



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена М. Младеновић

ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И ЕПИКАТЕХИНА  
НА ОКСИДАТИВНО-АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС ПАЦОВА  
ТРЕТИРАНИХ БАКАР(II)-ЈОНОМ

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014.

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>I. Аутор</b>
Име и презиме: Јелена М. Младеновић
Датум и место рођења: 22.10.1971. Ниш, Србија
Садашње запослење: асистент Факултета педагошких наука у Јагодини, Универзитета у Крагујевцу
<b>II. Докторска дисертација</b>
Наслов: <b>Ефекти кверцетина и епикатехина на оксидативно-антиоксидативни статус пацова третираних бакар(II)-јоном</b>
Број страница: 178
Број слика: 9
Број библиографских података: 325
Установа и место где је рад израђен: Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Биологија/ Физиологија животиња и молекуларна биологија: 57 / 591.1 / 577.2
Ментор: др Бранка Огњановић, ванредни професор Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу
<b>III. Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 23.01.2014.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Др Бранка Огњановић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</li> <li>2. Др Андраш Штајн, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња;</li> <li>3. Др Зорица Саичић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, ужа научна област: Физиологија.</li> </ol>
Комисија за оцену докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Др Бранка Огњановић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</li> <li>2. Др Андраш Штајн, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња;</li> <li>3. Др Зорица Саичић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, ужа научна област: Физиологија.</li> </ol>
Датум одбране дисертације:

*Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Лабораторији за експерименталну физиологију Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу.*

*Дубоку захвалност дугујем свом ментору проф. др Бранки Огњановић, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на прилици коју ми је пружила, знању које ми је преносила током студирања и реализације овог рада и свесрдној помоћи, корисним сугестијама током свих фаза израде ове дисертације. Њено искуство и пријатељство помогло ми је да истрајем у свом раду.*

*Захваљујем се проф. др Андрашу Штајну, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за сву подршку и драгоцене савете који су омогућили да ова дисертација буде успешно финализована.*

*Посебну захвалност дугујем др Зорици Саичић, научном саветнику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, на несебичној помоћи, идејама и драгоценим сугестијама током целокупне реализације ове дисертације.*

*Захваљујем се колегама у Лабораторији за експерименталну физиологију, посебно Милицу, Милошу и Бојану за велику помоћ током експерименталног рада. Захваљујем се и колегама у Лабораторији за биохемију на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу за помоћ и колегијалност. Такође, овим путем захваљујем се свима који су на било који начин допринели изради ове докторске дисертације.*

*На крају, посебну захвалност дугујем мојој породици, Мими, Божени, Новаку и пријатељима који су веровали у мене, подржавали ме и охрабривали када год је то било потребно. Немерљиву захвалност за безгранично стрпљење, подршку, разумевање и љубав упућујем мојој Емилији, Ксенији и Александру.*

*Јелена Младеновић*

## СКРАЋЕНИЦЕ

---

$^1\text{O}_2$	синглет кисеоник
ADP	аденозин дифосфат
AGEs	напредна гликација крајњих продуката (енг. <i>Advanced glycation end products</i> )
Alb	албумин
ALP	алкална фосфатаза
ALT	аланин аминотрансфераза
АО	оксидаза амина
AOS	систем антиоксидативне заштите (енг. <i>Antioxidant defence system</i> )
AP-1	активатор протеин 1
AsA <sup>-</sup>	аскорбил радикал
AST	аспартат аминотрансфераза
Atox1 (НАН1)	траспортер бакра (енг. <i>Antioxidant 1 copper chaperone</i> )
АТР-аза	аденозин трифосфатаза
АТР7А, АТР7В	АТР-азе одговорне за транспорт бакра
bFGF	фактор раста фибробласта (енг. <i>Basic fibroblast growth factor</i> )
Ca	калцијум
CAT	каталаза
CCS	транспортер бакра за SOD (енг. <i>Copper chaperone for SOD</i> )
CDNB	1-хлоро-2,4-динитробензен
Chol	укупни холестерол
-COOH	карбоксилна група
COX	цитохром c-оксидаза
Cox17	транспортер бакра (енг. <i>Copper chaperone for cytochrome c-oxidase</i> )
CP	церулоплазмин
CTR1	трансмембрански транспортер за бакар (енг. <i>Copper transporter</i> )
Cu	бакар
CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	бакар хлорид дихидрат
Cu(II)-HSA-Hys	бакар-албумин-хистидински комплекс
CuSO <sub>4</sub>	бакар сулфат
CuZn SOD	бакар цинк садржавајућа супероксид-дисмутаза
DasA	дехидро-L-аскорбинска киселина
DBH	допамин β-хидроксилаза
DMT1	транспортер бакра (енг. <i>Divalent metal transporter 1</i> )
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
DNPН	2,4-динитро-фенилхидразин
DPA	D-пенициламин
DTNB	5,5'-дителиобис(2-нитробензоична киселина)
ЕС	епикатехин (енг. (-)- <i>Epicatechin</i> )
ЕС SOD	екстрацелуларна супероксид-дисмутаза
EDTA	етилендиамин тетраацетат
FAD	флавин аденин динуклеотид
Fe	гвожђе
GGT	гама-глутамил транспептидаза

---

---

G-6-P	глукозо-6-фосфат
G6PDH	глукозо-6-фосфат дехидрогеназа
GBA3	цитосолна β-глюкозидаза
Glu	глукоза
GR	глутатион-редуктаза
Gra	гранулоцити
GS	глутатион-синтетаза
GSH	редуковани глутатион
GSH-Px	глутатион-пероксидаза
GSH RI	глутатион редокс индекс
G-SR	коњугат електрофилног супстрата и глутатиона
GSSG	оксидовани глутатион
GST	глутатион-S-трансфераза
H <sub>2</sub> O	вода
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	водоник пероксид
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	хидропероксил радикал
Hb	хемоглобин
HCl	хлороводонична киселина
Hct	хематокрит
HRPO	пероксидаза рена (енг. <i>Horseradish Peroxidase</i> )
HSA	хумани серум албумин
IgM	имуноглобулин M
IL-1	интерлеукин-1
K	калијум
KCN	калијум цијанид
L <sup>•</sup>	липидни радикал
LD <sub>50</sub>	средња летална доза 50 %
LDH	лактат дехидрогеназа
LH	незасићена масна киселина
LO <sup>•</sup>	липидни алкоксил радикал
LOH	липидни алдехид
LOO <sup>•</sup>	липидни пероксил радикал
LOOH	липидни хидропероксид
LOX	лизил оксидаза
LPH	лактаза-флоризин хидролаза
LPO	липидни пероксиди
Lym	лимфоцити
MAO	моноамино-оксидаза
MCH	просечна количина хемоглобина по еритроциту (енг. <i>Mean Cell Hemoglobin</i> )
MCHC	просечна концентрација хемоглобина у еритроцитима (енг. <i>Mean Cell Hemoglobin Concentration</i> )
MCT	мембрански транспортер монокарбоксилата
MCV	просечни волумен еритроцита (енг. <i>Mean Cell Volume</i> )
MDA	малондиалдехид
Mg	магнезијум

---

---

Mn	манган
Mn SOD	манган садржавајућа супероксид-дисмутаза
Mon	моноцити
MPV	просечни волумен тромбоцита (енг. <i>Mean Platelet Volume</i> )
MT	металотионеини
Na	натријум
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	натријум карбонат
NADH	редуковани никотинамид аденин динуклеотид
NADP <sup>+</sup>	оксидовани никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NADPH	редуковани никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	натријум дихидроген фосфат
NaHCO <sub>3</sub>	натријум бикарбонат
NaN <sub>3</sub>	натријум азид
NaOH	натријум хидроксид
NBT	нитроблу-тетразолијум
NED	N-(1-нафтил)етилендиамин дихидрохлорид
NF-κB	нуклеарни фактор <i>κ</i> B
-NH <sub>2</sub>	амино група
NO	азот оксид
NO <sup>•</sup>	азот оксид радикал
NO <sup>+</sup>	нитрозил катјон
NO <sup>-</sup>	нитроксил анјон
N <sub>2</sub> O	азот субоксид
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	нитрит јон
NOAEL	доза без штетних ефеката (енг. <i>No observed adverse effect level</i> )
non-CP-bound-Cu	бакар независан за церулоплазмин
non-Se GSH-Px	селен независна глутатион-пероксидаза
NOS	азот оксид синтетаза
O <sub>2</sub>	молекуларни кисеоник
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	супероксид анјон радикал
O <sub>3</sub>	озон
-OH	хидроксилна група
OH-	хидроксилни јон
OH <sup>•</sup>	хидроксил радикал
ONOO <sup>-</sup>	пероксинитрит
PCA	перхлорна киселина
Pct	тромбоцит
PDW	ширина дистрибуције тромбоцита по волумену (енг. <i>Platelet Distribution Width</i> )
PGE <sub>2</sub>	простагландин E <sub>2</sub>
PH GSH-Px	фосфолипид хидропероксид глутатион-пероксидаза
Phos	укупни фосфати
Plt	тромбоцити (енг. <i>Platelet</i> )
PRS	раствор фенол црвено (енг. <i>Phenol red solution</i> )
PUFA	полинезасићене масне киселине (енг. <i>Polyunsaturated fatty acids</i> )
QE	кверцетин (енг. <i>Quercetin</i> )

---

---

R <sup>•</sup>	органски радикал
RBC	еритроцити (енг. <i>Red blood cells</i> )
RDW	ширина дистрибуције еритроцита по волумену (енг. <i>Red Cell Distribution Width</i> )
RNS	реактивне врсте азота (енг. <i>Reactive nitrogen species</i> )
RO <sup>•</sup>	алкоксил радикал
RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	пероксил радикал
ROH	алкохол
ROOH	органски пероксид
ROS	реактивне врсте кисеоника (енг. <i>Reactive oxygen species</i> )
R-SSG	протеин-глутатион мешани дисулфид
R-X	електрофилни супстрат
Sco1/2	транспортер бакра за COX (енг. <i>Cytochrome c oxidase assembly protein</i> )
SDS	натријум додецил сулфат (енг. <i>Sodium dodecyl sulphate</i> )
Se	селен
Se GSH-Px	селен зависна глутатион-пероксидаза
SGLT-1	натријум зависни глукозни мембрански транспортер
SH	сулфхидрилна (тиолна) група
SOD	супероксид-дисмутаза
TBA	тиобарбитурна киселина
TCA	трихлорсирћетна киселина
TNF- $\alpha$	фактор $\alpha$ туморске некрозе (енг. <i>Tumour necrosis factor alpha</i> )
TP	укупни протеини
TT	телесна тежина
Ук SOD	укупна супероксид-дисмутаза
Vit C	аскорбинска киселина
WBC	леукоцити (енг. <i>White blood cells</i> )
WD	Вилсонова болест
WHO	Светска здравствена организација
Zn	цинк
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -глутамилцистеин-синтетаза

---

**Списак табела и графика**

- Табела 1.** Унос воде, телесна тежина животиња и тежина јетре у контролној и експерименталним групама
- Табела 2.** Вредности хематолошких параметара контролне и експерименталних група
- Табела 3.** Еритроцитни индекси контролне и експерименталних група
- Табела 4.** Број леукоцита и леукоцитарна формула контролне и експерименталних група
- Табела 5.** Број тромбоцита (Plt) и тромбоцитни индекси контролне и експерименталних група
- Табела 6.** Концентрације протеина, глукозе и холестерола у крви контролне и експерименталних група
- Табела 7.** Активности ензима јетре у крви контролне и експерименталних група
- Табела 8.** Концентрације електролита у крви контролне и експерименталних група
- Табела 9.** Концентрације реактивних врста кисеоника (ROS) и азота (RNS) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- Табела 10.** Концентрације липидних пероксида (LPO) у еритроцитима и у јетри контролне и експерименталних група
- Табела 11.** Концентрације редукованог глутатиона (GSH), оксидованог глутатиона (GSSG) и глутатион редокс индекс (GSH RI) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- Табела 12.** Активности ензима супероксид-дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- Табела 13.** Активности ензима глутатион циклуса у еритроцитима контролне и експерименталних група
- Табела 14.** Концентрације неензимских компоненти AOS у јетри контролне и експерименталних група
- Табела 15.** Активности супероксид-дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у јетри контролне и експерименталних група
- Табела 16.** Активности ензима глутатион циклуса у јетри контролне и експерименталних група
- Табела 17.** Концентрације бакра у плазми и јетри контролне и експерименталних група
- Табела 18.** Концентрације церулоплазмина у плазми и јетри и концентрације укупних протеина у јетри контролне и експерименталних група
- График 1.** Почетна и коначна телесна тежина животиња контролне и експерименталних група
- График 2.** Број еритроцита (RBC) у крви контролне и експерименталних група
- График 3.** Концентрација хемоглобина у крви контролне и експерименталних група
- График 4.** Хематокрит контролне и експерименталних група
- График 5.** Број леукоцита (WBC) у крви контролне и експерименталних група
- График 6.** Леукоцитарна формула контролне и експерименталних група
- График 7.** Број тромбоцита (Plt) у крви контролне и експерименталних група
- График 8.** Ширина дистрибуције тромбоцита по волумену (PDW) у крви контролне и експерименталних група
- График 9.** Концентрације глукозе у крви контролне и експерименталних група
- График 10.** Концентрације холестерола у крви контролне и експерименталних група
-



- График 11.** Активност аспартат аминотрансферазе (AST) и аланин аминотрансферазе (ALT) у крви контролне и експерименталних група
- График 12.** Активност алкалне фосфатазе (ALP) у крви контролне и експерименталних група
- График 13.** Активност гама-глутамил транспептидазе (GGT) у крви контролне и експерименталних група
- График 14.** Активност лактат дехидрогеназе (LDH) у крви контролне и експерименталних група
- График 15.** Концентрације калијума (K) у крви контролне и експерименталних група
- График 16.** Концентрације натријума (Na) у крви контролне и експерименталних група
- График 17.** Концентрације калцијума (Ca) у крви контролне и експерименталних група
- График 18.** Концентрације гвожђа (Fe) у крви контролне и експерименталних група
- График 19.** Концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у крви контролне и експерименталних група
- График 20.** Концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) у крви контролне и експерименталних група
- График 21.** Концентрације нитрита ( $NO_2^-$ ) у крви контролне и експерименталних група
- График 22.** Концентрације липидних пероксида (LPO) у крви контролне и експерименталних група
- График 23.** Концентрације липидних пероксида (LPO) у јетри контролне и експерименталних група
- График 24.** Концентрације редукованог глутатиона (GSH) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- График 25.** Концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- График 26.** Глутатион редокс индекс (GSH RI) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- График 27.** Активности супероксид-дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- График 28.** Активности глутатион-пероксидазе (GSH-Px) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- График 29.** Активности глутатион-редуктазе (GR) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- График 30.** Активности глутатион-S-трансферазе (GST) у еритроцитима контролне и експерименталних група
- График 31.** Концентрације аскорбинске киселине (Vit C) у јетри контролне и експерименталних група
- График 32.** Концентрације редукованог глутатиона (GSH) у јетри контролне и експерименталних група
- График 33.** Концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) у јетри контролне и експерименталних група
- График 34.** Глутатион редокс индекс (GSH RI) у јетри контролне и експерименталних група
- График 35.** Активност укупне супероксид-дисмутазе (Ук. SOD) у јетри контролне и експерименталних група
-

- График 36.** Активност манган садржавајуће супероксид-дисмутазе (MnSOD) и бакар, цинк садржавајуће супероксид-дисмутазе (CuZnSOD) у јетри контролне и експерименталних група
- График 37.** Активност каталазе (CAT) у јетри контролне и експерименталних група
- График 38.** Активност глутатион-пероксидазе (GSH-Px) у јетри контролне и експерименталних група
- График 39.** Активност глутатион-редуктазе (GR) у јетри контролне и експерименталних група
- График 40.** Активност глутатион-S-трансферазе (GST) у јетри контролне и експерименталних група
- График 41.** Концентрација укупног бакра у плазми контролне и експерименталних група
- График 42.** Концентрација бакра неvezаног за церулоплазмин (non-CP-bound Cu) у плазми контролне и експерименталних група
- График 43.** Концентрација укупног бакра у јетри контролне и експерименталних група
- График 44.** Концентрација бакра неvezаног за церулоплазмин (non-CP-bound Cu) у јетри контролне и експерименталних група
- График 45.** Концентрација церулоплазмине у плазми контролне и експерименталних група
- График 46.** Концентрација церулоплазмине у јетри контролне и експерименталних група
- График 47.** Концентрација укупних протеина у јетри контролне и експерименталних група
-

---

## ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И ЕПИКАТЕХИНА НА ОКСИДАТИВНО-АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС ПАЦОВА ТРЕТИРАНИХ БАКАР(II)-ЈОНОМ

Бакар као есенцијални микроелемент има важну улогу у биолошким системима међутим, повећане концентрације могу да изазову токсичне ефекте. Као прелазни метал, бакар може да стимулише продукцију реактивних врста кисеоника преко *Fenton*-ове и *Haber-Weiss*-ове реакције и доведе до оксидативних оштећења биомолекула у ткивима, пре свега у јетри која учествује у његовом метаболизму.

Флавоноиди су природна биљна полифенолна једињења која показују широк спектар биолошке активности. Антиоксидативна својства могу да испоље различитим механизмима, у директној реакцији са реактивним врстама или хелацијом јона прелазних метала, који би у даљим реакцијама произвели реактивне врсте.

Циљ истраживања ове докторске дисертације је испитивање ефеката субхроничне интоксикације бакром на хематолошко-биохемијске параметре у крви, оксидативни метаболизам еритроцита и параметре оксидативног стреса у јетри пацова. Такође, циљ је и испитивање протективног капацитета и синергистичког деловања флавоноида кверцетина (QE) и епикатехина (EC), као чистих супстанци, у условима оксидативног стреса. Упоредивани су и ефекти примењених флавоноида и комерцијалног лека D-пенициламина (DPA), тиолног једињења које се користи за третман обољења чији је узрок повећано акумулирање бакра у ткивима (Вилсонова болест).

Студија је изведена на мужјацима пацова соја *Wistar albino*, 8 недеља старости на почетку експеримента, насумично подељених у 5 група по 7 животиња: (1) контролна (0.3 ml физиолошког раствора, *i.p.*); (2) третирана бакром ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  у концентрацији од 560 mg/L) преко воде за пиће у трајању од 5 недеља; (3) третирана бакром (на начин описан претходно) и DPA (50 mg/kg ТТ, у 0.3 ml редестиловане воде, *i.p.*) сваког другог дана током последње 2 недеље експеримента (укупно 5 инјекција); (4) третирана бакром (на начин описан претходно), а затим флавоноидима QE и EC (40 mg QE/kg ТТ + 40 mg EC/kg ТТ, у 0.3 ml редестиловане воде, *i.p.*) сваког трећег дана током последње 3 недеље експеримента (укупно 7 инјекција); (5) третирана флавоноидима QE и EC (на начин описан претходно). У пуној крви одређивани су хематолошки параметри: број еритроцита (RBC), концентрација хемоглобина (Hb), хематокрит (Hct), број леукоцита (WBC), број тромбоцита (Plt), хематолошки индекси, и биохемијски параметри: концентрације електролита (K, Na, Ca, Fe, фосфата), концентрације укупних протеина, албумина, глукозе и укупног холестерола, активности ензима аспартат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP), гама-глутамил транспептидазе (GGT) и лактат дехидрогеназе (LDH). У лизату еритроцита, применом стандардних аналитичких метода, одређивани су маркери оксидативног стреса: концентрације липидних пероксида (LPO), концентрације реактивних врста кисеоника и азота (супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )), концентрације редукованог (GSH) и

---

---

оксидованог глутатиона (GSSG) и активности ензима супероксид-дисмузе (SOD), каталазе (CAT), глутатион-пероксидазе (GSH-Px), глутатион-редуктазе (GR), глутатион-S-трансферазе (GST). У изолованом ткиву јетре, након хомогенизације, применом стандардних аналитичких метода такође је одређен редокс статус (концентрације LPO, неензимских антиоксиданата GSH, GSSG и Vit C, и активности ензима AOS: укупне SOD, CuZn SOD, Mn SOD, CAT, GSH-Px, GR и GST). Концентрације бакра и церулоплазмينا одређене су у плазми и супернатанту ткива јетре.

Резултати истраживања показују да бакар у субхроничном третману испољава директан прооксидативни ефекат на еритроците и ткиво јетре пацова и показује значајне токсичне ефекте на хематолошко-биохемијске процесе у крви. Субхронична интоксикација бакром доводи до повећања LPO у еритроцитима и ткиву јетре, узрокује хемолизу еритроцита и анемију, пораст укупног холестерола, поремећај хомеостазе електролита. Након субхроничне интоксикације бакром повишене су активности ензима AST, ALT, ALP, GGT и LDH, маркера цитотоксичности јетре у серуму. Оксидативним оштећењима еритроцита и ткива јетре доприноси повећана продукција  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  и смањење неензимских антиоксиданата, ћелијског пула GSH и Vit C. Промене у активностима ензима AOS после субхроничне интоксикације бакром такође указују на појаву оксидативног стреса у еритроцитима и ткиву јетре.

Флавоноиди QE и EC показују антиоксидативну способност и умањују оксидативни стрес настао након субхроничног излагања бакру. QE и EC стабилизују мембране, блокирају липидну пероксидацију и тиме играју улогу у ублажавању манифестација токсичности у еритроцитима и ткиву јетре. Значајно повећавају концентрације неензимских антиоксиданата GSH и Vit C у ћелијама, индукују синтезу ензима AOS, чиме доприносе повећању антиоксидативног капацитета ћелија. Синергистичко деловање флавоноида QE и EC, као и цитопротективна улога коју показују, може се приписати њиховој способности да хелирају метале и/или уклањају  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ .

Резултати такође показују да су QE и EC ефективнији у антиоксидативном деловању у поређењу са DPA, који поред ефикасности у хелирању метала испољава и прооксидативне ефекте повећањем липидне пероксидације у еритроцитима и ткиву јетре.

Ово истраживање представља допринос комплетирању научних сазнања о токсичним ефектима бакра, као и комплексности протективног деловања флавоноида кверцетина и епикатехина на оксидативно-антиоксидативни статус еритроцита и ћелија ткива јетре. Због широког спектра биохемијских и фармаколошких дејстава, посебно треба истакнути значај испитиваних флавоноида у здравој исхрани, као и у превенцији и терапији многих обољења.

---

## EFFECTS OF QUERCETIN AND EPICATECHIN ON OXIDATIVE-ANTIOXIDATIVE STATUS OF RATS TREATED WITH COPPER(II)- IONS

Copper is an essential trace element that plays an important role in biological systems, however, the increased concentration may cause toxic effects. As the transition metal, copper may stimulate the production of reactive oxygen species by *Fenton's* and *Haber-Weiss* reaction and lead to oxidative damage of biomolecules in the tissues, especially in the liver, which participates in its metabolism.

Flavonoids are a natural plant polyphenol compounds which exhibit a wide spectrum of biological activity. They may exert antioxidant properties through different mechanisms, in a direct reaction with a reactive species, or by chelating transition metal ions, which in a further reaction may produce reactive species.

The effects of subchronic copper intoxication on haematological and biochemical parameters in blood, oxidative metabolism of erythrocytes and oxidative stress parameters in rat liver are objectives of this dissertation research. The aim is also to examine the protective capacity and synergistic effects of flavonoids quercetin (QE) and epicatechin (EC), as a pure substances, under oxidative stress conditions. We also compared the effects of these flavonoids and a commercial drug D-penicillamine (DPA), a thiol compound used for the treatment of diseases caused by an increased accumulation of copper in the tissues (Wilson's disease).

The study was performed on male *Wistar albino* rats, 8 weeks old at the beginning of the experiment, randomly divided into 5 groups of 7 animals: (1) control (0.3 ml of saline, *i.p.*); (2) copper-treated ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  at a concentration of 560 mg/L) through drinking water for 5 weeks; (3) treated with copper (as described previously), and DPA (50 mg/kg body weight in 0.3 ml of re-distilled water, *i.p.*) every other day during the last 2 week of the experiment (total number of injections were 5); (4) treated with copper (as described above), and flavonoids QE and EC (40 mg QE/kg body weight + 40 mg EC/kg body weight, in 0.3 ml of re-distilled water, *i.p.*) every third day during the last 3 weeks of the experiment (total number of injections were 7); and (5) treated with flavonoids QE and EC (as described previously). Hematological parameters: erythrocyte count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Hct), leukocyte count (WBC), platelet count (Plt), hematological indices, and biochemical parameters: concentration of electrolytes (K, Na, Ca, Fe, phosphate), total protein, albumin, glucose, and total cholesterol, the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured in the whole blood. Markers of oxidative stress: lipid peroxidation (LPO), the concentration of reactive oxygen and nitrogen species (superoxide anion radicals ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )), reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) concentrations, and activities of superoxide-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), and glutathione-S-transferase (GST) were determined in the erythrocyte lysate using standard analytical methods. In isolated liver tissue

---

after homogenization, the redox status (LPO concentration, GSH, GSSG and Vit C concentration, and the activities of AOS enzymes: total SOD, CuZn SOD, Mn SOD, CAT, GSH-Px, GR, and GST) was also determined using standard analytical methods. The concentrations of copper and ceruloplasmin were determined in the plasma and in the liver tissue supernatant.

The results show that copper in subchronic treatment exerts a direct pro-oxidative effect on erythrocytes and liver tissue of rats and significant toxic effects on haematological and biochemical processes in the blood. Subchronic intoxication with copper leads to an increase in LPO in liver tissue and in erythrocytes, causes haemolysis and anemia, increase in total cholesterol, electrolyte homeostasis disbalance. After subchronic copper intoxication activities of cytotoxicity liver markers AST, ALT, ALP, GGT, and LDH, in the serum were elevated. Increased production of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  and the reduction of non-enzymatic antioxidants, GSH and Vit C, contribute to oxidative damage in red blood cells and liver tissue. Changes in the activities of the AOS enzymes after subchronic intoxication with copper also indicated the occurrence of oxidative stress in erythrocytes and liver tissue.

Flavonoids QE and EC exhibit antioxidant capacity and reduce oxidative stress occurring after subchronic copper exposure. QE and EC stabilize the membrane, blocking the lipid peroxidation, and thereby play a role in mitigating the manifestation of toxicity in the erythrocytes and liver tissue. They significantly increase the concentration of non-enzymatic antioxidants GSH and Vit C in cells, induce synthesis of the AOS enzymes, thus contributing to increase the cells antioxidant capacity. The synergistic action of the flavonoids QE and EC, and a cytoprotective role which they exert, can be attributed to their ability to chelate metal ions and/or remove  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ .

The results also show that QE and EC were more effective in antioxidant activity when compared with the DPA, which in addition to the efficiency of chelating metal ions exerts prooxidant effects, by increasing lipid peroxidation in erythrocytes and liver tissue.

This research is a contribution to the scientific knowledge of the toxic effects of copper, as well as the complexity of the protective effect of flavonoids quercetin and epicatechin in the oxidative-antioxidant status of red blood cells and liver tissue cells. Considering their wide range of biochemical and pharmacological effects, we should point out to the importance of the flavonoids in a healthy diet, as well as in the prevention and treatment of many diseases.

---

---

<b>1. УВОД</b> .....	1
1.1. БАКАР.....	2
1.1.1. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ.....	2
1.1.2. ФИЗИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ БАКРА.....	2
1.1.3. МЕТАБОЛИЗАМ БАКРА.....	5
1.1.4. ИЗЛОЖЕНОСТ БАКРУ У ЖИВОТНОЈ СРЕДИНИ.....	9
1.2. D-ПЕНИЦИЛАМИН.....	11
1.3. РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ КИСЕОНИКА И АЗОТА.....	12
1.3.1. СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ ( $O_2^{\bullet -}$ ).....	14
1.3.2. ВОДНИК ПЕРОКСИД ( $H_2O_2$ ).....	15
1.3.3. ХИДРОКСИЛ РАДИКАЛ ( $\bullet OH$ ).....	16
1.3.4. АЗОТ ОКСИД (NO).....	17
1.3.5. ПЕРОКСИНИТРИТИ ( $ONOO^{\bullet -}$ ).....	18
1.3.6. БИОЛОШКИ ЕФЕКТИ РЕАКТИВНИХ ВРСТА.....	19
1.3.6.1. Оксидативна оштећења биомолекула.....	20
1.4. СИСТЕМ ЗАШТИТЕ ОД ОКСИДАТИВНИХ ОШТЕЋЕЊА.....	22
1.4.1. НЕЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ СИСТЕМА АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ.....	23
1.4.1.1. Глутатион (GSH).....	23
1.4.1.2. Аскорбинска киселина (Vit C).....	25
1.4.1.3. Церулоплазмин (CP).....	26
1.4.2. ЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ СИСТЕМА АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ.....	27
1.4.2.1. Супероксид-дисмутаза (SOD).....	27
1.4.2.2. Каталаза (CAT).....	28
1.4.2.3. Глутатион-пероксидаза (GSH-Px).....	28
1.4.2.4. Глутатион-редуктаза (GR).....	29
1.4.2.5. Глутатион-S-трансфераза (GST).....	30
1.5. ФЛАВОНОИДИ.....	32
1.5.1. КВЕРЦЕТИН.....	34
1.5.2. ЕПИКАТЕХИН.....	35
1.5.3. МЕТАБОЛИЗАМ ФЛАВОНОИДА.....	36
1.5.4. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ ФЛАВОНОИДА.....	41
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	43
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	46
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ.....	47
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ТРЕТМАН.....	47
3.3. ЖРТВОВАЊЕ ЖИВОТИЊА И ПРИПРЕМА УЗОРАКА.....	48
3.4. АНАЛИТИЧКЕ МЕТОДЕ.....	49
3.4.1. ХЕМАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ.....	49
3.4.2. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ.....	49
3.4.3. АНАЛИЗЕ БИОМАРКЕРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА.....	50
3.4.3.1. Одређивање концентрација ROS и RNS у лизату еритроцита.....	50
3.4.3.1.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet -}$ ).....	51
3.4.3.1.2. Одређивање концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ ).....	51

---

---

3.4.3.1.3. Одређивање концентрације нитрита ( $NO_2^-$ ).....	52
3.4.3.2. Одређивање концентрације липидних пероксида (LPO) у еритроцитима и ткивима.....	53
3.4.4. АНАЛИЗЕ НЕЕНЗИМСКИХ КОМПОНЕНТИ АОС.....	54
3.4.4.1. Одређивање концентрације GSH.....	55
3.4.4.2. Одређивање концентрације GSSG.....	57
3.4.4.3. Одређивање концентрације аскорбинске киселине (Vit C) у ткивима.....	57
3.4.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ ЕНЗИМА АОС.....	59
3.4.5.1. Одређивање концентрације хемоглобина (Hb) у еритроцитима.....	60
3.4.5.2. Одређивање концентрације протеина у ткивима.....	60
3.4.5.3. Одређивање активности SOD.....	61
3.4.5.4. Одређивање активности САТ.....	63
3.4.5.5. Одређивање активности GSH-Px.....	64
3.4.5.6. Одређивање активности GR.....	66
3.4.5.7. Одређивање активности GST.....	67
3.4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ БАКРА.....	68
3.4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА (CP).....	68
3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА И ПРИКАЗ РЕЗУЛТАТА.....	69
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>70</b>
4.1. УНОС ВОДЕ И ТЕЛЕСНА ТЕЖИНА ЖИВОТИЊА.....	71
4.2. ПРОМЕНЕ ХЕМАТОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА.....	73
4.3. ПРОМЕНЕ У МЕТАБОЛИЗМУ ПРОТЕИНА, ГЛУКОЗЕ И ЛИПИДА.....	81
4.4. БИОМАРКЕРИ ОШТЕЋЕЊА ЈЕТРЕ.....	83
4.5. ПРОМЕНЕ У ХОМЕОСТАЗИ ЕЛЕКТРОЛИТА.....	86
4.6. БИОМАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА.....	89
4.6.1. БИОМАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ЕРИТРОЦИТИМА.....	89
4.6.2. БИОМАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ЈЕТРИ.....	92
4.7. ЕФЕКТИ НА СИСТЕМ АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ (АОС).....	94
4.7.1. ЕФЕКТИ НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ ГЛУТАТИОНА У ЕРИТРОЦИТИМА.....	94
4.7.2. ЕФЕКТИ НА АКТИВНОСТИ ЕНЗИМА АОС У ЕРИТРОЦИТИМА.....	96
4.7.3. ЕФЕКТИ НА НЕЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ АОС У ЈЕТРИ.....	100
4.7.4. ЕФЕКТИ НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АОС У ЈЕТРИ.....	104
4.8. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ БАКРА И ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА.....	109
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>116</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>151</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>156</b>

---



## **1. УВОД**

## **1.1. БАКАР**

### **1.1.1. РАСПРОСТРАЊЕНОСТ**

Бакар (Cu) је метал Iб групе периодног система. Заступљен је у Земљиној кори у количини од 55 ppm-а (енг. *parts per milion*) у виду минерала халкопирита, халкозина и других. Масовно се употребљава за производњу електричних проводника, као и у електроници. У грађевинарству се користи као кровни покривач и за израду олука и као материјал за облагање фасада. Налази се у саставу водоводних цеви и цеви централног грејања. Једињења бакра користе се у производњи азо боја, за гравирање, литографију, рафинерије нафте и пиротехнику. Користе се у изради посуђа, због своје дуготрајности, добре топлотне проводљивости, али и смањењу раста колиформних бактерија, чиме се умањује могућност тровања храном. Соли бакра користе се у пољопривреди као алгициди, пестициди и фунгициди, захваљујући биоцидном дејству. Додају се ђубривима за поспешивање раста биљака, а користе се и као адитиви у животињској храни, за раст и развој животиња (WHO, 2004).

### **1.1.2. ФИЗИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ БАКРА**

Биохемијска улога бакра је углавном каталитичка, јер је интегрални део металоензима који делују као оксидазе. Кофактор је ензима који учествују у оксидо-редукционим процесима, међу којима су цитохром оксидаза, лизил оксидаза, допамин хидроксилаза, супероксид-дисмутаза, тирозиназа, оксидаза аскорбинске киселине и церулоплазмин (Goodman и сар., 2004; Ferenci, 2004; Kodama и Fujisawa, 2009).

Као есенцијални микроелеменат учествује у бројним биолошким процесима неопходним за нормалан раст и развој организма. Остварује улоге у процесима оксидативне фосфорилације, еритропозе, антиоксидативне заштите ћелија и утиче на метаболизам глукозе и холестерола. Потребан је за правилан развој нервног система, синтезу катехоламина и меланина, развој и одржавање крвних судова, синтезу колагена и еластина.

Као интегрални део цитохром *c*-оксидазе (COX, EC 1.9.3.1), терминалног ензима респираторног електрон-транспортног ланца, има важну улогу у стварању енергије у

ћелији. Ензим COX неопходан је за синтезу фосфолипида ћелијске мембране и мијелинизацију аксона нервне ћелије, чиме се одржава интегритет нервног система.

Хомеостаза бакра је блиско повезана са хомеостазом гвожђа. Церулоплазмин (CP) је гликопротеин који везује од 60 до 95 % укупног серумског бакра. Синтезише се у хепатоцима и секретује као холопротеин са 6 атома бакра. CP (*EC 1.16.3.1*) је бакар зависна оксидаза која делује као фероксидаза односно, катализује оксидацију феро ( $Fe^{2+}$ , Fe(II)) у фери ( $Fe^{3+}$ , Fe(III)) јон у еритропоези (Hellman и Gitlin, 2002; Patel и сар., 2002). Ферокинетичке студије показују критичну улогу CP у одређивању стопе ефлукса гвожђа из ретикулоендотелног система и других типова ћелија у којима се гвожђе складишти (Harris и сар., 1999).

Недостатак бакра умањује ресорпцију гвожђа код животиња и људи (Reeves и DeMars, 2004; Chirulescu и сар., 1990). Такође, показано је да животиње са дефицитом бакра немају одговарајући ниво COX па је умањена синтеза хема (Cizewski Culotta и Gitlin, 2001). Дефицијенцију бакра карактерише анемија као последица поремећаја у метаболизму гвожђа и синтези хемоглобина.

Бакар је важан у стварању имуног одговора на инфекције и неопходан за сазревање и функционисање Т-ћелија. У току запаљенског процеса или инфекције долази до мобилизације супероксид-дисмутазе и CP. Две форме супероксид-дисмутазе (SOD) су присутне у сисарским ћелијама, манган садржавајућа (Mn SOD) и бакар, цинк SOD (CuZn SOD), (Harris, 1997). Оба ензима одговорна су за одбрану против оксидативних оштећења од стране супероксид анјон радикала.

Допамин β-хидроксилаза (DBH) (*EC 1.14.17.1*) је ензим који врши конверзију допамина у норепинефрин, неуротрансмитер који учествује у преношењу нервних импулса. Студија на мишевима са недостатком ензима DBH, показала је да су били осетљивији на инфекцију и имали су ослабљену функцију Т-ћелија, и продукцију Th1 цитокина, што говори да физиолошка продукција катехоламина (норепинефрина и епинефрина) има улогу у модулацији имунитета (Alaniz и сар., 1999). Неколико поремећаја ЦНС-а који укључују атаксију, тремор, хипо или демјелинизацију су последице недостатка бакра. Паркинсонова болест, тремор, моторни поремећаји се јављају услед недостатака допамина.

Бакар је укључен у метаболизам глукозе, масти и холестерола, као и функционисање инсулина (Petering и сар., 1977; Olivares и Uauy, 1996).

Тирозиназа (*EC 1.14.18.1*), оксидаза одговорна за продукцију меланина (природног пигмента који се налази у коси и кожи) од тирозина, такође садржи бакар у активном центру (Korner и Pawelek, 1982). Један од првих знакова дефицита бакра код животиња је губитак боје услед поремећаја метаболизма тирозина који је претеча меланина.

Оксидазе амина (АО) су ензими који катализују оксидацију бројних биогених амина укључујући неуротрансмитере и хистамине. Бакар садржавајућа АО или хистаминаза (*EC 1.4.3.6*) катализује оксидативну деаминацију примарних амина до алдехида уз ослобађање амонијака и водоник пероксида и захтева бакар за своје функционисање. АО код еукариота делује на диференцијацију ћелија и раст, зарастање рана, детоксикацију и ћелијску сигнализацију (Kumar и сар., 1996).

Бакар је неопходан за развој и одржавање везивног ткива, коже, костију и зглобова и крвних судова. Лизил оксидаза (*EC 1.4.3.13 LOX*) је екстрацелуларни ензим који учествује у синтези и формирању унакрсних веза између колагена и еластина што је од суштинског значаја за стабилизацију колагених влакана, формирање флексибилности и јачање везивног ткива. Редукција активности овог ензима, услед дефицита бакра, одговорна је за скелетне и срчане абнормалности (Kagan и Li, 2003).

Бакар утиче на функционисање мишића крвних судова и неопходан је за активацију ендотелијалних ћелија јер стимулише њихову пролиферацију и миграцију.

Бакар је неопходан за нормалан раст и развој људских фетуса, новорођенчади и деце. Детињство представља један од најкритичнијих периода у погледу потреба за бакром, јер брзи раст повећава захтеве, а исхрана на бази млека не подмирује растуће потребе организма за овим елементом (Arredondo и Nunez, 2005). Иако је недостатак већи проблем током ове фазе живота, постоји и висок ризик од токсичних ефеката бакра, услед недовољно развијених функција јетре и немогућношћу да се избори са већом количином бакра.

### 1.1.3. МЕТАБОЛИЗАМ БАКРА

Бакар се апсорбује, дистрибуира, акумулира и излучује у телу према сложеним хомеостатским процесима који обезбеђују константно и довољно снабдевање овим елементом. Ако се бакар у организам уноси у недовољним количинама, акумулирање бакра у јетри ће бити осиромашено. Недовољан унос и трошење из депоа јетре доводи до поремећаја здравственог стања. Такође, унос већих количина може имати штетне последице по здравље. Захваљујући хомеостатској регулацији, ниво бакра се одржава у стању равнотеже који задовољава потребе организма.

Бакар се као есенцијални елемент у човековом организму налази у малим количинама (75-150 mg) у различитим ћелијама и ткивима, са највећом концентрацијом у јетри, бубрезима, слезини, срцу, плућима, желуцу, коси и ноктима (Turnlund и сар., 1998). Нормалне концентрације бакра у серуму код људи варирају између 0.7 и 1.6  $\mu\text{g/ml}$ . Препоручен дневни унос (RDA, енг. *Recommended Dietary Allowance*) бакра за децу износи од 340 до 890  $\mu\text{g}$ , а за одрасле особе 900  $\mu\text{g}$  (у трудноћи и лактацији 1300  $\mu\text{g}$ ) (WHO, 2004). Најбогатији извори бакра у исхрани су јетра и месо, плодови мора, ораси и семенке, квасни хлеб, бели кромпир, парадајз, житарице, пасуљ и сочиво (WHO, 2004).

Хомеостаза бакра условљена је, пре свега, апсорпцијом у танком цреву и екскрецијом преко жучи. Апсорпција бакра из дигестивног тракта се креће од 15 до 97% у зависности од његовог садржаја у храни, облика, као и присуства других фактора који ометају његову апсорпцију. Цинк (Zn), манган (Mn) и кадмијум (Cd) су веома јаки антагонисти апсорпције бакра. Велике дозе гвожђа (Fe) такође могу смањити апсорпцију бакра, као и аскорбинска киселина (Vit C) која побољшава апсорпцију гвожђа. Такође и обрнуто, високе концентрације бакра доводе до дефицијенције гвожђа. Особе са хроничним дигестивним проблемима могу имати недостатак бакра, иако конзумирају намирнице које га садрже, услед немогућности апсорпције (Arredondo и Nunez, 2005). Код сисара апсорпција се одвија у желуцу и танком цреву, али постоје разлике у максималној апсорпцији између врста. Код пацова се апсорбује из желуца и дванаестопалачног црева, а код хрчка из нижих делова. Максимална апсорпција за људе није позната, али се претпоставља да се обавља у желуцу и горњем делу црева (WHO, 2004).

