

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**HEMIJSKI FAKULTET**



**Nikoleta M. LUGONJA**

**ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG  
POTENCIJALA HRANE ZA BEBE**

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2014.

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**  
**ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ**



**Николета М. ЛУГОЊА**

**ИСПИТИВАЊЕ АНТИОКСИДАТИВНОГ  
ПОТЕНЦИЈАЛА ХРАНЕ ЗА БЕБЕ**

**Докторска дисертација**

Београд, 2014.

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY**



**Nikoleta M. LUGONJA**

**EXAMINATION OF ANTIOXIDATIVE  
POTENTIAL OF INFANT FORMULA**

**Doctoral Dissertation**

Belgrade, 2014.

### **MENTORI:**

Dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor  
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Snežana D. Spasić, viši naučni saradnik  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju - Centar za  
hemiju u Beogradu

### **ČLANOVI KOMISIJE:**

Dr Ljuba M. Mandić, redovni profesor  
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Dragan M. Manojlović, redovni profesor  
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Stanislava Gorjanović, viši naučni saradnik  
Institut za opštu i fizičku hemiju u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Datum promocije doktorske disertacije:

*Mojim roditeljima*

*Milanu i Nevenki*

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju.*

*Temu za doktorsku disertaciju je predložio i neposredno rukovodio izradom prof. dr Miroslav M. Vroić, redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Želim da se zahvalim mentoru na lepoj temi kojom me usmerava kroz biohemiju hrane od diplomskog rada, preko magistrature do ove doktorske disertacije. Takođe se najiskrenije zahvaljujem na hemijskom i životnom znanju koje mi nesebično prenosi.*

*Dr Snežani Spasić želim da se zahvalim na podršci i savetima u toku izrade doktorske disertacije, kao na i pažljivom čitanju i korisnim sugestijama tokom pisanja.*

*Prof. dr Ljubi Mandić i Prof. dr Draganu Manojloviću zahvaljujem na pažljivom čitanju i korigovanju doktorske disertacije.*

*Dr Stanislavi Gorjanović se zahvaljujem na saradnji tokom izrade disertacije, kao i na korisnim sugestijama tokom pisanja.*

*Dr Aleksandri Nikolić-Kokić se zahvaljujem na podršci i pomoći tokom eksperimentalnog rada.*

*Dr Daliboru Stankoviću se zahvaljujem na saradnji i korisnim savetima u toku izrade doktorske disertacije.*

*Dr Gordani Gojgić-Cvijović i dr Dragici Jakovljević želim da se zahvalim na korisnim savetima i saradnji u toku izrade disertacije.*

*Mojim dragim kolegama dr Vladimiru Beškoskom, dr Mili Ilić, dr Jeleni Milić, dr Srđanu Miletiću, Jovani Stefanović Kojić i mr Jeleni Avdalović želim da zahvalim na savetima, saradnji i pozitivnoj atmosferi u laboratoriji u toku izrade doktorske disertacije.*

*Mojim roditeljima, Živoić Milanu i Nevenki, i bratu Miomiru želim da se zahvalim na neizmernoj veri, podršci, optimizmu i ljubavi koju sam dobila u toku svog školovanja.*

*Konačno, ogromno hvala mojoj dragocenoj porodici, suprugu Slobodanu, ćerki Bojani i sinu Konstantinu, koji su svojim smehom, radošću, prvim koracima, beskrajnim strpljenjem i ljubavlju doprineli oblikovanju ove doktorske disertacije.*

*Beograd,*

*Maj 2014.*

*Nikoleta Lugonja*

## ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA HRANE ZA BEBE

### IZVOD

Oksidativni stres se javlja još u toku neonatalnog perioda. U mlađem gestacionom dobu koje karakteriše slabiji antioksidativni kapacitet može doći do povećanog stvaranja slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da majčino mleko ima veoma veliki antioksidativni kapacitet u odnosu na infant formule, koje su zamena za majčino mleko. Antioksidanti majčinog mleka još uvek nisu kompletno definisani, ali najvažniji su superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, katalaza, vitamini C, A i E, koenzim Q, karotenoidi, cistein, koji sinergistički štite novorođenče od reaktivnih kiseoničnih vrsta u ranom životnom doba.

Cilj ove doktorske disertacije je proučavanje ukupnog antioksidativnog potencijala infant i prelaznih formula i mleka za malu decu do 3 godine starosti i njihovo poredjenje sa ukupnim antioksidativnim svojstvima zrelog majčinog mleka i standardnog konzumnog kravljeg mleka, kao referentnog.

Na osnovu dosadašnjih rezultata i aktuelnih naučnih saznanja u okviru ove oblasti istraživanja, u ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su moderne laboratorijske tehnike i instrumentalne metode za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala hrane za bebe. Karakterizacija antioksidativnog potencijala hrane za bebe urađena je na osnovu: enzimskih aktivnosti uzoraka (određivanje enzimske aktivnosti superoksid-dismutaze-SOD i glutation-peroksidaze-GSH-Px), ispitivanja antioksidativnog potencijala hrane za bebe različitim elektrohemijским metodama (potencijometrija, ciklična voltometrija, diferencijalna pulsna voltometrija, polarografija), elektron-paramagnetnom rezonancom (EPR) i spektrometrijskim metodama (UV/VIS). Testiran je



farmakološki efekat različitih uzoraka hrane za bebe i majčinog mleka ispitivanjem uticaja na relaksaciju glatkih mišića uterusa.

Majčino mleko poseduje direktne farmakološke relaksirajuće efekte, ispoljava opuštajući efekat na izolovani nevaskularni glatki mišić, za razliku od infant formula i obezbeđuje bolju antioksidacionu zaštitu u poređenju sa infant formulama, zbog prisustva specifičnih enzimskih komponenti kao što je enzim superoksid dismutaza. Ovi efekti mogu da budu prednost u bebinom gastrointestinalnom traktu, podržavajući normalan rad glatkih mišića i održavajući redoks homeostazu što može predstavljati mehanizam kojim dojenje doprinosi zdravlju beba. Iz rezultata različitih elektrohemijskih merenja može da se zaključi da najveći antioksidativni potencijal ima majčino mleko.

Antioksidativni potencijal majčinog mleka potiče od enzimskih komponenti mleka. Infant formule imaju antioksidativni potencijal koji potiče od neenzimskih komponenti (vitamina A, C, E,  $Fe^{2+}$ ,...), dok kravlje mleko UHT ima mali antioksidativni potencijal, zbog tretmana pri obradi i pakovanju mleka, kojim su uništene enzimske i vitaminske komponente.

Primenjene elektrohemijske metode mogu da budu veoma relevantne za brzo i rutinsko merenje ukupnog antioksidativnog potencijala mleka, infant formula i određivanje svežine mleka.

*Ključne reči: antioksidativni potencijal, hrana za bebe, majčino mleko, kravlje mleko, elektron-paramagnetna rezonanca, potenciometrija, ciklična voltometrija, diferencijalna pulsna voltometrija, polarografija*

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija hrane i ishrane

UDK broj:

## **DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANT POTENTIAL IN INFANT FORMULA AND BREAST MILK**

### **ABSTRACT**

Oxidative stress occurs even during the neonatal period. At the younger gestational age, which is characterized by weaker antioxidant capacity, increased production of free radicals and reactive oxygen species is possible. Previous research has found that breast milk has very high antioxidant capacity compared to infant formula, which are a substitute for breast milk. Breast milk antioxidants are not fully defined yet, but the most important ones are superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, vitamins C, A and E, coenzyme Q, carotenoids, cysteine, which synergistically protect infants from reactive oxygen species at an early age.

The objective of this dissertation is the study of total antioxidant potential of infant, follow-on and toddler formulas for children under 3 years of age and their comparison with the overall antioxidant properties of mature breast milk and standard cow's milk as a reference.

Based on previous results and current scientific knowledge in this field of research, modern laboratory techniques and instrumental methods for the determination of total antioxidant potential of baby food were applied within this dissertation. Characterization of the antioxidant potential of baby food was performed on the basis of: enzyme activity (determining the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px)), testing the antioxidant potential using various electrochemical methods (potentiometry, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, and polarography), electron paramagnetic resonance and spectrometric methods.

The pharmacologic effects of various samples of breast milk and formulas were examined by studying their effects on the rat uterine smooth muscle contraction.

Human milk has direct pharmacologic relaxation effects, it induces relaxation of the isolated non-vascular muscle, unlike infant formulas, and provides better antioxidant protection compared with infant formulas due to the presence of specific enzymatic components, such as human superoxide dismutase. These effects can have a beneficial effect on the infant's gastrointestinal tract by supporting the normal work of smooth muscles and maintaining redox homeostasis, which might represent one of the mechanisms by which breast-feeding provides health benefits. Based on the results of various electrochemical measurements it can be concluded that breast milk has the highest antioxidant potential. The results of different electrochemical measurements have shown that breast milk has the highest antioxidant potential.

The antioxidative potential of breast milk comes from the enzymatic components of milk. Infant formulas have antioxidant potential that comes from non-enzymatic components (vitamins A, C, E, Fe<sup>2+</sup>, etc.), while cow's milk has the lowest antioxidant potential due to the treatment it undergoes during processing and packaging, by which the enzymatic and vitamin components were destroyed.

The applied electrochemical methods could be highly relevant for quick and routine measurement of total antioxidant capacity of milk and infant formula and of the freshness of milk.

*Key words: antioxidant potential, infant formula, human breast milk, cow's milk, electron paramagnetic resonance, potentiometry, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, polarography*

Science topic: Biochemistry

Topic field: Food biochemistry

UDC number:

**SPISAK SKRAĆENICA**

AA - Arahidonska kiselina  
ABTS - 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)  
AO - Antioksidant  
AOA - Antioksidativna aktivnost  
AOS - Antioksidativni zaštitni sistem  
BMPO - 5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi  
CAT - Katalaza  
CV - Ciklična voltametrija  
DEPMPO - 5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi  
DHA - Dokozaheksaenoinska kiselina  
DMPO - 5,5-dimetil-pirolin-N-oksidi  
DPPH - 2,2-difenil-1-pikril-hidrazin  
DPV - Diferencijalna pulsna voltametrija  
DTNB - 5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoeva kiselina  
EOMA - Elementarna organska mikroanaliza  
EPR - Elektron-paramagnetna rezonanca  
ESR - Elektron-spin-rezonanca  
ET metode - Metode bazirane na reakciji transfera singletnog elektrona  
FC - Folin-Ciocalteu  
FCR - Folin-Ciocalteu reagens  
FRAP - Metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe(III)-kompleksom  
GC - Elektroda od staklastog ugljenika  
GR - Glutation-reduktaza  
GS• - Glutation-tiil radikal  
GSH - Glutation  
GSH-Px - Glutation-peroksidaza  
HAT metode - Metode bazirane na reakcijama transfera atoma vodonika  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Vodonik-peroksid  
HPMC - Polarografska metoda  
IF - Mlečna formula za ishranu odojčadi, beba i male dece  
ISE - Jon-selektivna elektroda  
IP3 - Inozitol-3-fosfat  
KM - Kravlje mleko  
KŽE - Kapljuča živina elektroda  
LCP - Dugolančane polinezasićene masne kiseline  
LOO• - Lipidperoksil-radikal  
MLCK- Miozin kinaza lakog lanca  
MM - Zrelo majčino mleko  
NADPH - Nikotinamidadenindinukleotid-fosfat  
NK - Natural killer, ćelije ubice  
NO• - Azot-oksidi radikal  
NOS - Azot-oksidi-sintaze  
NPV - Normalna pulsna voltametrija

O<sub>2</sub>• - Superoksid-anjon  
•OH - Hidroksil-radikal  
ONOO• - Peroksinitrit  
ORAC - Metoda određivanja kapaciteta apsorbanse kiseoničnog radikala  
PH GSH-Px - Fosfolipid-hidroperoksid-glutation-peroksidaza  
PDI - Protein-disulfid-izomeraza  
ROO• - Alkil-peroksi-radikal  
ROS - Reaktivna kiseonična vrsta  
RS• - Tiil-radikal  
RSS• - Pertiil-radikali  
R<sub>2</sub>S<sup>+</sup> - Sumpor-centrirani radikal-katjon  
SeGPx - Selen-zavisna glutacion-peroksidaza  
SOD - Superoksid-dismutaza  
TO• - Tokoferil-radikal  
TEAC - Metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta preko Trolox ekvivalenta  
XO - Ksantin-oksidadaza

## SADRŽAJ

I	UVOD	1
II	PREGLED LITERATURE	5
2.1.	Ćelijski antioksidativni sistem zaštite	6
2.2.	Antioksidanti	11
2.2.1.	Enzimski sistemi antioksidativne zaštite	14
2.2.1.1.	Superoksid-dismutaza	15
2.2.1.2.	Katalaza	16
2.2.1.3.	Glutation-peroksidaza	17
2.2.1.4.	Glutation-reduktaza	18
2.2.2.	Neenzimski sistemi antioksidativne zaštite	19
2.2.2.1.	Vitamin E	20
2.2.2.2.	Vitamin C	20
2.2.2.3.	Glutation	21
2.3.	Mehanizam dejstva antioksidanata	24
2.4.	Metode određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala	26
2.4.1.	Metode bazirane na reakciji transfera singletnog elektrona	27
2.4.1.1	DPPH metoda za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala	27
2.4.1.2.	Primena Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala	28
2.4.2.	Metode bazirane na reakcijama transfera atoma vodonika	29
2.4.3.	Ostale metode	30
2.5.	Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija	33
2.5.1.	Elektron-paramagnetna rezonantna detekcija dugoživećih paramagnetnih vrsta	36
2.5.2.	Elektron-paramagnetna rezonantna spin-trapping detekcija kratkoživećih slobodnih radikala	37
2.5.2.1.	Reaktivne kiseonične vrste	37
2.5.2.2.	Reaktivne vrste azota	38
2.5.2.3.	Ugljenik-centrirani radikali	39
2.5.2.4.	Sumpor-centrirani radikali	39
2.5.3.	Elektron-paramagnetna rezonantna spin-trapping detekcija u istraživanjima antioksidanata	43
2.6.	Elektrohemijske metode određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala	45
2.6.1.	Redoks potencijometrija	47

2.6.2.	Ciklična voltometrija	50
2.6.3.	Diferencijalna pulsna voltometrija	53
2.6.4.	Klasična polarografija	55
2.7.	Majčino mleko	60
2.7.1.	Sastav majčinog mleka	60
2.7.2.	Antioksidativne osobine majčinog mleka	62
2.7.3.	Farmakološki značaj majčinog mleka	65
2.7.3.1.	Reproduktivni sistem ženke pacova	65
2.7.3.2.	Glatki mišići - Studija kontrakcije nevaskularnog glatkog mišića	68
2.8.	Hrana za bebe - infant formule	73
III	MATERIJAL I METODE	77
3.1.	Uzorci hrane za bebe	78
3.2.	Izolovanje vodene faze uzoraka hrane za bebe	83
3.3.	Antioksidativna aktivnost enzima u uzorcima hrane za bebe	84
3.3.1.	Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze	84
3.3.2.	Određivanje aktivnosti katalaze	86
3.3.3.	Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze	87
3.4.	Određivanje sadržaja slobodnih -SH grupa	89
3.5.	Određivanje koncentracije proteina u uzorcima hrane za bebe	90
3.5.1.	Određivanje koncentracije proteina po Lowry metodi	90
3.5.2.	Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom	91
3.6.	Određivanje sadržaja suve supstance	93
3.7.	Elementarna organska mikroanaliza i proteinski ekvivalent	93
3.8.	Određivanje koncentracije laktoze	93
3.9.	Ispitivanje kontrakcije nevaskularnog glatkog mišića	98
3.10.	Elektron-paramagnetna rezonanca uzoraka hrane za bebe	100
3.11.	Potenciometrijska titracija uzoraka hrane za bebe	101
3.12.	Ciklična voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija uzoraka hrane za bebe	101
3.13.	Polarografija uzoraka hrane za bebe	102
3.14.	Sposobnost hvatanja DPPH radikala	104
3.15.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom	105
3.16.	Statistička analiza	106
IV	REZULTATI	108
4.1.	Ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u uzorcima hrane za bebe	109
4.2.	Ispitivanje aktivnosti antioksidanata u uzorcima hrane za bebe primenom elektron-paramagnetne rezonance	115



4.3.	Farmakološka ispitivanja - ispitivanje kontrakcije nevaskularnog glatkog mišića dejstvom različitih uzoraka hrane za bebe	120
4.4.	Potenciometrijsko određivanje antioksidativnog potencijala uzoraka hrane za bebe	124
4.5.	Određivanje antioksidativnog potencijala uzoraka hrane za bebe cikličnom voltametrijom	129
4.5.1.	Optimizacija uslova merenja metodom ciklične voltametrije	129
4.5.2.	Određivanje antioksidativnog potencijala uzoraka hrane za bebe	133
4.6.	Određivanje antioksidativnog potencijala hrane za bebe diferencijalnom pulsnom voltametrijom	139
4.7.	Polarografsko određivanje antioksidativnog potencijala uzoraka hrane za bebe	144
4.8.	Statistička analiza varijanse različitih elektrohemijskih metoda	150
V	DISKUSIJA	153
VI	ZAKLJUČCI	160
VII	LITERATURA	164
VIII	BIOGRAFIJA	

# I UVOD

Istraživanja svojstava, upotrebe i izvora egzogenih antioksidanata, naročito fenolnih komponenti, flavonoida, vitamina, sintetičkih hemikalija i nekih mikro nutrijenata počela su krajem 18. veka (Gutteridge & Halliwell, 2010). Od tada su istraživanja antioksidanata (AO) dobila na značaju i objavljeni su radovi na ovu temu, što je dovelo do njihove intenzivne upotrebe u cilju očuvanja optimalnog zdravlja (Halliwell, 2009). Brojni dijetetski proizvodi i dodaci ishrani se konstantno obogaćuju prirodnim ili sintetičkim antioksidantima.

Oksidacija je glavni uzrok štetnih promena kvaliteta i ukusa hrane, promene njene boje i teksture, a takođe vodi i gubitku nutritivne vrednosti ili kvarenju hrane. Oksidativni stres može modifikovati DNK, proteine i male ćelijske molekule, i smatra se da ima značajnu ulogu u nastanku bolesti, kao što je kancer, ateroskleroza, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, neurološke bolesti i Alchajmerova bolest (Friel i sar., 2004.).

Kiseonik je potencijalno toksičan, jer može da učestvuje u produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). ROS imaju sposobnost da interaguju i oksidacijom menjaju esencijalne ćelijske molekule, pa su stoga citotoksične. Antioksidativni mehanizmi odbrane organizma mogu da spreče proizvodnju ili da neutralizuju ROS (Tsukahara, 2007). Kada produkcija ROS premaši kapacitet antioksidativne odbrane, kojom se organizam detoksifikuje, nastaje stanje poznato kao oksidativni stres. Poznato je da oksidativni stres učestvuje u patogenezi brojnih neonatalnih bolesti, kao bronhopulmonarna displazija, retinopatija prevremeno rođene dece i enterokolitis (Scheibmeir i sar., 2005; Thompson & Bizzarro, 2008.).

Humano majčino mleko sadrži mnogo bioaktivnih komponenti koje doprinose poboljšanju zdravlja (Atkinson i sar., 1981) i štite novorođenče od hiperoksične sredine, nakon prelaza novorođenčeta u sredinu bogatu kiseonikom u odnosu na intrauterinu sredinu (Hamosh, 2001; Oddy, 2002).

Brojni odbrambeni mehanizmi povezani sa različitim sastojcima majčinog mleka stimulišu imuni sistem, poboljšavaju rast zdrave mikroflore, olakšavaju razvoj endogenih odbrambenih mehanizama koji štite od neonatalnih bolesti u poređenju sa ishranom beba infant formulama (Oddy, 2002).

U ishrani odojčadi ne upotrebljava se rutinski kravlje mleko, već se ono modifikuje u infant formule, koje se koriste kao hrana za odojčad i bebe kada majke nisu u mogućnosti da doje. Međutim, prema istraživanju koje je objavio Goldman (Goldman i sar., 1990) mnogi antioksidativni faktori, su odsutni ili slabo prisutni u kravljem mleku i infant formulama, u odnosu na nivo nekih plazma antioksidanata kod novorođenčadi koji zavisi od ishrane majčinim mlekom. Van Zoeren-Grobbe i sar. (Van Zoeren-Grobbe i sar, 1994.) su objavili da prevremeno rođene bebe, koje su hranjene majčinim mlekom, imaju veću sposobnost uklanjanja peroksil-radikala u plazmi *in vitro* u odnosu na kontrolnu grupu odojčadi hranjene infant formulama. Mleko majki prevremeno rođene dece se razlikuje po sastavu od mleka majki terminske dece (Lonnerdal & Atkinson, 1995).

Razvijene su različite metode za merenje pojedinačnih antioksidativnih aktivnosti u biološkim tečnostima (Huang i sar., 2005; Janaszewska & Bartosz, 2002). Ove metode su korisne za dobijanje celokupne slike o antioksidativnoj aktivnosti u telesnim tečnostima i njihovim promenama u različitim uslovima (Friel i sar., 2002). Poznate su koncentracije individualnih antioksidanata u mleku (Sakurai i sar., 2005; Gossage i sar., 2002; Barbas & Herrera, 1998), ali je od izuzetnog značaja odrediti ukupan antioksidativni potencijal mleka.

Cilj ove disertacije je da pruži nove podatke o značaju humanog majčinog mleka i infant formula u sprečavanju oksidativnog stresa određivanjem ukupnog antioksidativnog potencijala.

Određena je aktivnost ključnih antioksidativnih enzima: superoksid-dismutaze (SOD), glutation-peroksidaze (GSH-Px), katalaze (CAT), kao i sadržaj sulfhidrilnih grupa (-SH). Spektroskopskim ispitivanjem, primenom elektron-paramagnetne rezonance (EPR) uz spin trapping, testirana je sposobnost majčinog mleka i infant formula da smanjuju proizvodnju slobodnih radikala u Fentonovom sistemu. Ispitan je direktni farmakološki efekat majčinog mleka i različitih infant formula na relaksaciju nevaskularnih glatkih mišića i uticaj relaksirajućeg efekta majčinog mleka na odojče. Za ovaj tip studije veoma je pogodan izolovani uterus pacova, zbog prisustva kompleksnih sistema signalne transdukcije, visokog nivoa membranskih receptora i redoks osetljivosti glatkih mišića uterusa (Appiah i sar., 2009).

Pored toga, cilj disertacije je bio da se primene elektrohemijske metode (potenciometrija, ciklična voltometrija, diferencijalna pulsna voltometrija i klasična polarografija) kojima se može relativno lako i jednostavno odrediti ukupan antioksidativni potencijal svežeg mleka, bez tretmana i određivanja pojedinačnih komponenti koje utiču na antioksidativnu aktivnost (AOA), na fiziološkom pH.

## **II PREGLED LITERATURE**

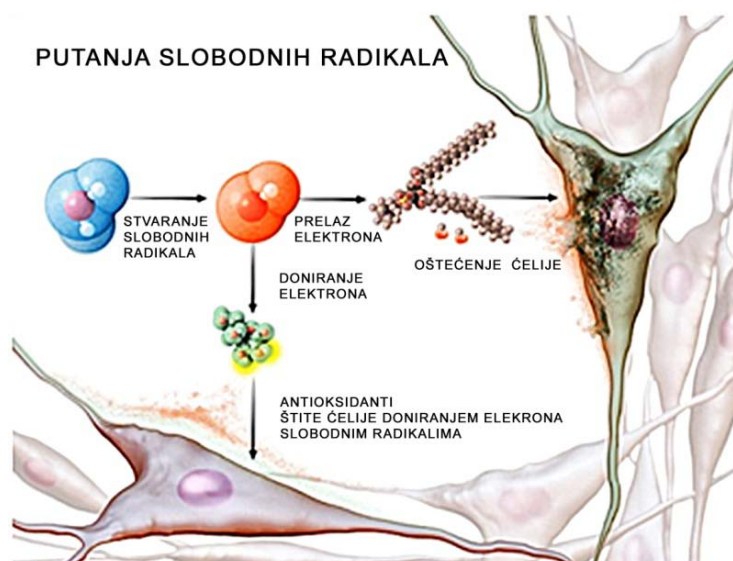
## 2.1. ĆELIJSKI ANTIOKSIDATIVNI SISTEM ZAŠTITE

Antioksidativna zaštita je skup enzimskih i neenzimskih komponenti koji u zdravom organizmu funkcioniše neprekidno i ima za cilj da spreči štetno delovanje prooksidativnih faktora. Iako je kiseonik neophodan za život, to samo po sebi ne znači da nije opasan za njegovo očuvanje. U procesu ekstrakcije energije, ćelije koriste kiseonik, koji stvara i proizvode poznate kao slobodni radikali.

Do sada je u različitim studijama dokazano da se oko 5 % inhaliranog kiseonika metaboliše u ćelijama i prevodi u reaktivne kiseonične vrste (ROS) kao što su superoksid-anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i organski peroksidi, i hidroksil- radikal ( $\bullet OH$ ) (Kulkarni i sar., 2008; Bandyopadhyay i sar., 1999). ROS su neophodni za signalne putanje bioloških procesa (Živković i sar., 2009; Spasojević i sar., 2009), kao što su ćelijska migracija, proliferacija stem ćelija i neurogeneza (Dickinson & Chang, 2011).

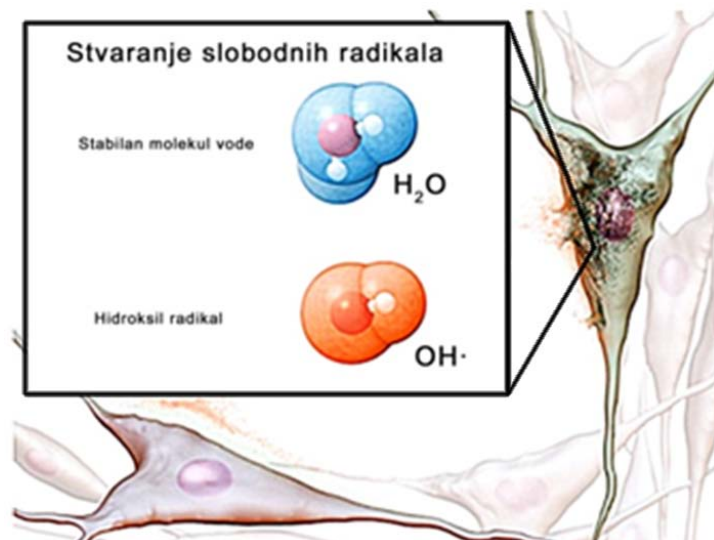
Slobodni radikali nastali tokom normalnog aerobnog metabolizma se uglavnom uklanjaju ili inaktiviraju *in vivo* antioksidantima (Alam & Bristi, 2013). Individualni članovi antioksidativnog odbrambenog tima su raspoređeni da štite od generisanja ROS, da unište potencijalne oksidante i uklone ROS. Tako je tkivno oštećenje indukovano oksidativnim stresom minimizirano. Apsolutni ili relativni deficit antioksidativne odbrane dovodi do pojačanog oksidativnog stresa, a to dalje može biti povezano sa uzrokom i posledicom mnogih bolesti.

Kod zdravih osoba, ROS se efikasno eliminišu odbrambenim enzimima superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza, katalaza, i neenzimskim antioksidantima kao što su glutation, vitamin A, askorbinska kiselina, mokraćna kiselina, hidrohinoni i vitamin E (Jia i sar., 2008). Kada produkcija ROS premaši sposobnost hvatanja odbrambenog sistema, dešava se oksidativni stres koji uzrokuje disfunkcionisanje ćelijskog metabolizma (Slika 1. A-E). Dodatno, ROS indukovana oksidacija makromolekula kao što su lipoproteini, DNK i RNK ugrožava integritet ćelije (Cooke i sar., 2003).

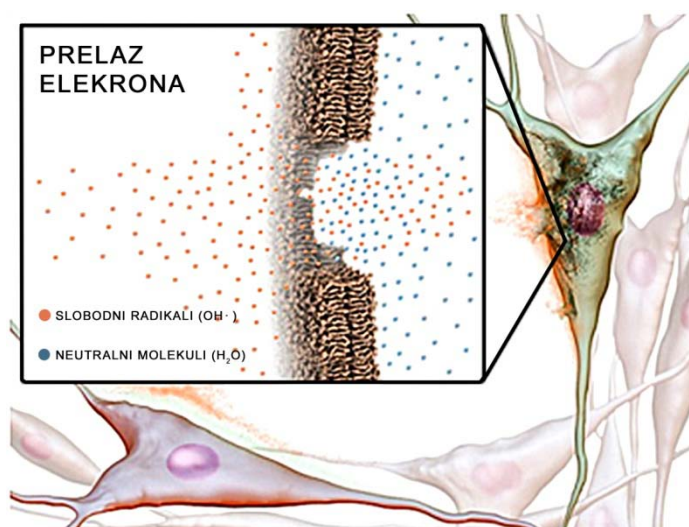


(A) Putanja nastanka i delovanja slobodnih radikala na ćelije

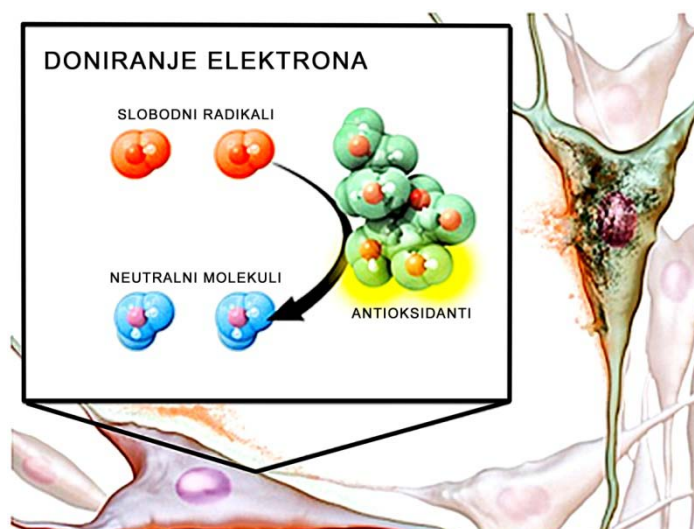




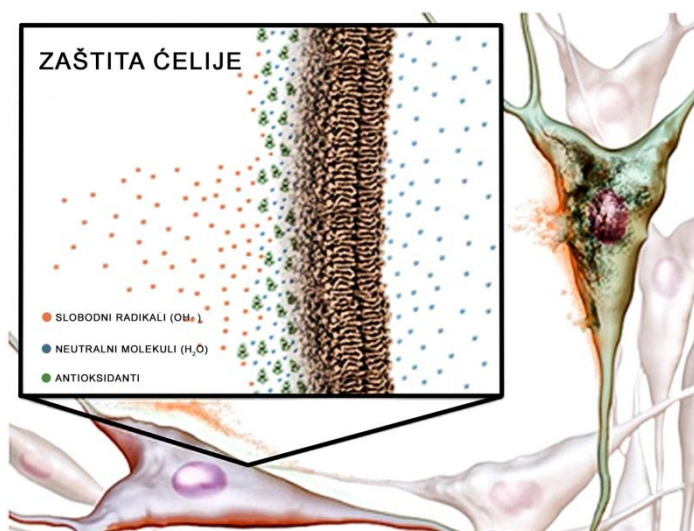
(B) Slobodni radikali (narandžasto) su veoma nestabilni i brzo reaguju sa drugim molekulima od kojih uzimaju elektrone da bi postigli stabilnost. Dejstvom ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , ili  $\cdot OH$ ) nastaju oštećenja na membrani.



(C) Kada napadnuti molekul izgubi elektron, postaje slobodni radikal i počinje lančanu reakciju.



(D) Antioksidanti (modeli molekula zelene boje) doniraju elektrone slobodnim radikalima, neutrališu ih i štite membranu.



(E) Zaustavlja se napad na ćeliju i prekida oksidativna lančana reakcija.

Slika 1. Reaktivne kiseonične vrste i antioksidativni mehanizmi (San Miguel i sar., 2011.)

Još uvek nije utvrđeno da li je nekontrolisano stvaranje ROS uzrok ili prateća posledica nekoliko bolesti (Sedelnikova i sar., 2010; Valko i sar., 2007), ali je oksidativni stres koji izazivaju povezan sa kardiovaskularnom disfunkcijom (Higashi i sar., 2009; Rocha i sar., 2010), kancerom (Poulsen & Loft, 1996; Waris & Ahsan, 2006), reumatoidnim artritismom (Phillips i sar., 2010; Mirshafiey & Mohsenzadegan, 2008), inflamatornim odgovorom (Wiseman & Halliwell, 1996), dijabetesom (Rains & Jain, 2011), starenjem (Kondratova & Kondratov, 2012) i neurodegenerativnim stanjima (Uttara i sar., 2009) kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest (Pimentel i sar., 2012; Barnham i sar., 2004).

Reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao što je na primer  $O_2^{\bullet-}$ , stvaraju se u ćelijama dejstvom različitih oksidaza, ksantin-oksidaza (XO) i NADPH oksidaze.  $H_2O_2$ , koji je proizvod oksidaza ili SOD uzrokovanih dismutacija  $O_2^{\bullet-}$ , je dugoživeći molekul, sposoban da migrira sa mesta produkcije (Chevion i sar., 1993). Postoje šest različitih reaktivnih kiseoničnih vrsta koji prouzrokuju oštećenja u organizmu ljudi. Ove vrste su superoksidni anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), peroksil radikal ( $ROO^{\bullet}$ ), hidroksil radikal ( $^{\bullet}OH$ ), singletni kiseonik ( $^1O_2$ ) i peroksinitrit ( $ONOO^-$ ). Problem nastaje kada  $H_2O_2$  interaguje sa prelaznim metalima, kao što su bakar i/ili gvožđe, koji se oslobađaju iz metaloproteina u toku ishemijske patologije, produkujući veoma reaktivni hidroksil-radikal,  $^{\bullet}OH$  (Fenton-ova reakcija) (Berka i sar., 1998).

Pored ROS, u organizmu su prisutne reaktivne vrste azota (RNS) kao što su azot-oxid ( $NO^{\bullet}$ ), azot-dioksid i azot-trioksid.  $NO^{\bullet}$  je proizvod enzima azot-oxid-sintaze (NOS) (Becker i sar., 2004) i uključen je u neurotransmisiju, regulaciju krvnog pritiska, relaksaciju glatkih mišića i procese imunoregulacije.

U toku zapaljenskih procesa aktivirana je proizvodnja  $O_2^{\bullet-}$  i  $NO^{\bullet}$ . U ovim uslovima ovi radikali međusobno reaguju i proizvode peroksinitrit (ONOO-), veoma moćan oksidujućí molekúl koji izaziva nitraciju proteina i fragmentaciju DNA. Jedan od načina prevencije ovih bolesti je korišćenje antioksidanata koji bi smanjili štetno oksidativno stanje (Kohen & Nyska, 2002).

## 2.2. ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti su supstance koje, u niskim koncentracijama, sprečavaju ili usporavaju oksidaciju biomolekula, kao što su lipidi, proteini i DNA (Becker i sar, 2004). Antioksidanti mogu imati različitu ulogu u sprečavanju oksidacije i to kao redukujućí agensi, helatori ili čistači slobodnih radikala.

Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala, odnosno redoks stanja sistema nije lak zadatak i još uvek ne postoje univerzalno prihvaćene procedure. Oksido-redukциони procesi se definišu u odnosu na transfer elektrona između komponenti. Redoks ili oksidoredukциони potencijal, koji je indikacija unutrašnjeg biološkog sistema, može da se definiše kao mera sposobnosti hemijskog/biohemijskog sistema da se oksiduje (izgubi elektrone) ili redukuje (primi elektrone) (Kohen & Nyska, 2002). Redoks potencijal opisuje Nernst-ova jednačina, koja pretpostavlja reverzibilan transfer elektrona između svih vrsta.

U hemiji životne sredine i fizičkoj hemiji, vrednost redoks potencijala se koristi za određivanje oksidacione ili redukcionne moći supstance. Međutim, u biohemiji, elektrohemijska mera oksidacione i redukcionne moći supstance je antioksidativna aktivnost (AOA). Po definiciji, antioksidativna aktivnost je

sposobnost jedinjenja da inhibira oksidativnu degradaciju (Roginsky & Lissi, 2005), to je akumulacija svih redoks parova u sistemu.

U hemiji hrane, antioksidant se definiše kao supstanca u hrani koja, kada je prisutna u niskim koncentracijama u odnosu na supstrat koji može da se oksiduje, značajno smanjuje ili sprečava štetne efekte reaktivnih vrsta na normalnu fiziološku funkciju kod ljudi (Halliwell i sar., 1995; Huang i sar., 2005). Prema ovoj definiciji, reduktanti koji su uključeni u hemijske reakcije nisu svi antioksidanti; samo one komponente koje su sposobne da zaštite biološke mete od oksidacije zadovoljavaju ovaj kriterijum (Karadag i sar, 2009).

Antioksidativna aktivnost u hrani se može posmatrati preko antioksidativnog potencijala i biološkog efekta. Antioksidativni potencijal se definiše kao antioksidativni sastav i antioksidativne osobine sastojaka, a biološki efekat zavisi od antioksidativne biodostupnosti. Prvo je predmet hemije hrane, a drugo je bio-medicinski problem, a najčešće se razmatraju zajedno.

Izvršena je podela antioksidanata prema nivou i načinu delovanja (Shi i sar., 2001) u ljudskom organizmu na:

- Preventivne antioksidante, koji sprečavaju nastanak slobodnih radikala.
- "Skevindžer - hvatač" antioksidante, koji poseduju sposobnost da "hvataju" slobodne radikale.
- "Reparacione" antioksidante, koji deluju posebnim mehanizmima, obnavljajući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. U "reparacione" antioksidante ubrajaju se fosfolipaze, proteaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze, itd. (Ohshima i sar., 1998)

Prema mestu nastajanja antioksidanti značajni za ljudski organizam dele se na:

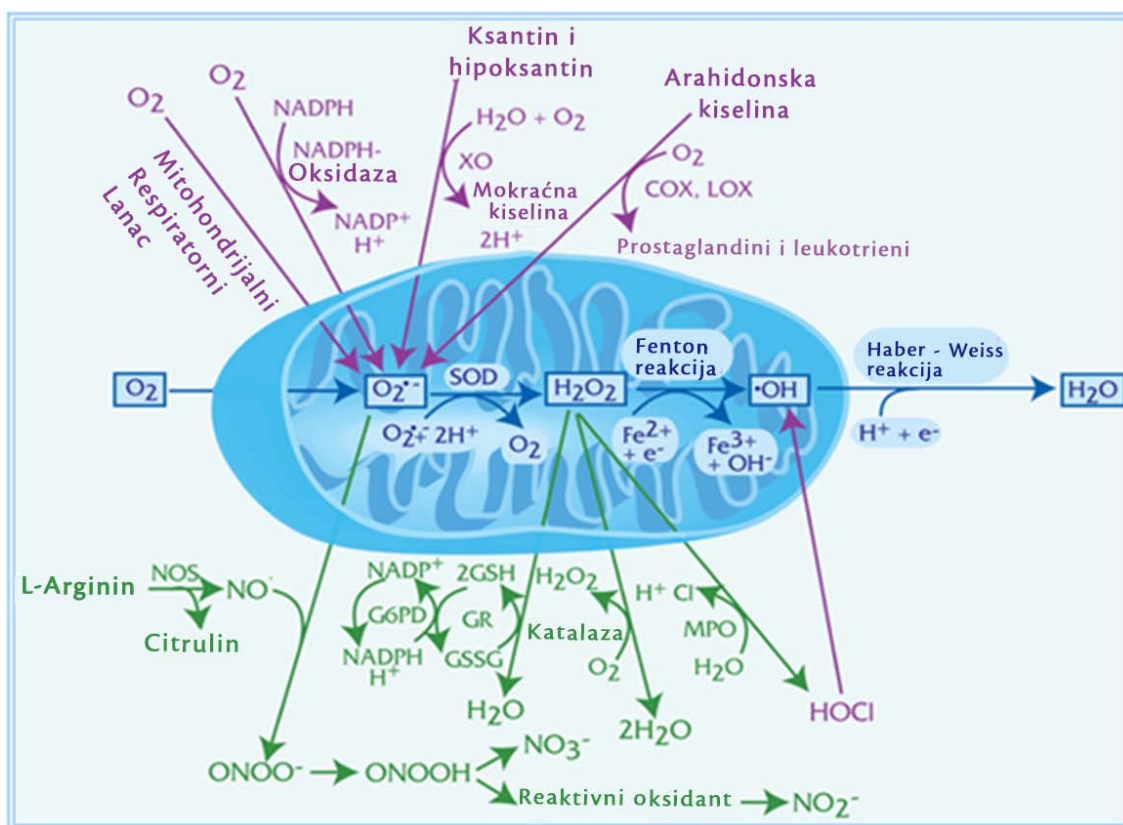
- Endogeni antioksidanti predstavljaju antioksidante koji nastaju u ljudskom organizmu.
- Egzogeni antioksidanti unose se putem hrane ili lekova (npr. fenolna jedinjenja (Ruberto i sar., 2007) su jedna od najvažnijih grupa prirodnih egzogenih antioksidanata, čija je aktivnost uslovljena strukturnim karakteristikama).
- Sintetički antioksidanti pripadaju grupi egzogenih antioksidanata za sve organizme.

Ratnam i sar. su jednostavno definisali antioksidante kao supstance koje neutrališu slobodne radikale i na taj način sprečavaju oksidativna oštećenja. Postoje dve grupe endogenih antioksidanata: enzimski i neenzimski antioksidanti. Enzimski antioksidanti obuhvataju primarne enzime, superoksid-dismutazu, katalazu i glutacion-peroksidazu, i sekundarne enzime glutacion-reduktazu i glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu (Ratnam i sar., 2006). Neenzimski antioksidanti mogu biti hidrosolubilni (vitamin C i fenolne komponente) ili liposolubilni (vitamin E i karotenoidi) biomolekuli (Podsędek i sar., 2007).

Nekoliko koncepata je uobičajeno u oblasti istraživanja antioksidanata, sinergizam, antagonizam, usporavanje oksidacije i biodostupnost. Sinergizam označava mehanizam u kojem brojne komponente (primer biljni ekstrakti ili hrana), kada su prisutne zajedno, imaju izraženiji efekat u odnosu na zbir efekata pojedinačnih komponenti. Antagonizam predstavlja suprotan efekat sinergizmu, gde se kombinovan efekat komponenti smanjuje u odnosu na pojedinačne efekte. Antioksidanti usporivači su komponente koje smanjuju brzinu oksidacije. Biodostupnost se odnosi na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju antioksidativnih komponenti i njihovu mogućnost da proizvedu određeni biološki efekat (Cornelli et al., 2001).

### 2.2.1. ENZIMSKI SISTEMI ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

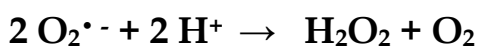
Biološki sistemi imaju nekoliko endogenih antioksidativnih mehanizama za kontrolu oksidativnih procesa. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS) obuhvata primarnu i sekundarnu antioksidativnu zaštitu. Primarna antioksidativna zaštita sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenata. Ovi sistemi obuhvataju enzimske komponente kao što su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px) i glutation-reduktaza (GR) (Slika 2). Pored ova tri enzima, enzimskoj kontroli kiseoničnih radikala i njihovih proizvoda doprinose i enzimi glutation-transferaza, ceruloplazmin, hemokisgenaza i drugi (Masella i sar., 2005).



Slika 2. Prikaz ćelijskog antioksidativnog zaštitnog sistema (McAnalley S i sar., 2003)

### 2.2.1.1. SUPEROKSID-DISMUTAZA

Svi aerobni organizmi, neki anaerobni organizmi i obligatni anaerobi, sadrže superoksid-dismutazu. Do danas je utvrđeno postojanje četiri oblika ovog enzima: CuZn-SOD, Mn-SOD, FeSOD i NiSOD. Ekstracelularna (EC SOD) sadrži Cu i Zn, ali se razlikuje od citosolne CuZnSOD. Svi deluju po sličnom mehanizmu pri kome se jon metala u aktivnom centru prvo redukuje, a onda reoksiduje.



Mn SOD, sadrži mangan u aktivnom centru koji menja valentno stanje između +3 i +2. Prisutna je u ćelijama prokariota, gde je izgrađena od 2 subjedinice i u mitohondrijama eukariota, gde je izgrađena od 4 subjedinice. Nije osetljiva na dejstvo CN- jona, ali gubi aktivnost tretmanom sa smešom hloroforma i etanola. Fe SOD i Mn SOD su sličnog aminokiselinskog sastava i oba se razlikuju od CuZn SOD, što dokazuje da Mn SOD i Fe SOD pripadaju jednoj a CuZn SOD drugoj evolucionoj liniji.

CuZnSOD se sastoji iz 2 subjedinice od kojih svaka sadrži po jedan jon i bakra i cinka. Katalitička aktivnost enzima je vezana za bakar i on menja valentno stanje između +2 i +1, dok cink stabilizuje konformaciju enzima. CuZnSOD se uglavnom nalazi u citosolu, endoplazmatičnom retikulumu i međumembranskom prostoru mitohondrija eukariota. Osetljiva je na dejstvo cijanida.

EC-SOD (ekstracelularna forma CuZnSOD) je tetramerni protein sa po jonom Cu i Zn u svakoj podjedinici. Ima veliki afinitet za glikozaminoglikane (heparin i heparan sulfat).

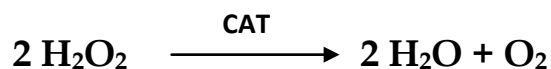


U ćelijama sisara aktivnost SOD je najveća u onim tkivima koja i najviše koriste kiseonik, npr. mozgu, jetri, srcu, bubrezima. Izlaganje mnogih organizama višim koncentracijama kiseonika dovodi do povećane produkcije SOD. Manjak Cu, kao i Zn može dovesti do smanjene aktivnosti SOD više nego drugih enzima, isto kao i vodonik-peroksid koji je inhibira.

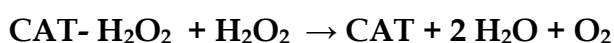
Citosolna i mitohondrijska SOD prisutne su u zrelom majčinom mleku (Kiyosawa & Matuyama, 1993). Značajno je naglasiti da je ukupna koncentracija SOD u majčinom mleku 5 puta manja nego u humanoj plazmi, ali 2 do 3 puta veća nego u kravljem mleku (Kiyosawa & Matuyama, 1993; Holbrook & Hicks, 1978). Utvrđene su značajne promene u SOD aktivnosti u različitim fazama laktacije kod žena, pri čemu su najveće vrednosti u trećoj nedelji laktacije (Kasapović i sar., 2005).

#### 2.2.1.2. KATALAZA

Katalaza (CAT) je enzim koji katališe razgradnju vodonik-peroksida do vode i molekulskog kiseonika (Loew, 1900):



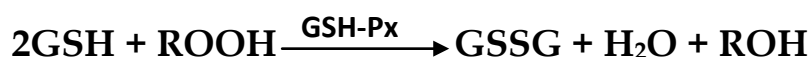
CAT se sastoji od 4 subjedinice od kojih svaka sadrži hem (Fe-III protoporfirin) u aktivnom centru, kao i molekul NADPH koji stabilizuje enzim. Reakcija razgradnje vodonik-peroksida se odvija veoma brzo, prema sledećim jednačinama:



Većina aerobnih organizama sadrži katalazu, osim nekih bakterija, modrozelenih i zelenih algi. Kod životinja najveća aktivnost CAT je vezana za peroksizome, mada je nešto aktivnosti nađeno i u mitohondrijama, endoplazmatskom retikulumu i hloroplastima, a u sisarskim eritrocitima katalaza je smeštena u citosolu. U peroksizomima postoji stalna produkcija vodonik-peroksida, jer ove organele sadrže enzime koji generišu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (glikolat-oksidaza, urat-oksidaza, flavoprotein-dehidrogenaza), pa je sasvim razumljivo što 40% svih proteina peroksizoma čini upravo ovaj enzim. Katalaza u poređenju sa glutation-peroksidadom ima mali afinitet prema vodonik-peroksidu. Zato se smatra da pri manjim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veći značaj ima glutation-peroksidaza, dok katalaza efikasno razgrađuje visoku koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na ovaj način obezbeđuje se sigurno uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čak i ako neki od sistema otkaže.