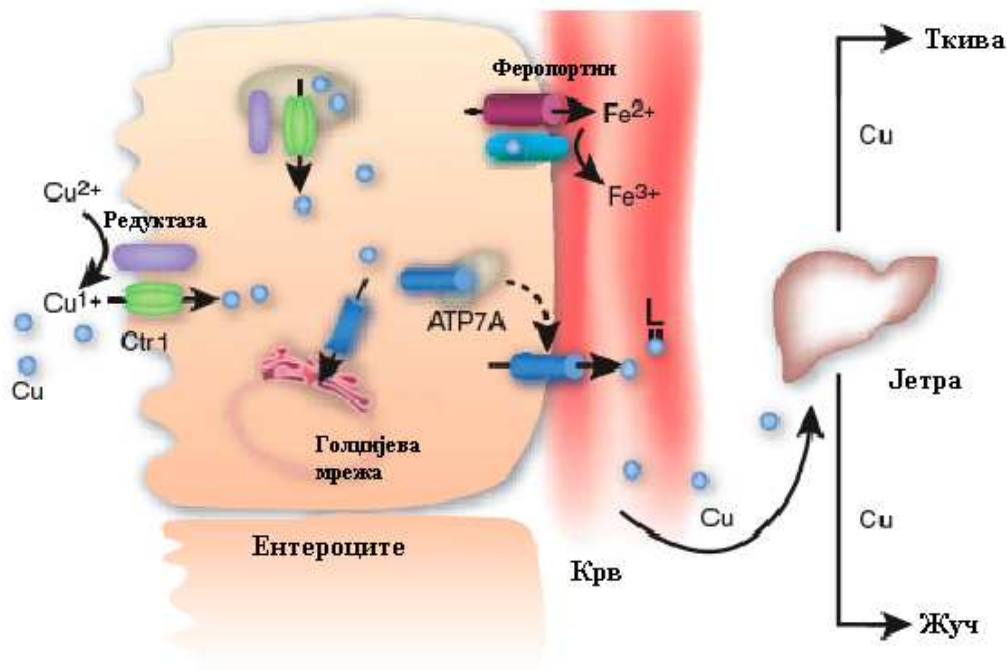
Око 35 % унетог бакра се апсорбује и транспортује, везан за албумине, преко порталне вене до јетре (Turnlund и сар., 1998). Јетра обрађује бакар на два начина. Први

укључује излучивање бакра путем жучи у гастроинтестинални тракт, из којег се даље не ресорбује. Други пут метаболизма бакра у јетри је његово уграђивање у церулоплазмин (СР), гликопротеин кога синтетишу хепатоците. СР са уграђеним бакром секретује се из хепатоцита у циркулацију. Око 95% укупног бакра у плазми везано је за СР, а осталих 5% за албумин или аминокиселине. Да би добиле бакар, ћелије периферних ткива преузимају СР и разлажу га. Са опадањем доступног бакра у јетри мање се СР излучује.

У биолошким системима бакар се претежно налази у облику бакар(II)-јона, с обзиром да, у присуству кисеоника или других акцептора електрона, бакар(I)-јон оксидује до бакар(II)-јона. Оксидација је реверзибилна јер бакар(II)-јон може да прими електрон од јаких редуктаната као што су аскорбат или редуковани глутатион (Arredondo и Nunez, 2005). Бакар(II)-јон прелази у бакар(I)-јон кроз бројне механизме и улази у ћелију преко трансмембранског транспортера СТР1, који припада породици купропротеина са високим афинитетом за пренос бакра (Wang и Guo, 2006) (Слика 1). СТР1 је присутан у јетри, бубрезима, срцу, цревима, док га најмање има у мозгу и мишићима. Cu(I)-везујући део на СТР1 су метионин и хистидин на N крају (Wang и Guo, 2006). Студије на мишевима показују да је СТР1 од суштинског значаја за опстанак ембриона сисара (Safaei и сар., 2004). Други транспортер бакра на апикалној мембрани ентероцита је DMT1 (енг. *divalent metal transporter 1*), који поред бакра преноси и гвожђе, манган и кадмијум (Arredondo и Nunez, 2005).

У ентероцитима бакар се везује за нискомолекулски протеин металотионеин (MT). Као такав улази у серум где се везује за аминокиселине, нарочито L-хистидин и серумски албумин (HSA). Претпоставља се да Cu(II)-HSA-Hys комплекс може бити главни за пренос Cu(II) до јетре. АТР7А одговорна је за транспорт бакра преко базолатералне мембране ентероцита (Слика 1). АТР-азе су класа мембранских протеина које служе за АТР-зависну фосфорилацију непроменљивих аспартатних остатака ради добијања енергије потребне за транспорт катјона кроз мембране. Ћелије сисара имају два структурно слична Р-типа АТР-аза које учествују у метаболизму бакра – АТР7А и АТР7В. АТР7А је изражена у цревном епителу, док је АТР7В највише изражена у јетри и бубрезима, а у мањој мери у мозгу и плаценти. Вишак бакра из ћелија већине ткива екскретује АТР7А, а у хепатоцитима ту улогу има АТР7В, која екскретује бакар у жуч. Такође, ови протеини снабдевају бакром ензиме који се секретују у ћелији, убацивањем

бабра у транс Голцијеву мрежу, где се уграђује у апоензиме. Поремећаји у функцији АТР7А узрокују Менкеову болест, док недостаци у АТР7В Вилсонову болест. Код обе болести резултат је прекомерна акумулације бабра у јетри, бубрезима или мозгу.



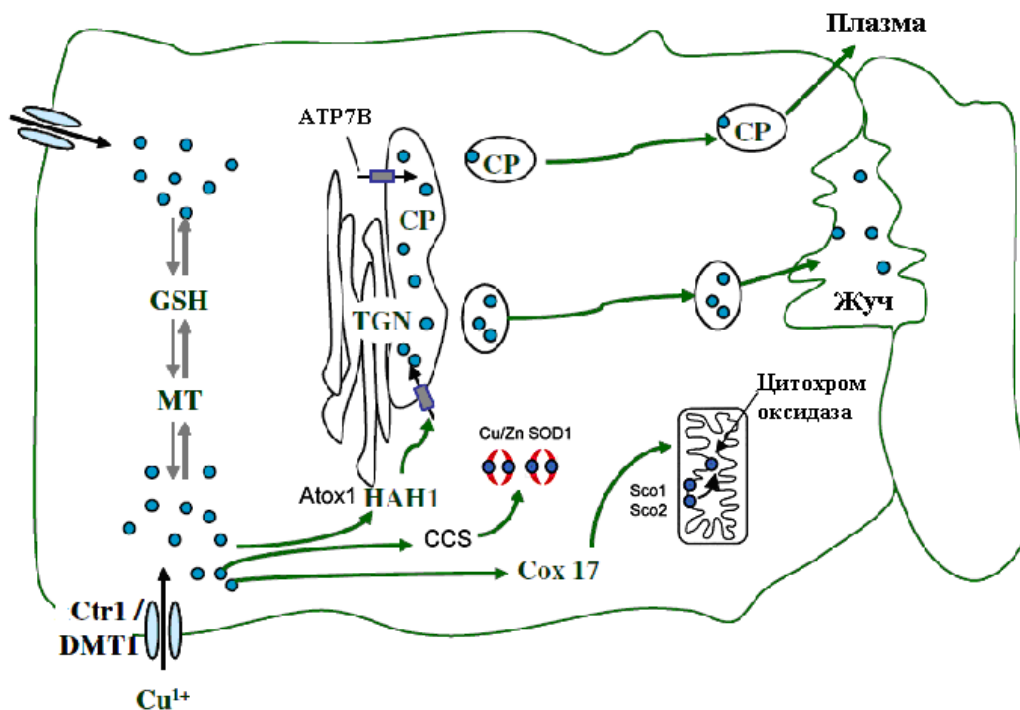
**Слика 1.** Транспорт бабра

Извор: <http://thielelab.duhs.duke.edu/> (модификовано)

Идентификовано је неколико гена и протеина укључених у транспорт бабра унутар и преко мембрана ћелија (Слика 2). Цитосолни Atox1 (НАН1 хомолог у хуманим ћелијама) везује и транспортује бакар на Р-тип АТР-аза у лумену Голцијеве мреже, где се бакар инкорпорира у апоцерулоплазмин или бакар зависне ензиме, лизил-оксидазу, тирозиназу, допамин-оксигеназу, у зависности од типа ћелије (Strausak и сар., 2003; Safaei и сар., 2004). Atox1/НАН1 такође допрема бакар преко АТР7В за секрецију из хепатоцита у жуч (Safaei и сар., 2004; Arredondo и Nunez, 2005).

Транспортер бабра за SOD (CCS) одговоран је за трансфер бабра цитосолној CuZn SOD и есенцијалан је за активацију овог ензима (Prohaska, 2008). Транспортер Cox17 предаје бакар транспортерима Cox11, Sco1 и Sco2 (Cytochrome *c*-oxidase assembly protein) у митохондријама који га даље преносе до цитохром *c*-оксидазе (Palumaa и сар., 2004;

Horn и Barrientos, 2008). Одређена количина бакра у ћелији везује се за цитосолне металотионеине (Sugawara и Sugawara, 1987).



Слика 2. Метаболизам бакра у хепатоцитама

Извор: Arredondo и Nunez, 2005 (модификовано)

Редуковани глутатион (GSH) присутан у ћелији у високој концентрацији, може да веже бакар и да га достави транспортеру CTR1 у плазма мембрани (Arredondo и Nunez, 2005). Cu(I)-GSH комплекс може да послужи као средство за пренос бакар(I)-јона до MT. Ранија истраживања су показала да инјекција бакра код пацова резултује смањењем нивоа GSH у јетри (Cartañà и сар., 1992), као и да је ниво GSH у ћелијама јетре пацова са дефицијенцијом бакра био у порасту. Међутим, ћелије са смањеним нивоом GSH имају спорију апсорпцију бакра из медија а самим тим и нижу концентрацију бакра. На основу овога, може се закључити да GSH и MT делимично учествују у контроли расподеле бакра.



#### 1.1.4. ИЗЛОЖЕНОСТ БАКРУ У ЖИВОТНОЈ СРЕДИНИ

Човек је утицају бакра изложен преко ваздуха, воде и земљишта, удисањем, узимањем хране и воде, и преко коже (Turnlund и сар., 1998). Присуство бакра у атмосфери потиче од дисперзије честица геолошког материјала расутих ветром и из индустријских емисија. Бакар се налази у површинским водама, у концентрацијама од 0,0005 до 1 mg/L, а судбина елементарног бакра у води је сложена. Оксидацијом бакра настају бакар(I) оксид или хидроксид. У већини случајева, бакар(I)-јон се оксидује до бакар(II)-јона, који представља најзаступљенији облик бакра у водама киселости до рН 6. Бакар(I) амонијум и бакар(I) хлорид комплекси су релативно стабилни у воденом раствору. Концентрације бакра у пијаћој води варирају у зависности од карактеристика вода, као што су рН, тврдоћа и доступности бакра у систему водоснабдевања. Концентрације бакра у води за пиће често расту током дистрибуције, посебно у системима са киселим рН или у високо-карбонатним водама (WHO, 2004).

Храна је главни извор излагања бакру за људе. Природна храна углавном обезбеђује потребну количину бакра и његове умерене концентрације не ремете хомеостазу. Међутим, накупљање бакра у количинама које превазилазе метаболичке потребе организма или поремећај у хомеостазу бакра могу да доведу до испољавања његових токсичних ефеката (Fuentalba и Aburto, 2003). Познато је да су редокс активни метали, попут бакра, у стању да индукују оксидативни стрес повећањем продукције слободних радикала који узрокују пероксидативну деградацију полинезасићених масних киселина у мембранским липидима и доводе до оштећења биомолекула (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Као последица повећане антропогене активности, тешки метали, међу којима и бакар, све су више заступљени у животној средини. Дуготрајна употреба воде за пиће са повећаном концентрацијом бакра може да представља потенцијални ризик за осетљиву популацију људи, попут деце и особа са генетским поремећајем метаболизма бакра (Brewer, 2000). Бакарне цеви за воду такође могу бити извор веће количине бакра. Људи могу да дођу у контакт са повећаном количином бакра конзумирајући храну, нарочито киселу, из бакарних судова. Конзумирање млека чуваног у кородираним бакарним судовима може да има штетне последице, нарочито на децу (Mir и сар., 2007). До акумулирања виших нивоа бакра у ћелијама и ткивима може да дође услед пушења,

употребе лекова који садрже бакар и оралних контрацептива са естрогенима (Mehta и Eikum, 1989).

Акутна изложеност високим концентрацијама бакра код људи може да доведе до иритације желуца и наузеје (Агауа и сар., 2004). Бакар сулфат је некада преписиван као еметик, али је ова употреба обустављена због негативних ефеката на здравље људи (WHO, 2004). Концентрације веће од 3 mg бакра/дневно у току дужег временског периода, или 10 mg/дневно током неколико недеља могу да доведу до токсичних симптома, као што су слабост, главобоља и мучнина.

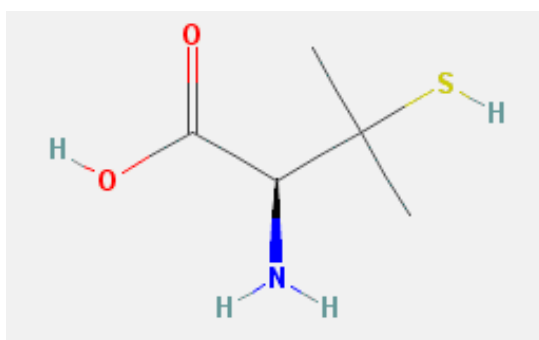
Бакар у вишку доводи до појаве психичких и неуролошких симптома (Scheinberg и Sternlieb, 1996). Присуство прекомерних концентрација бакра код деце повезано је са инфекцијама, хиперактивним понашањем, дислексијом, прекомерном стимулацијом или депресијом (Russo, 2010). Вишак бакра делује штетно на кардиоваскуларни систем, доводи до повишеног крвног притиска и промовише атеросклерозу (Iskra и Мајевски, 2000). Студија Leone и сар. (2006), показала је да повишене концентрације бакра, са нижим концентрацијама магнезијума и цинка у серуму, носе повећани ризик од смртности код средовечних мушкараца. Повећањем концентрације бакра нарочито је погођена јетра, с обзиром да је главни орган акумулације. Вишак бакра доводи до бројних обољења јетре, опструкције жучних путева и канцера јетре (Ferenci, 2004).

Прекомерно акумулирање бакра код људи може бити последица поремећаја метаболизма генетског порекла, као у случају Вилсонове болести (Patil и сар., 2013). Вилсонова болест (енг. *Wilson's Disease*) је ретко наследно обољење претежно младих људи, чији је узрок нефункционална АТР7В. Акумулирани бакар временом доводи до уништења хепатоцита и испољавања хепатичне форме болести у виду акутног хепатитиса, хроничног активног хепатиса и цирозе јетре и сметњи везаних за оштећење централног нервног система. Лек избора у третману ове болести је пенициламин и триен. Успешност терапије и прогноза болести зависе од препознавања симптома и тренутка када је лечење започето, посебно када је у питању хепатична форма болести.

## 1.2. D-ПЕНИЦИЛАМИН

D-Пенициламин (D-Penicillamine, DPA) је деградациони продукт антибиотика пеницилина. По хемијској структури је бета-диметил цистеин, односно 2-амино-3-метил-3-сулфанилбутаноична киселина (IUPAC), ( $C_5H_{11}NO_2S$ ), молекулске масе 149.212 g/mol (Слика 3).

DPA је хелирајући агенс који се користи у третману оболелих од Вилсонове болести за уклањање вишка бакра, (два молекула DPA везују један атом бакра) чиме се повећава његово излучивање урином (Brewer, 1995). Такође, користи се за смањење повећане екскреције цистина код цистинурије и лечење реуматоидног артритиса због имуносупресивног деловања које поседује.



Слика 3. Структура DPA

Izvor: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

DPA инхибира пролиферацију Т-лимфоцита, функцију макрофага, смањује секрецију интерлеукина 1 (IL-1), концентрацију имуноглобулина М (IgM) као реуматоидних фактора, али и спречава формирање унакрсних веза међу молекулима колагена. Пролиферација Т-лимфоцита инхибирана је вероватно захваљујући продукцији пероксида или деловању тиолних група. DPA се *in vitro* показао као инхибитор везивања активатор протеина (AP-1) за ДНК, а како је AP-1 важан транскрипциони активатор бројних гена цитокина и металопроотеиназа, овим би могле да се објасне његове анти-инфламаторне особине (Handel и сар., 1996). Други *in vitro* ефекти DPA укључују смањење продукције имуноглобулина од стране В-ћелија и инхибицију васкуларизације стимулисане од стране ендотелијалног фактора раста. У *in vivo* условима након третмана DPA примећен је пад концентрације имуноглобулина IgM и IgG у серуму (Chou и Panay,

1999). Ови аутори сматрају да оксидација DPA у присуству бабра води развоју ROS, водоник пероксида, који утиче на функцију Т лимфоцита, ендотелијалних ћелија и фибробласта.

Дуготрајном употребом или применом неадекватних доза, DPA може да испољи штетне ефекте на нервни и гастроинтестинални систем, везивно ткиво или хематопоезу. Појава лезија на кожи може да буде последица токсичног ефекта на везивна ткива или акутне сензитивне реакције, обзиром да је дериват пеницилина (Perrett, 1981; Kianoush и сар., 2012). Апластична анемија, тромбоцитопенија и леукоцитопенија такође могу бити изазване употребом DPA (Fishel и сар., 1989, UK/W/033/pdWS/001, 2006). Познато је да овај лек може да доведе до појаве аутоимуних болести као што су мијастенија гравис (енг. *myasthenia gravis*) (Drosos и сар., 1993) и системски лупус (енг. *systemic lupus erythematosus*) (Donnelly и сар., 1993). *In vitro*, DPA доводи до прекида у ДНК и липидне пероксидације мембрана (Yamanaka и сар., 1993). Третман појединим тиолима мале молекулске масе, међу којима и DPA, доводи до цитотоксичности и инхибиције раста ћелија код различитих типова канцера, као последица интеракције тиолних група са липидима, протеинима или ензимима. Узрок цитотоксичних ефеката може да буде и смањење металног кофактора за ензиме, с обзиром да DPA хелира бакар, или продукција ROS услед оксидација тиолних група (Wadhwa и Mumper, 2013).

### 1.3. РЕАКТИВНЕ ВРСТЕ КИСЕОНИКА И АЗОТА

Аеробним организмима неопходан је молекулски кисеоник ( $O_2$ ) за ефикасну производњу енергије у митохондријама. У молекуларном облику у коме се јавља у природи, кисеоник је слабо реактиван, захваљујући постојању два неспарена електрона са паралелним спином, па је везивање ограничено само на атоме или молекуле који имају електроне са антипаралелним спином (Valko и сар., 2007).

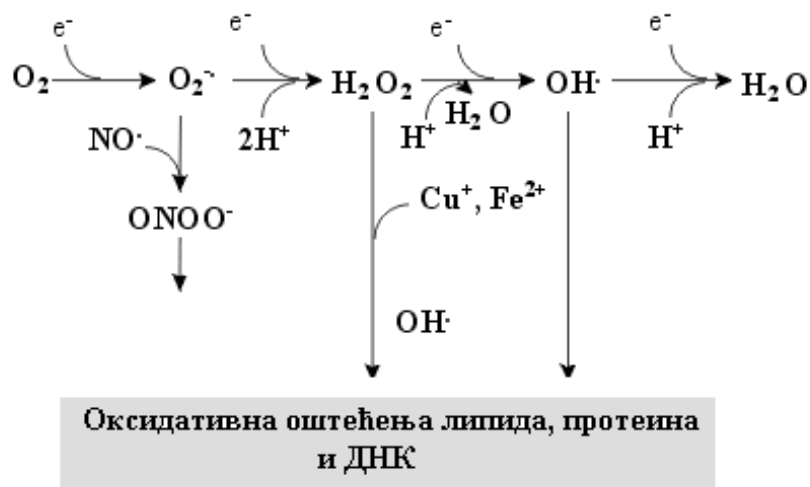
Током метаболичких процеса у ћелијама аеробних организама, највећи део молекулског кисеоника се редукује до воде. У овом процесу, који се одвија на унутрашњој мембрани митохондрија, каталитичком активношћу комплекса цитохром-оксидаза, молекул кисеоника везује 4 електрона:



Редукцијом кисеоника мањим бројем електрона или трансфером енергије настају делимично редуковани и високо реактивни метаболити – реактивне врсте кисеоника (енг. *reactive oxygen species*, ROS). У реактивне врсте убрајају се слободни радикали кисеоника, као и нерадикалске врсте које делују као оксидујући агенси или се лако конвертују у слободне радикале. Реактивне врсте су атоми, јони или молекули са једним или више неспарених електрона у својој структури, што их чини веома реактивним, па могу да реагују међусобно или са другим мање реактивним врстама и тиме изазову низ ланчаних реакција. У реакцијама са ћелијским конституентима продукују се секундарни и терцијарни слободни радикали из масти, аминокиселина, глутатиона, аскорбинске киселине и компоненти нуклеинских киселина. Реакција иницијалних реактивних врста или секундарних метаболита са циљним молекулима доводи до поремећаја ћелијских функција (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Више од 95% молекулског кисеоника унетог у ћелију се комплетно редукује до воде, а услед делимичне редукције око 1-5% се трансформише у ROS (Scandalios, 2005). Једноелектронском редукцијом настаје супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), двоелектронском водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), а троелектронском хидроксил радикал ( $OH^{\bullet}$ ). Интеракцијом са другим молекулима и конституентима ћелије продукују се и други слободни радикали кисеоника (хидропероксил –  $HO_2^{\bullet}$ , пероксил –  $RO_2^{\bullet}$ , алкоксил –  $RO^{\bullet}$ ), као и нерадикалске реактивне врсте (синглет кисеоник –  $^1O_2$ , пероксинитрит –  $ONOO^{\bullet}$ , пероксинитритна киселина –  $ONOOH$ , органски хидропероксиди –  $ROOH$ ).

У биолошким системима слободни радикали су углавном кисеоничне врсте, али се продукују и реактивне врсте угљеника (трихлорметил радикал –  $CCl_3^{\bullet}$ ), реактивне врсте сумпора (тиол радикал –  $R-S^{\bullet}$ ) и реактивне врсте азота (енг. *reactive nitrogen species*, RNS) (Halliwell и Gutteridge, 2007), (Слика 4).



Слика 4. Реактивне врсте кисеоника и азота  
Извор: [www.frontbiosci.org](http://www.frontbiosci.org)

### 1.3.1. СУПЕРОКСИД АНЈОН РАДИКАЛ ( $O_2^{\bullet-}$ )

Једноелектронском редукцијом молекуларног кисеоника настаје супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ) према следећој једначини:



Овај радикал настаје у свим аеробним ћелијама, у респираторном ланцу митохондрија и хлоропласта, уз учешће NADH дехидрогеназе и убихинон-Q-цитохром b-комплекса, али и у ендоплазматичном ретикулуму и на другим местима у ћелији. Важан извор  $O_2^{\bullet-}$  је такође, „респираторна експлозија“ (respiratory burst) у фагоцитним ћелијама (неутрофили, макрофаги) при контакту са страним честицама или имуним комплексима (De Coursey и Ligeti, 2005). Значајна количина  $O_2^{\bullet-}$  продукује се у реакцијама оксидаза, као што су ксантин оксидаза, NAD(P)H оксидаза, цитохром P-450 оксидаза и алдехид оксидаза. Супероксид анјон може да настане и у реакцијама хидролаза у току аутооксидације хинона, катехоламина, флавина, тиола, хромопротеина и у присуству прелазних метала. Такође, може да настане у процесу биотрансформације егзогенних и ендогених супстрата, у процесу метаболизма етанола и процесу липидне пероксидације незасићених масних киселина (Valko и сар., 2007).

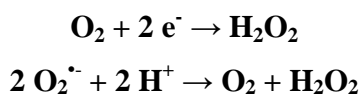
У воденој средини  $O_2^{\bullet-}$  подлеже реакцији дисмутације, која представља реакцију два молекула супероксид анјон радикала, при чему се један оксидује, а други редукује, дајући водоник пероксид. Ова реакција може да се одвија спонтано или уз каталитичко дејство супероксид-дисмутазе (SOD). Као примарна реактивна врста,  $O_2^{\bullet-}$  је умерено реактиван, али може да реагује са другим молекулима и генерише реактивније секундарне врсте. У присуству метала са променљивом валенцом,  $O_2^{\bullet-}$  се преводи у екстремно реактивни хидроксил радикал ( $OH^{\bullet}$ ), а у реакцији са азот оксидом (NO) генерише изразито реактивни пероксинитрит ( $ONOO^-$ ).  $O_2^{\bullet-}$  је најчешће продукована врста слободних радикала у живим организмима због чега се углавном налази на почетку каскаде унутарћелијског оксидативног стреса (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Супероксид анјон радикал изазива деполимеризацију полисахарида, оштећење ензима и мембрана ћелија, ремети синтезу и транскрипцију ДНК, и учествује у процесима канцерогенезе (Štajn и сар., 2007).

### 1.3.2. ВОДНИК ПЕРОКСИД ( $H_2O_2$ )

Спонтаном или катализованом дисмутацијом  $O_2^{\bullet-}$  долази до настанка водоник пероксида ( $H_2O_2$ ). То је слабо реактивни молекул, који нема неспарених електрона, па није у правом смислу радикал (Cadenas, 1989). Иако није нарочито реактиван, лако дифундује кроз мембране, што му омогућава да директно оксидује ћелијске компоненте.

До продукције  $H_2O_2$  у ћелији може да дође и директно, двоелектронском редукцијом молекулског кисеоника:



Водоник пероксид се продукује у пероксизомима, митохондријама, микрозомима и ендоплазматичном ретикулуму, као и на ћелијској мембрани. Уклањање водоник пероксида из ћелија обавља се деловањем ензима каталазе или глутатион-пероксидазе (Dröge, 2002). Највећа количина водоник пероксида се ствара у пероксизомима, у којима је присутна висока активност каталаза, која штити овај део ћелије од оксидативног оштећења. Поред тога,  $H_2O_2$  настаје у ћелији директно, деловањем урат-оксидаза, оксидаза D-амино киселина, ксантин-оксидаза, уриказа, глукозо-оксидазе и оксидаза L-хидрокси киселина, као и у реакцијама аутооксидације оксисемоглобина, аскорбата, глутатиона,

тиола и катехоламина (Halliwell и Gutteridge, 2007). Водоник пероксид настаје и током активности ензима моноамино-оксидазе (МАО), који обавља оксидативну деаминацију допамина и смештен је највећим делом на спољашњој страни митохондрија (Štajn и сар., 2007). Активирани фагоцити (моноцити, неутрофили, еозинофили, макрофаги) такође продукују водоник пероксид.

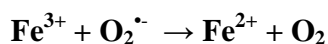
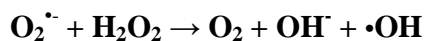
$\text{H}_2\text{O}_2$  делује директно и индиректно испољавајући штетне ефекте на биомолекуле. Директни ефекти настају као последица његових оксидативних својстава, и укључују деградацију хем протеина, ослобађање гвожђа, оксидације сулфхидрилних група протеина и инактивацију ензима, оксидацију ДНК, липида, и кетокиселина. Индиректно штетно деловање  $\text{H}_2\text{O}_2$  испољава стварањем високо реактивног хидроксил радикала ( $\bullet\text{OH}$ ) у присуству метала са променљивом валенцом ( $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ ) у *Fenton*-овој реакцији или интеракцијом са супероксид анјон радикалом у *Haber-Weiss*-овој реакцији (Halliwell и Gutteridge 2007).

### 1.3.3. ХИДРОКСИЛ РАДИКАЛ ( $\bullet\text{OH}$ )

Хидроксил радикал ( $\bullet\text{OH}$ ) је најреактивнији продукт метаболизма кисеоника и најодговорнији је за оксидативну деструкцију биомолекула. Настаје троелектронском редукцијом молекулског кисеоника. Хидроксил радикал може да настане и у реакцији водоник пероксида са јонима прелазних метала ( $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ ) у *Fenton*-овој реакцији:



У присуству јона метала, реакцијом између водоник пероксида и супероксид анјон радикала, такође може да настане хидроксил радикал, а реакција се назива *Haber-Weiss*-ова:



Хидроксил радикал настаје из воде при апликацији високих доза јонизујућег зрачења, током аутооксидације б-хидроксидопамина и б-аминодопамина.

Ови радикали присутни су у ћелији кратко ( $10^{-9}$ ), јер реагују са другим биомолекулима, шећерима, аминокиселинама, пуринским и пиримидинским базама,



органичним киселинама, стварајући секундарне радикале различите реактивности. Оксидацијом полинезасићених масних киселина у биомембранама •ОН инцира процес липидне пероксидације, који може даље да пропагира секундарно створеним реактивним врстама. •ОН изазива озбиљна оштећења ткива и укључен је у инфламаторне процесе, тератогенезу и ћелијску смрт (Štajn и сар., 2007).

Не постоји ниједан специфични антиоксидативни механизам који успешно уклања већ настали •ОН, што указује на значај антиоксидативног деловања које ће да спречи његову продукцију. То обухвата превенцију формирања и неутрализацију већ формираних ROS, дисмутацију супероксид анион радикала, разлагање водоник пероксида до воде, као и везивање јона гвожђа и бакра (Halliwell и Gutteridge 2007).

#### 1.3.4. АЗОТ ОКСИД (NO)

Азот оксид (Nitric Oxide, NO) је гас без боје, укуса и мириса, мали хидрофобни молекул. Присутан је у ћелијама свих кичмењака и као сигнални молекул учествује у регулацији бројних ћелијских функција. Ендогена синтеза NO одвија се посредством ензима азот оксид синтазе (Nitric Oxide Synthase, NOS) у васкуларним ендотелним ћелијама, неутрофилима и макрофагима, неуронима, епителним ћелијама горњих дисајних путева и у било ком ткиву подвргнутом исхемији и инфламацији. Супстрат за синтезу NO је полуесенцијална аминокиселина L-аргинин, а синтеза се одвија у присуству молекуларног кисеоника и NADPH као косупстрата (Palmer и сар., 1988).

NO је молекул липофилне природе, брзо дифундује кроз ћелијске мембране, што му омогућава да утиче на бројне биолошке функције у организму. Као унутарћелијски гласник учествује у неуротрансмисији, у регулацији васкуларног тонуса (инхибиција агрегације тромбоцита, регулација крвног притиска), и у регулацији активности имуног система (имунолошки одговори макрофага). Хемизам NO у биолошким системима је комплексан. NO поседује један неспарени електрон, који му омогућава везивање за гвожђе у протеинима са хемом, али протеинима са гвожђе-сулфидним центрима. Реакције остварује са тиолима, молекуларним кисеоником и супероксид анион радикалом (Liao, 1999). У интеракцији са редокс активним металима, NO може да инхибира *Fenton*-ову реакцију и спречи настанак хидроксил радикала (Lu и Korpenol, 2005).

Са кисеоником и реактивним врстама кисеоника реагује брзо. Цитотоксични ефекти NO посредовани су пре његовим оксидативним продуктима него директним деловањем. У биолошким системима могу да се нађу три сродне редокс форме азот оксида, слободни радикал ( $\text{NO}^\bullet$ ), нитрозил катјон ( $\text{NO}^+$ ), који настаје једноелектронском оксидацијом  $\text{NO}^\bullet$ , и нитроксил анјон ( $\text{NO}^-$ ), који настаје једноелектронском редукцијом  $\text{NO}^\bullet$ . Све три редокс форме NO могу да реагују са ROS, редокс активним металима и тиолима. Такође, NO може да се редукује у азот субоксид ( $\text{N}_2\text{O}$ ) или да се оксидује у нитрите ( $\text{NO}_2^-$ ) (Wink и сар., 1998). У реакцији NO са супероксид анјон радикалом ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) формира се веома снажан оксидант пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ).

Акумулирање великих концентрација NO и испољавање потенцијално токсичних ефеката, спречено је дифузијом NO кроз ткива у еритроците. У еритроцитима, у реакцији са оксигемоглобином, NO се конвертује до нитрата. Оксидација NO од стране оксигемоглобина је главни пут елиминације NO. Нитрати могу бити одређивани у плазми и сматрају се мером продукције азот монооксида (Joshi, 2002).

RNS могу да оксидују, нитрирају и нитролизују биомолекуле и тиме доведу до њихове дисфункције. Цитотоксично деловање RNS, као резултат повећане продукције NO, за последицу има неуродегенеративне поремећаје, патофизиолошке промене кардиоваскуларног система, хронична запаљења и носи повећани ризик обољевања од канцера (Štajn и сар., 2007).

### 1.3.5. ПЕРОКСИНИТРИТИ ( $\text{ONOO}^-$ )

У неензимској реакцији азот оксида са  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , настају пероксинитрити ( $\text{ONOO}^-$ ). Реакција формирања  $\text{ONOO}^-$  је изузетно брза и превазилази брзину дисмутације  $\text{O}_2^{\bullet-}$  посредоване SOD, а за њено одвијање није потребан прелазни метал.

Пероксинитрит је високо реактиван молекул, реактивнији од супероксид анјон радикала и азот оксида од којих потиче. На физиолошким рН, пероксинитрит се претежно налази у стабилном анјонском облику ( $\text{ONOO}^-$ ), а делом у облику нестабилне пероксинитритне киселине ( $\text{ONOOH}$ ), која се разлаже до нитрата формирајући интермедијере. У присуству прелазних метала и супероксид-дисмутазе,  $\text{ONOO}^-$  се разлаже до  $\text{OH}^-$  и нитрил јона ( $\text{NO}_2^+$ ) (Pryor и Squadrito, 1995). Полуживот  $\text{ONOO}^-$  је кратак и

износи око 10–20 ms, али је довољан да омогући пролаз кроз биомембране и интеракцију са биомолекулима удаљеним од места синтезе (Alvarez и Radi, 2003).

Оксидацијом тиола, липида, протеина и дезоксирибоза, ONOO<sup>-</sup> доводи до структурних и функционалних модификација ових биомолекула. Директном реакцијом са металним центрима протеина модификује хемоглобин, миоглобин или цитохром *c*, и инактивира ензиме укључене у кључне метаболичке процесе (Alvarez и Radi, 2003). Важан аспект цитотоксичности пероксинитрита је његова способност да индукује процес липидне пероксидације (Radi и сар., 1991).

### 1.3.6. БИОЛОШКИ ЕФЕКТИ РЕАКТИВНИХ ВРСТА

Реактивне врсте кисеоника и азота се стварају континуирано и у ограниченим количинама као део нормалних метаболичких процеса. Настају током процеса оксидативне фосфорилације у митохондријама, фагоцитозе, биотрансформације у ендоплазматичном ретикулуму, у метаболизму етанола, у реакцијама које катализују оксидазе, током синтезе еикосаноида и у реакцијама оксидоредукције у присуству метала са променљивом валенцом. Такође, могу да настану под утицајем различитих егзогених фактора, екстремних температура, радијације, тешких метала, биотоксина или лекова (Dröge, 2002; Halliwell и Gutteridge, 2007; Valko и сар., 2007).

У умереним концентрацијама под физиолошким условима имају вишеструке корисне улоге у бројним физиолошким процесима. Учествују у регулацији интраћелијских сигналних каскада и генској експресији, диференцијацији неурона, регулацији ћелијског циклуса и регулацији апоптозе (Valko и сар., 2007). Контролишу ниво респираторне вентилације, релаксацију мускулатуре, учествују у активацији имуног система и одбрани од инфективних агенаса (Dröge, 2002).

Поред важних улога које остварују у физиолошким процесима, реактивне врсте су, такође, и интегрални део процеса који могу да доведу до оксидативних оштећења ћелија. Еволутивним развојем одбрамбених механизма, аеробни организми су постали способни да користе кисеоник као крајњи акцептор електрона и да се заштите од штетних ефеката реактивних врста кисеоника. Међутим, при повећаној продукцији реактивних врста или смањеном антиоксидативном капацитету ћелија, настаје оксидативни и нитрозативни стрес (Sies, 1991). Поремећај баланса између продукције ROS (RNS) и антиоксидативне

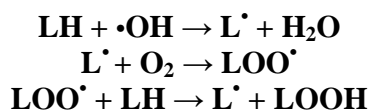
заштите, може да узрокује развој различитих оштећења, убрза процес старења, развој болести и смрт организама (Halliwell и Gutteridge, 2007).

ROS и RNS су способне да наруше међумолекулске везе и доведу до оштећења готово свих биомолекула у ћелији. У реакцијама са биомолекулима ROS и RNS узрокују секундарну и терцијарну продукцију реактивних врста, што за резултат има оштећења липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина, и коначно може да доведе до неопластичних трансформација или смрти ћелије (Sies, 1991; Halliwell и Gutteridge, 2007). Сматра се да реактивне врсте кисеоника и азота имају значајну улогу у етиопатогенези преко 200 врста хуманих обољења (Štajn и сар., 2007).

### 1.3.6.1. Оксидативна оштећења биомолекула

Најбоље проучена штетна последица деловања реактивних врста кисеоника на живе организме је липидна пероксидација. Липидна пероксидација представља низ ланчаних слободнорадикалских реакција које доводе до разлагања липида и липопротеина, што за последицу има нарушавање флуидности и пропустљивости ћелијских мембрана, њихово разарање и смрт ћелија (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Главни циљни молекули за реактивне врсте кисеоника су полинезасићене масне киселине (енг. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) фосфолипидног двослоја ћелијских мембрана. Хидроксил радикал ( $\bullet\text{OH}$ ) започиње процес липидне пероксидације који даље пропагира низом ланчаних реакција до формирања липидних хидропероксида и алдехида. Преузимање водониковог атома незасићене масне киселине липида (LH) од стране хидроксил радикала, доводи до настанка липидног радикала ( $\text{L}\bullet$ ), који у реакцији са молекулским кисеоником прелази у изразито реактиван липидни пероксил радикал ( $\text{LOO}\bullet$ ). Липидни пероксил радикал затим преузима водоников атом са суседног липида и формира липидни хидропероксид ( $\text{LOOH}$ ). Новонастали липидни радикал интерагује са другим суседним липидом у ланчаној реакцији која резултује акумулацијом оштећених липида. Реакције су приказане следећим формулама (Catalá, 2006):



У присуству јона прелазних метала,  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ , LOOH дисосује до  $\bullet\text{OH}$  и липидног алкоксил радикала ( $\text{LO}\bullet$ ), који може да реагује са другим липидом и формира  $\text{L}\bullet$  и липидни алдехид (LOH). У реакцији са  $\text{Fe}^{3+}$  или  $\text{Cu}^{2+}$ , LOOH дисосује до пероксил радикала ( $\text{LOO}\bullet$ ). Оба радикала, настала дисосијацијом LOOH, одговорна су за даљу иницијацију и пропацију липидне пероксидације (Halliwell и Gutteridge, 2007). LOOH су нестабилни и разлажу се до реактивних алдехидних једињења која лако дифундују у цитосол. Међу најтоксичније алдехидне продукте липидне пероксидације спадају 4-хидрокси-2,3-трансноренал и малондиалдехид (MDA), који се користи као биомаркер липидне пероксидације (Valko и сар., 2007). MDA је главни извор липофусцина чија се концентрација у ткивима повећава током старења. Може да реагује са слободним аминок групама протеина и нуклеинских киселина, и да доведе до још већих оштећења ћелије (Scott, 1995).

Последице липидне пероксидације су структурно-функционалне промене ћелијске мембране. Оштећењем мембранских липида смањује се хидрофобност липидног двослоја и мења се афинитет и интеракција протеина и липида. Услед нарушене липопротеинске интеракције ремети се хомеостаза ћелије, што доводи до дисфункције ћелијских процеса (деооба, диференцијација, ендоцитоза, егзоцитоза, фагоцитоза, транспорт јона, пријем и пренос сигнала, међућелијски контакт). Крајњи производи липидне пероксидације значајни су медијатори атеросклерозе, коронарне болести, акутног инфаркта миокарда, реуматоидног артритиса, системске склерозе и канцера (Valko и сар., 2007).

Протеини такође чине значајне циљне молекуле реактивних врста. У току оксидативне модификације протеина, као последица модификације појединих аминокиселина, или комплетног губитка аминокиселине, мења се њихова примарна, секундарна и терцијарна структура. Бочни ланци аминокиселинских остатака протеина, посебно цистеина и метионина, осетљивији су на оксидацију изазвану ROS/RNS, а реакција је посредована прелазним металима (Stadtman, 2004). Иницијатор оксидативних оштећења протеина углавном је  $\bullet\text{OH}$ , као најреактивнија кисеонична врста, а оксидација протеина најчешће доводи до настанка хидроксилних и карбонилних група. Секундарни ефекти оксидације протеина укључују настанак алкил, алкоксил и алкил-пероксил радикала, фрагментацију полипептидног ланца, промену наелектрисања протеина, повећану осетљивост на протеолизу, протеин-протеин интеракције и агрегацију насталих

продуката (Scandalios, 2005). Оксидативна модификација протеина резултира губитком њихове функције и доводи до поремећаја трансмембранског транспорта јона и нарушавања ћелијске сигнализације.

Оксидативна деструкција угљених хидрата за последицу има поремећај њихове функције. Моносахариди, глукоза или фруктоза, подложни су оксидативном деловању ROS, али већи физиолошки ефекат проузрокују оксидативна оштећења сложенијих молекула који садрже угљенохидратну компоненту, попут протеина са разгранатим олигосахаридним ланцима или нуклеинских киселина у чијем саставу су пентозе (Štajn и сар., 2007).

Све компоненте ДНК могу да буду погођене оксидативним оштећењима од стране ROS. Оксидативно оштећење нуклеинских киселина доводи до прекида у једном или оба ланца ДНК, модификације база (отварање прстена, хидроксилација прстена), унакрсног повезивања у оквиру једног или оба ланца ДНК, и унакрсног повезивања ДНК и протеина. Оксидативна оштећења ДНК инхибирају индукцију транскрипције, доводе до нарушавања репликације, и до геномске нестабилности, што представља први корак укључен у мутагенезу, канцерогенезу и старење (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Интензитет оксидативних оштећења и могућност њиховог репарирања зависе од про/антиоксидативних услова у ћелијама (Halliwell и Gutteridge, 2007).

## **1.4. СИСТЕМ ЗАШТИТЕ ОД ОКСИДАТИВНИХ ОШТЕЋЕЊА**

Систем заштите од оксидативних оштећења (енг. *Antioxidant defence system*, AOS) развијен је током еволуције код свих аеробних организама како би била спречена, ограничена или уклоњена оштећења настала деловањем реактивних врста. Ћелије се штите од токсичног деловања реактивних врста бројним ендогеним радикал-, „scavenging“ протеинима, ензимима, као и непротеинским биомолекулима који су део овог система.