### 2.2.1.3. GLUTATION-PEROKSIDAZA

Glutation-peroksidaza katalizuje glutation-zavisnu redukciju vodonik-peroksida u vodu, i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole, u reakciji sa glutationom (GSH), koji tom prilikom prelazi u oksidovanu formu GSSG (Michiels i sar., 1994).



Glutation-peroksidaza je prisutna u svim ćelijama kičmenjaka, dok je beskičmenjaci, više biljke i bakterije ne sadrže. U organizmu sisara najveća aktivnost ovog enzima je prisutna u jetri. U ćeliji, GSH-Px je prisutna u citosolu i mitohondrijama.

Postoje tri oblika enzima GSH-Px:

- Selen-zavisna glutation-peroksidaza (SeGPx) je tetramerni protein, sastavljen od četiri subjedinice sa po jednim jonom Se u aktivnom centru u obliku selenocisteina.
- Selen-nezavisna glutation-peroksidaza ne sadrži selen u aktivnom centru. Pretpostavlja se da pripada familiji enzima glutation S-transferazne aktivnosti, koja katalizuje redukciju samo organskih hidroperoksida.
- Fosfolipid-hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH GSH-Px) može da redukuje fosfolipidne hidroperokside, perokside holesterola i vodonik-hidroperokside. Monomer je, a u aktivnom centru sadrži selenocistein. Nalazi se u citosolu. Jedini je oblik glutation-peroksidaze koja ima sposobnost da direktno reaguje sa lipidnim hidroperoksidima u ćelijskoj membrani i da inhibira procese lipidne peroksidacije, uz obavezno prisustvo fizioloških koncentracija vitamina E .

#### 2.2.1.4. GLUTATION-REDUKTAZA

Glutation-reduktaza katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani glutation (GSH), uz učešće NADPH kao redukujućeg kofaktora.



GR je dimer sastavljen od dve proteinske subjedinice, od kojih svaka sadrži po jedan molekul FAD u aktivnom centru. U ćelijama sisara, GR se nalazi u citosolu i mitohondrijama, a glavna metabolička funkcija ovog enzima je da održava glutation u redukovanom obliku. Promene aktivnosti GR često su povezane sa promenama aktivnosti GSH-Px i SOD. GR je izuzetno značajna u sistemu antioksidativne odbrane ćelije, zato što obezbeđuje potrebnu količinu redukovanog glutationa za delovanje glutation-peroksidaze i glutation-S-transferaze (Yan i sar., 2012).

### 2.2.2. NEENZIMSKI SISTEMI ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

Pored enzimskih, postoje i neenzimski sistemi koji su takođe aktivni unutar bioloških sistema, kao što su vitamini C i E i glutation.

Neenzimske komponente antioksidativne zaštite čine:

- Vitamin E
- Vitamin C
- Glutation
- Bilirubin
- Mokraćna kiselina
- Karotenoidi

### 2.2.2.1. VITAMIN E

Vitamin E (tokoferoli i tokotrienoli) je glavni liposolubilni antioksidant u tkivima koji ima važnu ulogu u prvoj liniji odbrane membrane od oksidativnog stresa u ranim fazama napada slobodnih radikala. Primarna aktivnost vitamina E je da „hvata“ peroksi-radikale u ćelijskim membranama. Ovo ukazuje da vitamin E ima ulogu u prevenciji ili smanjenju oštećenja nastalog slobodnim radikalima kod kancera, kardiovaskularnih bolesti, prevremenog starenja i katarakte (Lien i sar., 1999).

### 2.2.2.2. VITAMIN C

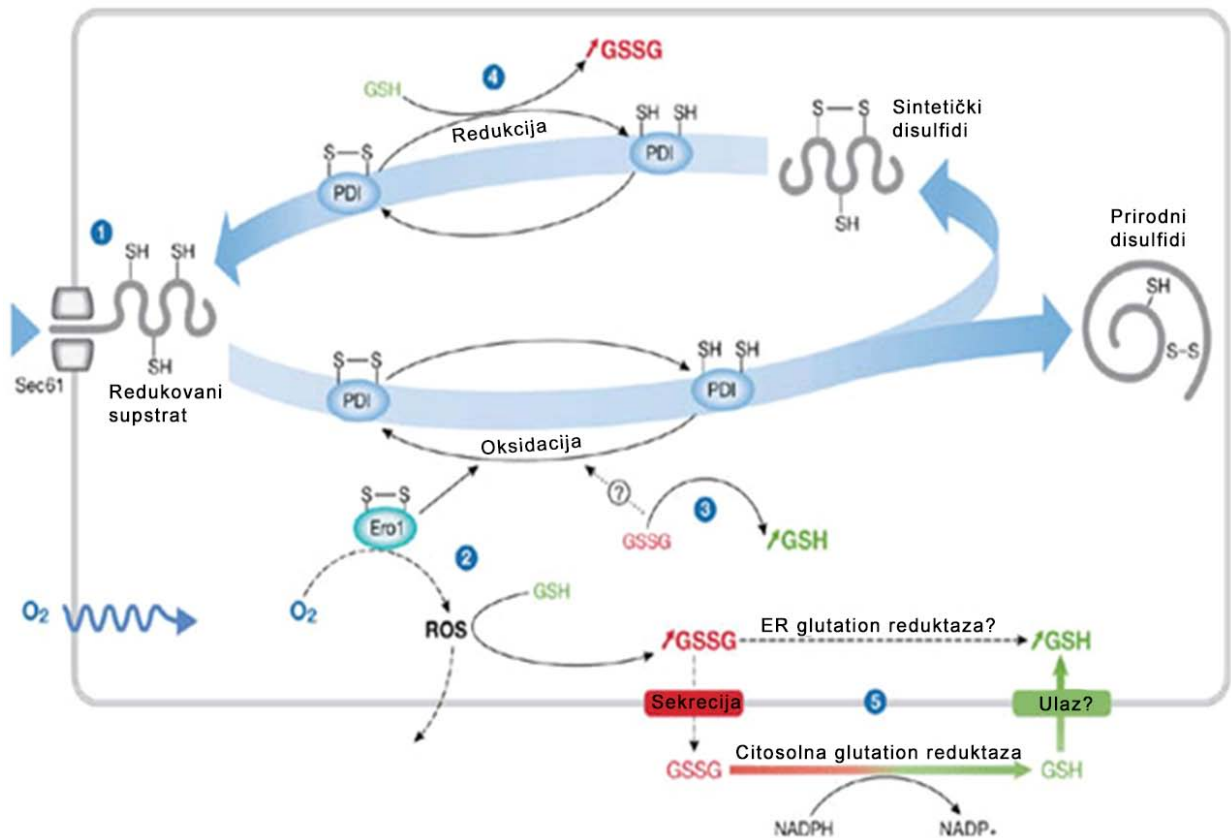
Vitamin C (askorbinska kiselina) je hidrosolubilni antioksidant koji učestvuje u redukciji radikala iz različitih izvora. Askorbinska kiselina učestvuje i u recikliranju radikala nastalih oksidacijom vitamina E. Vitamin C funkcioniše pod određenim uslovima kao prooksidant, kada je u reakciji kiseonik kao sporedan proizvod koji može da izazove oštećenje ćelija (Baydar i sar., 2007).

Askorbinska kiselina služi kao antioksidant u procesima u kojima učestvuju slobodni radikali. Takođe je sposobna da redukuje redoks aktivne metale, kao što su bakar i gvožđe, čime povećava oksidativna svojstva ovih metala. Generalno, u niskim koncentracijama askorbinska kiselina može da bude prooksidant, a u većim koncentracijama služi kao antioksidant (Buettner & Jurkiewicz, 1996).

### 2.2.2.3. GLUTATION

Glutation je najvažnija intracelularna komponenta u sprečavanju oštećenja izazvanih reaktivnim kiseoničnim vrstama. Cistein na molekulima glutaciona ima izložene veoma reaktivne slobodne sulfhidril-grupe koje su meta napada radikala. Reakcijom sa radikalima glutacion se oksiduje, a dejstvom glutation-reduktaze i akceptora elektrona NADPH u redoks ciklusu, glutacion se regeneriše u redukovanu formu (Masella i sar., 2005).

Oksidacija proteinskih sulfhidrilnih grupa do disulfida i njihova redukcija ponovo do sulfhidrila je rani ćelijski odgovor na oksidativni stres. Ovaj odgovor mogu da uzrokuju oksidativne pojave iz različitih izvora. Proteinske sulfhidrine grupe su potencijalna mesta reverzibilne oksidativne modifikacije pomoću S-glutatiolacije i S-nitrozilacije, ali su podložne i ireverzibilnim oštećenjima u oksidativnim uslovima. U odsustvu adekvatne antioksidativne zaštite, ova reaktivna mesta postaju beskorisna pošto su ireverzibilno oštećena. Pretpostavlja se da je adekvatna glutationska zaštita esencijalna za sprečavanje povećane sulfhidrilne oksidacije. Povećanje oštećenja proteinskih sulfhidrilnih grupa može biti kritično za funkcionisanje signalne transdukcije i transkripcije u kojima učestvuju proteini koji imaju ova reaktivna mesta (slika 3). Produkcija redukujućeg ili oksidujućeg glutaciona se dešava u toku različitih faza formiranja nativnih disulfidnih veza. Protein-disulfid-izomeraza (PDI) je primer kako se održava nivo redukovanog glutaciona (GSH) ili oksidovanog glutaciona (GSSG) u endoplazmatičnom retikulumu (ER).



Slika 3. Uloga glutationa u formiranju disulfidnih veza i oksidativnom stresu na endoplazmatičnom retikulumu (Chakravarthi et al., 2006). (1) Slobodni cistein ulazi u endoplazmatični retikulum (ER) u formi novih translociranih proteina. (2) Disulfidne veze se formiraju pomoću enzima PDI, koji je redukovan. PDI je oksidovan Ero1, koji je oksidovan kiseonikom, u procesu u kojem se stvaraju reaktivne kiseonične vrste (ROS). Detoksifikacija ROS dovodi do povećanja GSSG. (3) PDI može da se oksiduje pomoću GSSG, što dovodi do povećanja GSH. (4) PDI se redukuje pomoću GSH, koji dovodi do povećanja GSSG. (5) Ulaz i izlaz GSH ili GSSG iz ER mogu da kontrolišu njihov odnos. Citosolna GSSG se redukuje enzimom glutation-reduktaza. Slična aktivnost može da se dešava i u lumenu ER.

Cisteinski ostaci u proteinima i glutationu predstavljaju glavne tirole (-SH) u živom sistemu. Ravnoteža između GSH i njegove oksidovane forme (GSSG) ima ključnu ulogu u očuvanju sveukupne okoline citosola. GSH je supstrat važnog antioksidativnog enzima GSH-peroksidaze. Cisteinski ostaci su posebno redoks osetljivi i predstavljaju redoks prekidač brojnih proteina. Izlaganje cisteina ROS dovodi do formiranja različitih modifikacija -SOH, -SO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -S-S- i glutation konjugata (-S-SG). Cisteinski ostaci mogu da se modifikuju i RNS: NO, -S-NO, ONOO<sup>-</sup> preko NO<sub>2</sub><sup>•</sup>. Informacije o koncentraciji tiola su ključne za razumevanje redoks metabolizma. Biohemijski eseji, kao npr. Ellman-ov metod, tradicionalno se koriste za merenje nivoa slobodnih tiolnih grupa u biološkim uzorcima (Winterbourn & Hampton, 2008).

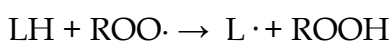
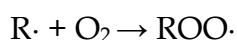
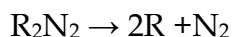
Pored vitamina E i C i glutationa, nekoliko drugih molekula kao što su bilirubin, mokraćna kiselina, karotenoidi i brojni mali molekuli mogu da imaju antioksidativne funkcije (Coinu i sar., 2007; Baydar i sar., 2007). Karotenoidi su lipofilne komponente od kojih je β-karoten najzastupljeniji. β-karoten ima karakterističan produženi lanac konjugovanih dvostrukih veza koje imaju antioksidativna svojstva. Karotenoidi štite biološke sisteme od oštećenja izazvanog singletnim kiseonikom direktnim gašenjem, a takođe mogu da inhibiraju slobodnoradikalske reakcije. Neke bazne aminokiseline kao što su lizin i arginin i kisele aspartat i glutamat ispoljavaju antioksidativnu aktivnost heliranjem metalnih jona. Bazna aminokiselina histidin ima sposobnost hvatanja radikala i heliranja jona metala preko svog imidazolnog prstena. Sekvenca aminokiselina u proteinskom molekulu je glavni faktor koji determiniše antioksidativna svojstva proteina (Rajapakse i sar., 2005; Arcan & Yemenicioğlu, 2007).



### 2.3. MEHANIZAM DEJSTVA ANTIOKSIDANATA

Brojni hemijski i fizički fenomeni mogu inicirati oksidaciju, koja se kontinualno nastavlja sve dok je prisutan pogodan supstrat i do aktivacije odbrambenog mehanizma. Ciljne supstance su kiseonik, polinezasićene masne kiseline, fosfolipidi, holesterol i DNK. Slobodnim radikalima posredovane lančane reakcije uključuju procese inicijacije, propagacije, grananja i terminacije. Proces može biti iniciran delovanjem spoljašnjih agenasa kao što su zagrevanje, svetlost, jonizujuće zračenje ili hemijska inicijacija koja uključuje metalne jone ili metaloproteine (Ingold, 1961).

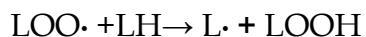
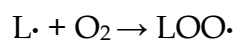
#### Inicijacija



LH - supstratni molekul, na primer lipid, R· - početni radikal.

Oksidacija lipida stvara visoko reaktivni alil-radikal (L·) koji veoma brzo reaguje sa kiseonikom do forme peroksil- radikala (LOO·).

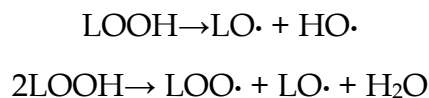
#### Propagacija



Peroksil-radikali dalje mogu oksidovati lipide, proizvodeći lipidne hidroperoksidge (LOOH) koji se mogu prevesti u širok spektar jedinjenja, kao što

su alkoholi, aldehidi, alkil-grupe, ketoni, ugljeni-hidrati i radikali, uključujući alkoksil-radikale (LO·).

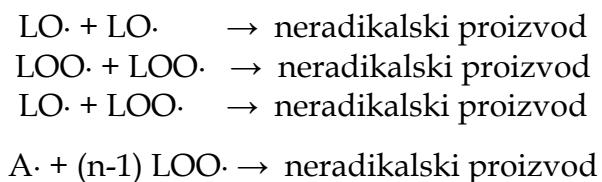
### Grananje



Razlaganje lipidnih hidroperoksida često uključuje katalizu jonima prelaznih metala, u reakciji sličnoj onoj koja uključuje vodonik-peroksidge, dajući lipidne peroksil- i alkoksil- radikale.

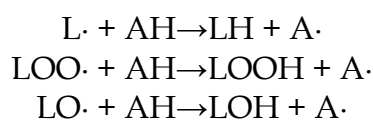
### Terminacija

Prevođenje radikala u formu ne-radikalnih proizvoda:



Kada su prisutni u tragovima, primarni antioksidanti (AH) mogu ili usporiti ili inhibirati inicijacioni korak reagujući sa lipidnim radikalima ili inhibirajući propagacioni korak reakcije sa peroksil- ili alkoksil-radikalima.

### Inhibicija



Sekundarni ili preventivni antioksidanti su jedinjenja koja usporavaju stepen oksidacije. Ovo se može postići na više načina, uključujući uklanjanje supstrata (Denisov & Khudyakov, 1987).

#### **2.4. METODE ODREĐIVANJA UKUPNOG ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA**

Redoks status biosistema predstavlja relativni nivo oksidacije bioloških molekula i struktura. Procesi oksidacije se dešavaju u toku ćelijske signalizacije, a većina doprinosi ukupnoj fiziološkoj funkciji.

Informacija o oksidativnom statusu je esencijalna za razumevanje brojnih humanih fizioloških procesa. Nekoliko biohemijskih tehnika se primenjuje za određivanje oksidativnog statusa, kao što su ABTS, i drugi spektrometrijski testovi, određivanje koncentracije R-SH grupa (opadaju pod prooksidativnim uslovima), određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, katalaza, glutation-peroksidaza i reduktaza) i fluorescentna mikroskopija. Ove tehnike su široko zastupljene i informativne, ali bi ih trebalo upotpuniti EPR spektroskopijom da bi se dobili specifični podaci o oksidativnom statusu.

Na osnovu hemijskih reakcija na kojima su zasnovane glavne metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta mogu se podeliti u tri kategorije (Huang et al., 2005).

1. Metode bazirane na reakciji transfera singletnog elektrona (ET metode)
2. Metode bazirane na reakcijama transfera atoma vodonika (HAT metode)
3. Ostale metode za merenje kapaciteta hvatanja ROS

## 2.4.1. METODE BAZIRANE NA REAKCIJI TRANSFERA SINGLETNOG ELEKTRONA

Metode bazirane na reakciji transfera singletnog elektrona (ET) obuhvataju jednu redoks reakciju sa oksidantom kao indikatorom reakcione završne tačke i služe za merenje redukcionog kapaciteta antioksidanata. To su najčešće upotrebljavani testovi za određivanje antioksidativnog potencijala, koji obuhvataju metode za određivanje ukupnih fenola po Folin-Ciocalteu (FCR), metoda bazirana na merenju antioksidativnog kapaciteta u odnosu na standard (Trolox, TEAC), metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa feri-jonom (FRAP), DPPH metoda (metoda hvatanja 2,2 difenil-1-pikril-hidrazil-slobodnih radikala)... Ove metode su slične redoks titracijama u klasičnoj hemijskoj analizi, i pretpostavljaju da je antioksidativni kapacitet jednak redoks kapacitetu (Benzie & Strain, 1999).

### 2.4.1.1. DPPH METODA ZA ODREĐIVANJE UKUPNOG ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA

DPPH• (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikal je stabilan slobodni radikal, usled delokalizacije elektrona u molekulu. Usled toga, DPPH• ne dimerizuje, kao što je slučaj sa većinom slobodnih radikala. Delokalizacija na DPPH• radikalnu određuje pojavu ljubičaste boje, sa apsorpcionim maksimumom oko 520 nm (Molyneux, 2004).

Kada DPPH• reaguje sa donorom vodonika, stvara se redukovana (molekulska) forma (DPPH), što je povezano sa nestajanjem ljubičaste boje. Zbog toga, smanjenje apsorbanice linearno zavisi od koncentracije antioksidanata (Pisoschi i sar., 2009).

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala izračunava se po formuli:

$$\% \text{ hvatanja slobodnih radikala} = [(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}) / A_{\text{kontrola}}] \times 100$$

Spektrofotometrijski metod sa DPPH se primenjuje za određivanje antioksidativnog kapaciteta u različitim uzorcima. Trolox se koristi kao standardni antioksidant. Standardna kriva je linearna između 25 i 800  $\mu\text{M}$  Troloxa. Rezultati se izražavaju kao ekvivalent Troloxa ili u procentima smanjenja apsorbance.

#### **2.4.1.2. PRIMENA FOLIN-CIOCALTEU METODA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA ZA ODREĐIVANJE UKUPNOG ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA**

Folin-Ciocalteu reagens (FCR) je inicijalno namenjen za analizu proteina, iskoristivši aktivnost reagensa prema tirozinskim ostacima proteina (Folin & Ciocalteu, 1927). Kasnije, Singleton i saradnici (1999) iskoristili su ovu metodu za analizu ukupnih fenola u vinu, i od tada Folin-Ciocalteu (FC) metoda ima mnogobrojne primene. FC metoda meri redukcionu kapacitet uzorka, što se ogleda u imenu "metoda za ukupne fenole". U brojnim publikacijama su primenjene FC metoda i ET metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta (FRAP, TEAC...) i često je prisutna odlična linearna korelacija između "ukupnih fenolnih profila" i "antioksidativne aktivnosti". Jedna od ovih metoda može biti suvišna, pogotovo ako se koristi polifenol-oksidaza za određivanje ukupnih fenola, koja je mnogo specifičnija za fenolne komponente (Stevanato i sar., 2004).

FCR je nespecifičan na fenolne komponente, a može se redukovati i nefenolnim komponentama (vitamin C, Cu(I)..). Fenolne komponente reaguju sa FCR u baznim uslovima (podešen pH ~ 10, natrijum-karbonatom). Disocijacija fenolnog protona dovodi do stvaranja fenolnog anjona, koji redukuje FCR. Ovo ukazuje da se reakcija odigrava preko mehanizma transfera elektrona. Između fenolata i FCR formira se kompleks plave boje, nezavisno od strukture fenolne komponente, stoga se isključuje mogućnost formiranja koordinatnog kompleksa između jona metala i fenolne komponente.

Bez obzira na nedefinisano hemijsku prirodu FCR, metoda za određivanje ukupnih fenola pomoću FCR je pogodna, jednostavna i reproduktivna. Kao rezultat toga, ova metoda je postala rutinska u proučavanju fenolnih komponenti i antioksidativne aktivnosti (Prior i sar., 2005).

#### **2.4.2. METODE BAZIRANE NA REAKCIJAMA TRANSFERA ATOMA VODONIKA**

Većina metoda baziranih na reakcijama transfera atoma vodonika (HAT) prati kompetitivnu reakcionu kinetiku, a količina se određuje iz kinetičke krive. HAT bazirane metode su sastavljene od generatora sintetičkog slobodnog radikala, oksidizabilne molekulske probe i antioksidanta, i služe za merenje kapaciteta doniranja atoma vodonika. Najčešće upotrebljavana metoda bazirana na HAT je ORAC (kapacitet apsorbance kiseoničnog radikala) test, koji uključuje peroksi-radikale kao oksidante, zatim TRAP, Crocin test, inhibicija linoleinske oksidacije, i inhibicija LDL oksidacije. Očigledno je da su reakcije transfera atoma vodonika ključni korak u reakcijama radikalskog lanca. Stoga su HAT metode više relevantne za radikal „chain-breaking” antioksidativni kapacitet. HAT metode bazirane na fluorescentnim probama imaju sličnost sa

lipidnom peroksidacijom, ali pod određenim uslovima koncentracija supstrata je često manja od koncentracije antioksidanata. Ovo je kontradiktorno sa situacijama analiziranja hrane, gde je koncentracija antioksidanata mnogo manja od supstrata, pa je često problem primeniti HAT bazirane metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta u hrani, koja je često heterogena i pod različitim stresnim uslovima.

### 2.4.3. OSTALE METODE

Ostale metode za određivanje kapaciteta hvatanja ROS su ukupan kapacitet hvatanja oksidanata, reakcija inhibicije Briggs-Rauscher oscilacija, hemiluminiscencija, elektroluminiscencija:

1. Metode za određivanje kapaciteta hvatanja  $O_2^-$  su enzimski testovi zasnovani na aktivnosti superoksid-dismutaze ili katalaze, kojima se konvertuje  $O_2^-$  u kiseonik i vodonik-peroksid, odnosno vodonik-peroksid u vodu i kiseonik.
2. Metode za određivanje kapaciteta hvatanja  $H_2O_2$  su zasnovane na Fentonovoj reakciji, gde se pod fiziološkim uslovima  $H_2O_2$  posmatra u kombinaciji sa Fe (II).
3. Metode za određivanje kapaciteta hvatanja hidroksil-radikala ( $HO\cdot$ ), kao što je HORAC metod zasnovan na fluorimetrijskom testu za određivanje helatnog kapaciteta antioksidanata iz hrane za jon Co(II). Metoda se zasniva na stvaranju Co(II) kompleksa posredovanog Fentonovom reakcijom.
4. Metode za određivanje kapaciteta hvatanja singletnog kiseonika ( $^1O_2$ )
5. Metode za određivanje kapaciteta hvatanja peroksinitrita ( $ONOO^-$ ).

Sve metode su bazirane na hemijskim reakcijama *in vitro*. Ove metode ne mere biodostupnost, *in vivo* stabilnost, zadržavanje antioksidanata u tkivima i reaktivnost *in situ* (Huang i sar., 2005).

U tabeli 1. prikazane su neenzimske metode određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala.

Testovi koji mere kombinovane antioksidativne efekte neenzimske zaštite u biološkim tečnostima su korisni za određivanje indeksa sposobnosti otpora oksidativnom oštećenju. Mnogi testovi ukupne antioksidativne aktivnosti koriste podatke dobijene u testovima sposobnosti plazme da se bori protiv oksidativnih efekata reaktivnih vrsta generisanih u reakcionoj smeši. Smanjenje koncentracije antioksidanata je praćeno promenom u signalu, kao što je stepen iskorišćenja kiseonika ili hemijska luminiscencija. Mera ovih signala zahteva specijalizovanu opremu, a i vremenski su zahtevni. Ovo ograničava dostupnost testova i dalje čini klinička ispitivanja težim (Benzie & Strain, 1999).



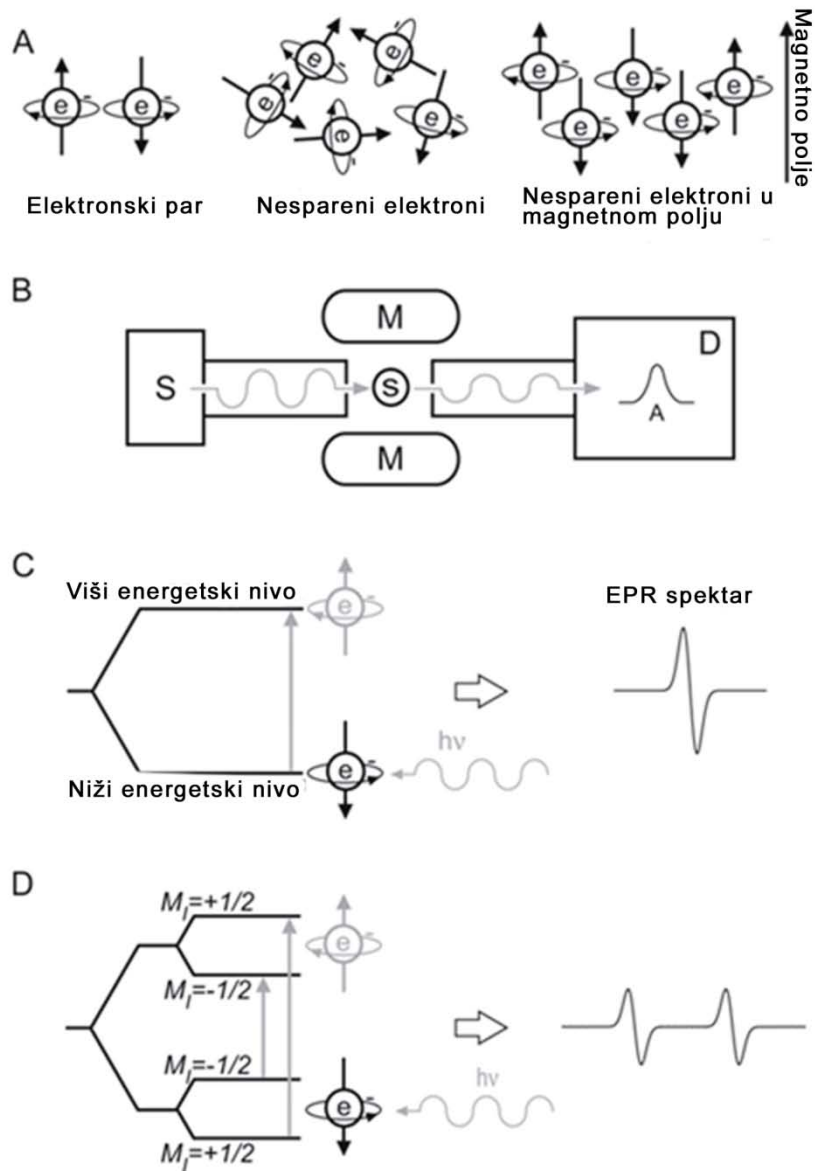
Tabela 1. Neenzimske metode određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala (Pisoschi &amp; Negulescu, 2011)

Test za merenje ukupnog antioksidativnog potencijala	Princip metode	Određivanje krajnjeg proizvoda
<b>Spektrometrija</b>		
DPPH	Reakcija antioksidanata sa organskim radikalima	Kolorimetrijski
ABTS	Reakcija antioksidanata sa katjonskim organskim radikalima	Kolorimetrijski
FRAP	Reakcija antioksidanata sa Fe(III) kompleksom	Kolorimetrijski
PFRAP	Redukcija kalijum fericijanida antioksidantima i supsekventna reakcija kalijum fericijanida sa Fe <sup>3+</sup>	Kolorimetrijski
CUPRAC	Redukcija Cu(II) do Cu(I) antioksidantima	Kolorimetrijski
ORAC	Reakcija antioksidanata sa peroksil radikalima, indukovanim AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propan)	Oslobađanje fluorescencije od fluoresceina-
TRAP	Kapacitet antioksidanata da čisti luminol-izvedene radikale, baziran na AAPH dekompoziciji	Hemiluminiscencija
Fluorimetrija	Emisija svetlosti od supstance koja je apsorbovala svetlost ili drugu vrstu elektromagnetne radijacije različite talasne dužine	Snimanje fluorescentnog ekscitaciono/emisionog spektra
EPR	Detekcija apsorpcione energije i identifikacija paramagnetnih vrsta	Spektroskopski
<b>Elektrohemijske tehnike</b>		
Ciklična voltametrijia	Potencijal radne elektrode linearno varira od inicijalne do finalne vrednosti i nazad, i pri tom se snimaju vrednosti intenziteta struje u zavisnosti od promene potencijala	Merenje intenziteta katodnog/anodnog pika
Amperometrija	Potencijal radne elektrode je podešen kao fiksirana vrednost u odnosu na referentnu elektrodu	Mera intenziteta generisane oksidacije/redukcije elektroaktivnog analita
Biamperometrija	Reakcija analita (antioksidanta) sa oksidovanom formom reverzibilno pokazujućeg redoks para	Merenje protoka između dve identične radne elektrode, pri maloj razlici potencijala uronjene u rastvor koji sadrži analizirani uzorak i reverzibilni redoks par
<b>Hromatografija</b>		
Gasna hromatografija	Razdvajanje jedinjenja iz smeše je bazirano na podeli između stacionarne tečne faze i gasne mobilne faze	Jonizacija plamena ili detekcija termalnog konduktiviteta
HPLC	Razdvajanje jedinjenja iz smeše je bazirano na podeli između čvrste stacionarne faze i tečne mobilne faze sa različitim polaritetima, pri visokom protoku i pritisku mobilne faze	UV-VIS detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrohemijska detekcija

## 2.5. ELEKTRON-PARAMAGNETNA REZONANTNA SPEKTROSKOPIJA

Elektron-paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija (takođe poznata i kao elektron-spin rezonanca (ESR)) pruža jedinstven i najdirektniji uvid u biohemiju slobodnih radikala i antioksidanata. EPR predstavlja zlatni standard u redoks istraživanjima (Weil & Bolton, 2007; Hagen, 2008; Bender & Berliner, 2004; Eaton et al., 2005; Saifutdinov et al., 2001).

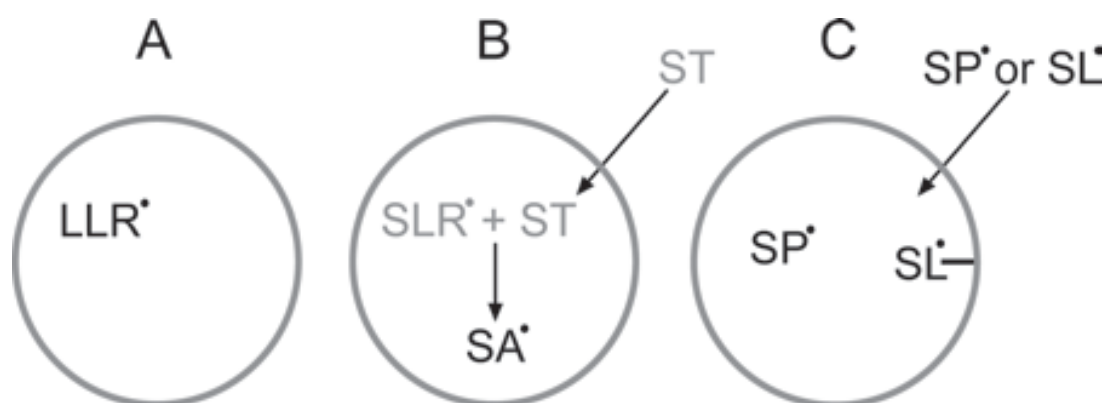
EPR je nedestruktivna spektroskopska tehnika za detekciju i identifikaciju paramagnetnih vrsta (vrsta sa nesprenim elektronima), bazirana na unutrašnjem magnetnom momentu elektrona koji raste sa njegovim spinom. U većini sistema elektroni su u paru, pa je ukupni magnetni moment nula. Međutim, ako je prisutan nespren elektron, njegov magnetni moment može pogodno da interaguje sa magnetnim poljem. Elektronski procesi oko ose polja sa njihovim magnetnim momentom mogu biti paralelni ili antiparalelni sa poljem vektora (slika 4A) (Spasojević, 2011). Ovo definiše dva nivoa energije. Drugo oscilirajuće magnetno polje rezonantne frekvencije izaziva prelaz između nivoa. EPR spektrometar detektuje energiju apsorpcije, pošto je veći broj nesprenih elektrona na nižem energetske nivou (slika 4B). Uobičajeno je da se EPR spektar prikazuje kao prvi izvod apsorpcionog spektra. (slika 4 C i D). Oblik EPR signala od nesprenih elektrona zavisi od njihovih interakcija sa jezgrom. Pod pretpostavkom da je nespreni elektron lokalizovan blizu jezgra sa spinom  $I=1/2$ . Jezgro može da se prilagodi jednom od dva stanja, gde je spin komponenta jezgra  $M_I = +1/2$  ili  $M_I = -1/2$ . Ovo dovodi do cepanja svakog od dva energetska nivoa elektrona, pa umesto jedne sada su prisutne dve spektralne linije (slika 4D).



Slika 4. Shematski opis osnovnih principa EPR spektroskopije (Spasojević, 2011).

A: Elektroni izvan i unutar magnetnog polja; B: Shema EPR spektrometra (S – izvor oscilirajućeg magnetnog polja; M – magneti koji stvaraju magnetno polje, s – uzorak; D – detektor; A – apsorpciona linija); C: Shema energetskeg nivoa nesporenog elektrona koji pokazuje EPR apsorpciju i odgovarajućeg spektra sa jednom linijom; D: Shema energetskeg nivoa nesporenog elektrona kuplovanog sa nukleusom sa  $I = 1/2$ , koji pokazuje dva rezonantna prelaza i odgovarajuće spektre sa dve linije.

Postoje tri različita EPR pristupa koji se koriste u redoks studijama bioloških sistema (slika 5). Slika 5A: Dugoživeće paramagnetne vrste prirodno prisutne u biološkim uzorcima koji mogu biti detektovani direktno EPR spektroskopijom; 5B: Kratkoživeće vrste moraju da se "zarobe". Specifične EPR "tihe" komponente spin-trap se dodaju u uzorak. One reaguju sa kratkoživećim radikalima i formiraju stabilne EPR aktivne spin-adukte (slika 5B). Istraživanja specifičnih osobina, kao fluidnost membrane, parcijalni pritisak kiseonika ili slobodne tiol-grupe, zahtevaju sintetički stabilne paramagnetne vrste (spin-proba i spin-obeleživač, gde se obeleživači kovalentno vezuju za biomolekule, dok se probe ne vezuju, slika 5C).



Slika 5. Shematski prikaz EPR tehnika u redoks istraživanjima (Spasojević, 2011) A: EPR spektroskopija unutrašnjih dugoživećih radikala (LLR) B: EPR spin-trapng kratkoživećih radikala (SLR), ST - spin-trap, SA - spin-adukt; C: EPR spin-proba i EPR spin-obeležavanje, SP - spin-proba, SL - spin-obeleživač. Tamnije označava EPR aktivno, svetlo EPR "tiho". Krug predstavlja biološki sistem.

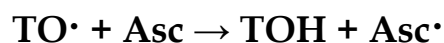
Detekcija paramagnetnih vrsta je na rezonanci pri magnetnom polju od 300 mT, ako je frekvencija 9-10 GHz. Ove frekvencije su u oblasti mikrotalasa, koji ne utiču na merenja *in vitro* ili *in vivo* (Koppenol, 1990; Koppenol, 2002).

### 2.5.1. ELEKTRON-PARAMAGNETNA REZONANTNA DETEKCIJA DUGOŽIVEĆIH PARAMAGNETNIH VRSTA

Oksidacija biomolekula završava EPR "tihim" proizvodima. Međutim, neki molekuli, kao što su askorbat, tokoferol, melanin... daju radikale sa produženim vremenom života. EPR dugoživeći radikali obezbeđuju vitalne podatke o oksidativnim uslovima u biosistemima bez mešanja sa unutrašnjim procesima, koji su esencijalni u nekim studijama (Armstrong, 1999).

Askorbil-radikal ( $\text{Asc}^\bullet$ ) se proizvodi oksidacijom askorbata, koja može da se izvrši skoro svim unutrašnjim reaktivnim vrstama u biološkom sistemu. Ovo obuhvata  $\text{OH}^\bullet$ , alkil-peroksi-radikal ( $\text{ROO}^\bullet$ ), lipidperoksil-radikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ), tokoferil-radikal ( $\text{TO}^\bullet$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), tiil-radikal ( $\text{RS}^\bullet$ ), protein-radikal i katalitičke metale (gvožđe i bakar). Askorbat deluje kao "skupljač" većine biološki oksidizabilnih vrsta. Ovo čini nivo  $\text{Asc}^\bullet$  veoma osetljivim na oksidativni status sistema. Druga prednost  $\text{Asc}^\bullet$  je stabilnost, koja se meri u minutima u biološkim sistemima. Dodatno,  $\text{Asc}^\bullet$  je sklon degradaciji tokom skladištenja uzoraka na niskoj temperaturi (Ahola et al., 2004).

Tokoferoli su glavni lipid-solubilni antioksidanti u biološkim sistemima. Reaguju sa  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{LOO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^\bullet$  i  $\text{ONOO}^\bullet$  i produkuju  $\text{TO}^\bullet$  radikal, koji može da se detektuje EPR-om.  $\text{TO}^\bullet$  se snažno termodinamički uzajamno povezuje sa askorbatom, preko reakcije:



$\text{TO}^\bullet$  signal u EPR se pojavljuje u humanoj plazmi izloženoj oksidativnom stresu, samo nakon što iščezne  $\text{Asc}^\bullet$ . Kao rezultat, prisustvo  $\text{TO}^\bullet$  u biološkim uzorcima označava intenzivnu oksidaciju, sposobnu da potroši antioksidativne kapacitete askorbata (Clarke i sar., 2008; Sharma & Buettner, 1993).

## 2.5.2. ELEKTRON-PARAMAGNETNA REZONANTNA SPIN-TRAPPING DETEKCIJA KRATKOŽIVEĆIH SLOBODNIH RADIKALA

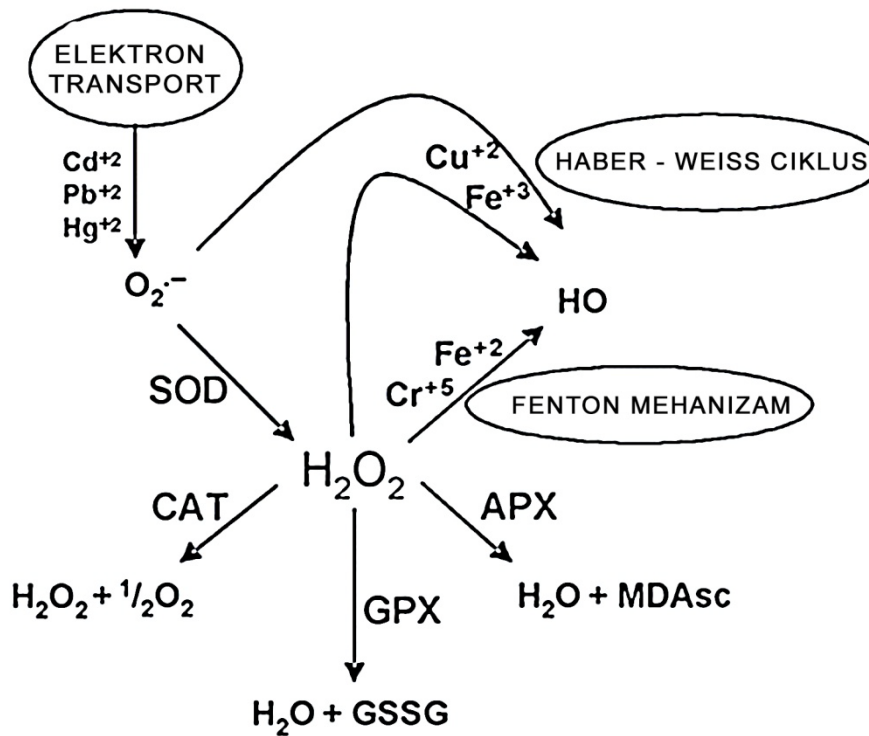
Fiziološki bitni kratkoživeći slobodni radikali prema lokaciji nesparenih elektrona mogu da se podele u četiri strukturne kategorije:

1. Reaktivne kiseonične vrste (ROS)
2. Reaktivne vrste azota (RNS)
3. Ugljenik-centrirani radikali
4. Sumpor-centrirani radikali

### 2.5.2.1. Reaktivne kiseonične vrste

Osnovni izvor ROS je superoksidni anjon-radikal,  $O_2^{\bullet-}$ , koji se generiše u mitohondrijama u toku prelaza elektrona iz respiratornog lanca na  $O_2$  kod aerobnih organizama. Drugi potentan izvor  $O_2^{\bullet-}$  su ćelije uključene u imuni odgovor, koje sadrže NADPH oksidaze kojima se redukuje  $O_2$  i proizvode velike količine  $O_2^{\bullet-}$ .

Superoksidni anjon ima specifične targete, reaguje sa gvožđem u aktivnom centru gvožđe/sumpor enzima i transkripcionim faktorima, modulišući njihovu funkciju (Jacob & Winyard, 2009; Halliwell & Gutteridge, 2007). Većina  $O_2^{\bullet-}$  se pod dejstvom SOD prevodi u  $H_2O_2$  (član ROS familije, ali nije slobodni radikal) koji učestvuje u redoks signalizaciji (slika 6).  $O_2^{\bullet-}$  mogu biti uključeni u reakcije redoks-aktivnih metala ili Haber-Weiss-ov mehanizam, pri čemu se stvaraju reaktivni  $OH\cdot$ .  $OH\cdot$  skoro neselektivno reaguje sa biomolekulima u okolini, pa je vreme poluživota  $OH\cdot$  u biološkim sistemima  $\sim 10^{-9}$  s. Glavni izvor  $OH\cdot$  je Fentonova reakcija u kojoj učestvuju nepravilno heliran jon gvožđa ili neki prelazni jon metala i  $H_2O_2$  ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH\cdot$ ) (Valko i sar., 2005; Kell, 2010).



Slika 6. Stvaranje ROS pod dejstvom teških metala (Pinto i sar., 2003.)

### 2.5.2.2. Reaktivne vrste azota

Superoksid-anjon-radikal reaguje sa  $NO^{\cdot}$  i produkuje peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), biološki aktivne vrste koje mogu da inhibiraju enzime i membranske funkcije. Peroksinitrit se protonuje do  $ONOOH$ , koji se razlaže na dve reaktivne vrste  $OH^{\cdot}$  i azot-dioksid-radikal ( $NO_2^{\cdot}$ , član RNS familije). Proteaze brzo razlažu proteine nitrovane  $NO_2^{\cdot}$ .  $NO_2^{\cdot}$  brzo napada nezasićene masne kiseline (Szabo, 2003).

### 2.5.2.3. Ugljenik-centrirani radikali

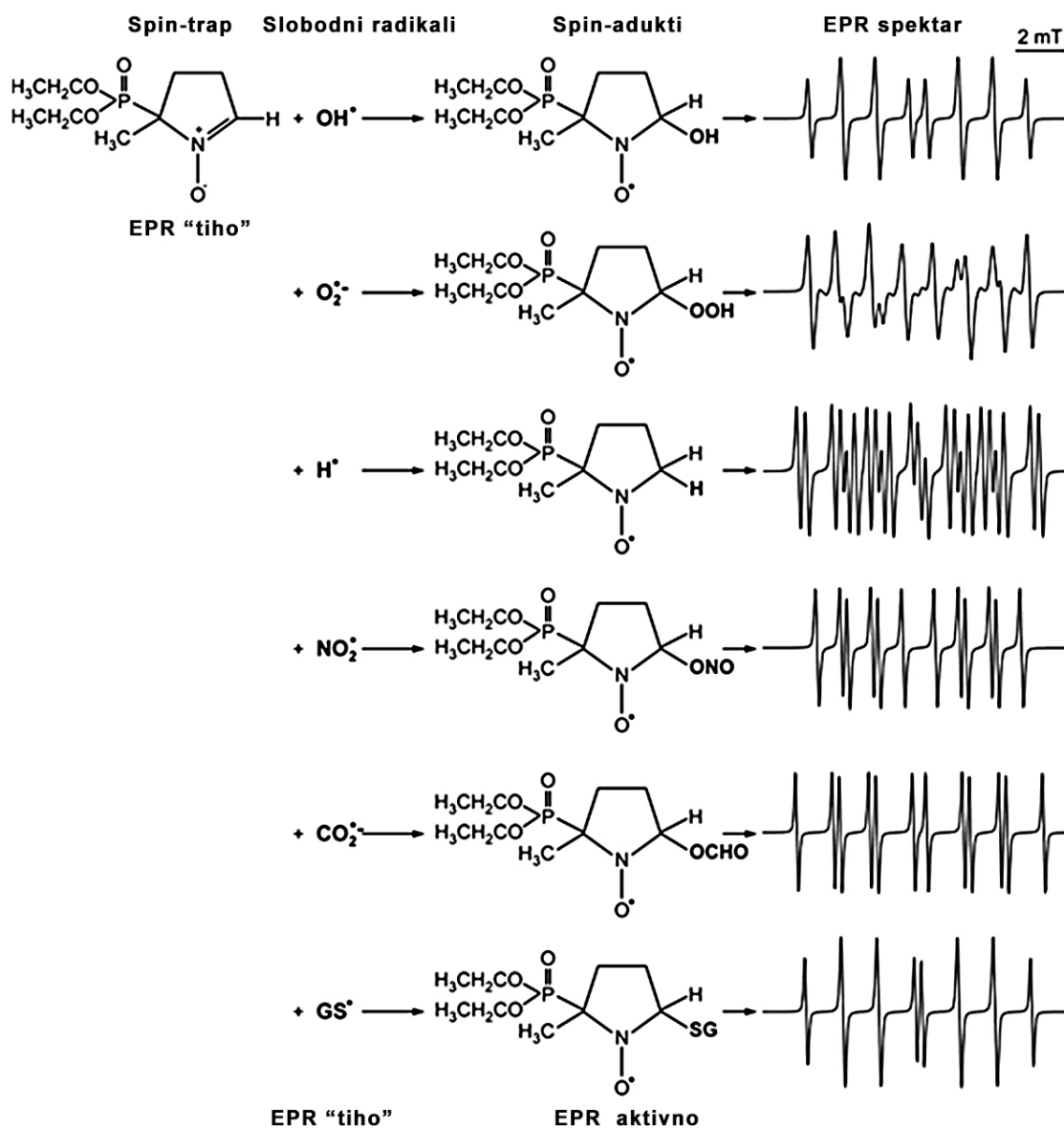
$\text{OH}\cdot$  reaguje sa karbonatnim jonom ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) i produkuje karbonatni radikal ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) ili radikal ugljen-dioksida ( $\text{CO}_2^{\cdot-}$ ). Ovi radikali su manje reaktivni od  $\text{OH}\cdot$ , ali su veoma opasni pošto su im meta proteini. Ugljenik-centrirani radikali mogu da se stvaraju ~~OH~~ nazvanom oksidacijom različitih biomolekula (Halliwell & Gutteridge, 2007).