AOS се према природи и начину деловања може поделити на примарну и секундарну заштиту. Примарна антиоксидативна заштита укључује ензимске и неензимске компоненте, које су активне у условима нормалне и повећане продукције ROS. Секундарна антиоксидативна заштита укључује протеин-специфичне оксидоредуктазе (тиол-трансфераза, протеин-ADP-рибозил-трансфераза, АТФ и Ca<sup>2+</sup> независна протеаза)

које учествују у поправци оксидативних оштећења биомолекула (Cadenas, 1989; Štajn и сар., 2007).

Неензимску антиоксидативну заштиту остварују супстанце мале молекулске масе, растворљиве у води: глутатион, аскорбинска киселина, метионин, цистеин, албумин, билирубин, биливердин, мокраћна киселина, трансферин, церулоплазмин, хистидин, феритин и растворљиве у мастима: витамин Е, витамин А, β-каротен, коензим Q. Према најновијој класификацији ензимске компоненте AOS чине ензими: супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион-пероксидаза (GSH-Px), глутатион-редуктаза (GR), док се ензим глутатион-S-трансфераза (GST), који је раније био сврстан у ову групу, убраја у ензиме II фазе биотрансформације (Van der Oost и сар., 2003).

#### **1.4.1. НЕЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ СИСТЕМА АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ**

##### **1.4.1.1. Глутатион (GSH)**

Глутатион (GSH) је трипептид (L-γ-glutamyl-L-cisteinyl-glycine) који представља најзаступљенији нискомолекулски тиол у ћелијама. Широко је распрострањен у животињама, биљкама и микроорганизмима, и налази се као слободан или везан у цитосолу, једру, митохондријама и микрозомима (Parris и Kidd, 1997).

У ћелијама се налази у две форме, као редуковани (GSH, тиолна форма) и као оксидовани (GSSG, дисулфидна форма), (Parris и Kidd, 1997). При нормалним физиолошким условима, више од 98% интрацелуларног глутатиона је у редукованом стању, док је остатак присутан у ћелији у виду дисулфидне форме – GSSG, мешаних дисулфида (углавном GSS-протеин) и тиоестара. GSSG у нормалним околностима чини мање од 1% укупног GSH и у здравим ћелијама ретко достиже више од 10%. Унутарћелијски садржај GSH зависи од баланса између његовог коришћења и синтезе.

GSH остварује неколико значајних улога у ћелији: учествује у антиоксидативној заштити и детоксификацији различитих ксенобиотика, одржавању структуре и функције протеина, регулацији синтезе и деградације протеина, метаболизму леукотриена и простагландина, редукцији рибонуклеотида до дезоксирибонуклеотида, регулацији ћелијског циклуса и генској експресији (Forman и сар., 2009).

GSH у антиоксидативној заштити функционише на више нивоа. Заштитна улога GSH базирана је на способности сулфхидрилне групе цистеина да се реверзибилно оксидује. Антиоксидативну заштиту остварује директним уклањањем реактивних врста,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\bullet OH$  и  $ONOO^-$ , и органских радикала ( $R^{\cdot}$ ). Као супстрат ензима GSH-Px учествује у редукцији водоник пероксида и хидропероксида, а као коњугујући молекул у реакцији са ензимом GST, омогућава детоксификацију и екскрецију ксенобиотика (Matés, 2000). Регенерише важне неензимске антиоксиданте, аскорбинску киселину и  $\alpha$ -токоферол, до њихових активних форми (Forman и сар., 2009).

GSH такође може неензимски да формира металне комплексе и има важну улогу у транспорту, депоновању и метаболизму метала. GSH функционише у мобилизацији и транспорту метала између лиганата, као и кроз ћелијске мембране, извор је цистеина за везивање метала и служи као редуктант или кофактор у редокс реакцијама које укључују метале. Сулфхидрилна група цистеина у молекулу GSH има висок афинитет за метале и формира меркаптите са неколико ендогених метала, као што су жива, кадмијум, бакар, селен, хром, олово и цинк (Ballatori, 1994).

Као резултат ових реакција, GSH се у ћелијама оксидује до GSSG, који није биолошки активан (Brigelius-Flohe, 1999). Део GSSG се екскретује из ћелије, док се делом унутар ћелија редукује, деловањем ензима глутатион-редуктазе (GR). Конверзија GSSG у GSH обавља се уз присуство редукованог NADPH, који се обезбеђује из глукозомонофосфатног циклуса. Глукозо-6-фосфат дехидрогеназа (G6PDH) продукује NADPH, молекул који је есенцијалан за функционисање многих антиоксидативних ензима (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Поред активности ензима GR, концентрација GSH у ћелији регулисана је и *de novo* синтезом, која се одиграва у цитосолу свих ћелија, док је јетра главно место биосинтезе овог једињења. GSH се синтетише из аминокиселина које га чине (L-глутамат, L-цистеин и глицин), активношћу два ATP зависна ензима:  $\gamma$ -глутамилцистеин-синтетазе ( $\gamma$ -GCS) и глутатион-синтетазе (GS) (Griffith, 1999). У условима оксидативног стреса повећава се екскреција GSH из хепатоцита у крв, којом се дистрибуира у различита ткива (Forman и сар., 2009).



### 1.4.1.2. Аскорбинска киселина (Vit C)

Аскорбинска киселина (Vit C) је најефикаснији хидросолубилни неензимски антиоксидант. Синтетишу је биљке и неке животиње, а есенцијални је нутријент за људе, примате, заморце, летеће сисаре и птице певачице. Овим организмима недостаје ензим L-гулоно- $\gamma$ -лактон-оксидаза, последњи ензим у процесу синтезе Vit C из глукозе. Ензим катализује конверзију L-гулоно- $\gamma$ -лактона до аскорбинске киселине. Код сисара код којих функционише овај ензим, Vit C се синтетише у јетри (Padh, 1990).

Аскорбинска киселина постоји у три различита стања: редукованом (аскорбинска киселина, AsA); редукована форма губитком једног електрона прелази у аскорбил радикал (L-семидехидроаскорбат, AsA $^{\bullet}$ ) који губитком још једног електрона прелази у дехидро-L-аскорбинску киселину (DAsA) (Maу и сар., 1997). Формирање молекула DAsA може да буде последица директне реакције између AsA и реактивних врста кисеоника (Štajn и сар., 2007).

Vit C остварује многобројне функције: убрзава ресорпцију гвожђа, регулише синтезу холестерола и норадреналина, јача функције имуног система, укључен је у детоксификацију ксенобиотика, учествује у ћелијској диференцијацији. Антиоксидативна активност Vit C базирана је на његовој способности као донора водоника, да неутралише многе интермедијере и продукте слободно радикалских процеса (Padh, 1990). Присуство Vit C у крвној плазми ефикасно спречава оксидацију липида плазме, при чему су антиоксидативни ефекти овог витамина и брзина његове реакције са перокси радикалом већи у односу на друге антиоксиданте (Sies и сар., 1992). Vit C смањује ендегену липидну пероксидацију, штити јетру од оксидативног оштећења и редукује нитроксил радикале у мембрани еритроцита. При томе, ефикасност у одбрани од оксидативних оштећења показује не само у воденим деловима ћелије, екстрацелуларном матриксу и циркулацији, него и у хидрофобној фази ћелијских мембрана. Метаболизам овог антиоксиданса блиско је повезан са метаболизмом других нискомолекулских компоненти AOS, глутатиона, витамина E и коензима Q (Štajn и сар., 2007).

Једна од важних улога Vit C је његова интеракција са редокс активним транзиционим металима, као што су бакар или гвожђе. Vit C делује као косупстрат за хидролазу и оксигеназу, ензиме укључене у биосинтезу проколагена, карнитина и неуротрансмитера. Аскорбат одржава металне јоне у активном центру ових ензима у

редукованом стању за оптималну активност ензима. Редукција јона транзиционих метала аскорбатом може да има негативне ефекте, односно да резултује продукцијом реактивних врста, хидроксил радикала или липидних алкоксил радикала ( $LO^{\bullet}$ ) у реакцији редукованих металних јона ( $Fe^{2+}$  и  $Cu^{+}$ ) са водоник пероксидом или хидропероксидима ( $LOOH$ ) (Buettner и Jurkiewicz, 1996).

#### 1.4.1.3. Церулоплазмин (СР)

Церулоплазмин (СР) се синтетише у јетри као апо-СР и излучује у циркулацију као холопротеин са везаних 6 атома бабра. Бакар не утиче на ниво синтезе СР, али је полуживот холо-СР (4 дана) знатно дужи од полуживота апо-СР (4 сата) (Harris и Gitlin, 1996). Синтеза и секреција СР из хепатоцита стимулирана је интерлеукином-1 и интерлеукином-6 (Linder и Hazegh-Azam, 1996). СР служи као извор бабра за ткива (Vulpe и Packman, 1995). Рецептори за церулоплазмин, који могу да промовишу акумулацију бабра у ћелијама сисара, откривени су у плазма мембранама еритроцита, ендотела јетре, срчаних мишићних ћелија и лимфоцита (Vulpe и Packman, 1995). Након везивања СР за рецепторе, јони бабра се отпуштају и улазе у ћелије, док СР протеин остаје изван ћелија. Хепатоците уклањају апо-СР из циркулације у наредних неколико сати. СР је такође одговоран за секрецију бабра у жуч и преко жучи у црево, одакле се углавном поново не ресорбује (Evans, 1973).

СР делује као оксидаза, будући да у присуству молекулског кисеоника оксидује  $Fe^{2+}$  у  $Fe^{3+}$ , уз ослобађање воде (Hellman и Gitlin, 2002; Patel и сар., 2002). Ферооксидазна активност СР омогућава везивање гвожђа за трансферин (Uriu-Adams и сар., 2005). На ова два начина СР директно спречава повећање транзитног „пула“ гвожђа. Смањена концентрација СР за последицу има нагомилавање гвожђа у јетри услед немогућности да се угради у трансферин. Церулоплазмин за који није везан бакар не показује оксидазну активност и брзо бива деградиран (Uriu-Adams и сар., 2005).

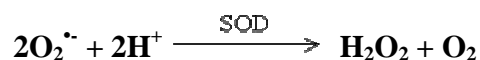
СР је веома ефикасан антиоксидант. Уклањањем токсичних феро јона, који могу да индукују формирање супероксид анјон радикала и хидроксил радикала, СР може да спречи оксидативно оштећење липида, ДНК, и протеина (Halliwell и Gutteridge, 2007). Антиоксидативно дејство показује и катализом дисмутације супероксид анјон радикала у реакцији која не резултује формирањем водоник пероксида (Goldstein и сар., 1982).

Показано је и да се СР специфично везује за мијелопероксидазе, и тиме инхибира продукцију хипохлорне киселине (HClO) од стране неутрофила (Park и сар., 2000).

## 1.4.2. ЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ СИСТЕМА АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ

### 1.4.2.1. Супероксид-дисмутаза (SOD)

Супероксид-дисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1) је металопротеин присутан у свим аеробним организмима и неким анаеробима. Један је од најефикаснијих интрацелуларних ензима. SOD катализује дисмутацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) до молекулског кисеоника и мање реактивног  $H_2O_2$  према следећој реакцији (McCord и Fridovich, 1969):



Еукариоте поседују три изоензимске форме супероксид-дисмутазе у зависности од метала у активном центру: манган садржавајућа супероксид-дисмутаза (Mn SOD), бакар цинк садржавајућа супероксид-дисмутаза (CuZn SOD), и екстрацелуларна супероксид-дисмутаза (EC SOD).

Манган садржавајућа SOD, молекулске масе од 88 kDa, се састоји од четири субјединице са  $Mn^{3+}$  у активном центру. Присутна је у матриксу митохондија многих ткива. Примарно се синтетише у цитосолу одакле се сигналним пептидом, кога добија постраниционим променама, транспортује у митохондрије (Matés, 2000).

Бакар цинк садржавајућа супероксид-дисмутаза (CuZn SOD) је хомодимер, молекулске масе од 32 kDa. Свака субјединица садржи по један атом бакра ( $Cu^{2+}$ ) и један атом цинка ( $Zn^{2+}$ ). CuZn SOD се налази у свим ткивима, као и у еритроцитима и плазми. Присутна је у цитосолу, а у мањим количинама заступљена је у ћелијској мембрани, једру, ендоплазматичном ретикулуму, међумембранском простору, митохондријама и липозомима.

Екстрацелуларна супероксид-дисмутаза (EC SOD) је тетрамерни глукопротеин са молекулском масом од 135 kDa, који садржи један атом Zn и један атом Cu. Налази се у међућелијском простору и екстрацелуларној течности, плазми, лимфи и цереброспиналном ликвору. Показује слабу активност и у ткивима. EC SOD обезбеђује физиолошке концентracије супероксид анјона и модификује деловање азот оксида. При

њеној смањеној активности повећава се концентрација супероксид ањон радикала и долази до настанка пероксинитрита, који изазива оштећење ћелија и ткива (Štajn и сар., 2007).

#### 1.4.2.2. Каталаза (CAT)

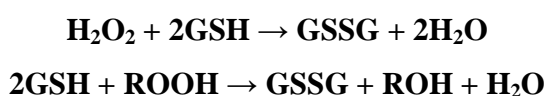
Каталаза (CAT, *EC 1.11.1.6*) је хемохромопротеид, тетрамер од 4 идентичне субјединице које садрже хематин (хем- $\text{Fe}^{3+}$  протопорфирин) групу у активном центру и има молекулску масу од 240 kDa. Основна улога каталазе је редукција водоник пероксида до воде и молекулског кисеоника. У зависности од концентрације супстрата одвијаће се каталазни или пероксидазни тип реакције.

У каталазном типу реакције, када је продукција  $\text{H}_2\text{O}_2$  брза, дозор водоника је водоник пероксид (Percy, 1984). У пероксидазном типу реакције, дозори водоника могу бити различита органска и неорганска једињења (алкохоли, нитрити, пирогалол, аксорбинска киселина), а крајњи производи су нативни ензим, оксидовани косупстрат и вода. Ова реакција је спорија и јавља се у условима споре продукције пероксида или високе концентрације дозора водоника (Štajn и сар., 2007).

Каталаза је присутна код већине аеробних организама. Код сисара је присутна у готово свим ткивима, иако њена концентрација међу ткивима варира. Највиши ниво каталазне активности код сисара нађен је у јетри и еритроцитима, док је низак ниво CAT нађен у мозгу, срцу, скелетним мишићима и слезини. Ендотелне ћелје не садрже овај ензим. Унутар ћелија CAT се највећим делом налази у пероксизомима и митохондријама, као слободна или везана за мембрану. У еритроцитима 80-98% активности CAT испољава у цитосолу, док је само 2-20% везано за мембрану (Halliwell и Gutteridge, 2007).

#### 1.4.2.3. Глутатион-пероксидаза (GSH-Px)

Глутатион-пероксидаза (GSH-Px, *EC 1.11.1.9*) је заједничко име за групу ензима са више изоформи која има пероксидазну активност. GSH-Px је ензим који катализује глутатион-зависну редукцију водоник пероксида у воду, и органских хидропероксида у одговарајуће алкоhole, при чему настаје оксидовани глутатион:



GSH-Px је присутна у свим ћелијама кичмењака, док је бескичмењаци, биљке и прокариоте немају. Описане су три форме овог ензима:

- селен-зависна (Se GSH-Px), која представља тетрамерни ензим, молекулске масе од 21.5 kDa, са по једним атомом селена (Se) у активном центру (у облику селеноцистеина). Ова форма ензима катализује редукцију и органских и неорганских супстрата. При нижој концентрацији H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Se GSH-Px има већи афинитет према H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ефикаснија је у његовој редукцији од каталазе (Brigelius-Flohé, 1999);

- селен-независна (non-Se GSH-Px) је мономер, молекулске масе од 22 kDa, и присутна је у јетри и плазми. Има мањи афинитет за H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а ефикасна је у редукцији органских хидропероксида. Захтева високе концентрације GSH;

- фосфолипид хидропероксид глутатион-пероксидаза (PH GSH-Px) је мономер са селеноцистеином у активном центру. Редукује H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, фосфолипидне хидропероксиде и пероксиде холестерола. PH GSH-Px је једини ензим који редукује мембранске фосфолипидне хидропероксиде, прекида процес липидне пероксидације, уз присуство физиолошких концентрација витамина Е, и тако има кључну улогу у ћелијском систему заштите од ROS (Cotgreave, 1988; Andreyev и сар., 2005). Све глутатион-пероксидазе за редукцију хидропероксида користе глутатион као тиол-супстрат.

#### 1.4.2.4. Глутатион-редуктаза (GR)

Глутатион-редуктаза (GR, *EC 1.6.4.2*) је хомодимерни флавопротеин, са редокс активним дисулфидом у активном центру, молекулске масе од 120 kDa. Свака субјединица садржи протетичку групу FAD. GR је присутна код прокариота, и у цитосолу и митохондријама еукариотских ћелија. Овај ензим је неопходан за одржавање концентрација редукованог глутатиона. GR катализује реакцију редукције оксидованог глутатиона (GSSG) у редуковани глутатион (GSH), уз учешће NADPH као редукујућег кофактора:



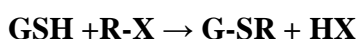
Каталитички циклус GR има две фазе, прво NADPH редукује FAD, при чему се редукујући еквивалент преноси на редокс активан дисулфид, а затим долази до редукције GSSG у активном центру ензима (Tandoğan и Ulusu, 2006). Редуковани GSH учествује у великом броју ензимских и неензимских реакција које су од пресудног значаја за

функционисање ћелије, при чему прелази у своју оксидовану GSSG форму. Ензим GR је заслужан за одржавање пула GSH углавном у редукованом стању, тако да има значајну улогу у регулацији редокс хомеостазе у ћелији (Forman и сар., 2009).

#### 1.4.2.5. Глутатион-S-трансфераза (GST)

Глутатион-S-трансфераза (GST, EC 2.5.1.18) припада мултигенској фамилији протеина укључених у процесе детоксификације великог броја једињења. Улогу детоксификације остварује катализом коњугације глутатиона са великим бројем електрофилних токсина и ксенобиотика (Mantle и сар., 1990). Присутна је код скоро свих аеробних организама. Највећу активност код сисара показује у јетри, где чини и до 10% свих протеина у цитосолу. Код еукариота GST изоензими се налазе у цитосолу и везани за мембране, а разликују се на основу каталитичких особина.

Најзначајнија реакција ензима GST је коњугација GSH са различитим електрофилним супстратима (R-X), при чему настаје коњугат електрофилног супстрата и глутатиона (G-SR), чиме се смањује потенцијална реактивност R-X са ћелијским макромолекулима:



Цитосолне GST су димери, молекулске масе 50 kDa, осим код глодара код којих су као тримери заступљене у микрозомима, ендоплазматичном ретикулуму и на спољашњој мембрани митохондрија. Свака субјединица садржи два функционална региона у активним центрима: хидрофилни G-регион, који везује GSH, и хидрофобни H-регион, који везује структурно различите електрофилне супstrate. Након везивања GSH и електрофилног супстрата у активном центру протеина, активира се сулфхидрилна група GSH, што омогућава нуклеофилни "напад" на атом угљеника, азота или сумпора електрофилног једињења. Формација тиоетарске везе између GSH и електрофила, односно настанак GSH коњугата, резултује у мањој реактивности и већој растворљивости супстрата у води, тако да је ова реакција углавном детоксификационе природе.

Осим детоксификације различитих егзогених једињења, коњугационе реакције са GSH су кључне и за метаболизам ендогених реактивних међупродуката. Својом активношћу GSH може да детоксикује штетне продукте липидне пероксидације, тако да

овај ензим има важну физиолошку улогу у заштити ћелије од оксидативног стреса који је индукован ендогеним липидним пероксидима.

GST изоензими поред детоксификационе улоге остварују и транспортну и синтетичку улогу односно, делују као везујући протеини за транспорт стероида, неких лекова и метаболита, и учествују у синтези леукотриена и простагландина, остварујући каталитичку активност уз учешће GSH као супстрата.

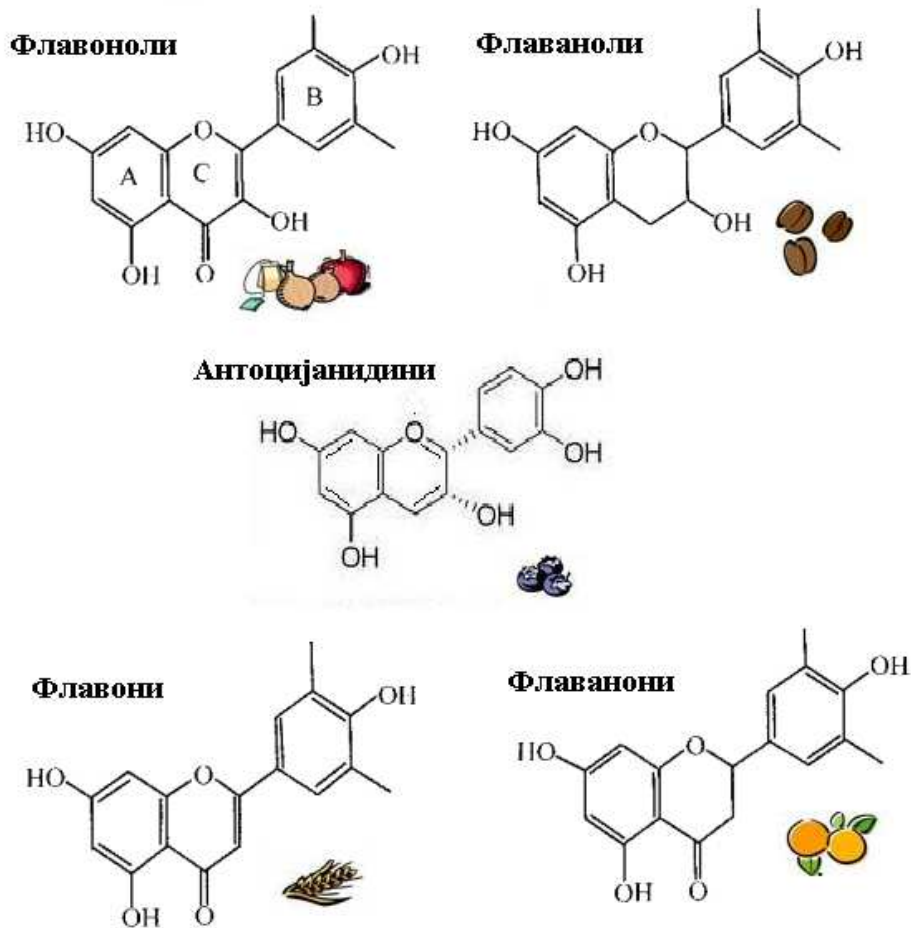
На основу аминокиселинског састава и супстратне специфичности GST изоензими су груписани у осам независних генетских класа: *alpha*, *kappa*, *mu*, *omega*, *pi*, *sigma*, *theta* и *zeta* (Halliwell и Gutteridge, 2007).

## 1.5. ФЛАВОНОИДИ

Флавоноиди (од латинске речи *flavus*, са значењем жут) и њихови полимери представљају велику групу полифенолних секундарних метаболита биљака. Сматра се да код биљака имају улогу у остваривању симбиозе са микроорганизмима, гаметогенези, и у одбрамбеним механизмима насталим као одговор на бројне биотичке и абиотичке стресоре, попут заштите од UV-B радијације и фитопатогена (Pourcel и сар., 2007; Falcone Ferreуга и сар., 2012).

Флавоноиди садрже два бензенова прстена (А и В), међусобно повезана трочланим угљеничним низом, од којих сваки има бар једну хидроксилну групу. Централни трочлани низ може да формира затворени пирански прстен (С) са једним од бензенових прстенова. Структурна разноликост флавоноида настаје као резултат бројних модификација основне скелетне структуре, у реакцијама хидрогенације, хидроксилације, О-метилације хидроксилних група, димеризације, везивања неорганског сулфата и гликолизацијом хидроксилних група (О-гликозиди) или флавоноидног језгра. На основу разлика у хемијској структури, базираним на основу везе бензеновог прстена са пиранским прстеном, и функционалним групама, класификовано је 5 подкласа флавоноида (Слика 5): флавоноли (енг. *flavonols*), флаваноли (енг. *flavan-3-ols*), антоцијанидини (енг. *anthocyanidins*), флавони (енг. *flavones*) и флаванони (енг. *flavanones*) (USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, 2013). До данас је изоловано преко 9000 флавоноида (Hernández и сар., 2009).





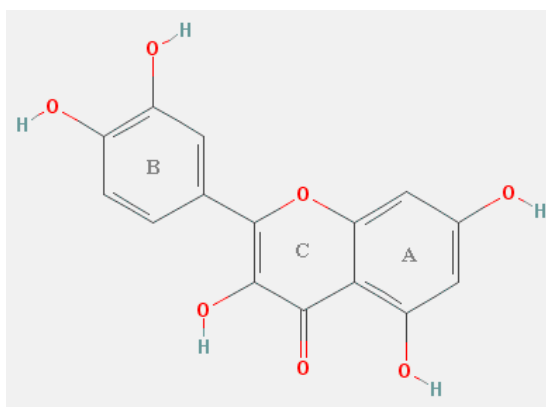
Слика 5. Подкласе флавоноида

Извор: Ren и сар., 2003 (модификовано)

### 1.5.1. КВЕРЦЕТИН

Кверцетин (QE, Quercetin) припада подкласи флавонола (3,3',4',5,6-пентахидроксифлавоон ( $C_{15}H_{10}O_7$ ), молекулске масе 302.24 g/mol) (Слика 6). Флавоноли се у биљкама налазе углавном у гликозидним облицима, а QE представља агликонски облик који настаје хидролизом гликозида. Како су најбогатији извори ових флавоноида јабуке, цитруси, броколи, црни лук, бобичасто воће, чај и црвено вино, може се рећи да су флавоноли и QE присутни у свакодневnoj исхрани људи (Nutrient data laboratory).

Синтеза флавонола у биљкама стимулирана је сунчевим зрацима, а флавоноли се акумулирају претежно у спољним слојевима плодова воћа. Могу да постоје различите концентрације флавонола у плодовима истог дрвета, чак и у истом плоду, у зависности од изложености сунчевим зрацима (D'Archivio и сар., 2007).



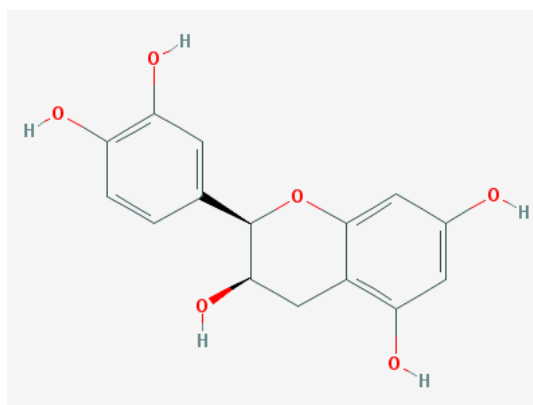
**Слика 6.** Структура кверцетина

Извор: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

### 1.5.2. ЕПИКАТЕХИН

Епикатехин (ЕС, (-)-Epicatechin) припада подкласи флаванола ((-)-cis-3,3',4',5,7-пентахидроксифлаван, (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>), молекулске масе 290.27 g/mol) (Слика 7). Флаваноли се у биљкама јављају у више хемијских форми и деривата, али се, за разлику од осталих флавоноида, не налазе у гликозидном облику, већ као мономери (катехини) или полимери (проантоцијанидини). Полимери могу да садрже и до 17 мономера катехина. Катехини поседују два хирална центра и четири изомера. Два изомера су у *trans* конфигурацији ((+)-катехин и (-)-катехин), а друга два у *cis* конфигурацији (епикатехини). ЕС представља најчешћи изомер епикатехина (Nagarajan и сар., 2008).

Катехини и њихови полимери су најзаступљенији у зеленом и црном чају, какао продуктима, чоколади, црвеном вину, кајсијама и бресквама, хлебним зрнима (Nutrient data laboratory). Сматра се да човек исхраном унесе дневно од 100 до 300 mg катехина, у мономерној или полимерној форми (Rice-Evans и Packer 2003). Полимери катехина, проантоцијанидини, одговорни су за опори укус воћа, грожђа, вина и зеленог чаја и за горчину чоколаде (D'Archivio и сар., 2007).



Слика 7. Структура (-)-епикатехина

Извор: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 1.5.3. МЕТАБОЛИЗАМ ФЛАВОНОИДА

Иако је важно у којој мери су поједини нутријенти заступљени у храни, још је важније колико су биорасположиви. Биорасположивост се дефинише као количина нутријента унета храном, апсорбована и метаболирана преко метаболичких путева (D'Archivio и сар., 2007). Флавоноли се, као и већина флавоноида, у храни налазе везани за шећере као  $\beta$ -гликозиди. Флаваноли се не налазе у гликозидном облику, али су присутни као полимери. Ни једни ни други не могу да буду апсорбовани у таквом облику већ, да би били апсорбовани, морају да буду хидролизоване од стране ензима или микрофлоре. Облик који доспе у циркулацију зато може да буде другачији од облика унетог храном.

У горњим деловима цревног тракта метаболичке промене ових флавоноида нису интензивне, мада у усној шупљини долази до хидролизе појединих QE гликозида, од стране ензима епителних ћелија или уз помоћ бактерија. Настанком фармаколошки активних QE агликона омогућен је њихов локални ефекат на инхибицију пролиферације канцера усне шупљине (Walle и сар., 2005). QE гликозиди, као и катехини, отпорни су на киселу средину желуца и у непромењеном облику доспевају до танког црева (D'Archivio и сар., 2007).

Све подкласе флавоноида, подлежу интензивном метаболизму у јејунуму и илеуму танког црева, а метаболити се затим порталном вену допремају у јетру, где се врши даљи метаболизам (Слика 8 и 9). Апсорпција флавонола у танком цреву зависи од типа шећерне јединице QE гликозида. Кверцетин 3-O- $\beta$ -гликозид се много боље апсорбује од рутина (QE рамнозилгликозида), па чак и од QE агликона, а биодоступност гликозида кверцетина из јабука ( $\beta$ -галактозиди и  $\beta$ -ксилозиди) износи свега 30 % од биодоступности кверцетина из црног лука ( $\beta$ -гликозид) (Hollman, 2004). Иако гликозиди имају ниску липофилност да би могли пасивно да дифундују кроз биолошке мембране попут агликона, два механизма објашњавају бољу апсорпцију гликозида у односу на QE агликон.

Први механизам укључује мембрански транспортер SGLT-1 (натријум зависни глукозни транспортер), мада о овоме постоје опречна мишљења (Day и сар., 2003; Kottra и Daniel 2007). Њиме се гликозиди активним транспортом убацују у ентероците где затим подлежу дегликолизацији од цитосолне  $\beta$ -глукозидазе (GBA3), ензима укљученог у

детоксификацију биљних гликозида. Други механизам укључује хидролизу гликозида од лактаза-флоризин хидролазе (LPH), смештене на мембрани ентероцита са активним местом окренутим према лумену црева. Својом активношћу LPH отпушта QE агликоне, који потом пасивно дифундују преко мембране (Day и сар., 2003).

ЕС и друге катехине мономере брзо апсорбује танко црево, док олигомери и полимери (проантоцијанидини) доспевају до колона где их метаболишу цревни микроорганизми. У апсорпцију катехина укључен је транспортер монокарбоксилата (MCT), који има улогу и у апсорпцији једноставних фенолних киселина (Vaidyanathan и Walle, 2003). Апсорпцију донекле умањују мембранске АТФ-азе, које гликозиде, као и коњугате катехина, настале у ентероцитама, транспортују назад у лумен црева (Vaidyanathan и Walle, 2003). Слаба апсорпција полимера, проантоцијанидина, у танком цреву може да буде значајна за постизање локалних ефеката на цревни епител (Cheung и сар., 2014).

Цревна микрофлора такође има значајну улогу у метаболизму флавоноида. Полимери катехина и QE гликозиди који нису апсорбовани у танком цреву, као и коњугати који су након апсорпције секретовани преко жучи, доспевају у колон. Деловањем ензима  $\beta$ -гликозидазе,  $\alpha$ -рамнозидазе и  $\beta$ -глукуронидазе микрофлоре у колону, гликозидни облици се хидролизују у шећере и QE агликон, који онда може да буде апсорбован (Graf и сар., 2006). Микрофлора колона разлаже флавоноиде до продуката који се очигледно апсорбују, с обзиром да могу да се детектују у плазми и урину. Деградациони продукт флавонола је фенилсирћетна киселина, а катехина валеролактон (бензенов прстен са бочним ланцем од пет С-атома) (Hollman, 2004). Учешћем колона у метаболизму флавоноида настаје ентерохепатично кружење и продужава се време задржавања флавоноида у организму.

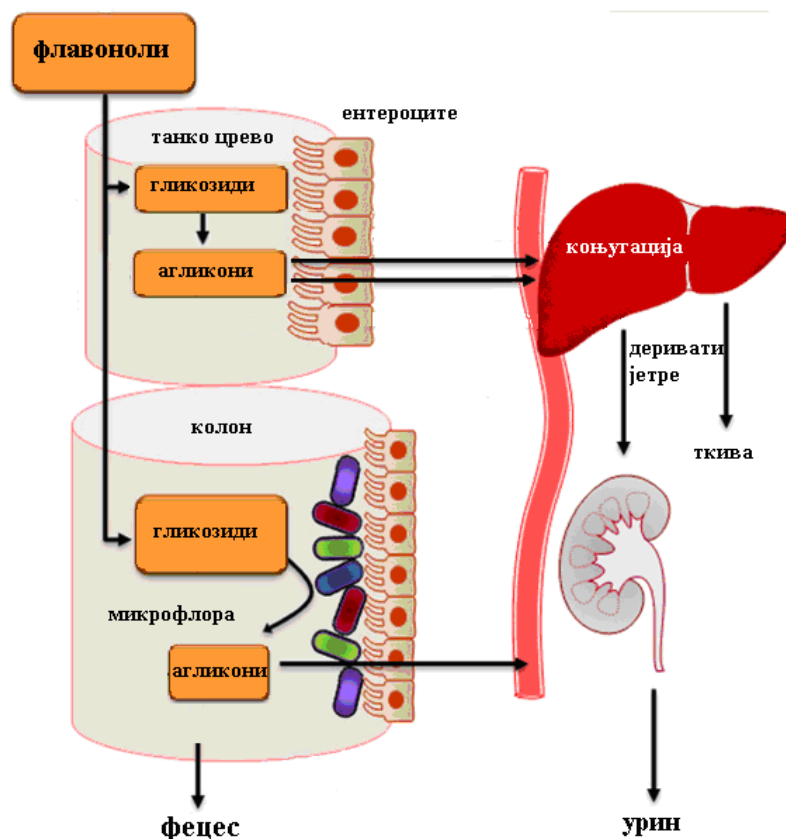
Студије које су испитивале утицај других састојака хране на апсорпцију флавоноида показале су да је апсорпција флавонола или катехина из црног чаја непромењена у присуству млека у чају. Могло би се очекивати да апсорпција флавоноида из вина буде донекле повећана због присуства етанола који повећава њихову солубилност, али није детектовано повећање катехина у плазми (Dopovan и сар., 1999; Hollman, 2004).

Јетра је главни орган за метаболизам флавоноида. У јетри се од стране ензима II фазе обављају процеси метилације, сулфатације и глукуронидације флавонола и

флаванола, који представљају метаболичке процесе детоксификације заједничке за многе ксенобиотику (D'Archivio и сар., 2007). Овим процесима се повећава хидрофилност ових флавоноида са циљем да се убрза њихова елиминација из организма. Катехол-О-метил трансфераза (COMT) је један од ензима који учествује у процесима метилације кверцетина и катехина, и мада је присутна у другим ткивима, њена активност је најизраженија у јетри. Метилација катехина се, захваљујући деловању COMT обавља и у танком цреву. Сулфатација флавоноида настаје деловањем сулфотрансфераза, које катализују трансфер сулфата са 3-фосфоаденозин-5-фосфосулфата на хидроксилне групе флавоноида. За глукуронидацију флавоноида у јетри, али и у танком цреву, одговорне су UDP-глукуронилтрансферазе, мембрански везани ензими у ендоплазматичном ретикулуму. Поред реакција коњугације, флавоноиди у мањој мери подлежу и процесима оксидације, који могу да утичу на њихову биолошку активност. Хидроксилацијом и деметилацијом катализованим од CYP (енг. *cytochrome P450*) изоензима могу да настану метаболити мање или више активни од почетног (Breinholt и сар., 2002). Индивидуалне разлике у активности ових ензима могу да утичу на различит исход деловања флавоноида.

Процеси коњугације флавонола су врло ефикасни тако да се у плазми готово не срећу агликонски облици кверцетина. Најприсутнији коњугат кверцетина у плазми је 3-О-β-D-глукуронид (D'Archivio и сар., 2007). За разлику од кверцетина, агликони (мономери) катехина у плазми могу да се детектују од 10 до 80 % у зависности од типа катехина (Hollman, 2004). Поред катехина, циркулишући катехински метаболити су углавном глукуронидни коњугати, (+)-катехин 5-О-β-глукуронид и (-)-епикатехин 5-О-β-глукуронид, као и 3'-О-метил катехин. Мада метилација, као и глукуронидација, може да смањи биоактивност флавоноида, може да утиче и на смањење њихове потенцијалне токсичности, с обзиром да катехолне групе могу бити оксидоване у токсичне хиноне (Scalbert и сар., 2002).

Метаболити се у плазми налазе везани за албумине, а афинитет за везивање варира у зависности од хемијске структуре, па тако и стопа екскреције или снабдевање ћелија и ткива (D'Archivio и сар., 2007). Још увек није сасвим јасно да ли биолошке ефекте флавоноиди остварују у слободној форми или везани за албумин. Студија Dufour и сар. (2007), показала је да кверцетин ефикасно одлаже процес липидне пероксидације и у везаној форми.

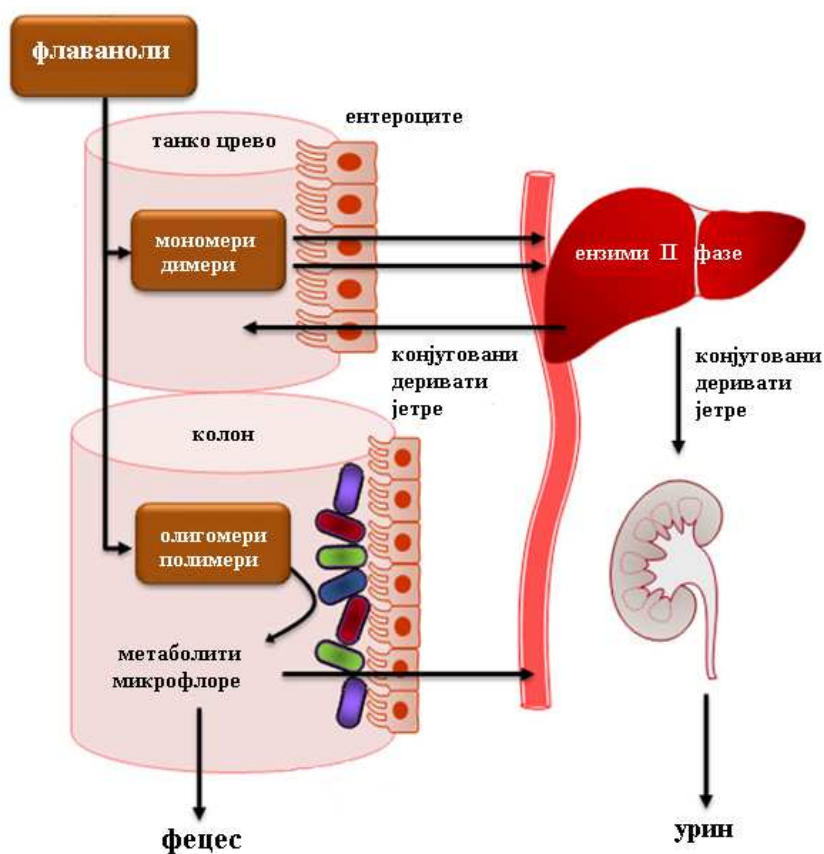


Слика 8. Метаболички путеви флавонола (кверцетина)

Извор: Pérez-Cano и сар., 2013. (модификовано)

Након оралног уноса флавонола, максималне концентрације у плазми постижу се за око 0.5 до 6 сати, а концентрација опада у току наредних 24 до 48 сати. Катехини се, након оралног уноса углавном метаболишу у наредних 24 часа. Глукорониди и интензивно коњуговани метаболити елиминишу се преко жучи, док се мали коњугати, попут моносульфата екскретују урином (D'Archivio и сар., 2007). Док за друге подкласе флавоноида проценат уринарне екскреције може да износи и до 60 % од количине унетих флавоноида, за флавоноле износи свега 0.1 до 3.6 % (Hollman, 2004). Добра апсорпција и низак проценат екскреције гликозида кверцетина упућују на интензивни метаболизам овог флавоноида. Процент уринарне екскреције за катехине из зеленог чаја и црвеног вина је у рангу од 0.5 до 10 %, а за епикатехин из какаоа до 30 % (D'Archivio и сар., 2007).

Ефекти које флаваноиди остварују зависе од њиховог уноса и биорасположивости, а она обухвата интестиналну апсорпцију, метаболизам микрофлоре, метаболизам у цревима и јетри, природу циркулишућих метаболита, везивање за албумин, акумулацију у ткивима и билијарну и уринарну екскрецију. Података о биорасположивости метаболита и метаболичким облицима флаваноида који доспевају до ћелија и ткива још увек има мало, не само у студијама на људима већ и на животињским моделима.



Слика 9. Метаболички путеви флаванола (катехина)

Извор: Pérez-Cano и сар., 2013. (модификовано)



### 1.5.4. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ ФЛАВОНОИДА

Флавоноиди показују широк спектар биолошке активности, па исхрана биљним производима у којима су широко заступљени делује превентивно на очување здравља. Због својих активности флавоноиди имају важну улогу у и фармацеутској индустрији као лекови и антиоксиданти. Извор флавоноида, поред биљака у исхрани, могу бити и суплементи који се користе као алтернативна терапија за лечење алергија, астме, бактеријских инфекција, артритиса, гихта, хипертензије и неуродегенеративних поремећаја (Larson и сар., 2012).

Често конзумирање катехина у исхрани повезано је са смањењем ризика од кардиоваскуларних болести. Појам „француски парадокс“ односи се на појаву да становништво јужне Француске мање болује од кардиоваскуларних болести, иако њихова исхрана садржи већу количину засићених масти него просечна исхрана становништва осталих развијених земаља. Истраживања тог феномена показују да разлог може бити конзумирање умерене количине црног вина, које може да смањи ризик од болести срца и до 40 % (Nijveldt и сар., 2001). Механизми којима катехини остварују протективно дејство на кардиоваскуларни систем укључују регулацију васкуларног тонууса повећањем еластичности зида капилара, имуномодулацију, ефекте на функције тромбоцита и инхибицију оксидативног стреса (Vøhn и сар., 2012; Peng и сар., 2013).

Катехини црног вина спречавају оксидацију LDL-холестерола, умањују његову растворљивост и апсорпцију у цреву, и побољшавају метаболизам глукозе (Ikeda и сар., 1992). QE такође показује јаку антидијабетичну активност, инхибирајући кључне ензиме  $\alpha$ -глукозидазу,  $\alpha$ -амилазу и липазу (Larson и сар., 2012). Нађено је да агликони и гликозиди кверцетина, као и катехини, инхибирају експресију и активност циклооксигеназа, липооксигеназа, ксантин оксидаза и фосфодиестераза, ензима укључених у процесе инфламације и атеросклерозе (Middleton и сар., 2000; Ishizawa и сар., 2011; Peng и сар., 2013). Кверцетин и његови метаболити инхибирају мијелопероксидазу, коју секретују активирани неутрофили и макрофаги (Shiba и сар., 2008), отпуштање хистамина и синтезу интерлеукина у базофилима (Kawai и сар., 2007).

Антивирусна активност кверцетина и катехина показана је на преко 11 типова вируса, укључујући херпес, коксаки и полио вирус, и сматра се да вероватно укључује

инхибицију вирусне полимеразе. Метаболити кверцетина и катехина показују бактериостатичко и бактерицидно дејство, инхибирањем синтезе нуклеинских киселина или функција ћелијске мембране бактерија (Cushnie и Lamb, 2005; Ishisaka и сар., 2011).

Флавоноиди испољавају антиканцерогено деловање, што је показано на ћелијским линијама *in vitro* и код експерименталних животиња. Описано је више механизма, који укључују инхибицију пролиферације, активацију и контролу апоптозе, модулацију ћелијских сигналних путева и индукцију ензима II фазе детоксификације (Ren и сар., 2003; Walle и сар., 2005; Nagarajan и сар., 2008; Vøhn и сар., 2012; Batra и Sharma, 2013).

Доста пажње последњих година посвећено је њиховом антиоксидативном деловању. У *in vitro* студијама ефеката агликона и гликозида кверцетина показано је да су у стању да инхибирају процес липидне пероксидације (Middleton и сар., 2000; Graf и сар., 2006). Lotito и Fraga (1998) су објавили да катехини *in vitro* спречавају оксидацију хумане плазме. Редовно конзумирање хране богате флавоноидима доприноси смањењу неуродегенеративних поремећаја код деменције или Паркинсонове и Алцхајмерове болести. Показано је да су кверцетини и катехини у стању да умање последице оксидативног стреса у неуронима које прате ове болести (Zhao 2009; Ishisaka и сар., 2011). Бројне студије показују да ови флавоноиди имају хепатопротективно дејство (Quine и Raghu, 2005; Si и сар., 2011), и да су у стању да умање оштећења бубрежних тубула (Tanabe и сар., 2012; Hsieh и сар., 2013). Исхрана богата кверцетином пружа заштиту од оштећења коже индукованих UV зрачењем (Svobodova и сар., 2003).

Антиоксидативно деловање флавоноида резултат је њиховог капацитета да хелирају јоне транзиционих метала и/или способности да „хватају“ и неутралишу слободне радикале, као доноси водоника или електрона (Bors и сар., 1990; Mira и сар., 2002). У реакцији флавоноида са слободним радикалима настају мање реактивни флавоноидни феноксидни радикали (Middleton и сар., 2000). Способност да прекину ланчане реакције оксидације флавоноиди имају захваљујући хидроксилним групама у В-прстену, при чему ефикасност зависи од броја и позиције хидроксилних група (Mira и сар., 2002).

## **2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

Бакар као есенцијални микроелемент има важну улогу у биолошким системима међутим, повећане концентрације могу да изазову токсичне ефекте. Бакар као прелазни метал може да стимулише продукцију реактивних врста кисеоника преко *Fenton*-ове и *Haber-Weiss*-ове реакције и доведе до оксидативних оштећења у еритроцитима и ткивима, пре свега у јетри која учествује у његовом метаболизму.

Флавоноиди чине бројну групу природних биљних полифенолних једињења која поседују антиоксидативни капацитет. Флавоноиди могу да испоље своја антиоксидативна својства различитим механизмима, који произилазе из директне реакције са слободним радикалима или хелацијом јона метала, који би у даљим реакцијама произвели слободне радикале. У највећем броју студија *in vivo*, истраживања деловања флавоноида односила су се на флавоноиде у биљним екстрактима.

Циљ истраживања ове докторске дисертације је испитивање ефеката субхроничне интоксикације бакром на хематолошко-биохемијске параметре у крви, оксидативни метаболизам еритроцита и параметре оксидативног стреса у јетри пацова. Такође, циљ је и испитивање потенцијалних антиоксидативних и цитопротективних ефеката, односно протективног капацитета и синергистичког деловања флавоноида кверцетина (QE) и епикатехина (EC), као чистих супстанци, у условима оксидативног стреса. Упоређивани су и ефекти примењених флавоноида и комерцијалног лека D-пенициламина (DPA) који се користи за третман обољења чији је узрок повећано акумулирање бакра у ткивима (Вилсонова болест).

У експерименталном раду ове докторске дисертације испитивани су:

- хематолошки параметри: број еритроцита (RBC), концентрација хемоглобина (Hb), хематокрит (Hct), број леукоцита (WBC), број тромбоцита (Plt), хематолошки индекси,
- биохемијски параметри у крви: концентрације електролита (K, Na, Ca, Fe, фосфата), концентрације укупних протеина, албумина, глукозе и укупног холестерола, активности ензима аспарат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP), гама-глутамил трансептидазе (GGT) и лактат дехидрогеназе (LDH),

- одређивање редокс-статуса:
  - концентрације липидних пероксида (LPO) у еритроцитима и јетри,
  - концентрације реактивних врста кисеоника и азота у еритроцитима: супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ), водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) и нитрита ( $NO_2^-$ ),
  - концентрације редукованог (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у еритроцитима и јетри,
  - концентрације аскорбинске киселине (Vit C) у јетри,
  - активности антиоксидативних заштитних ензима: супероксид-дисмузе (SOD), каталазе (CAT), глутатион-пероксидазе (GSH-Px), глутатион-редуктазе (GR), као и глутатион-S-трансферазе (GST) у еритроцитима и јетри, и
- концентрације бабра и церулоплазмина (CP) у еритроцитима и јетри.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Студија је изведена на мужјацима пацова соја *Wistar albino*, старим 8 недеља и тежине  $230 \pm 20$  g на почетку експеримента. Животиње су гајене у појединачним пластичним кавезима у стандардним лабораторијским условима (температура  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 12 часовни циклус светлост/мрак) у виваријуму Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Животиње су добијале стандардну брикетирану храну (Ветеринарски завод Земун) и воду *ad libitum*. Експерименти су изведени у складу са Законом о добробити животиња („Службени гласник РС“, број: 41/09) донетом од стране Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде 2009. године, на основу Директиве 86/609 Европске конвенције о заштити кичмењака намењених у огледне и друге научне сврхе (ETS 123).

### 3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ТРЕТМАН

Након периода адаптације од недељу дана, животиње су насумично подељене у 5 група. У свакој групи било је по 7 животиња:

1. Контрола – примала физиолошки раствор (0.3 ml, *i.p.*),
2. Cu – третирана бакром (као  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  у концентрацији од 560 mg/L) преко воде за пиће у трајању од 5 недеља,
3. Cu+DPA – третирана бакром (као  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  у концентрацији од 560 mg/L) преко воде за пиће у трајању од 5 недеља и комерцијалним леком Д-пенициламином (DPA, Sandoz, Austria) (50 mg/kg ТТ, у 0.3 ml редестиловане воде, *i.p.*) сваког другог дана током последње 2 недеље експеримента. Животиње су примиле укупно 5 инјекција.
4. Cu+QE+EC – третирана бакром (као  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  у концентрацији од 560 mg/L) преко воде за пиће 5 недеља, а затим флавоноидима кверцетином и епикатехином (40 mg QE/kg ТТ + 40 mg EC/kg ТТ, у 0.3 ml редестиловане воде, *i.p.*) сваког трећег дана током последње 3 недеље експеримента. Животиње су укупно примиле 7 инјекција.
5. QE+EC – третирана флавоноидима кверцетином и епикатехином (40 mg QE/kg ТТ + 40 mg EC/kg ТТ, у 0.3 ml редестиловане воде, *i.p.*) сваког трећег дана

током последње 3 недеље експеримента. Животиње су укупно примиле 7 инјекција.

Концентрација  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  у води за пиће која је понуђена животињама утврђена је на основу оралне средње леталне дозе ( $\text{LD}_{50}$ ) за пацове (WHO). Количина воде и раствора  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  коју су животиње попиле мерена је сваког трећег дана. Није било уинулих животиња.

### 3.3. ЖРТВОВАЊЕ ЖИВОТИЊА И ПРИПРЕМА УЗОРАКА

На крају експерименталног периода од пет недеља, 24 h након последње инјекције, животиње су измерене, анестезиране етром и жртвоване декапитацијом. Животиње су дисековане на леду, одвојено ткиво јетре испрано је у хладном физиолошком раствору и замрзнуто на  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  до будућих биохемијских анализа. Изоловано ткиво јетре је даље припремано за одређивање концентрације липидних пероксида (LPO), глутатиона (GSH), аскорбинске киселине (Vit C), протеина, активности ензима система антиоксидативне заштите (AOS), концентрације бакра и церулоплазмина.

Анализе хематолошких и биохемијских параметара у крви рађене су на дан жртвовања у акредитованој биохемијској лабораторији у Крагујевцу. За хематолошке анализе пуна крв сакупљана је у микротубе са антикоагулансом K-EDTA. За анализу биохемијских параметара пуна крв сакупљана је у епрувете без антикоагуланаса. Након центрифугирања од 10 минута на  $1000\times g$  издвојен је серум.

Анализе биомаркера оксидативног стреса и компоненти AOS, рађене су у лизату еритроцита и супернатанту јетре у Лабораторији за Експерименталну физиологију, Института за биологију и екологију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Све хемикалије, коришћене за прављење раствора и пуфера, биле су аналитичког (*pro analysi*) степена чистоће, купљене од фирми Sigma-Aldrich (Germany) и Merck (Darmstadt, Germany).

За анализе биомаркера оксидативног стреса и компоненти AOS пуна крв сакупљана је у епрувете са хепарином. Узорци хепаринизоване крви центрифугирани су 10 минута на  $1000\times g$  ( $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Еритроцити су одвојени од плазме, испрани три пута физиолошким раствором (0.9 %, *v/v*) у односу 1:3, центрифугирани 10 минута на  $1000\times g$  и лизирани на леду 30 минута.



### 3.4. АНАЛИТИЧКЕ МЕТОДЕ

#### 3.4.1. ХЕМАТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ

Хематолошка анализа обухватила је одређивање следећих параметара: броја еритроцита (RBC), хемоглобина (Hb), хематокрита (Hct), укупних леукоцита (WBC), лимфоцита (Lym), моноцита (Mon), гранулоцита (Gra), тромбоцита (Plt), тромбокрит (Pct), као и хематолошких индекса: MCV (*Mean Cell Volume* – просечан волумен еритроцита), MCH (*Mean Cell Hemoglobin* – просечна концентрација хемоглобина), MCHC (*Mean Cell Hemoglobin Concentration* – просечна концентрација хемоглобина по еритроциту), RDW (*Red Cell Distribution Width* – расподела еритроцита по волумену), MPV (*Mean Platelet Volume* – просечан волумен тромбоцита), PDW (*Platelet Distribution Width* – расподела тромбоцита по волумену). Анализе су обављене стандардним методама и процедурама на аутоматизованом хематолошком анализатору *Horiba Medical ABX Micros 60* (Japan).

#### 3.4.2. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Биохемијска анализа обухватила је одређивање следећих параметара у серуму: укупних протеина, албумина, глукозе, укупног холестерола, активности ензима аспартат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP), гама-глутамил трансептидазе (GGT) и лактат дехидрогеназе (LDH) и концентрације калијума (K), натријума (Na), калцијума (Ca), гвожђа (Fe) и укупних фосфата (Phos).

Концентрација укупних протеина одређена је биуретском колориметријском методом. Концентрације глукозе и укупног холестерола и активности ензима AST, ALT, ALP, GGT и LDH одређене су спектрофотометријски (*BioSystem BTS 330*, Spain). Глукоза се под дејством ензима глукозооксидазе оксидише до глуконске киселине уз издвајање водоник пероксида. Оксидативном кондензацијом донора водоника, фенола, у присуству пероксидазе настаје хромоген хинонимин са максимумом апсорпције на 510 nm. Метода за одређивање концентрација укупног холестерола заснива се на хидролизи холестерол естара до холестерола и масних киселина, под дејством холестеролестеразе (CHOD-PAP спектрофотометријска метода). AST катализује реакцију трансаминације, при чему настаје оксалацетат, који се редукује до малата у присуству NADH. Брзина оксидације NADH је

директно пропорционална активности AST. ALT катализује реакцију трансминације, при чему настаје пируват, који се редукује до лактата у присуству NADH. Брзина оксидације NADH је директно пропорционална активности ALT. Активност ALP одређена је на основу њене особине да катализује хидролизу фенолно или алкохолно фосфатних естара, а ослобођена количина фосфата мери се спектофотометријски са амонијум молибдатом. Активност GGT одређена је спектрофотометријски на 412 nm, уз коришћење глицил глицина као акцептора гама-глутамил групе чији трансфер катализује овај ензим. Активност LDH је одређена на основу њене особине да катализује редукацију пирувата до лактата, уз присуство NADH, при чему је брзина оксидације NADH директно пропорционална активности LDH. Концентрације електролита K, Na, Ca, Fe и Phos у серуму одређене су директном потенциометријом са јон селективним електродама (*Electrolyte analyzer Easylite, Medica, USA*).

### **3.4.3. АНАЛИЗЕ БИОМАРКЕРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА**

#### **3.4.3.1. Одређивање концентрација ROS и RNS у лизату еритроцита**

*Раствори:*

- 3 М перхлорна киселина (PCA)
- 20 mM етилендиаминотетрасирћетна киселина (EDTA)
- 2 М калијум карбонат ( $K_2CO_3$ )

*Експериментални поступак:*

Узорци за одређивање концентрације ROS екстраховани су из лизата еритроцита уз коришћење 3 М PCA и 20 mM раствора EDTA, у запреминском односу 1:½:2 (0.6 ml лизата + 0.3 ml 3 М PCA + 1.2 ml 20 mM EDTA). Екстракција је вршена на леду у трајању од 15 минута. По завршеној екстракцији узорци су центрифугирани 10 минута на 1000×g. Добијени супернатант (~1 ml) издвајан је у чисте тубе и неутрализован (pH 7.0) 2M раствором  $K_2CO_3$  (~150 µl).

Концентрације ROS одређене су на основу апсорбанце, која је мерена спектофотометријски у претходно добијеним екстрактима (L-Arg екстракти). Разблажења у току прављења хемолизата, екстракције и спектофотометријског читавања узета су у обзир при прерачунавању концентрација.

### 3.4.3.1.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ )

Концентрација  $O_2^{\bullet-}$  одређена је методом по Auclair и Voisin-у (1985). Метода представља тест, који се користи као мера стварања  $O_2^{\bullet-}$  у хемијским и биолошким системима, а заснива се на редукцији нитроблу-тетразолијума (NBT) до нитроблу-формаза у присуству  $O_2^{\bullet-}$ .

*Раствори:*

- 50 mM Tris-HCl пуфер (pH 8.6)
- 0.1 mM EDTA
- 0.1 mM NBT
- 0.1 mg/ml гелатин

*Експериментални поступак:*

Апсорбанца слепе пробе (A1) 0.95 ml реакционе смеше (50 mM Tris-HCl пуфер (pH 8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NBT и 0.1 mg/ml гелатина) и 0.05 ml дестиловане воде очитана је на 550 nm (*UV/VIS spectrophotometer, Jenway, UK*). Апсорбанца узорка (A2) очитана је 5 минута након реакције која почиње додавањем 0.95 ml реакционе смеше у 0.05 ml L-Arg екстракта на 550 nm. На основу разлике у апсорбанцама  $\Delta A$  (A2-A1) и моларног екстинционог коефицијента (F), који за 1  $\mu\text{mol}$  моноформаза износи 0.015 на 550 nm, израчунате су концентрације  $O_2^{\bullet-}$  и изражене у nmol/L еритроцита.

### 3.4.3.1.2. Одређивање концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ )

Метода за одређивање концентрације  $H_2O_2$  заснива се на оксидацији фенол црвеног (Phenol Red) водоник пероксидом у присуству пероксидазе рена (Horseradish Peroxidase - HRPO) као катализатора (Pick и Keisari, 1980).

*Раствори:*

- 0.28 mM фенол црвено (*phenol red solution- PRS*)
- пероксидаза рена тип II ензим 1 Јед./ml (HRPO)
- 1 M NaOH

*Експериментални поступак:*

У 0.05 ml L-Arg екстракта додато је 0.05 ml реакционе смеше (0.28 mM PRS и HRPO тип II ензим 1 Јед./ml). Реакциона смеша је мешана на вортекс мешалици и инкубирана 60 минута на 37 °C. После инкубирања, реакција је заустављена додавањем 0.01 ml 1 M NaOH. Слепа проба и серија стандардних раствора ( $C_1$  - 2.5 nmol/ml,  $C_2$  - 5 nmol/ml,  $C_3$  - 10 nmol/ml,  $C_4$  - 20 nmol/ml) прошли су кроз исту процедуру. На основу апсорбанце очитане на 600 nm на Elisa microplate читачу (*Optic Ivymen System, Model 2100-c; Biotech SL, Spain*) за стандардне растворе, одређен је екстинциони коефицијент  $F = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4)/4$ , где је  $\Delta A$  разлика апсорбанци стандардног раствора и апсорбанце слепе пробе. На основу апсорбанце узорка очитане на 600 nm и екстинционог коефицијента  $F$  за  $H_2O_2$ , одређена је концентрација  $H_2O_2$  и изражена у nmol/L еритроцита.

**3.4.3.1.3. Одређивање концентрације нитрита ( $NO_2^-$ )**

Концентрација  $NO_2^-$ , као индикатора NO, одређена је по методи Green-а и сар. (1982). У аеробном воденом раствору NO се примарно оксидује у  $NO_2^-$  (Ignarro и сар., 1993).

*Раствори:*

- сулфаниламидни реагенс (1% сулфаниламид у 5% фосфорној киселини),
- 0.1 % N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED)

*Експериментални поступак:*

У 0.05 ml L-Arg екстракта додато је 0.05 ml сулфаниламидног реагенса (1% сулфаниламид растворен у 5% фосфорној киселини). После мешања на вортекс мешалици и инкубирања 10 минута на собној температури, смеши је додато 0.05 ml 0.1 % раствора NED-а. Након мешања на вортекс мешалици и инкубирања 10 минута на собној температури у мраку, апсорбанца је очитана на 550 nm на Elisa microplate читачу (*Optic Ivymen System, Model 2100-c; Biotech SL, Spain*). Слепа проба и серија стандардних раствора ( $C_1$  - 3 nmol/ml,  $C_2$  - 6 nmol/ml,  $C_3$  - 12 nmol/ml,  $C_4$  - 24 nmol/ml,  $C_5$  - 48 nmol/ml,  $C_6$  - 72 nmol/ml) прошли су кроз исту процедуру. На основу апсорбанце очитане на 550 nm за стандардне растворе одређен је екстинциони коефицијент  $F = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4 + \Delta A_5 + \Delta A_6)/6$ , где је  $\Delta A$  разлика апсорбанци стандардног раствора и апсорбанце слепе пробе. На

основу очитане апсорбанце узорка и слепе пробе, екстинционог коефицијента F и фактора разблажења Fd израчуната је концентрација  $\text{NO}_2^-$  и изражена у  $\mu\text{mol/L}$  еритроцита.

### 3.4.3.2. Одређивање концентрације липидних пероксида (LPO) у еритроцитима и ткивима

Метода за одређивање концентрације LPO (TBARS анализа - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances assay*) заснива се на реакцији продуката липидне пероксидације (малонилдиалдехида - MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА) (Ohkawa и сар., 1979).

#### Еритроцити

*Раствори:*

- 28% трихлорсирћетна киселина (ТСА)
- 0.1 М натријум-арсенит
- 1 % ТВА (у 0.05 N расвору NaOH)

*Експериментални поступак:*

Липидни пероксиди су екстраховани из лизата еритроцита додавањем 0.4 ml 28% ТСА (у 0.1 М натријум-арсениту) и 0.8 ml лизата. После 15 минута екстракције на леду, узорци су центрифугирани 10 минута на  $1000\times g$ . У 0.8 ml добијеног супернатанта додато је 0.2 ml 1% раствора ТВА у 0.05 N расвору NaOH. Смеша је мешана на вортекс мешалици и инкубирана 15 минута на  $100^\circ\text{C}$ . Кроз исту процедуру прошла је и слепа проба (0.8 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  + 0.2 ml 1% раствора ТВА у 0.05 N расвору NaOH). Апсорбанце, на основу којих је одређена концентрација, очитане су спектрофотометријски (*UV/VIS spectrophotometer, Jenway, UK*). На основу апсорбанце узорка и слепе пробе очитане на 530 nm, моларног екстинционог коефицијента (F), који за 1  $\mu\text{mol}$  малондиалдехида износи  $1.56\times 10^5$ , и фактора разблажења (Fd), израчунате су концентрације LPO и изражене у  $\mu\text{mol/L}$  еритроцита.

#### Ткива

*Раствори:*

- 1,15% KCl
- 28% ТСА
- 1% ТВА (0.05 M NaOH)
- 8.1% SDS

- 20% CH<sub>3</sub>COOH (pH 3.5)
- n-бутанол/пиридин (15:1 v/v)

*Експериментални поступак:*

Након постепеног одмрзавања 100 mg ткива јетре одмерено је на техничкој ваги и хомогенизовано у 1 ml 1,15% KCl (у односу 1:10) (*IKA ULTRA-TURRAX T18 basic*, Germany), а затим сонификовано ултрасоничним хомогенизатором (*BANDELIN SONOPLUS HD2070*, Germany) на фреквенцији од 20 KHz у трајању од 10 секунди. У 1 ml сонификата додато је 3.9 ml раствора (0.2 ml 8.1% SDS + 1.5 ml 20% CH<sub>3</sub>COOH (pH 3.5) + 1.5 ml 1% ТВА у NaOH + 0.7 ml dH<sub>2</sub>O). Након инкубирања од 60 минута на 95 °C, издвојено је 2 ml охлађеног узорка и додато 0.5 ml dH<sub>2</sub>O и 2.5 ml n-бутанола са пиридином (15:1 v/v). Смеша је промешана на вортексу и центрифугирана 10 минута на 1500×g. У супернатанту је очитана апсорбанца на 530 nm (*UV/VIS spectrophotometer*, Jenway, UK). Кроз исту процедуру прошла је и слепа проба. Концентрација је приказана као pmol MDA/g ткива уз коришћење моларног екстинкционог коефицијента за MDA који износи  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **3.4.4. АНАЛИЗЕ НЕЕНЗИМСКИХ КОМПОНЕНТИ AOS**

Неензимске компоненте AOS, редуковани глутатион (GSH) и оксидовани глутатион (GSSG), одређени су у лизату еритроцита и супернатанту јетре, а концентрација аскорбинске киселине (Vit C) у супернатанту јетре. Глутатион редокс индекс (GSH RI) израчунат је на основу формуле и изражен у арбитрарним јединицама (AU, енг. *Arbitrary Unit*) (Benzi и сар., 1988):

$$\text{GSH RI} = ([\text{GSH}] + 2 [\text{GSSG}]) / (2 [\text{GSSG}] \times 100)$$

### 3.4.4.1. Одређивање концентрације GSH

Концентрације GSH одређене су по методи *Beutler*-а (1975а), која се заснива се на оксидацији GSH 5,5-дитио-бис-2-нитробензоевом киселином (DTNB).

#### Еритроцити

##### *Раствори:*

- 0.1% EDTA
- раствор за преципитацију (1.67 g метафосфорне киселине, 0.2 g EDTA и 30 g NaCl растворено у 100 ml dH<sub>2</sub>O)
- 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 40 mg% DTNB, раствореног у 1% раствору Na-цитрата

##### *Експериментални поступак:*

У 0.05 ml лизата еритроцита додато је 0.2 ml 0.1% EDTA и 0.385 ml раствора за преципитацију. Узорци су екстраховани на леду 15 минута и центрифугирани 10 минута на 1000 × g. Супернатант је коришћен за мерење GSH и GSSG.

У 0.02 ml супернатанта додато је 0.16 ml 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 0.02 ml 0.04% DTNB у 1% Na-цитрату. После инкубације од 10 минута на собној температури, очитана је апсорбанца на Elisa microplate читачу (*Optic Ivymen System, Model 2100-c; Biotech SL, Spain*) на 405 nm. Исти поступак је спроведен за слепу пробу и серију стандардних раствора GSH (C<sub>1</sub> - 15 μmol/ml, C<sub>2</sub> - 30 μmol/ml, C<sub>3</sub> - 45 μmol/ml, C<sub>4</sub> - 60 μmol/ml). На основу апсорбанце очитане за стандардне растворе одређен је екстинциони коефицијент  $F = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4) / 4$ , где је  $\Delta A$  разлика апсорбанце стандардног раствора и апсорбанце слепе пробе. На основу вредности апсорбанци узорака и слепе пробе, екстинционог коефицијента F и фактора разблажења Fd, израчунате су концентрације GSH и изражене у nmol GSH/ml еритроцита.

### Ткива

#### Раствори:

- преципитациони раствор (0.1 М Na-фосфатни пуфер у 0.005 М EDTA (pH 8.0) и 25%  $\text{HPO}_3$ )
- 0.1% EDTA
- 0.3 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0.04% DTNB у 1% Na-цитрату

#### Експериментални поступак:

Након постепеног одмрзавања 100 mg ткива јетре одмерено је на техничкој ваги и хомогенизовано на леду у 1.9 ml преципитационог раствора (1.5 ml 0.1 М Na-фосфатни пуфер у 0.005 М EDTA (pH 8.0) + 0.4 ml 25%  $\text{HPO}_3$ ) у односу 1:20 (*IKA ULTRA-TURRAX T18 basic*, Germany), а затим сонификовано ултрасоничним хомогенизатором (*BANDELIN SONOPLUS HD2070*, Germany) на фреквенцији од 20 KHz у трајању од 10 секунди. Узорци су центрифугирани 30 минута на  $10000\times g$  на 4 °C. Супернатант је коришћен за мерење GSH и GSSG.

У 0.5 ml супернатанта додато је 0.75 ml 0.2 М Na- $\text{PO}_4$  пуфера (pH 7.4), 0.1 ml 0.04% DTNB у 1% Na-цитрату и 0.04 ml NaOH, а затим инкубирано 15 минута на собној температури. Апсорбанце су очитане на Elisa microplate читачу (*Optic Ivymen System, Model 2100-c; Biotech SL, Spain*) на 405 nm. На основу вредности апсорбанци очитаних за узорке и слепу пробу, екстинкционог коефицијента F и фактора разблажења Fd, израчунате су концентрације GSH и изражене као nmol GSH/mg протеина.



### 3.4.4.2. Одређивање концентрације GSSG

Концентрације GSSG одређене су по методи *Beutler*-а (1975б). Метода се заснива на редукцији GSSG у GSH у присуству глутатион-редуктазе (GR) и NADPH као кофактора.

#### Еритроцити и ткива

*Раствори:*

- 4-винилпиридин (растворен у етанолу у односу 1:4)
- 0.08 М К-РО<sub>4</sub> пуфер (pH 7.4)
- 0.2 mM NADPH
- GR (1.0 Јед./ml)
- 1.5 mM DTNB (растворен у 5% NaHCO<sub>3</sub>)

*Експериментални поступак:*

У 0.4 ml GSH екстракта (супернатанта) додато је 0.008 ml 4-винилпиридина (раствореног у етанолу у односу 1:4). Након инкубације од 10 минута на собној температури, одмерено је 0.05 ml узорка и додато 0.1 ml реакционе смеше ензима која садржи 0.08 М К-РО<sub>4</sub> пуфер (pH 7.4), 0.2 mM NADPH, 1.5 mM DTNB (растворен у 5% NaHCO<sub>3</sub>) и GR (1.0 Јед./ml). После инкубације од 10 минута на собној температури очитане су апсорбанце на 405 nm на Elisa microplate читачу (*Optic Ivymen System, Model 2100-c; Biotech SL, Spain*).

Кроз исти поступак прошла је и слепа проба, која уместо екстракта садржи dH<sub>2</sub>O. На основу разлике добијених апсорбанци ΔA (A2-A1) и моларног екстинкционог коефицијента (F), који за 1 nmol NADPH износи 6.22, израчуната је концентрација GSSG и изражена у nmol GSSG/ml еритроцита и nmol GSSG/mg протеина.

### 3.4.4.3. Одређивање концентрације аскорбинске киселине (Vit C) у ткивима

За одређивање концентрације аскорбинске киселине (Vit C) у јетри коришћена је динитрофенилхидразинска метода (Omaye и сар., 1979). Метода се заснива на оксидацији аскорбинске киселине (AsA, Vit C, дикетогулонска киселина) у дехидро-аскорбинску киселину, која спонтано прелази у дикетогулонску киселину, а која са 2,4-динитрофенилхидразином (DNPH) гради бис-2,4-динитро-фенилхидразон. Растварањем бис-2,4-

динитро-фенилхидразона у 85 % сумпорној киселини добија се постојана црвено-мрка боја чији се максимум апсорпције читава спектрофотометријски на таласној дужини од 500-550 nm.

Оксидација Vit C у дехидро-аскорбинску киселину врши се помоћу активног угља, који поред оксидације има и улогу у обезбојавању ектракта у коме се одређује укупна концентрација Vit C.

*Раствори:*

- 6 % трихлорсирћетна киселина (TCA)
- 9 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 85 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Раствор 2,4-динитро-фенилхидразина (2,4-DNPH) и тиоурее ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CS): у 50 ml 9 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> раствори се 1 g 2,4-DNPH и 2 g (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CS уз енергично мућкање, а затим се филтрира кроз квантитативни филтер папир (Whatman N °12) и чува у тамној боци на +4 °C
- Активни угаљ (200 g активног угља загрева се до кључања у 1 L 10 % HCl, затим се филтрира и испира дестилованом водом док се не одстрани хлориди и суши на температури од 110 – 120 °C)
- стандардни раствор AsA (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)

*Експериментални поступак:*

За одређивање концентрације Vit C претходно је конструисана стандардна крива. Од стандардног раствора Vit C (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) који садржи 20 mg Vit C у 10 ml 6 % TCA, направљена су разблажења концентрација од 8 до 80 µg Vit C /4 ml. Мерењем апсорбанци стандардних раствора на 540 nm конструисана је стандардна крива.

Одмерено је 60 mg ткива јетре и хомогенизовано у 6 ml 6 % TCA, а затим центрифугирано 15 минута на 1500×g. Супернатанти су одливени у чисте епрувете којима је додато по 0.2 g пречишћеног активног угља. Узорци су промућкани и инкубирани 10 минута на собној температури. Оксидовани раствор је профилиран кроз филтер папир (Whatman N °12). Одмерено је 4 ml филтрата и додато по 1 ml 2,4-DNPH-тиокарбамидног реагенса. Узорци су инкубирани 10 минута на 100 °C, а затим пренети у ледено водено купатило на 0 °C. Награђени хидразони растворени су у 5 ml 85 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и инкубирани 10

минута на собној температури. На исти начин су припремљени узорци за стандардну криву и слепу пробу (садржи 4 ml 6 % ТСА уместо 4 ml оксидованог филтрата).

Апсорбанца је очитана спектрофотометријски (*UV/VIS spectrophotometer, Jenway, UK*) на 540 nm према слепој проби. Концентрација Vit C је израчуната помоћу стандардне криве и изражена у mg % Vit C (mg Vit C /100 g ткива).

### 3.4.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ ЕНЗИМА AOS

Активности ензима AOS, супероксид-дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион-пероксидазе (GSH-Px), глутатион-редуктазе (GR), и глутатион-S-трансферазе (GST) одређени су у еритроцитима и јетри. Узорци лизата еритроцита за одређивање активности ензима AOS чувани су на температури од -80 °C до даљих анализа. Непосредно пре извођења анализа, узорци су постепено одлеђени и мешани на вортекс мешалици.

Узорци ткива јетре за одређивање активности ензима AOS чувани су на температури од -80 °C до даљих анализа. Након постепеног одмрзавања, 500 mg ткива јетре (средњи режањ) одмерено је на техничкој ваги и измацерирано, а затим хомогенизовано на 4 °C у 5 ml сахарозног пуфера (0.25 M сахароза + 0.1 M EDTA + 0.05 M Tris са HCl pH 7.4) у односу 1:10 хомогенизатором *IKA ULTRA-TURRAX T18 basic* (Germany). Хомогенати су центрифугирани 120 минута на 4000×g на 4 °C (*JANETZKI K-24, Germany*). Добијени супернатанти јетре коришћени су за одређивање активности ензима SOD, CAT, GSH-Px, GR и GST и одређивање концентрације протеина јетре преко којих је изражена активност ензима.

Промена апсорбанци у одређеном временском интервалу при температури од 25 °C праћена је спектрофотометријски (*HALO DB-20 UV-VIS Double beam Spectrophotometer, Dynamica, Austria*). Разблажења током екстракције и спектофотометријског очитавања узета су у обзир при прерачунавању активности.

### 3.4.5.1. Одређивање концентрације хемоглобина (Hb) у еритроцитима

У хемолизату, одвојеном за одређивање активности ензима, одређена је концентрација Hb цијанметхемоглобинском методом (Drabkin и Austin, 1935). Метода се заснива на оксидацији Hb фeroцијанидом у метхемоглобин, који са калијум цијанидом (KCN) даје стабилан, обојени комплекс цијанметхемоглобина.

*Раствори:*

- Драбкин-ов реагенс

*Експериментални поступак:*

У 0.02 ml хемолизата додато је 5 ml Драбкин-овог реагенса. Смеша је промућкана и инкубирана 15 минута на собној температури у мраку. Апсорбанца је очитана на спектрофотометру (*UV/VIS spectrophotometer, Jenway, UK*) на таласној дужини од 545 nm.

На основу апсорбанци узорка, слепе пробе и фактора изведеног из апсорбанци стандардних раствора Hb (36.77) израчуната је концентрација Hb и изражена је у g %.

### 3.4.5.2. Одређивање концентрације протеина у ткивима

У ткиву јетре, ради одређивања активности ензима, одређене су концентрације протеина. Концентрација протеина одређена је методом која се заснива на биуретској реакцији купри јона (Cu(II)-јон,  $Cu^{2+}$ ) са пептидним везама протеина у алкалној средини и реакцији фосфолибденско-фосфоволфрамовског реагенса (Folin-Ciocalteu реагенс) са ароматичним аминокиселинама тирозином и триптофаном присутним у испитиваним протеинима (Lowry и сар., 1951). Cu(II)-јони везују се за пептидне везе испитиваних протеина и редукују у купро јоне (Cu(I)-јон,  $Cu^{+}$ ), при чему настаје комплекс Cu(I)-јон-протеин. Овај комплекс затим реагује са додатим Folin-Ciocalteu реагенсом. Као резултат наведених реакција настаје плаво обојен комплекс са максимумом апсорпције на таласној дужини од 500 nm, а добијена апсорбанца директно је пропорционална концентрацији протеина у узорку.

*Раствори:*

- 0.2 N NaOH
- Реагенс I (2 %  $Na_2CO_3$  + 0.2 N NaOH)
- 0.13 M  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

- 0.13 М К-Na-tartarat
- Реагенс II (1 ml 0.13 М  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 1 ml 0.13 М К-Na-tartarat, допунити до 100 ml Реагенсом I)
- Folin-Ciocalteu реагенс разблажен у односу 1:2 са дестилованом водом

*Експериментални поступак:*

У епрувете са 1.5 ml Реагенса II (1 ml 0.13 М  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 1 ml 0.13 М К-Na-tartarat, допуњено до 100 ml Реагенсом I (2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0.2 N NaOH)) додато је 0.05 ml 0.2 N NaOH и 0.05 ml разблаженог узорка супернатанта јетре (разблажење 11). Након мешања на вортекс мешалици и инкубације од 15 минута на собној температури, додато је 0.3 ml Folin-Ciocalteu реагенса (разблажен са  $\text{dH}_2\text{O}$  у односу 1:2), смеша је промешана на вортекс мешалици и инкубирана још 30 минута на собној температури. Кроз исту процедуру је прошла и слепа проба (0.1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  уместо узорка).

Апсорбанца је измерена спектрофотометријски (*UV/VIS spectrophotometer, Jenway, UK*) на таласној дужини од 500 nm. Вредност концентрације протеина у испитиваним узорцима израчуната је помоћу калибрационе криве (конструисане на основу стандардних раствора познатих концентрација протеина BSA) и изражена је као mg протеина/ml хомогената ткива (mg/ml).

### **3.4.5.3. Одређивање активности SOD**

Активност ензима SOD (*EC 1.15.1.1*) одређена је у лизату еритроцита и супернатанту јетре пирогалолском методом (Marklund и Marklund, 1974), која се заснива на способности SOD да у алкалној средини инхибира спонтану аутооксидацију пирогалола. Активност SOD праћена је спектрофотометријски на таласној дужини од 420 nm.

#### **Еритроцити**

*Раствори:*

- етанол
- хлороформ
- Tris-HCl пуфер (1 М Tris-HCl + 5 mM EDTA, pH 8.0 подешен 10% HCl)
- пирогалол (10 mM пирогалол у 10 mM HCl)

*Експериментални поступак:*

Из узорака лизата еритроцита, пре одређивања активности ензима, прво је уклоњен хемоглобин. У 0.25 ml лизата додато је 1.5 ml dH<sub>2</sub>O (+4 °C) и инкубирано на леду 30 минута. Уз мешање на вортекс мешалици, додато је 0.5 ml етанола (-20 °C) и 0.3 ml хлороформа (-20 °C). Смеша је инкубирана 10 минута на леду, а затим центрифугирана 10 минута на 1000×g. Након центрифугирања уклоњен је хлороформски слој са екстрахованим хемоглобином. Активност ензима одређена је у бистром супернатанту (SOD екстракт).

У кивету за спектрофотометријско читавање додато је: 0.1 ml Tris-HCl пуфера (1 M Tris + 5 mM EDTA, pH 8.0 подешен 10% HCl), 0.02 ml SOD екстракта, 0.02 ml 10 mM раствора пирогалола (10 mM пирогалол у 10 mM HCl) и 1 ml dH<sub>2</sub>O. Промена апсорбанци праћена је на 420 nm у току 4 минута. На основу промена апсорбанци узорака и слепе пробе израчуната је активност ензима и изражена у Јед./ml еритроцита. Јединица активности SOD дефинише се као количина ензима која инхибира 50% реакције аутооксидације пирогалола.

**Ткива**

*Раствори:*

- Tris-HCl пуфер (1 M Tris-HCl + 5 mM EDTA, pH 8.0 подешен 10% HCl)
- пирогалол (10 mM пирогалол у 10 mM HCl)

*Експериментални поступак:*

У кивету за спектрофотометријско читавање додато је: 0.1 ml Tris-HCl пуфера (1 M Tris + 5 mM EDTA, pH 8.0 подешен 10% HCl), 0.01 ml супернатанта јетре, 0.02 ml 10 mM раствора пирогалола (10 mM пирогалол у 10 mM HCl) и 1 ml dH<sub>2</sub>O. Промена апсорбанци праћена је на 420 nm у току 4 минута. На основу промена апсорбанци узорака и слепе пробе израчуната је активност ензима и изражена у Јед./mg протеина. Јединица активности SOD дефинише се као количина ензима која инхибира 50% реакције аутооксидације пирогалола.

За одређивање активности MnSOD, у 0.1 ml узорка супернатанта јетре додато је 0.1 ml 8 mM KCN (у односу 1:1), да би се инхибирала активност CuZnSOD. Након инкубације од 15 минута на собној температури, активност MnSOD је одређена на начин описан за укупну SOD. Вредност за активност CuZnSOD добијена је као разлика активности укупне

SOD и активности MnSOD. Активност MnSOD и CuZnSOD у испитиваним узорцима изражена је Јед./mg протеина. Јединица активности SOD дефинише се као количина ензима која инхибира 50% реакције аутооксидације пирогалола.

#### 3.4.5.4. Одређивање активности CAT

Активност ензима CAT (*EC 1.11.1.6*) одређена је у лизату еритроцита и супернатанту јетре методом по Beutler-у (1982), која се заснива на праћењу брзине разградње  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{O}_2$  под дејством ензима CAT. Пад апсорбанце услед потрошње  $\text{H}_2\text{O}_2$  детектује се спектрофотометријски на таласној дужини од 230 nm.