### 2.5.2.4. Sumpor-centrirani radikali

Najvažniji sumpor-centrirani radikali su tiil-radikali, kao što je glutation-tiil-radikal ( $\text{GS}\cdot$ ).  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NO}_2\cdot$  i  $\text{ONOO}\cdot$  stvaraju tiil-radikale reakcijom sa tiolima, dok  $\text{O}_2^-$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne stvaraju ove radikale. Drugi sumpor-centrirani radikali su pertiil-radikali ( $\text{RSS}\cdot$ ) i sumpor -centrirani radikal-katjon ( $\text{R}_2\text{S}^+$ ). Sumpor-centrirani radikali se formiraju unutar enzima i utiču na katalitičku aktivnost. Tiil-radikali interaguju sa nezasićenim masnim kiselinama, kao što su arahidonska, linoleinska i oleinska kiselina, i formiraju tioestre i karbon-centrirane radikale. Ove vrste imaju dobre i loše strane, pošto učestvuju u patogenezi različitih bolesti, a takođe i u signalnim kaskadama i imunom odgovoru (Jacob & Winyard, 2005).

Osnovni principi spin-trapping tehnika su prikazani na slici 7. EPR "tiha" komponenta (spin-trap) hvata reaktivne intermedijerne radikale i formira stabilne paramagnetne vrste (spin-adukt).





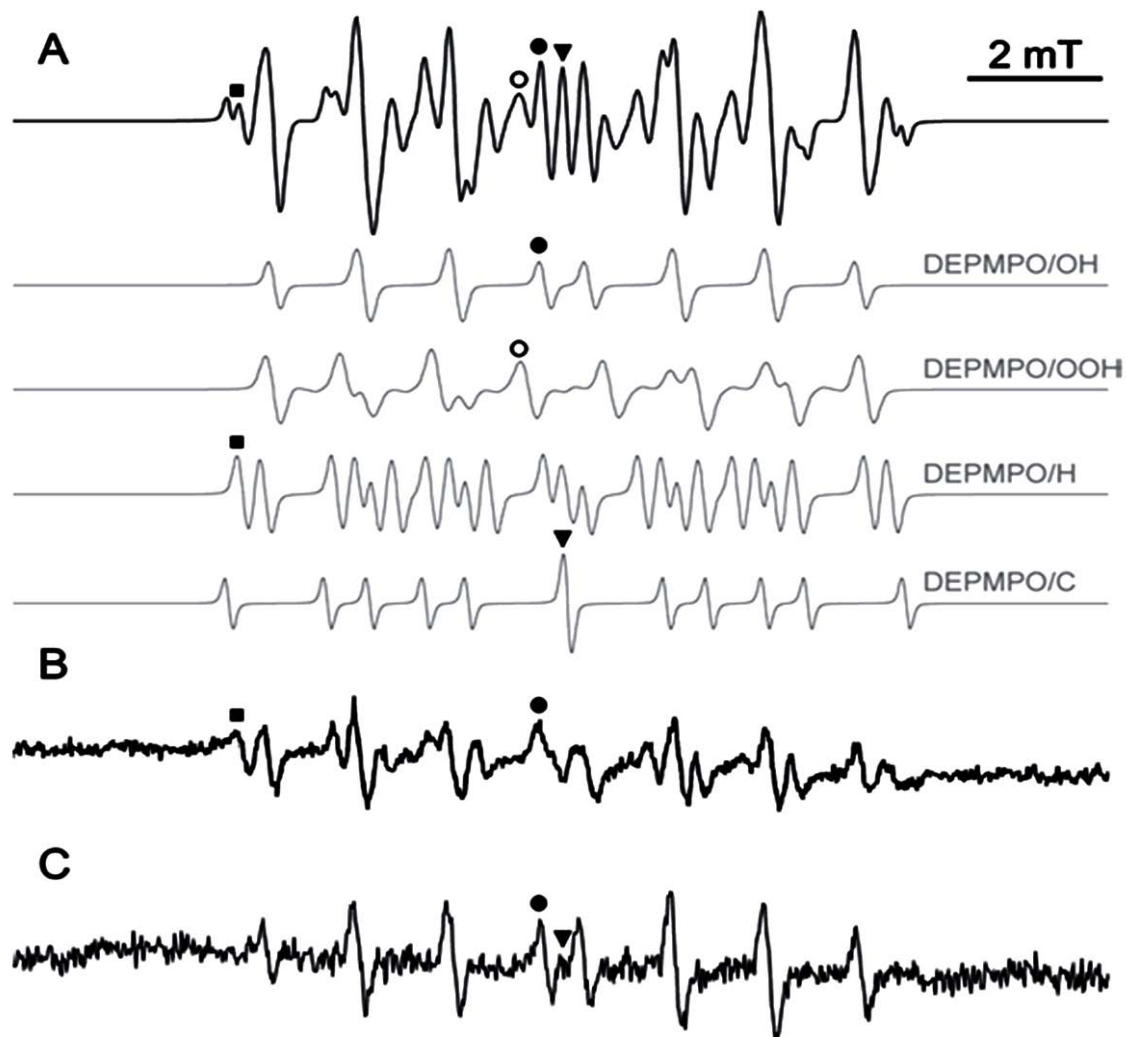
Slika 7. Osnovni principi EPR spin-trapping metoda, na primeru dodatog spin-trap DEMPO i različitih fiziološki značajnih slobodnih radikala – hidroksil-radikal, superoksid-anjon-radikal, atom vodonika, azot-dioksid-radikal, ugljendioksid-radikal i glutation-tiil-radikal. DEPMPO/ONO adukt je intermedijer koji se oksiduje do acil-nitroksida (DEPMPO/O). Svaki adukt pokazuje različit EPR signal (Preuzeto iz rada Bačić i sar., 2008).

Formule i karakteristike najčešće upotrebljivanih spin-trap molekula prikazani su na slici 8:

1. DEPMPO (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksid), najčešće se koristi za identifikaciju radikala.
2. BMPO (5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksid) najčešće se koristi za kvantitativnu analizu, zbog svoje stabilnosti.
3. DMPO (5,5-dimepil-pirolin-N-oksid) najčešće upotrebljavan trap, zbog niske cene.

Structure	DEPMPO	BMPO	DMPO
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Razlikuje različite radikale</li> <li>• Koristi se za kvalitativnu analizu</li> <li>• Veoma informativni spektri</li> <li>• Koristi se u <math>^{31}\text{P}</math> NMR</li> <li>• Potencijalno kompleksna spektralna analiza</li> <li>• Konverzija adukta</li> <li>• Komercijalni trap-ovi mogu da sadrže EPR nečistoće</li> <li>• Visoka cena</li> <li>• Čuvanje na <math>-80^\circ\text{C}</math></li> <li>• Poluživot spin adukta u vodi: DEPMPO/OH: 22,3 min DEPMPO/OOH: 14,8 min</li> <li>• Poluživot u ćelijskoj suspenziji: DEPMPO/OH: 4,5 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Razlikuje superoksid, hidroksil, C-centrirani i tiil radikale</li> <li>• Koristi se za kvantitativnu analizu</li> <li>• Jednostavni spektri</li> <li>• Stabilan, lako se transportuje</li> <li>• Potencijalno kompleksna kvalitativna analiza</li> <li>• Citotoksičan u visokim koncentracijama</li> <li>• Poluživot spin adukta u vodi: DEPMPO/OH: &gt; 30 min DEPMPO/OOH: 23 min</li> <li>• Poluživot u ćelijskoj suspenziji: DEPMPO/OH: 3,6 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detektuje hidroksil radikal</li> <li>• Koristi se za rutinsku analizu</li> <li>• Jednostavni spektri</li> <li>• Niska cena</li> <li>• Veoma niska stabilnost adukta</li> <li>• Nije pogodan za kvalitativnu analizu</li> <li>• Konverzija adukta</li> <li>• Poluživot spin adukta u vodi: DEPMPO/OH: 2,9 min DEPMPO/OOH: &lt;1 min</li> <li>• Poluživot u ćelijskoj suspenziji: DEPMPO/OH: 0 min</li> </ul>

Slika 8. Strukture i karakteristike spin-trap molekula. DEPMPO, BMPO i DMPO ne pokazuju nikakvu citotoksičnost na koncentracijama koje se uobičajeno koriste u *in vitro* studijama (Spasojević, 2011).



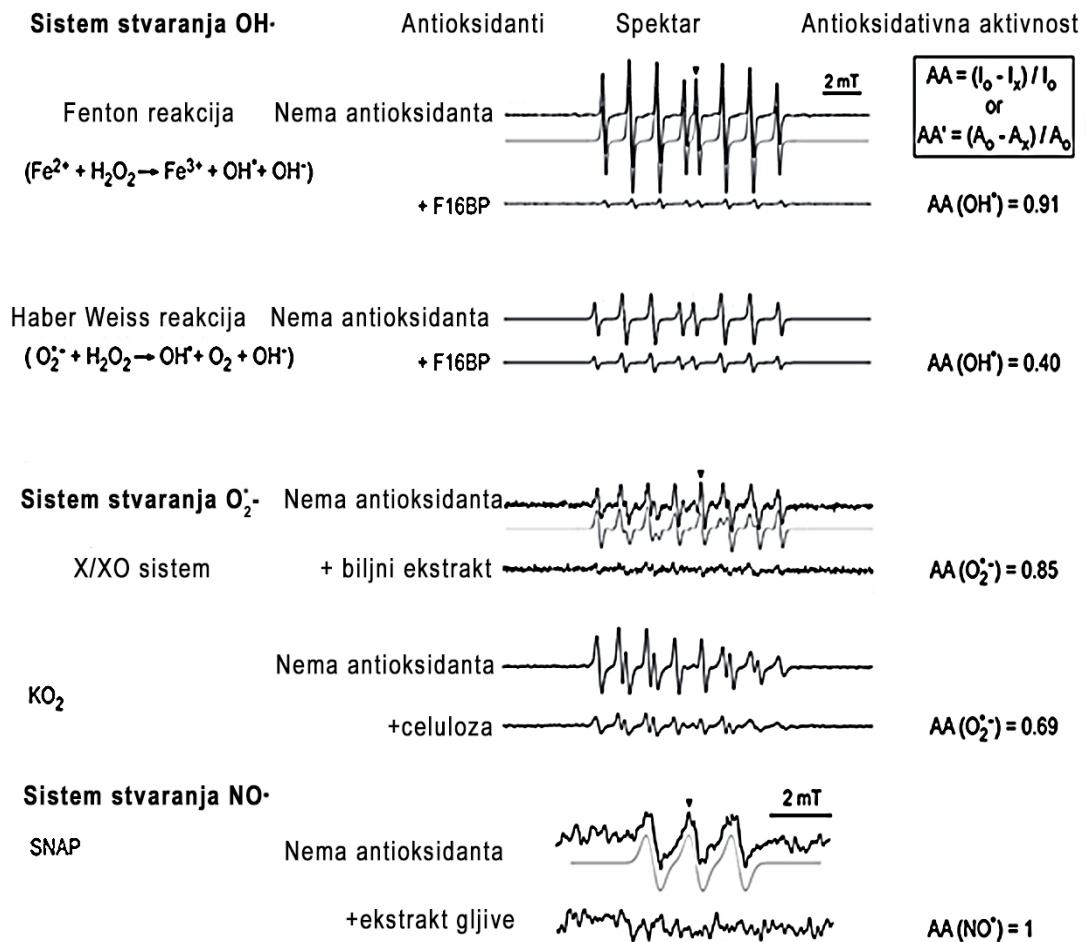
Slika 9. Sposobnost EPR spin-trapng da razlikuje istovremeno slobodne radikale (Spasojević, 2011). A: EPR spektar sastavljen od signala četiri DEPMPO adukta (tamnije) u poređenju sa pojedinačnim spektrima svakog adukta (svetlije). Svi spektri su generisani kompjuterskom simulacijom. Simboli karakterističnih spektralnih linija adukta: taman krug  $\text{OH}^\bullet$  adukt (DEPMPO/OH adukt); svetao krug,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  adukt (DEPMPO/OOH); kvadrat  $\text{H}^\bullet$  adukt (DEPMPO/H); trougao  $\text{CH}_2\text{OH}^\bullet$  adukt (DEPMPO/C); B: EPR spektar DEPMPO spin-adukta dobijenog iz Langerhansovih ostrvaca pod fiziološkim uslovima ; C: EPR spektar DEPMPO spin-adukta cerebrospinalne tečnosti ALS pacijenata sa dodatim vodonik peroksidom.

Biološki sistemi proizvode više od jednog slobodnog radikala. EPR metodom mogu da se razlikuju tri ili više različitih reaktivnih vrsta (Slika 9). Signali specifičnih spin-adukata prepoznaju se po različitim spektralnim linijama i spektralnim stimulacijama. Stimulacije se koriste za kvantifikaciju koncentracija spin-adukta (slobodnih radikala).

### **2.5.3. ELEKTRON-PARAMAGNETNA REZONANTNA SPIN-TRAPING DETEKCIJA U ISTRAŽIVANJIMA ANTIOKSIDANATA**

Postoji veliki broj jednostavnih metoda za određivanje ukupne ili nespecifične antioksidativne aktivnosti: metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa ferijonom (FRAP), metoda bazirana na merenju antioksidativnog kapaciteta u odnosu na standard Trolox (TEAC), kapacitet apsorbanse kiseoničnih radikala i druge slične metode koje se koriste za brzo određivanje antioksidativnog efekta različitih komponenti, hrane i ekstrakata (Halliwell & Gutteridge, 2007; Cadenas & Packer, 2002; Halliwell, 1995). EPR spektroskopija je zlatni standard prema kojem se procenjuju sve druge metode određivanja antioksidativne aktivnosti.

Spin-trapning je najčešće upotrebljavana EPR tehnika u antioksidativnim istraživanjima, koja omogućava merenje antioksidativne aktivnosti na bilo kojoj selektovanoj koncentraciji ispitivane komponente u odnosu na fiziološki relevantne radikale. Osnovni princip je da se koristi sistem za stvaranje specifičnih radikala i meri relativna koncentracija radikala u prisustvu i odsustvu potencijalnog antioksidanta. Prisustvo aktivnog antioksidanta smanjuje intenzitet spektra (slika 10). EPR metoda sa Fentonovom reakcijom je najčešće upotrebljavana za proučavanje antioksidativnih aktivnosti (Živković i sar., 2009; Spasojević i sar., 2009).



Slika 10. Principi primene EPR spin-trapting u istraživanjima antioksidanata na primeru F16BP (fruktoza1,6-(bis)fosfat), biljnog ekstrakta, celuloze i ekstrakta gljiva, na fiziološkim koncentracijama antioksidanata. X/XO, ksantin/ksantin oksidaza sistem; SNAP,  $\text{NO}^\bullet$ -generator (S-nitrozo-N-acetil-DL-penicilamin);  $I_0$ , intenzitet signala spin-adukta u sistemu koji ne sadrži antioksidant;  $I_x$ , intenzitet signala spin-adukta u sistemu koji sadrži ispitivani antioksidant;  $A_0$  i  $A_x$ , amplitude spektralnih linija (obeležene trouglom) u sistemu. Spektri predstavljaju adukte spin-trap DEPMPO (siva linija) (Živković i sar., 2009; Spasojević i sar, 2009).

## 2.6. ELEKTROHEMIJSKE METODE ODREĐIVANJA UKUPNOG ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA

Razvojem tehnika i instrumenata za proučavanje elektrohemijskih reakcija i reakcija na površini elektrode dolazi do velikog napretka u razumevanju elektrohemijskih procesa.

Jednostavne elektroanalitičke tehnike se mogu podeliti u tri grupe: potenciometrija, konduktometrija i voltametrijsko/amperometrijske tehnike. Najčešća je upotreba trećeg tipa elektroanalitičkih tehnika, koje se generalno nazivaju i dinamička elektrohemija. Veći značaj dobijaju potenciometrijske metode zbog napretka na polju jon-selektivnih elektroda (ISE), koji je omogućio smanjenje granice detekcije ispod pikomolarnog (pM) nivoa (Sokalski i sar., 1997; Mathison & Bakker, 1998).

Elektrohemija obuhvata procese koji se dešavaju na granici između dve faze, kao što su transfer elektrona sa metalne elektrode na aktivne redoks vrste u rastvoru elektrolita ili transfer jona iz vodene faze u organsku fazu. Prvi slučaj je najčešći primer elektrohemijske reakcije. Međutim, proces transfera jona je od velikog interesa za mnoga područja ispitivanja, na primer u ćelijskim procesima (Gennis, 1989) kao i u transferu elektrona u polimerom modifikovanim elektrodama (Murray, 1992). Ispitivani sistem je generalno jedna faza ali je važno napomenuti da se takav sistem ne može ispitivati eksperimentalno. Potrebno je ispitati celu elektrohemijsku ćeliju koja uključuje nekoliko različitih faza zajedno. U najjednostavnijem slučaju elektrohemijska ćelija uključuje dve elektrode uronjene u elektrolit. Razlika u elektrodnom potencijalu između njih meri se obično voltmetrima sa velikim otporom. Ukupni ćelijski potencijal predstavlja posebne promene potencijala koje se dešavaju prilikom svakog transfera naelektrisanja u ćeliji. Promenu potencijala jedne elektrohemijske

ćelije kontrolišu i pravac i kinetika prenosa naelektrisanja. Iz toga sledi da je kontrola i merenje potencijala elektrohemijske ćelije veoma važan aspekt u eksperimentima koji obuhvataju dinamičku elektrohemiju.

Za dvoelektrodnu ćeliju, ukupnu reakciju čine dve polureakcije koje uključuju procese na dve elektrode. Obično se jedan od ovih procesa dešava na radnoj (u dinamičkoj elektrohemiji) ili na indikatorskoj elektrodi (u potenciometriji). Druga elektroda, koja se naziva referentna elektroda, služi da obezbedi konstantan potencijal koji se uzima kao referentni potencijal i prema kom se meri potencijal radne elektrode.

Danas se najčešće primenjuje srebro/srebrohloridna elektroda kao referentna elektroda pri potenciometrijskim merenjima. Srebro-srebrohloridna elektroda se shematski označava  $\text{Ag}^+/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$  i sastoji se od srebrne žice uronjene u rastvor AgCl (presvučene sa AgCl), a kao elektrolit koristi se zasićeni rastvor KCl.

Suprotno potenciometriji, gde se meri potencijal elektroda (bez prolaska struje), u dinamičkoj elektrohemiji potencijal radnih elektroda u većini slučajeva kontrolisan je prema referentnoj elektrodi i meri se rezultujuća struja (Sherman, 1947).

### 2.6.1. REDOKS POTENCIOMETRIJA

Određivanje redoks stanja sistema nije jednostavan zadatak i ne postoji univerzalno prihvaćena procedura (Whitfield, 1969). Metode kontrole redoks potencijala se primenjuju u industriji hrane ali postoji problem korišćenja hemijskih proizvoda kao što je dodavanje cisteina ili vitamina C (Giroux i sar, 2008). Merenje redoks stanja obuhvata termodinamička merenja, koja su veoma slična merenju pH. Ipak, redoks merenja su manje popularna od pH merenja zbog reverzibilnosti većine redoks procesa u prirodi (Christensen i sar., 2000; Grundl, 1994).

Oksidoredukциони procesi su definisani elektronskim transferima između komponenti. Redoks ili oksido-redukциони potencijal, koji je unutrašnji indikator biološkog sistema (Kohen & Nyska, 2002), može da se definiše kao mera sposobnosti hemijskog/biohemijskog sistema da oksiduje (izgubi elektrone) ili redukuje (primi elektrone). Redoks potencijal je definisan Nernstovom jednačinom, koja pretpostavlja reverzibilan transfer elektrona između svih vrsta (Kohen & Nyska, 2002).

Redoks centri u proteinima su prelazni metali, organski kofaktori, gvožđe-sumpor klasteri i citohromi. Za razumevanje mehanizma transfera elektrona, bioenergije i redoks procesa u biološkim sistemima, neophodno je da se definišu elektrohemijske osobine ovih centara. Metode određivanja polutalasnog potencijala ( $E_m$ ) redoks centara u proteinima na pH mogu biti direktne i posredovane elektrohemijske tehnike. Posredovane elektrohemijske tehnike su dostupne za većinu proteina, a direktne su veoma moćne tehnike, ali često ne mogu da se koriste za proteine pošto zahtevaju određeni raspored redoks centara na površini proteina (Becker, 2008).

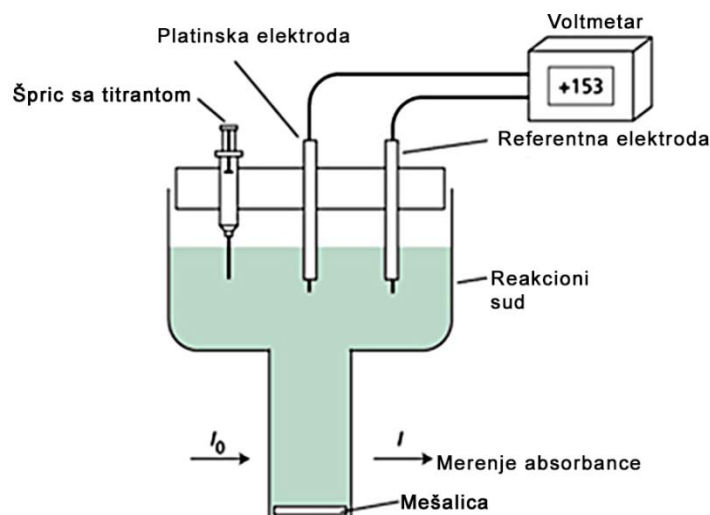


Polutaladni potencijal je mera tendencije komponenti da uzimaju elektrone od drugih komponenti. Veliki pozitivni polutaladni potencijal znači da je komponenta jak oksidant, dok velika vrednost negativnog središnjeg potencijala ukazuje da je komponenta snažan reduktant (u oba slučaja se određuje u odnosu na standardnu vodoničnu elektrodu). Poznavanje polutaladnog potencijala različitih nosača elektrona veoma je važno za uspostavljanje putanje protoka elektrona u bilo kom biohemijskom elektron transportnom sistemu, kao što su mitohondrije. Najčešće se određuje redoks titracijama (Dutton, 1978), kojima se podešava ili uravnotežava uzorak na određenom redoks potencijalu, dodavanjem malih količina oksidanata ili reduktanata. Redoks medijatori, mali molekuli koji omogućavaju brzo uravnoteženje između uzorka i elektroda sistema za merenje, moraju da se dodaju da bi se osiguralo ravnotežno stanje u toku merenja.

Merenja mogu da se rade na različitim redoks potencijalima. Uzorak se meša u specijalnim ćelijama koje sadrže platinsku i referentne elektrode, a oksidanti i reduktanti se dodaju da se dostigne redoks potencijal, koji se očitava na voltmetru. Nakon svakog dodatka redukujućeg ekvivalenta, rastvor proteina ili drugi biološki sistem se prati dok se ne uspostavi ravnoteža, a zatim se beleži potencijal između referentne (Ag/AgCl) i radne elektrode (Au ili Pt) (slika 11). Rastvor se zatim dalje redukuje i uravnotežuje na različitim potencijalima. Ovaj proces se ponavlja sve dok se redoks centar potpuno ne redukuje. Pri svakom potenciometrijskom merenju, raspored oksidovanih i redukovanih vrsta se određuje spektralnim promenama i generiše se Nernstov plot. Izmereni potencijali se izražavaju u odnosu na referentnu vodoničnu elektrodu (u odnosu na NHE) kalibrisanjem referentne elektrode korišćenjem kalijum ferocijanid/ferocijanid standardnog rastvora (Becker, 2008).

Zbog visoke reaktivnosti sa većinom redoks medijatora, kiseonik treba potpuno isključiti iz potenciometrijskih eksperimenata na <10 ppm. Potenciometrijski

eksperimenti zahtevaju anaerobne elektrohemijske ćelije, u kojima se atmosferski kiseonik zamenjuje inertnim gasom ili azotom, a za proteinski rastvor se koristi vakuum ili pozitivni pritisak gasa.



Slika 11. Shema aparature za određivanje polutalasnog potencijala (Taiz & Zeiger, 201)

Ukupan potencijal meri se preko koncepta redoks ili ravotežnog kapaciteta ( $\rho$ ). Kapacitet pufera je poznati faktor, i definisan je kao količina jake kiseline ili baze potrebna da se doda u sistem da se pH promeni za jednu jedinicu. Redoks kapacitet na bilo kom potencijalu,  $E$ , je definisan kao količina jakog oksidanta koja mora da se doda u jedan litar ispitivanog rastvora da bi se  $E$  promenio za 1 V (jednačina, 107).

$$\rho = dO_{\text{total}}/dE$$

gde je  $O_{\text{total}}$  koncentracija jakog oksidanta. U idealnom sistemu, u kojem je redoks potencijal stabilan, fiksni, redoks kapacitet karakteriše sistem (Grundl, 1994).

## 2.6.2. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA

Dinamička elektrohemija podrazumeva promenu potencijala radne elektrode, u odnosu na referentnu, da bi se obezbedio transfer elektrona sa elektrode u ispitivani rastvor (Sabela i sar., 2012).

Među nekoliko metoda, koje su primenjene da karakterišu uzorke hrane i individualne prirodne fenole, ciklična voltametrija (CV) je najinformativnija i najkorisnija (Kilmartin, 2001). Osnovni princip CV metode je elektrohemijska oksidacija određenih vrsta na inertnoj radnoj elektrodi koja je povezana sa pojavljivanjem struje na određenom potencijalu. Potencijal na kojem se CV pikovi pojavljuju određen je redoks osobinama testiranih komponenti, vrednosti struje pokazuju kvantitet ovih komponenti.

Ova tehnika se sastoji iz reverzne, linearne promene elektrodnog potencijala od početnog potencijala do vrednosti za krajnji potencijal, pa do vrednosti potencijala gašenja (to ne mora da bude potencijal koji je isti kao i početni) odgovarajućom brzinom skeniranja. Na taj način se ispituje reaktivnost elektrohemijskog sistema u širokom opsegu potencijala.

Za proces oksidacije obično se polazi od elektrodnog potencijala na kome nema oksidacije i u toku snimanja elektrodni potencijal se menja prema pozitivnijim vrednostima. Obrnuto, za proces redukcije polazi se od elektrodnog potencijala na kome nema redukcije, a elektrodni potencijal se menja prema negativnijim vrednostima. Elektrodni potencijal u određenom trenutku ima vrednost:

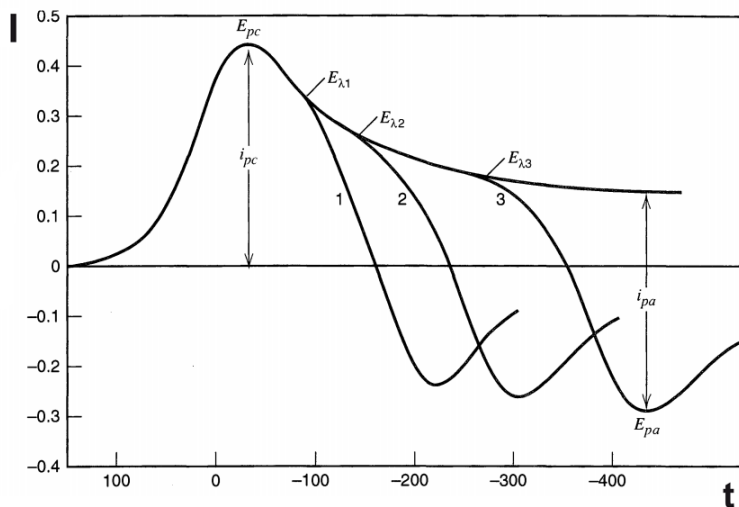
$$E(t) = E_i + vt$$

Nakon postizanja konačne vrednosti elektrodnog potencijala koja se za primer oksidacije obično postavlja na vrednost nešto manju od potencijala oksidacije rastvarača ili osnovnog elektrolita, elektrodni potencijal se vraća do potencijala gašenja.

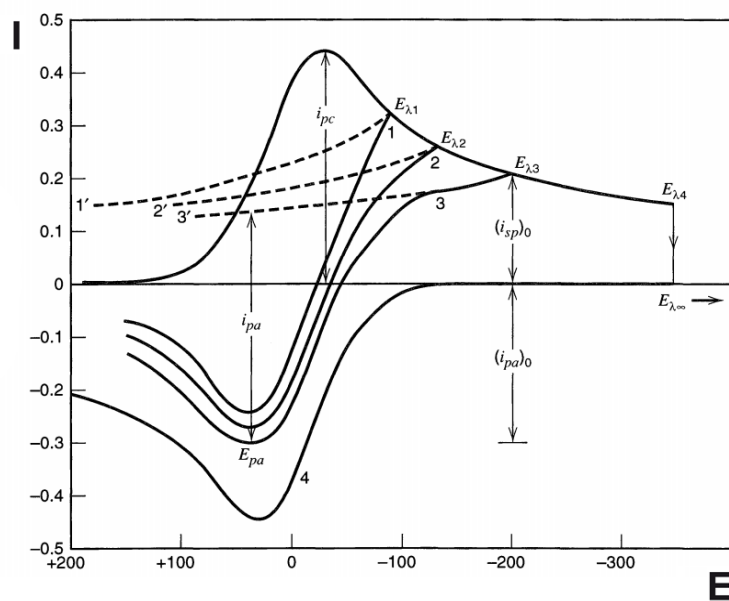
Prilikom povratka potencijala redukuje se deo vrste koja je oksidovana u direktnom snimanju. Uje brzina promene potencijala tj. brzina polarizacije ili brzina skeniranja i može da se kreće od nekoliko mV/s do nekoliko miliona V/s. Prilikom eksperimenta, krive struje se mogu snimati u zavisnosti od vremena ili u zavisnosti od potencijala, mada se ove druge mnogo češće koriste. Ciklični voltamogrami za reverzibilni sistem prikazani su na slici 12.

Testirane komponente mogu biti okarakterisane pomoću reverzibilnosti snimljenih CV tragova, kada se potencijal menja u oba smera. Do sada je metodom CV analiziran veliki broj široko rasprostranjenih prirodnih fenolnih jedinjenja (Bard & Faulkner, 2001; Kilmartin & Hsu, 2003; Kilmartin i sar., 2001; Kilmartin i sar., 2002; Zou i sar, 2002). Ova istraživanja su omogućila korišćenje CV metode za testiranje uzoraka hrane koji sadrže kompleksne smeše antioksidanata, kao što je vino (Zou i sar, 2002; Kilmartin & Zou, 2001) ili čaj (Roginsky i sar., 2003).

Iako CV testovi ne dozvoljavaju određivanje individualnih antioksidanata u kompleksnim smešama, ovo daje važne informacije o količini glavnih grupa fenola, kao što su katehini, galati, antocijani, monofenoli,... CV metoda je jeftina i produktivnija alternativa za HPLC. Zbog preklapanja mnogih pikova koji pripadaju različitim individualnim supstratima, pikovi dobijeni snimanjem CV voltamograma pokazuju širenje. Pod ovim uslovima, trebalo bi koristiti integral struje umesto samu struju da se karakteriše kvantitet antioksidanata u uzorcima hrane (Kilmartin i sar., 2002; Roginsky i sar., 2003).



(a)



(b)

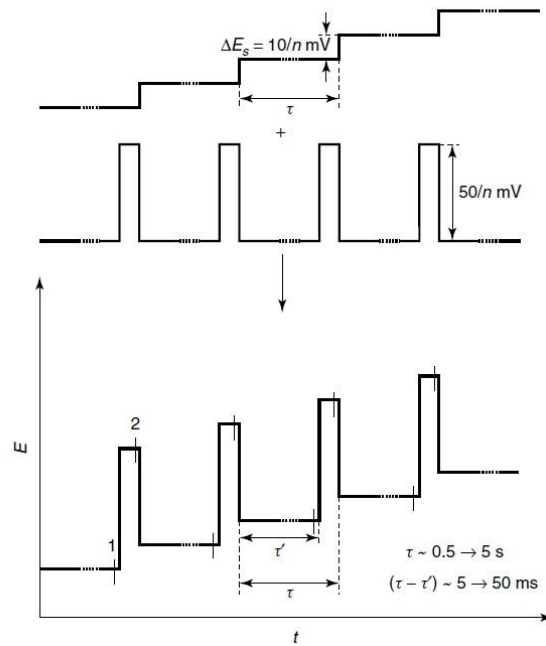
Slika 12. Ciklovoltamogram za primer redukcije u direktnom snimanju za reverzibilan sistem u zavisnosti od vremena (a) i potencijala (b) (Bard & Faulkner, 2001).

### 2.6.3. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

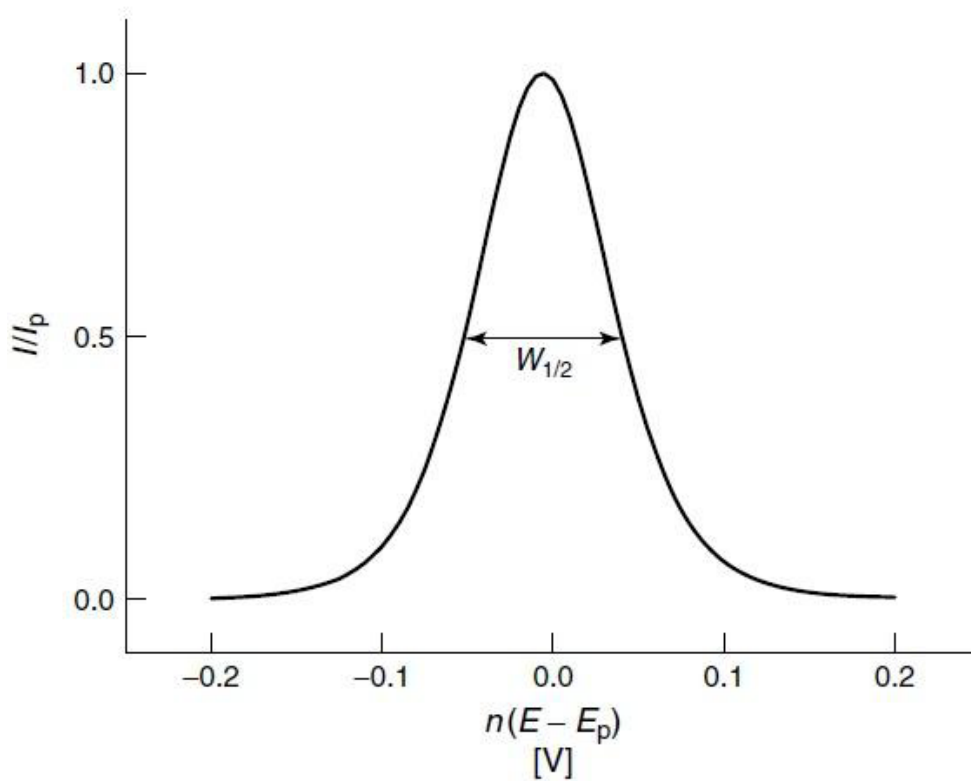
Pulsne tehnike se zasnivaju na sukcesivnom povećanju potencijalskog koraka (metod stepenica, Slika 13.) različite visine u pozitivnom ili negativnom smeru, sa uzorkovanjem struje (Gulaboski, R., Pereira, 2008; Osteryoung & Schreiner, 1988; Manojlović i sar., 2010). Najčešće pulsne tehnike koje se koriste u elektrohemiji su normalna pulsna voltametrijia (NPV) i diferencijalna pulsna voltametrijia (DPV).

U normalnoj pulsnoj voltametrijii (NPV) potencijal se ne menja linearno rastućim potencijalom nego sa pulsevima pravougaonih talasa sa rastućom visinom superponiran na početni potencijal, što je sinhronizovano sa nastajanjem kapi pri čemu svaka kap ima jedan puls potencijala sa vremenom pulsa od oko 50 ms primenjen na nju. Amplituda raste od jedne kapi do sledeće, za konstantnu veličinu i postiže maksimum od 1000 mV. Struja se meri na kraju života kapi oko 10 do 15 ms pre završetka vremena impulsa  $t_p$  (Manojlović i sar., 2010). Ova tehnika ima osetljivost oko  $10^{-7}$  M, pa se zbog toga slabije koristi za analitička određivanja.

Najefikasnija pulsna metoda je diferencijalna pulsna polarografija (voltametrijia, DPV). Kod DPV se meri razlika izmedju dve struje, prve koja se meri odmah posle završetka zadavanja pulsa i druge koja se meri nekoliko milisekundi pre početka zadavanja pulsa. Razlika izmedju dve merene struje ( $I_2 - I_1$ ) koja je prikazana na slici 13. dovodi do pika karakterističnog za DPV koji je prikazan na slici 14.



Slika 13. Diferencijalna pulsna voltametrij: način zadavanja pulsa i mesta na kojima se snima struja (Osteryoung & Schreiner, 1988).



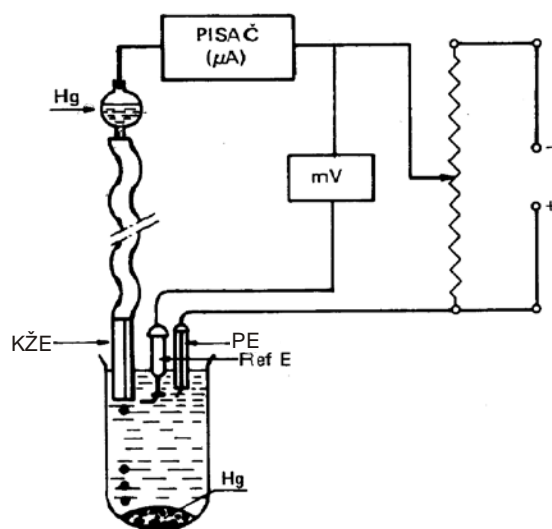
Slika 14. Oblik pika u diferencijalnoj pulsnoj polarografiji (Osteryoung & Schreiner, 1988)

#### 2.6.4. KLASIČNA POLAROGRAFIJA

Polarografija sa jednosmernom strujom (DC-direct current), odnosno klasična polarografija, je elektrohemijska tehnika kod koje se sporom promenom potencijala polarizuje elektroda male površine, tzv. radna elektroda. U klasičnoj polarografiji kao radna elektroda se obično koristi takozvana kapajuća živina elektroda (KŽE). Ona se sastoji iz staklene kapilare veoma malog unutrašnjeg prečnika, povezane za rezervoar sa živom, dok se na donjem kraju, koji je uronjen u rastvor, formira kap žive. Kap raste nekoliko sekundi, nakon čega se otkida i počinje formiranje nove kapi. Ta uvek sveža kap žive na otvoru kapilare je radna elektroda. Da bi strujno kolo bilo zatvoreno u rastvor se uranja i takozvana pomoćna elektroda. Da bi polarizacija pomoćne elektrode bila minimalna, gustina struje na njoj je manja nego na površini radne elektrode te joj je stoga površina višestruko veća u odnosu na radnu elektrodu. Pomoćna elektroda je najčešće od inertnog materijala, platine ili staklastog ugljenika. Treća elektroda u elektroanalitičkoj ćeliji je referentna elektroda, tzv. standardna elektroda sa poznatom vrednošću potencijala. Ona se sa radnom elektrodom povezuje strujnim kolom velikog otpora sa ciljem da kroz to kolo praktično ne protiče struja i služi da daje razliku potencijala između radne i referentne elektrode. Iz te razlike potencijala i poznate vrednosti potencijala referentne elektrode određuje se potencijal radne elektrode.

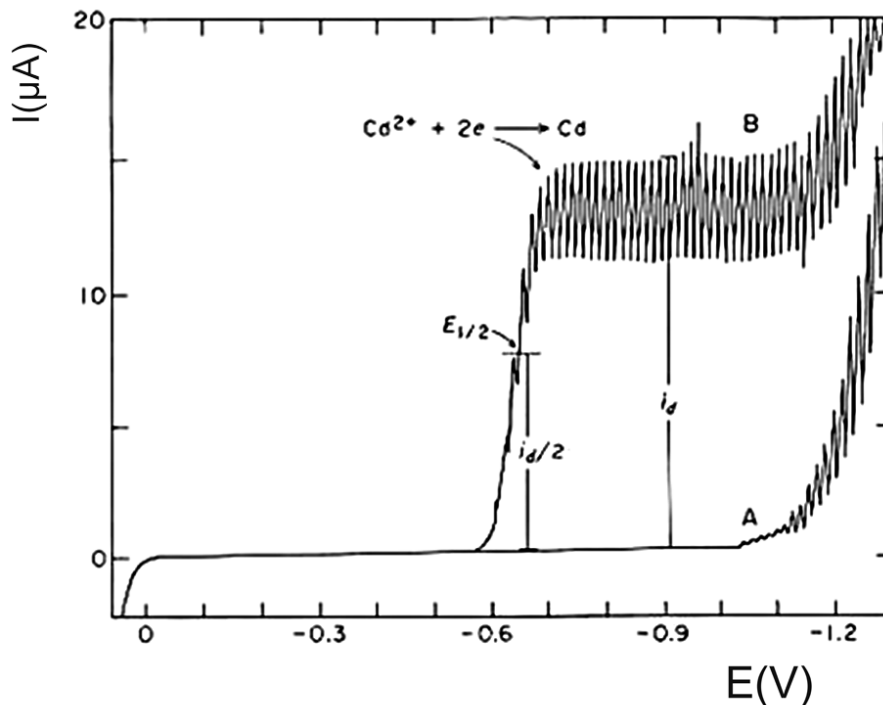
Na slici 15. data je uprošćena shema polarografskog uređaja.





Slika 15. Shema polarografskog uređaja: KŽE-kapljuća živina elektroda; PE pomoćna elektroda; Ref E referentna elektroda (Sužnjević i sar., 2011).

Kada se sporom promenom potencijala polarizacije radna elektroda dovede na potencijal na kome se neka hemijska vrsta (jon ili molekul prisutan u rastvoru) oksiduje ili redukuje, ta elektrohemijska reakcija dovodi do depolarizacije radne elektrode i do protoka električne struje između radne i pomoćne elektrode. Tokom polarografske analize snima se zavisnost jačine struje od potencijala radne elektrode a dobijena kriva se naziva i-E kriva odnosno polarogram. Svaka elektroaktivna vrsta koja reaguje na radnoj elektrodi daje na polarogramu takozvani polarografski talas. Primer polarografskog talasa redukcije jona kadmijuma  $\text{Cd}^{2+}$  dat je na slici 16. Polarografski talas ima dve važne karakteristike: visinu, koja se zove granična difuziona struja i na slici 16 je označena sa  $i_d$  i koja je proporcionalna koncentraciji vrste koja reaguje na elektrodi ( $\text{Cd}^{2+}$  u datom primeru) i polutalasnog potencijal  $E_{1/2}$ . Polutalasnog potencijal je potencijal na kome difuziona struja dostiže polovinu svoje maksimalne (granične) vrednosti. Vrednost polutalasnog potencijala je karakteristična za određenu hemijsku vrstu. Polutalasnog potencijal se koristi za kvalitativnu a vrednost granične najčešće difuzione struje (visina talasa) za kvantitativnu analizu.



Slika 16. Polarografske  $i$ - $E$  krive: A-struja osnovnog elektrolita 0.1 M KCl; B-struja redukcije jona kadmijuma iz osnovnog elektrolita ( $E_{1/2}$ -polutaladni potencijal,  $i_d$ -granična difuziona struja).

Polarografska metoda za merenje AO aktivnosti (HPMC) zasnovana na klasičnoj polarografiji sa kapljućom Hg-elektrodom (KŽE) je nedavno razvijena u Elektrohemijskoj laboratoriji, Instituta za opštu i fizičku hemiju (Sužnjević i ostali, 2011). U oblasti potencijala anodnog rastvaranja žive u prisustvu  $\text{OH}^-$  i  $\text{HOO}^-$  (perhidroksidnog) jona umesto karakterističnog polarografskog talasa (Slika 16) javlja se strujni pik. Obzirom da u alkalnim uslovima dolazi do nastanka perhidroksidnog iona, pretpostavljeno je nastajanje mešovitog kompleksa  $[\text{Hg}(\text{O}_2\text{H})(\text{OH})]$  koji je uzrok nastanka napred pomenute struje.

HPMC metoda je zasnovana na smanjenju anodne struje mešovitog kompleksa žive(II), koji nastaje u alkalnom rastvoru vodonik peroksida, u prisustvu antioksidanata. Osetljivost ispitivanog anodnog pika kompleksa žive na prisustvo antioksidanata je iskorišćena u smislu razvoja jednostavne, brze i reproduktivne metode za određivanje antioksidativne aktivnosti koja ne zahteva upotrebu skupih reagenasa, radikalskih vrsta koje ne postoje u prirodi, kratkoživećih kiseoničnih radikala itd. Razvoj i optimizacija metode su detaljno opisani u radu koji je napred naveden (Sužnjević i ostali, 2011). Osnovne karakteristike pomenute anodne struje, važne za primenu u analitičke svrhe, tj. optimalni eksperimentalni uslovi (temperatura, pH i koncentracija vodonik peroksida) su u citiranom radu dati. Reprodutivnost merenja je zadovoljavajuća. Relativna standardna devijacija granične difuzione struje na 33 puta uzastopno snimljenje i-E krive 5 mM vodonik peroksida u CL puferu pH 9,8 je 1,16%. Prisustvo individualnih fenolnih jedinjenja, ili kompleksnih uzoraka sa odgovarajućom AO aktivnošću, izaziva smanjenje anodne granične struje proporcionalno aktivnosti ispitivanih uzoraka. Veća aktivnost uzorka izaziva i veće smanjenje. Optimalna zapremina dodatka se ustanovi preliminarnim merenjem. Mutni ili obojeni uzorci se mogu direktno, bez prethodne pripreme, uneti u elektrohemijsku ćeliju. Procedura je veoma jednostavna a merenja su brza što su, uz činjenicu da metoda ne zahteva skupe reagense, značajne prednosti u odnosu na klasične spektrofotometrijske metode koje se široko primenjuju.

Polarografska metoda je do sada upotrebljena za određivanje aktivnosti različitih klasa fenolnih jedinjenja. Proučavan je odnos strukture i antioksidativne aktivnosti nekih fenolnih jedinjenja, kao što je npr. niz benzoevih kiselina i njihovih cimetnih analoga (Sužnjević i sar, 2011). Takođe, ova metoda je upotrebljena za merenje aktivnosti alkoholnih pića, kao što su komercijalna i specijalna (biljna) piva (Gorjanović i sar, 2010a), crna i bela vina

(Gorjanović i sar, 2010b), jaka alkoholna pića (Gorjanović i ostali, 2010c), ekstrakti maline (Novaković i sar, 2011) i ekstrakti hladno ceđenog bundevinog ulja (Gorjanović i sar, 2011), čajevi i biljne infuzije (Gorjanović i sar, 2012), ekstrakti propolisa (Potkonjak i sar, 2012), med (Gorjanović i sar, 2013), ekstrakti hmelja (Gorjanović i sar, 2013), kafe i surogati kafa, ekstrakti čokolada. Procesi proizvodnje sladovine i piva, starenja rakije i sušenja maline, tj. promene antioksidativne aktivnosti do kojih dolazi tokom istih, su takođe praćeni (Gorjanović i sar, 2010a,c, Novaković i sar, 2011). Dobijeni rezultati su poređeni sa rezultatima spektrofotometrijskih antioksidativnih metoda kao što su DPPH, ABTS, FRAP i ORAC.

Kao što se vidi, metoda je do sada primenjena na velikom broju raznorodnih uzoraka. Visoke korelacije sa standarnim AO metodama i ukupnim sadržajem fenola (određenim Folin–Ciocalteu-ovom metodom) potvrdile su validnost metode. Do sada je zabeležen jedan izuzetak kad su korelacije sa sadržajem fenola i DPPH testom u pitanju. Radi se o ekstraktima domaćih sorti hmelja i preparatima hmelja namenjenim primeni u pivarstvu. Naime, rezultati polarografske metode tada nisu korelirali sa sadržajem ukupnih fenola, niti sa AO aktivnošću određenom DPPH testom, već sa sadržajem humulona. Merenja aktivnosti čistih supstanci prisutnih u ekstraktima hmelja kako polarografskom tako i spektrofotometrijskim metodama omogućila su razumevanje dobijenih korelacija. Za razliku od spektrofotometrijskih merenja, aktivnost humulona merena polarografski daleko je veća od aktivnosti najzastupljenih fenola kao što su ksantohumol, rutin, katehin i kvercetin.

## 2.7. MAJČINO MLEKO

### 2.7.1. SASTAV MAJČINOG MLEKA

Majčino mleko je idealna i prirodna hrana za novorođenčad i bebe. Sadrži sve neophodne nutrijente i obezbeđuje odbrambene faktore za rast odojčadi.

Majčino mleko je svojim sastavom posebno prilagođeno bebinim potrebama. U toku prvih dana nakon rođenja, sastav mleka varira prilagođavajući se i zadovoljavajući bebine potrebe za hranom. Humano mleko sadrži 6,9-7,2% ugljenih hidrata, 3-5% lipida, 0,8-0,9% proteina i 0,2% minerala. Energetski sadržaj mleka je 60-75 kcal/100ml. Zbog specifičnog sastava majčino mleko je izuzetna hrana za odojčad, koja pored prethodno navedenih komponenti sadrži i: semi-esencijalne nutrijente, slobodne aminokiseline, enzime, hormone, faktore rasta, poliamine, nukleotide i oligosaharide. Njihovo pojavljivanje regulisano je neuroendokrinim i imunim faktorima koje kontroliše biološki sat (Gartner i sar., 2005; Ballard & Morrow, 2013).

U zavisnosti od vremena lučenja razlikuje se: kolostrum, prelazno i zrelo majčino mleko. Za tek rođeno dete kolostrum je savršena, prva hrana, potpuno prilagođena trenutnim potrebama novorođenčeta. Kolostrum se stvara u grudima majke, kod nekih već i od sedmog meseca trudnoće. To je gusta, lepljiva, bleđa do žućkasta tečnost. U poređenju sa zrelim mlekom sadrži više proteina, minerala i vitamina A, dok je sadržaj ugljenih hidrata i masti manji nego u zreлом mleku. Zahvaljujući sadržaju imunoglobulina (uglavnom IgA) u kolostrumu, novorođenče je zaštićeno od mnogih bakterija i virusa. Svojim laksativnim dejstvom kolostrum pomaže odojčetu da eliminiše prvu stolicu (mekonijum) (Musumeci i sar., 2006).

Tokom prve dve nedelje nakon porođaja luči se prelazno mleko. U odnosu na kolostrum, prelazno mleko sadrži više masti, laktoze i energetski je "jače" od kolostruma. Sastav mleka se stabilizuje posle intervala od oko 15 dana, kada počinje da se luči zrelo mleko.

Sastav zrelog majčinog mleka nije konstantan već se menja u zavisnosti od doba dana, dužine podoja, potreba odojčeta i preležanih bolesti majke. Na početku podoja mleko se luči u velikim količinama i bogato je proteinima i laktozom. Ukoliko se odojče hrani ovim mlekom u velikim količinama, ono na taj način zadovoljava i svoje potrebe za vodom, čak i u toplim suvim klimama; tako se rasterećuju bubrezi i odojče ne zadržava višak tečnosti. Mleko koje se luči na samom kraju podoja je svetlije boje zbog visokog sadržaja masti. Ova činjenica ukazuje na značaj dužine podoja u zadovoljavanju energetskih potreba odojčeta.

Majčino mleko sadrži optimalnu količinu proteina, od kojih su najzastupljeniji: kazein, alfa-laktalbumin, laktoferin, imunoglobulin IgA, lizozim i serum albumin. Svi ovi proteini neophodni su za rast odojčeta i razvoj mozga, oni se lako vare i dobro apsorbuju. Ishrana majke ne utiče na sadržaj proteina u njenom mleku. Masti su glavni izvor energije za odojče, posebno dugolančane masne kiseline, palmitinska i oleinska kiselina koje su potrebne za rast mozga. Majčino mleko sadrži i enzime potrebne za razlaganje masti. Ishrana majke utiče na sadržaj masti u mleku. Od mineralnih konstituenata u majčinom mleku su najzastupljeniji: Na, K, Ca, Mg, P i Cl. Iz majčinog mleka odojče dobro apsorbuje gvožđe (oko 50%) upravo zato što majčino mleko obezbeđuje faktore koji potpomažu ovaj proces (Ballard & Morrow, 2013).

Pored prisustva specifičnih proteina, u humanom mleku postoje i druge komponente koje ga razlikuju od mleka drugih sisara, kao što su oligosaharidi. Oligosaharidi majčinog mleka su jedinstveni za humano mleko. Oni su glavni

prebiotici majčinog mleka i utiču na uspostavljanje normalne bifidogene flore kod novorođenčadi od samog rođenja. Oligosaharidi majčinog mleka služe kao antiadhezivni antimikrobni agensi, koji sprečavaju vezivanje patogena za mukozne površine gastrointestinalnog trakta odojčadi, čime se smanjuje rizik od virusnih, bakterijskih i protozoa parazitskih infekcija (Bode, 2012). Takođe, oligosaharidi humanog mleka mogu modulirati imuni odgovor smanjujući intenzivnu mukoznu leukocitnu infiltraciju i aktivaciju, smanjujući rizik od nekrotizirajućeg enterokolitisa i obezbeđujući bebama sijalinsku kiselinu kao potencijalno esencijalni nutrijent za razvoj mozga i kognicije (Laugier i sar, 2012; Martinov i sar., 2011, Lugonja i sar., 2010).

## 2.7.2. ANTIOKSIDATIVNE OSOBINE MAJČINOG MLEKA

Rođenje je fiziološki proces, prilikom kojeg dolazi do prelaza bebe iz relativno hipoksične sredine uterusa u hiperkiseoničnu spoljašnju sredinu (Saugstad, 1990). U toku ovog procesa organizam bebe je izložen povećanom stresu što uzrokuje prekomerno stvaranje molekula koji oštećuju ćelije, kao što su superoksid- i hidroksil-radikali i druge reaktivne kiseonične vrste.

Postoje jaki dokazi da reaktivne kiseonične vrste i drugi slobodni radikali igraju važnu ulogu u mnogim degenerativnom bolestima, kao što su kancer, ateroskleroza i dijabetes. Da bi se sprečilo ili smanjilo oksidativno oštećenje različitih tkiva u telu, dojenje je važno da bi se odojče zaštitilo različitim antioksidansima.

Majčino mleko je sinergistička mešavina više interagujućih faktora, koji obezbeđuju najveću korist i najbolje funkcionisanje. Sa druge strane, majčin antioksidativni status preko antioksidativnog potencijala majčinog mleka utiče na antioksidativni status odojčeta (Newburg, 2001). Buescher i McIlheran

(Buescher & McIlheran, 1988) su utvrdili da humani kolostrum ima antioksidativne osobine, može spontano da redukuje citohrom c, utiče na razlaganje  $H_2O_2$  nastalog u polimorfonuklearnim leukocitima, i štiti epitelijalne ćelije od odvajanja koje uzrokuju polimorfonuklearni leukociti.

Endogeni antioksidanti su prisutni u majčinom mleku. Podeljeni su na enzimске i neenzimske antioksidante. Enzimski antioksidanti su glutation-peroksidaza, katalaza, superoksid-dizmutaza i koenzim Q10. Neenzimski antioksidanti su vitamin E,  $\alpha$ -tokoferol, vitamin C, retinol,  $\beta$ -karoten, koji hvataju slobodne radikale i štite novorođenčad od ROS u ranim fazama života (Scheibmeir i sar., 2005; L'Abbe & Friel, 2000), zatim izoflavonoidi, selen, proteinski antioksidanti kao što se tioredoksin i kazeini, i peptidi nastali hidrolizom proteina. Koenzim Q10 je primer lipofilnog antioksidanta. Nivo koenzima Q10,  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferola u humanom mleku direktno koreliše sa antioksidativnim kapacitetom mleka. Tioredoksin je redoks-regulatorni protein, čiji visok nivo kod novorođenčeta može da obezbedi jedinstveni zaštitni mehanizam protiv oksidativnog stresa u toku fetal-neonatalnog prelaza. Kazeini mleka mogu da inhibiraju lipidnu peroksidaciju, verovatno mehanizmom povećanja autooksidacije gvožđa. Peptidi nastali hidrolizom kazeina imaju sposobnost "hvatanja" superoksid-anjon-radikala. Vitamin C u majčinom mleku pomaže održavanje prirodne barijere u odbrani od infekcija, stimuliše fagocitnu i antimikrobnu aktivnost leukocita, povećava proizvodnju antitela i sintezu interferona. Antioksidativni potencijal izoflavonoida u majčinom mleku ima ulogu u sprečavanju nekih kancera, verovatno preko multiplih efekata povezanih sa inhibicijom karcinogeneze.

Prisustvo svih ovih komponenata uslovljava da majčino mleko poseduje antioksidativna svojstva čime pruža zaštitu ćelijama novorođenčadi (Callen & Pinelli, 2005), što je posebno važno za prevremeno rođene bebe.



Prevremeno rođene bebe (gestacioni period je manji od 37 nedelja), veoma su osetljive na bolesti uzrokovane oksidativnim stresom, koji nastaje kao posledica disbalansa između intracelularnih pro- i antioksidanasa. Prilikom rođenja dolazi do prelaza iz relativno hipoksične sredine uterusa u hiperkiseoničnu spoljašnju sredinu, što uzrokuje prekomerno stvaranje radikala koji oštećuju ćelije, kao što su superoksid- i hidroksil-radikali i druge ROS (Saugstad, 1990). Smatra se da su bronhopulmonalna displazija, nekrotični enterokolitis i retinopatija kod prevremeno rođenih beba povezani sa oksidativnim stresom. Stoga je ishrana majčinim mlekom kod prevremeno rođenih beba i beba rođenih u terminu veoma značajna. Koncentracija antioksidanata u majčinom mleku zavisi od ishrane majke, vitamina koje je majka uzimala tokom trudnoće i laktacije, kao i od geografskog položaja (Emmett & Rogers, 1997). Bebe koje se hrane majčinim mlekom imaju veći oksidativni kapacitet u krvi i niži intenzitet oksidativnog stresa u odnosu na bebe koje se hrane infant formulama. Majke koje puše povećavaju oksidativna oštećenja kod odojčadi i snižavaju antioksidativni kapacitet mleka (Zarban i sar., 2009).

Iako je uočeno da dojene bebe imaju mnogo veći nivo lipidne peroksidacije od beba koje se hrane infant formulama u uslovima sličnog antioksidativnog kapaciteta, mnoga istraživanja ukazuju da majčino mleko obezbeđuje bolju antioksidativnu zaštitu od infant formule. Proizvođači se trude da naprave infant formule koje su po sastavu približne majčinom mleku, što podrazumeva i postizanje sličnog antioksidativnog kapaciteta, tako da se infant formule obogaćuju dugolančanim polinezasićenim masnim kiselinama i nukleotidima sa selenom, pa je antioksidativni kapacitet infant formula sve približniji majčinom mleku (Cheeseman & Slater, 1993).

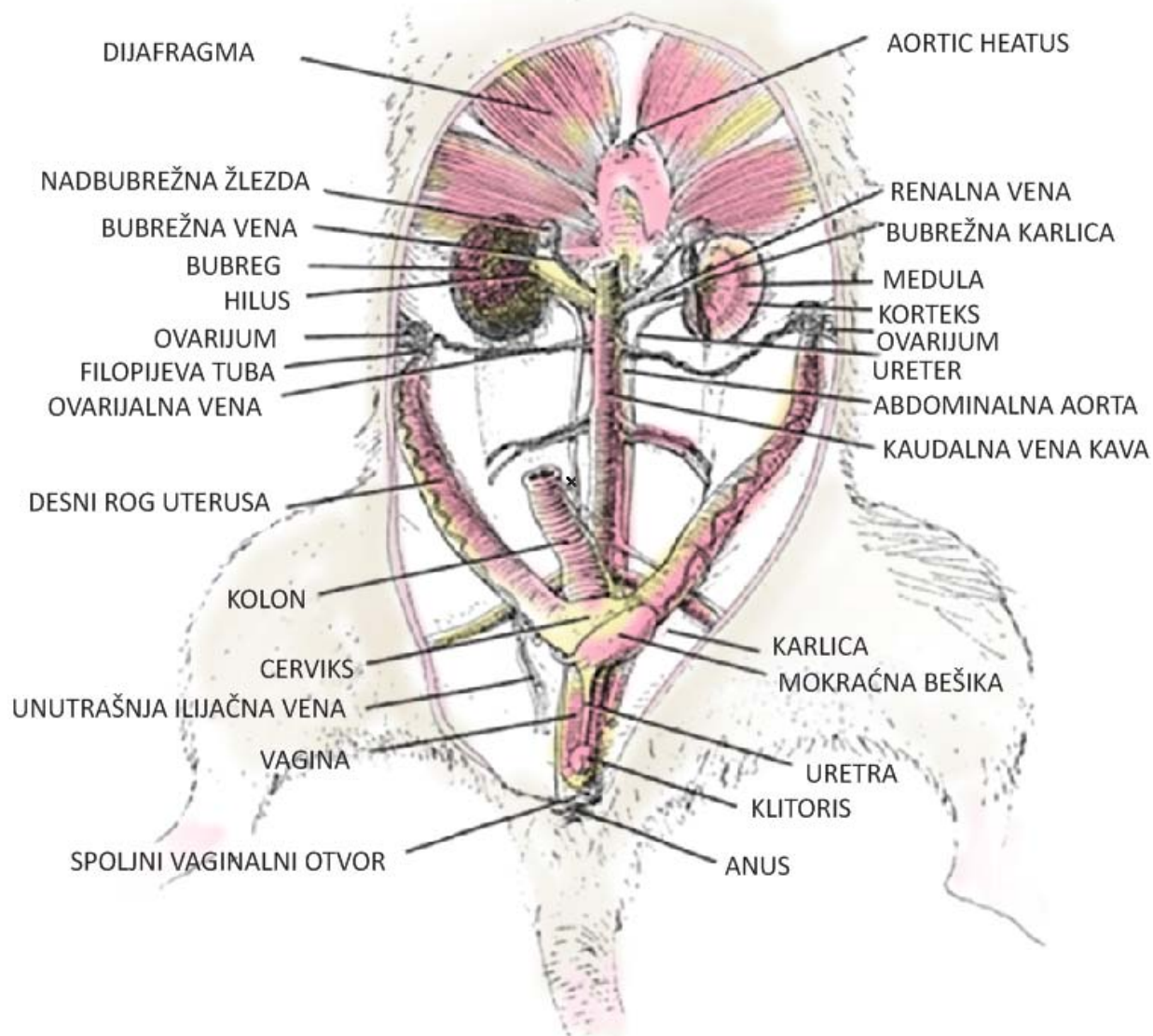
### **2.7.3. FARMAKOLOŠKI ZNAČAJ MAJČINOG MLEKA**

Model sistem za proučavanje farmakoloških efekata majčinog mleka može da bude uterus pacova (Kanner i sar., 1987; Shoichi i sar, 2008).

#### **2.7.3.1. REPRODUKTIVNI SISTEM ŽENKE PACOVA**

Ženka pacova ima dva jajnika koja se nalaze ispod bubrega, na krajnjoj levoj, odnosno desnoj strani abdomena. Jajne ćelije koje se proizvode u jajnicima oslobađaju se u jajovode, koji su kod pacova veoma kratki i teško uočljivi kao zasebne celine.

Uterus pacova čine dva roga koji daju uterusu oblik slova V. Grlić uterusa ima širi dijametar, svetlije je boje i ima čvršće vezivno tkivo. Ovakav oblik uterusa predstavlja morfološku adaptaciju koja omogućava simultani razvoj nekoliko embriona i višestruke, uzastopne porođaje. Grlić se nastavlja u vaginu koja se otvara u spoljašnji deo u koji ulazi sperma tokom kopulacije. Zrele jajne ćelije prolaze od jajnika kroz jajovode i oplođuju se u uterusu. Zigoti, budući embrioni, sukcesivno se potom smeštaju u zid uterusa. Period gestacije traje 21 dan, a rađa se u proseku 6-8 mladunaca (Marcondes i sar., 2002).



Slika 17. Prikaz uterusa pacova

Na slici 17 prikazan je uterus pacova, koji se nalazi u delu abdomena koji se naziva pelvis, dorzalno od mokraćne bešike. Svakog meseca uterus hipertrofira pod dejstvom estrogena iz jajnika pripremajući se tako za implantaciju i ishranu oplodene jajne ćelije. Ukoliko do oplodjenja ne dođe zid uterusa se ljušti, što se manifestuje krvarenjem jedinke.

Uterus se sastoji iz:

Endometrijuma (unutrašnji sloj - mukoza)

Miometrijuma (srednji, mišićni sloj) i

Perimetrijuma (spoljni sloj - seroza)

1. Endometrijum je čvrsto vezan za miometrijum. Ovaj deo uterusa podleže najvećim promenama tokom mesečnog ciklusa ženke, odnosno hipertrofira paralelno sa sazrevanjem jajne ćelije i ovulacijom, a ljušti se ukoliko do oplodjenja ne dođe. Ćelije epitela endometrijuma su pravougaonog oblika a ispod njih je široka lamina propria, tzv. endometrijalna stroma u kojoj se nalaze materične ćelije koje sintetišu prostaglandine i koje se otvaraju prema miometrijumu.

2. Miometrijum, glatki mišić uterusa, se sastoji od tri mišićna sloja: spoljne slojeve čine mišići sa longitudinalnim pravcem pružanja, dok unutrašnji sloj čine mišići koji su kružno postavljeni. Ovaj sloj ima puno velikih krvnih i limfnih sudova. Tokom trudnoće, povećava se broj i dužina glatkih mišićnih ćelija (i do 20 puta). Nove gl. mišićne ćelije se diferenciraju od nediferenciranih ćelija vezivnog tkiva, kao i od već postojećih glatkih mišića. Takođe se uvećava i elastično tkivo u perifernom miometrijumu.

3. Perimetrijum je pelvični peritoneum oko uterusa, u kom se nalaze ligamenti koji održavaju uterus na tom mestu u organizmu. Kroz ovaj sloj do uterusa dopiru mnogi krvni i limfni sudovi, kao i nervi.

Aktivnost uterusa veoma varira u zavisnosti od trenutnih funkcionalnih potreba jedinke (gestacija, partum, post partum). Tokom trudnoće glatki mišić uterusa u suštini miruje, jedino slabe, nepravilne kontrakcije obezbeđuju umeren tonus zida uterusa. Za vreme i nakon porođaja glatki mišić uterusa stvara snažne i ujednačene kontrakcije, kako bi omogućio izlazak fetusa i odmah potom sprečio krvarenje. Slične ali manje izražene promene se dešavaju i tokom menstrualnog ciklusa (Shew i sar., 1993). Kako bi se kontraktilna aktivnost uterusa održala neophodno je obezbedeti dovoljnu količinu energije, odnosno ATP, za ove procese, što se ostvaruje procesom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Međutim, to istovremeno dovodi i do produkcije ROS. Primarnu funkciju njihove eliminacije u uterusu ima endogeni AOS (Fridovich, 1978). Sve ovo ukazuje da je spontana kontraktilna aktivnost uterusa pojava od izuzetne fiziološke važnosti. Kontraktilna aktivnost uterusa kao i mnoge druge karakteristike omogućava, između ostalog, i ispitivanja dejstava različitih kontraktilnih i relaksirajućih supstanci.

### **2.7.3.2. GLATKI MIŠIĆI - STUDIJA KONTRAKCIJE NEVASKULARNOG GLATKOG MIŠIĆA**

Normalno funkcionisanje organa zavisi od kontraktilne funkcije glatkih mišića. Glatko mišićno tkivo ima ulogu u transportu hrane, urina, polnih ćelija, žuči, u irisu kontroliše dotok svetlosti u retinu, utiče na elastična svojstva zida arterija, kontrakcije glatkih mišića menjaju dijametar lumena arteriola i na taj način utiču na nivo krvnog pritiska (Horowitz i sar., 1996).

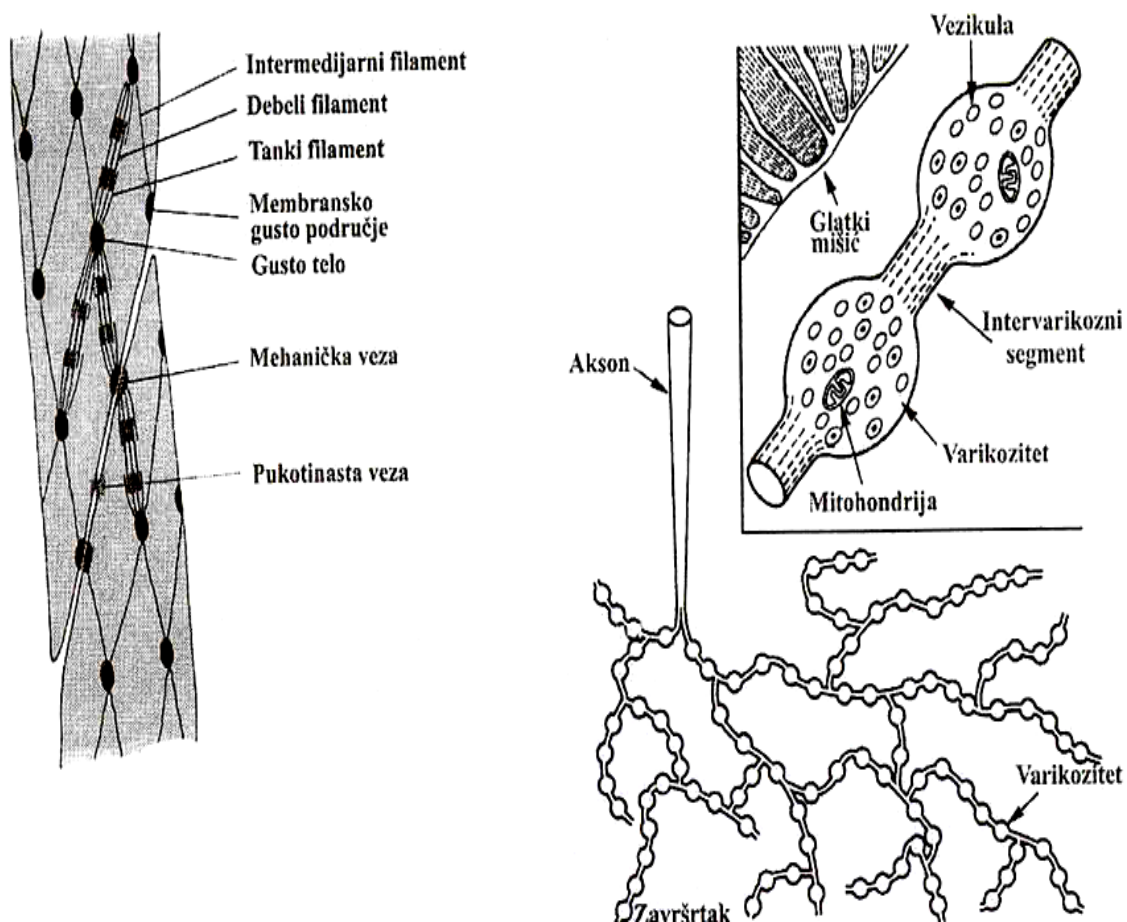
Glatka mišićna ćelija je duga 25-50  $\mu\text{m}$  i široka 5  $\mu\text{m}$  i sadrži samo jedno jedro. Ćelije su povezane pukotinastim vezama (gap junction), koji im omogućavaju međućelijsku električnu i hemijsku komunikaciju. Sarkolema glatkog mišića sadrži mikrodomene specijalizovane za ćelijsku signalizaciju, kao i jonske

kanale koncentrisane u invaginacijama membrane zvane kaveole. Kaveole sadrže mnoštvo receptora (prostaciklin, endotelin, serotonin, muskarinske receptore, adrenergičke receptore), sekundarnih glasnika (adenilat-ciklaza, fosolipaza C), G proteine, kinaze (protein kinaza C, protein kinaza A), jonske kanale (L tip kalcijumskih kanala, ATP zavisne kalijumove kanale, kalcijum-zavisne kalijumove kanale) raspoređene blizu jedan drugog. Kaveole su često u blizini sarkoplazmatičnog retikuluma ili mitohondrija što ukazuje na njihovu metaboličku ulogu.

Tanki i debeli miofilamenti su slične građe kao u poprečno-prugastim mišićima, ali ne formiraju sarkomere i raspoređeni su po celoj ćeliji (slika 18). Tanki miofilamenti su spojeni sa gustim telima (ekvivalent Z diskova) koje plivaju po citoplazmi, a samo su neka pripojena za sarkolemu. Debeli miofilamenti su sagrađeni od miozina, a tanke miofilamente sačinjavaju molekuli aktina i tropomiozina, dok je troponin odsutan. Takođe nema ni T tubula, za razliku od poprečno-prugastih mišića.

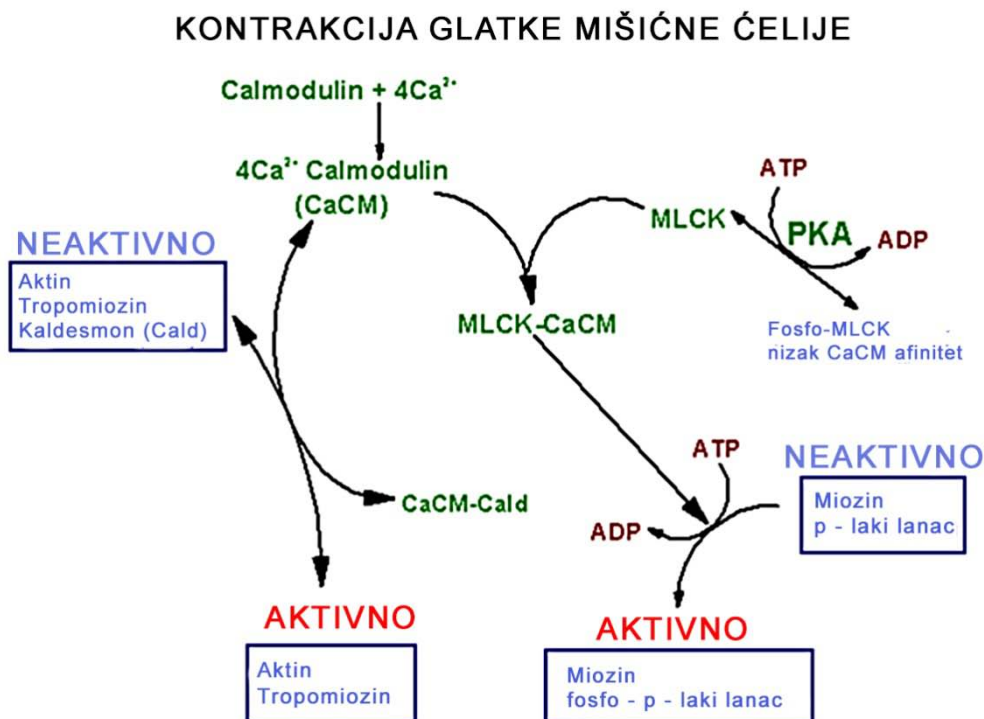
Miozinske glavice su izgrađene od teških i lakih proteinskih lanaca. Kada se laki lanci fosforilišu glavica postaje aktivirana. Enzim koji fosforiliše laki lanac je miozin kinaza lakog lanca (MLCK), koja se aktivira samo kada je mišić stimulisan.

Kontrakcija glatkih mišića može biti inicirana strujom pukotinastih veza, neuralnim i humoralnim agensima ili opterećenjem-istezanjem. Glatki mišići su inervisani autonomnim nervnim sistemom, i za razliku od skeletnih, ne poseduju prave nervno-mišićne sinapse. Akson se završava mnogobrojnim granama koje imaju proširenja (varikozitete) u kojima se nalazi neurotransmitterska supstanca. Nakon oslobađanja neurotransmiteri difunduju i dolaze do većeg broja glatkih mišićnih ćelija čime ih stimulišu. Stimulacija mišićne ćelije dovodi do povećanja intracelularne koncentracije  $Ca^{2+}$ .



Slika 18. Organizacija citoskeleta i miofilamenata u glatkoj mišićnoj ćeliji autonomnih neurona na glatkom mišiću (Stanfield & Germann, 2014)

Glavni izvor  $\text{Ca}^{2+}$ , neophodnog za mišićnu kontrakciju je ekstraćelijski  $\text{Ca}^{2+}$  koji ulazi kroz L tip kalcijumskih kanala, mada i sarkoplazmatski retikulum ovih ćelija poseduje značajnu količinu ovih jona, koje oslobađa kroz Rijanodin receptorske kanale, redoks procesom, i kroz inozitol-3-fosfat receptorske kanale preko sekundarnog glasnika inozitol-3-fosfata (IP3).



Slika 19. Mehanizam kontrakcije u glatkoj mišićnoj ćeliji (King, 1996); MLCK-miozin kinaza lakog lanca

Joni  $\text{Ca}^{2+}$  se vezuju za regulatorni protein kalmodulin. Kompleks  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin se vezuje za MLCK i tako je aktivira. Kalcijum-kalmodulin-MLCK kompleks fosforiliše laki lanac miozina, pri čemu aktivira miozin ATPazu. Fosforilisana glavica miozina se vezuje sa aktinom i omogućava kontrakciju mišića. Kada se koncentracija unutarćelijskog kalcijuma smanji, proces ide u obrnutom smeru, a enzim miozin fosfataza vrši defosforilaciju glavice miozina (slika 19).

U zavisnosti od odgovora na depolarizujuće kalijumove rastvore, glatki mišići mogu biti okarakterisani kao dvotipski: tonični i fazični. Tonični se kontrahuju i opuštaju polako i čuvaju energiju, a fazični se kontrahuju i opuštaju brzo.



Fazični glatki mišići u gastrointestinalnom i urogenitalnom traktu su regulisani crevnim nervnim sistemom i peristaltičkim peismeiker ćelijama-intersticijalne Cajal ćelije.

Fosforilacija lakog lanca miozina koreliše sa brzinom skraćanja glatkog mišića. Tokom fosforilacije dolazi do velike potrošnje energije, izmereno potrošnjom kiseonika. Nekoliko minuta nakon inicijacije kontrakcije, nivo kalcijuma značajno opada, fosforilacija lakog lanca miozina opada i potrošnja energije opada. Ipak održava se sačuvana snaga u toničnim glatkim mišićima najverovatnije usled defosforilacije (Miozin fosfataza lakog lanca defosforiliše laki lanac miozina) miozinskih mostova. Za vreme kontrakcija brzo stvaranje mostova između aktiviranog aktina i fosforilisanog miozina proizvodi snagu. Tokom mirne faze defosforilisani mostovi zadržavaju snagu pri niskoj potrošnji energije.

Relaksacija glatkog mišića je posredovana endotelnim faktorom relaksacije (azot-oksidi), endotelnim faktorom hiperpolarizacije (kanabinoid, citohrom P450, vodonik-peroksid) ili prostaciklinom (PG12). Azot-oksidi (NO) i PG12 stimulišu solubilnu guanilat-ciklazu i membransku adenilat-ciklazu, redom. Ovi ciklični nukleotidi aktiviraju protein kinazu G i protein kinazu A i fosforilišu brojne proteine, što dovodi do smanjenja intracelularnog kalcijuma (inhibiraju L tip kalcijumskih kanala, inhibiraju IP3 receptorske kanale, stimulišu sarkoplazmatičnu kalcijum-ATPaznu pumpu); smanjenja fosforilacije lakog lanca miozina menjanjem osetljivosti na kalcijum i povećanjem aktivnosti fosfataze lakog lanca miozina; stimulacije kalcijum-zavisnih kalijumovih kanala koji hiperpolarišu ćeliju; fosforilacije malih proteina toplotnog šoka (small heat shock protein) koji menjaju interakciju aktina i miozina. Ovi procesi dovode do relaksacije. NO stimuliše kalcijum-zavisne kalijumove kanale i/ili ATP zavisne kalijumove kanale i stimuliše izlaz kalijuma koji hiperpolarišu ćeliju i dovodi do relaksacije.

## 2.8. HRANA ZA BEBE - INFANT FORMULE

Majčino mleko je najbolja hrana za novorođenče. Međutim, majke često ne mogu ili ne žele da doje, pa bebe hrane adaptiranom hranom za bebe - infant formulama (IF) "zamenama za majčino mleko". Složeni sastav, a posebno biološka svojstva majčinog mleka nije moguće u potpunosti postići u hrani za odojčad, što se posebno odnosi na biološki aktivne komponente kao što su: imunoprotektivne i druge neimunogene zaštitne supstance, faktori rasta, hormoni i enzimi (Alles i sar., 2004).

Deklarisane nutritivne i biološke vrednosti infant formula približno odgovaraju sastavu majčinog mleka, i kao takve predstavljaju adekvatnu zamenu kada dojenje nije moguće.

Istraživanje u cilju poboljšanja kvaliteta infant formula usmereno je na bioaktivne komponente koje su prisutne u humanom mleku (Li i sar., 2009; Lugonja et al. 2010), odnosno cilj savremenih istraživanja ne sastoji se u kopiranju egzaktnog sastava majčinog mleka već u dostizanju funkcionalnih svojstava majčinog mleka.

Lipidi, kao jedan od osnovnih sastojaka infant formula, zadovoljavaju 40-50 % ukupnih energetske potrebe odojčeta. Proizvođači infant formula uglavnom upotrebljavaju lipide koji potiču iz biljaka. Od lipida koji nisu biljnog porekla, a dodaju se infant formulama, važno je napomenuti dugolančane polinezasićene masne kiseline (Long-Chain Polyunsaturated - LCP) i strukturne triacilglicerole. Komponente majčinog mleka koje su posebno važne su LCP arahidonska kiselina (C20-4, n-6; AA) i dokozaheksaenoinska kiselina (C22-6, n-3; DHA). AA i DHA čine veliki deo fosfolipida koji ulaze u sastav ćelijskih membrana mrežnjače i mozga i zbog toga su veoma važne za razvoj kognitivnih funkcija novorođenčeta. Međutim, biljna ulja koja se koriste u

proizvodnji infant formula ne sadrže nijednu od ovih kiselina. AA i DHA mogu da se sintetišu elongacijom lanca i desaturacijom linolne kiseline (C18:2, n-6) i  $\alpha$ -linoleinske kiseline (C18:3, n-3), koje su prisutne u svim infant formulama. Pokazalo se da je mogućnost odvijanja ove sinteze smanjena kod novorođenčadi (Koletzko & Rodriguez-Palmero, 1999). Kao posledica toga, koncentracije DHA i AA u membranama crvenih krvnih zrnaca niže su kod novorođenčadi koja se hrane infant formulama u odnosu na one koja sisaju majčino mleko.

Masne kiseline u majčinom mleku su uglavnom prisutne u formi triglicerida. Relativno visok sadržaj AA i DHA (10-20 %) u humanom mleku nalazi se u obliku fosfolipida. Pokazalo se da je usvajanje AA u obliku fosfolipida znatno efikasnije nego u obliku triglicerida (Wijendran, Huang i sar., 2002). Pretpostavlja se da su ovi lipidi zaštićeni od beta-lipolize i da se dalje transformišu u masne kiseline koje su važne u procesu mijelinizacije (Shoichi i sar., 2008). Izvori DHA i AA u komercijalno dostupnim formulama su riblje ulje (DHA u obliku triglicerida) i lipidi iz jaja (AA i DHA u obliku fosfolipida).

U skladu sa mnogobrojnom istraživanjima koja su sprovedena, ekspertski timovi širom sveta i svetski poznate zdravstvene organizacije (British Nutrition Foundation, World Health Organization) preporučuju dodavanje AA i DHA infant formulama (Wijendran, Lawrence i sar., 2002). Takođe, obogaćivanje infant formula triacilglicerolima, koji su po svojoj strukturi vrlo slični humanim (palmitinska kiselina predominantno na *sn*-2 poziciji glicerola) dovodi do bolje apsorpcije kalcijuma i masti, uslovljavajući čitav niz povoljnih efekata kod odojčeta (mekša konzistencija stolice, povećan sadržaj kalcijuma u kostima).

Sastav proteina kazeina i surutke u infant formulama na bazi kravljeg mleka se prilagođava potrebama odojčeta za esencijalnim aminokiselinama. Još uvek se ne zna optimalan odnos za odojčad, ali je uočeno da odojčad koja se hrane

infant formulama imaju povećan unos proteina u odnosu na odojčad koja se hrane majčinim mlekom (Janas i sar., 1985). Neka od istraživanja fokusirana su na smanjenje koncentracije proteina u infant formulama (Fomon i sar., 1995).

Nukleotidi čine oko 2-5 % neproteinske azotne frakcije humanog mleka (Janas & Picciano, 1982; Thorell i sar., 1996). U humanom mleku nalaze se veće količine nukleotida nego u kravljem mleku i infant formulama (Barness, 1994). Pretpostavlja se da nukleotidi imaju važnu ulogu u razvoju funkcija imunog sistema. Uočena je povećana aktivnost NK ćelija (Natural killer cells) kod odojčadi koja su se hranila infant formulama koje su bile obogaćene nukleotidima (Carver i sar., 1991). Takođe, pretpostavlja se da su nukleotidi važni za razvoj intestinalne mikroflore, metabolizam lipoproteina i da redukuju pojavu dijareje kod odojčadi. Rezultati koji su dobijeni u različitim eksperimentima su oprečni i biće potrebno još dodatnih istraživanja da bi se potvrdile neke od pretpostavljenih delotvornih osobina nukleotida na odojčad.

Uočeno je da su bebe koje sisaju majčino mleko otpornije na gastrointestinalne i respiratorne infekcije (Raisler i sar., 1999; Wilson i sar 1998). Svakako da je jedan od glavnih uzroka tome činjenica da u crevnoj flori ovih beba dominiraju bifidobakterije. Uzrok tome nalazi se u razlici koja postoji između sastava majčinog mleka i infant formula. Jedna od procentualno najzastupljenijih komponenti majčinog mleka oligosaharidi (Agostoni i sar., 2004; McCartney, 2004), podstiču rast "dobre" intestinalne flore (Boehm i sar., 2004). Za oligosaharide majčinog mleka je, *in vitro* i *in vivo* eksperimentima, potvrđeno da su prebiotici, odnosno da stimulišu razvoj i aktivnost "dobre" bakterijske flore kolona, prvenstveno bifidobakterija. Zahvaljujući tome, kod svetski poznatih proizvođača infant formula postoji trend dodavanja prebiotika, najčešće smeša galakto-oligosaharida i frukto-oligosaharida, koji su slični oligosaharidima majčinog mleka (Wainwright, 2006) mada se dodaju i inulin, laktuloza i laktitol, u cilju što bolje simulacije sastava majčinog mleka.

Egzopolisaharidi nekih vrsta bifidobakterija (*Bifidobacterium animalis* RH) pokazuju antioksidativnu aktivnost *in vitro* i *in vivo*. Kisele i neutralne frakcije egzopolisaharida značajno povećavaju aktivnosti SOD, CAT, glutation i ukupan antioksidativni kapacitet u serumu i imaju direktnu i potentnu antioksidativnu aktivnost (Xu i sar, 2011).

Različite studije potvrdile su postojanje antioksidativne aktivnosti laktobacila. Postoje različiti predloženi mehanizmi antioksidativne aktivnosti u laktobacilima (Ou i sar., 2009; Sun i sar., 2010; Virtanen, 2010). Iako postoje razlike u mehanizmima, hvatanje slobodnih radikala završava lančanu reakciju oksidacije. Nakon uklanjanja ćelija i kazeina centrifugiranjem, posmatrana antioksidativna aktivnost može poticati od ekstracelularnih metabolita, hidrolizovanih komponenti mleka ili produkata lize ćelije (Osuntoki & Korie, 2010).

### **III MATERIJAL I METODE**

### 3.1. UZORCI HRANE ZA BEBE

Uzorci zrelog majčinog mleka (MM) sakupljeni su od 10 zdravih majki, kao zajednički uzorak, u 9. nedelji laktacije nakon normalnog porođaja, koje su dobrovoljno pristale da učestvuju u studiji. Uzorci humanog zrelog mleka su čuvani u sterilnim bočicama, transportovani na ledu u laboratoriju i čuvani na -80 °C. Neposredno pre merenja uzorci su homogenizovani mešanjem na magnetnoj mešalici, da ne bi došlo do raslojavanja faza, kao u slučaju mehaničkog homogenizovanja.

Pet različitih infant formula (IF, mlečna formula za ishranu odojčadi, beba i male dece), proizvođača "IMPAMIL" Srbija, koje se upotrebljavaju kao hrana za bebe različitog uzrasta: MIL 1 početna formula mleka za mlađu odojčad od rođenja do 6 meseci starosti, MIL 2 prelazna formula mleka za stariju odojčad od 6 do 12 meseci starosti, MIL 3 formula mleka za malu decu stariju od 12 meseci, MIL PRE specijalna formula mleka namenjena prevremeno rođenoj deci i novorođenčadi male telesne mase, MIL FL specijalna mlečna formula bez laktoze, za ishranu odojčadi i male dece sa intolerancijom laktoze i dijarejom. Sve formule su sa dodatim prirodnim dijetetskim prebiotskim vlaknima.

Sve formule se pripremaju rastvaranjem 14-17 g praha u 90 mL prokuvane i ohlađene demi vode (prema uputstvu proizvođača navedenom na pakovanju), za dobijanje 100 mL obroka za bebe. Tako napravljeni uzorci smatrani su početnim, osnovnim rastvorom.

Komercijalno kravlje mleko sa sadržajem mlečne masti 3,2 % (UHT) korišćeno je kao kontrolni uzorak (KM). Kao kontrolne formule korišćene su Bebelac 1 i Aptamil, mleka za mlađu odojčad od rođenja do 6 meseci starosti, za eksperiment EPR.

Ispitivani uzorci mleka i formula prikazani su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Uzorci hrane za bebe

<b>UZORAK</b>	<b>Naziv</b>
Uzorak 1	Zrelo humano majčino mleko
Uzorak 2	<b>MIL 1</b> (Impamil, Srbija) - početna formula mleka za mlađu odojčad od rođenja do 6 meseci starosti (14 g/90 mL).
Uzorak 3	<b>MIL 2</b> (Impamil, Srbija) - prelazna formula mleka za stariju odojčad od 6 do 12 meseci starosti (15 g/90 mL.)
Uzorak 4	<b>MIL 3</b> (Impamil, Srbija) - formula mleka za malu decu stariju od 12 meseci (17 g/90 mL).
Uzorak 5	<b>MIL PRE</b> (Impamil, Srbija) - specijalna formula mleka namenjena prevremeno rođenoj deci i novorođenčadi male telesne mase (16 g/90 mL).
Uzorak 6	<b>MIL FL</b> (Impamil, Srbija) - specijalna mlečna formula bez laktoze, za ishranu odojčadi i male dece sa intolerancijom laktoze i dijarejom (14 g/90 mL).
Uzorak 7	<b>Bebelac 1</b> (Nutricia, Cuijk, Holland) - formula mleka za mlađu odojčad od rođenja do 6 meseci starosti.
Uzorak 8	<b>Aptamil</b> (Milupa GmbH, Fulda-Rodges, Germany) - formula mleka za mlađu odojčad od rođenja do 6 meseci starosti.

Karakteristike, prosečan sastav, sadržaj mineralnih supstanci i vitamina u hrani za bebe proizvođača "IMPAMIL", prikazani su u tabelama 3, 4a i 4b.



Tabela 3. Karakteristike IMPAMIL -MIL infant formula

<b>Karakteristike IMPAMIL infant formula</b>		
<b>Naziv i oznaka infant formule</b>	<b>Karakteristike</b>	<b>Način pripreme 100 ml infant formule</b>
<b>Osnovna formula (Mil 1)</b>	Standardna formula za ishranu terminski rođene dece, sa normalnom porođajnom masom. Koristi se do navršenih 6 meseci života odojčeta.	14 g praha rastvoriti u 90 ml prokuvane vode, ohlađene na 50 °C
<b>Prelazna formula (Mil 2)</b>	Adaptirana formula na koju se prelazi između četvrtog i šestog meseca i koja se uz dodatak nemlečne hrane koristi do kraja prve godine. Obogaćen gvožđem, prevenira nutritivnu anemiju kod starije odojčadi	15 g praha se rastvori u 90 ml prokuvane vode, ohlađene na 50 °C
<b>Dopunska formula (Mil 3)</b>	Za decu stariju od 12 meseci. Sa prebioticima, antioksidantima, optimalnom količinom oligominerala i vitamina. Bez glutena, saharoze, genetski modificovanih komponenti. Obezbeđuje visoku biološku usvojivost gvožđa	17 g praha se rastvori u 90 ml prokuvane vode, ohlađene na 50 °C
<b>Specijalna formula (Mil PRE)</b>	Prilagođen prevremenoj rođenoj deci, kao i novorođenčadi male telesne mase	16 g praha se rastvori u 90 ml prokuvane vode, ohlađene na 50 °C
<b>Formula bez laktoze (Mil FL)</b>	Formula bez laktoze, za ishranu odojčadi i male dece sa intolerancijom laktoze i dijarejom, proizvedena od pasterizovanog, standardizovanog mleka, hidrolizom laktoze. Sadrži lako svarljivi maltodekstrin umesto laktoze, kao i optimalnu količinu minerala, oligo-elemenata, taurina, gvožđa i vitamina D.	14 g praha se rastvori u 90 ml prokuvane vode, ohlađene na 50 °C

Tabela 4a. Prosečan sastav hrane za bebe, proizvođača "IMPAMIL"

INFANT FORMULE	u 100 ml pripremljenog obroka	Mil 1 (14g/100ml)	Mil 2 (14,5g/100ml)	Mil 3 (17g/100ml)	Mil PRE (16g/100ml)	Mil FL (14g/100ml)
Ugljeni hidrati	g	8,0	7,82	9,1	9	7,6
Laktoza	g	7	6,75	6,5	6,3	<0,01
Monosaharidi(Glc+Gal)	g	-	-	-	-	2,85
Maltodekstrin	g	-	-	-	2,7	4,75
Prirodna dijetetska vlakna	g	0,4	0,65	0,6	0,4	0,6
Masti	g	3,5	3,5	3	3,73	3,3
Lecitin	g	-	-	-	-	0,2
Zasićene masne kiseline	%	45	45	-	45	-
Nezasićene masne kiseline	%	55	55	-	55	-
$\alpha$ -linoleinska kis.	mg	60	59	-	-	-
Linolna kis	g	0,74	0,73	-	0,7	-
Polinezasićene dugolancane kiseline	mg	32	32	-	-	-
$\omega$ -3 masne kiseline	mg	78	77	-	-	-
$\omega$ -6 masne kiseline	g	0,754	0,744	-	-	-
Uk. nezasić. mk./ Uk. zasić. mk.	% (min/max)	55:45	55:45	-	55:45	-
Proteini	g	1,5	1,8	1,8	2,4	1,8
Albumini/globulini	%	-	-	-	60	-
Proteini surutke	g	1,5	-	-	-	-
Prot. surutke:kazein	%	60:40	50:50	-	60:40	-
Taurin	mg	6	6	5,9	6,2	-
L-karnitin	mg	1,5	1,5	1,5	1,9	1,5
Mineralni sastojci	g	0,4	0,53	0,4	0,45	0,45
Drugi mikronutrijenti						
Holin	mg	7	7	7,3	12	7
Inozitol	mg	3	3	2,9	3,8	3,5
Osmolarnost	mOsmol/L	300	310	290-310	290	300±10%
Energetska vrednost	Kcal (kJ)	69,5(291)	71,5(299)	78(327)	81(339)	67(281)

**Tabela 4b.** Prosečan sadržaj minerala i vitamina u hrani za bebe, proizvođača "IMPAMIL"

INFANT FORMULE	u 100 ml pripremljenog obroka	Mil 1 (14g/100ml)	Mil 2 (14,5g/100ml)	Mil 3 (17g/100ml)	Mil PRE (16g/100ml)	Mil FL (14g/100ml)
<b>Ca</b>	mg	70	70	104	120	98
<b>P</b>	mg	40	50	61	63	57
<b>Ca:P</b>		1.75:1	1.4:1	1.7:1	1.9 : 1	1.7:1
<b>Mg</b>	mg	6	7	7,5	6,7	9
<b>Fe</b>	mg	0,5	0,8	1,2	0,82	0,78
<b>K</b>	mg	75	75	90	109	89
<b>Na</b>	mg	30	30	33	40	58
<b>Cl</b>	mg	60	70	64	62	64
<b>Zn</b>	mg	0,6	0,8	0,7	0,7	0,5
<b>Cu</b>	µg	50	60	60	80	50
<b>I</b>	µg	8	8	12	12,5	11
<b>Mn</b>	mg	0,003	0,005	20	0,005	4
<b>Se</b>	µg	1,3	1,5	1,2	1,6	1
<b>Cr</b>	µg	-	-	6	-	2
<b>Mo</b>	µg	-	-	1,2	-	1,2
<b>F</b>	mg	-	-	-	0.04	-
<b>Vit. A</b>	µg	73	73	62	93	60
<b>Vit. D</b>	µg	1.2	1.2	1.4	1.35	1.1
<b>Vit. E</b>	mg	1	1	0.8	1.3	0.8
<b>Vit. K</b>	µg	5	5	5.3	4.2	4.5
<b>Tiamin (B1)</b>	µg	60	60	63	90	72
<b>Riboflavin (B2)</b>	µg	80	80	100	130	100
<b>Niacin (PP)</b>	µg	600	600	850	900	710
<b>Vit. B6</b>	µg	70	70	60	62	60
<b>Folna kis.</b>	µg	10	10	13.3	56	7.2
<b>Vit. B12</b>	µg	0,25	0.25	0.2	0.24	0.17
<b>Pantotenska kis.</b>	µg	350	350	396	400	410
<b>Biotin</b>	µg	1.5	1.5	1.9	1.6	1.6
<b>Vit. C</b>	mg	10	10	9	11	10

Sadržaj vitamina C (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija i opseg) izražen je u miligramima u 100 mL obroka, gde su vrednosti  $10 \pm 0,07$  (9-11) za infant formule a  $4,4 \pm 0,5$  (3,9-6,5) u uzorcima zrelog majčinog mleka. Količine vitamina E, izražene u miligramima po 100 mL obroka, su  $0,98 \pm 0,2$  (0,8-1,3) i  $0,45 \pm 0,31$  (0,2-0,8), respektivno.