##### Еритроцити и ткива

###### *Раствори:*

- Tris-HCl пуфер (1 М Tris-HCl + 5 mM EDTA, pH 8.0 подешен 10% HCl)
- апсолутни етанол
- 1 М фосфатни пуфер, pH 7.0
- 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$

###### *Експериментални поступак:*

У кварцну кивету за спектрофотометријско читавање додато је 0.05 ml Tris-HCl пуфера (1 М Tris + 5 mM EDTA, pH 8.0 подешен 10% HCl), 0.01 ml лизата еритроцита, чији је фактор разређења 101 (0.01 ml лизата + 1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  + 0.01 ml апсолутног етанола), или 0.005 ml супернатанта јетре, и 1 ml 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Промена апсорбанци праћена је на 230 nm у току 2.5 минута. Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  од 10 mM онемогућава издвајање кисеоника у виду мехурића у току спектрофотометријског читавања. Концентрација  $\text{H}_2\text{O}_2$  подешавана је тако што је прво прочитана апсорбанца  $\text{OD}_1$  (0.9 ml 1 М фосфатног пуфера, pH 7.0, разблажен  $\text{dH}_2\text{O}$  у односу 1:10). После читавања апсорбанце додато је 0.1 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  разблаженог  $\text{dH}_2\text{O}$  у односу 1:100 и прочитана апсорбанца  $\text{OD}_2$ . Применом формуле  $C = 141 \text{ mM} \times (\text{OD}_2 - \text{OD}_1)$  израчуната је концентрација разблаженог  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Разблажењем 30% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  дестилованом водом у односу C/10, подешена је концентрација на 10 mM.

Активност CAT израчуната је на основу промена апсорбанци и милимоларног екстинкционог коефицијента за  $\text{H}_2\text{O}_2$  који на 230 nm износи 0.071. Активност ензима изражена је у Јед./ml еритроцита, односно у Јед./mg протеина за ткиво јетре, при чему јединица активности CAT представља количину  $\text{mmol H}_2\text{O}_2$  редукованих у минути.

### 3.4.5.5. Одређивање активности GSH-Px

#### Еритроцити

Активност GSH-Px (EC 1.11.1.9) одређена је у лизату еритроцита по методи Maral и сар. (1977). Метода се заснива на способности GSH-Px да у присуству GSH као ко-супстрата каталише редукцију органских хидропероксида, при чему се GSH оксидује у GSSG. Настали GSSG редукује се у GSH, деловањем ензима глутатион-редуктазе (GR) у присуству NADPH као коензима, који се током реакције оксидује у NADP<sup>+</sup>. Активност GSH-Px детектује се спектрофотометријски праћењем оксидације NADPH у NADP<sup>+</sup> на 340 nm.

На основу претходно одређене концентрације хемоглобина, узорци лизата су разблажени dH<sub>2</sub>O до концентрације од 5 g% Hb.

#### *Раствори:*

- Драбкин-ов реагенс
- 1 mM NADPH (у 1% NaHCO<sub>3</sub>)
- 10 mM раствора GSH
- 0.5 M K-PO<sub>4</sub> пуфер (pH 7.0)
- 0.03 M t-бутил хидропероксид
- GR (100 Јед./ml)

#### *Експериментални поступак:*

У кварцну кивету за спектрофотометријско читавање додато је 0.01 ml лизата еритроцита (концентрације 5 g% Hb), 0.05 ml Драбкин-овог реагенса (који преводи Hb из лизата у стабилан цијанметхемоглобин и на тај начин спречава пероксидативне ефекте Hb), 0.8 ml dH<sub>2</sub>O, 0.3 ml 1 mM NADPH (у 1% NaHCO<sub>3</sub>), 0.15 ml 10 mM раствора GSH, 0.15 ml 0.5 M K-PO<sub>4</sub> пуфера (pH 7.0) и 0.05 ml 0.03 M раствора t-бутил хидропероксида. Реакција је започета додавањем 0.01ml GR (100 Јед./ml). Слепа проба је садржала све реагенсе, осим Драбкин-овог реагенса и узорка лизата. Промене апсорбанци су очитане у току 3 минута на 340 nm. На основу очитаних промена апсорбанци израчуната је активност ензима и изражена у Јед./ml еритроцита. Јединица активности GSH-Px представља количину nmol NADPH оксидованих у минути (nmol NADPH/min).



### Ткива

Активност GSH-Px одређена је у супернатанту ткива јетре по методи Тамуга и сар. (1982). Принцип методе заснива се на спрегнутој активности GSH-Px (катализује оксидацију GSH у GSSG уз редукцију органских хидропероксида) и GR (катализује редукцију GSSG у GSH уз оксидацију NADPH као коензима).

#### *Раствори:*

- 0.2 mM NADPH (у 1% NaHCO<sub>3</sub>)
- 1 mM раствор GSH
- 1 mM NaN<sub>3</sub>
- 1 mM EDTA
- 0.5 M K-PO<sub>4</sub> пуфер (pH 7.0)
- 0.03 M t-бутил хидропероксид
- GR (100 Јед./ml)

#### *Експериментални поступак:*

У кварцну кивету за спектрофотометријско читавање додато је 1.6 ml dH<sub>2</sub>O, 0.6 ml 0.2 mM NADPH (у 1% NaHCO<sub>3</sub>), 0.3 ml 1 mM раствора GSH, 0.1 ml 1 mM NaN<sub>3</sub> (инактивира CAT), 0.1 ml 1 mM EDTA, 0.3 ml 0.5 M K-PO<sub>4</sub> пуфера (pH 7.0), 0.1 ml 0.03 M раствора t-бутил хидропероксида и 0.04 ml супернатанта јетре. Реакција је започета додавањем 0.005 ml GR (100 Јед./ml). Слепа проба је садржала све реагенсе осим узорка. Промене апсорбанци су очитане у току 3 минута на 340 nm на температури од 25 °C. На основу очитаних промена апсорбанци и моларног екстинкционог коефицијента за NADPH на 340 nm од  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , израчуната је активност ензима и изражена у Јед./mg протеина. Јединица активности GSH-Px представља количину nmol NADPH оксидованих у минути (nmol NADPH/min).

### 3.4.5.6. Одређивање активности GR

Активност GR (EC 1.6.4.2) одређена је у лизату еритроцита и супернатанту јетре методом коју су описали Glatzle и сар. (1974). Метода се заснива на способности GR да катализује редукцију GSSG у GSH, у присуству NADPH, који се у току реакције оксидује у NADP<sup>+</sup>. Активност GR мери се спектрофотометријски преко смањења концентрације NADPH на таласној дужини од 340 nm.

#### Еритроцити и ткива

##### *Раствори:*

- 0.5 М К-PO<sub>4</sub> пуфер (pH 7.4)
- 2 mM раствор GSSG
- 0.5 mM EDTA
- 0.1 mM раствор NADPH (у 1% NaHCO<sub>3</sub>)

##### *Експериментални поступак:*

У кварцну кивету за спектрометријско читавање додато је 0.6 ml 0.5 М К-PO<sub>4</sub> пуфера (pH 7.4), 0.1 ml 2 mM раствора GSSG, 0.1 ml 0.5 mM раствора EDTA, 2 ml dH<sub>2</sub>O и 0.02 ml лизата еритроцита (супернатанта јетре). Реакција је започета додавањем 0.1 ml 0.1 mM раствора NADPH (у 1% NaHCO<sub>3</sub>). Промене апсорбанци узорака и слепе пробе очитане су на 340 nm у току 3 минута. На основу очитаних промена апсорбанци и моларног екстинкционог коефицијента за NADPH на 340 nm од  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , израчуната је активност ензима и изражена у Јед./ml еритроцита, односно у Јед./mg протеина за ткиво јетре. Јединица активности GR представља број nmol NADPH оксидованих у минути (nmol NADPH/min).

### 3.4.5.7. Одређивање активности GST

Активност ензима GST (EC 2.5.1.1.8) одређена је у лизату еритроцита и супернатанту јетре по методи Habig и сар. (1974). Метода се заснива на способности GST да катализује реакцију везивања 1-hloro-2,4-dinitro-benzena (CDNB) за сулфхидрилну (-SH) групу цистеина у саставу GSH, при чему настаје CDNB-GSH коњугат. Стопа пораста апсорбанце услед насталог CDNB-GSH коњугата директно је пропорционална активности GST у узорку и детектује се спектрофотометријски на таласној дужини од 340 nm.

#### Еритроцити и ткива

##### *Раствори:*

- 25 mM CDNB (у 95% етанолу)
- 0.5 M K-PO<sub>4</sub> пуфер (pH 6.5)
- 20 mM раствор GSH

##### *Експериментални поступак:*

У кварцну кивету за спектрофотометријско читавање додато је 1.0 ml dH<sub>2</sub>O, 0.05 ml 25 mM раствора CDNB (у 95 % етанолу), 0.3 ml 0.5 M K-PO<sub>4</sub> пуфера (pH 6.5) и 0.15 ml 20 mM раствора GSH. Реакција је започета додавањем 0.02 ml лизата еритроцита (супернатанта јетре). Промене апсорбанци узорака и слепе пробе прочитане су на 340 nm у току 3 минута. Активност GST одређена је према слепој проби, уз коришћење моларног екстинкционог коефицијента за CDNB-GSH коњугат на 340 nm од  $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , и изражена је у Јед./ml еритроцита, односно у Јед./mg протеина за ткиво јетре. Јединица активности GST изражава се као број nmol CDNB-GSH коњугата насталог у минути (nmol CDNB-GSH/min).

### 3.4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ БАКРА

Концентрација бакра у плазми и супернатанту јетре одређена је у акредитованој биохемијској лабораторији стандардном процедуром на анализатору *Merck Vitalab Selektia* (Germany). Метода се заснива на реакцији бакра са специфичним обојеним реагенсом ((3,5-dibromo-2-pyridazolo)-N-Ethyl-N-(3-sulphopropyl) aniline) са којим формира стабилан обојени хелат, при чему је интензитет обојености пропорционалан концентрацији бакра. Концентрација бакра у плазми изражена је у  $\mu\text{g}$  бакра/100 ml плазме ( $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ), а концентрација бакра у супернатанту јетре у  $\mu\text{g}$  бакра/g влажне масе ткива ( $\mu\text{g}/\text{g w.w.}$  ткива). Концентрације слободног бакра односно, бакра невезаног за церулоплазмин (non-CP-bound-Cu, енг. *non-ceruloplasmin bound Cu*, free Cu) прерачунате су применом формуле (Roberts и Schilsky, 2008):

$$\text{Non-CP-bound-Cu } (\mu\text{g/L}) = \text{Cu total } (\mu\text{g/L}) - \text{Cu bound } (3.15 \times \text{Ceruloplasmin } (\text{mg/L}))$$

### 3.4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА (CP)

Концентрације CP у плазми и супернатанту јетре одређене су у акредитованој биохемијској лабораторији стандардном методом на анализатору *Roche Hitachi 911* (Switzerland). Метода представља тест који се заснива на специфичној реакцији која се јавља између анти-церулоплазмин антитела и одговарајућих антигена у узорку, у присуству полиетилен гликола, при чему се формира имуно-комплекс. Замућеност изазвана формирањем имуно-комплекса је пропорционална концентрацији церулоплазмине у узорку (Immunoturbidimetric test). Концентрација CP у плазми изражена је као mg CP/100 ml плазме (mg/100 ml), а концентрација CP у јетри као  $\mu\text{g}$  CP/mg протеина ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

### 3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА И ПРИКАЗ РЕЗУЛТАТА

Добијени подаци у овој докторској дисертацији анализирани су коришћењем софтверског пакета *SPSS 13.0* за *Windows* (Chicago, IL, USA). За статистичку анализу постојања значајних разлика између средњих вредности испитивних параметара коришћени су анализа варијанси (ANOVA) са post-hoc Bonferroni/Dunnnett's вишеструком анализом и Student-ов t-тест или непараметарски Kruskal-Wallis (за поређење између група) и Mann-Whitney U-тест (за поређење између две групе). Резултати су приказани као средња вредност  $\bar{X} \pm$  стандардна грешка (S.E.M). У свим тестовима критеријум за статистичку значајност је  $p < 0.05$ . Резултати су приказани табеларно и графички.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

Резултати истраживања приказани су табеларно и графички као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Експерименталне групе третиране су багром (Cu), багром и комерцијалним леком пенициламином (Cu+DPA), багром и флавоноидима кверцетином и епикатехином (Cu+QE+EC) и само флавоноидима (QE+EC). У контроли и у свакој експерименталној групи било је по 7 животиња.

#### **4.1. УНОС ВОДЕ И ТЕЛЕСНА ТЕЖИНА ЖИВОТИЊА**

Просечна запремина воденог раствора бакар хлорида ( $\text{CuCl}_2$ ) коју је попила експериментална Cu група ( $22.0 \pm 0.7$  ml/жив./дневно) и Cu+QE+EC група ( $24.3 \pm 0.7$  ml/жив./дневно) значајно је мања у односу на групу Cu+DPA ( $29.1 \pm 0.6$  ml/жив./дневно) и запремину чисте воде код контролне групе ( $30.3 \pm 0.7$  ml/жив./дневно) и QE+EC третиране групе ( $30.8 \pm 0.5$  ml/жив. /дневно) (Табела 1). Прорачун на основу запремине попијеног раствора  $\text{CuCl}_2$  показује да су животиње уносиле дневно просечно 30 mg бакар(II)-јона.

Ефекти третмана на просечну тежину животиња приказани су у Табели 1 и на Графику 1. Животиње контролне групе, као и Cu+DPA и Cu+QE+EC третираних група, у току експеримента имале су приближне прирасте телесне тежине. Највећи прираст телесне тежине је забележен код животиња које су добијале у котретману само флавоноиде QE+EC. Животиње у групи третираној само Cu губиле су у тежини током експеримента, па је коначна телесна тежина значајно мања ( $215.3 \pm 4.0$  g) од тежине контролних животиња ( $263.3 \pm 4.8$  g). Иако је дошло до смањења телесне тежине и вероватно дехидратације услед смањеног уноса воде и хране, током експеримента није забележено угинуће животиња.

Ефекти третмана на просечну тежину јетре приказани су у Табели 1. Највећа тежина јетре забележена је у групи животиња третираних само флавоноидима QE+EC у поређењу са осталим експерименталним групама.

**Табела 1.** Унос воде, телесна тежина животиња и тежина јетре у контролној и експерименталним групама

	Унос воде (ml/жив./дневно)	Почетна телесна тежина (g)	Крајња телесна тежина (g)	Тежина јетре (g)
<b>Контрола</b>	30.3 ± 0.7	238.7 ± 3.4	263.3 ± 4.8	5.57 ± 0.43
<b>Cu</b>	22.0 ± 0.7*	232.7 ± 2.3	215.3 ± 4.0*	4.83 ± 0.19
<b>Cu+DPA</b>	29.1 ± 0.6	226.0 ± 5.1	250.0 ± 6.3	5.22 ± 0.15
<b>Cu+QE+EC</b>	24.3 ± 0.7*	232.9 ± 9.7	255.7 ± 10.4	5.81 ± 0.21 <sup>#</sup>
<b>QE+EC</b>	30.8 ± 0.5 <sup>#</sup>	230.0 ± 9.3	265.7 ± 7.8 <sup>#</sup>	7.49 ± 0.21 <sup>*#§‡</sup>

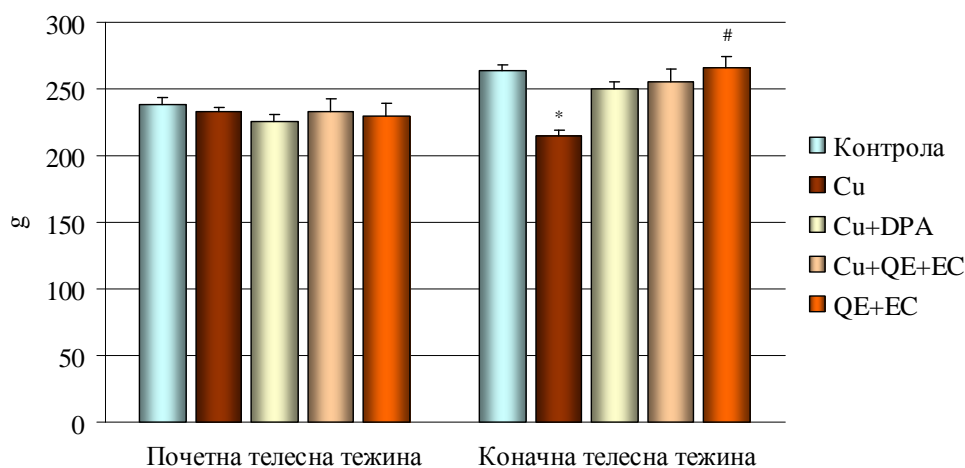
\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>‡</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 1.** Почетна и крајња телесна тежина животиња контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).



## 4.2. ПРОМЕНЕ ХЕМАТОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА

Резултати вредности хематолошких параметара након третмана приказани су у Табелама 2–5 и на Графицима 2–8. Број еритроцита (RBC) у крви контролне групе животиња је  $6.32 \pm 0.26 \times 10^{12}/L$ , а у групи третираној Cu значајно је смањен на  $5.16 \pm 0.21 \times 10^{12}/L$ . Број RBC код животиња третираних Cu+QE+EC ( $6.87 \pm 0.17 \times 10^{12}/L$ ) и QE+EC ( $7.19 \pm 0.17 \times 10^{12}/L$ ) значајно је повећан у односу на групу третирану само Cu и Cu+DPA (Табела 2 и График 2).

Концентрације хемоглобина (Hb) у крви значајно су снижене у групи третираној Cu ( $101.1 \pm 3.81 \text{ g/L}$ ) и Cu+DPA ( $102 \pm 1.35 \text{ g/L}$ ) у односу на контролне вредности ( $135.3 \pm 6.22 \text{ g/L}$ ). Концентрације Hb су значајно повећане код животиња третираних Cu+QE+EC ( $141.3 \pm 3.4 \text{ g/L}$ ) и QE+EC ( $144 \pm 3.18 \text{ g/L}$ ) у поређењу са вредностима код животиња које су добијале само Cu и Cu+DPA (Табела 2 и График 3).

Вредности хематокрита (Hct) у крви су значајно снижене у групи третираној Cu ( $29.52 \pm 1.15 \%$ ) и Cu+DPA ( $28.62 \pm 0.38 \%$ ) у поређењу са вредностима контролне групе ( $38.41 \pm 1.69 \%$ ). Третман флавоноидима значајно повећава вредности Hct у групи Cu+QE+EC ( $38.35 \pm 1.44 \%$ ) и QE+EC ( $41.05 \pm 1.02 \%$ ) у односу на групу третирану само Cu и Cu+DPA (Табела 2 и График 4).

Вредности еритроцитних индекса у крви приказани су у Табели 3. Просечни волумени еритроцита (MCV) и просечне количине хемоглобина по еритроциту (MCH) су смањене, али ове промене у свим експерименталним групама нису статистички значајне у односу на контролне вредности. Просечне концентрације хемоглобина у еритроцитима (MCHC) су значајно више у групи третираној Cu+QE+EC ( $368.75 \pm 8.03 \text{ g/L}$ ) у поређењу са групом третираном само Cu ( $340.87 \pm 3.16 \text{ g/L}$ ). Флавоноиди су утицали на смањење ширине дистрибуције еритроцита по волумену (RDW) у групи Cu+QE+EC ( $13.73 \pm 0.2 \%$ ) и QE+EC ( $14.06 \pm 0.68 \%$ ) у односу на групу која је узимала само Cu ( $15.95 \pm 0.22 \%$ ).

Број леукоцита (WBC) у крви није значајно промењен у експерименталним групама у поређењу са контролном групом (Табела 4 и График 5). Међутим, забележене су разлике у процентуалној заступљености поједних елемената беле крвне лозе. Моноцити (Mon) су смањени у групи третираној Cu ( $10.26 \pm 1.17 \%$ ) и Cu+DPA ( $9.02 \pm 1.02 \%$ ) у односу на

контролну групу ( $14.52 \pm 1.35$  %) и групе третиране Cu+QE+EC ( $14.90 \pm 0.72$  %) и QE+EC ( $14.77 \pm 0.42$  %) (Табела 4 и График 6).

Пораст гранулоцита (Gra) је значајан у групи третираној Cu+DPA ( $26.84 \pm 2.62$  %) у поређењу са вредностима контролне групе ( $16.80 \pm 3.07$  %). Третман флавоноидима значајно смањује вредности Gra у групи Cu+QE+EC ( $9.90 \pm 1.35$  %) и QE+EC ( $14.07 \pm 2.03$  %) у односу на групу третирану само Cu и Cu+DPA (Табела 4 и График 6).

**Табела 2.** Вредности хематолошких параметара контролне и експерименталних група

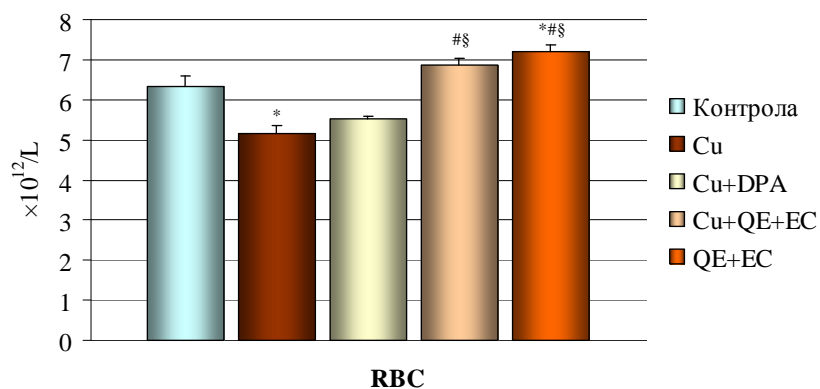
	<b>RBC</b> ( $\times 10^{12}/L$ )	<b>Hb</b> (g/L)	<b>Hct</b> (%)
<b>Контрола</b>	$6.32 \pm 0.26$	$135.3 \pm 6.22$	$38.41 \pm 1.69$
<b>Cu</b>	$5.16 \pm 0.21^*$	$101.1 \pm 3.81^*$	$29.52 \pm 1.15^*$
<b>Cu+DPA</b>	$5.51 \pm 0.09$	$102 \pm 1.35^*$	$28.62 \pm 0.38^*$
<b>Cu+QE+EC</b>	$6.87 \pm 0.17^{*\#\$}$	$141.3 \pm 3.4^{*\#\$}$	$38.35 \pm 1.44^{*\#\$}$
<b>QE+EC</b>	$7.19 \pm 0.17^{*\#\$}$	$144 \pm 3.18^{*\#\$}$	$41.05 \pm 1.02^{*\#\$}$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 2.** Број еритроцита (RBC) у крви контролне и експерименталних група

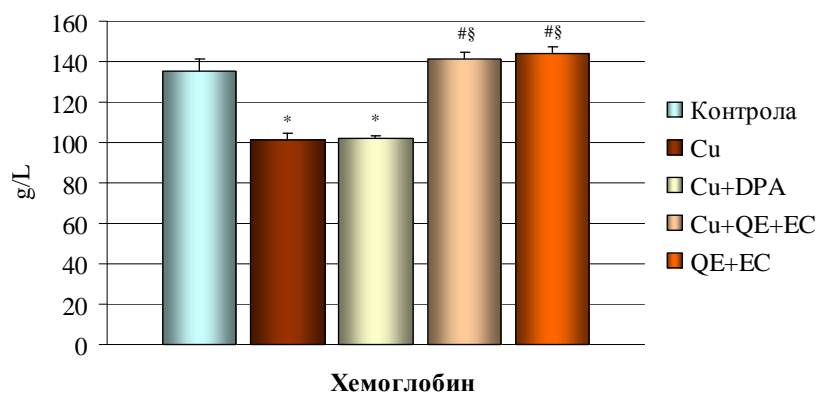


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 3.** Концентрација хемоглобина у крви контролне и експерименталних група

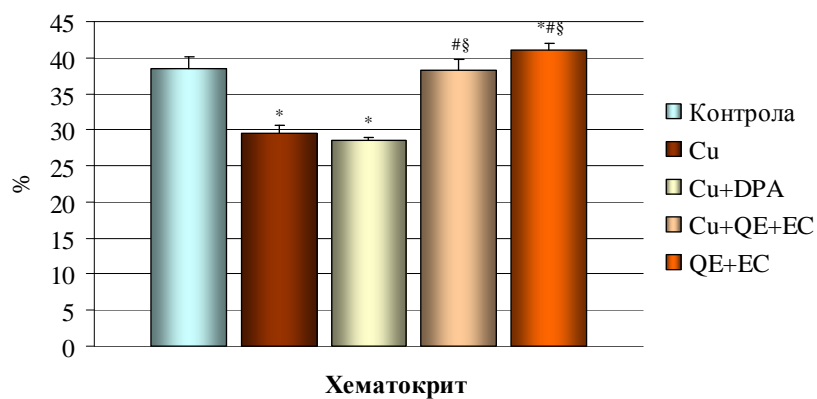


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

График 4. Хематокрит контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

Табела 3. Еритроцитни индекси контролне и експерименталних група

	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW (%)
<b>Контрола</b>	59.21 ± 2.08	21.1 ± 0.61	352.75 ± 3.64	13.80 ± 0.49
<b>Cu</b>	53.80 ± 1.91	18.67 ± 0.63	340.87 ± 3.16	15.95 ± 0.22*
<b>Cu+DPA</b>	52.06 ± 0.36	18.52 ± 0.16	356.6 ± 1.74	15.28 ± 0.43
<b>Cu+QE+EC</b>	56.10 ± 0.91	20.57 ± 0.41	368.75 ± 8.03#	13.73 ± 0.2#§
<b>QE+EC</b>	57.03 ± 1.21	20.02 ± 0.51	350.83 ± 3.17	14.06 ± 0.68#

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**Табела 4.** Број леукоцита и леукоцитарна формула контролне и експерименталних група

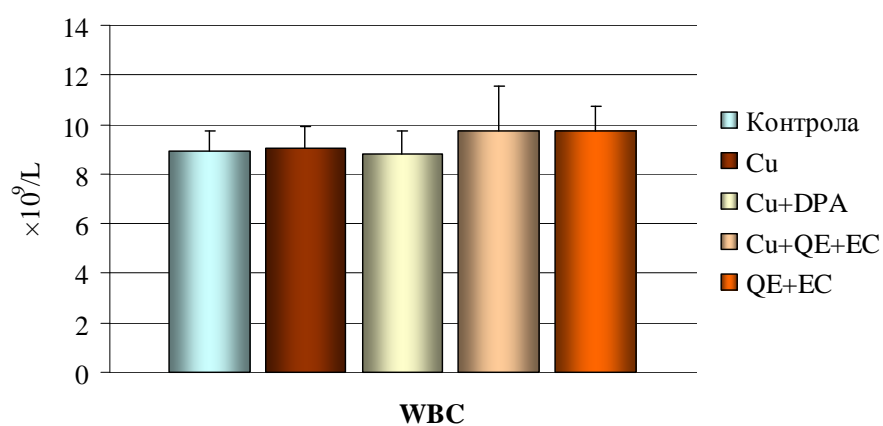
	<b>WBC</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>Lym</b> (%)	<b>Mon</b> (%)	<b>Gra</b> (%)
<b>Контрола</b>	8.93 $\pm$ 0.82	68.68 $\pm$ 2.03	14.52 $\pm$ 1.35	16.80 $\pm$ 3.07
<b>Cu</b>	9.06 $\pm$ 0.83	67.36 $\pm$ 5.04	10.26 $\pm$ 1.17*	22.38 $\pm$ 4.23
<b>Cu+DPA</b>	8.79 $\pm$ 0.98	64.14 $\pm$ 2.55	9.02 $\pm$ 1.02*	26.84 $\pm$ 2.62*
<b>Cu+QE+EC</b>	9.75 $\pm$ 1.79	75.20 $\pm$ 2.01 <sup>§</sup>	14.90 $\pm$ 0.72 <sup>#§</sup>	9.90 $\pm$ 1.35 <sup>#§</sup>
<b>QE+EC</b>	9.73 $\pm$ 1.02	71.17 $\pm$ 1.71	14.77 $\pm$ 0.42 <sup>#§</sup>	14.07 $\pm$ 2.03 <sup>§</sup>

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

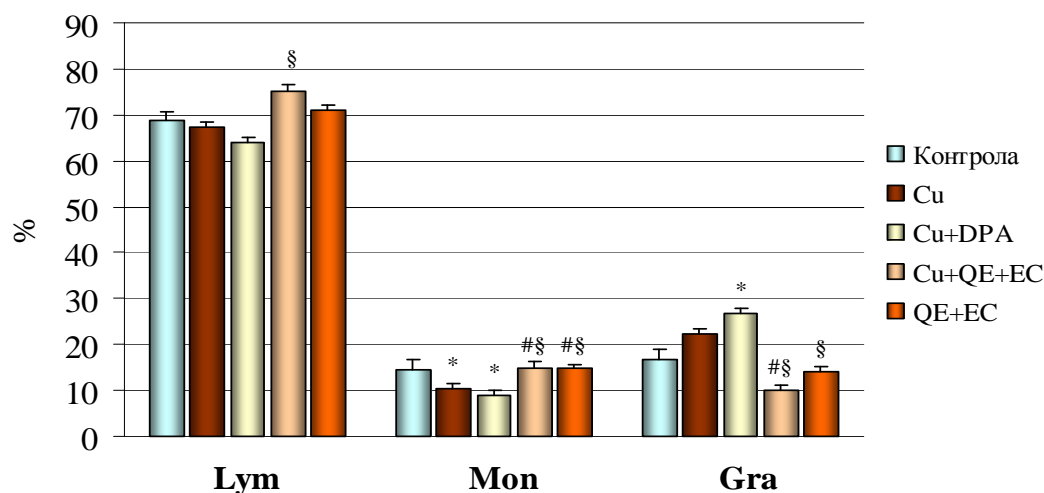
# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 5.** Број леукоцита (WBC) у крви контролне и експерименталних група



**График 6.** Леукоцитарна формула контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

Број тромбоцита (Plt) и тромбоцитни индекси у крви приказани су у Табели 5. Флавоноиди су утицали на повећање броја Plt у групи Cu+QE+EC ( $925.0 \pm 33.18 \times 10^9/L$ ) и QE+EC ( $813.2 \pm 38.26 \times 10^9/L$ ) у односу на контролну групу ( $680.9 \pm 30.81 \times 10^9/L$ ) и групе третиране Cu ( $607.9 \pm 29.09 \times 10^9/L$ ) и Cu+DPA ( $654.4 \pm 21.74 \times 10^9/L$ ) (График 7). У групи Cu+QE+EC повећани су тромбокрит (Pct) (на  $0.713 \pm 0.036$  %) и просечни волумен тромбоцита (MPV) (на  $7.70 \pm 0.15$  fl) у односу на групу третирану само Cu ( $0.438 \pm 0.025$  % за Pct и  $6.34 \pm 0.34$  fl за MPV) и Cu+DPA ( $0.485 \pm 0.024$  % за Pct и  $6.10 \pm 0.10$  fl за MPV) (Табела 5). Ширина дистрибуције тромбоцита по волумену (PDW) је повећана у групи третираној Cu ( $15.86 \pm 0.65$  %) и Cu+DPA ( $15.36 \pm 0.21$  %) у односу на контролну групу ( $6.51 \pm 2.71$  %) и групе третиране Cu+QE+EC ( $7.88 \pm 1.15$  %) и QE+EC ( $7.57 \pm 1.09$  %) (Табела 5 и График 8).

**Табела 5.** Број тромбоцита (Plt) и тромбоцитни индекси контролне и експерименталних група

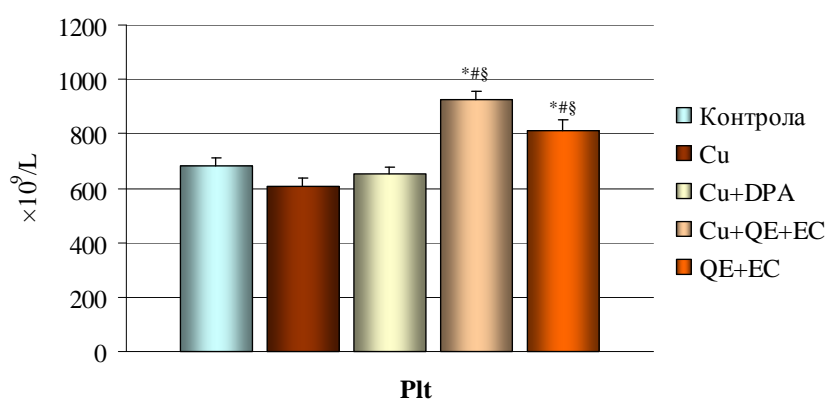
	<b>Plt</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>Pct</b> (%)	<b>MPV</b> (fl)	<b>PDW</b> (%)
<b>Контрола</b>	680.9 $\pm$ 30.81	0.554 $\pm$ 0.063	7.58 $\pm$ 0.74	6.51 $\pm$ 2.71
<b>Cu</b>	607.9 $\pm$ 29.09	0.438 $\pm$ 0.025	6.34 $\pm$ 0.34	15.86 $\pm$ 0.65 <sup>*</sup>
<b>Cu+DPA</b>	654.4 $\pm$ 21.74	0.485 $\pm$ 0.024	6.10 $\pm$ 0.10	15.36 $\pm$ 0.21 <sup>*</sup>
<b>Cu+QE+EC</b>	925.0 $\pm$ 33.18 <sup>*#§</sup>	0.713 $\pm$ 0.036 <sup>#§</sup>	7.70 $\pm$ 0.15 <sup>#§</sup>	7.88 $\pm$ 1.15 <sup>#§</sup>
<b>QE+EC</b>	813.2 $\pm$ 38.26 <sup>*#§</sup>	0.576 $\pm$ 0.028 <sup>#</sup>	7.13 $\pm$ 0.42	7.57 $\pm$ 1.09 <sup>#§</sup>

<sup>\*</sup> Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 7.** Број тромбоцита (Plt) у крви контролне и експерименталних група

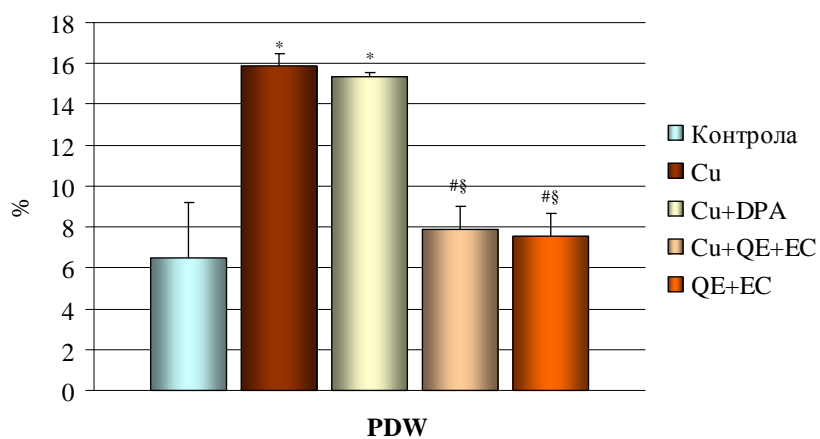


<sup>\*</sup> Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 8.** Ширина дистрибуције тромбоцита по волумену (PDW) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).



### 4.3. ПРОМЕНЕ У МЕТАБОЛИЗМУ ПРОТЕИНА, ГЛУКОЗЕ И ЛИПИДА

Ефекти третмана на метаболизам протеина, глукозе и липида приказани су у Табели 6. Субхронична изложеност бакру довела је до незнатног пада вредности укупних протеина и пораста албумина у серуму у односу на контролу, док третман флавоноидима није довео до значајних промена укупних протеина и албумина. Концентрације глукозе су повећане, али ове промене у свим експерименталним групама нису статистички значајне у односу на контролну вредност (Табела 6 и График 9).

Третман бакром довео је до пораста нивоа холестерола у групи третираној само **Cu** ( $1.92 \pm 0.07$  mmol/L) и **Cu+DPA** ( $1.60 \pm 0.09$  mmol/L) у поређењу са контролом ( $1.15 \pm 0.08$  mmol/L). Флавоноиди значајно смањују концентрације холестерола у групи **Cu+QE+EC** ( $0.98 \pm 0.15$  mmol/L) и **QE+EC** ( $1.04 \pm 0.07$  mmol/L) у односу на групу третирану само **Cu** и **Cu+DPA** (Табела 6 и График 10).

**Табела 6.** Концентрације протеина, глукозе и холестерола у крви контролне и експерименталних група

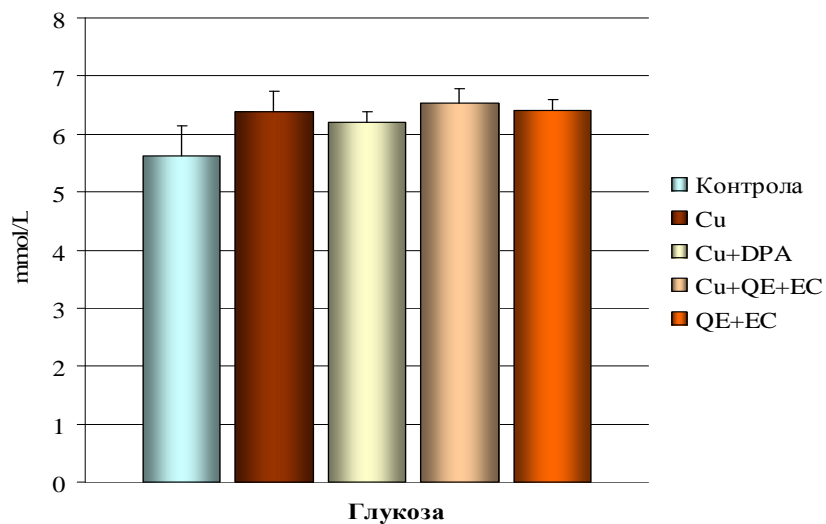
	Укупни протеини (g/L)	Албумин (g/L)	Глукоза (mmol/L)	Холестерол (mmol/L)
<b>Контрола</b>	$60.9 \pm 0.91$	$12.7 \pm 0.57$	$5.62 \pm 0.52$	$1.15 \pm 0.08$
<b>Cu</b>	$59.0 \pm 1.30$	$13.6 \pm 0.55$	$6.38 \pm 0.36$	$1.92 \pm 0.07^*$
<b>Cu+DPA</b>	$62.0 \pm 1.05$	$13.8 \pm 0.20$	$6.20 \pm 0.18$	$1.60 \pm 0.09^*$
<b>Cu+QE+EC</b>	$60.3 \pm 2.08$	$11.5 \pm 0.72^{\S}$	$6.53 \pm 0.26$	$0.98 \pm 0.15^{\#\S}$
<b>QE+EC</b>	$61.4 \pm 1.32$	$12.3 \pm 0.52$	$6.4 \pm 0.19$	$1.04 \pm 0.07^{\#\S}$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

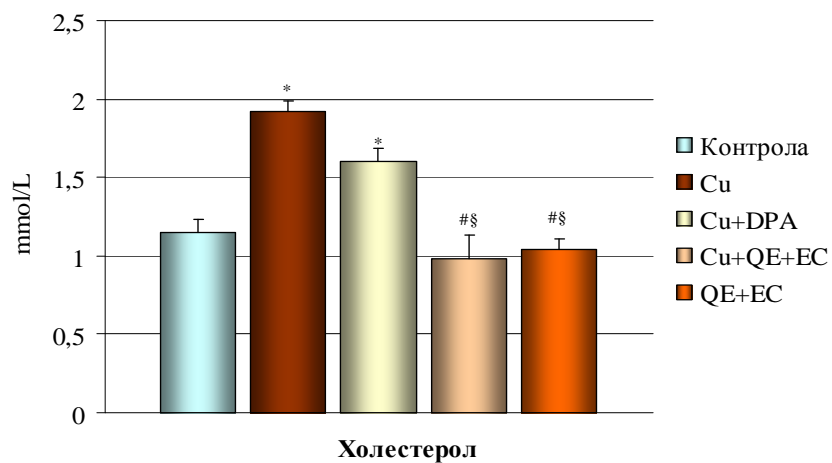
# Статистички значајно у поређењу са **Cu** групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са **Cu+DPA** групом ( $p < 0.05$ ).

**График 9.** Концентрације глукозе у крви контролне и експерименталних група



**График 10.** Концентрације холестерола у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4. БИОМАРКЕРИ ОШТЕЋЕЊА ЈЕТРЕ

Ефекти третмана на активности ензима јетре у крви, као биомаркера оштећења јетре, приказани су у Табели 7 и на Графицима 11–14. Третман багром узроковао је значајан пораст активности ензима аспартат аминотрансферазе (AST) (од  $141.8 \pm 6.0$  Јед./L до  $216.2 \pm 18.4$  Јед./L), аланин аминотрансферазе (ALT) (од  $50.6 \pm 2.8$  Јед./L до  $70.1 \pm 4.4$  Јед./L), алкалне фосфатазе (ALP) (од  $217.4 \pm 12.4$  Јед./L до  $259.7 \pm 14.3$  Јед./L), гама-глутамил транспептидазе (GGT) (од  $2.29 \pm 0.36$  Јед./L до  $4.60 \pm 0.68$  Јед./L) и лактат дехидрогеназе (LDH) (од  $1131.0 \pm 107.6$  Јед./L до  $2102.3 \pm 190.8$  Јед./L) у серуму животиња у поређењу са контролама. У групи третираној Cu+DPA активности свих испитиваних ензима су смањене у односу на групу третирану само Cu, али ове промене нису статистички значајне. Флавоноиди значајно смањују активности ензима AST, ALP и LDH у групи Cu+QE+EC и QE+EC у поређењу са групом третираном само Cu, и вредности су приближне контролним (Табела 7 и График 11, 12 и 14).