Premiks vitamina (Fortitech Europe, Gadstrup, Denmark) je kompleks koji obezbeđuje sve neophodne vitamine (A, C, E, ..) koji ulaze u sastav infant formula, a u kojem se takođe nalaze holin, inozitol, taurin i L-karnitin na maltodekstrinu kao nosaču. Premiks sadrži vitamin C kao dominantan vitamin (u obliku askorbil-palmitata, u smeši se nalazi u koncentraciji 247,059 g/kg) prisutan u mnogo većoj koncentraciji u odnosu na ostale vitamine koji doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Premiks vitamina je upotrebljen kao referentni materijal za elektrohemijska ispitivanja u koncentracionom opsegu 0,5-1,5 mmol/L u odnosu na vitamin C.

U spreju osušen maltodekstrin (Cargill, Minneapolis, USA) dobijen enzimskom preradom skroba, koristi se kao nosač za komponente premiksa. Korišten je kao referentni material za ispitivanje antioksidativnog potencijala cikličnom voltametrijom.

Svi vodeni rastvori pripremljeni su sa prokuvanom i ohlađenom demi vodom.

### **3.2. IZOLOVANJE VODENE FAZE UZORAKA HRANE ZA BEBE**

Vodena faza uzoraka mleka dobijena je odvajanjem masne faze centrifugiranjem 30 minuta na 10 000 rpm, na temperature 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5804R) (Patton & Huston, 1986).

### 3.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ENZIMA U UZORCIMA HRANE ZA BEBE

#### 3.3.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID-DISMUTAZE

Aktivnost SOD u uzorcima mleka određena je adrenalinskom metodom (Misra, 1972). Pre određivanja aktivnosti SOD, drugi proteini su uklonjeni po metodi Tsuchihashi (1923) tretiranjem vodene faze uzoraka mleka etanolom i hloroformom (1:1:1 v/v/v), a zatim centrifugiranjem. Jedinica aktivnosti SOD se definiše kao količina enzima koja smanjuje nivo autooksidacije adrenalina za 50% na pH 10,2.

Superoxid-anjon-radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ) se generiše u reakciji oksidacije adrenalina (epinefrina) kiseonikom na alkalnom pH. Kada se  $O_2^{\bullet-}$  generiše u rastvoru, ubrzava se stvaranje adrenohroma, pošto  $O_2^{\bullet-}$  reaguje sa adrenalinom. Do kraja reakcije, kada se utroši adrenalin, formiranje adrenohroma se usporava. Ako se duže posmatra, adrenohroma nestaje i rastvor postaje braon boje koja potiče od nerastvornih proizvoda u rastvoru.

SOD reaguje sa  $O_2^{\bullet-}$ , koji je formiran u toku oksidacije adrenalina, i smanjuje brzinu formiranja adrenohroma kao i njenu količinu. Zbog usporavanja procesa SOD inhibira oksidaciju epinefrina. Procenat inhibicije (% I) je hiperbola u odnosu na koncentraciju SOD. Ovo je suprotno od drugih enzima, gde je funkcija vezana za enzimsku aktivnost linearna funkcija enzimске koncentracije.

Rastvori:

1. 0,05 M Natrijum-karbonatni pufer, pH 10,2 sa  $1 \times 10^{-4}$  M EDTA  
NaHCO<sub>3</sub>.....4,20 g/L  
Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O.....0,039 g/L

## 2. 0,1 mM EDTA

Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O..... 0.0093 g/250 ml karbonatnog pufera  
0,05 M, pH 10,2

## 3. 10% HCl za titraciju karbonatnog pufera

HCl.....22,7 ml/100 ml dH<sub>2</sub>O

## 4. 0,1 N HCl za rastvor adrenalina

HCl (37%).....1 ml / 100 ml dH<sub>2</sub>O

## 5. 25 mL of 0,0100 M adrenalina (epinephrine, MW = 183,2 g/mol) u 0,01 M HCl

Adrenalin.....45,8 mg

0,1 N HCl.. .....25 ml

U normalni sud od 25 mL sipati odmereni adrenalin, a zatim odmah rastvoriti u 0,1 N HCl, da ne bi došlo do oksidacije adrenalina, a zatim razblažiti vodom do 100 ml. Adrenalin rastvoriti tako da promena absorbance po minuti bude 0,020-0,022.

Postupak određivanja: U staklenu kivetu (3.5 ml, na 25 °C) sipati 3 ml karbonatnog pufera i 20 µl adrenalina u količini koja će proizvesti promenu apsorbance na 480 nm između 0.020-0.022 – slepa proba (u idealnom slučaju promena apsorbance je 0.020).

Uzorak se dodaje u količini da redukuje linearni deo krive autooksidacije adrenalina 30-40%. U staklenu kivetu sipati 3 ml karbonatnog pufera, 100 µl uzorka mleka i 20 µl adrenalina. Promućkati kivetu i odmah meriti promenu absorbance A 480 nm svakog minuta. Prati se  $\Delta A/\text{min}$  na 480 nm do završetka linearnosti krive.

$$\text{Specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 2 \times R}{C_{uz} \times C_{pr} \times \Delta A_{sp}}$$

R - razblaženje; C - koncentracija proteina (mg/ml)

### 3.3.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KATALAZE

Aktivnost katalaze je određivana metodom po Claiborn-u (1985). Pre određivanja aktivnosti CAT, uzorci mleka su tretirani hloroformom (1:1 v/v), a zatim centrifugirani. Vodonik-peroksid ima maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost CAT se meri praćenjem razlaganja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, odnosno padom apsorbance na datoj dužini.

Rastvori:

1. 0.05 M fosfatni pufer pH 7.0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.68/100ml dH<sub>2</sub>O

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 0.87/100ml dH<sub>2</sub>O

2. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rastvara se u puferu tako da apsorbance na 240nm bude 0.525-0.550)

Postupak određivanja: Podešavanje aparata vrši se 0.05 M fosfatnim puferom, bez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uzorci se promućkaju pre stavljanja u kivetu (kvarcna od 1.5 ml; 25 °C). Prati se pad apsorbance na 240 nm u roku od 3 minuta (5 merenja na po 30sec.). Srednja vrednost promena apsorbanci treba da bude u opsegu 0.03-0.06.

Izračunavanje:

$$\text{Specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000 \times V_{rs} \times R}{43.6 \times C_{pr} \times V_{uz}}$$

$\Delta A_{uz}$  - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

$\Delta A_{sp}$  - srednja promena apsorbance slepe probe u minuti

$V_{rs}$  - zapremina reakcione smese (ml)

$R$  - razblaženje (101)

$C_{pr}$  - koncentracija proteina (mg/ml)

$V_{uz}$  - zapremina uzorka (ml)

43.6 - molarni ekstinkcioni koeficijent za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

### 3.3.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI GLUTATION-PEROKSIDAZE

Aktivnost glutation-peroksidaze, GSH-Px, određena je GSH-zavisnom redukcijom t-butilhidroperoksida, korišćenjem modifikacije metoda koji su opisali Paglia i Valentine (1967), izolovanjem vodene faze uzorka, a zatim tretiranjem hloroformom i centrifugiranjem.

Glutation-peroksidaza katalizuje oksidaciju redukovanog glutationa (GSH) u oksidovani glutation (GSSG), uz redukciju hidroperoksida. Redukciju GSSG u GSH katalizuje enzim glutation-reduktaza (GR) uz oksidaciju nikotinamidadenin dinukleotid-fosfata (NADPH), kao koenzima.

Aktivnost GSHP-x se prati posredno određivanjem NADPH na 340 nm. Jedinica aktivnosti se definiše kao količina enzima koja oksiduje 1 nmol redukovanog nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata po minuti na 37 °C na pH 7,0.

Rastvori:

1. 1 mM GSH
2. 0.2 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>
3. 1% NaN<sub>3</sub>
4. 1 mM EDTA
5. 0.5 M fosfatni pufer pH 7.0
6. 0.03 M t-butilhidroperoksid
7. Glutation-reduktaza (3 IU)



Postupak određivanja aktivnosti:

U kvarcnu kivetu se doda 1,5 ml destilovane vode, 0,2 ml uzorka, 0,3 ml GSH, 0,6 ml NADPH, 0,1 ml EDTA, 0,3 ml fosfatnog pufera pH 7.0, 0,1 ml t-butilhidroperoksida i 0,005 ml glutation-reduktaze. Tek dodatkom GR počinje reakcija. Apsorbanca se meri na 340nm, pri T=25 °C, svakih 30 sekundi u toku 180 sekundi. Za slepu probu koriste se isti rastvori bez uzorka i uzima se 1.6 ml destilovane vode.

$$\text{Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl})}{6.22 \times V \times Low} \times 3000 \quad (\text{nM NADPH / min / mg prot})$$

$\Delta A_{uz}$  - promena apsorbance uzorka/minut

$\Delta A_{bl}$  - promena apsorbance slepe probe/minut

V - zapremina uzorka u ml

Low - koncentracija proteina u mg/ml

6.22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH

Enzimaska aktivnost se izražava kao jedinica aktivnosti po gramu proteina.

### 3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA SLOBODNIH -SH GRUPA

Količina slobodnih -SH grupa koje se nalaze u uzorcima mleka određena je po Ellman-ovoj metodi (Habeeb, 1972), na pH 7,3. 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB) je Elmanov reagens, koji se koristi u testovima za tiolne grupe u tkivima, telesnim tečnostima i proteinima.

Rastvori:

1. 3mM DTNB (5,5'-ditio-bis-2 nitrobenzoeva kiselina) u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,3  
DTNB.....12 mg  
Fosfatni pufer, pH 7,3.....10 ml
2. 0,1 M Kalijum-fosfatni pufer, 7,3  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....1,36 g/100 ml  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....2,28 g/100 ml

Postupak određivanja:

U kvarcnu kivetu se sipa 0,5 ml uzorka mleka, 0,5 ml fosfatnog pufera pH 7,3 i 200 µl DTNB. Nakon 10 minuta očitava se apsorbancu na  $\lambda=412$  nm. Za slepu probu koriste se isti rastvori bez uzorka i uzima se fosfatni pufer.

Izračunavanje:

$$A_{uz} = A - A_{bl}$$

$$X = \frac{A_{uz} \times R}{14150} \text{ mol SH/L}$$

### 3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA U UZORCIMA HRANE ZA BEBE

Određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima mleka rađeno je uporedno sa tri metode: metodom po Lowry iz uzoraka koji su korišćeni za određivanje enzimske aktivnosti, po Bradfordu iz originalnih uzoraka bez prethodnog tretmana i metodom mikroanalize iz uzoraka nakon sušenja na  $102 \pm 2$  °C.

#### 3.5.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA PO LOWRY METODI

Za određivanje koncentracije proteina korišćena je metoda Lowry-ja i saradnika (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji Cu(II)-jona i peptidnih veza ispitivanih proteina u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens), sa aromatičnim aminokiselinama tirozinom i triptofanom prisutnim u ispitivanom uzorku. Ukupni proteini određeni po Lowry metodi izraženi su u gramima po litru, u uzorcima u kojima je prethodno određena aktivnost enzima (prethodno tretirani uzorci po Tsuchihashi protokolu).

Rastvori:

1. 0.1 N NaOH
2. 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.1 N NaOH
3. 1% CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O
4. 2% KNa-tartarat
5. Reagens (pravi se neposredno pre upotrebe): 1 ml CuSO<sub>4</sub> (3), 1 ml KNa-tartarata (4), 98 ml rastvora (2)
6. Folin-Ciocalteu-ov reagens, razblažen u odnosu 1:2 sa destilovanom vodom

Postupak:

Postupak određivanja: U epruvetu sipati 20  $\mu$ l uzorka, 3 ml reagensa i 0,2 ml 0,1 N NaOH. Promućkati i ostaviti da stoji 15 minuta. Zatim dodati 0,6 ml Folin-Ciocalteu-ovog reagensa, promućkati i ostaviti da stoji 35 minuta. Meri se apsorbanca na 500 nm. Kao slepa proba koriste se isti reagensi, samo se umesto uzoraka doda 20  $\mu$ l destilovane vode. Spektralna karakterizacija nastalih obojenih kompleksa urađena je snimanjem spektara u vidljivoj oblasti u kvarcnim planparalelnim kivetama ( $b=1.000$  cm).

Izračunavanje:

**Proteini mg/ml = proteini mg/ml mleka x R**

R - razblaženje ispitivanog uzorka mleka, R=10

### 3.5.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA BRADFORDOVOM METODOM

Rastvori:

1. Koncentrovani rastvor boje

Commassie brilliant blue.....100 mg  
Etanol (95 %)...50 ml  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.....100 ml  
H<sub>2</sub>O.....do 200 ml

Bradfordov radni reagens

Koncentrovani rastvor boje.....20 ml  
Voda .....do 100 ml

Rastvoriti boju u etanolu, zatim dodati kiselinu i vodu do finalne zapremine.

Radni reagens se dobija razblaživanjem koncentrovanog rastvora boje u finalnoj zapremini, a zatim ceđenjem kroz filter-papir (Bradford, 1976).

2. Fosfatni pufer 0,1 M pH 7,0

0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....50 ml

0,1 M NaOH.....37 ml

Standardna kriva za određivanje proteina snimljena je s BSA kao standardom. Osnovni standardni rastvor (1 mg/ml) napraviti rastvaranjem BSA u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,0. Od osnovnog rastvora napraviti radne rastvore u kojima sadržaj BSA iznosi 100, 200, 400, 600, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . U 10  $\mu\text{l}$  svakog standardnog razblaženja rastvora BSA dodati 600  $\mu\text{l}$  Bradfordovog reagensa, a zatim snimati apsorbancu  $\lambda=620$  nm i odrediti jednačinu prave.

Postupak određivanja: Uzorke mleka razblažiti sa 0,1 M fosfatnim puferom pH 7,0 u odnosu 1:100. Pomešati 10  $\mu\text{l}$  razblaženog uzorka mleka sa 600  $\mu\text{l}$  Bradfordovog reagensa. Vrednost koncentracije za svaki pojedinačni uzorak određuje se iz jednačine prave na osnovu izmerene absorbance (White & Area). Uzorci su određivani u tri nezavisna merenja i uzeta je srednja vrednost.

Sva spektrofotometrijska merenja urađena su snimanjem spektra u vidljivoj oblasti na instrumentu model Cintra 40 (proizvodnja "GBC Scientific Equipment", Melbourne, Australija) u kvarcnim planparalelnim kivetama ( $b=1.000$  cm).

### 3.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA SUVE SUPSTANCE

U vegeglase ustaljene mase odmeri se približno 1,5 g uzorka mlečne formule ili uzorka majčinog mleka, a zatim zagreva - suši na  $102 \pm 2$  °C. Voda iz uzorka ispari, a zaostaje suva supstanca. Nakon hlađenja vegeglasa u eksikatoru, meri se masa na analitičkoj vagi i izračunava sadržaj suve supstance u uzorku.

### 3.7. ELEMENTARNA ORGANSKA MIKROANALIZA I PROTEINSKI EKVIVALENT

Uzorak osušiti na  $102 \pm 2$  °C do konstantne mase, zatim sprášiti u avanu i čuvati u eksikatoru iznad silika-gela. Sadržaj N, C, H i S u uzorku analiziran je u automatskom analizatoru Vario - EL III CHNS/O Elementar analyzer, firme Elementar (Hanau, Germany). Uzorci su određivani u dva nezavisna merenja i uzeta je srednja vrednost.

Proteinski ekvivalent je određen množenjem dobijene vrednosti za %N u uzorku sa 6,38, i izražen u g/100g praha, odnosno g/L uzorka uzorka majčinog i kravljeg mleka.

### 3.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LAKTOZE

Laktoza se stvara u mlečnim žlezdama svih dojećih životinja i prisutna je u njihovom mleku. Laktaza ( $\beta$ -galaktozidaza), koja katalizuje hidrolizu laktoze na D-galaktozu i D-glukozu, nalazi se u gastričnom soku. Ljudi, kojima nedostaje ovaj enzim, koji se gubi nakon detinjstva, ne mogu digestovati mleko i netolerantni su na laktozu.

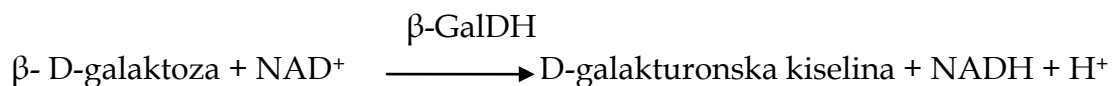
Enzimaska metoda određivanja koncentracije laktoze zasnovana je na hidrolizi laktoze do D-galaktoze i D-glukoze u prisustvu  $\beta$ -galaktozidaze, a potom na određivanju sadržaja D-galaktoze ili D-glukoze (Beutler, 1988). Određivanje koncentracije laktoze preko sadržaja D-galaktoze je pouzdanije nego preko sadržaja D-glukoze.

Za hidrolizu laktoze koristi se  $\beta$ -galaktozidaza iz *Aspergillus niger*, a hidroliza se odvija na pH 5,0.

Interkonverzija  $\alpha$  u  $\beta$  anomernu formu D-galaktoze odvija se u prisustvu galaktoza-mutarotaze (GalM).



$\beta$ -galaktoza se oksiduje sa  $\text{NAD}^+$  do D-galaktonske kiseline, u prisustvu galaktoza-dehidrogenaze ( $\beta$ -GalDH) na pH 8,6.



Količina stvorenog NADH, proporcionalna je količini laktoze, i određuje se spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 340 nm.

*Priprema uzorka za određivanje laktoze u mleku:*

Odmeriti 1 g mleka i sipati u normalni sud od 100 ml, dodati 60 ml destilovane vode, promešati. Dodati 2 ml Carrez I rastvora i promešati. Dodati 2 ml Carrez II rastvora i promešati. Dodati 4 ml 100 mM NaOH rastvora i snažno promešati. Razblažiti destilovanom vodom do 100 ml i pažljivo promešati. Filtrirati rastvor kroz Whatman 1 filter papir. Odbaciti prvih nekoliko ml filtrata. Koristiti samo bistar filtrat (rastvor uzorka).

*„Megazyme” reagensi:*

Reagens 1: natrijum-acetatni pufer ( 2,5 ml, 2 M, pH 5,0).

Reagens 2: Tris/HCl pufer (25ml, 2M, pH 8,6) plus EDTA (40 mM) i natrijum-azid (0,02%).

Reagens 3: NAD<sup>+</sup> (96 mg) u 12 ml .

Reagens 4: β-galaktozidaza, suspenzija (1,2 ml, 4000 U/ml).

Reagens 5: β-galaktoza-dehidrogenaza (200 U/ml) plus galaktoza-mutarotaza (4,1 mg/ml), suspenzija, 2,4 ml.

Reagens 6: D-galaktoza, standardni rastvor (5ml, =,4mg/ml u 0,02 % natrijum-azidu).

Reagens 1 razblažiti destilovanom vodom u razmeri 1:24 pre korišćenja.

Reagens 3 se dobija rastvaranjem sadržaja bočice u 12 ml destilovane vode, a

reagens 4 se spaja sa reagensom 1 i koristi se kao radni reagens 4.

Talasna dužina: 340 nm; plastična kiveta od 1ml; temperatura: 25 °C; finalna zapremina: 1,36 ml.



Postupak određivanja:

Pipetirati u ependorf kivetu	Laktoza		D-galaktoza	
	Slepa proba	Uzorak	Slepa proba	Uzorak
Zapremina uzorka	-	0,10 ml	-	0,10 ml
Rastvor 4	0,10 ml	0,10 ml	-	-
Proveriti da li su rastvori na dnu ependorf kiveta. Sadržaj pomešati blago vrteći ependorf kivetu. Zatim dodati:				
Destilovana voda	1,10 ml	1,0 ml	1,20 ml	1,10 ml
Rastvor 2	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Rastvor 3	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Pomešati, a zatim nakon 3 minuta čitati vrednost apsorbance na 340 nm ( $A_1$ ) i započeti reakciju dodatkom:				
Rastvor 5	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Pomešati, čitati vrednost apsorbance na 340 nm ( $A_2$ ) do kraja reakcije, tj. dok vrednost ne ostane konstanta u toku 1 min.				

Izračunavanje koncentracije laktoze:

$$\Delta A_{\text{laktoza}} = \Delta A_{(\text{laktoza} + \text{D-galaktoza})} - \Delta A_{\text{D-galaktoza}}$$

Koncentracija D-galaktoze i laktoze izračunava se na sledeći način:

$$C = \frac{V \times M_r \times \Delta A \text{ (g/L)}}{\epsilon \times d \times v}$$

gde je:

V- finalna zapremina (ml)

$M_r$  -  $M_r$  laktoze

$\epsilon$ - ekstencioni koeficijent NADH na 340nm ( $6400 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )

d- debljina kivete (cm)

v- zapremina uzorka (ml)

Koncentracija D-galaktoze izračunava se prema formuli :

$$C = \frac{2,73 \times 180,16 \times \Delta A \text{ Dgal}}{6300 \times 1 \times 0,2} = 0,3889 \times \Delta A \text{ Dgal}$$

a laktoze:

$$C = \frac{2,72 \times 342,3 \times \Delta A \text{ laktoze}}{6300 \times 1 \times 0,2} = 0,7389 \times \Delta A \text{ laktoze}$$

Svi uzorci su rađeni sa razblaženjem od 100 puta, što se uzima u obzir kada se računa koncentracija laktoze i galaktoze.

### 3.9. ISPITIVANJE KONTRAKCIJE NEVASKULARNOG GLATKOG MIŠIĆA

Eksperimenti su rađeni na izolovanom uterusima nevinih ženki pacova soja Wistar, telesne mase 200-250 g, starosti 3 meseca, poreklom sa farme za eksperimentalne životinje Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" (Nikolić-Kokić i sar, 2013). Svi protokoli za eksperiment na životinjama su odobreni od strane lokalnog etičkog komiteta za životinjske eksperimente, koji strogo prati internacionalne regulative. Pacovi se čuvaju na temperaturi od 22 °C, po 3 u kavezu i hrane *ad libitum* (na zahtev). Uterus pacova je izolovan u toku estrus faze estrogenog ciklusa. Estrus faza je određena svakodnevnim praćenjem vaginalog sekreta (Marcondes i sar., 2002). Svi pacovi su eutanazirani cervikalnom dislokacijom.

#### IZOLOVANJE UTERUSA

Nakon lokalizovanja uterusa, uterusne rogove brzo iseći i pažljivo očistiti od okolnog vezivnog tkiva. Malom pincetom podići tkivo i makazama iseći uz sam zid uterusa. Za eksperiment je dovoljan deo jednog roga dužine 2 cm. Isečak potom prebaciti u Petri šolju sa De Jalonovim rastvorom i dodatno očistiti ukoliko je potrebno. Nakon toga provući iglu sa koncem kroz otvor na jednom kraju roga i probušiti zid uterusa na oko 3 mm od otvora uterusa. Provući konac i vezati čvor tako da omča bude dijametra otprilike 0.5 cm. Ostatak konca iseći. Postupak ponoviti i sa druge strane preparata, na drugom otvoru roga uterusa. Ovde čvor vezati vrlo blizu preparata i ostaviti duži konac.

Nakon izolacije, preparat postaviti u kupatilo za izolovane organe. Uterus uroniti u vodeno kupatilo tako da se strana na kojoj je veća omča okrene nadole kako bi se preparat zakačio na kukicu. Sa gornje strane konac provući kroz otvor na transdjuseru i vezati čvor tako da preparat bude zategnut.

Uterusni rogovi su postavljeni vertikalno u kadici za organe zapremine 10 mL koja sadrži De Jalon rastvor (NaCl 154 mmol/L, KCl 5.6 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.41 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 5.9 mmol/L i glukoza 2.8 mmol/L) pod 1xg naponom. Kadica se održava na temperaturi 32-37 °C, uz aeraciju 95% kiseonika i 5 % ugljendioksida.

Nakon perioda uravnoteženja (oko 30 minuta), kada uterus uspostavlja stabilne spontane kalcijum-indukovane kontrakcije, dodaju se pojedinačne doze uzoraka majčinog mleka ili infant formula (500 µL). Mehaničke kontrakcije izolovanog uterusa pacova registruju transdjuserom (Experimetria, Budapest, Hungary). Zapis je beležen korišćenjem Experimentaria softvera. Registrovana je spontana i Ca-indukovana ritmička aktivnost izolovanih uterusa pacova (Milovanovic i sar., 2004).

Uzorkom indukovana relaksacija je izražena kao maksimalna kontrakcija u prisustvu pomenutih antagonista u medijumu (relativni odnos). Svi uterusu su zamrznuti u tečnom azotu na kraju eksperimenta.

## **PRIPREMA TKIVA**

Rastvor:

Saharozni pufer: 0.25 M saharoza, 0.05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 sa 10% HCl (u 1000 ml vode 85.56 g saharoze, 6.056 g Trisa, 0.372 g EDTA)

Postupak:

Nakon odmrzavanja, tkiva se odmere i doda im se saharozni pufer u odnosu 1:5. Tkiva se potom homogenizuju 3 puta po 10 sekundi, sa pauzama od po 10 sekundi, a potom i sonifikuju 3 puta po 15 sekundi, sa pauzama po 15 sekundi na frekvenciji od 10 KHz. Ovako tretirani uzorci su centrifugirani 90 min. Na 37500 rpm. Nakon centrifugiranja uziman je supernatant i čuvan na -20 °C.

### 3.10. ELEKTRON-PARAMAGNETNA REZONANCA UZORAKA HRANE ZA BEBE

Određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka mleka metodom EPR (Xu & Kalyanaraman, 2007), zasniva se na Fenton-ovoj reakciji upotrebom  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Reanal, Budimpešta, Mađarska) i  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$ ; Sigma-Aldrich Taufkirchen, Nemačka) u finalnim koncentracijama od 3 i 0,6 mmol/L, respektivno, nakon dodavanja BMPO (10 mmol/L). Uzorci su pripremljeni dodatkom  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{FeSO}_4$  rastvorima koji su sadržavali uzorke mleka i BMPO. Posle inkubacije od 2 minuta, snimljen je EPR spektar. U svim analizama upotrebljena je ultra čista MilliQ (18 M) voda.

EPR spektar snimljen je na spektrometru Varian E104-A EPR (Varian, Palo Alto, CA, USA) X-band (9,572 GHz) u sledećim uslovima: modulacija amplitude 0,2 mT, modulacija frekvencije 100 kHz; mikrotalasna snaga 20 mW; vremenska konstanta 32 ms; vreme skeniranja 4 minuta. U toku eksperimenta temperatura je održavana na 20 °C. Upotrebljen je Spin-trap stimulaciju 5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksida (5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide, BMPO) od proizvođača Enzo Life Sciences International (Plymouth Meeting, PA, USA). Snimanje je urađeno korišćenjem EW softvera (Scientific Software, Bloomington, IL, USA). Uzorci su snimani u 10 cm dugačkim gas-propusnim Teflonskim tubama da bi se održao konstantan nivo  $\text{O}_2$  u uzorcima (debljina zida 0,025 mm i unutrašnji dijametar 0,6 mm; Zeus Industries, Raritan, NJ, USA), a potom su smešteni u kvarcne kapilare. Merenja su započeta 2 minuta nakon starta reakcije. Spektralna simulacija svakog spektra je urađena korišćenjem WINPER SimFonia kompjuterskog programa (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Darmstadt, Germany) da bi se odredio intenzitet signala.

Simulacija parametara za signal koji potiče od BMPO/OH dodatka (proizvodi: BMPO/OH reakcije) su bili sledeći:  $a_N = 1.356$  mT,  $a^{\beta}_H = 1.230$  mT,  $a^{\gamma}_H = 0.066$  mT (diastereomer I; 81.6%) and  $a_N = 1.347$  mT,  $a^{\beta}_H = 1.531$  mT,  $a^{\gamma}_H = 0.062$  mT (diastereomer II; 18.4%) (Zhao, 2001); BMPO dodatak sa karbon radikalom (BMPO/C):  $a_N = 2.20$  mT,  $a_H = 1.45$  mT (Xu & Kalyanaraman, 2007).

### 3.11. POTENCIOMETRIJSKA TITRACIJA UZORAKA HRANE ZA BEBE

Potenciometrijsko određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta uzoraka mleka zasniva se na metodi Noyhouzer-a i saradnika (2009) kojom se određuje redoks stanje i redoks kapacitet mleka.

Uzorci mleka su razblaženi (1:1 v/v) fosfatnim puferom (pH 6,7; 0,1 M) u cilju održavanja konstantnog pH u toku merenja. Ukupna antioksidativna aktivnost mleka određivana je potenciometrijski korišćenjem jod/jodid redoks para u dvoelektrodnoj ćeliji/kiveti. Fišerova Pt elektroda je radna elektroda, a zasićena kalomelova elektroda je referentna. Ukupna antioksidativna aktivnost (redoks potencijal) merena je u rastvoru nakon dodavanja konstantnih zapremina redoks medijatora 0,1 M J<sup>-</sup>/J<sub>2</sub>. U 50 mL rastvora dodavane su porcije od 10 μL titranta svakih 90 s.

### 3.12. CIKLIČNA VOLTAMETRIJA I DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA UZORAKA HRANE ZA BEBE

Voltamogrami ciklične i diferencijalne pulsne voltametrije snimljeni su na instrumentu CHI760B (CHI Instruments, Austin, USA). Sva merenja su rađena u troelektrodnoj ćeliji/kiveti, gde je staklena elektroda (GC) upotrebljena kao radna elektroda (Model CHI 104), a dodatna Pt elektroda (platinska žica) velike površine (Model CHI 221) i Ag/AgCl (Model CHI 111) kao pomoćna i referentna elektroda. Elektrohemijske ćelije su zapremine 5 mL. Merenja su rađena u anaerobnoj atmosferi, sa uvođenjem azota u ćeliju.

Voltamogram CV je snimljen u opsegu -400 do +1000 mV, sa brzinom snimanja  $100 \text{ mVs}^{-1}$ , DP voltamogram od -100 do +700 mV sa brzinom  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . Pre svakog snimka radna GC elektroda je polirana alumina prahom (1 i  $0,5 \mu\text{m}$ , Buehler, IL, USA), a zatim isprana destilovanom vodom. Sva merenja u toku eksperimenta su rađena na sobnoj temperature,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Ispitivani su svi uzorci mleka (pripremljeni kao obrok) i njihovih vodenih faza, a za optimizaciju uslova merenja rađene su probe sa različitim koncentracijama vitamina C (1, 2 i 5 mM), u različitim oblicima: premiks rastvoren u vodi (1 mM askorbil-palmitat), vitamin C + maltodekstrin (1 mM askorbinska kiselina), vitamin C u vodi (1 mM), premiks + vitamin C (2 mM), rastvor maltodekstrina. Svi uzorci formula i različitih proba vitamina C rastvarani su u prokuvanoj i ohlađenoj ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) demi vodi, a zatim snimani sa dodatkom KCl.

Ciklična voltametrijia i diferencijalna pulsna voltametrijia se koriste za kvantifikaciju elektrohemijskih osobina antioksidanata prisutnih u različitim uzorcima mleka i određivanje antioksidativnog kapaciteta pomoću Q parametra (charge passed to oxidation peak). Potencijal na kojem je meren maksimum struje u CV metodi iznosi  $\sim 200 \text{ mV}$  (Q200), dok u slučaju DPV potencijal za maksimum struje iznosi  $\sim 500 \text{ mV}$  (Q500) (Piljac-Zegarac i sar., 2010; Veljković i sar, 2013).

### **3.13. POLAROGRAFIJA UZORAKA HRANE ZA BEBE**

Za polarografska merenja antioksidativne aktivnosti uzoraka mleka i formula korišćen je polarografski uređaj PAR (Princeton Applied Research) 174A sa priključenim X-Y pisačem (Houston Instruments, Omnigraph 2000) za automatsko beleženje polarografskih i-E krivih. Elektrodni sistem elektrolitičke ćelije sastojao se od tri elektrode:

1. Radne kapljuće živine elektrode (KŽE) kapilarnih karakteristika (masa žive istekle iz kapilare u jednoj sekundi)  $m = 2,5 \text{ mg s}^{-1}$  pri visini Hg rezervoara od 75 cm.
2. Referentne zasićene kalomelske elektrode (ZKE)
3. Platinskog (Pt) lima kao pomoćne elektrode

Za snimanje je korišćena polarografska ćelija zapremine 30 mL prilagođena za termostatiranje. Programirano vreme kapanja ( $\tau_{\text{K}}$ ) od 1 s podešeno je instrumentom. Brzina promene polarizujućeg napona iznosila je  $10 \text{ mV/s}$ , a početni potencijal  $0,1 \text{ V}$  prema ZKE. Promena potencijala polarizacije je usmerena ka negativnijim vrednostima potencijala. Suzbijanje kapacitivne komponente struje i-E signala vršeno je filterom instrumenta na poziciji 3 s. Strujna osetljivost je iznosila  $20 \text{ }\mu\text{A}$  (pun otklon skale od 250 mm). Radi uklanjanja prisutnog kiseonika struja čistog azota propuštana je kroz rastvor u ćeliji u trajanju od 5 min. Tokom snimanja održavana je inertna atmosfera (struja azota iznad rastvora). Po dodatku svakog alikvota uzorka rastvor je 30 s homogenizovan i deaerisan azotom.

Optimalna koncentracija vodonik peroksida (5 mM) u puferskom rastvoru (Clark&Lubs (CL) pufer pH 9,8) određena na osnovu linearne zavisnosti anodne struje od koncentracije vodonik peroksida (Sužnjević i ostali, 2011). U 20 mL puferskog rastvora peroksida postupno su dodati uzorci mleka: infant formule i majčino mleko. Zapremina svakog od 5 dodataka je bila  $25 \text{ }\mu\text{L}$ . Prvo je snimljena i-E kriva polaznog rastvora peroksida, a zatim nakon svakog dodatka ispitivanog uzorka. Dodaci su izazivali ravnomerno smanjenje osnovne struje peroksida. Izmeren je intenzitet, tj. visina granične struje osnovnog anodnog pika peroksida ( $i_{i0}$ ), kao i visina granične vrednosti anodne struje po svakom dodatku ( $i_{lr}$ ). Dobijene vrednosti su upotrebljene za izračunavanje procenta smanjenja osnovne struje po svakom dodatku prema sledećoj jednačini:



$$\% \text{ smanjenje } [\text{H}_2\text{O}_2] = \left( 1 - \frac{i_{1r}}{i_{10}} \right) \times 100$$

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta smanjenja granične struje od zapremine dodatog uzorka. Aktivnost uzorka izražena je kao nagib pravolinijskog dela te zavisnosti. Ova zavisnost je bila linearna u celom intervalu zapremine od 25 do 125  $\mu\text{L}$ .

### 3.14. SPOSOBNOST HVATANJA DPPH RADIKALA

Sposobnost hvatanja DPPH radikala u uzorcima mleka određena je prema DPPH metodi Zarbana i sar. (2009), uz modifikacije.

200  $\mu\text{l}$  uzorka mleka, pripremljenog kao obrok, dodati u 1800  $\mu\text{l}$  metanolnog rastvora DPPH (0.1 M). Nakon inkubacije u trajanju od 30 min na 37 °C u mraku, dodati 1 ml hloroforma i centrifugirati 5 minuta na 3000 g.

Spektralna karakterizacija nastalih obojenih kompleksa (bistar supernatant) urađena je snimanjem absorbance na 517 nm. Kontrola je 100 mM metanolni rastvor DPPH (1800  $\mu\text{l}$ ) sa 200  $\mu\text{l}$  demi vode, a procenat kapaciteta hvatanja DPPH radikala izračunava se prema jednačini:

$$\text{Sposobnost hvatanja DPPH radikala (\%)} = [(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}) / A_{\text{kontrola}}] \times 100$$

Sva određivanja i u uzorcima mleka i slepoj probi rađena su u triplikatu.

### 3.15. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA FOLIN-CIOCALTEU REAGENSOM

Folin-Ciocalteu (FC) metoda određivanja ukupnih fenola, originalno razvijena za određivanje proteina, primenjena je metoda za određivanje ukupnog sadržaja fenola u uzorcima mleka.

Ukupan sadržaj fenola određen je spektrofotometrijski prema metodi Singletona i sar. (1999) sa Folin-Ciocalteu reagensom. Pripremiti FC reagens razblaživanjem originalnog u odnosu 1:10. Uzorak mleka, pripremljen kao obrok, centrifugirati, zatim tretirati jednakim zapreminama etanola i hloroforma, i ponovo centrifugirati. Uzeti 200  $\mu$ l dobijenog bistrog supernatanta i dodati 1000  $\mu$ l razblaženog FC reagensa. Ostaviti epruvetu sa uzorkom u mraku 6 minuta, a zatim dodati 800  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%) i ostaviti da stoji 120 minuta, da se razvije plava boja.

Spektralna karakterizacija nastalih obojenih kompleksa (bistar supernatant) urađena je snimanjem absorbance na 740 nm.

Sva određivanja i u uzorcima mleka i slepoj probi rađena su u triplikatu. Ukupan sadržaj fenola (FCGAE) se izražava u odnosu na galnu kiselinu (GAE), kao  $\mu\text{g/l}$  ekvivalenta galne kiseline.

### 3.16. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati dobijeni u eksperimentima obrađeni su u Microsoft Office Excel 2007 primenom Student-vog t-testa, pri čemu je verovatnoća nulte hipoteze manja od 5% ( $p < 0,05$ ) uzimana kao značajna.

Rezultati merenja izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Rezultati su testirani jednosmernom analizom varijanse i poređeni post hoc Tukey testom značajne razlike (Tukey High Significant Difference test, Tukey HSD test). Razlike se smatraju statistički značajne ako je  $p < 0,05$  i obeležene su različitim slovima. Idućna slova ukazuju na statistički neznačajne razlike između uzoraka izračunatim Tukey HSD test.

Rezultati elektrohemijjskih merenja izraženi su kao srednja vrednost. Poređenje između grupa urađeno je korišćenjem NCSS- 2001 (NCSS, Kaysville, UT) statističkog softvera. Kruskal-Wallis ANOVA test za višestruko poređenje.

Potvrđena je tačnost polarografske HPMC metode, na osnovu korelacija sa široko korišćenim spektrofotometrijskim metodama. ANOVA i F - test su primenjeni da bi se pokazala visoka tačnost HPMC metode, u poređenju sa drugim elektrohemijjskim metodama za i sadržajem proteina. Korišćen je post - hoc Tukijev (Tukey) HSD test sa granicom pouzdanosti 95% da bi se ispitala statistička značajnost razlika između različitih uzoraka mleka. Deskriptivna statistička analiza, računanje srednjih vrednosti i standardnih devijacija urađena je korišćenjem StatSoft Statistica 10 softvera.

Izračunavanje matrice korelacija, kao i p - vrednosti (koje pokazuju nivo statističke značajnosti rezultata), analize varijanse (ANOVA) i F-testa dobijenih rezultata, urađene su u StatSoft Statistica 10 programu. Poređenje srednjih vrednosti merenja, kao i ispitivanje statističke značajnosti razlika između

različitim uzoraka mleka, vršeno je korišćenjem post-hoc Tukijevog (Tukey) HSD testa, na nivou značajnosti  $p < 0.05$ , 95% granica pouzdanosti, korišćenjem programa StatSoft Statistica 10.

## **IV REZULTATI**

#### 4.1. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U UZORCIMA HRANE ZA BEBE

Aktivnost antioksidativnog odbrambenog enzimskog sistema (SOD, superoksid-dismutaza; GSH-Px, glutation peroksidaza; -SH, sulfhidrilna grupa) u uzorcima majčinog mleka i različitim infant formulama prikazana je u tabeli 5.

Ukupna aktivnost SOD kod infant formula smanjena je u odnosu na uzorke majčinog mleka. U infant formulama smanjenje iznosi od 3 do 6 puta u odnosu na uzorak majčinog mleka, dok kod komercijalnog UHT kravljeg mleka nije detektovana aktivnost SOD enzima. Smanjenje SOD aktivnosti u svim infant formulama je statistički značajno na nivou  $p < 0,005$ .

SOD je termostabilan enzim, koji ne bi trebao da se razgrađuje tokom termičke obrade mleka (Hicks i sar, 1979). Međutim, sterilisano UHT mleko ne pokazuje SOD aktivnost, dok infant formule pokazuju. Stoga je provereno da li SOD aktivnost potiče od dodatih minerala i vitamina, koji se nalaze u formulama i koji mogu da daju lažno pozitivnu aktivnost SOD, ili od mleka upotrebljenog za pripremu ovih formula. U kontrolnom uzorku UHT mleka sa vitaminima (A, E i C) i mineralima (Fe, Se i I), koji su dodati u koncentracijama jednakim kao u infant formulama, nije dokazana antioksidazna SOD aktivnost, što ukazuje da SOD potiče od mleka upotrebljenog za pripremu infant formula.

Određivanjem aktivnosti GSH-Px u uzorcima mleka utvrđeno je da postoje statistički značajne ( $P < 0,01$ ) razlike uzoraka MIL 1, MIL 2, MIL PRE, Bebelac I Aptamil u poređenju sa uzorkom majčinog mleka (uzorak MM).

Koncentracija slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa u ispitivanim uzorcima mleka prikazana je u tabeli 5. Dobijeni podaci pokazuju da je koncentracija ove niskomolekulske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja statistički značajno ( $P < 0,05$ ) veća kod uzoraka majčinog mleka i infant formule Mil PRE u odnosu na ostale infant formule. Uzorak MIL PRE sadrži dvostruko viši nivo proteina u odnosu na uzorak majčinog mleka ( $P < 0,05$ ; Tabela 5). SH grupe potiču od proteinske frakcije mleka, pa je koncentracija SH grupa dvostruko veća kod kravljeg mleka u odnosu na majčino mleko i MIL PRE. Ovo je i očekivano, s obzirom na to da je kod ovih uzoraka i najveća ukupna koncentracija proteina.

Aktivnost enzima katalaze nije detektovana u ispitivanim uzorcima infant formula, kao ni u uzorku majčinog mleka.

**Tabela 5.** Aktivnost antioksidativnog odbrambenog enzimskog sistema u uzorcima majčinog mleka i različitim infant formulama. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

Uzorak	Ukupna SOD (U/g proteina)	Slobodne -SH grupe (mmol/L)	GSH-Px (nmol NADPH min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> proteina)	Ukupni proteini (g/L) Po Lowry metodi
<b>MM</b>	5,00 $\pm$ 2,3a	35,60 $\pm$ 2,4a	9,72 $\pm$ 2,16a	12,02 $\pm$ 0,31a
<b>MIL 1</b>	1,56 $\pm$ 0,56b	23,32 $\pm$ 3,1b	1,58 $\pm$ 0,25b	15,57 $\pm$ 0,21b
<b>MIL 2</b>	0,96 $\pm$ 0,13b	12,42 $\pm$ 1,2b	4,10 $\pm$ 0,16b	17,93 $\pm$ 0,35b
<b>MIL 3</b>	1,63 $\pm$ 0,35b	25,14 $\pm$ 1,6b	8,03 $\pm$ 0,21a	19,46 $\pm$ 0,15b
<b>MIL PRE</b>	0,96 $\pm$ 0,23b	35,17 $\pm$ 2,6a	4,32 $\pm$ 0,15b	21,60 $\pm$ 0,42b
<b>MIL FL</b>	1,01 $\pm$ 0,21b	15,52 $\pm$ 1,2b	6,83 $\pm$ 0,81a	19,45 $\pm$ 0,35b
<b>BEBELAC</b>	0,72 $\pm$ 0,15b	12,54 $\pm$ 1,3b	3,11 $\pm$ 0,65b	16,51 $\pm$ 0,13b
<b>APTAMIL</b>	1,32 $\pm$ 0,42	14,31 $\pm$ 1,1b	2,51 $\pm$ 0,42b	17,35 $\pm$ 1,6b
<b>KM UHT</b>	-	72,40 $\pm$ 2,3	-	24,17 $\pm$ 2,2

<sup>a,b</sup> Različita slova u superskriptu, kod podataka prikazanih u istoj koloni, su oznaka da se vrednosti statistički značajno razlikuju na nivou P <0,05 za SOD aktivnost, Sadržaj slobodnih -SH grupa i Sadržaj ukupnih proteina, a GSH-Px aktivnost se statistički značajno razlikuje na nivou P <0,01.



Koncentracija proteina u uzorcima mleka određena je na više načina, zbog složenosti uzoraka mleka. Dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 6. Koncentracija proteina određena po Bradfordovoj metodi (određena u originalnom uzorku mleka bez prethodnog razblaživanja i centrifugiranja) ne pokazuje odstupanja od vrednosti koje je deklarirao proizvođač formula, a vrednosti za zrelo majčino mleko se uklapaju u literaturne referentne vrednosti. Metoda po Lowry-ju primenjena je za određivanje sadržaja proteina u uzorcima mleka koji su prethodno tretirani po Tschuschicashi metodi, po proceduri za pripremu uzoraka za enzimske metode. Vrednosti za ukupne proteine dobijene Lowry metodom se razlikuju u odnosu na dobijene vrednosti po Bradfordovoj metodi, zbog pretretmana kojim se originalni uzorci centrifugiraju i ekstrahuju etanolom, čime se odstranjuje lipidna frakcija mleka u kojoj postoji mogućnost da se nađu proteini, kao i zbog neophodnog razblaživanja uzoraka, kojima se povećava mogućnost greške merenja. Visoka osetljivost Bradfordove metode je dovoljna da prevaziđe zamućenost rastvora koja potiče od masne faze uzoraka, pa ova metoda može da se koristi za određivanje koncentracije proteina u uzorcima mleka i mleka u prahu sa i bez ekstrakcije lipidne faze umesto metode po Kjeldalu (Kamizake i sar., 2003).

Referentne literaturne vrednosti za sadržaj ukupnih proteina u humanom majčinom mleku su: kolostrum  $22,59 \pm 3,66\%$ , prelazno mleko  $12,91 \pm 1,48\%$ , zrelo mleko  $7,67 \pm 1,07\%$  (Jenness, 1979), a za kravlje mleko  $3,5\%$  (Fox & McSweeney, 1998). Literaturne vrednosti za sadržaj laktoze u humanom mleku su:  $6,7-7,2\%$  (Claiborne, 1985), za kravlje mleko  $4,9\%$  (Fox, 1995).

Tabela 6. Sadržaj ukupnih proteina mleka određen metodom po Bradfordu, metodom po Lowry-ju i dobijen izračunavanjem proteinskog ekvivalenta, sadržaj suve supstance, vode, laktoze i galaktoze u uzorcima mleka.

Uzorak	Ukupni proteini (mg/mL obroka) po Bradfordu	Ukupni proteini po deklaraciji proizvođača	Ukupni proteini (mg/mL obroka) po Lowry metodi	Ukupni proteini % Nx6,38 (proteinski ekvivalent)*	Ukupni proteini % N (po deklaraciji proizvođača)	Vlaga (%)	Suva supst. (%)	Laktoza (g/L)	Galaktoza (g/L)
<b>MM</b>	11,65±0,28	-	12,02±0,31	10,65	-	90,27	9,73	6,55	0,0028
<b>MIL 1</b>	14,98±0,10	15	15,57±0,21	10,91	10,7	3,51	96,49	6,95	0,0046
<b>MIL 2</b>	18,10±0,43	18	17,93±0,35	11,95	12,0	3,17	96,83	7,04	0,0031
<b>MIL 3</b>	19,96±0,51	20	19,46±0,15	11,86	11,8	3,60	96,40	6,45	0,0034
<b>MIL PRE</b>	23,77±0,41	24	21,60±0,42	14,93	15,0	3,70	96,30	6,38	0,0070
<b>MIL FL</b>	17,87±0,01	18	19,45±0,35	12,76	12,9	4,37	95,63	0,03	0,0937
<b>KM UHT</b>	30,03±0,8	31	24,17±2,2	32,2	-	88,52	11,48	4,49	0,0006

\* Ukupni protein %N za formule su rađeni iz originalnog suvog uzorka praha, bez prethodnog rastvaranja u vidu obroka

U tabeli 7 prikazane su vrednosti dobijene organskom mikroanalizom uzoraka mleka, određene u suvim uzorcima, dobijenim sušenjem na  $102 \pm 2$ . Najmanji sadržaj N (1,67%) nađen je u uzorku majčinog mleka (MM), pa je i odgovarajuća vrednost proteinskog ekvivalenta najniža, dok uzorak kravljeg mleka ima najviši sadržaj N (4,49%) i proteinski ekvivalent (32,20). Proteinski ekvivalenti ispitivanih infant formula odgovaraju sadržajima ukupnih proteina (%N) navedenim na deklaracijama proizvođača.

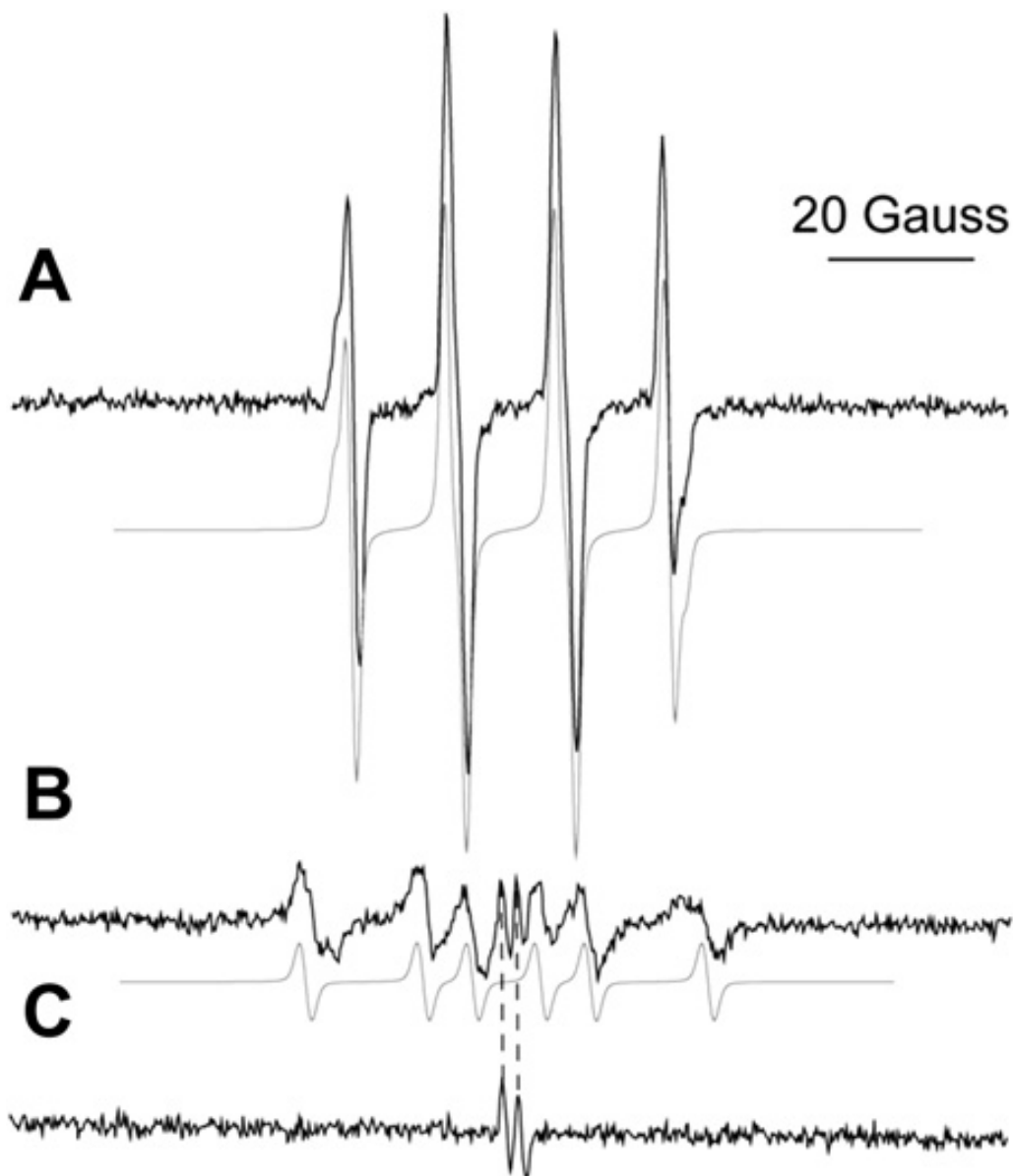
Tabela 7. Rezultati elementarne organske mikroanalize suvih uzoraka mleka i proteinski ekvivalenti

Uzorak	%C	%H	%N	%S	Proteini (Proteinski ekvivalent: Nx6,38) (g/100g praha)
<b>MM</b>	43,90	7,14	1,67	< 0,2	10,65
<b>MIL 1</b>	51,22	7,83	2,05	0,30	10,91
<b>MIL 2</b>	51,46	8,28	2,00	0,31	11,95
<b>MIL 3</b>	49,25	7,69	1,95	< 0,2	11,86
<b>MIL PRE</b>	49,70	7,79	2,35	< 0,2	14,93
<b>MIL FL</b>	50,38	7,89	2,00	< 0,2	12,76
<b>KM</b>	51,00	8,06	4,49	< 0,35	32,20

## 4.2. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDANATA U UZORCIMA HRANE ZA BEBE PRIMENOM ELEKTRON-PARAMAGNETNE REZONANCE

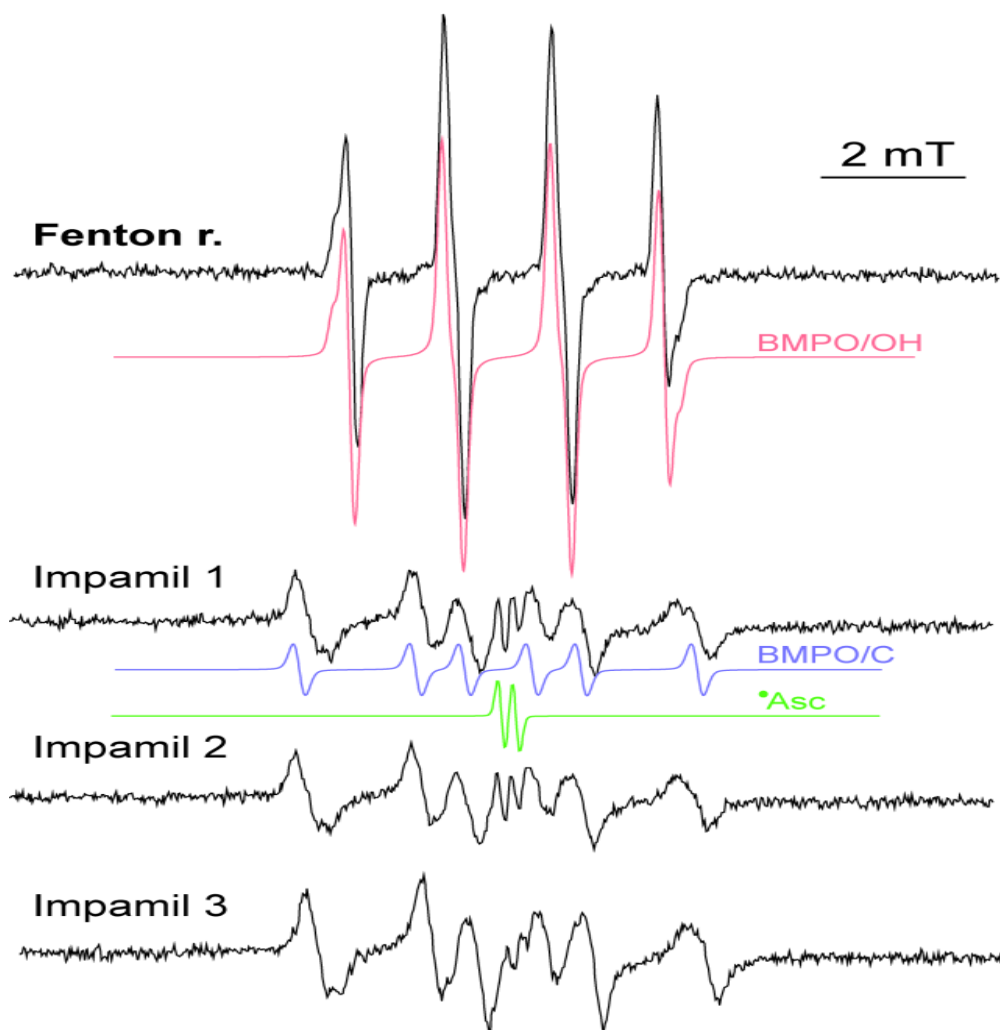
EPR spektar u Fenton-sistemu prikazan je na slikama 20, 21 i 22. Fenton-ova reakcija u sistemu koji sadrži: fosfatni pufer (pH 7,4),  $\text{Fe}^{2+}$  (0,6 mmol/L) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mmol/L), bez dodatog uzorka prikazana je na slici 20 A, kao i spektralna stimulacija 5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksida (BMPO) adukta sa  $\cdot\text{OH}$  radikalom (kriva sive boje).

U svim ispitivanim uzorcima hidroksil-radikal reaguje sa biomolekulima (proteini i askorbat) i produkuje ugljenik-centrirani i askorbil-radikal (slika 20). Na slici 20B prikazana je Fenton-ova reakcija u prisustvu uzorka majčinog mleka. Kriva sive boje predstavlja spektralnu stimulaciju BMPO adukta sa ugljenik-centriranim radikalom. Intenzitet signala BMPO adukta sa ugljenik-centriranim radikalom je bio  $81 \pm 10$ . Signal askorbil-radikala pojavljuje se u majčinom mleku izloženom Fenton-ovom sistemu (slika 20B). Askorbil-radikal je stabilan i može se EPR-om detektovati bez spin-trapa što je prikazano na slici 20C, gde se vidi Fenton-ova reakcija uzorka majčinog mleka bez spin-trapa. Prisutne linearne karakteristike askorbil-radikala na slici 20 C povezane su isprekidanim linijama sa signalom askorbil-radikala na slici 20 B. Nivo ovih reaktivnih bioprodukata je bio najniži u majčinom mleku u odnosu na ostale ispitivane uzorke.



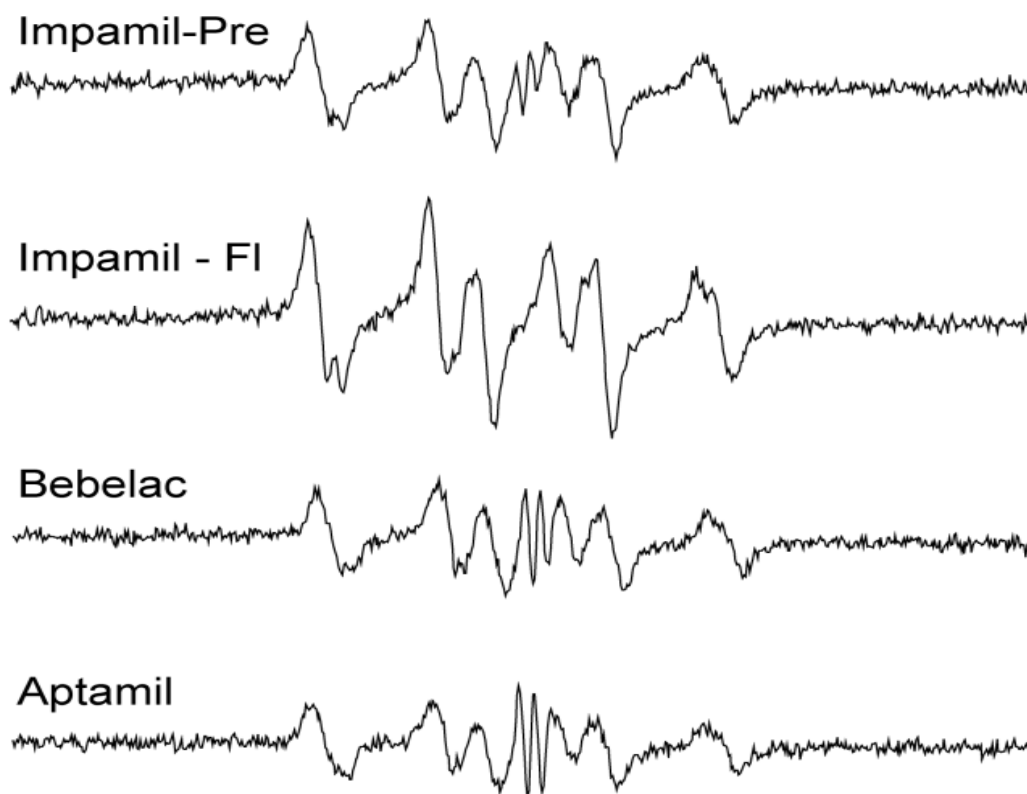
Slika 20: Fenton-ova reakcija uzorka majčinog mleka u fosfatnom puferu (pH 7,4),  $\text{Fe}^{2+}$  (0,6 mmol/L) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mmol/L). Siva kriva predstavlja spektralnu stimulaciju 5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksid (BMPO) adukta sa  $\cdot\text{OH}$  radikalom. B: Fenton-ova reakcija u uzorku MM. Kriva sive boje predstavlja spektralnu stimulaciju BMPO adukta sa ugljenik-centriranim radikalom. Intenzitet signala BMPO adukta sa ugljenik-centriranim radikalom je bio  $81 \pm 10$ . C: Fenton-ova reakcija uzorka MM bez spin trap. Prisutne su linearne karakteristike askorbil-radikala (povezane sa signalom askorbil-radikala u B).

U uzorcima MIL 1, 2, 3 PRE i FL nivo ugljenik-centriranog radikala je bio sličan majčinom mleku, dok je nivo askorbil-radikala bio jasno viši (slike 21 i 22). Fenton-ova reakcija u uzorku MIL 1 intenzitet signala  $108 \pm 11$ ; u uzorku MIL 2, intenzitet signala  $111 \pm 7$  i u MIL 3, intenzitet signala  $171 \pm 10$  prikazane su na slici 21.



Slika 21. Fenton-ova reakcija različitih uzoraka mleka u fosfatnom puferu (pH 7,4),  $\text{Fe}^{2+}$  (0,6 mmol/L) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mmol/L). Plava kriva predstavlja spektralnu stimulaciju 5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksida (BMPO) adukta sa  $\cdot\text{OH}$  radikalom. Fenton reakcija u uzorcima infant formula MIL 1 (Impamil 1), MIL 2 (Impamil 2), MIL 3 (Impamil 3).

Fenton reakcija u MIL PRE, intenzitet signala  $107\pm 16$ ; u MIL FL, intenzitet signala  $145\pm 7$ ; u Bebelac, intenzitet signala  $94\pm 13$ ; u Aptamil, intenzitet signala  $80\pm 20$  prikazane su na slici 22.



Slika 22. Fenton-ova reakcija različitih uzoraka mleka u fosfatnom puferu (pH 7,4),  $\text{Fe}^{2+}$  (0,6 mmol/L) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mmol/L): Fenton-ova reakcija u uzorcima infant formula MIL PRE (Impamil-PRE), MIL FL (Impamil-FL), Bebelac i Aptamil.

Može se videti da i MM i IF hvataju  $\cdot\text{OH}$  radikal pri čemu u MM nastaje ugljenik-centrirani radikal i askorbil-radikal, a u IF nastaje ugljenik-centrirani radikal. Antioksidativni kapacitet majčinog mleka je očigledno 3 puta veći od IF, posebno kada se uzme u obzir da ugljenik-centrirani radikal ima za cilj različite biološke molekule. Ugljenik-centrirani radikali mogu za cilj da imaju tiolnu grupu (npr. cistein) i da proizvedu tiil-radikal (Buettner 1993). Dodatno, ugljenik-centrirani radikali mogu izvršiti demetilaciju kombinovanu sa produkcijom drugog ugljenik-centriranog radikala (Hioe & Zipse, 2010).

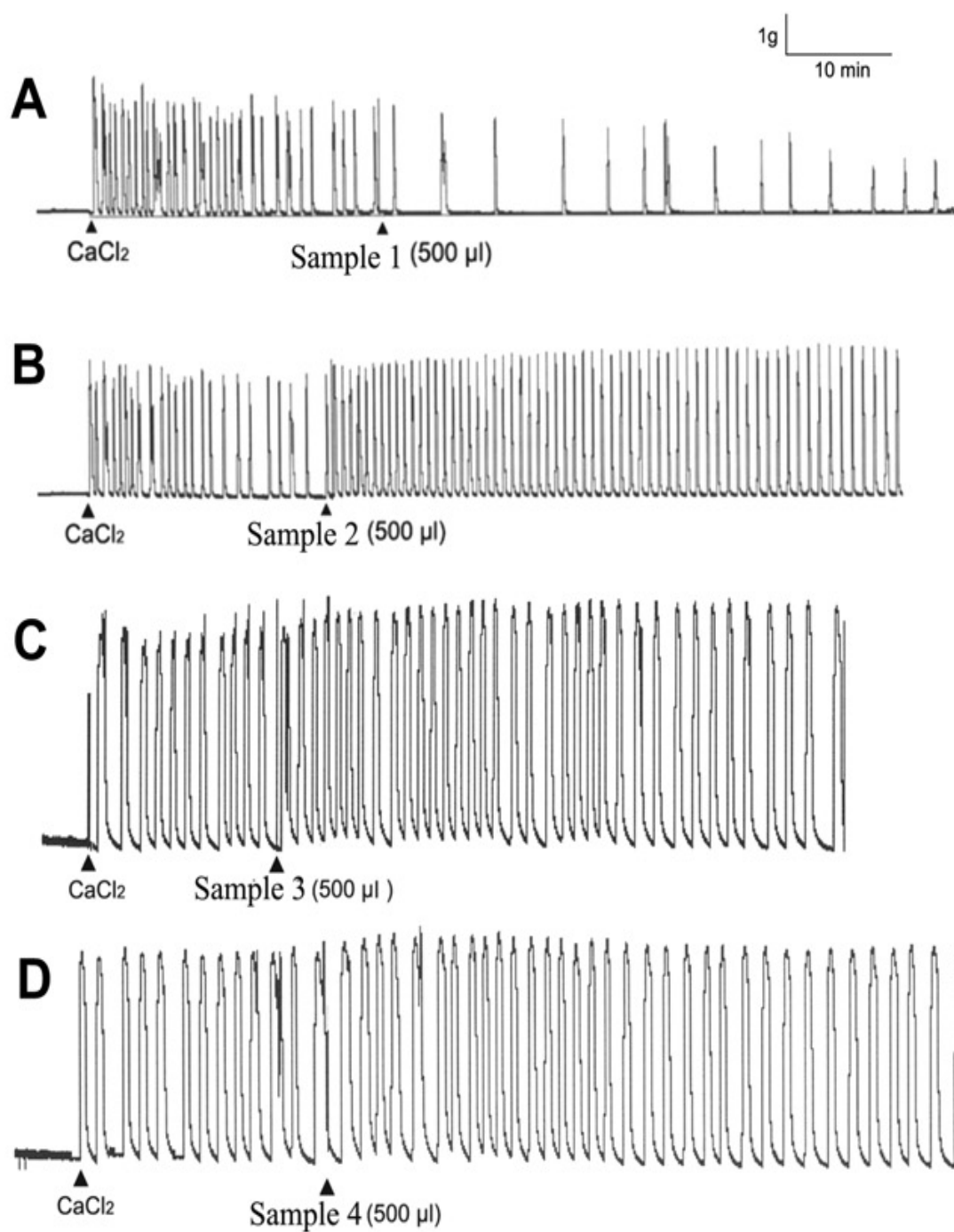


### 4.3. FARMAKOLOŠKA ISPITIVANJA - ISPITIVANJE KONTRAKCIJE NEVASKULARNOG GLATKOG MIŠIĆA DEJSTVOM RAZLIČITIH UZORAKA HRANE ZA BEBE

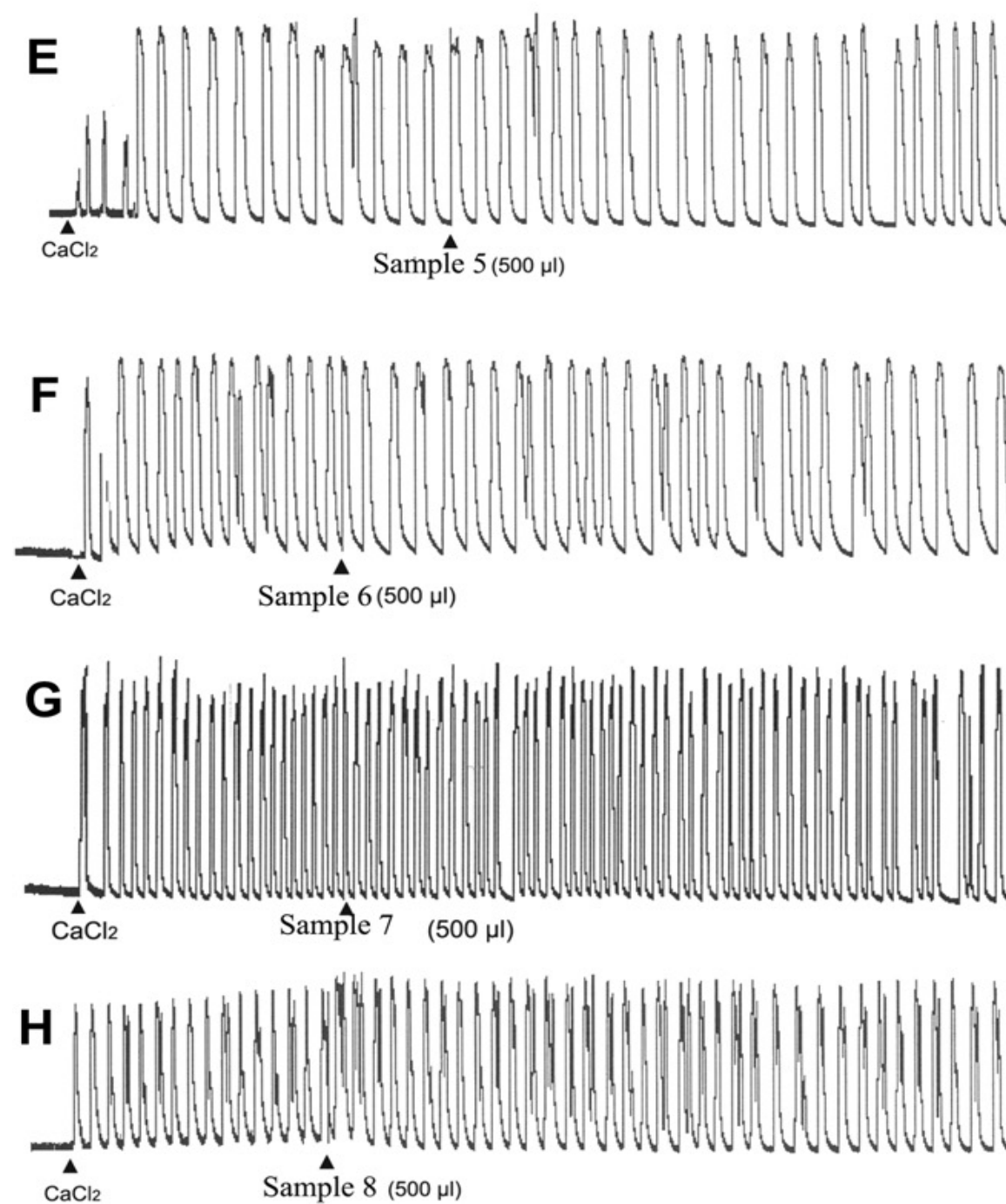
Svi eksperimenti su izvedeni na izolovanim uterusima nevinih ženki pacova u fazi estrus, u cilju ispitivanja efekata uzoraka mleka na spontanu i Ca-indukovanu ritmičku kontraktilnost. Nakon perioda uravnoteženja kada su uterusu postigli stabilne kontrakcije (Ca-indukovane), tretirani su pojedinačnim uzorcima mleka (500  $\mu$ l) i efekti su beleženi do totalne relaksacije (Slike 23 i 24). U toku ispitivanja kontrakcije nevaskularnog glatkog mišića praćeni su intenzitet i frekvencija kontrakcije.

Slika 23A prikazuje efekte dejstva majčinog mleka na kontrakcije kalcijum-iniciranog uterusnog mišića. Kalcijum indukuje kontrakcije nevaskularnog glatkog mišića uterusu, pri čemu se javljaju kontrakcije određene frekvencije i intenziteta impulsa. Nakon dodavanja uzorka majčinog mleka frekvencija impulsa se smanjuje u toku vremena, a takođe i intenzitet impulsa, tako da je posle 20-25 minuta od dodavanja uzorka majčinog mleka intenzitet impulsa dvostruko manji u odnosu na početni Ca-indukovani impuls. Frekvencija impulsa je u prvih 10 minuta od dodavanja uzorka smanjena 4 puta. Majčino mleko izaziva relaksaciju kontrakcije kalcijum-iniciranog uterusnog mišića.

Infant formule (uzorci MIL 1, 2, 3, PRE, FL, Bebelac i Aptamil) nemaju ovaj efekat na kontrakciju nevaskularnih glatkih mišića, što se vidi sa slika 23 i 24 (B-H). Uzorci MIL 1, MIL 2, MIL 3 i Aptamil nasuprot majčinom mleku, izazivaju povećanje frekvencije kontrakcije glatkog nevaskularnog uterusnog mišića, u odnosu na početne stabilne (Ca-indukovane) kontrakcije, dok intenzitet kontrakcija ostaje isti.



Slika 23. Efekti majčinog mleka (A) i različitih infant formula na Ca-indukovane kontrakcije uterusa. Prikazani su reprezentativni zapisi svake ispitivane grupe (n=5). (A) MM, (B) MIL 1, (C) MIL 2, (D) MIL 3



Slika 24. Efekti različitih infant formula na Ca-indukovane kontrakcije uterusa. Prikazani su reprezentativni zapisi svake ispitivane grupe (n=5). (E) MIL PRE, (F) MIL FL, (G) Bebelac, (H) Aptamil

Uzorci MIL PRE i MIL FL (slika 24. E i F) pokazuju efekat sličan majčinom mleku u tome što smanjuju frekvenciju impulsa i neznatno intenzitet impulsa u odnosu na početni Ca-indukovani impuls.

Uzorci formula Bebelac i Aptamil nasuprot majčinom mleku, izazivaju povećanje frekvencije kontrakcije glatkog nevaskularnog uterusnog mišića, u odnosu na početne stabilne (Ca-indukovane) kontrakcije, dok se intenzitet kontrakcija malo povećava.

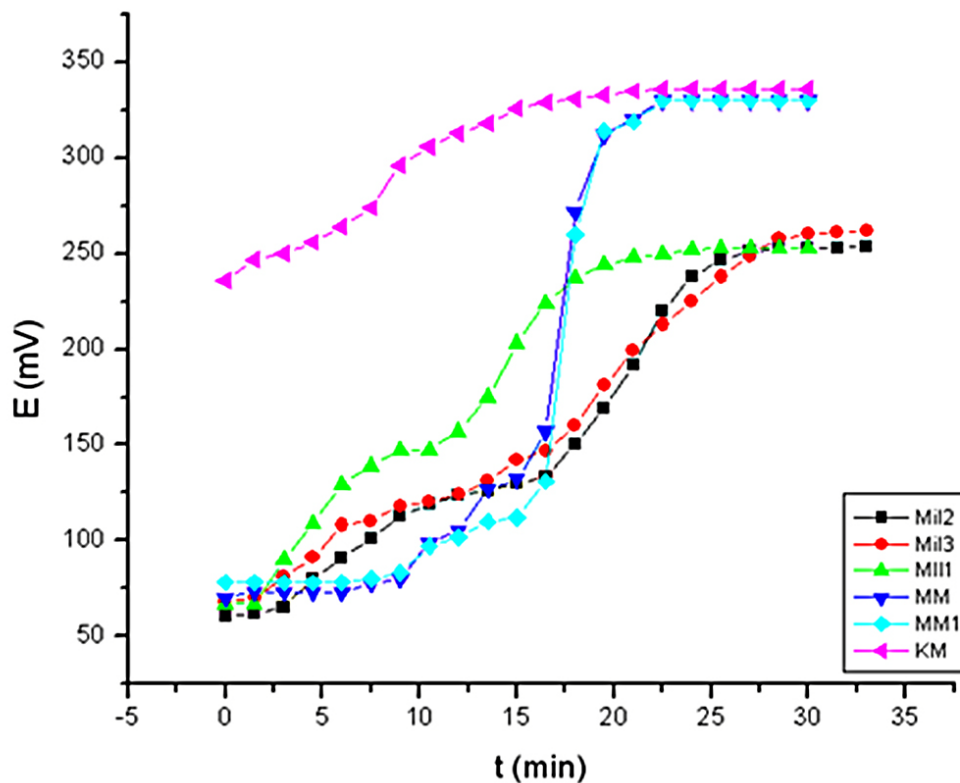
#### 4.4. POTENCIOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA UZORAKA HRANE ZA BEBE

Potenciometrijski metod baziran je na redoks medijatoru koji prenosi naelektrisanje sa elektroaktivnog materijala širokog opsega na čvrstu elektrodu. Ovaj medijator je upotrebljen da bi se rešio fundamentalni problem u potenciometriji, odnosno spora kinetika između supstance koja određuje potencijal i površine elektrode. Redoks par koji je upotrebljen za redoks titraciju je jod/jodid ( $E^{\circ} = 0,536 \text{ V}$  u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu).

Na slici 25 je prikazano određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti majčinog mleka, infant formula i komercijalnog UHT mleka potenciometrijskom titracijom sa 0,1 M  $I_2$ .

Potenciometrijske vrednosti svih uzoraka ukazuju da humano majčino mleko i infant formule imaju visok ukupan antioksidativni kapacitet. Na slici 25 se vidi da sve MIL formule imaju skoro isto ponašanje. Crtanjem izvoda koncentracije oksidanata sa potencijalom kao funkcija potencijala, ukazuje da svi uzorci imaju krivu sa dva pika koji potiču od dve glavne oksidacione komponente koje se sekvencijalno oksiduju jodom.

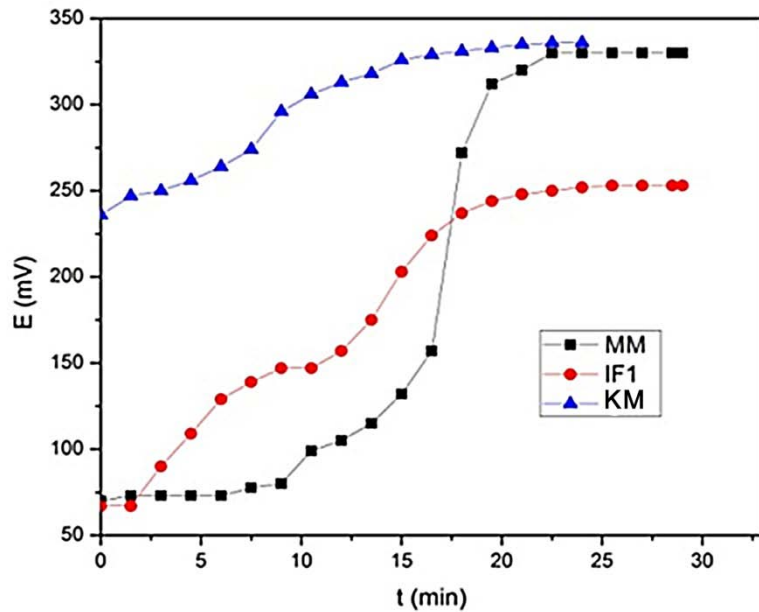
Na slici 25 izdvaja se MIL 1 koji ima kraće vreme potrebno za ispitivanje antioksidativne aktivnosti. Vidi se da je ista količina antioksidativnih supstanci u svim MIL formulama, s tim što su kod MIL 1 lakše dostupne, dok je kod MIL 2 i 3 potrebno duže vreme za titraciju, odnosno antioksidativne supstance su teže dostupne. Pored MIL 1, izuzetak je i MIL PRE, koji takođe pokazuje visoku antioksidativnu aktivnost koja je i očekivana, pošto se ova formula koristi za prevremeno rođenu decu i količine lako dostupnih antioksidativnih supstanci treba da budu veće.



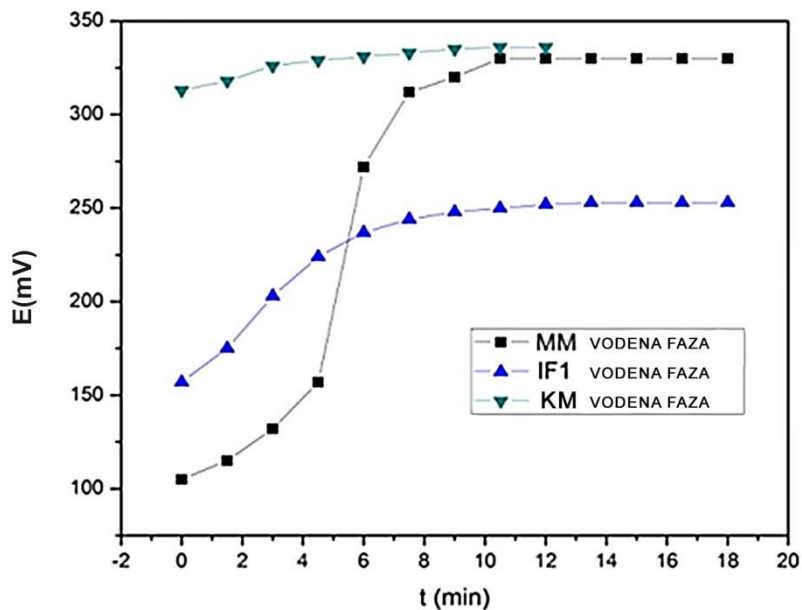
Slika 25. Uporedni prikaz potenciometrijskog određivanja redoks kapaciteta ispitivanih uzoraka mleka sa 0.1 M jodom. Reprezentativni zapisi svake ispitivane grupe su prikazani (n=5).

U svim ispitivanim formulama, jasno se vidi razlika AO potencijala između vodene i masne faze i značajno je veća u vodenoj fazi. Stoga, potenciometrijsko određivanje titracijom može da se upotrebi za određivanje pojedinačne antioksidativne moći i u vodenoj i u masnoj fazi mleka.

Potenciometrijska titracija mleka razlikuje dva jasna i odvojena redoks procesa povezana sa najmanje dve oksidizabilne vrste. Iz razdvojenih faza mleka može da se zaključi da je najmanje jedna vrsta hidrofobna i ima tendenciju da ostane u masnoj fazi, dok je druga visoko hidrofilna i može da se titruje u vodenoj fazi, nakon razdvajanja faza pripremljenog obroka mleka centrifugiranjem (Noyhouzer i sar., 2009).



a)



b)

Slika 26: Potencijal platinske elektrode meren u rastvoru različitih uzoraka mleka u fosfatnom puferu pH 6.7 koji je titrovan sa 1 mM  $I^-/I_2$ . a: Humano majčino mleko - obrok (MM), Infant formula- obrok (IF 1 - MIL 1), Komercijalno UHT mleko - obrok (CM); i b: Humano majčino mleko - vodena faza (MM), B. Infant formula- vodena faza (IF 1 - MIL 1), Komercijalno UHT mleko - vodena faza (CM)

Na slici 26a jasno se vidi da zrelo majčino mleko sadrži najveću količinu antioksidativnih supstanci, a vreme potrebno da se odredi ukupna antioksidativna moć je isto kao kod MIL 1, što se i očekuje obzirom da se ta dva mleka koriste u početnoj ishrani beba istog uzrasta. Titracija vodene faze kod MM završava se u nekoliko kapi, što ukazuje da su antioksidativne supstance lako dostupne, kao što se može videti iz izgleda grafika (26b).

Komercijalno kravlje mleko je osnova svih infant formula, stoga je korišćeno kao referentno mleko. Prema rezultatima dobijenim potencimetrijskom titracijom, kravlje mleko ima najmanju vrednost antioksidativne aktivnosti, kao što se vidi na slici 26, a biološki aktivne materije zaslužne za antioksidativni kapacitet mleka su teško dostupne, za razliku od majčinog mleka i infant formula, pa zbog toga titracija KM traje duže u odnosu na MM.

Vreme potrebno za potencimetrijsku analizu antioksidativne moći, kao i intenzitet skoka na kraju titracije su merilo ukupne antioksidativne moći kao i dostupnosti antioksidativnih supstanci organizmu u obe faze (vodene i masne faze). Rezultati određivanja antioksidativne moći samo vodenih faza mleka prikazani su takođe u tabeli 8. Rezultati dobijeni titracijom samo izolovane vodene faze uzoraka su konzistentni sa rezultatima dobijenim za vodenu fazu titracijom pripremljenog obroka mleka, što potvrđuje da potencimetrija može da se koristi za određivanje antioksidativnog kapaciteta vodene i masne faze mleka.



**Tabela 8: Ukupna antioksidativna aktivnost uzoraka mleka dobijena potencijometrijskom titracijom**

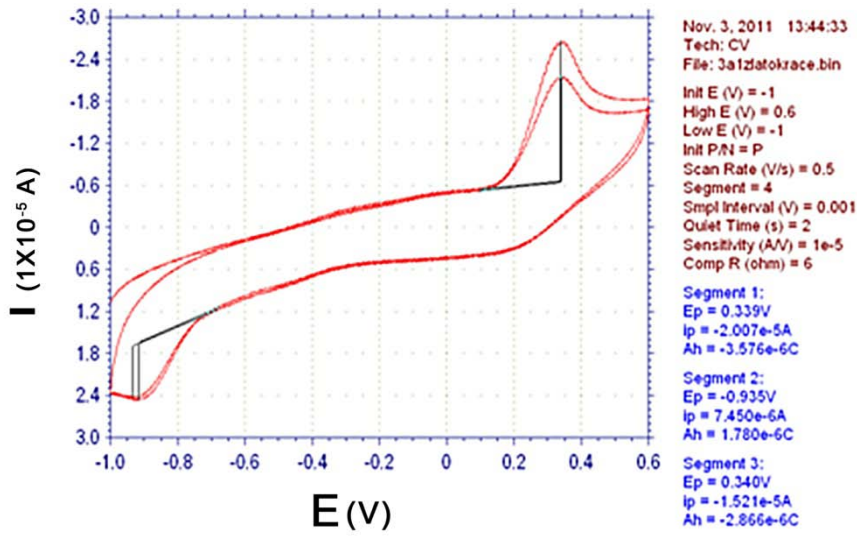
Uzorak	$\Delta E$ (mV) pripr. obrok	AOA pripr. obrok (%)	$\Delta E$ (mV) vodene faze obroka	AOA vodene faze u odnosu na ukupnu AOA uzorka (%)	$\Delta E$ (mV) masne faze obroka	AOA masne faze u odnosu na ukupnu AOA uzorka (%)	$\Delta E$ (mV) vodene faze uzorka	AOA vodene faze uzorka (%)
MM	250	100	200	80	50	20	190	76
KM	100	40	77	31	23	9	74	30
MIL 1	180	72	104	42	76	30	99	40
MIL 2	185	74	130	52	55	22	124	50
MIL 3	155	62	135	54	20	8	128	51
MIL PRE	205	82	160	64	45	18	197	79
MIL FL	195	78	150	60	45	18	105	42

## **4.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA UZORAKA HRANE ZA BEBE CIKLIČNOM VOLTAMETRIJOM**

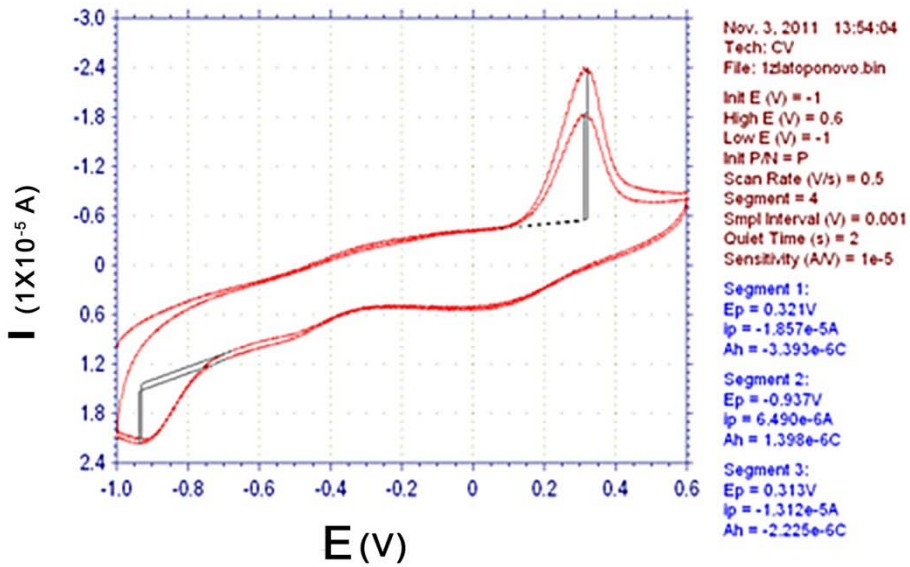
Elektrohemijsko ponašanje mleka i semi-kvantitativno određivanje vitamina C se detektuje cikličnom voltametrijom.

### **4.5.1. OPTIMIZACIJA USLOVA MERENJA METODOM CIKLIČNE VOLTAMETRIJE**

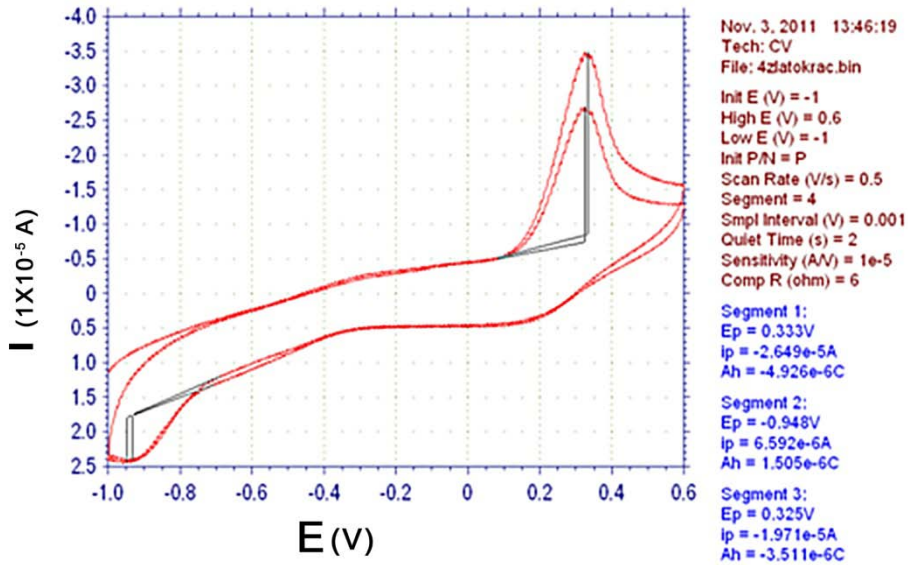
Preliminarna merenja cikličnom voltametrijom su rađena u troelektrodnom sistemu sa Au radnom elektrodom, Pt pomoćnom i Ag/AgCl referentnom elektrodom. Merenja su rađena pri brzini 100 i 500 mV/s. Prikazani su voltamogrami koji su snimljeni pri brzini 100 mV/s, pošto se pri većoj brzini snimanja ne dobijaju reproduktivni rezultati. Rezultati dobijeni ovim sistemom elektroda prikazani su na slici 27. Može se videti da vitamin C, komponente premiksa i maltodekstrin daju pikove na istom potencijalu, srazmerno koncentraciji. Pikovi koji potiču od vitamina C se nalaze na potencijalu između 300 i 400 mV. Upoređivanjem snimaka vitamina C i askorbil-palmitata, vidi se da je askorbil-palmitat stabilniji, i da daje redukcionu talas, za razliku od vitamina C. Maltodekstrin daje manji pik na 250 mV, ali nema redukcionog talasa, pa pojačava signal, što ukazuje da ima dosta -OH grupa. Veliki problem u radu je slabo rastvaranje premiksa vitamina, koji je potrebno dugo rastvarati u demineralizovanoj vodi na magnetnoj mešalici. Urađena je proba dodatka vitamina C (1 mM) u uzorke mleka, ali nisu dobijeni reproduktivni rezultati, pošto se dešava brza reakcija koja gasi signal u cikličnoj voltametrijom, pa stoga nije prikazan voltamogram.



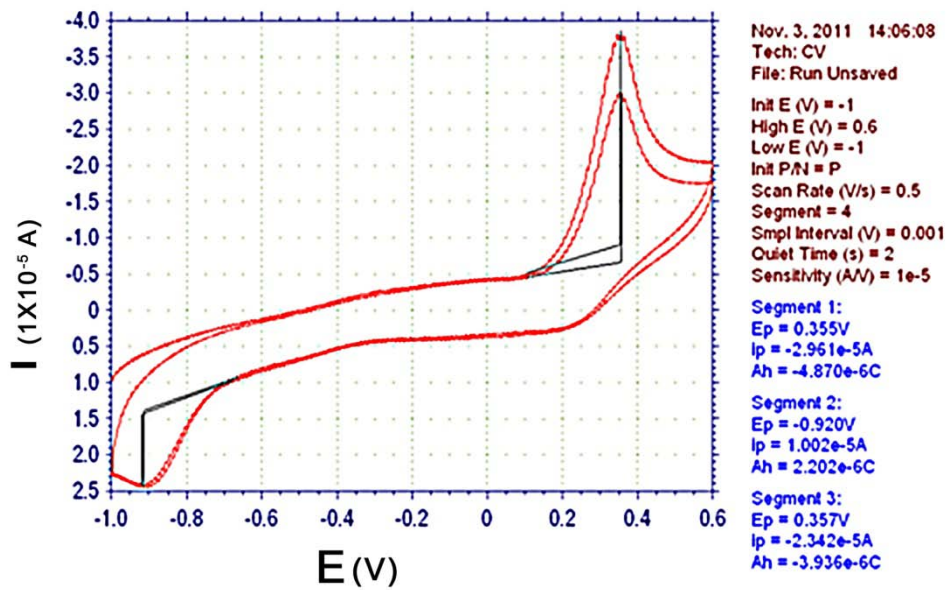
A) Vitamin C (1 mM)



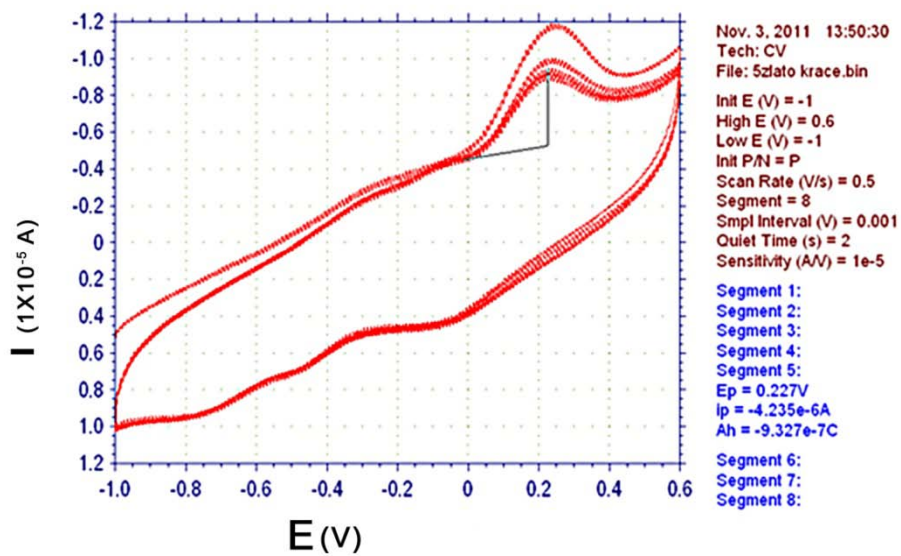
B) Premiks vitamina (koncentracija askorbil palmitata 1 mM)



C) Smeša premiks (1 mM askorbil-palmitat) i vitamin C  
 (1 mM askorbinska kiselina)



D) Vitamin C (1 mM) i maltodekstrin



E) Uzorak maltodekstrina

Slika 27. Optimizacija uslova snimanja cikličnih voltamograma uzoraka mleka i njihovih komponenti snimljeni Au elektrodom u troelektrodnom sistemu sa Pt i Ag/AgCl referentnom elektrodom (premik vitaminsa, vitamin C, maltodekstin).