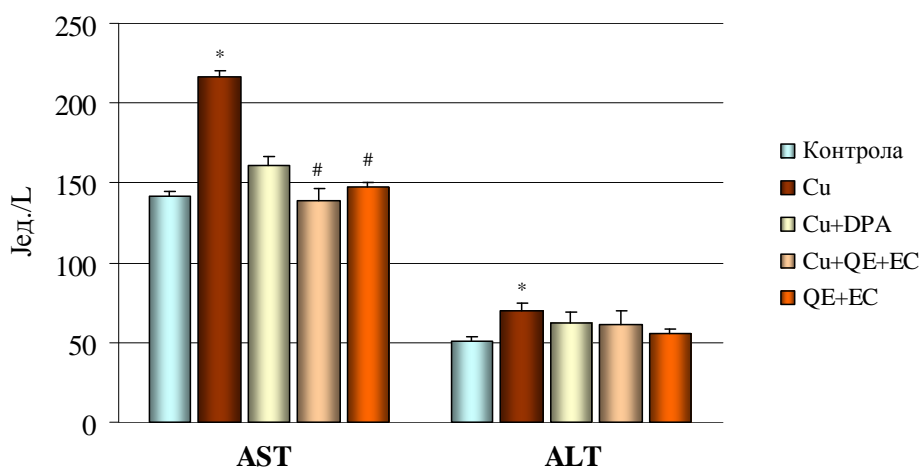
**Табела 7.** Активности ензима јетре у крви контролне и експерименталних група

	<b>AST</b> (Јед./L)	<b>ALT</b> (Јед./L)	<b>ALP</b> (Јед./L)	<b>GGT</b> (Јед./L)	<b>LDH</b> (Јед./L)
<b>Контрола</b>	$141.8 \pm 6.0$	$50.6 \pm 2.8$	$217.4 \pm 12.4$	$2.29 \pm 0.36$	$1131.0 \pm 107.6$
<b>Cu</b>	$216.2 \pm 18.4^*$	$70.1 \pm 4.4^*$	$259.7 \pm 14.3^*$	$4.60 \pm 0.68^*$	$2102.3 \pm 190.8^*$
<b>Cu+DPA</b>	$161.0 \pm 26.1$	$62.6 \pm 1.5$	$180.6 \pm 23.4^\#$	$3.60 \pm 0.60$	$1603.6 \pm 84.7$
<b>Cu+QE+EC</b>	$138.8 \pm 11.7^\#$	$61.4 \pm 8.1$	$192.8 \pm 27.9^\#$	$2.40 \pm 0.75$	$1116.3 \pm 168.8^\#$
<b>QE+EC</b>	$147.2 \pm 6.1^\#$	$55.2 \pm 3.6$	$230.8 \pm 18.7$	$3.14 \pm 0.46$	$1097.7 \pm 81.8^\#$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

^\# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

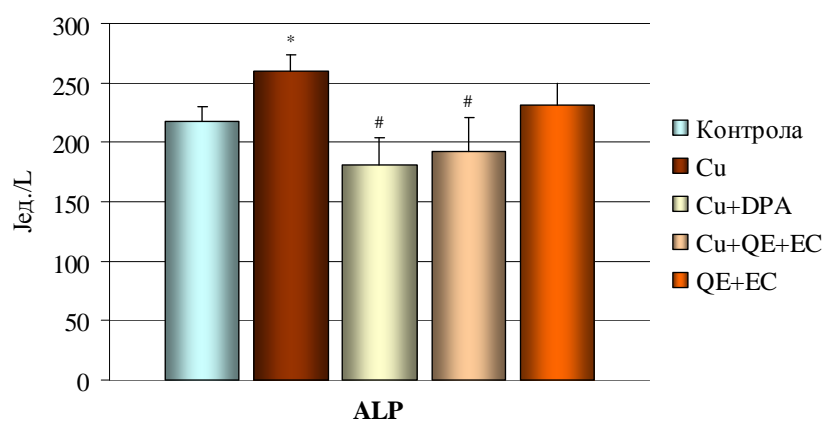
**График 11.** Активност аспартат аминотрансферазе (AST) и аланин аминотрансферазе (ALT) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

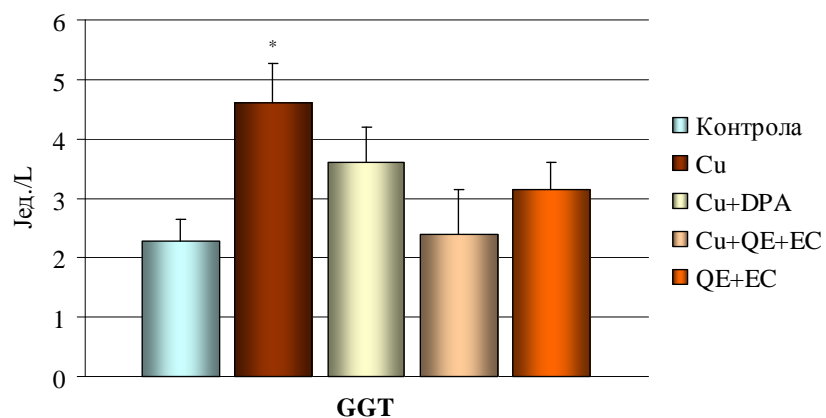
**График 12.** Активност алкалне фосфатазе (ALP) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

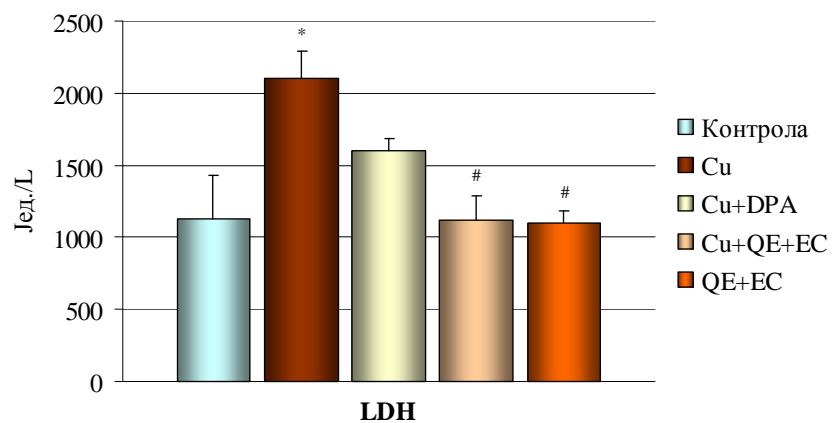
# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

**График 13.** Активност гама-глутамил трансептидазе (GGT) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 14.** Активност лактат дехидрогеназе (LDH) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5. ПРОМЕНЕ У ХОМЕОСТАЗИ ЕЛЕКТРОЛИТА

Ефекти субхроничног третмана на концентрације електролита у крви приказани су у Табели 8 и на Графицима 15–18. Третман багром довео је до значајног пада концентрација натријума (од  $129.8 \pm 1.5$  mmol/L до  $118.2 \pm 0.6$  mmol/L) и гвожђа (од  $38.9 \pm 9.24$   $\mu$ mol/L до  $14.8 \pm 2.12$   $\mu$ mol/L) у односу на контроле. Флавоноиди су довели до значајног пада концентрације калијума у групи Cu+QE+EC ( $5.29 \pm 0.27$  mmol/L) и у групи QE+EC ( $5.00 \pm 0.16$  mmol/L) у односу на контролу ( $8.22 \pm 0.79$  mmol/L), групу третирану Cu ( $6.73 \pm 0.31$  mmol/L) и Cu+DPA ( $8.63 \pm 0.91$  mmol/L) (Табела 8 и График 15). Третман флавоноидима је довео до значајног пораста концентрација натријума у групи Cu+QE+EC ( $132.5 \pm 2.23$  mmol/L) и QE+EC ( $131.5 \pm 1.6$  mmol/L) у односу на групе третиране Cu ( $118.2 \pm 0.6$  mmol/L) и Cu+DPA ( $122.6 \pm 0.9$  mmol/L) (Табела 8 и График 16). Концентрација гвожђа је значајно повећана у групи третираној флавоноидима QE+EC ( $23.7 \pm 2.45$  mmol/L) у поређењу са групом третираном само Cu ( $14.8 \pm 2.12$   $\mu$ mol/L) (Табела 8 и График 18).

**Табела 8.** Концентрације електролита у крви контролне и експерименталних група

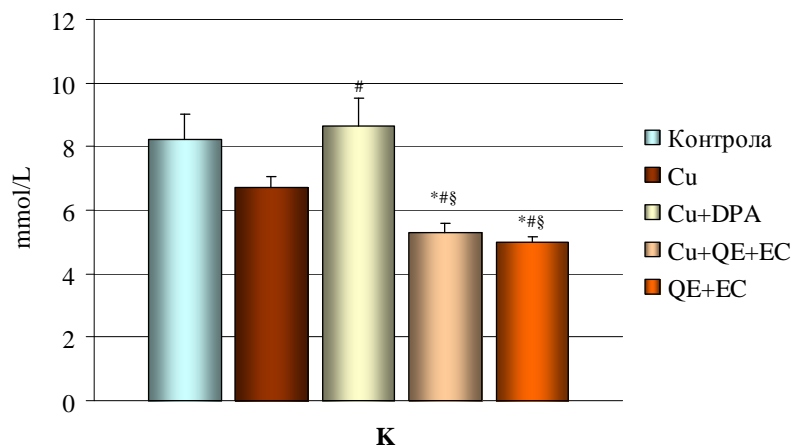
	<b>К</b> (mmol/L)	<b>Na</b> (mmol/L)	<b>Ca</b> (mmol/L)	<b>Fe</b> ( $\mu$ mol/L)	<b>Phos</b> (mmol/L)
<b>Контрола</b>	$8.22 \pm 0.79$	$129.8 \pm 1.5$	$18.3 \pm 2.01$	$38.9 \pm 9.24$	$0.35 \pm 0.06$
<b>Cu</b>	$6.73 \pm 0.31$	$118.2 \pm 0.6^*$	$17.3 \pm 2.32$	$14.8 \pm 2.12^*$	$0.24 \pm 0.01$
<b>Cu+DPA</b>	$8.63 \pm 0.91^\#$	$122.6 \pm 0.9^*$	$16.7 \pm 1.94$	$18.9 \pm 4.13$	$0.28 \pm 0.01$
<b>Cu+QE+EC</b>	$5.29 \pm 0.27^{*\#\$}$	$132.5 \pm 2.2^{\#\$}$	$17.7 \pm 3.28$	$19.3 \pm 4.36$	$0.37 \pm 0.03$
<b>QE+EC</b>	$5.00 \pm 0.16^{*\#\$}$	$131.5 \pm 1.6^{\#\$}$	$17.2 \pm 2.10$	$23.7 \pm 2.45^\#$	$0.33 \pm 0.06$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 15.** Концентрације калијума (K)  
у крви контролне и експерименталних група

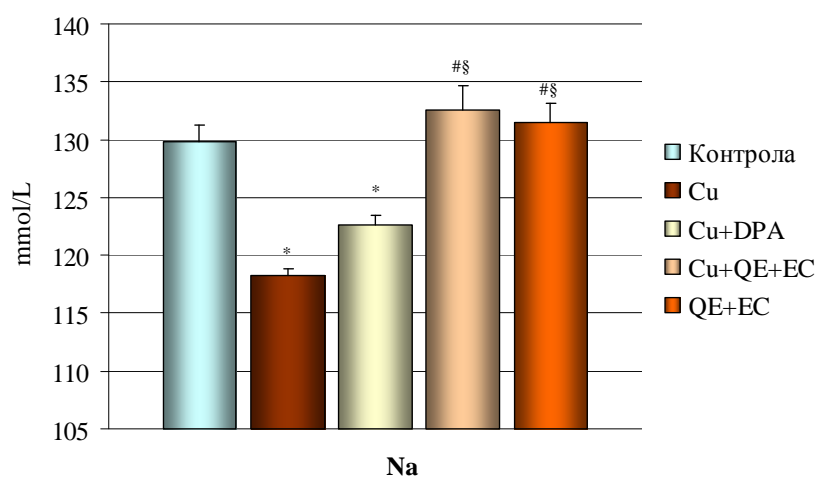


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 16.** Концентрације натријума (Na)  
у крви контролне и експерименталних група

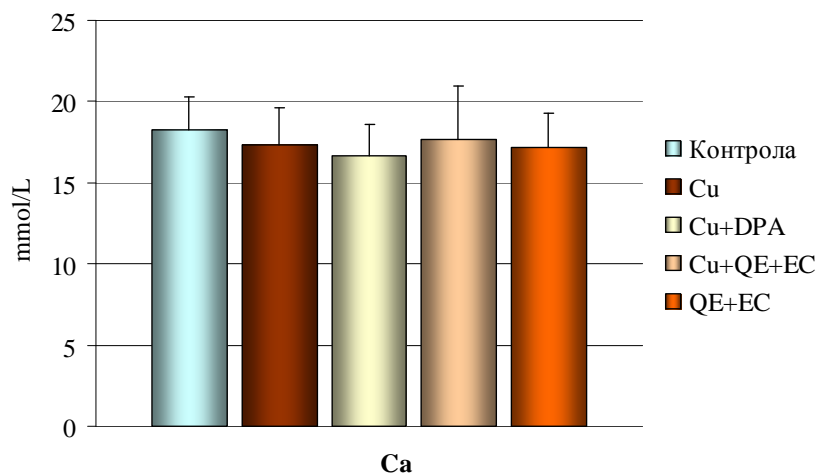


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

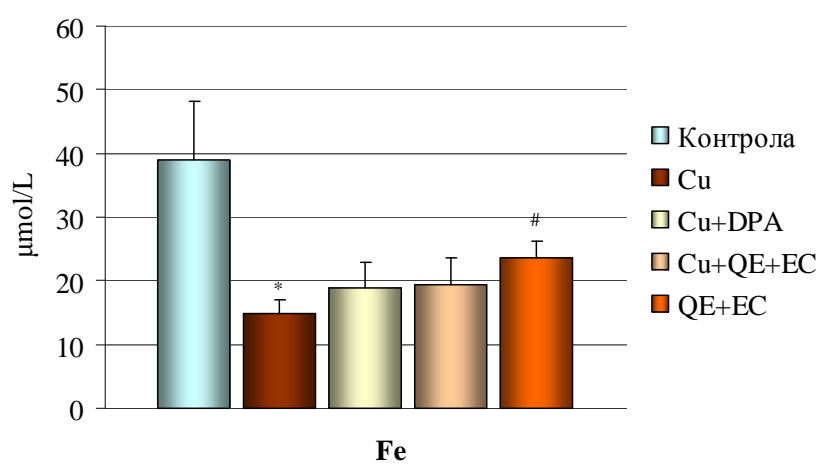
# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 17.** Концентрације калцијума (Ca)  
у крви контролне и експерименталних група



**График 18.** Концентрације гвожђа (Fe)  
у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).



## 4.6. БИОМАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА

### 4.6.1. БИОМАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ЕРИТРОЦИТИМА

Ефекти третмана на концентрације реактивних врста кисеоника (ROS) и азота (RNS) у еритроцитима животиња приказани су у Табели 9 и на Графицима 19–21. Бакар је довео до значајног пораста концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) ( $665.83 \pm 30.5$  nmol/L еритроцита) у односу на вредност измерену код контроле ( $590.32 \pm 33.5$  nmol/L еритроцита). Концентрација  $O_2^{\bullet-}$  је смањена у групи третираној Cu+DPA ( $515.43 \pm 42.1$  nmol/L еритроцита) и QE+EC ( $565.72 \pm 16.8$  nmol/L еритроцита) у односу на групу третирану Cu ( $665.83 \pm 30.5$  nmol/L еритроцита) (Табела 9 и График 19). Концентрација водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) је значајно повећана само у групи која је добијала Cu ( $12.66 \pm 0.58$  nmol/L еритроцита) у односу на контролну вредност ( $10.79 \pm 0.50$  nmol/L еритроцита) (Табела 9 и График 20). У групи QE+EC+Cu концентрације  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$  су смањене и приближне су контролним вредностима, док је забележено повећање концентрације нитрита ( $NO_2^-$ ) ( $479.96 \pm 74.87$   $\mu$ mol/L еритроцита) у односу на контролну вредност ( $329.34 \pm 16.97$   $\mu$ mol/L еритроцита) (Табела 9 и График 21).

Резултати показују да је бакар у субхроничном третману довео до значајног пораста LPO у еритроцитима пацова, од  $2.69 \pm 0.16$   $\mu$ mol/L еритроцита, код контроле, до  $5.65 \pm 0.31$   $\mu$ mol/L еритроцита, код групе која је примала само Cu, и  $3.99 \pm 0.20$   $\mu$ mol/L еритроцита, код групе третиране Cu+DPA. Третман флавоноидима је значајно смањио концентрације LPO у еритроцитима код животиња третираних Cu+QE+EC ( $2.34 \pm 0.09$   $\mu$ mol/L) и QE+EC ( $2.59 \pm 0.13$   $\mu$ mol/L) у поређењу са вредностима код животиња које су добијале само Cu и Cu+DPA, и вредности су приближне контролним (Табела 10 и График 22).

**Табела 9.** Концентрације реактивних врста кисеоника (ROS) и азота (RNS) у еритроцитима контролне и експерименталних група

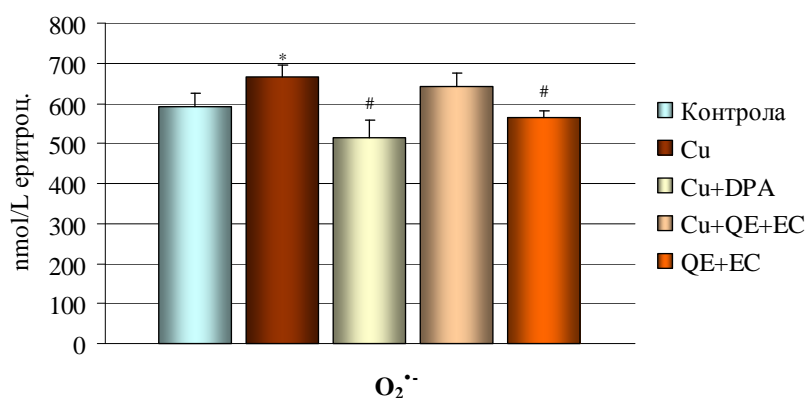
	$O_2^{\cdot-}$ (nmol/L еритроцита)	$H_2O_2$ (nmol/L еритроцита)	$NO_2^-$ ( $\mu$ mol/L еритроцита)
<b>Контрола</b>	590.32 $\pm$ 21.4	10.79 $\pm$ 0.50	329.34 $\pm$ 16.97
<b>Cu</b>	665.83 $\pm$ 24.3*	12.66 $\pm$ 0.58*	353.48 $\pm$ 11.49
<b>Cu+DPA</b>	515.43 $\pm$ 42.1 <sup>#</sup>	11.08 $\pm$ 1.27	344.94 $\pm$ 13.83
<b>Cu+QE+EC</b>	640.8 $\pm$ 36.1	10.82 $\pm$ 0.89	479.96 $\pm$ 74.87*
<b>QE+EC</b>	565.72 $\pm$ 16.8 <sup>#</sup>	10.38 $\pm$ 0.77	370.57 $\pm$ 43.00

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

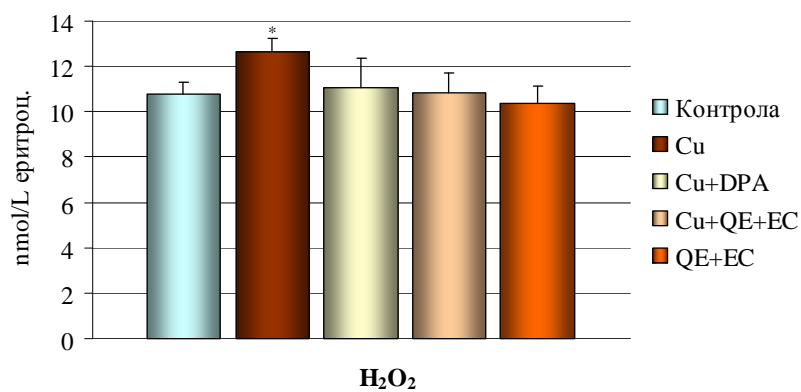
**График 19.** Концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

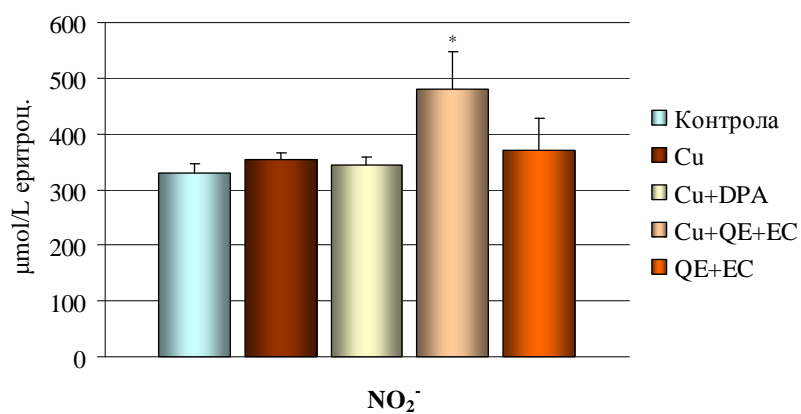
<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

**График 20.** Концентрације водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) у крви контролне и експерименталних група



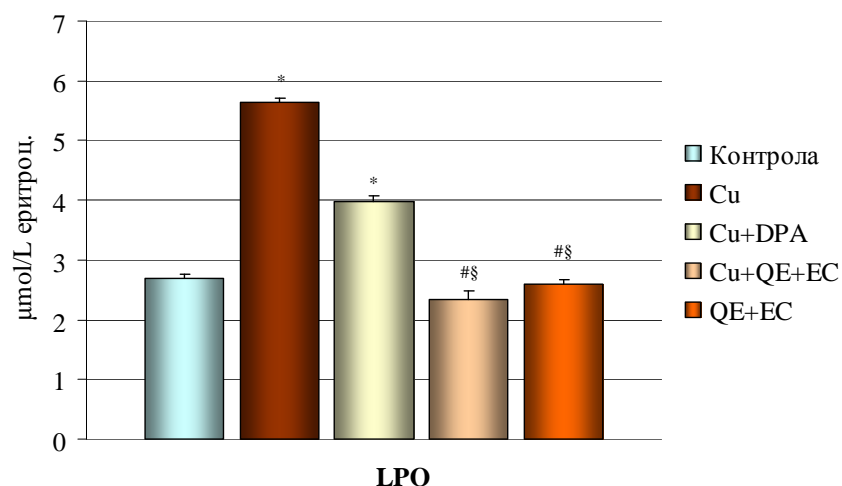
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 21.** Концентрације нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 22.** Концентрације липидних пероксида (LPO) у крви контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.6.2. БИОМАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ЈЕТРИ

Резултати овог истраживања показују да је бакар довео до значајног повећања концентрација липидних пероксида у јетри животиња ( $22.25 \pm 0.85$  nmol/g ткива) у поређењу са контролним вредностима ( $13.43 \pm 1.14$  nmol/g ткива). Концентрације LPO у јетри су значајно смањене код животиња третираних Cu+DPA ( $17.11 \pm 1.46$  nmol/g ткива), Cu+QE+EC ( $14.58 \pm 1.03$  µmol/L) и QE+EC ( $14.06 \pm 1.67$  nmol/g ткива) у поређењу са вредностима код животиња које су добијале само Cu, и приближне су контролним вредностима (Табела 10 и График 23).

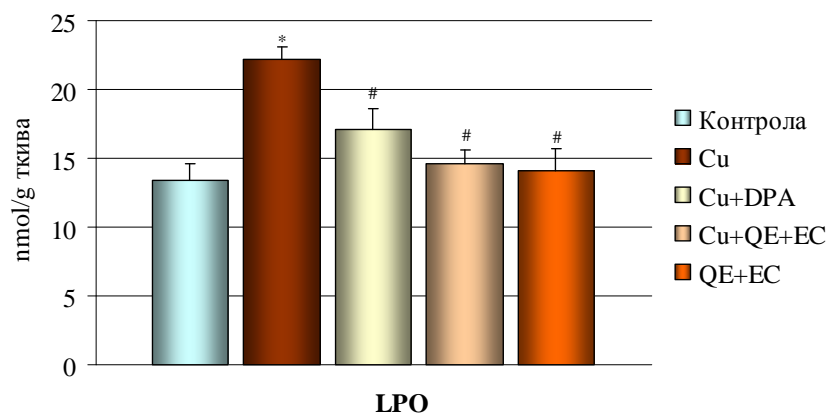
**Табела 10.** Концентрације липидних пероксида (LPO) у еритроцитима и у јетри контролне и експерименталних група

	<b>LPO</b> ( $\mu\text{mol/L}$ еритроцита)	<b>LPO</b> ( $\text{nmol/g}$ ткива)
<b>Контрола</b>	$2.69 \pm 0.16$	$13.43 \pm 1.14$
<b>Cu</b>	$5.65 \pm 0.31^*$	$22.25 \pm 0.85^*$
<b>Cu+DPA</b>	$3.99 \pm 0.20^{*\#}$	$17.11 \pm 1.46^\#$
<b>Cu+QE+EC</b>	$2.34 \pm 0.09^{\#\S}$	$14.58 \pm 1.03^\#$
<b>QE+EC</b>	$2.59 \pm 0.13^{\#\S}$	$14.06 \pm 1.67^\#$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

**График 23.** Концентрације липидних пероксида (LPO) у јетри контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

## 4.7. ЕФЕКТИ НА СИСТЕМ АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ (AOS)

### 4.7.1. ЕФЕКТИ НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ ГЛУТАТИОНА У ЕРИТРОЦИТИМА

Резултати добијени овим истраживањима показују да је третман бакром у еритроцитима животиња значајно умањио концентрације редукованог глутатиона (GSH) ( $42.42 \pm 1.64$  nmol/ml еритроцита) у односу на контролу ( $51.78 \pm 1.36$  nmol/ml еритроцита) (Табела 11 и График 24), док је повисио концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) ( $9.60 \pm 0.35$  nmol/ml еритроцита) у односу на контролу ( $8.85 \pm 0.13$  nmol/ml еритроцита) (Табела 11 и График 25). Концентрације GSH су значајно повећане код животиња третираних Cu+DPA, Cu+QE+EC и QE+EC у поређењу са вредностима код животиња које су добијале само Cu и приближне су контролним вредностима (Табела 11 и График 24). Глутатион редокс индекс (GSH RI) значајно је смањен у Cu групи ( $0.32 \pm 0.02 \times 10^{-1}$  AU) у односу на контролу ( $0.39 \pm 0.01 \times 10^{-1}$  AU) и остале експерименталне групе (Табела 11 и График 26).

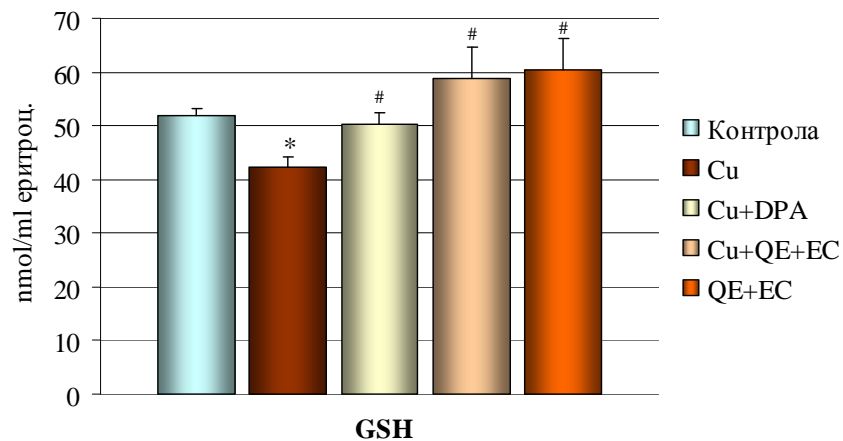
**Табела 11.** Концентрације редукованог глутатиона (GSH), оксидованог глутатиона (GSSG) и глутатион редокс индекс (GSH RI) у еритроцитима контролне и експерименталних група

	<b>GSH</b> (nmol/ml еритроцита)	<b>GSSG</b> (nmol/ml еритроцита)	<b>GSH RI</b> ( $\times 10^{-1}$ AU)
<b>Контрола</b>	$51.78 \pm 1.36$	$8.85 \pm 0.13$	$0.39 \pm 0.01$
<b>Cu</b>	$42.42 \pm 1.64^*$	$9.60 \pm 0.35^*$	$0.32 \pm 0.02^*$
<b>Cu+DPA</b>	$50.29 \pm 2.13^\#$	$8.24 \pm 0.97$	$0.41 \pm 0.02^\#$
<b>Cu+QE+EC</b>	$58.88 \pm 5.77^\#$	$9.41 \pm 1.46$	$0.42 \pm 0.03^\#$
<b>QE+EC</b>	$60.51 \pm 5.65^\#$	$8.92 \pm 0.33$	$0.44 \pm 0.01^{*\#}$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

^\# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

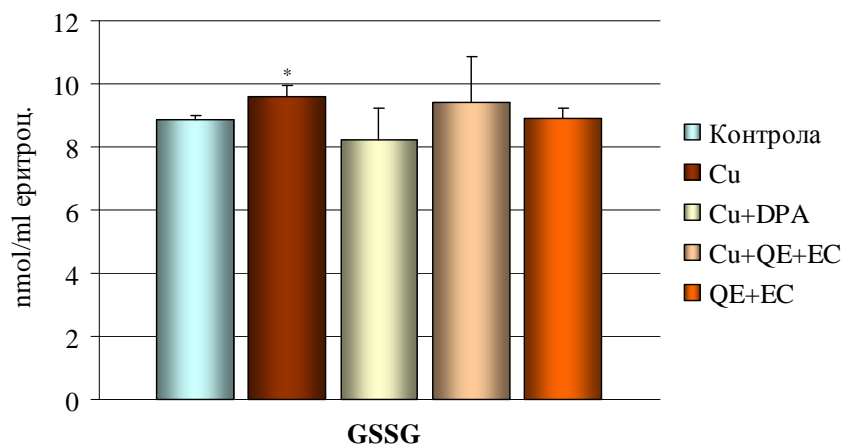
**График 24.** Концентрације редукованог глутатиона (GSH) у еритроцитима контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

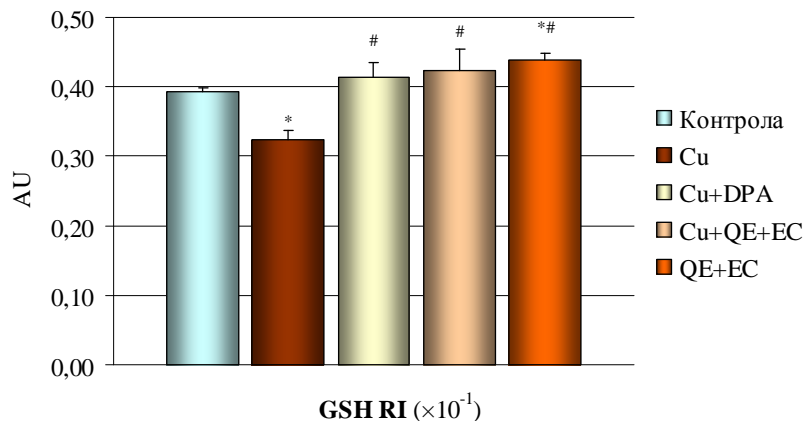
# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

**График 25.** Концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) у еритроцитима контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

**График 26.** Глутатион редокс индекс (GSH RI) у еритроцитима контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.2. ЕФЕКТИ НА АКТИВНОСТИ ЕНЗИМА АОС У ЕРИТРОЦИТИМА

Резултати активности ензима система антиоксидативне заштите (АОС) у еритроцитима приказани су у Табели 12 и 13 и на Графицима 27–30. Табела 12 и График 27 приказују активности супероксид-дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT). Након третмана бавром активност SOD у еритроцитима животиња значајно је повећана ( $6.36 \pm 0.32$  Јед./ml $\times 10^3$  еритроцита) у односу на контролу ( $5.22 \pm 0.26$  Јед./ml $\times 10^3$  еритроцита). DPA примењен са бавром довео је до значајног смањења активности SOD ( $5.05 \pm 0.23$  Јед./ml $\times 10^3$  еритроцита) у односу на групу која је примала само Cu ( $6.36 \pm 0.32$  Јед./ml $\times 10^3$  еритроцита). Активност CAT значајно је повећана након третмана бавром ( $4.83 \pm 0.27$  Јед./ml $\times 10^4$  еритроцита) у односу на контролну вредност ( $3.07 \pm 0.25$  Јед./ml  $\times 10^4$  еритроцита). Третман флавоноидима није битно утицао на активност SOD, док су активности CAT значајно умањене код животиња третираних Cu+QE+EC ( $3.64 \pm 0.34$  Јед./ml $\times 10^4$  еритроцита) и QE+EC ( $2.95 \pm 0.36$  Јед./ml $\times 10^4$  еритроцита) у поређењу са вредностима код животиња које су добијале само Cu ( $4.83 \pm 0.27$  Јед./ml $\times 10^4$  еритроцита), али приближне су контролним вредностима.



**Табела 12.** Активности ензима супероксид-дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у еритроцитима контролне и експерименталних група

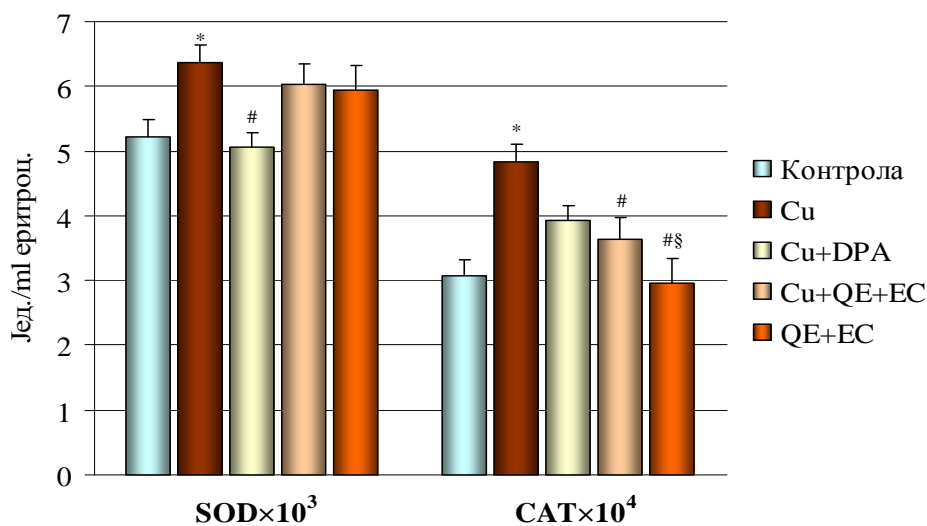
	<b>SOD</b> (Јед./ml $\times 10^3$ еритроцита)	<b>CAT</b> (Јед./ml $\times 10^4$ еритроцита)
<b>Контрола</b>	5.22 $\pm$ 0.26	3.07 $\pm$ 0.25
<b>Cu</b>	6.36 $\pm$ 0.32*	4.83 $\pm$ 0.27*
<b>Cu+DPA</b>	5.05 $\pm$ 0.23 <sup>#</sup>	3.93 $\pm$ 0.29
<b>Cu+QE+EC</b>	6.02 $\pm$ 0.33	3.64 $\pm$ 0.34 <sup>#</sup>
<b>QE+EC</b>	5.93 $\pm$ 0.40	2.95 $\pm$ 0.36 <sup>#§</sup>

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 27.** Активности супероксид-дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у еритроцитима контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

У Табели 13 и на Графицима 28, 29 и 30, приказани су резултати активности ензима глутатион циклуса, глутатион-пероксидазе (GSH-Px), глутатион-редуктазе (GR) и глутатион-S-трансферазе (GST) у еритроцитима животиња. Активност GSH-Px повећана је у свим групама третираним бавром, а најизразитије повећање је у групи Cu+DPA (41.91 ± 8.17 Јед./ml еритроцита) у поређењу са контролом (17.70 ± 0.61 Јед./ml еритроцита) (График 28). Активност GR незнатно је повећана у свим групама третираним бавром, а значајно повећана у групи која је примала само флавоноиде QE+EC (7.16 ± 0.72 Јед./ml еритроцита) у поређењу са контролом (3.31 ± 0.46 Јед./ml еритроцита), Cu+DPA групом (4.69 ± 0.75 Јед./ml еритроцита) и Cu+QE+EC групом (4.83 ± 0.68 Јед./ml еритроцита) (График 29). Активност GST значајно је умањена након третмана бавром (0.99 ± 0.32 Јед./ml еритроцита) у поређењу са контролом (2.68 ± 0.21 Јед./ml еритроцита). У експерименталним групама Cu+DPA (3.08 ± 0.53 Јед./ml еритроцита) и Cu+QE+EC (4.39 ± 0.63 Јед./ml еритроцита) повећане су активност GST у односу на групу која је примала само бакар, док је највеће повећање забележено у групи која је примала само флавоноиде QE+EC (8.27 ± 0.72 Јед./ml еритроцита) (График 30).

**Табела 13.** Активности ензима глутатион циклуса у еритроцитима контролне и експерименталних група

	<b>GSH-Px</b> (Јед./ml еритроцита)	<b>GR</b> (Јед./ml еритроцита)	<b>GST</b> (Јед./ml еритроцита)
<b>Контрола</b>	17.70 ± 0.61	3.31 ± 0.46	2.68 ± 0.21
<b>Cu</b>	28.18 ± 6.64	5.68 ± 0.87	0.99 ± 0.32*
<b>Cu+DPA</b>	41.91 ± 8.17*	4.69 ± 0.75	3.08 ± 0.53 <sup>#</sup>
<b>Cu+QE+EC</b>	29.04 ± 6.83	4.83 ± 0.68	4.39 ± 0.63 <sup>#</sup>
<b>QE+EC</b>	17.55 ± 4.25 <sup>§</sup>	7.16 ± 0.72* <sup>§</sup> †	8.27 ± 0.72* <sup>#</sup> §†

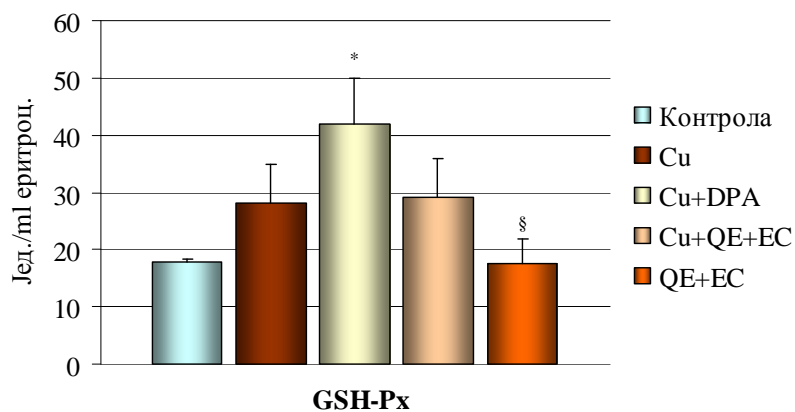
\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

† Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 28.** Активности глутатион-пероксидазе (GSH-Px) у еритроцитима контролне и експерименталних група

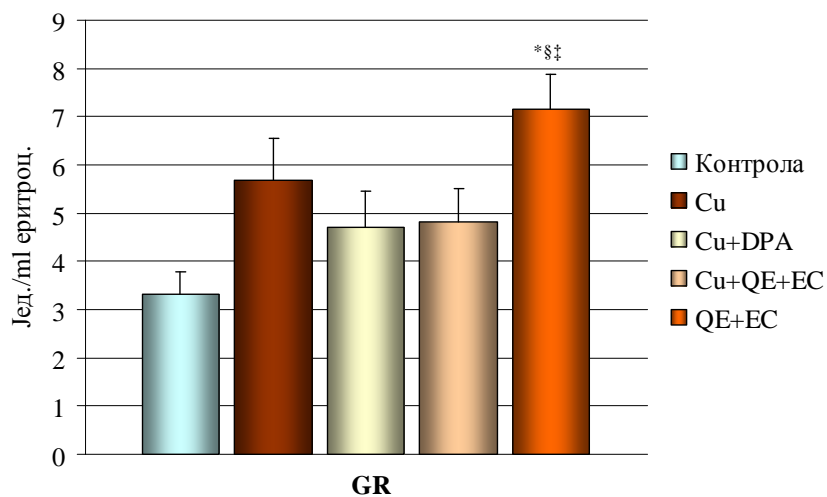


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 29.** Активности глутатион-редуктазе (GR) у еритроцитима контролне и експерименталних група

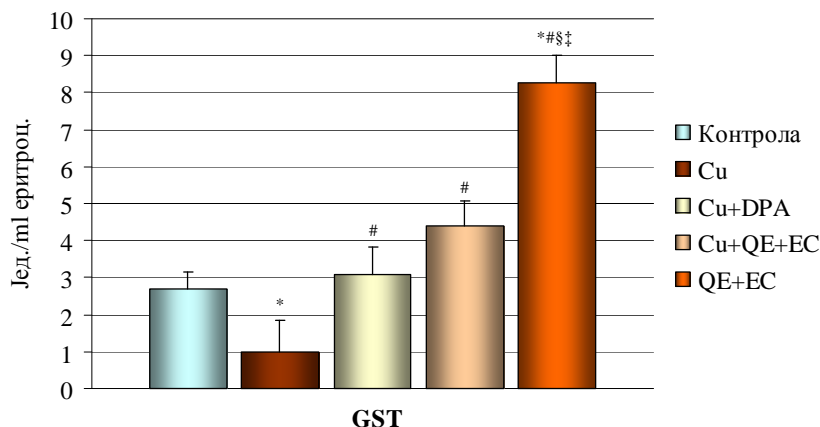


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

† Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 30.** Активности глутатион-S-трансферазе (GST) у еритроцитима контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

‡ Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.3. ЕФЕКТИ НА НЕЕНЗИМСКЕ КОМПОНЕНТЕ AOS У ЈЕТРИ

Ефекти третмана на концентрације аскорбинске киселине (Vit C), редукованог глутатиона (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) у јетри пацова приказани су у Табели 14 и на Графицима 31–34.

Концентрације Vit C значајно су смањене у групи третираној Cu ( $3.60 \pm 0.37$  mg %) и Cu+DPA ( $3.13 \pm 0.82$  mg %) у односу на контролу ( $7.75 \pm 2.17$  mg %). Флавоноиди су вишеструко повећали концентрацију Vit C у јетри животиња у групи Cu+QE+EC ( $12.83 \pm 1.71$  mg %) и QE+EC ( $16.09 \pm 1.78$  mg %) у поређењу са контролном групом и групама животиња које су добијале само Cu и Cu+DPA (Табела 14 и График 31).

Концентрација GSH у јетри значајно је умањена након третмана бавром ( $4.61 \pm 0.26$  nmol/mg протеина) у поређењу са контролом ( $5.56 \pm 0.22$  nmol/mg протеина). Третман Cu+DPA допринео је значајном повећању концентрације GSH ( $7.06 \pm 0.52$  nmol/mg протеина) у односу на контролу и групу третирану само бавром, док третман флавоноидима није довео до значајних промена концентрација GSH у јетри животиња у

групама Cu+QE+EC ( $5.02 \pm 0.29$  nmol/mg протеина) и QE+EC ( $5.10 \pm 0.51$  nmol/mg протеина) и вредности су приближне контролним (Табела 14 и График 32).

Концентрације GSSG у јетри су повећане у групама третираним Cu ( $0.062 \pm 0.005$  nmol/mg протеина) и Cu+DPA ( $0.067 \pm 0.006$  nmol/mg протеина), али ове промене нису статистички значајне у односу на контролне вредности ( $0.058 \pm 0.004$  nmol/mg протеина). Флавоноиди су смањили концентрације GSSG ( $0.051 \pm 0.002$  nmol/mg протеина) у поређењу са групама животиња које су добијале само Cu и Cu+DPA и приближне су контролним вредностима (Табела 14 и График 33).

GSH редокс индекс (GSH RI) значајно је смањен у групи третираној бакром ( $0.39 \pm 0.03$  AU) у односу на контролу ( $0.50 \pm 0.02$  AU) и остале експерименталне групе (Табела 14 и График 34).

**Табела 14.** Концентрације неензимских компоненти AOS у јетри контролне и експерименталних група

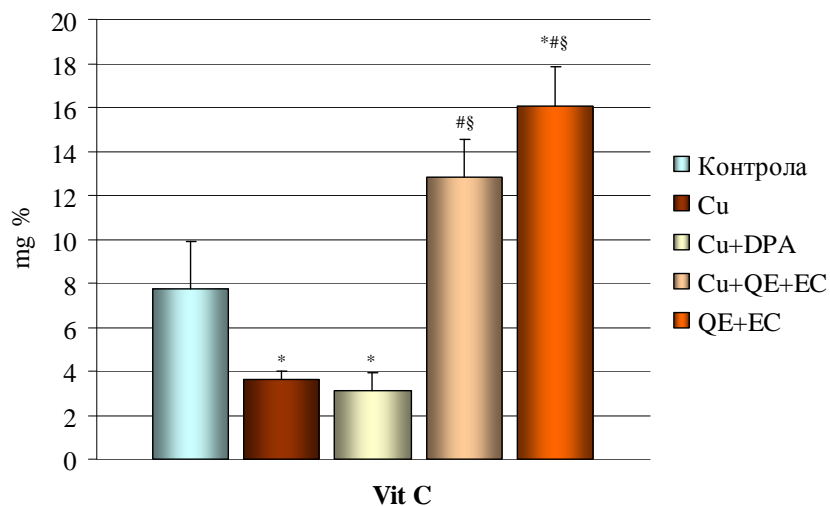
	<b>Vit C</b> (mg %)	<b>GSH</b> (nmol/mg протеина)	<b>GSSG</b> (nmol/mg протеина)	<b>GSH RI</b> (AU)
<b>Контрола</b>	$7.75 \pm 2.17$	$5.56 \pm 0.22$	$0.058 \pm 0.004$	$0.50 \pm 0.02$
<b>Cu</b>	$3.60 \pm 0.37^*$	$4.61 \pm 0.26^*$	$0.062 \pm 0.005$	$0.39 \pm 0.03^*$
<b>Cu+DPA</b>	$3.13 \pm 0.82^*$	$7.06 \pm 0.52^{*\#}$	$0.067 \pm 0.006$	$0.53 \pm 0.03^\#$
<b>Cu+QE+EC</b>	$12.83 \pm 1.71^{\#\S}$	$5.02 \pm 0.29^\S$	$0.054 \pm 0.003$	$0.49 \pm 0.02^\#$
<b>QE+EC</b>	$16.09 \pm 1.78^{*\#\S}$	$5.10 \pm 0.51^\S$	$0.051 \pm 0.002^{\#\S}$	$0.52 \pm 0.03^\#$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 31.** Концентрације аскорбинске киселине (Vit C) у јетри контролне и експерименталних група

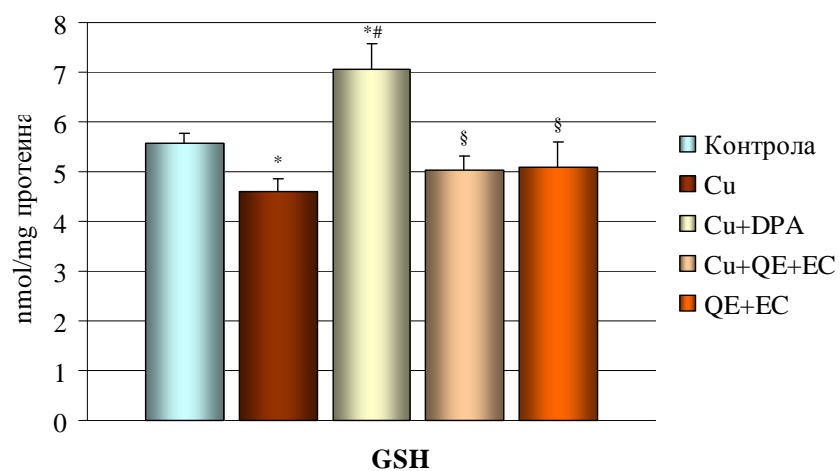


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

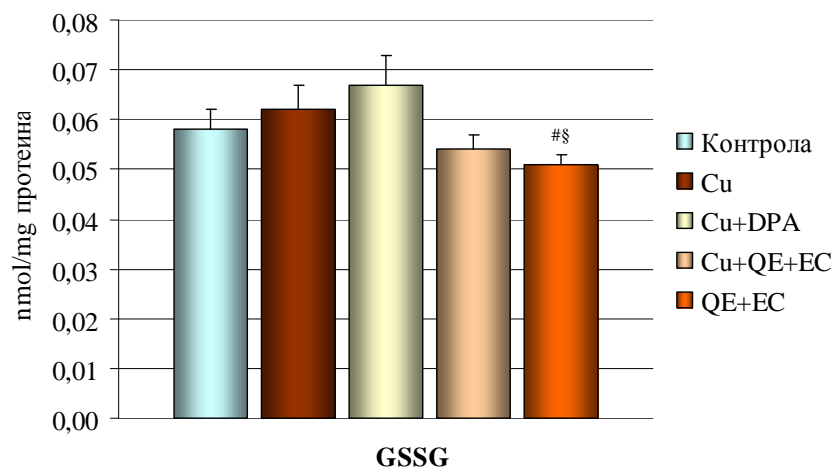
**График 32.** Концентрације редукованог глутатиона (GSH) у јетри контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

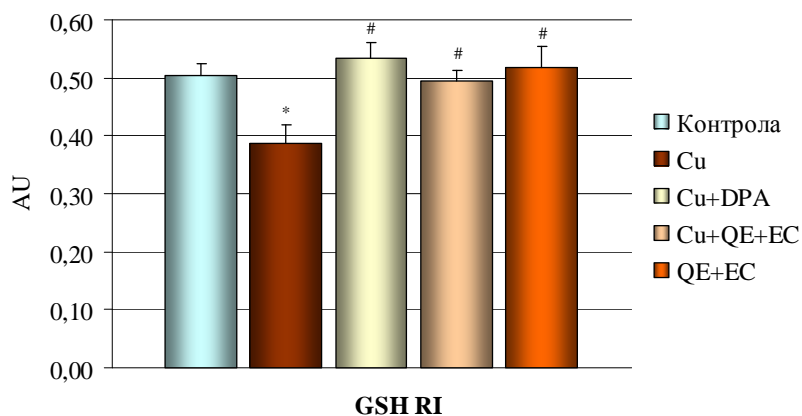
**График 33.** Концентрације оксидованог глутатиона (GSSG) у јетри контролне и експерименталних група



<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 34.** Глутатион редокс индекс (GSH RI) у јетри контролне и експерименталних група



<sup>\*</sup> Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.4. ЕФЕКТИ НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА AOS У ЈЕТРИ

У Табели 15 и на Графицима 35–37 приказани су ефекти третмана на активности укупне SOD, манган садржавајуће SOD (Mn SOD), бакар, цинк садржавајуће SOD (CuZn SOD), и каталазе (CAT) у јетри животиња.

Активност укупне SOD је значајно повећана само у групи третираној Cu+DPA ( $13.21 \pm 0.84$  Јед./mg протеина) у поређењу са контролом ( $10.60 \pm 0.61$  Јед./mg протеина). Флавоноиди значајно смањују активност укупне SOD у групи Cu+QE+EC ( $8.99 \pm 0.28$  Јед./mg протеина) у поређењу са контролном групом и групама животиња које су добијале само Cu и Cu+DPA (Табела 15 и График 35).

У групи третираној Cu+DPA активност Mn SOD је значајно повећана ( $9.66 \pm 0.98$  Јед./mg протеина) у односу на групу третирану само Cu ( $5.33 \pm 0.79$  Јед./mg протеина), док су флавоноиди смањили активност овог ензима у поређењу са групом третираном Cu+DPA (Табела 15 и График 36).

У групи третираној бакром активност CuZn SOD значајно је повећана у односу на контролу (од  $3.38 \pm 0.72$  Јед./mg протеина до  $7.18 \pm 0.51$  Јед./mg протеина). У осталим експерименталним групама активности CuZn SOD су смањене у односу на групу третирану само Cu, и приближне су контролним вредностима (Табела 15 и График 36).

Активност CAT је значајно повећана у групи која је примала само Cu ( $490.2 \pm 32.36$  Јед./mg протеина) и у групи Cu+DPA ( $582.1 \pm 37.48$  Јед./mg протеина) у односу на контролу ( $313.5 \pm 38.12$  Јед./mg протеина). Флавоноиди значајно смањују активности CAT у групи Cu+QE+EC ( $358.9 \pm 9.57$  Јед./mg протеина) и QE+EC ( $371.2 \pm 20.42$  Јед./mg протеина) у поређењу са Cu+DPA групом, и вредности су приближне контролним (Табела 15 и График 37).



**Табела 15.** Активности супероксид-дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у јетри контролне и експерименталних група

	<b>Ук. SOD</b> (Јед./mg протеина)	<b>Mn SOD</b> (Јед./mg протеина)	<b>CuZn SOD</b> (Јед./mg протеина)	<b>CAT</b> (Јед./mg протеина)
<b>Контрола</b>	10.60 ± 0.61	7.22 ± 0.89	3.38 ± 0.72	313.5 ± 38.12
<b>Cu</b>	12.51 ± 1.14	5.33 ± 0.79	7.18 ± 0.51 <sup>*</sup>	490.2 ± 32.36 <sup>*</sup>
<b>Cu+DPA</b>	13.21 ± 0.84 <sup>*</sup>	9.66 ± 0.98 <sup>#</sup>	3.55 ± 0.84 <sup>#</sup>	582.1 ± 37.48 <sup>*</sup>
<b>Cu+QE+EC</b>	8.99 ± 0.28 <sup>*#§</sup>	6.35 ± 0.38 <sup>§</sup>	2.65 ± 0.30 <sup>#</sup>	358.9 ± 9.57 <sup>§</sup>
<b>QE+EC</b>	9.99 ± 0.46 <sup>§</sup>	6.10 ± 0.54 <sup>§</sup>	3.89 ± 0.40 <sup>#‡</sup>	371.2 ± 20.42 <sup>§</sup>

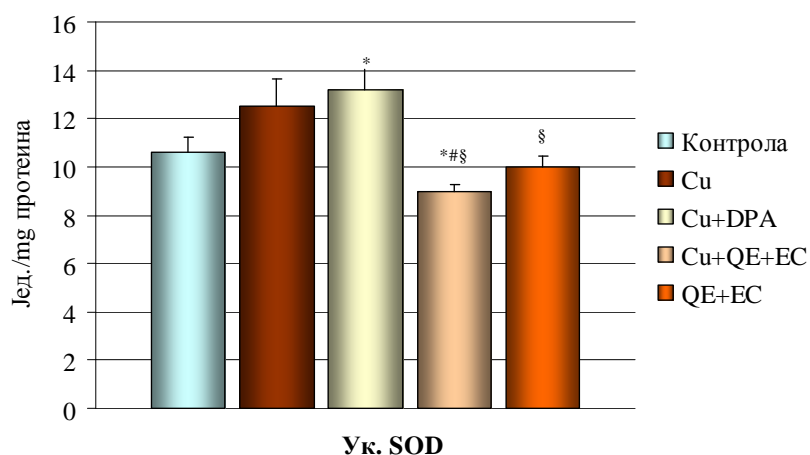
<sup>\*</sup> Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>‡</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 35.** Активност укупне супероксид-дисмутазе (Ук. SOD) у јетри контролне и експерименталних група

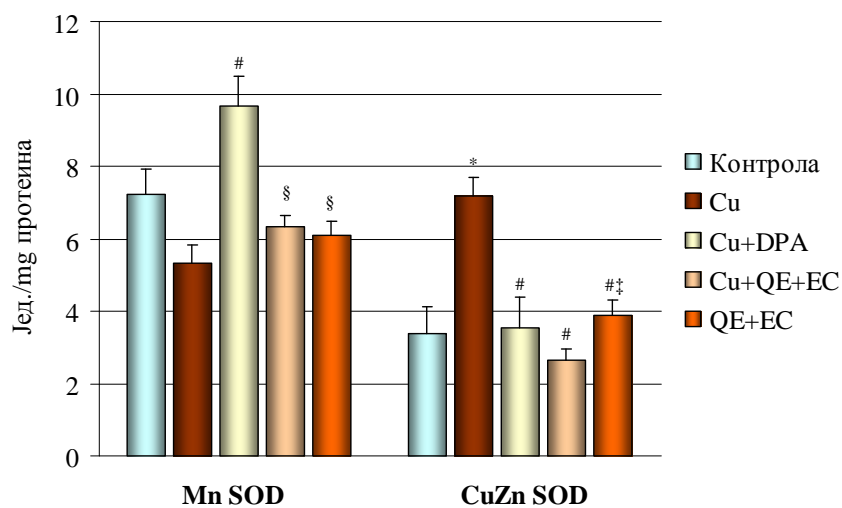


<sup>\*</sup> Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 36.** Активност манган садржавајуће супероксид-дисмутазе (Mn SOD) и бакар, цинк садржавајуће супероксид-дисмутазе (CuZn SOD) у јетри контролне и експерименталних група



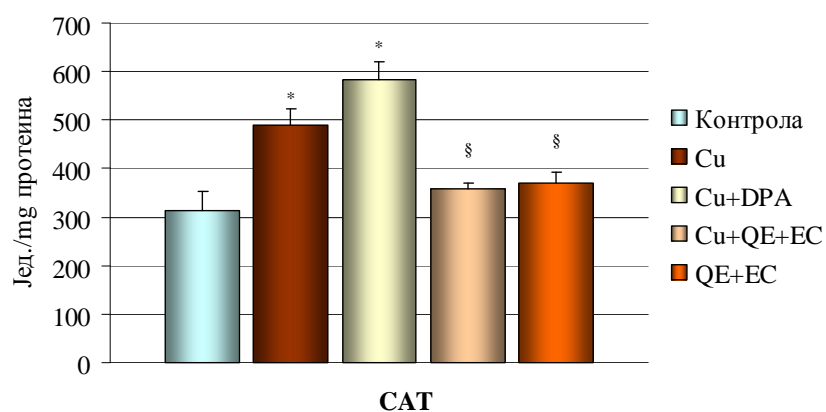
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

‡ Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 37.** Активност каталазе (CAT) у јетри контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

Табела 16 и Графици 38–40 приказују активности ензима глутатион циклуса у јетри. Активност GSH-Px значајно је повећана само у групи Cu+QE+EC, на  $49.27 \pm 2.98$  Јед./mg протеина, у поређењу са контролом ( $34.56 \pm 3.81$  Јед./mg протеина), групом третираном само Cu ( $36.54 \pm 3.89$  Јед./mg протеина) и групом третираном Cu+DPA ( $42.40 \pm 3.02$  Јед./mg протеина) (Табела 16, График 38).

Активности GR су повећане након третмана Cu ( $11.29 \pm 1.13$  nmol NADPH/mg протеина) и Cu+DPA ( $11.10 \pm 0.62$  nmol NADPH/mg протеина), али ове промене нису статистички значајне у односу на контролне вредности ( $10.42 \pm 1.14$  nmol NADPH/mg протеина) (Табела 16, График 39).

Бакар није значајно утицао на активност GST, док су флавоноида повећали активност овог ензима у групи Cu+QE+EC ( $327.17 \pm 22.59$  Јед./mg протеина) и QE+EC ( $370.95 \pm 45.38$  Јед./mg протеина) у поређењу са контролном групом ( $221.33 \pm 16.95$  Јед./mg протеина) и групом животиња која је добијала Cu+DPA ( $206.47 \pm 19.06$  Јед./mg протеина) (Табела 16, График 40).

**Табела 16.** Активности ензима глутатион циклуса у јетри контролне и експерименталних група

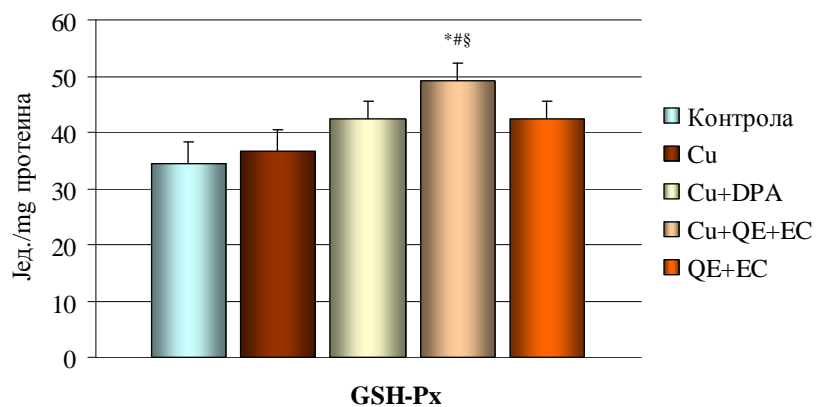
	<b>GSH-Px</b> (Јед./mg протеина)	<b>GR</b> (Јед./ mg протеина)	<b>GST</b> (Јед./mg протеина)
<b>Контрола</b>	$34.56 \pm 3.81$	$10.42 \pm 1.14$	$221.33 \pm 16.95$
<b>Cu</b>	$36.54 \pm 3.89$	$11.29 \pm 1.13$	$235.08 \pm 19.0$
<b>Cu+DPA</b>	$42.40 \pm 3.02$	$11.10 \pm 0.62$	$206.47 \pm 19.06$
<b>Cu+QE+EC</b>	$49.27 \pm 2.98^{*\#\S}$	$9.62 \pm 0.45$	$327.17 \pm 22.59^{*\S}$
<b>QE+EC</b>	$42.53 \pm 3.11$	$10.75 \pm 0.79$	$370.95 \pm 45.38^{*\#\S}$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 38.** Активност глутатион-пероксидазе (GSH-Px) у јетри контролне и експерименталних група

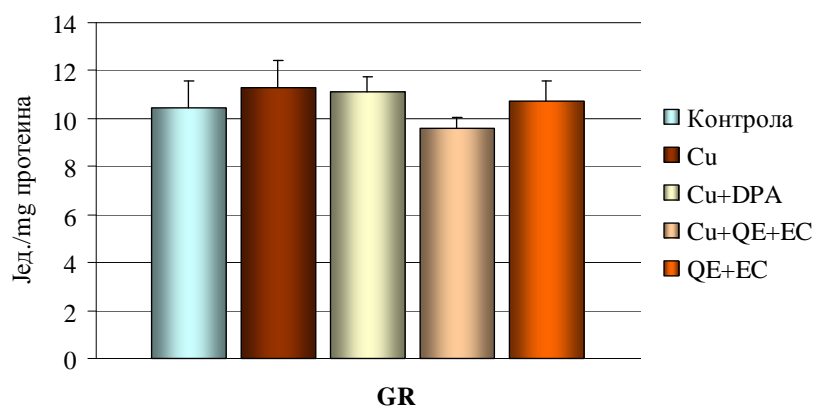


\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

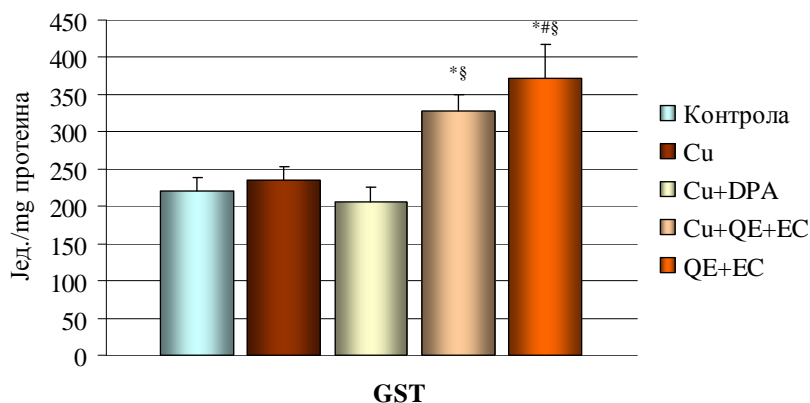
# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 39.** Активност глутатион-редуктазе (GR) у јетри контролне и експерименталних група



**График 40.** Активност глутатион-S-трансферазе (GST) у јетри контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.8. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ БАКРА И ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА

Концентрације бакра у плазми и јетри третираних животиња дате су у Табели 17 и на Графицима 41–44. Концентрације укупног бакра у плазми не варирају значајно у третираним групама, али резултати указују да је субхроничан третман бакром допринео незнатном повећању концентрација укупног бакра ( $169.27 \pm 38.53 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) у плазми третираних животиња у односу на контролу ( $157.27 \pm 21.27 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) (Табела 17 и График 41). Концентрација бакра невезаног за церулоплазмин (non-CP-bound Cu, NCPC), добијена на основу формуле, значајно је увећана у плазми бакром третираних животиња ( $49.52 \pm 1.9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) у односу на контролу ( $8.96 \pm 0.50 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) (Табела 17 и График 42). Концентрације укупног бакра у плазми незнатно су смањене након третмана са DPA ( $118.75 \pm 9.53 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) и флавоноидима ( $127.32 \pm 11.58 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) (Табела 17 и График 41), а концентрације non-CP-bound Cu значајно су умањене након третмана са DPA ( $2.91 \pm 0.79 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) и флавоноидима ( $1.70 \pm 0.46 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) у односу на контролу и групу која је третирана само бакром (Табела 17, График 42).

С друге стране, концентрације укупног бакра у јетри и концентрације non-CP-bound Cu, значајно су повећане у свим групама третираним бакром у односу на контролне

вредности ( $3.6 \pm 0.8 \mu\text{g/g w.w.}$  ткива, за укупни бакар и  $1.95 \pm 0.15 \mu\text{g/g w.w.}$  ткива, за non-CP-bound Cu). У групи Cu+QE+EC концентрација укупног бакра ( $29.9 \pm 1.8 \mu\text{g/g w.w.}$  ткива) је виша у односу на Cu третирану групу ( $12.0 \pm 1.4 \mu\text{g/g w.w.}$  ткива) (Табела 17 и График 43). Концентрација non-CP-bound Cu, већа је у групи која је третирана Cu+DPA ( $17.07 \pm 1.75 \mu\text{g/g w.w.}$  ткива) у односу на групу која је третирана само Cu ( $10.51 \pm 1.00 \mu\text{g/g w.w.}$  ткива). Такође, концентрација non-CP-bound Cu, већа је у групи Cu+QE+EC ( $27.89 \pm 1.27 \mu\text{g/g w.w.}$  ткива) у односу на остале две групе које су примале бакар, Cu и Cu+DPA (Табела 17, График 44).

**Табела 17.** Концентрације бакра у плазми и јетри контролне и експерименталних група

	Укупни бакар у плазми ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )	Non-CP-bound Cu у плазми ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )	Укупни бакар у јетри ( $\mu\text{g}/\text{g w.w.}$ ткива)	Non-CP-bound Cu у јетри ( $\mu\text{g}/\text{g w.w.}$ ткива)
<b>Контрола</b>	$157.27 \pm 21.27$	$8.96 \pm 0.50$	$3.6 \pm 0.8$	$1.95 \pm 0.15$
<b>Cu</b>	$169.27 \pm 38.53$	$49.52 \pm 1.9^*$	$12.0 \pm 1.4^*$	$10.51 \pm 1.00^*$
<b>Cu+DPA</b>	$118.75 \pm 9.53$	$2.91 \pm 0.79^{*\#}$	$18.8 \pm 4.2^*$	$17.07 \pm 1.75^{*\#}$
<b>Cu+QE+EC</b>	$127.32 \pm 11.58$	$1.70 \pm 0.46^{*\#}$	$29.9 \pm 1.8^{*\#}$	$27.89 \pm 1.27^{*\#\S}$
<b>QE+EC</b>	$152.09 \pm 6.32$	$8.32 \pm 0.73^{\#\S\ddagger}$	$3.7 \pm 0.8^{\#\S\ddagger}$	$2.01 \pm 0.32^{\#\S\ddagger}$

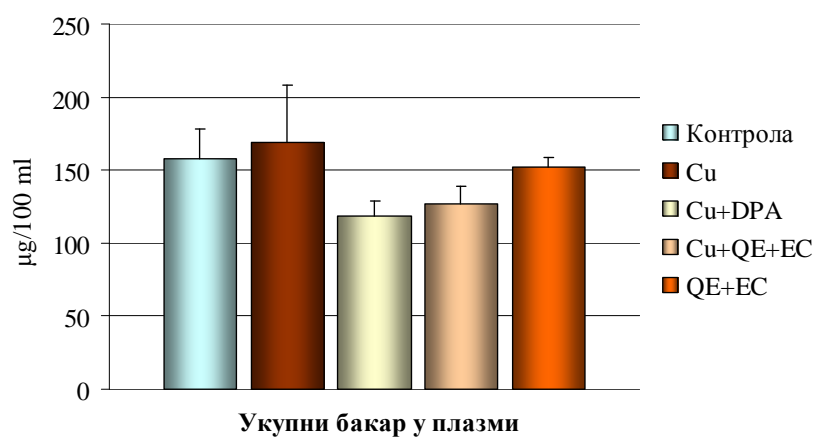
\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

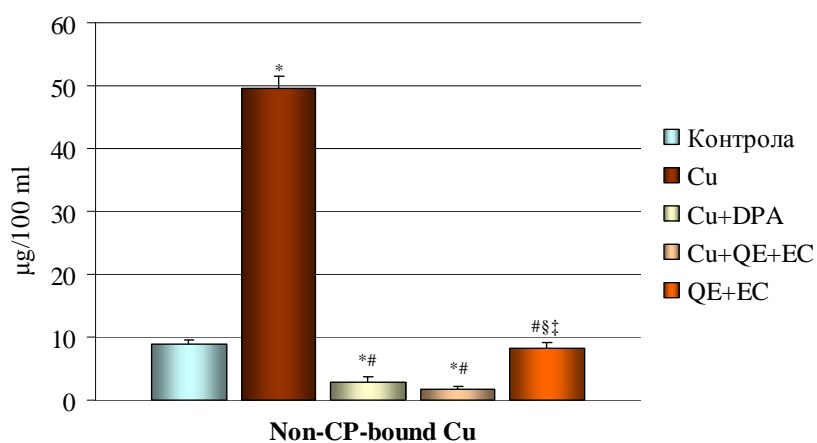
§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

‡ Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 41.** Концентрација укупног бакра у плазми контролне и експерименталних група



**График 42.** Концентрација бакра неvezаног за церулоплазмин (non-CP-bound Cu) у плазми контролне и експерименталних група



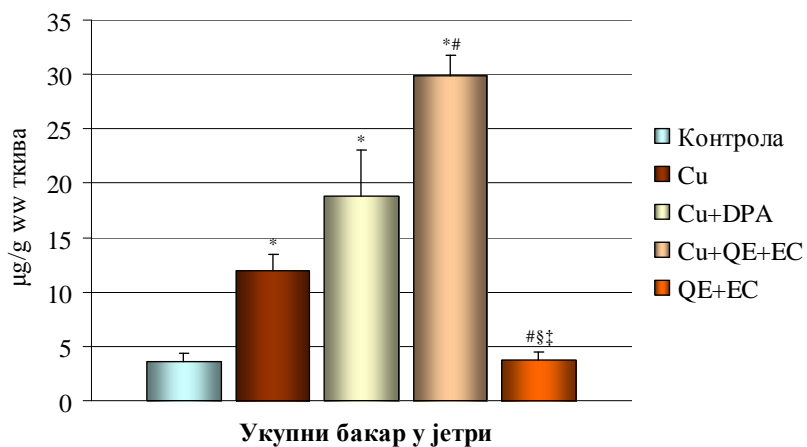
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

† Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 43.** Концентрација укупног бакра у јетри контролне и експерименталних група



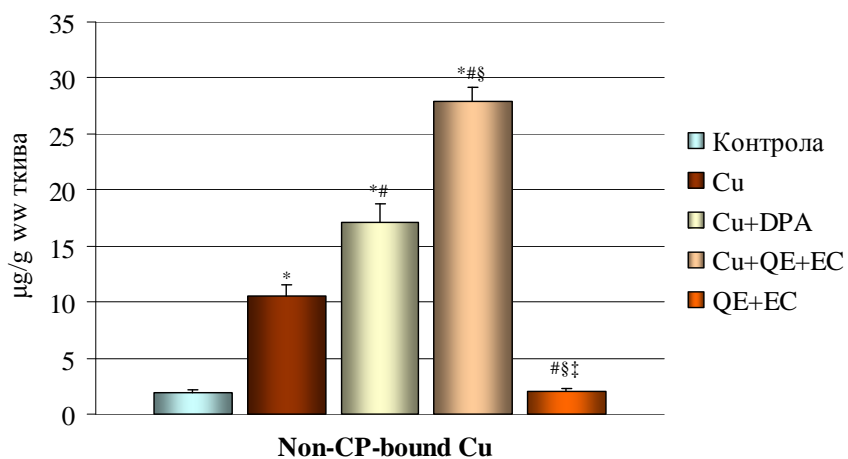
\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

† Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).

**График 44.** Концентрација бакра неvezаног за церулоплазмин (non-CP-bound Cu) у јетри контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

† Статистички значајно у поређењу са Cu+QE+EC групом ( $p < 0.05$ ).



Резултати приказани у Табели 18 и на Графику 45 показују да је концентрација церулоплазмина у плазми животиња третираних Cu ( $37.9 \pm 1.8$  mg/100 ml) и животиња третираних Cu+DPA ( $36.8 \pm 1.2$  mg/100 ml) значајно смањена у односу на контролу ( $47.1 \pm 3.9$  mg/100 ml). Концентрација церулоплазмина у плазми животиња третираних Cu+QE+EC ( $39.9 \pm 1.8$  mg/100 ml) је умањена у односу на контролу, али је виша у односу на остале две групе третиране бакром.

Концентрација церулоплазмина у јетри, изражена преко укупних протеина јетре, значајно је повећана у групи третираној само Cu ( $4.16 \pm 0.09$   $\mu$ g/mg протеина) и Cu+DPA ( $4.78 \pm 0.43$   $\mu$ g/mg протеина) у односу на контролу ( $3.63 \pm 0.15$   $\mu$ g/mg протеина) (Табела 18, График 46).

Концентрација укупних протеина јетре значајно је смањена у групи третираној Cu ( $11.57 \pm 0.45$  mg/ml) и Cu+DPA ( $11.27 \pm 0.73$  mg/ml) у односу на контролу ( $14.74 \pm 0.83$  mg/ml). Флавоноиди значајно повећавају концентрације укупних протеина јетре у групи Cu+QE+EC ( $15.45 \pm 0.33$  mg/ml) и QE+EC ( $16.55 \pm 0.43$  mg/ml) у поређењу са групама животиња које су добијале само Cu и Cu+DPA, и вредности су приближне контролним (Табела 18, График 47).

**Табела 18.** Концентрације церулоплазмина у плазми и јетри и концентрације укупних протеина у јетри контролне и експерименталних група

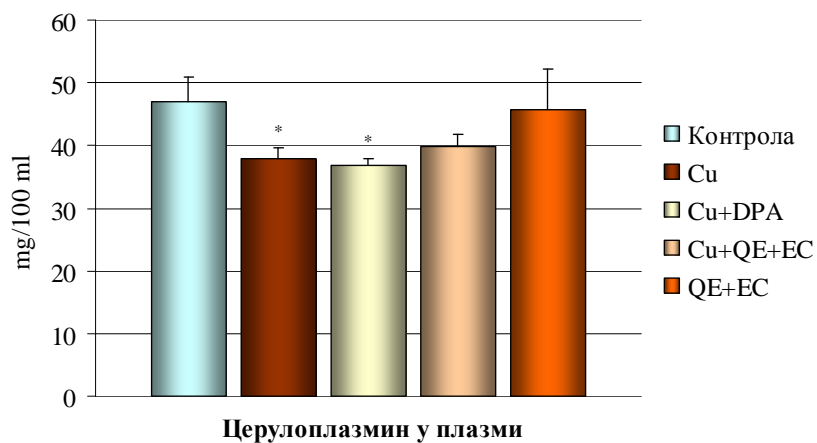
	Церулоплазмин у плазми (mg/100 ml)	Церулоплазмин у јетри ( $\mu$ g/mg протеина)	Укупни протеини у јетри (mg/ml)
<b>Контрола</b>	$47.1 \pm 3.9$	$3.63 \pm 0.15$	$14.74 \pm 0.83$
<b>Cu</b>	$37.9 \pm 1.8^*$	$4.16 \pm 0.09^*$	$11.57 \pm 0.45^*$
<b>Cu+DPA</b>	$36.8 \pm 1.2^*$	$4.78 \pm 0.43^*$	$11.27 \pm 0.73^*$
<b>Cu+QE+EC</b>	$39.9 \pm 1.8$	$4.07 \pm 0.24$	$15.45 \pm 0.33^{#\S}$
<b>QE+EC</b>	$45.7 \pm 6.6$	$3.28 \pm 0.38^{\S}$	$16.55 \pm 0.43^{#\S}$

\* Статистички значајно у поређењу са контролама ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

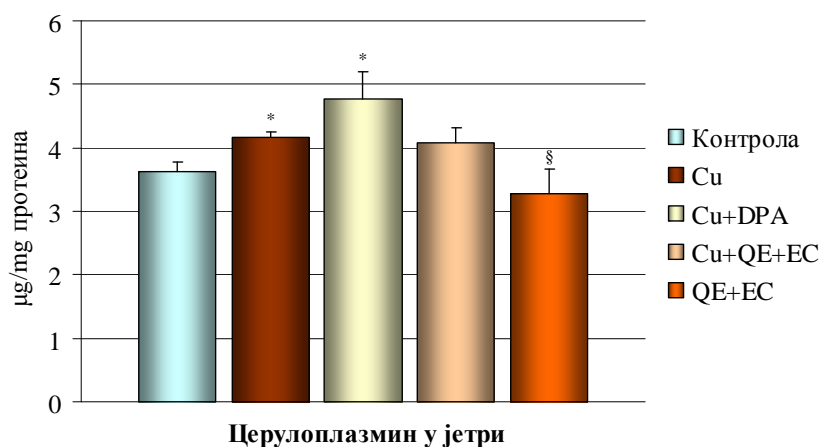
§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 45.** Концентрација церулоплазмينا у плазми контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

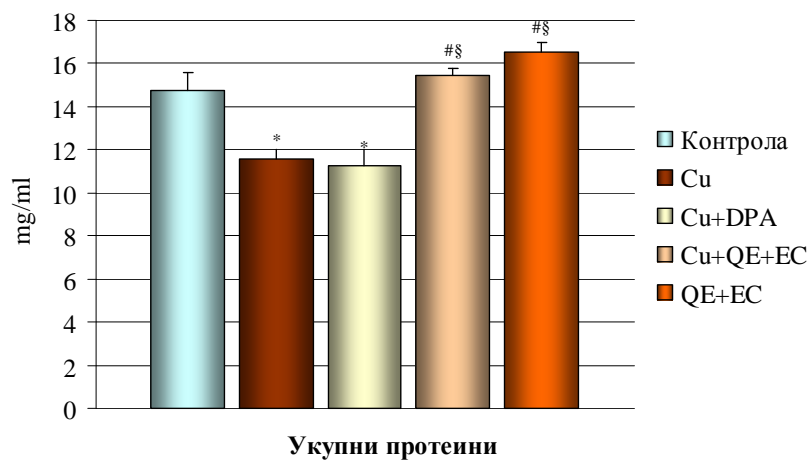
**График 46.** Концентрација церулоплазмينا у јетри контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

**График 47.** Концентрација укупних протеина у јетри контролне и експерименталних група



\* Статистички значајно у поређењу са контролом ( $p < 0.05$ ).

# Статистички значајно у поређењу са Cu групом ( $p < 0.05$ ).

§ Статистички значајно у поређењу са Cu+DPA групом ( $p < 0.05$ ).

## **5. ДИСКУСИЈА**

Бакар као есенцијални нутриент учествује у бројним биолошким процесима неопходним за нормалан раст и развој организма. Активни је центар преко 12 металоензима који су укључени у стварање хемоглобина, биосинтезу катехоламина, у синтезу меланина, оксидацију дифенола, транспорт електрона (Уау, 1998; Ferenci, 2004; Kodama и Fujisawa, 2009). С обзиром да је редокс активан метал и може да стимулише продукцију ROS и тиме доведе до оксидативног стреса његова хомеостаза је добро контролисана (Halliwell и Gutteridge, 2007). Услед поремећаја у хомеостази или повећане изложености бакру може да дође до испољавања његових штетних ефеката (Fuentealba и Aburto, 2003, Uriu-Adams и Keen, 2005). Бакар у вишку доводи до појаве психичких и неуролошких симптома (Scheinberg и Sternlieb, 1996; Arnal и сар., 2010), делује штетно на кардиоваскуларни систем, промовише атеросклерозу (Iskra и Majewski, 2000), доводи до бројних обољења јетре, опструкције жучних путева и канцера јетре (Eagon и сар., 1999; Ferenci, 2004; Patil и сар., 2013).

Флавоноиди показују широк спектар биолошке активности укључујући антиоксидативно (Bøhn и сар., 2012; Peng и сар., 2013), антиалергијско (Kawai и сар., 2007), антимикубно (Cushnie и Lamb, 2005; Ishisaka и сар., 2011), неуропротективно (Zhao, 2009) и хепатопротективно деловање (Middleton и сар., 2000; Si и сар., 2011; Ishisaka и сар., 2011). Исхрана богата флавоноидима, нарочито кверцетином, доводи до опадања крвног притиска, смањује ризик од кардиоваскуларних болести (Nijveldt и сар., 2001), доприноси редукцији неуродегенеративних поремећаја и побољшава антиоксидативни одбрамбени систем (García-Saura и сар., 2005; Zhao, 2009; Larson и сар., 2012). Кверцетин и епикатехин заступљени су у намирницама присутним у свакодневной исхрани људи. Најбогатији извори ових флавоноида су јабуке, црни лук, орашасто воће, црни и зелени чај, црвено вино, чоколада и какао. Захваљујући фенолној структури и присуству хидроксилних група, флавоноиди делују као донори водоника и представљају снажне антиоксидансе (Bors и сар. 1990; Mira и сар., 2002).

Циљ истраживања ове докторске дисертације је испитивање ефеката субхроничне интоксикације бакром на хематолошко-биохемијске параметре у крви, параметре оксидативно/антиоксидативног статуса у еритроцитима и јетри пацова, као и испитивање протективног капацитета флавоноида кверцетина (QE) и епикатехина (EC). Такође су испитивани и упоређивани ефекти примењених флавоноида и комерцијалног лека D-

---

пенициламина (DPA) који се користи у терапији Вилсонове болести, чији је узрок повећано акумулирање бакра у ткивима.

У току експеримента у трајању од 5 недеља, животиње које су пиле воду са бакар хлоридом узимале су у просеку мање воде од животиња које су пиле чисту воду (Табела 1). То је довело до дехидратације, која је условила и смањено узимање хране. Резултати нашег истраживања показују да је код животиња субхронично интоксицираних само баком дошло до смањења прираста телесне тежине за ~ 30% у поређењу са осталим експерименталним групама (Табела 1, График 1) што је довело до лошег општег здравственог стања животиња. Смањење телесне тежине код пацова третираних баком упућује на појачану разградњу протеина ткива. Хронични стрес доводи до појачаног лучења кортизола који појачава катаболичке реакције, односно доводи до интензивније разградње ткива у корист регенерације. Друге студије су такође показале да дуготрајна конзумација соли бакра узрокује поремећаје у расту и смањење телесне тежине животиња (Boyden и сар., 1938; Rana и Kumar 1980; Bataineh и сар., 1998).

С друге стране, животиње третиране флавоноидима QE и EC у котретману са баком, као и животиње третиране баком и DPA, континуирано су добијале на тежини. Студија Satyendra и сар. (2012) показала је да су мишеви третирани кверцетином нормално добијали на тежини и имали 20% повећање дужине живота.

Бакар је важан за процес еритропоезе и његов недостатак је повезан са умањеном синтезом хемоглобина и анемијом. Показано је међутим, да изложеност већим концентрацијама бакра *in vitro* доводи до смањења флексибилности еритроцита, повећане пропустљивости мембране и осмотске слабости третираних ћелија што резултује повећаном разградњом или хемолизом еритроцита (Adams и сар., 1979). Истраживање Fernandes и сар. (1988) показало је да инкубација суспензије еритроцита бакар(II)-јонима доводи до липидне пероксидације и деструкције еритроцита као последице оксидације оксихемоглобина од стране бакар(II)-јона и то за крајњи резултат има смањење концентрације Hb и Hct и појаву микроцитне анемије.

Резултати овог истраживања показују да је интоксикација сублеталном дозом бакра довела до значајних промена хематолошких параметара. Смањен је број еритроцита (RBC), концентрација хемоглобина (Hb), као и вредност хематокрита (Hct), (Табела 2 и Графици 2–4). Такође, забележене су и промењене вредности еритроцитних индекса

(MCV, MCH, MCHC, RDW) у групи животиња третираних само бавром и бавром са DPA (Табела 3). Анемија, која се јавља код бавром третираних животиња карактерише се микроцитозом и хипохромијом. Еритроцитни индекси су параметри који указују на особине еритроцита и промене њихових вредности ближе одређују морфологију еритроцита и тип анемије. После третмана бавром на микроцитозу указује смањена вредност просечне запремине еритроцита (MCV), док на хипохромну анемију указују смањене вредности просечне количине Hb у еритроциту (MCH) и просечне концентрације Hb у свим еритроцитима (MCHC), као и повећана вредност ширине дистрибуције запремине еритроцита (RDW). RDW је еритроцитни индекс који показује варијације у величини еритроцита и када је повећан упућује на постојање више популација еритроцита, што је карактеристика појединих хематолошких болести еритроцитне лозе (Simel и сар., 1988). Слични резултати добијени су и у другим студијама које показују да бакар, као и други метали (олово, кадмијум и цинк), оштећују мембрански скелет еритроцита, и то доводи до деформације ћелија, њиховог повећаног разлагања и до хемоллизе (Kostić и сар., 1993; Ognjanović и сар., 2003; Vozynski и сар., 2009; Nikolić и сар., 2013).