Problem snimanja cikličnih voltamograma sa zlatnom elektrodom je velika struja elektrolita pa se ne dobija toliko dobar signal kao sa elektrodom od staklastog ugljenika (GC elektroda), što se vidi sa slika (27 i 28). Takođe, postoji problem snimanja CV sa zlatnom elektrodom u složenom matriksu kakav je mleko, pa zbog velike struje osnovnog elektrolita postoji mogućnost da se signali malog inteziteta ne vide dobro ili da ih uopšte nema. U radu sa elektrodom od staklastog ugljenika pikovi su jasniji i bolji tako da je izabrana za dalji rad elektroda od staklastog ugljenika.

#### 4.5.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA UZORAKA HRANE ZA BEBE METODOM CIKLIČNE VOLTAMETRIJE

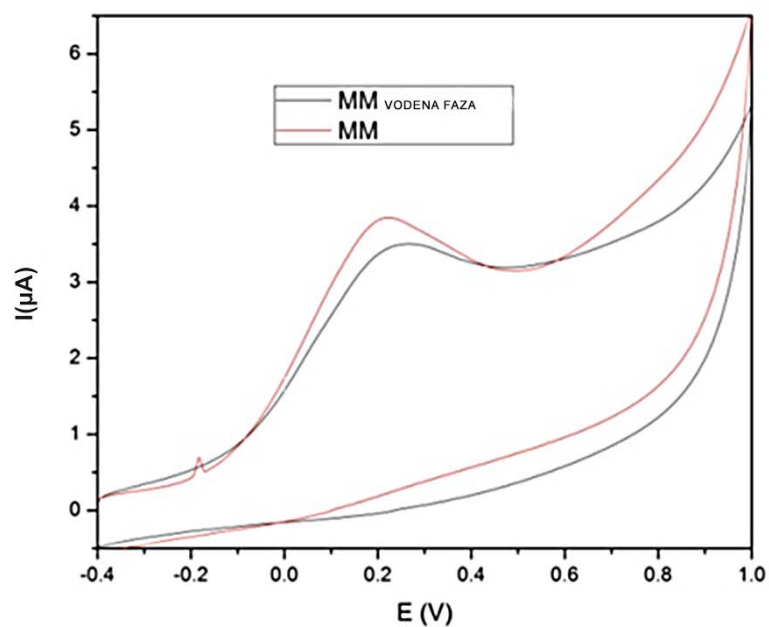
Određivanje antioksidativnog potencijala mleka cikličnom voltametrijom rađeno je u troelektrodnoj ćeliji/kiveti, gde je elektroda od staklastog ugljenika (GC) upotrebljena kao radna elektroda (Model CHI 104), a platinska elektroda velike površine (Model CHI 221) i Ag/AgCl (Model CHI 111) kao pomoćna i referentna elektroda.

U CV metodi, potencijal radne elektrode se linearno skenira u odnosu na referentnu elektrodu, u opsegu -400 do +1 000 mV, počevši od -400 mV. Ciklični voltamogrami su snimani za vodene faze mleka i pripremljen obrok za svaki uzorak. Na slici 28 (A, B, C) su prikazani dobijeni uporedni voltamogrami za vodenu fazu i pripremljen obrok uzoraka majčinog mleka, IF 1 (MIL 1) i KM. Na potencijalu 1000 mV pravac skeniranja se okrenuo prema negativnim vrednostima (donji deo krive).

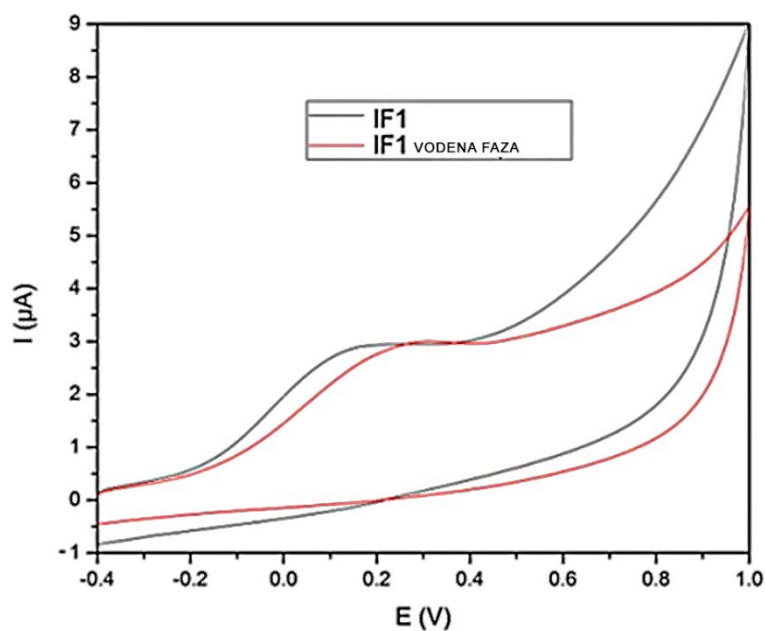
Ciklični voltamogrami su snimljeni za različita mleka na potencijalu oksidacije od -400 do 1000 mV. U svim uzorcima je pronađen samo jedan anodni pik, a nije bilo redukcionog talasa. Anodni pik se nalazi na potencijalu oko +195 i +210 mV, što bi značilo da je to najviši potencijal za stacionarnu elektrodu da oksiduje antioksidante u uzorku. Proizvod oksidacije askorbata odmah reaguje sa vodom i nestaje, pa ovaj proizvod ne postoji kada se smer snimanja obrne, i zbog toga ne postoji redukcionni talas (Hu & Kuwana, 1986).

Tretman izolovanja vodene faze centrifugiranjem upotrebljen je da se identifikuju sastojci koji doprinose anodnom pik. Nakon izolovanja vodene faze uzoraka mleka, uklanjanjem masne faze, pojavljuje se samo jedan značajno manji anodni pik. Površine anodnih pikova pojedinačnih uzoraka mleka, koji određuju veličinu AOA uzorka, date su uporedno u tabeli. Uporedni prikaz

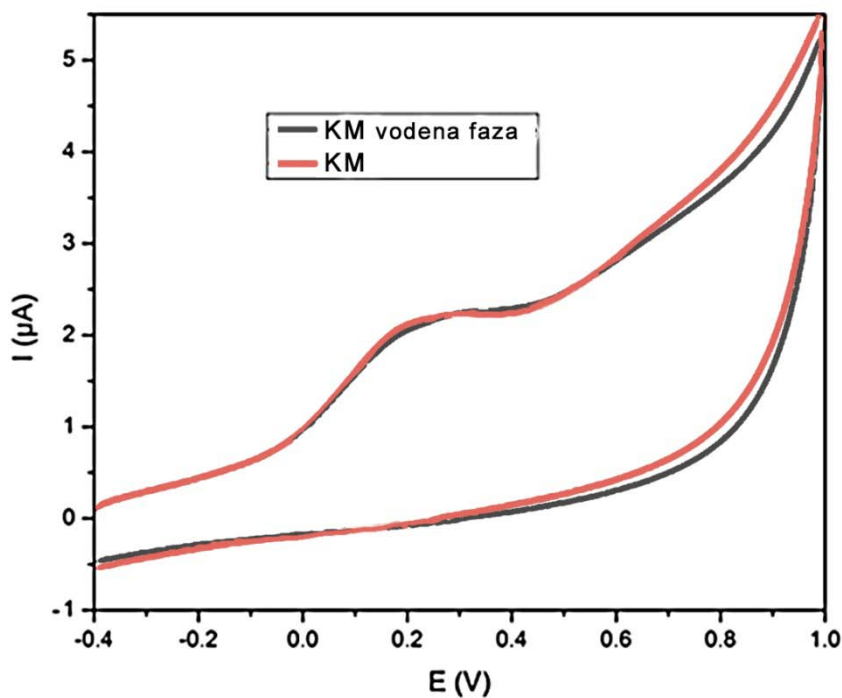
uzoraka formula i premiksa snimljeni cikličnom voltametrijom, u opsegu -1000 do +600 mV, dat je na slici 28.



A)



B)

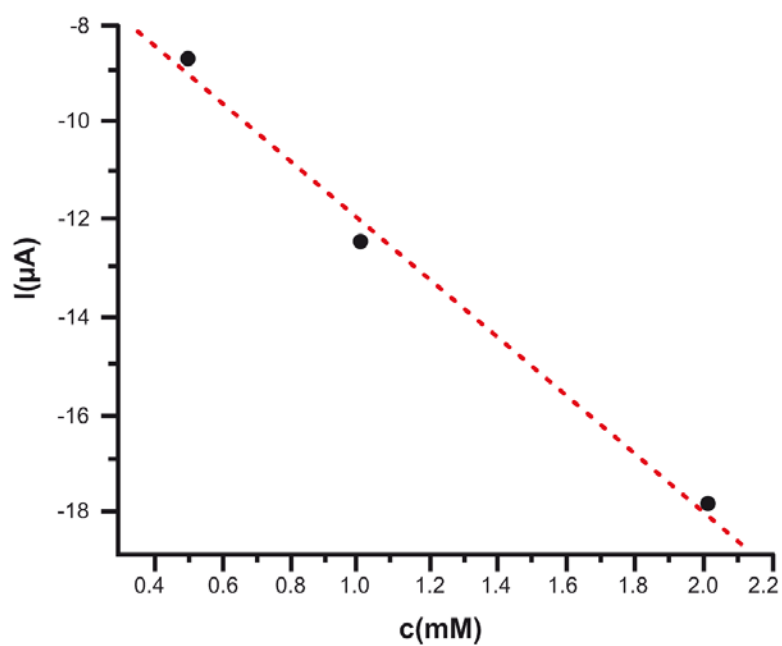
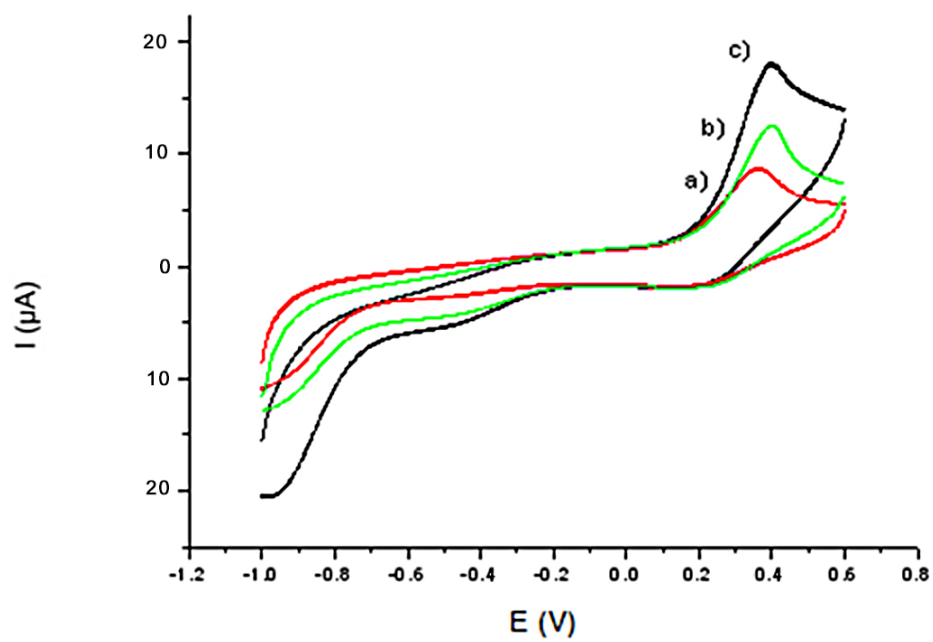


C)

Slika 28. Ciklični voltamogrami snimljeni GC elektrodom u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6,7; brzina skeniranja  $100 \text{ mVs}^{-1}$  u opsegu potencijala -400 do 1 000 mV. A: Majčino mleko - ukupno i vodena faza (MM); B: Infant formula - ukupno i vodena faza (IF 1 - MIL 1); C: Komercijalno kravlje mleko, UHT - ukupno i vodena faza (KM).

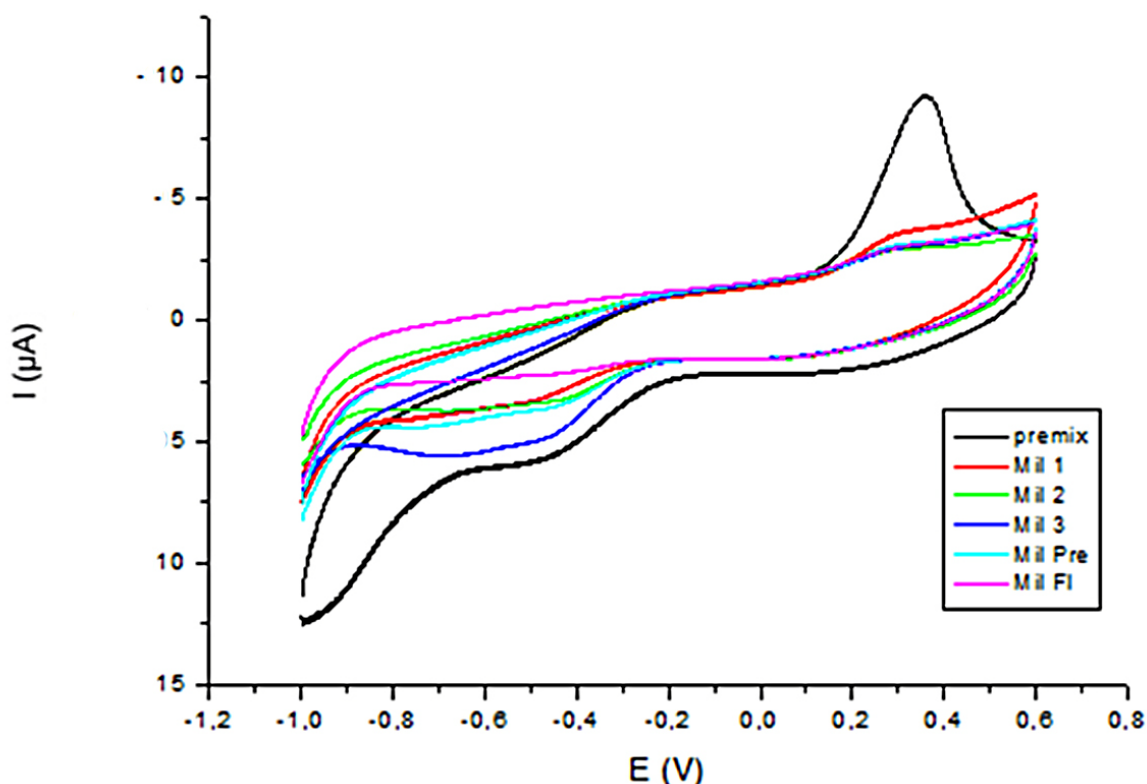
Ciklični voltamogrami su takođe snimani za Premiks vitamina - ekvivalent vitamina C, u koncentracionom opsegu 0,5-1,5 mmol/L (slika 29). Kalibraciona kriva dobijena za ovaj standard korišćena je za izračunavanje AOA ispitivanih uzoraka mleka (slika 29). Proizvod oksidacije askorbata evidentno odmah reaguje sa vodom i nestaje, tako da se ne može detektovati kada se promeni smer skeniranja, pa se stoga ne vidi redukcionni talas (Chen i sar., 2002).





Slika 29. Kalibraciona kriva za vitamin C

Uporednim snimanjem uzoraka mleka, premiksa, vitamina C, maltodekstrina i njihovih kombinacija cikličnom voltametrijom (slika 30), uočava se da imaju jedan talas oksidacije, dok se pri potenciometrijskoj titraciji uzoraka mleka vidi da postoje dva talasa. Upoređivanjem rezultata potenciometrije i CV uočava se da dolazi do slaganja u krajnjim tačkama titracije sa CV.



Slika 30. Uporedni prikaz uzoraka formula i premiksa snimljeni cikličnom voltametrijom, u opsegu -1000 do +600 mV.

Dobijeni rezultati snimanja CV različitih uzoraka mleka i njihovih vodenih faza prikazani su u tabeli 9 (poređenje MM, IF i KM). U tabeli su prikazane površine anodnih pikova pojedinačnih uzoraka mleka i vodene faze uzoraka mleka, koji određuju veličinu AOA uzorka. Najveću površinu ispod krive, i ekvivalent antioksidativni potencijal izražen u procentima ima majčino mleko (100%) a vodena faza majčinog mleka 78%. Najniži antioksidativni potencijal ima kravlje

mleko (38%, odnosno 31% za vodenu fazu). Infant formule Mil 1 i 2 imaju 70 i 72 % za pripremljen obrok, odnosno 40 i 47% za njihove vodene faze, dok Mil3 ima 55% za pripremljen obrok i 52% za vodenu fazu. Mil PRE i Mil FL imaju 80, odnosno 76% za pripremljen obrok, a 63 i 58% respektivno, za njihove vodene faze.

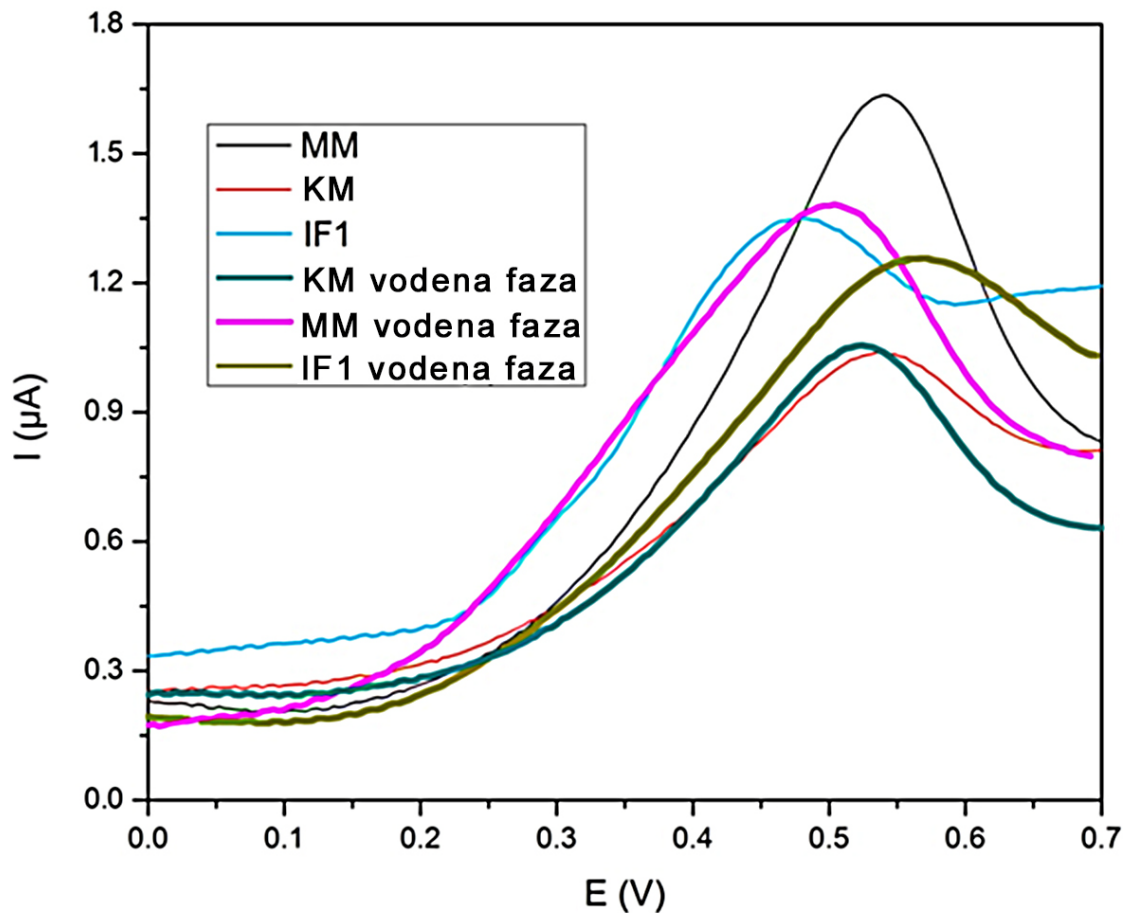
**Tabela 9.** Ukupna antioksidativna aktivnost uzoraka mleka dobijena cikličnom voltametrijom

Uzorak	Površina ispod krive, pripremljen obrok $\times 10^{-7}$ C	AOA za pripremljen obrok (%)	Površina ispod krive, vodena faza $\times 10^{-6}$ C	AOA vodene faze u odnosu na ukupnu AOA uzorka (%)
<b>MM</b>	3.9	100	3.04	78
<b>KM</b>	1.3	38	1.20	31
<b>MIL 1</b>	2.7	70	1.08	40
<b>MIL 2</b>	2.8	72	1.56	47
<b>MIL 3</b>	2.3	55	2.10	52
<b>MIL PRE</b>	3.1	80	2.46	63
<b>MIL FL</b>	2.94	76	2.26	58

#### **4.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA HRANE ZA BEBE DIFERENCIJALNOM PULSNOM VOLTAMETRIJOM**

Diferencijalna pulsna voltometrija je još jedna brza, efikasna i tačna metoda za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti različitih uzoraka mleka i njihovih vodenih faza. Ispitivana je upotreba DPV sa istim sistemom elektroda kao i prilikom određivanja sa cikličnom voltametrijom nakon što su optimizovani uslovi za snimanje uzoraka mleka sa CV. Rezultati koji su dobijeni za različite uzorke mleka i njihove vodene faze su prikazani na slici 31.

Prikazani su uporedni diferencijalni pulsni voltamogrami pripremljen obrok i pojedinačne vodene faze uzoraka majčinog mleka, infant formule Mil 1 i kravljeg mleka. Iz dobijenih kriva za sve uzorke pripremljenog obroka i njihovih vodenih faza, izračunata je površina ispod krive i izražena kao procenat antioksidativnog potencijala uzorka u odnosu na originalan uzorak majčinog mleka, koji je uzet kao 100 % antioksidativnog potencijala.



Slika 31. DP voltamogrami snimljeni GC elektrodom u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6,7; brzina snimanja  $100 \text{ mVs}^{-1}$ , pulsna amplitude 100 mV, u opsegu potencijala -400 do 1 000 mV. A: Majčino mleko - ukupno i vodena faza (MM); B: Infant formula - ukupno i vodena faza (IF 1 - MIL 1); C: Komerčijalno kravlje mleko, UHT - ukupno i vodena faza (KM).

U tabeli 10. date su vrednosti koje su dobijene merenjem AO potencijala diferencijalnom pulsnom voltametrijom za pripremljen obrok mleka i njihove izolovane vodene faze.

Prema dobijenim rezultatima vodena faza majčinog mleka pokazuje 80 % ukupnog antioksidativnog potencijala u odnosu na ukupan originalni uzorak majčinog mleka. Pripremljeni obroci infant formula imaju niži antioksidativni potencijal u odnosu na majčino mleko, pri čemu najviši (80%) pokazuje uzorak Mil PRE, zatim MIL FL (77%), a najniži uzorka Mil 3 (58%), dok Mil 1 i 2 imaju 66 i 71 % respektivno. Vodene faze uzoraka infant formula pokazuju antioksidativni potencijal niži u odnosu na originalni uzorak. Najviši je kod uzorka Mil PRE (62%), dok je Mil 1 (41%) a Mil 2 i 3 su 52%, što je u skladu sa različitim formulacijama. Kravlje mleko ima najmanji izmeren antioksidativni potencijal i kao pripremljen obrok i kao vodena faza (43% i 31%, respektivno) u odnosu na uzorak majčinog mleka (100%).

Iz vrednosti dobijenih u tabeli 10, može da se zaključi da su rezultati dobijeni ovom metodom u dobrom slaganju sa rezultatima dobijenim potenciometrijskim i CV određivanjima i za pripremljen obrok mleka i za njihove vodene faze.

**Tabela 10.** Ukupan antioksidativni potencijal uzoraka mleka dobijen diferencijalnom pulsnom voltametrijom (DPV)

Uzorak	Površina ispod krive, pripremljen obrok $\times 10^{-6}$ C	AOA za pripremljen obrok (%)	Površina ispod krive, vodena faza $\times 10^{-6}$ C	AOA vodene faze u odnosu na ukupnu AOA uzorka (%)
<b>MM</b>	1.53	100	1.24	81
<b>KM</b>	0.74	43	0.47	31
<b>MIL 1</b>	1.00	66	0.63	41
<b>MIL 2</b>	1.08	71	0.79	52
<b>MIL 3</b>	0.88	58	0.80	52
<b>MIL PRE</b>	1.23	80	0.95	62
<b>MIL FL</b>	1.18	77	0.87	57

U tabeli 11. prikazane su vrednosti antioksidativnog potencijala obroka mleka dobijene upoređivanjem tri elektrohemijske metode.

**Tabela 11.** Poređenje elektrohemijskih metoda za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala u pripremljenom obroku hrane za bebe, u procentima.

Elektrohemijski metod	CV	DPV	Potencimetrija
<b>MM</b>	100	100	100
<b>KM</b>	38	43	40
<b>MIL1</b>	70	66	72
<b>MIL2</b>	72	71	74
<b>MIL3</b>	55	58	62
<b>MILPRE</b>	80	80	82
<b>MIL FL</b>	76	77	78

Može se zaključiti da primenjene elektrohemijske metode (potencimetrija, CV i DPV) mogu da se koriste za kvantitativno određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala uzoraka mleka.

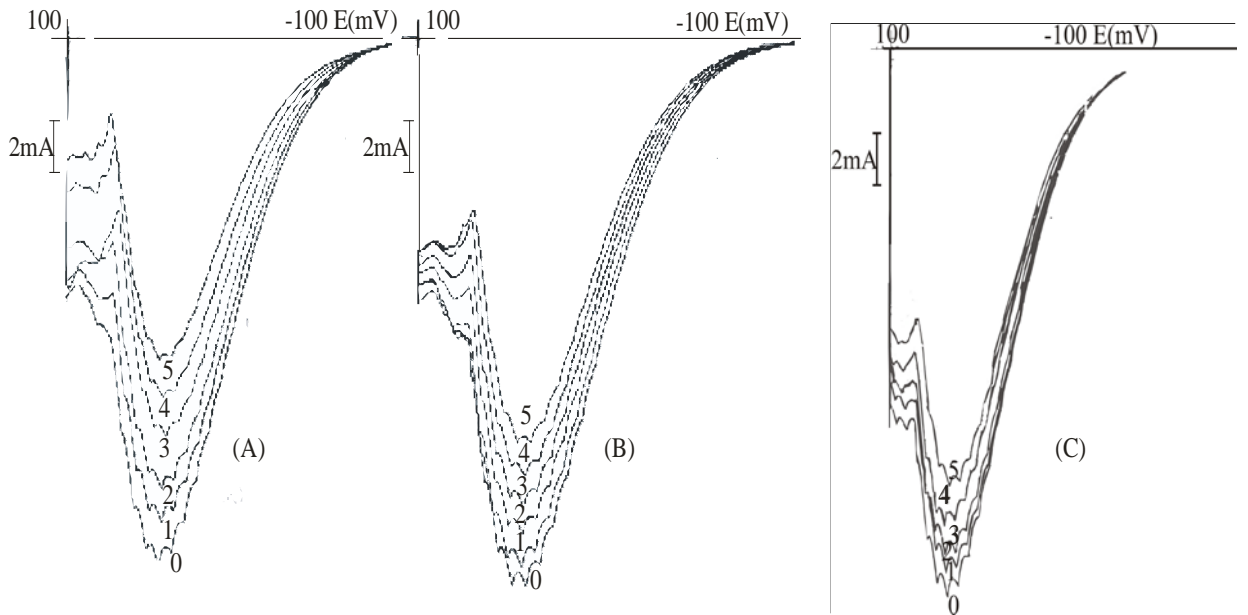


#### 4.7. POLAROGRAFSKO ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA UZORAKA HRANE ZA BEBE

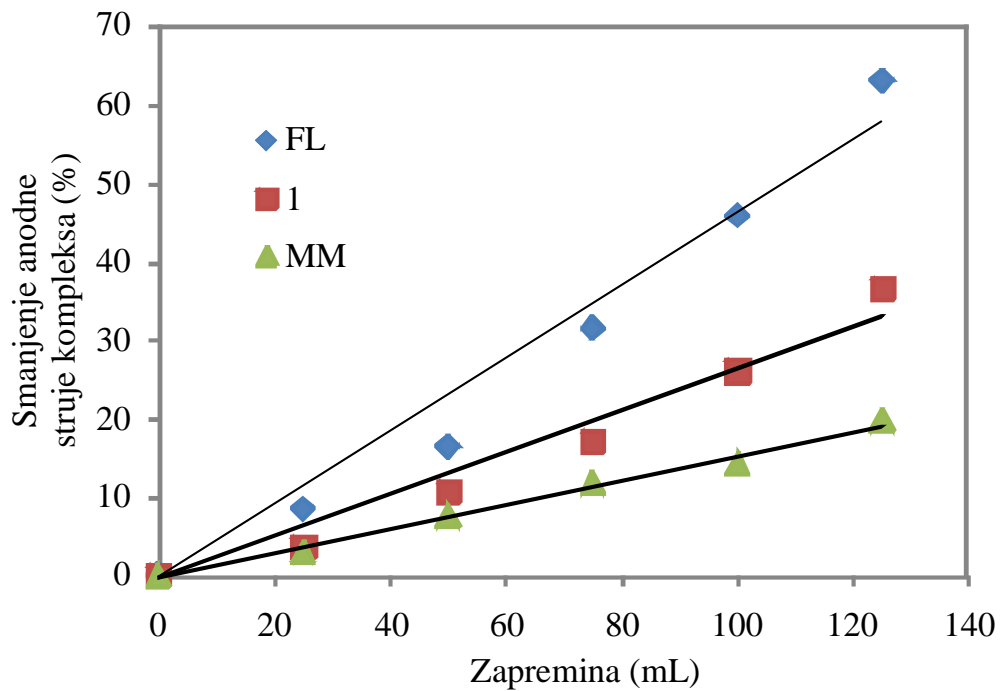
Metoda polarografskog određivanja antioksidativnog kapaciteta do sada je primenjivana na različite uzorke vina, piva, hmelja, i dr. Merenje antioksidativne aktivnosti polarografskom metodom po prvi put je primenjeno na uzorke mleka, pripremljene kao obrok, bez prethodnog tretmana.

Polarogrami dobijeni snimanjem 5 mM rastvora peroksida u CL puferu pH 9,8 pre i posle uzastopnog dodavanja uzoraka mleka su prikazani na slici 32. Iz prikazanih polarograma se vidi da visina početne granične struje 5,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peroksida  $i_l$  ( $i_{l0}$ ) opada sa svakim dodatkom uzorka. Smanjenje osnovnog pika peroksida je najveće po dodatku MIL FL i MIL PRE, uzoraka sa najvećim sadržajem proteina (19,36 i 23,77 mg/ml), a najmanje po dodatku majčinog mleka koje sadrži najmanje proteina (12 mg/ml).

Zavisnost procenta smanjenja anodne granične struje od zapremine dodatog uzorka mleka data je grafičkim prikazom (Slika 33).



Slika 32. Polarogrami osnovne struje vodonik peroksida ( $i_{H_2O_2}$ ), pre (0) i po dodatku 5 alikvota od po 25  $\mu$ L (1,2,3,4,5) MIL FL (A), MIL 1 (B) MM (C).



Slika 33. Smanjenje anodne struje (%) vodonik peroksida u zavisnosti od dodate zapremine uzoraka: MIL FL, MIL 1, MM.

Uzorci su mereni odmah nakon pripreme infant formula. Aktivnost svih analiziranih uzoraka je izražena kao nagib početnog, linearnog dela grafika zavisnosti procenta smanjenja anodne struje od zapremine dodatog uzorka. Rezultati su dati u tabeli 12. u kojoj je pored nagiba (B), dat i odsečak na ordinati (A) i koeficijent linearnosti (R), zajedno sa rezultatima DPPH i Folin-Ciocalteu testa i sadržajem proteina.

Deskriptivna statistička analiza urađena je posebno za svaku od primenjenih metoda, da bi se pokazale neke osnovne informacije, kao što su srednje vrednosti, standardne devijacije i ekstremne vrednosti rezultata merenja (Tabela 12).

Iz tabele 12. se vidi da se antioksidativni potencijal uzoraka mleka razlikuje u zavisnosti od primenjene metode. Antioksidativni potencijal infant formula meren polarografski varira od 0,42 do 0,58 %/ $\mu$ L, dok je vrednost AO potencijala majčinog mleka najniža, tj. 0,23 %/ $\mu$ L.

Od spektrofotometrijskih metoda DPPH i Folin Chiocalte-ova su najčešće primenjivane za određivanje ukupnog AO potencijala različitih uzoraka. Da bi se dobio što sveobuhvatniji uvid u AOA ispitivanih uzoraka u ovom doktoratu su ove dve najčešće korišćene spektrofotometrijske metode primenjene paralelno sa elektrohemijским metodama.

Prema dobijenim rezultatima određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala DPPH metodom vidi se da svi ispitivani uzorci mleka imaju visoke vrednosti inhibicije, odnosno sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH• radikala 80-90%. Najveću aktivnost, odnosno najveći antioksidativni potencijal, ima uzorak majčinog mleka (90,05%), dok najmanju aktivnost ima uzorak MIL FL.

Metodom po Folin-Ciocalteu je ispitivana koncentracija i aktivnost ukupnih fenola u uzorcima mleka. Najveće vrednosti za FCGAE pokazuje FL formula bez laktoze (188,40), za ishranu odojčadi i male dece sa intolerancijom laktoze i dijarejom, proizvedena od pasterizovanog, standardizovanog mleka, hidrolizom laktoze, koja sadrži lako svarljivi maltodekstrin umesto laktoze, dok najmanje vrednosti ima MIL 3 (90,12). Majčino mleko ima nizak nivo fenolnih komponenti (114, 19).

Tabela 12. Antioksidativni potencijal uzoraka mleka određen DPPH, Folin-Ciocalteu-ovom i polarografskom metodom (HPMC) i sadržaj proteina

Uzorak	DPPH (% inhibicije)	FCGAE (mg/l GAE)	HPMC (% $\mu$ l)	PROTEINI (mg/ml)
MIL 1	87.48 $\pm$ 8.89 <sup>a</sup>	129.65 $\pm$ 12.73 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	14.98 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>
MIL 2	84.89 $\pm$ 5.55 <sup>a</sup>	122.87 $\pm$ 8.35 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	18.10 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
MIL 3	80.17 $\pm$ 7.39 <sup>a</sup>	90.12 $\pm$ 16.89 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	19.96 $\pm$ 0.51 <sup>d</sup>
MIL PRE	85.73 $\pm$ 11.84 <sup>a</sup>	131.67 $\pm$ 21.54 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	23.77 $\pm$ 0.41 <sup>e</sup>
MIL FL	80.00 $\pm$ 13.10 <sup>a</sup>	188.40 $\pm$ 11.79 <sup>c</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	17.87 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
MM	90.05 $\pm$ 5.68 <sup>a</sup>	114.19 $\pm$ 12.62 <sup>ab</sup>	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	11.65 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Različita slova u superskriptu, kod podataka prikazanih u istoj koloni, su oznaka da se sredine statistički značajno razlikuju, na nivou  $p < 0,05$ , prema HSD Tukey-evom testu.

Rezultati polarografskih merenja su korelirani sa rezultatima DPPH i FC metode i sadržajem proteina. Za razliku od napred pomenutih rezultata dobijenih merenjem ekstrakta hmelja ovom metodom, korelacija sa DPPH testom u slučaju mleka postoji, ali je koeficijent korelacije negativan (-0.81). Kao i u slučaju hmelja rezultati ne koreliraju sa sadržajem fenola. Zanimljivo je da ni DPPH test, specifičan upravo za fenolna jedinjenja, ne korelira sa sadržajem fenola. Antioksidativni potencijal određen polarografskom metodom korelira sa sadržajem proteina što objašnjava redosled aktivnosti infant formula i majčinog mleka.

Rezultati dobijeni polarografskom metodom poređeni su sa rezultatima dobijenim standardnim spektrofotometrijskim metodama DPPH i FC-GAE, odnosno sa sadržajem ukupnih fenola i proteina. Koeficijenti dobijenih korelacija prikazani su u tabeli 13. Korelacija između polarografske HPMC i DPPH metode je visoka ali je za razliku od svih dosadašnjih merenja AO aktivnosti kompleksnih uzoraka koeficijent korelacije negativan (-0.81), dok korelacija sa sadržajem fenola ne postoji. Zanimljivo je da i DPPH test, specifičan upravo za fenolna jedinjenja, ne korelira sa sadržajem fenola. Antioksidativni potencijal određen polarografskom metodom korelira sa sadržajem proteina, tj. redosled AO aktivnosti ispitivanih uzoraka je u saglasnosti sa istim.

Tabela 13. Korelacije između ukupnog sadržaja fenola i proteina i antioksidativnog potencijala određene polarografski (HPMC) i DPPH metodom.

	<b>FCGAE</b>	<b>HPMC</b>	<b>PROTEINI</b>
<b>DPPH</b>	-0.28	-0.81**	-0.54
	p=0.598	p=0.051	p=0.271
<b>FCGAE</b>		0.39	0.03
		p=0.439	p=0.948
<b>HPMC</b>			0.80**
			p=0.057

\*Statistički značajna na nivou  $p < 0,05$ , \*\* Značajna na nivou  $p < 0,10$

#### 4.8. STATISTIČKA ANALIZA VARIJANSE RAZLIČITIH ELEKTROHEMIJSKIH METODA

Rezultati elektrohemijjskih merenja izraženi su kao srednja vrednost. Poređenje između grupa urađeno je korišćenjem NCSS- 2001 (NCSS, Kaysville, UT) statističkog softvera.

Kao potvrda eksperimentalnih rezultata za statističku analizu korišćen je Kruskal-Wallis one-way ANOVA test koji otkriva da li postoji značajna razlika između elektrohemijjskih metoda za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala različitih uzoraka. Rezultati dobijeni Fisher LSD testom pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između metoda. Kruskal-Wallis-ovim testom višestrukog poređenja Z-vrednosti, koji pokazuje da Z vrednost za interval poverenja ne prelazi kritičnu vrednost (z-vrednost 1,9600), još jednom su potvrđeni eksperimentalni rezultati i pokazano da se potenciometrija, CV i DPV mogu koristiti podjednako da se odredi ukupan antioksidativni potencijal različitih uzoraka mleka (Tabela 14).

**Tabela 14.** Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test

Variable	Pot	CV	DPV
Potenciometrija	0.0000	0.0271	0.4611
CV	0.0271	0.0000	0.4339
DPV	0.4611	0.4339	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 2.3940

Kada se porede ove tri elektrohemijske metode za određivanju ukupnog antioksidativnog potencijala infant formula, majčinog mleka i kravljeg UHT mleka, iz navedenih rezultata može se zaključiti da se sve tri metode mogu koristiti za određivanje ukupne antioksidativne moći pošto se rezultati dobijeni pojedinačno svakom tehnikom dobro slažu i prate isti trend (tabela 14). Mehanizmi određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala CV i DPV metodom se razlikuju od potencijometrije, pošto kod CV i DPV reaktivne vrste su elektroni sa elektrode, dok su kod potencijometrije reaktivne vrste donori elektrona a rastvor joda kao oksidant je akceptor, što je pokazatelj koji antioksidativni potencijal se meri.

Vrednosti antioksidativnog potencijala kod CV i DPV se dobro slažu, dok se rezultati koji se dobijaju potencijometrijom neznatno razlikuju sa malo većim vrednostima, što se može objasniti dužinom merenja, pošto je prilikom potencijometrijskih analiza vreme između dodavanja dva alikvota jod 90 s, što predstavlja dovoljno vremena da se sav jod upotrebi – oksiduje sa antioksidantima iz mleka i da se dobije realnija slika ukupnog sadržaja antioksidativnih supstanci. Mana potencijometrijske tehnike je u tome što je vreme potrebno za analizu duže, oko pola sata, dok je vreme potrebno da bi se došlo do rezultata ukupnog antioksidativnog potencijala cikličnom voltametrijom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom mnogo kraće i traje svega par sekundi, a rezultati koji se dobijaju odlično se slažu sa potencijometrijom.

Takođe, urađena je korelacija spektrofotometrijskih metoda i polarografske (HPMC) metode, sa drugim elektrohemijskim metodama (potencijometrija, CV, DPV). Korelacije između polarografske i ostalih elektrohemijskih metoda su visoke ali su koeficijenti korelacije negativni (Tabela 15).



Tabela 15. Korelacije spektrofotometrijskih metoda DPPH i FCGAE i polarografske (HPMC) metode sa drugim elektrohemijskim metodama za određivanje AO potencijala.

	CV	DPV	Potencimetrija
<b>DPPH</b>	0.92*	0.88*	0.89*
	p=0.010	p=0.022	p=0.018
<b>FCGAE</b>	-0.51	-0.49	-0.59
	p=0.306	p=0.320	p=0.222
<b>HPMC</b>	-0.82*	-0.83*	-0.81**
	p=0.045	p=0.041	p=0.053
<b>PROTEINI</b>	-0.36	-0.35	-0.33
	p=0.481	p=0.496	p=0.528

\*Statistički značajna promena na nivou  $p < 0,05$ , \*\* Značajna promena na nivou  $p < 0,10$

## **V DISKUSIJA**

Mleko je primarna hrana u ishrani odojčadi. Ono je izuzetan izvor energije, proteina, minerala i vitamina. Ipak, sa hemijske tačke gledišta, mleko je složena tečnost, koja sadrži brojne supstance, od metalnih jona do enzima. Mleko ima široku biološku aktivnost, koja opstaje i nakon pasterizacije.

Ne postoji jednostavan način za određivanje svežine mleka. Svežina i kvalitet mleka odražavaju njegovo redoks stanje.

Mleko predstavlja smešu nekoliko antioksidativnih komponenti kao što su vitamini, proteini i mikroelementi, a pojedinačne komponentne mleka kao što su surutka, kazeini, laktoferin i albumin, takođe imaju antioksidativne osobine. Vitamini C i E deluju kao antioksidanti, hvatanjem slobodnih radikala. U toku ovog procesa, vitamini se oksiduju. Aktivne redukovane forme vitamina se regenerišu redukcijom sa glutationom (GSH) i/ili reduktantima kao što su askorbat, NADH/NADPH, dihidrolipoat (antioksidant koji kao GSH sadrži tiol), ubihinon i citohrom. Askorbinska kiselina se regeneriše iz svoje oksidovane forme pomoću enzima reduktaze, koja takođe koristi GSH i verovatno NADPH (redukcione ekvivalente) (Jacob, 1995).

Enzim SOD, koji ima sposobnost da ukloni  $O_2^{\bullet-}$  i tako doprinese održavanju balansa između oksidanata i antioksidanata, jedna je od najvažnijih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja i predstavlja pouzdan biomarker oksidacionog stresa (Gutteridge & Halliwell, 2010).

Rezultati dobijeni u ovoj tezi pokazuju da majčino mleko izaziva relaksaciju nevaskularnih glatkih mišića, dok takav efekat nije uočen kod infant formula. Ovo može da bude usled visokog nivoa SOD, za koji je poznato da izaziva

efekat opuštanja mišića (Spasić i sar., 1991), pored antiinflamatornih i drugih osobina. Ehlers i saradnici (2011) su našli da mleko pokazuje antihipertenzivnu aktivnost. Za tripeptide, izoleucin-prolin-prolin (Ile-Pro-Pro) i valin-prolin-prolin (Val-Pro-Pro), koji su prisutni u majčinom mleku, pokazano je da imaju antihipertenzivne efekte na ljude i umanjuju razvoj hipertenzije kod eksperimentalnih modela. Treba naglasiti da ovi tripeptidi i SOD mogu da očuvaju svoju strukturu i funkciju u humanom gastrointestinalnom traktu. Zbog toga, oni su sposobni da poboljšaju varenje odojčadi i beba pomoću njihovog efekta na glatke mišiće u zidovima intestine.

Tokom eksperimenta, konstatovana je značajna aktivnost GSH-Px. Poznato je da GSH-Px ima veći afinitet za  $H_2O_2$  u odnosu na CAT, tako da igra važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskoj koncentraciji  $H_2O_2$ , dok je CAT najznačajniji enzim u uslovima izrazitog oksidacionog stresa. Unutarćelijska koncentracija  $H_2O_2$  predstavlja važan faktor koji utiče na nivo enzimske funkcionalnosti CAT i GSH-Px (Kruidenier & Verspaget, 2002).

Majčino mleko obezbeđuje bolju antioksidativnu zaštitu nego infant formule (Friel i sar., 2002), sadrži snažniji antioksidativni sistem, ima viši nivo aktivnosti SOD i viši sadržaj redukcionih sredstava (slobodni tioli).

Sulfhidril-grupe (-SH) u glutationu se regenerišu glutation-reciklirajućim sistemom i imaju najveći doprinos sistemu antioksidativne odbrane ćelije. U plazmi, sulfhidril-grupe se nalaze u proteinima plazme i njihov doprinos antioksidativnoj aktivnosti plazme je mali. Sulfhidril-grupe su nakon rođenja u niskoj koncentraciji kod odojčadi, u poređenju sa odraslim čovekom, što je povezano sa nižom koncentracijom plazma proteina. Koncentracija ukupnih slobodnih -SH grupa, markera oksidativnog stresa, opada postnatalno iako je stabilna koncentracija plazma proteina, što ukazuje na postojanje oksidativnog stresa (Van Zoeren-Grobbe i sar, 1994).

Majčino mleko i infant formule hvataju hidrosil-radikal pri čemu nastaju ugljenik-centrirani i askorbil-radikal. Nastajanje ovih vrsta je manje, pri istoj produkciji OH radikala kod infant formula u poređenju sa majčinim mlekom. Ove formule imaju više antioksidanata male molekulske mase u poređenju sa majčinim mlekom (Anderson, 1985; Lane, 2003). Važno je napomenuti da ugljenik-centrirani radikali mogu da učestvuju u reakcijama demetilacije sa produkcijom još jednog ugljenik-centriranog radikala (Buettner, 1993). Visok antioksidativni potencijal majčinog mleka može se pripisati direktnom hvatanju i jmskupljanju, radikala pomoću tiol-grupa (Hioe i sar., 2010). Ovo ukazuje da majčino mleko poseduje mnogo snažniji antioksidativni potencijal u poređenju sa ispitivanim infant formulama. Ovo je od naročite važnosti za imuni sistem koji je nezreo kod odojčadi, što ih čini osetljivijim na različite stresore iz okruženja i na unutrašnje sistemske poremećaje koji su povezani sa povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Pored uklanjanja hidrosil-radikala, na Fentonovu reakciju može uticati i uklanjanje redoks aktivnog gvožđa (neadekvatno helirano) (Zhao i sar., 2001). Mehanizmi uključeni u uklanjanje gvožđa su veoma važni kod novorođenčadi koji imaju nizak nivo transferina i ceruloplazmina i povećane nivoe slobodnog gvožđa u plazmi (Evans i sar., 1992; Hirano i sar., 2001), eritrocitima (Buonocore i sar., 1998), i alveolarnoj tečnosti (Gerber i sar., 1999). Kao što je već prethodno pomenuto, redoks stanje krvi odraslog čoveka i novorođenčeta se značajno razlikuju (Andrades i sar., 2011). Uzimajući u obzir da je nivo askorbata u plazmi stogo kontrolisan intestinalnom apsorpcijom i renalnom sekrecijom, oralna primena megadoza askorbata je najverovatnije beskorisna i nepotrebna (Levine i sar., 1996). Nivoi ostalih antioksidanata, kao što je  $\alpha$ -tokoferol (koji se ekskretuje u žuči), su takođe strogo regulisani (Herrera & Barbas, 2001). Međutim, status gvožđa, koji može da utiče na oksidativni stres preko Fentonove reakcije (i regulisan je transferinom i feritinom kod odraslih ljudi), može biti podložan patološkim promenama kod odojčadi.

Proteini mleka mogu se podeliti u dve kategorije: kazeini i proteini surutke. Odnos kazeini : proteini surutke u humanom mleku iznosi 40 : 60, a u kravljem mleku 80 : 20. Kravlje mleko ima koncentraciju ukupnih proteina veću za više od 2 puta od humanog mleka, odnosno sadrži mnogo veću količinu kazeina od humanog mleka. Kazeini su teško svarljivi proteini. Infant formule su prilagođene potrebama odojčadi, pa sadrže više proteina surutke (odnos surutke i kazeina u ovim formulama je sličan majčinom mleku), stoga im je bolja svarljivost i usvojivost kod odojčadi i male dece (Chessman, 2009).

Primena ugljenih hidrata može biti važna za redoks fiziologiju, uzimajući u obzir da su neki šećeri (na primer fruktoza) poznati po svom visokom antioksidativnom kapacitetu (Spasojevic i sar., 2009; Pristov i sar., 2011).

U kompleksnom sistemu kao što je mleko, nekoliko oksido-redukcionih sistema je istovremeno aktivno, a njihov efekat na antioksidativni potencijal (redoks-potencijal) zavisi od nekoliko faktora, kao što su reverzibilnost sistema, vrednosti  $E^\circ$ , odnos oksidanata i reduktanata, i koncentracija aktivnih komponenti sistema (Sherbon, 1999). Prema rezultatima elektrohemijskih studija antioksidativnog potencijala mleka, mleko nije kompaktan sistem, i opseg njegovog redoks-potencijala je veliki (Beresford i sar., 2001; Crow i sar., 1995) usled različitih proteinskih komponenti i malih molekula prisutnih u mleku.

Glavna prednost elektrohemijskih metoda koje su korišćene za određivanje antioksidativnog potencijala uzoraka mleka je ta da može direktno da se prati sposobnost doniranja elektrona od strane redukcionih komponenti mleka. Osim toga, pomoću njih se razlikuju različite reduktivne komponente u zavisnosti od potencijala njihovog pika. Majčino mleko pokazuje bolju antioksidativnu zaštitu od infant formula. Ono sadrži snažniji antioksidativni sistem, (Friel i sar., 2002).

Pretpostavlja se da najveći doprinos ukupnom antioksidativnom potencijalu uzoraka mleka dolazi od vitamina C, a zatim od malo prisutnih vitamina A i E, kao i od jona gvožđa dok su enzimi SOD i GSH-Px naročito aktivni u majčinom mleku (Lugonja i sar., 2013). Dva najvažnija oksidaciona talasa prisutna na voltamogramima CV i DPV rezultat su redoks-aktivnih redukujućih vrsta koje mogu biti prisutne u vodenoj ili lipidnoj fazi uzoraka mleka. Pomenute metode određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala su brze, ali nisu pouzdane za određivanje individualnih redoks-aktivnih redukujućih vrsta u originalnom uzorku mleka, bez prethodnog enzimskog tretmana i zbog toga nisu ispitivane AOA pojedinačnih komponenti.

CV je brža metoda za određivanje AOA u poređenju sa potenciometrijom, a dobijeni rezultati su u saglasnosti sa dobijenim potenciometrijskim analizama. Glavna prednost potenciometrije je u mogućnost određivanja AOA obe faze bez odvajanja, dok se CV detektuje samo ukupan antioksidativni potencijal ili samo AOA vodene faze mleka.

Osnovna razlika između CV i DPV je u načinu zadavanja pulsa. Metoda ciklične voltametrije puls menja linearno sa vremenom, a kod DPV pulsevi se zadaju sa postepenim povećanjem. Postoje takođe razlike u osetljivosti metoda zbog načina zadavanja pulsa, pa je DPV dosta osetljivija metoda u odnosu na CV. Kod CV možemo jednim snimkom da vidimo i oksidacionu i redukcionu krivu za uzorak, pošto se snima ceo ciklus u oba smera, dok se kod DPV snima samo u jednom odabranom smeru, oksidacija ili redukcija. DPV daje pojedinačne snimke oksidacije ili redukcije koji su osetljiviji u odnosu na CV. U slučaju snimanja uzoraka mleka metodama CV i DPV, ne uočavaju se razlike u osetljivosti ovih metoda, zbog visokog sadržaja antioksidativnih supstanci koje mogu da se kvantitativno odrede sa obe navedene metode, iako se DPV uobičajeno koristi kao kvantitativna metoda, a CV semikvantitativna metoda.

Poređenjem rezultata određivanja antioksidativnog potencijala vodene faze obroka mleka i rezultata dobijenih određivanjem u izolovanoj vodenoj fazi može da se zaključi da potenciometrijska metoda može da se koristi za određivanje antioksidativnog potencijala obe faze jednom titracijom, tako da iako je sporija metoda u odnosu na CV i DPV, ona ima svoje prednosti preciznijeg određivanja AOA pojedinačnih faza. Zbog strukture lipofilne faze rezultati koji su dobijeni u ponovljenim merenjima nisu bili reproduktivni, pa stoga nisu prikazani. Nije bilo moguće direktno odrediti ukupne lipofilne antioksidante u lipofilnoj fazi, ali iz razlike ukupne AOA obroka mleka i AOA vodene faze može da se odredi koncentracija ukupnih lipofilnih antioksidanata u uzorcima mleka (Lugonja i sar, 2014).

Polarografska metoda pruža specifičan uvid u antioksidativnu aktivnost analiziranih uzoraka. Dobijene korelacije između rezultata dobijenih različitim elektrohemijskim metodama i koncentracije proteina, dovode u vezu rezultate polarografske metode sa vrlo važnom komponentom prisutnom u analiziranom uzorku, a to su proteini. Dobijeni rezultati potvrđuju da je multilateralni pristup određivanju AO potencijala još uvek neophodan upravo zato što različite metode daju različite rezultate (Fukumoto i ostali, 2000). Merenje AO aktivnosti 2 % rastvora kazeina i BSA potvrdilo je da proteini značajno doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti mleka određenoj polarografskom metodom, dok premiks vitamina daje ovom metodom veoma malu aktivnost. U daljem radu će svakako biti određen doprinos pojedinih komponenti formula i humanog mleka ukupnom AO potencijalu merenom različitim metodama.



## **VI ZAKLJUČCI**

1. Majčino mleko je hrana koja sadrži antioksidante. Potvrđeno je da majčino mleko ima bolju reduktivnu sposobnost od infant formula.
2. Majčino mleko ispoljava opuštajući efekat na izolovani nevaskularni glatki mišić izolovan iz uterusa pacova, za razliku od infant formula kod kojih nije zabeležen ovakav efekat.
3. Kod svih uzoraka mleka, stvaranje hidroksil-radikala dovodi do formiranja ugljenik-centriranog i askorbil-radikala. Generalno, majčino mleko ima viši antioksidativni potencijal u poređenju sa infant formulama.
4. Viši antioksidativni potencijal majčinog mleka može se pripisati direktnom hvatanju radikala. Ovo ukazuje da majčino mleko poseduje mnogo snažniji antioksidativni potencijal u poređenju sa ispitivanim infant formulama. Ovo je od naročitog značaja za nezreo odbrambeni sistem odojčadi, što ih čini osetljivije na različite stresne faktore iz okruženja i poremećaje unutar sistema koji su povezani sa produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta.
5. Majčino mleko poseduje direktne farmakološke relaksirajuće efekte i obezbeđuje bolju antioksidativnu zaštitu u poređenju sa infant formulama, zbog prisustva specifičnih enzimskih komponenti kao što je superoksid-dismutaza. Ovi efekti mogu da budu prednost u bebinom gastrointestinalnom traktu, podržavajući normalan rad glatkih mišića i održavajući redoks homeostazu što može predstavljati mehanizam kojim dojenje doprinosi zdravlju beba.

6. Postoje razlike u sadržaju antioksidanata male molekulske mase i mineralnih supstanci u uzorcima mleka. Organizam kao celina koristi mehanizme odbijanja preuzimanja antioksidanata da bi sprečio poremećaje redoks stanja unutarćelijske sredine antioksidacionim suplementima. Ovo upućuje na zaključak da efekti specifičnih antioksidanata u majčinom mleku ne mogu biti u potpunosti imitirani dodatkom samo jednog ili više široko upotrebljivanih antioksidanata u infant formulama.
7. U kompleksnoj tečnosti kao što je mleko, nekoliko oksido-redukcionih sistema je istovremeno aktivno i njihov efekat na oksidaciono-redukциони potencijal zavisi od nekoliko faktora, kao što su reverzibilnost sistema,  $E^0$  vrednost sistema, odnos oksidanata i reduktanata i koncentracija aktivnih komponenti sistema. Iz rezultata potencimetrijskih titracija može da se zaključi da najveći antioksidativni potencijal ima majčino mleko, koji potiče uglavnom od enzimske komponente mleka. Infant formule imaju antioksidativni potencijal koji potiče od neenzimskih komponenti (vitamina A, C, E,  $Fe^{2+}$ ,...). Kravlje mleko UHT ima mali antioksidativni potencijal, zbog tretmana pri obradi i pakovanju mleka, kojim su uništene enzimske i vitaminske komponente.
8. Prema rezultatima tri uporedne elektrohemijske metode (CV, DPV i potencimetrija), može se zaključiti da IF za odojčad do godinu dana starosti (MIL 1 i 2), kao i za prevremeno rođenu decu (MIL PRE), imaju visok antioksidativni potencijal (70-80%) u odnosu na majčino mleko (100%), što doprinosi boljem fiziološkom razvoju deteta. Vrednost antioksidativnog potencijala je niža kod MIL 3 namenjene za ishranu dece preko godinu dana starosti, pošto ova deca dobijaju dovoljno antioksidanata iz druge hrane, a ne samo ishranom infant formulom.

9. Dosadašnje kliničke studije na infant formulama i majčinom mleku pokazale su da postoji visok nivo biološke aktivnosti pripremljenih obroka, što je još potvrđeno elektrohemijским određivanjima antioksidativnog potencijala infant formula u odnosu na majčino mleko.

10. Elektrohemijske metode mogu da budu veoma relevantne za brzo i rutinsko određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala mleka, infant formula i svežine mleka, kao i za kvantitativno određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala mleka.

Polarografska metoda (HPMC) je dala drugačiji uvid u AO potencijal ispitivanih uzoraka od ostalih metoda. Naime, AO potencijal infant formula izmeren ovom metodom bio je veći od potencijala majčinog mleka, dok je AO potencijal infant formula i majčinog mleka korelirao sa sadržajem proteina. Ovakav rezultat ukazuje na neophodnost ispitivanja pojedinačnih proteinskih komponenti mleka, kako ovom tako i drugim metodama.

11. Dobijeni rezultati pokazuju razlike između majčinog mleka i različitih infant formula koje ranije nisu razmatrane. Rezultati ukazuju na moguće mehanizme dobrih efekata majčinog mleka. Metode testirane u ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su prvi put za određivanje antioksidativnog potencijala ovih važnih proizvoda - hrane za odojčad, bebe i malu decu.

12. Strategija razvoja infant formula da što više liče na majčino mleko treba da se bazira na snižavanju koncentracije nepravilno heliranog gvožđa i imitiranju sastava malih molekula antioksidanata majčinog mleka.

## **VII LITERATURA**

1. Agostoni C., Axelsson I., Goulet O., Koletzko B., Michaelson K., Puntis J., Rigo J., Shamir R., Szajewska H., and Turck D. Prebiotic oligosaccharides in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 2004; 39: 465-473.
2. Ahola T, Fellman V, Kjellmer I, Raivio KO, Lapatto R. Plasma 8-isoprostane is increased in preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia or periventricular leukomalacia. *Pediatr Res.* 2004; 56: 88-93.
3. Alam, N., Bristi, N.J., Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2013; 21: 143-152.
4. Alles M.S., Scholtens P.A.M.J., and Bindels J.G. Current trends in the composition of infant milk formulas. *Curr. Pediatr.* 2004; 14: 51-63.
5. Anderson, G.H. Human milk feeding. *Pediatr Clin North Am.* 1985; 32: 335-353.
6. Andrades ME, Morina A, Spasic S, Spasojevic I. Bench-to-bedside review: Sepsis from the redox point of view. *Crit Care.* 2011; 15: 230.
7. Appiah I, Milovanovic S, Radojicic R, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, Slavic M, et al.: Hydrogen peroxide affects contractile activity and antioxidantenzymes in rat uterus. *Br J Pharmacol.* 2009; 158:1932-41.
8. Arcan, I.; Yemenicioğlu, A. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chem.* 2007; 103: 301-312.
9. Armstrong D. *Methods in Molecular Biology Vol 108.* Totowa: Humana Press Inc, 1999.
10. Atkinson, S.A., Bryan, M.H., Anderson, G.H. Human milk feeding in premature infants: Protein, fat and carbohydrate balances in the first two weeks of life. *Journal of Pediatrics.* 1981; 99:617-624.
11. Bačić, G., Spasojević, I., Šećerov, B., Mojović, M. Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities. *Spectrochim Acta A Mol BiomolSpectrosc.* 2008; 69: 1354-1366.

12. Ballard, O., Morrow, A.L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60: 49-74.
13. Bandyopadhyay, U.; Das, D.; Banerjee, R. K. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.* 1999; 77: 658-666.
14. Barbas C., Herrera E. Lipid composition and vitamin E content in human colostrum and mature milk. *J. Physiol. Biochem.* 1998; 54: 167-173.
15. Barness L.A. Dietary sources of nucleotides - from breast milk to weaning. *J. Nutr.* 1994; 124: 128S-130S.
16. Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 3: 205-214.
17. Baydar, N.G., Ozkan, G., Yasar, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control.* 2007; 18: 1131-1136.
18. Becker, E.M.; Nissen, L.R.; Skibsted, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* 2004; 219: 561-571.
19. Becker, D. (Ed.) *Redox potentiometry Redox Biochemistry.* John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2008.
20. Bender, C.J., Berliner, L.J. *EPR: Instrumental Methods.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods enzymol.* 1999; 299: 15-27.
21. Beresford, T.P., Fitzsimons, N.L., Brennan, N.L., Cogan, T.M. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J.* 2001; 11: 259-274.
22. Berka, V.; Palmer, G.; Cheng, P.; Tsai, A. Effects of various imidazole ligands on heme conformation in endothelial nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 1998; 37: 6136-6144

23. Beutler, H. Lactose and D-Galactose. In *methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed), 3rd ed. Vol VI, 102-112, VCH Publishers (UK) Ltd, Cmabridge, UK.
24. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012; 22:1147-62.
25. Boehm G., Jelinek J., Stahl B., Van Laere K., Knol J., Fanaro S., Moro G., Vigi V. Prebiotics in infant formulas. *J. Clin. Gastroenterol*. 2004; 38 288-292.
26. Bradford, M.M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding." *Analytical Biochemistry*. 1976, 72, 248-254.
27. Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 535-43.
28. Buettner, G. R.; Jurkiewicz, B. A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res*. 1996; 145: 532-541.
29. Buescher, E.S., McIlheran, S.M. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res*. 1988; 24: 14-19.
30. Buonocore G, Zani S, Sargentini I, Gioia D, Signorini C, Bracci R. Hypoxia-induced free iron release in the red cells of newborn infants. *Acta Paediatr*. 1998; 87: 77-81.
31. Cadenas E, Packer L. *Handbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekker, 2002.
32. Callen J., Pinelli J. A review of the literature examining the benefits and challenges, incidence and duration, and barriers to breastfeeding in preterm infants. *Adv. Neonatal Care*. 2005; 5: 72-79.
33. Carver J.D., Pimentel B., Cox W.I., and Barness L.A. Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics*. 1991. 88: 359-363.
34. Chakravarthi, S., Jessop, C.E., Bulleid, N.J. *EMBO reports*. 2006; 7: 271 - 275.



35. Cheeseman KH and Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 481-493.
36. Chen J, Gorton L, Akesson B. Electrochemical studies on antioxidants in bovine milk. *Anal Chim Acta.* 2002; 474: 137-146.
37. Chessman, K.H. Infant nutrition and special nutritional needs of children. In: Berardi R.R., Ferreri, S.P., Hume, A.L., Kroon, L.A., Newton, G.D., Popovich, N.G., et al. eds. *Handbook of Nonprescription Drugs*, 16<sup>th</sup> ed. Washington, DC: American Pharmacists Association. 2009: 467-96.
38. Chevion, M.; Jiang, Y.; Har-El, R.; Berenshtein, E.; Uretzky, G.; Kitrossky, N. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1993, 90, 1102-1106.
39. Christensen, T.H., Bjerg, P.I., Banwart, S.A., Jakobsen, R., Heron, G., Albrechtsen, H.J. Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *J Contam Hydrol* 2000; 45: 165-241.
40. Claiborne, A. Catalase activity. In: R. A. Greenwald (ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, pp. 283-284. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985.
41. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008; 45: 417-450.
42. Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P.P., Mulinacci, N., Pinelli, P., Franconi, F., Romani A. Dose effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke. *Food Chem.* 2007; 101: 524-531.
43. Cooke, M. S.; Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal.* 2003; 17: 1195-1214.
44. Cornelli, U.; Terranova, I.R.; Luca, S.; Cornelli, M.; Alberti, A. Bioavailability and Antioxidant Activity of Some Food Supplements in Men and Women Using the D-Roms Test as a Marker of Oxidative Stress. *J. Nutr.* 2001; 131: 3208-3211.

45. Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., Mckay, L.L., Riepe, H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int Dairy J.* 1995; 5: 855-875.
46. Denisov, E. T., Khudyakov, I., V. Mechanism of action and reactivities of the free radicals of inhibitors. *Chem. ReV.* 1987; 87: 1313-1357.
47. Dickinson, B. C.; Chang, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol.* 2011; 7: 504-511.
48. Dutton, P. L. Redox potentiometry: Determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems. *Methods Enzymol.* 1978; 54: 411-435.
49. Eaton SS, Eaton GR, Berliner LJ. *Biomedical EPR - Part A: Free Radicals, Metals, Medicine and Physiology.* New York: Springer Verlag, 2005.
50. Ehlers PI, Kivimaki AS, Turpeinen AM, Korpela R, Vapaatalo H. High blood pressure-lowering and vasoprotective effects of milk products in experimental hypertension. *Br J Nutr.* 2011; 106: 1353-63.
51. Emmett, P.M., Rogers, I.S. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Hum Dev.* 1997; 49: S7-28.
52. Evans PJ, Evans R, Kovar IZ, Holton AF, Halliwell B. Bleomycin-detectable iron in the plasma of premature and full-term neonates. *FEBS Lett* 1992; 303: 210-2.
53. Folin, O., Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophan determinations proteins. *J Biol Chem.* 1927; 73: 627.
54. Fomon S.J., Zielger E.E., Nelson S.E., and Frantz J.A. What is the safe protein-energy ratio for infant formulas? *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62: 358-363.
55. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry.* Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, London, 1998.
56. Fox, P. F. *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 3: Lactose, Water, Salts and Vitamins.* 2nd ed. Chapman and Hall: New York, 1995.
57. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals, *Science.* 1978; 201: 875-880.

58. Friel, J.K., Martin, S.M., Langdon, M., Herzberg, G.R., Buettner, G.R. Milk from mothers of both premature and full term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res.* 2002; 51: 612-8.
59. Friel, J.K., Friesen, R.W., Harding, S.V., and Roberts, L.J. Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr. Res.* 2004; 56: 878-882.
60. Gartner L.M., Morton J., Lawrence R.A., Naylor A.J., O'Hare D., Schanler R.J., Eidelman A.I. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2005; 115: 496-506.
61. Gennis, R. B. *Biomembranes (Ed) Molecular Structure and Function*, Springer, New York, 1989.
62. Gerber, C.E., Bruchelt, G., Stegmann H, Schweinsberg F, Speer CP. Presence of bleomycin-detectable free iron in the alveolar system of preterm infants. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257:.218-22.
63. Giroux, H.J., St-Amant, J.B., Fustier, P., Chapuzet, J.M., Britten, M. Effect of electroreduction and heat treatments on oxidative degradation of dairy beverage enriched with polyunsaturated fatty acids. *Food Res Int.* 2008; 41: 145-153.
64. Goldman, A.S., Goldblum, R.M., Hanson, K.A. Anti-inflammatory systems in human milk. *Adv Exp Med Biol.* 1990; 262:69-76.
65. Gorjanović, S. Ž, Novaković, M. M., Potkonjak, N. I., & Sužnjević, D. Ž, Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010; 58: 4626-4631.
66. Gorjanović, S., Novaković, M., Potkonjak, N., Leskošek-Čukalović, I., Sužnjević, D. Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010; 58 (2): 744-751.
67. Gorjanović, S., Novaković, M., Vukosavljević, P., Pastor, F., Tešević, V., Sužnjević, D. Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in

determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58 (14): 8400–8406.

68. Gorjanović, S., Rabrenović, B., Novaković, M., Dimić, E., Basić, Z., Sužnjević, D. Cold-Pressed Pumpkin Seed Oil Antioxidant Activity as Determined by a DC Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenge. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011; 88. 1875–1882.

69. Gorjanović S, Komes D, Pastor FT, Belščak-Cvitanović A, Pezo L, Hećimović I, Sužnjević D. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(38)., 9573-80.

70. Gorjanović S., Ferenc P., Novaković M., Simonović M., Milić S., Sužnjević D, Electrochemical versus Spectrophotometric Assessment of Antioxidant Activity of Hop (*Humulus lupulus* L.) Products and Individual Compounds *J Agric Food Chem*. 2013;61(38):9089-96

71. Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., Sužnjević, D. Ž. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013; 30(1): 13-18.

72. Gossage C.P., Deyhim M., Yamini S., Douglass L.W., Moser-Veillon P.B. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to beta-carotene supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 76: 193–197.

73. Grundl, T. A review of the current understanding of redox capacity in natural, disequilibrium systems. *Chemosphere*. 1994; 28: 613-626.

74. Gulaboski, R., Pereira C.M. *Electroanalytical Techniques and Instrumentation in Food Analysis*. Handbook of Food Analysis Instruments, CRC Press, 2008.

75. Gutteridge, J., Halliwell, B. Antioxidants: Molecules, medicines and myths. *Biochem.Biophys. Res. Commun*. 2010; 393: 561-564.

76. Habeeb A. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 1972; 25: 457-64.
77. Hagen, W.R. *Biomolecular EPR spectroscopy*. Boca Raton: CRC Press, 2008.
78. Halliwell, B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46:531-542.
79. Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I. The characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology.* 1995; 33: 601-617.
80. Halliwell, B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon, 2007.
81. Halliwell, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1341-1348.
82. Hamosh M: Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am.* 2001; 48:69.
83. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 2001; 57: 43-56.
84. Hicks, C.L., Bucy, J., Stofer, W. Heat Inactivation of Superoxide Dismutase in Bovine Milk; *Journal of Dairy Science.* 1979; 62: 529-532.
85. Hioe J., Zipse H. Radical stability and its role in synthesis and catalysis. *Org Biomol Chem*, 2010; 8: 3609-17.
86. Higashi, Y.; Noma, K.; Yoshizumi, M.; Kihara, Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ. J.* 2009; 73: 411-418.
87. Hirano K, Morinobu T, Kim H. Blood transfusion increases radical promoting non-transferrin bound iron in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2001; 84: F188-93.
88. Holbrook, J., Hicks, C. Variation of superoxide dismutase in bovine milk. *J Dairy Sci.* 1978; 61: 1072-7.
89. Horowitz, A., Menice, C. B., Laporte, R., Morgan, K. Mechanisms of Smooth Muscle Contractions. *Physiological Rev.* 1996; 74: 967-992.

90. Hu, F., Kuwana, T. Oxidative Mechanism of Ascorbic Acid at Glassy Carbon Electrode, *Anal. Chem.* 1986; 58: 3235-3239.
91. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agrif Food Chem*, 2005; 53: 1841-1856.
92. Huang, D.J., Chen, H.J., Lin, C.D, Lin. Y.H. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatic* Forsk) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2005; 46: 99-106.
93. Ingold, K. U. Inhibition of the autoxidation of organic substances in liquid phase *Chem Rev.* 1961; 61: 563-584.
94. Jacob C, Winyard PG. *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine.* Weinheim: Wiley-VCH, 2009.
95. Jacob, R.A. The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* 1995; 15: 755-766.
96. Janas L.M., Picciano M.F., and Hatch T.F. Indices of protein metabolism in term infants fed human milk, whey-predominant formula, or cow's milk formula. *Pediatrics* 1985; 75: 775-784.
97. Janas L.M., and Picciano M.F. The nucleotide profile of human milk. *Pediatr. Res.* 1982; 16: 659-662.
98. Janaszewska, A., Bartosz, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002; 62:231-236.
99. Jenness, R. The composition of human milk, *Semin Perinatol.* 1979; 3: 225-39.
100. Jia, Z.; Zhu, H.; Misra, B. R.; Mahaney, J. E.; Li, Y.; Misra, H. P. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Mol. Cell Biochem.* 2008; 313: 187-194.
101. Kamizake, N., Goncalves, M., Zaia, C., Zaia, D. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *J Food composition and Anal.* 2003; 16: 507-516.

102. Kanner, J., German, J.B. Kinsella, J.E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987; 25: p. 317-364.
103. Karadag A., Ozcelik B., Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods.* 2009; 2: 41-60.
104. Kasapović J, Pejić S, Mladenović M, Radlović N, Pajović SB. Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk. *Turk J Pediatr* 2005; 47:343-7.
105. Kell DB. Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol.* 2010; 84: 825-889.
106. Kilmartin PA. Electrochemical detection of natural antioxidants: Principles and protocols. *Antioxidants and Redox Signalling.* 2001; 3: 941-955.
107. Bard, A. J., Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods*, 2nd ed., Wiley, New York, 2001, 137-155, Chap. 4.
108. Kilmartin, P.A., Hsu, C.F. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry.* 2003; 82: 501-512.
109. Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 1957-65.
110. Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. *American Journal of Enology and Viticulture.* 2002; 53: 294-203.
111. Kilmartin, P.A., Zou, H.L. The effect of electrode material on the measured redox potential of red and white wines. *Electroanalysis.* 2001; 13: 1347-1350.
112. King, M.W.1996. <http://themedicalbiochemistrypage.org/muscle.php>

113. Kiyosawa I, Matuyama JSN. Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase concentration in human colostrums and mature milk. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57: 676–7.
114. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30:620-50.
115. Koletzko B., Rodriguez-Palmero M. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.*1999; 4: 269-284.
116. Kondratova, A. A.; Kondratov, R. V. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012; 13: 325-335.
117. Koppenol WH. What is in a name? Rules for radicals. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 225–227.
118. Koppenol WH. NO nomenclature? *Nitric Oxide.* 2002; 6: 96–98.
119. Kruidenier, L. & Verspaget, H. W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease – radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16: 1997–2015.
120. Kulkarni, R. R.; Virkar, A. D.; D'mello, P. Antioxidant and antiinflammatory activity of *Vitex negundo*. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70: 838–840.
121. L'Abbe, M.R. and Friel, J.K.: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 31: 270–274,
122. Lachman J., Proněk, D., Hejtmánková, A., Dudjak, J., Pivec, V., Faitová, K. Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Hort. Sci. (Prague).* 2003; 30 (4): 142–147
123. Lane N. A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory. *J Theor Biol.* 2003; 225:531–40.



124. Laugier, O., Spasic, S., Mandic, V., Jakovljevic, D., Vrvic, M. The effects of repetitive alkaline/acid extractions of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall on antioxidative and bifidogenic efficacy. *Int J Food Sci Technol* 2012; 47:369–75.
125. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 3704–9.
126. Li W., Hosseinian F.S., Tsopmo A., Friel J.K., Beta T. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*. 2009; 25: 105–114.
127. Lien, E.J., Ren, S., Bui, H.-H., Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 285-294.
128. Loew O. A New Enzyme of General Occurrence in Organisms. *Science*. 1900; 11(279): 701–702.
129. Lonnerdal, B., Atkinson, S.A. Nitrogenous components of milk. In: Jensen R (ed) *Handbook of milk composition*. San Diego, Academic Press, 1995; 351-368.
130. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265–75.
131. Lugonja N, Martinov O, Rasović M, Spasić S, Gojgić G, Vrvic M. Comparative investigation of an in vitro and clinical test of the bifidogenic effect of an infant formula. *J Clin Biochem Nutr*. 2010; 47: 208–16.
132. Lugonja, N., Spasić, S., Laugier, O., Nikolić-Kokić, A., Spasojević, I., Oreščanin-Dušić, Z., Vrvic, M. Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas. *Nutrition*. 2013; 431-435.
133. Lugonja, N., Stanković, D., Spasić, S., Roglić, G., Manojlović, D., Vrvic, M. Comparative Electrochemical Determination of Total Antioxidant Activity in Infant Formula with Breast Milk. *Food Anal. Methods*. 2014; 7:337–344.

134. Manojlović, D., Mutić, J., Šegan, D. Osnovi elektroanalitičke hemije (II) izdanje. Beograd, 2010.
135. Martinov, O., Spasić, S., Lugonja, N., Gojgic-Cvijović, G., Vrvčić, M. Infant formula as a substrate for bifidogenesis: an in vitro investigation. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10: 2302-2307.
136. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62: 609-14.
137. Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16: 577-586.
138. Mathison, S., Bakker, E. Effect of Transmembrane Electrolyte Diffusion on the Detection Limit of Carrier-Based Potentiometric Ion Sensors *Anal. Chem.* 1998; 70: 303.
139. McAnalley S, Koepke CM, Le L, Vennum E, McAlley B. In Vitro methods for testing antioxidant potential: a review. *Glycoscience & Nutrition.* 2003; 4:1-9.
140. McCartney, A. Bacteria in the infant gut: the key role of prebiotics. *Family Healthcare Bulletin.* 2004; 14: suppl 2.
141. Michiels C, Raes M, Toussant O, Remacle J. Importance of Se glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 1994; 17: 235-248.
142. Milovanovic S., Orescanin Z., Spasic S., Miletic S., Prostran M., Spasic M.B. Effect of Mn SOD (E.coli) on the relaxation caused by sodium nitroprusside on isolated rat renal artery *J. Serb. Chem. Soc.* 2004; 69 (11): 973-980.
143. Misra HIF. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247: 3170-5.

144. Mirshafiey, A.; Mohsenzadegan, M. The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2008; 7: 195-202.
145. Murray R. W. (Ed.) *Molecular Design of Electrode Surfaces in Techniques in Chemistry Founding* (Ed.: A. Weissberger), Wiley- Interscience, New York, 1992, Vol. XXII.
146. Musumeci M., Simpoire J., D'Agata A., Sotgiu S., Musumeci S., Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkinabe women. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 43:372-378.
147. Newburg, D.S. Bioactive components of human milk: evolution, efficiency and protection. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 501: 3-10.
148. Nikolić-Kokić, A., Oreščanin-Dušić, Z., Slavić, M., Spasojević, I., Blagojević, D., Stević, Z, Spasić, M. The effect of human wildtype and mutant L144F SOD1 from human blood on non-vascular smooth muscle contractions. *J.Med.Biochem.* 2013; 32:375-379.
149. Novaković, M. M., Stevanović, S. M., Gorjanović, S. Ž, Jovanović, P. M., Tešević, V. V., Janković, M. A., Sužnjević, D. Ž. Changes of Hydrogen Peroxide and Radical-Scavenging Activity of Raspberry during Osmotic, Convective, and Freeze-Drying. *Journal of Food Science.* 2011; 76. C663–C668.
150. Noyhouzer, T., Kohen, R., Mandler, D. A new approach for measuring the redox state and redox capacity in milk. *Anal Meth.* 2009; 1: 93–99.
151. Nightingale, E.R. Poised oxidation-reduction systems. *Anal. Chem.* 1958; 30: 267-272.
152. Oddy, W.H.: The impact of breastmilk on infant and child health. *Breastfeed Rev.* 2002; 10, 5-8.
153. Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilbert, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine.* 1998; 25: 1057-1065.

154. Osteryoung, J.G., Schreiner, M.M. Recent advances in pulse voltammetry, *CRC Crit. Rev. Anal.Chem.* 1988; 19, S1.
155. Osuntoki, A., Korie, I. Antioxidant Activity of Whey from Fermented Milk, *Food Technol. Biotechnol.* 2010; 48 (4): 505–511.
156. Ou, C.C. Lu, T.M., Tsai, J.T., Yen, J.H., Chen, H.W., Lin. M.Y. Antioxidative effects of lactic acid bacteria: Intact cells vs. intracellular extracts. *J. Food Drug Anal.* 2009; 17: 209-216.
157. Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158–69.
158. Patton, S., Huston, G.E. A method for isolation of milk fat globules. *Lipids.* 1986; 21: 170-174.
159. Phillips, D. C.; Dias, H. K.; Kitas, G. D. Griffiths, H. R. Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in rheumatoid arthritis (RA): causes and 33 consequences for immune function, cell survival, and therapeutic intervention. *Antioxid. Redox Signal.* 2010; 12: 743-785.
160. Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Stipcević, T., Martinez, S. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chem.* 2010; 121:820–825.
161. Pimentel, C.; Batista-Nascimento, L.; Rodrigues-Pousada, C.; Menezes, R. A. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2012, 132-146.
162. Pinto E, Sigaud-Kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D. Colepicolo P Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 2003; 39: 1008-1018.
163. Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochem & Anal Biochem.* 2011; 1: 106.
164. Pisoschi, A.M., Cheregi, M.C., Danet, A.F. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules.* 2009; 14: 480-493.

165. Podsędek, A. Natural antioxidants and antioxidant activity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol.* 2007; 40: 1-11.
166. Potkonjak, N., Veselinović, D., Novaković, M., Gorjanović, S., Pezo, L., Sužnjević, D. Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: a polarographic approach. *Food and Chemical Toxicology.* 2012; 50: 3614-3618.
167. Poulsen, H. E.; Loft, S. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 1996; 74: 297-312
168. Prior, R., Wu, X., Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005; 53 (10): 4290-302.
169. Pristov, J.B., Mitrović, A., Spasojević, I. A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. *Carbohydr Res* 2011; 346: 2255-9.
170. Rains, J. L.; Jain, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic.Biol. Med.* 2011; 50: 567-575.
171. Raisler J., Alexander C., and O'campo P. (1999). Breast-feeding and infant illness: a dose-response relationship? *Am. J. Public Health.* 1999; 89: 25-30.
172. Rajapakse, N.; Mendis, E.; Jung, W.; Je, J.; Kim, S. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res. Int.* 2005; 38: 175-182.
173. Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control Release.* 2006; 113: 189-207.
174. Rocha, M.; Apostolova, N.; Hernandez-Mijares, A.; Herance, R.; Victor, V. M. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: mitochondria-targeted therapeutics. *Curr. Med. Chem.*, 2010, 17, 3827-3841.
175. Roginsky, V., Lissi, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 2005; 92: 235-254.
176. Roginsky, V., Barsukova, T., Hsu, C.F., Kilmartin, P.A. Chain-Breaking Antioxidant Activity and Cyclic Voltammetry Characterization of Polyphenols

- in a Range of Green, Oolong, and Black Teas. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 5798–5802.
177. Ruberto, G., Randa, A., Daquino, C., Amico, V., et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry.* 2007; 100: 203-210.
178. Sabela, M.I., Gumede, N.J., Singh, P., Bisetty, K. Evaluation of antioxidants in herbal tea with a Laccase biosensor. *Int J. Electrochem Sci.* 2012; 7: 4918–4928.
179. Saifutdinov, R.G., Larina, L.I., Vakulskaya, T.I., Voronkov, M.G. *Electron Paramagnetic Resonance in Biochemistry and Medicine.* New York: Springer Verlag, 2001.
180. Sakurai T., Furukawa M., Asoh M., Kanno T., Kojima T., Yonekubo A. Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2005; 51: 239–247.
181. San Miguel, S.A., Opperman, L.A., Allen, E.P., Svoboda, K. *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense Mechanisms in the Oral Cavity: A Literature Review.* Compendium. 2011.
182. Saugstad O.D. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr. Scand.* 1990; 79: 881-892 Scheibmeir, H.D., Christensen, K., Whitaker, S.H., Jegaethesan, J., Clancy, R., Pierce, J.D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.* 2005; 21:24-28;
183. Sharma MK, Buettner GR. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: An ESR study. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14: 649–653.
184. Sherbon, J.M. *Fundamentals of Dairy Chemistry,* Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, 1999.
185. Sherman, H.C. *Chemistry of food and nutrition.* The Macmillan Company, New York, 1947.

186. Shew, R.L., Papka, R.E., Mc Neil, D.L., Yee, J.A. NADPH diaphorase-positive nerves and role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction, *Peptides*. 1993; 14, 637-641.
187. Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. Introducing natural antioxidants. *Antioxidants in food, Practical application*, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. Woodhead Publishing Limited, Eds, Cambridge, England. 2001; 22-70.
188. Shoichi Ezaki, Tomoo Ito, Keiji Suzuki, Masanori Tamura. Association between Total Antioxidant Capacity in Breast Milk and Postnatal Age in Days in Premature Infants *J Clinl Bioch Nutr*. 2008; 42: 133-137.
189. Sedelnikova, O. A.; Redon, C. E.; Dickey, J. S.; Nakamura, A. J.; Georgakilas, A. G.; Bonner, W. M. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat. Res*. 2010; 704: 152-159.
190. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999; 299: 152-178.
191. Sokalski, T., Ceresa, A., Zwickl, T., Pretsch, E. Large improvement of the lower detection limit of ion-selective polymer membrane electrodes. *J. Am. Chem. Soc*. 1997; 119: 347.
192. Spasić M, Milovanović S, Simović M. The effect of superoxide dismutase on isolate smooth muscle of the rat. In: Nygaard O, Upton AC, editors. *Anticancerogenesis and radiation protection*. New York: Plenum Press; 1991. p. 345-8.
193. Spasojević, I. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2011; 48: 114-142.
194. Spasojević, I.; Mojović, M.; Blagojević, D.; Spasić, S.D.; Jones, D.R.; Nikolić-Kokić, A.; Spasić, M.B. Relevance of the capacity of phosphorylated fructose to scavenge the hydroxyl radical. *Carbohydr. Res*. 2009; 344: 80-84.

195. Stanfield, C., Germann, W. Principles of human physiology, 3/E. Chapter 12 - Muscle Physiology. Pearson Education, 2014.
196. Stevanato, R., Fabris, S., Momo, F. Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 6287-6293.
197. Sun, J., Hu, X.L., Le, G.W., Shi, Y.H. Lactobacilli prevent hydroxyl radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 50 (2010) 264–269.
198. Sužnjević D.Ž., Pastor F.T., Gorjanović S.Ž., Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination, *Talanta* 2011; 85 (3):1398-1403.
199. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 2003; 140-141: 105–112.
200. Taiz, L., Zeiger, E., *A Companion to Plant Physiology*, Fifth Edition, Chapter 7, Midpoint potential and redox reactions. Sinauer Associates, Inc. 2010.
201. Thompson, A.M., Bizzarro, M.J. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs.* 2008; 68: 1227-1238.
202. Thorell L., Sjoberg L.B., and Hernell O. Nucleotides in human milk: sources and metabolism by the newborn infant. *Pediatr. Res.* 1996; 40: 845-852.
203. Tsukahara, H. Biomarkers for oxidative stress: clinical application in pediatric medicine. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 339-351.
204. Tsuchihashi M. Zur Kernntnis der Blutkatalase. *Biochem Z* 1923; 140: 65.
205. Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.*, 2009, 7, 65-74.
206. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.



207. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 1161-1208.
208. Van Zoeren-Grobbe, D., Lindeman, J.H., Houdkamp, E., Brand, R., Schrijver, J., Berger, H.M. Postnatal changes in plasma chain-breaking antioxidants in healthy preterm infants fed formula and/or human milk. *Am J Clin Nutr.* 1994; 60: 900-906.
209. Veljković, J.N., Pavlović, A.N., Mitić, S. et al. Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: spectrophotometrical and electrochemical approaches. *J Food Nutr Res.* 2013; 52:12-24.
210. Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 2007, 102: 106-115.
211. Wainwright L. Does the addition of prebiotics to infant formula have beneficial effects for the baby? *J. Neonat. Nurs.* 2006; 12: 130-137.
212. Waris, G.; Ahsan, H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* 2006; 5. 14.
213. Weil, J.A., Bolton, J.R. *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications.* New York: Wiley and Sons, 2007.
214. White, C., Area, A., *Collection of Laboratory Activities: Bradford Protein Determination of Milk Protein,* Athens Area Technical Institute, Athens, GA.
215. Whitfield, M. Eh as an operational parameter in estuarine studies. *Limnol. Oceanogr.* 1969; 14: 547-558.
216. Wijendran V., Huang M.C., Diao G.Y., Boehm G., Nathanielsz P.W., and Brenna J.T. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatr. Res.* 2002; 51: 265-272.
217. Wijendran V., Lawrence P., Diao G.Y., Boehm G., Nathanielsz P.W., and Brenna J.T. Significant utilization of dietary arachidonic acid is for brain adrenic acid in baboon neonates. *Pediatr. Res.* 2002; 43: 762-767.

218. Wilson A.C., Forsyth J.S., Greene S.A., Irvine L., Hau C., and Howie P.W. Relation of infant diet to childhood health: seven year follow of cohort of children in dundee infant feeding study. *BMJ*. 1998; 316: 21-25.
219. Wiseman, H.; Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 1996; 313: 17-29.
220. Winterbourn, C.C., Hampton, M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45: 549-561.
221. Xu, Y., Kalyanaraman, B. Synthesis and ESR studies of a novel cyclic nitron spin trap attached to a phosphonium group-a suitable trap for mitochondria-generated ROS? *Free Radic Res*. 2007; 41: 1-7.
222. Xu R, Shang N, Li P. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH. *Anaerobe*. 2011; 17(5):226-31.
223. Yan J, Meng X, Wancket LM, Lintner K, Nelin LD, Chen B, Francis KP, Smith CV, Rogers LK, Liu Y. Glutathione reductase facilitates host defense by sustaining phagocytic oxidative burst and promoting the development of neutrophil extracellular traps. *J Immunol*. 2012; 188: 2316-27.
224. Zarban, A., Taheri, T., Chahkandi, T., Sharifzadeh, G., Khorashadizadeh, M. Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Human Colostrum, Transitional and Mature Milk. *J Clin Biochem Nutr*. 2009; 45: 150-154.
225. Zhao, H., Joseph, J., Zhang, H., Karoui, H., Kalyanaraman, B. Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: a relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathionyl radicals. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31: 599-606.
226. Živković, J.; Zeković, Z.; Mujie, I.; Godevac, D.; Mojović, M.; Mujić, A.; Spasojević, I. EPR Spin-trapping and spin-probing spectroscopy in assessing antioxidant properties: example on extracts of catkin, leaves, and spiny burs of *Castanea sativa*. *Food Biophysics*. 2009; 4: 126-133.

227. Zou, H., Kilmartin, P.A., Inglis, M., Frost, A. Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir wine examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2002; 8: 163–174.

## **VIII BIOGRAFIJA AUTORA**

Nikoleta M. Lugonja (rođ. Živić) je rođena u Kikindi 30.12.1977. godine. Diplomirala je biohemiju na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2005. godine, a magistrirala 2011. godine na istom fakultetu – smer Biohemija. Na mesto saradnika u nastavi na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu izabrana je 2008. godine. U Centru za hemiju IHTM je zaposlena od 2011. godine, na mestu istraživača-saradnika.

Oblast interesovanja i naučno-istraživačkog rada je biohemija hrane i ishrane, ispitivanje prebiotskog dejstva i antioksidativnog potencijala dijetetskih proizvoda, hrane za mlađu i stariju odojčad i malu decu.

Nikoleta M. Lugonja je do sada autor i koautor tri naučna rada sa SCI liste, objavljenih u uglednim inostranim časopisima i osam saopštenja u naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu, koja su proistekla iz rezultata ove doktorske disertacije.

**Bibliografija radova i saopštenja**

**Lugonja, N.,** Spasić, S., Laugier, O., Nikolić-Kokić, A., Spasojević, I., Oreščanin-Dušić, Z., Vrvic, M. Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas. *Nutrition*. 2013; 29:431-435.

**Lugonja, N.,** Stanković, D., Spasić, S., Roglić, G., Manojlović, D., Vrvic, M. Comparative Electrochemical Determination of Total Antioxidant Activity in Infant Formula with Breast Milk. *Food Anal. Methods*. 2014; 7:337-344.

**N.M. Lugonja,** O.B. Martinov, M.R. Rasović, S.D. Spasić, G.Dj. Gojgić, M.M. Vrvic, A comparative investigation of an *in vitro* and clinical test of the bifidogenic effect of an infant formula, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2010; 47:208-216.

**N. Lugonja,** O.B. Laugier, M.M. Vrvic, S. Miletić, S.D. Spasić, Antioxidative properties of infant formulas against hydroxyl radical production in the Fenton reaction, Abstract book of the Belgrade food international conference: Food, health and wellbeing, Belgrade, 2012, p. 87.

**N.M. Lugonja,** D.M. Stanković, S.D. Spasić, D.D. Manojlović, M.M. Vrvic, Comparative electrochemical determination of total antioxidant activity in breast milk with infant formula, Abstract book of the Belgrade food international conference: Food, health and wellbeing, Belgrade, 2012, p. 88.

S.D. Spasić, **N. Lugonja,** O. Laugier, Z. Oreščanin-Dušić, A. Nikolić-Kokić, I. Spasojević, M.M. Vrvic, Differences in direct pharmacological effects and antioxidative properties of mature breast milk and an infant formula, Abstracts of the 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmacology-EPHAR 2012, Granada (Spain), 2012, p. 351.

**N.M. Lugonja,** D.M. Stanković, S.D. Spasić, M.M. Vrvic, Determination of total antioxidant activity of milk using potentiometric titration, Proceedings of 6<sup>th</sup> Central European Congress on Food-CEFood, Novi Sad, 2012, p. 158.

**N.M. Lugonja,** O.B. Laugier, S.D. Spasić, G.Dj. Gojgic-Cvijović, M.M. Vrvic, Bifidogenic effect of a follow-on formula supplemented with prebiotics, Abstracts of the International Symposium of Probiotics & Prebiotics in Pediatrics, Istanbul (Turkey), 2012, p. 82.

**N.M. Lugonja**, O.B. Laugier, S.D. Spasic, G.Dj. Gojgic-Cvijovic, M.M. Vrvic, Effect of a follow-on formula supplemented with prebiotics on the baby's gut composition, CD-ROM Abstracts of the 7<sup>th</sup> Balkan Congress of Microbiology-Microbiologia Balkanica 2011, Belgrade, 2011.

**N.M. Lugonja**, O.B. Martinov, S.D. Spasić, G.Dj. Gojgić-Cvijović, M.M. Vrvić, Comparative clinical study and *in vitro* test of bifidogenic effect of two infant formulas supplemented with inulin and FOS, 1<sup>st</sup> FCUB ERA Workshop-Food Safety and Health Effects of Food, Belgrade, 2011.

O.B. Martinov, S.D. Spasić, **N.M. Lugonja**, G.Dj. Gojgić-Cvijović, M.M. Vrvić, Effect of prebiotic Infant Formula on The infant's gut microbial composition and anthropometric factors: Clinical study, 1<sup>st</sup> FCUB ERA Workshop-Food Safety and Health Effects of Food, Belgrade, 2011.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани Николета Лугоња

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање антиоксидативног потенцијала хране за бебе“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.


У Београду, 12. мај 2014.

Потпис докторанда

*Николета Лугоња*



## Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**Име и презиме аутора Николета ЛугоњаНаслов рада „Испитивање антиоксидативног потенцијала хране за бебе“Ментор проф. др Мирослав М. ВрвићПотписани 

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**У Београду, 12. мај 2014.

## Прилог 3.

**Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„ Испитивање антиоксидативног потенцијала хране за бебе“

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 12. мај 2014.

*Николеџа Лугоњџа*

---

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.