Од изузетне је важности за еритроците да имају способност да спрече или изврше поправку оштећених молекула, попут хемоглобина или мембранских липида и протеина. С обзиром да еритроцити немају способност синтезе протеина, не поседују способност да замене било који протеин или компоненту еритроцитне мембране која се оштети и постане нефункционална. Две су озбиљне последице оксидације хемоглобина: прво, створени метхемоглобин није способан да везује кисеоник и друго супероксид анион радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), који се у том процесу створио, може да оксидује или иницира оксидацију многих биомолекула посебно мембранских липида. Rana и Kumar (1980) су показали да у присуству бакра долази до повећане продукције  $O_2^{\cdot-}$  на мембранама RBC. Бакар(I)-јон у реакцији са кисеоником продукује  $O_2^{\cdot-}$ , а бакар(II)-јон оксидује –SH групе хемоглобина (Clopton и Saltman, 1997).

Еритроцити су осетљивији на оксидативна оштећења од других ћелија, с обзиром да имају велики афинитет за везивање метала, стално су изложени деловању слободних радикала и имају мембране богате незасићеним масним киселинама (Clemens и Waller, 1987). Као последица пероксидативних оштећења мембране слободним радикалима, у концентрацијама са којима антиоксидативни заштитни систем еритроцита не може да се

избори, наступа хемолиза (Ribarov и Venov, 1981; Iciek и сар., 2000; Gaetke и Chow, 2003). Смањење броја еритроцита, концентрација хемоглобина и вредности хематокрита након третмана сублеталним дозама бакра у нашем истраживању, вероватно су последице оксидативних оштећења мембране еритроцита и хемоглобина, као и њихове повећане деструкције.

Значајан пад вредности Hb и Hct, осим у групи која је третирана само бакром, забележени су и у групи која је уз бакар примала и DPA, што упућује на закључак да DPA није спречио негативне ефекте бакра на ове хематолошке параметре (Табела 2, График 3 и 4). Један од нежељених ефеката који се јавља приликом дуготрајне терапије DPA јесте и хемолиза (Fishel, 1989).

Флавоноиди QE и EC, примењени самостално и у котретману са бакром, довели су до пораста броја RBC, концентрација Hb, као и вредности Hct и еритроцитних индекса MCV и MCH, у поређењу са групом третираном само бакром и групом третираном бакром и DPA. Резултати показују и значајан пораст броја RBC и вредности Hct у односу на контролу након примене QE и EC (Табела 2 и Графици 2–4). Такође, у котретману QE и EC са бакром повећана је вредност просечне концентрације хемоглобина у еритроцитима (MCHC) у поређењу са групом која је примала само бакар, а смањена вредност ширине дистрибуције еритроцита по волумену (RDW), у поређењу са животињама третираним бакром и бакром са DPA (Табела 3).

Позитивне ефекте флавоноида на хематолошке параметре показала су и друга истраживања. У студији Selvakumar и сар. (2013) QE је довео до значајног пораста вредности Hb, Hct и RBC код пацова третираних полихлорованим бифенилима (PCB). До сличних резултата дошли су Chouhan и сар. (2011) у истраживању ефеката QE након третмана флуоридима код пацова и Petruška и сар. (2013) у студији на зечевима, применом различитих концентрација QE.

Значајно побољшање хематолошких параметара код животиња третираних QE и EC може се приписати њиховом антиоксидативном потенцијалу. Показано је да EC *in vitro* спречава оксидацију протеина, остварује интеракцију са липидним двослојем и повољно утиче на флуидност мембране и морфологију еритроцита, чиме спречава хемолизу индуковану пероксидацијом (Martinez и сар., 2012). Добијени резултати сугеришу да QE и



ЕС протективне ефекте остварују вероватно захваљујући способности да уклањају реактивне врсте чиме спречавају оштећења еритроцита и хемолизу.

Бакар је неопходан за ефикасан имуни одговор и есенцијалан за продукцију интерлеукина-2 (IL-2) од стране активираних лимфоцита (Tapiero и сар., 2003). Недостатак, као и прекомерни унос бакра, одражава се на више аспеката имуног одговора, укључујући смањење броја неутрофила, редукцију пролиферације лимфоцита и антиген-специфичну продукцију антитела. Резултати нашег истраживања показују да након третмана није дошло до значајне промене у броју леукоцита (WBC), али да постоје разлике у процентуалној заступљености поједних елемената беле крвне лозе. Пад заступљености моноцита (Mon), а пораст гранулоцита (Gra) у односу на контроле примећени су код животиња третираних бакром, као и животиња које су примале бакар и ДРА. Флавоноиди су у котретману са бакром смањили процентуалну заступљеност Gra, док су повећали процентуалну заступљеност Mon у поређењу са осталим групама третираним бакром (Табела 4, График б).

Из литературних извора може да се закључи да повећан унос бакра не утиче битно на промене у броју укупних леукоцита, али може да доведе до пораста броја неутрофила и пада броја лимфоцита (Soli и Froslie, 1977; Massie и сар., 1993; Handy, 2003). Повећано присуство бакра доводи до смањења концентрације IL-2 који регулише пролиферацију лимфоцита и последично до њихове смањене пролиферације. Имуносупресивно деловање бакра у вишку на мишевима показали су Rosino и сар. (1990), а администрација цинка повратила је функције имуног система. Апсорпција цинка, који је значајан за одбрамбене процесе ћелија, смањена је у условима повећане апсорпције бакра (Gunshin и сар., 1997). Третман бакром у нашем истраживању није значајно утицао на заступљеност лимфоцита, али је повисио заступљеност Gra.

Повећане концентрације серумског бакра нађене су код инфламаторних болести људи, а такође се доводе у везу са повећаном стопом смртности од кардиоваскуларних болести (Salonen и сар., 1991) и сматра се да инфламација представља резултат оксидативног деловања бакра (Leone и сар., 2006). Иако недостатак бакра може да угрози ефикасност имуног одговора, повећано присуство бакра такође, није пожељно због његове везе са маркерима оксидативног стреса, инфламацијом и повећаним кардиоваскуларним ризиком.

DPA поседује антиинфламаторне особине, инхибира синтезу цитокина и пролиферацију Т-лимфоцита (Handel и сар., 1996). Значајно повећање Gra код животиња третираних бакром и DPA у нашем истраживању упућује на алергијску реакцију на лек, с обзиром да је DPA дериват пеницилина (Kianoush и сар., 2012).

Флавоноиди испољавају антихистаминско, антиалергијско деловање. Агликон QE, као и његови метаболити попут QE-3-О-глукозида, у стању су да стабилизују ћелијске мембране мастоцита и базофила и на тај начин смање ослобађање хистамина (Middleton и сар., 2000; Sunita и сар., 2012). Поред овога, показано је да флавоноиди из црвеног вина, проантоцијанидини као и QE, инхибирају активност циклооксигеназа (COX-1 и COX-2) и липооксигеназе (5-LOX), медијаторе инфламаторних процеса, чиме испољавају антиинфламаторно деловање (Manthey, 2000; Kimata, 2000; Kutil и сар., 2014). QE и његови метаболити инхибирају мијелопероксидазу, коју секретују активирани неутрофили и макрофаги (Shiba и сар., 2008), отпуштање хистамина и синтезу интерлеукина у базофилима (Kawai и сар., 2007; Sikder и сар., 2014). За катехине је такође, показано да инхибирају ослобађање проинфламаторних цитокина, IL-1, фактора туморске некрозе (TNF- $\alpha$ ) и простагландина E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Rogerio и сар., 2007; Tang и сар., 2007) и редукују синтезу IgE (Pérez-Cano и сар., 2013).

На основу резултата (Табела 5 и Графици 7 и 8) може се видети да је бакар смањио број тромбоцита (Plt) и тромбокрит (Pct), а значајно повећао ширину дистрибуције тромбоцита по волумену (PDW) код животиња које су примале само бакар и код оних које су третиране бакром са DPA. Котретман бакром и QE+EC значајно је повећао Plt и Pct, а смањио PDW.

До смањења броја тромбоцита може да дође услед њихове смањене синтезе или повећане разградње, а оба поремећаја могу да буду последица деловања бројних фактора који супресивно утичу на костну срж или повећавају деструкцију, укључујући лекове и токсичне супстанце, вирусне инфекције или оштећење ткива (Aster и Bougie, 2007). Morin и сар. (1993) су испитивали активност тромбоцита у условима смањеног уноса бакра код пацова и показали су да долази до повећане синтезе тромбоксана од стране тромбоцита и њихове проагрегаторне активности услед смањене активности супероксид-дисмутазе и повећане липидне пероксидације. Код оболелих од Вилсонове болести (смањена концентрација бакра у серуму) један од клиничких знакова може да буде и

тромбоцитопенија. С друге стране, код паса (доберман) уз повећане концентрације бакра у серуму и јетри могу да се констатују смањен број тромбоцита и продужено протромбинско време (Crawford и сар., 1985). Пораст индекса PDW сугерише варирања у величини тромбоцита и упућује на њихову активацију (Vagdatli и сар., 2010), а наши резултати показују да је у групама третираним бакром и бакром са DPA дошло до значајног пораста овог тромбоцитног индекса. Активација тромбоцита повећава хемотаксију, адхезију и агрегацију неутрофила, и ослобађање лизозомалних ензима (Weksler, 1988). Наши резултати показују да је након третмана бакром и бакром са DPA повећана процентуална заступљеност гранулоцита (Табела 4).

Познато је да флавоноиди делују превентивно на процесе атеросклерозе, између осталог и редукијом агрегације тромбоцита, тако што инхибирају активност COX-1 (катализира биосинтезу тромбоксана, еиокосаноида који пропагира агрегацију тромбоцита и вазоконтриктију) (Kutil и сар., 2014). Метаболит кверцетина 3-O- $\beta$ -D-глукуронид инхибира миграцију ћелија посредовану фактором раста који синтетишу тромбоцити (Ishizawa и сар., 2011). Повећан број тромбоцита често се јавља као одговор на повреду уз повећану секрецију инфламаторних цитокина. Повећање броја тромбоцита након третмана флавоноидима можда представља реакцију на примену инјекција. Gammulle и сар. (2012) су нашли да третман екстрактом папаје има стимулаторну активност на тромбопоезу и значајно повећава број тромбоцита и леукоцита код мишева.

Одређивањем укупних протеина обухваћени су сви протеини и протеиди у крви. Њихова вредност може бити промењена у појединим стањима као што су трауме, хронична инфламаторна стања, хепатопатија, попут цирозе, тумори или дехидратација. Субхронична изложеност бакру у овом истраживању довела је до смањења вредности укупних протеина и пораста албумина у серуму у односу на контролу (Табела 6). Пад укупних протеина може да упућује на смањење синтезе протеина и повећани катаболизам. Резултати приказани у Табели 1 показују да су животиње третиране бакром имале смањен прираст телесне тежине.

Албумин је квантитативно најзначајнији протеин у плазми и чини 40–60 % укупних протеина плазме. До пораста концентрације албумина након третмана бакром могло је да дође услед дехидратације, с обзиром да су животиње којима је понуђен раствор бакар хлорида пиле знатно мање воде од животиња које су пиле чисту воду.

Могуће је да је повећана концентрација албумина резултат повећаног уноса бакра, с обзиром да је албумин одговоран за транспорт апсорбованог бакра из ентероцита до јетре, или немогућности хепатоцита да преузму циркулишући комплекс албумин-бакар. Сличне резултате показује и студија ефеката хроничног тровања бакром код оваца (Solli и Froslie, 1977).

Ниво укупних протеина и албумина у серуму након третмана флавоноидима самостално или у котретману са бакром сличан је контролним вредностима, а концентрације албумина су ниже у односу на групу третирану бакром и DPA (Табела 6), сугеришући да третман флавоноидима није значајно утицао на метаболизам протеина.

Субхронични третман није значајно утицао на ниво глукозе у крви, али се запажа пораст код свих третираних група у односу на контролу (Табела 6 и График 9). Експериментални и епидемиолошки подаци о уносу и концентрацијама бакра, с једне стране, и концентрацијама глукозе са друге, су различити. Поједине студије показују да бакар делује слично инсулину, односно инхибира ослобађање масних киселина и појачава унос глукозе у адипоците (Cohen и сар., 1982; Karmaker и сар., 2007). Примена бакар сулфата код дијабетичних пацова снижава ниво глукозе у крви (Tanko и сар., 2013). Са друге стране, повећан унос бакра ремети метаболизам Zn и Fe, и може да доведе до хроничних патолошких стања, као што су дијабетес или дијабетичке компликације (Eteng и сар., 2008; Kazi и сар., 2008). Цинк је укључен у синтезу и конформациони интегритет инсулинских мономера и неопходан је за секрецију инсулина. Смањен ниво Zn, услед повећаног уноса бакра, може да се одрази на способност ћелија Лангерхансових острваца, одговорних за продукцију и секрецију инсулина (Kazi и сар., 2008). Такође, повећане вредности бакра у серуму нађене су код пацијената са дијабетесом (Wiernsperger и Rapin, 2010). Да постоји тесна веза између бакра и инсулинске резистентности показала је и студија Такака и сар. (2009), где је након примене хелатора бакра (тетратиомолибдат), концентрација серумског бакра снижена, као и концентрације глукозе, инсулина и триглицерида.

За разлику од ефеката третмана на метаболизам протеина и шећера, резултати овог истраживања показују да је третман бакром значајно утицао на метаболизам холестерола. Табела 6 и График 10 приказују да је дошло до значајног пораста нивоа укупног

холестерола код животиња које су примале само бакар, и код оних које су уз бакар примале и DPA.

У експерименталним студијама на животињама и људима показана је како негативна (Ferns и сар., 1997), тако и позитивна (Galhardi и сар., 2004) корелација између бакра унетог храном и концентрације укупног холестерола. Повећан ниво бакра у серуму констатује се код пацијената са хиперхолестеролемијом и хипертриглицеридемијом (Kaminiwa и сар., 2013). Уочено је да постоји веза између повећаног нивоа серумског бакра и оксидације LDL холестерола (Tan и сар., 1999; Ahuja и сар., 2006), с обзиром да јони бакра партиципирају у реакцијама конверзије супероксид анјон радикала у водоник пероксид и хидроксил радикал и катализују оксидативну модификацију LDL *in vitro* и у зиду артерија.

Повећан садржај бакра у организму штетно делује на кардиоваскуларни систем, доводи до коронарних болести, атеросклерозе, као и повишеног крвног притиска. Цитотоксични ефекти бакра, испитивани применом CuSO<sub>4</sub>, показани су и на културама хуманих васкуларних ендотелних ћелија и фибробласта (Wang и Guo, 2006). Дисфункција ендотела је почетак атеросклеротског процеса и ово указује на значај поремећаја метаболизма бакра у раним фазама патогенезе атеросклерозе (Iskra и Majewski, 2000).

До повећања укупног холестерола у серуму након третмана бакром у овом истраживању могло је да дође услед пероксидације мембранских липида или услед смањења концентрација ендогених антиоксиданата попут аскорбинске киселине. Такође, блокада жучних канала јетре може да доведе до смањења или престанка секреције жучи у дванаестопалачно црево (холестаза) и сходно томе до повећаног присуства липида у серуму. Код холестазе као последице хроничног хепатитиса, билијарне цирозе и холангитиса (упала билијарних дуктуса), обично се налази повишен садржај бакра у јетри (European Association for Study of Liver, 2012).

Епидемиолошке студије показују да исхрана богата флавоноидима умањује ризик од атеросклеротичних промена. У томе, поред антиоксидативних активности, могу да имају улогу и ефекти флавоноида на метаболизам масти и холестерола. Флавоноиди могу да индукују гликогенезу, инхибирају К канале у панкреасним бета ћелијама, регулишу унос шећера у ентероцитима, као и унос и дистрибуцију липида и холестерола (Almarig и сар., 2001). Хиполипидемични ефекти кверцетин агликона, као и кверцетин гликона

(рутин), показани су у студији Sikder и сар. (2014). У раду Ikeda и сар. (1992), показано је да катехини умањују растворљивост холестерола и тиме и његову апсорпцију у цреву пацова. Најновије истраживање Nekohashi и сар. (2014) показало је да кверцетин инхибира апсорпцију холестерола *in vitro*, као и *in vivo*, инхибицијом транспортера холестерола NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*) у ентероцитима јејунума. Констатовано је и да метаболит кверцетина QE-3-O-глукуронид у макрофагама мишева *in vitro* појачава експресију транспортера ABCA1 (*ATP-binding cassette, subfamily A, member 1*) који има важну улогу у регулацији хомеостазе холестерола у ћелији (Ohara и сар., 2013). ABCA1 транспортер посредује у ефлуксу холестерола, метаболичком путу којим се уклања вишак холестерола из периферних ткива и транспортује до јетре да би био елиминисан (Ogam и Lawn, 2001). Резултати нашег истраживања показују да су флавоноиди QE+EC значајно редуковали вредност холестерола, како примењени самостално, тако и у котретману са бакром, у поређењу са остале две групе третиране бакром.

У Табели 7 и на Графицима 11–14 приказани су резултати активности ензима аспартат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP), гама-глутамил транспептидазе (GGT) и лактат дехидрогеназе (LDH) у серуму, као биомаркера цитотоксичности јетре. Показано је да је након субхроничне интоксикације бакром дошло до повећања активности испитиваних ензима у серуму у поређењу са контролним вредностима. Ове промене указују да је бакар узроковао оштећење хепатоцита нарушавањем функционалног интегритета ћелијских мембрана и довео до ослобађања ових ензима у серум.

Трансаминазе AST и ALT представљају групу ензима, одговорних за пренос аминокиселина на алфа-кето киселину, које су широко распрострањене у ткивима, са ниском активношћу у серуму. ALT се сматра ензимом „специфичним“ за јетру, с обзиром да су хепатоците знатно богатије овим ензимом него ћелије других органа. И код релативно малог оштећења ткива трансаминазе излазе из хепатоцита у циркулацију, где може да се констатује њихова повећана активност. Такође, повећане активности ензима AST у серуму настају услед отпуштања из лизираних еритроцита (Gaetke и Chow 2003; Oosthuizen, 2011).

ALP је хидролаза одговорна за дефосфорилацију нуклеотида, протеина и алкалоида. Серумска ALP углавном потиче из јетре и костију, па је од значаја у дијагнози

хепатобилијарних обољења и обољења костију. Умерено повећана активност серумске ALP јавља се код обољења јетре и жучних путева а значајно повећана код опструкције секреције жучи. Њено значајно повећање сматра се знаком холестазне болести јетре, интрахепатичне и екстрахепатичне холестазае. Уз повишене вредности GGT извор серумске ALP су готово сигурно јетра и жучни путеви (Stadtman, 1961). С друге стране, смањена активност ALP јавља се код оболелих од Вилсонове болести, што се приписује заменом цинка у активном месту ензима јоном бакра (Oosthuizen, 2011).

GGT је ензим укључен у метаболизам глутатиона и задужен за трансфер гама-глутамил функционалних група глутатиона на различите акцепторе, воду, аминокиселине или пептиде. Присутна је у јетри и другим ткивима и користи се као маркер у дијагнози болести јетре, панкреаса и опструкције жучних путева.

LDH је ензим који се налази у јетри, бубрезима, скелетним мишићима, еритроцитима и катализује претварање лактата у пируват. Повећани ниво LDH у хуманом серуму одражава степен разарања ћелија и токсичних ефеката у ткивима, која су богата овим ензимом. Повећање LDH је такође, последица хемолIZE (Oosthuizen, 2011). Повећане активности ALT и AST, као и LDH у серуму служе као један од параметара у дијагностици хепатитиса код Вилсонове болести, а такође упућују на оштећења јетре код животиња (Fuentealba и сар., 2000; Gaetke и Chow, 2003). Транзициони метали, бакар и гвожђе, индукују респираторну активност у Купферовим ћелијама, која води настанку секундарних реактивних врста  $\text{HO}^{\bullet}$  и  $\text{NO}_2^+$ , што за последицу има оштећење јетре и ослобађање LDH (Videla и сар., 2003). George и Chandrakasan, (1997) показали су значајан пораст активности LDH у серуму пацова као последица хепатичне фиброзе. Значајан пораст GGT у плазми након хроничне суплементације бакра констатован је код преживара (Minervino и сар., 2008), оваца (Villar и сар., 2002) и пацова (Fuentealba и сар., 2000).

Флавоноиди QE и EC апликовани самостално нису довели до битних разлика у активностима испитиваних ензима у односу на контролу. У котретману са баком QE и EC су активности ензима ALT и GGT незнатно умањили, а активности AST, ALP и LDH значајно редуковали у поређењу са вредностима измереним код животиња третираних баком. Третман DPA такође је ублажио негативне ефекте бакра на испитиване ензиме (Табела 7, Графици 11–14). Резултати зато сугеришу да су QE и EC, као и DPA у стању да

очувају функционални интегритет ћелијских мембрана хепатоцита и да спрече некрозу хепатоцита и „цурење“ ових ензима у крвоток.

Наши резултати корелирају са резултатима других истраживања у којима је показано да су након третмана QE снижене активности маркер ензима AST, ALT, ALP као и LDH у серуму животиња, захваљујући редукцији пероксидативних оштећења јетре (Tokyo и сар., 2006; Uzun и Kalender, 2013) и миокарда (Matouk и сар., 2013; Milton и сар., 2013).

Хомеостаза електролита (K, Na, Ca, Fe, Phos) неопходна је за остваривање комплексних функција организма. Ефекти субхроничног третмана на хомеостазу електролита у крви приказани су у Табели 8 и Графицима 15–18. Резултати показују да је бакар довео до значајног пада концентрација натријума и гвожђа у серуму у односу на контроле. Котретман баком и DPA такође је довео до смањења концентрације натријума у серуму. Флавоноиди су значајно повећали концентрацију натријума, а смањили концентрацију калијума у серуму у односу на групе третиране само баком и баком са DPA. Третман флавоноидима QE и EC, као и баком и DPA повећао је концентрацију гвожђа у серуму у поређењу са групом која је добијала само бакар.

Смањена концентрација натријума у серуму након третмана баком може да буде последица инхибиције Na/K-АТФ-азе, мембранског ензима који успоставља и одржава високу унутарћелијску концентрацију K и ниску унутарћелијску концентрацију Na. У *in vitro* условима је показано да транзициони метали,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$  и тешки метали,  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ , доводе до инхибиције овог ензима Na/K-АТФ-азе (Krstić и сар., 2005). Студија Kedzierska и сар. (2005) такође је показала да присуство повећаних концентрација бакра у серуму смањује активност Na/K транспортера и ремети функцију мембране. Негативна корелација између повишених концентрација бакра и активности мембранског Na/K транспортера за последицу има смањење концентрације Na у плазми.

Смањена концентрација Fe може да буде резултат смањене апсорпције у цреву, с обзиром да повећан унос бакра инхибира апсорпцију Fe. То потврђују и хематолошки налази, смањена концентрација хемоглобина, хематокрита, броја еритроцита, као и промењене вредности еритроцитних индекса. Транспортер Fe двовалентни метал транспортер 1 (DMT1), налази се на апикалној мембрани ентероцита, такође је и транспортер бакра, што указује да ова два метала могу међусобно да конкурирају за



апсорпцију од стране дуоденалних ентероцита (Sharp, 2004). Код свиња храњених бакром у вишку такође је регистрована смањена концентрација Fe у серуму (Girr и сар., 1974). Смањене концентрације натријума, калијума, гвожђа и калцијума у серуму, констатују се код хипертензивних пацијената уз повећане вредности бакра (Momtaz и сар., 2000). Недостатак, као и токсичност бакра повезани су са смањеном концентрацијом гвожђа, али различити механизми доводе до анемије која је присутна у оба случаја.

Флавоноиди у котретману са бакром повећали су однос Na/K као и концентрацију гвожђа у серуму. Javorková и сар. (2003) су показали да након третмана полифенолима из црвеног вина долази до повећања броја молекула Na/K-АТФ-азе у ткиву бубрега хипертензивних пацова и до обнављања афинитета АТФ и Na<sup>+</sup> везујућих места ензима. Са друге стране, у бројним студијама је показано да флавоноиди у микромоларним концентрацијама инхибирају Na/K-АТФ-азе (Hirano и сар., 1989; Mishra и Rizvi, 2012). Тетра- и пентахидрокси флавоноиди (кверцетин) инхибирају активност изоловане Na/K-АТФ-азе плазма мембране и митохондријалне АТФ-азе, али под одговарајућим условима не утичу на активност у транспорту јона (Suolinna и сар., 1975).

У оксидативном метаболизму у физиолошким условима формирање реактивних врста кисеоника (ROS) одвија се континуирано, у незнатном обиму, и у равнотежи је са системом антиоксидативне заштите (AOS). Повећано стварање ROS и/или недовољна антиоксидативна заштита доводи до оксидативног стреса у ћелији (Halliwell и Gutteridge, 2007). Нарушени оксидо-редукциони статус узрокује повећану продукцију ROS, промене активности антиоксидативних ензима и смањење концентрација неензимских антиоксиданаса, и доводи до оксидативне деструкције биомолекула.

У ћелијама бакар је присутан у два облика, као оксидовани, стабилни купри јон (Cu<sup>2+</sup>, Cu(II)-јон) и редуковани, реактиван купро јон (Cu<sup>+</sup>, Cu(I)-јон). Претежно је заступљен као Cu<sup>2+</sup>, с обзиром да у присуству кисеоника или другог акцептора електрона Cu<sup>1+</sup> лако оксидује до Cu<sup>2+</sup>. Преко *Fenton*-ове реакције, Cu<sup>1+</sup> преводи слабо реактивни водоник пероксид у хидроксил радикал (•OH), једну од најреактивнијих врста кисеоника (Halliwell и Gutteridge, 2007). Cu<sup>1+</sup> у присуству супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) и смањене количине аскорбинске киселине и глутатиона, преко *Haber-Weiss*-ове реакције такође катализује настајање •OH, који лако ступа у даље реакције и изазива оксидативна оштећења у ћелијама. У редуктивном окружењу ћелије, Cu<sup>2+</sup> (као и Fe<sup>3+</sup>) се неензимски

редукује од стране аскорбата и редукованог глутатиона до  $\text{Cu}^{1+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ), што доводи до зачараног круга продукције  $\bullet\text{OH}$  (Dröge, 2002; Halliwell и Gutteridge, 2007).

Ефекти третмана на концентрације ROS у еритроцитима животиња приказани су у Табели 9 и Графицима 19–21. Резултати показују да је бакар довео до значајне продукције  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  у односу на контролну вредност, док концентрација нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) није измењена. Активност NADPH оксидазе, генератора  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , може бити повећана у присуству већих концентрација бабра, као што су показали Dogan и сар. (1994), у неутрофилима. Такође, бакар утиче и на Купферове ћелије, иницирајући реакције које доводе до респираторног праска у активираним макрофагима, што може да води развоју оштећења јетре (Videla и сар., 2003). Супероксид анион радикал, као ни NO, појединачно не морају да буду токсични *in vivo* захваљујући ефикасним системима којима се спречава њихова акумулација. Супероксид анион радикал уклања ензим супероксид-дисмутаза (SOD), а акумулирање великих концентрација NO спречено је дифузијом NO кроз ткива у еритроците (Pacher, 2007). NO, ослобођен из ендотелних и активираних инфламаторних ћелија у плазму, нестабилан је и подлеже оксидацији, продукујући стабилне  $\text{NO}_2^-$  које преузимају еритроцити (Dejam и сар., 2005). Унутар еритроцита  $\text{NO}_2^-$  могу да реагују са оксихемоглобином и да формирају метхемоглобин и нитрате (Pacher, 2007). У анаеробним условима, деоксихемоглобин редукује  $\text{NO}_2^-$  до NO, који може да се ослободи у току проласка еритроцита кроз капиларе (Dejam и сар., 2005). Међутим, у присуству повећаних концентрација  $\text{O}_2^{\bullet-}$  у еритроцитима, реакција NO са  $\text{O}_2^{\bullet-}$  води формирању токсичних пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), (Wink и Mitchell, 1998).

Флавоноиди примењени са багром ублажили су пораст концентрација  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Табела 9, Графици 19 и 20). То може да се припише променама редокс стања и утицајима на одбрамбени механизам ћелија, као што су показала ранија истраживања (Chouhan и сар., 2011). Nakayama и сар. (1993) су забележили да QE и катехини инхибирају цитотоксичност  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  на V79 ћелије Кинеског хрчка *in vitro*. QE директно везује и уклања  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , а такође инхибира ксантин-оксидазу, ензим одговоран за продукцију  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Muthukumaran и сар., 2008). Ефикасност у уклањању радикала QE „дугује“ високој дифузији кроз мембране, што му омогућава да „хвата“  $\text{O}_2^{\bullet-}$  на више места у липидном двослоју (Moridani и сар., 2003), као и структури (орто-дихидрокси) захваљујући којој везује липидне алкоксил и пероксил радикале (Lien и сар., 1999; Muthukumaran и сар.,

2008). За ЕС је такође показано да ефикасно уклања хидроксил радикал (Quine и Raghu, 2005).

Наши резултати такође показују да је у котретману багром и флавоноидима значајно повећана концентрација  $\text{NO}_2^-$  у односу на контролну вредност (Табела 9, График 21).

Исхрана богата флавоноидима повезана је са смањеним ризиком за развој кардиоваскуларних болести, и бројни докази указују да флавоноиди своје ефекте испољавају директним утицајем на факторе ризика. Познато је да развоју кардиоваскуларних патологија доприноси дисфункција ендотела која је повезана са оксидативним стресом, смањењем биодоступности NO, услед његове смањене продукције или уклањања од стране  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , у реакцији у којој настају пероксинитрити. Флавоноиди побољшавају ендотелну функцију, инхибирају оксидацију липопротеина мале густине, смањују крвни притисак и побољшавају дислипидемију (Duarte и сар., 2001; Heiss и Kelm, 2010; Larson и сар., 2012). Студија Loke и сар. (2008), показала је да примена суплемената QE и ЕС од 200 mg/дневно код здравих мушкараца повећава ниво NO у крви и снижава концентрације ендотелина-1 у плазми. Venito и сар. (2002), су такође показали да исхрана пацова богата QE и катехинима индукује ендотелно зависно повећање NO, без повећања продукције  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и последичног формирања пероксинитрита. Повећана релаксација васкуларних глатних мишића може да буде резултат повећане експресије ендотелијалне азот оксид синтазе (eNOS) или њене повећане активности. Исти аутори нашли су, као резултат активације гуанил-циклазе, повећане концентрације цикличног гуанозин монофосфата (cGMP), секундарног гласника одговорног за релаксацију глатке мускулатуре посредовану NO. Поред активације eNOS, за QE је показано да умањује активност NOX, ензиме фамилије NADPH оксидаза, чија повећана активност води продукцији ROS, регулацијом експресије NOX субјединица (Galleano и сар., 2010). QE се у регулацији васкуларног тонуса показао ефективнијим од катехина (Venito и сар., 2002), из најмање два разлога. Ентерохепатична циркулација QE метаболита кверцетина обезбеђује њихово дуже задржавање, тиме и ефекте у ткивима, за разлику од метаболита катехина који се брже излучују (D'Archivio и сар., 2007). Такође, метаболити катехина слабије се везују за албумин од метаболита QE, па је њихова елиминација бржа (Manach и сар., 1999).

Поред тога, показано је и да аскорбат појачава активност eNOS и обезбеђује вазодилатацију (Ladurner и сар., 2012), а концентрација Vit C је значајно повећана у ткиву јетре након третмана флавоноидима у нашем експерименту (Табела 14).

Липидни пероксиди (LPO) указују на оксидативно оштећење које је изазвано деловањем ROS на ћелијске мембране, фосфолипиде, глуколипиде, холестерол, липопротеине и друге молекуле које садрже липиде (Halliwell и Gutteridge, 2007). ROS и RNS, способни су да издвоје атом водоника из метиленске групе (-CH<sub>2</sub>) полинезасићених масних киселина па тако настају слободни липидни радикали, а једном покренута реакција липидне пероксидације наставља се аутокаталитички. Када се јони метала са променљивом валенцом, као што је бакар, додају липидним системима који већ садрже пероксиде, они преводе пероксиде у пероксил и алкоксил радикале, који даље могу да адирају водоник, чиме се пропагира процес липидне пероксидације. Интезивна липидна пероксидација у биолошким мембранама изазвана O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •ОН, или липидним пероксил радикалима, доводи до опадања мембранског потенцијала, повећања пермеабилности према H<sup>+</sup> и другим јонима, што на крају резултује прскањем ћелије и отпуштањем њеног садржаја (Halliwell и Gutteridge, 2007). На деловање радикала је посебно осетљив хемоглобин, и у присуству O<sub>2</sub><sup>•-</sup> долази до промена у његовој структури.

Резултати овог истраживања показују да је бакар у субхроничном третману узроковао повећање концентрације LPO у лизату еритроцита (Табела 9 и График 22), као и у супернатанту ткива јетре (Табела 10 и График 23), што указује на прооксидативно деловање на ћелијске мембране еритроцита и хепатоцита. Концентрација LPO у еритроцитима животиња које су уз бакар примале и DPA, већа је од контроле, али је значајно мања од вредности код животиња које су интоксициране само бакром. Највећи пораст LPO забележен је у јетри пацова интоксицираних бакром, што може да се објасни чињеницом да је јетра циљани орган за токсично дејство бакра. Запажено је и да је ниво LPO у јетри значајно смањен код животиња који су уз бакар добијале DPA, у односу на животиње које су третиране само бакром.

Флавоноиди у котретману са бакром и примењени самостално значајно су редуковали концентрације LPO у еритроцитима, у поређењу са остале две групе третиране бакром (Табела 9 и График 22). Такође, QE и EC су редуковали и концентрације LPO у јетри, у поређењу са групом третираном само бакром (Табела 10 и График 23).

Бакар је неопходан за бројне биолошке функције, између осталог и за синтезу фосфолипида ћелијске мембране чиме одржава ћелијски интегритет (Ferenci, 2004). Раније студије су показале да вишак бакра у исхрани пацова доводи до оштећења липида у мембранама ћелија и липидне пероксидације у еритроцитима, јетри и бубрезима (Dillard и Tappel, 1984; Burkitt, 2001; Gaetke и Chow, 2003).

С обзиром да еритроцити немају једру и друге органеле, плазма мембрана је циљно место за одвијање процеса липидне пероксидације. Формирањем LPO смањују се хидрофобне карактеристике двослојне мембране еритроцита и мењају се афинитет и интеракција протеина и липида, што резултира нарушавањем хомеостазе и функције еритроцита (Dargel, 1991). Наши резултати показују да је субхронични третман бакром довео до хемоллизе и изазвао анемију (Табела 2), што потврђује да је деловао прооксидативно на мембране еритроцита.

Постоје докази да хронично излагање високим концентрацијама бакра највише погађа јетру, бубрежне каналиће и мозак, и доводи до хепатитиса, појаве психичких и неуролошких симптома (Winge, 1999; Scheinberg и Sternlieb, 1996; Fuentealba и сар., 2000). Депонован у јетри, бакар индукује стварање ROS (Kadiiska и сар., 1993) и доводи до некрозе хепатоцита (Rana и Kumar, 1980). Главне интрацелуларне мете у хепатоцима су митохондрије, при чему настају функционалне абнормалности митохондрија, удружене са липидном пероксидацијом и морфолошким променама. Такође, може да дође и до редукције целуларног АТФ, лизозомалне фрагилности, промене хомеостазе  $Ca^{2+}$  и оштећења ДНК у ћелијама јетре, услед акумулирања већих концентрација бакра (Sternlieb и сар., 1995; Stohs и Bagchi, 1995). Наши резултати су у складу са резултатима других истраживања, која су показала повећање LPO у еритроцитима и у ткиву јетре после хроничне интоксикације бакром. Да је дошло до прооксидативног оштећења хепатоцита показују и повећане активности ензима маркера цитотоксичности јетре (Табела 7).

DPA је у котретману са бакром, захваљујући способности да као тиолно једињење везује јоне бакра, редуковао продукцију реактивних врста и ублажио липидну пероксидацију еритроцита и хепатоцита. До сличних резултата дошли су Benov и сар. (1990), у истраживању заштитних ефеката DPA код пацова интоксицираних живом. Са друге стране, Chen и сар. (2012), нашли су повећане концентрације MDA у мозгу мишева субхронично третираних DPA.

Котретман QE и ЕС са бакром у нашој студији значајно је редуковао вредности LPO и приближио их контролним вредностима, што упућује на инхибицију процеса липидне пероксидације. Раније студије су показале да флавоноиди могу да блокирају LPO захваљујући структури која им омогућава да хелирају јоне метала или уклањају ROS као водороден или електрон донирајуће супстанце (Mira и сар., 2002; Heim и сар., 2002). На тај начин они могу да буду од користи у стањима и болестима узрокованим повећаним концентрацијама метала или стањима која су последица оксидативног стреса.

Флавоноиди су једињења чија се структура заснива на флаванском језгру, а број, позиција и типови функционалних група које поседују, утиче на њихову антиоксидативну активност. Вишеструке хидроксилне групе одговорне су за хелирање метала, метокси групе повећавају липофилност, а двострука веза и карбонил група у хетероцикличном прстену или полимеризације нуклеарне структуре повећава њихову активност, дајући стабилнији флавоноид радикал преко коњугације и делокализације електрона (Heim и сар., 2002). По Bors и сар. (1990), за хелирање метала и уклањање слободних радикала одговорне су три структуралне групе флавоноида: I) О-дихидрокси структура у В-прстену, која је циљно место за слободне радикале код свих флавоноида са С-2/С-3 везом; II) С-2/С-3 двострука веза у коњугацији са 4-охо функцијом, која је одговорна за делокализацију електрона са В-прстена; и III) додатно присуство 3- и 5-хидроксилних група за јаче уклањање радикала.

Mira и сар. (2002), показали су да QE и катехин хелирају Cu(II)-јоне, при чему је место интеракције вероватно између 5-хидроксилне и 4-охо група, а за QE и додатно на орто-катехол групи. Присуство катехол групе (о-дихидроксифенил) есенцијално је за формирање комплекса са Cu(II)-јоном. Мада гликозилација хидроксилних група може да смањи способност за везивање метала (код гликозида катехина), са друге стране, присуство метокси и хидроксил група у орто позицији повећава капацитет за везивање јона бакра (Karamac, 2009). Такође, показано је да катехин (Sugihara и сар., 2001) и кверцетин (Cai и сар., 1997) инхибирају липидну пероксидацију индуковану Fe<sup>2+</sup> захваљујући његовој хелацији.

LPO може бити инхибирана уклањањем реактивних врста и бројна истраживања показују да су QE и ЕС изузетно ефикасни у том деловању. QE и ЕС реагују са супероксид анјон, хидроксил, алкоксил и пероксил радикалима и спречавају оксидативна оштећења

хепатоцита (Middleton и сар., 2000; Selvakumar 2013; Sikder и сар., 2014). У раду Filipe и сар. (2001), показано је да катехин и QE инхибирају LPO индуковану бакром у хуманој плазми *in vitro*. Исти аутори су такође показали да постоји синергија ових флавоноида са ендогеним уратима у антиоксидативном деловању против LPO настале деловањем Cu(II)-јона, као и да су флавоноиди били у стању да заштите урате од оксидативне деградације. Метаболити QE подједнако су као и QE агликон ефикасни у инхибирању оксидације посредоване пероксинитритима (Klotz и Sies, 2003).

У истраживањима Dietrich-Muszalska и сар. (2012), ЕС се показао ефективнијим од QE у редукцији LPO у хуманој плазми *in vitro*. У другој *in vitro* студији, показано је да QE у концентрацијама од 10 и 20  $\mu\text{M}$  снижава липидну пероксидацију индуковану Cu(II)-јонима и да комбинација са другим флавоноидима (генистеин) нуди бољу антиоксидативну заштиту од третмана појединачним флавоноидима (Boadi и сар., 2003).

Одржавање концентрација ROS и RNS у границама неопходним за њихово физиолошко функционисање, као и ограничавање и поправљање насталих оксидативних оштећења, аеробни организми обезбеђују деловањем система антиоксидативне заштите (AOS), (Sies, 1991). Антиоксидативна заштита према природи и начину деловања обухвата примарну и секундарну заштиту. Примарна заштита остварује се деловањем неензимских антиоксиданата, као што су глутатион или аскорбинска киселина и деловањем ензима AOS, супероксид-дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион-пероксидазе (GSH-Px), глутатион-редуктазе (GR) и глутатион-S-трансферазе (GST), (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Биомаркери система антиоксидативне заштите проучавани у еритроцитима, с обзиром да су еритроцити константно изложени ROS, и у јетри, јер је то главни орган акумулације бакра и главни детоксификациони орган са улогом у регулацији редокс метаболизма.

Глутатион (GSH) је трипептид (L- $\gamma$ -глутамат-L-цистеин-L-глицин) који чини 90% укупних непротеинских тиолних једињења ћелије и есенцијални је кофактор многих ензима. Његова заштитна улога се заснива на способности тиолне групе (-SH) цистеина да се реверзибилно оксидује (Meister, 1992). Индиректно дејство остварује као кофактор ензима GSH-Px и GST у реакцијама детоксикације водоник и липидних пероксида (Matés, 2000). GSH преко тиолних група формира комплекс са металима и тиме штити ћелије од њиховог потенцијално токсичног деловања (Matés, 2000). У нормалним условима више од

90% глутатиона у ћелијама је у редукованом облику, док се у условима оксидативног стреса однос GSH/GSSG смањује у смислу фаворизовања GSSG (Griffith, 1999). Као индикатор целуларног редокс-стања, односно као маркер оксидативног стреса користи се глутатион редокс индекс (GSH RI), (Benzi и сар., 1988).

Резултати добијени овим истраживањима показују да је бакар у еритроцитима животиња значајно умањио ниво редукованог глутатиона (GSH), а повећао ниво оксидованог глутатиона (GSSG) у односу на контролу, односно значајно умањио GSH RI (Табела 11 и Графици 24–26). Флавоноиди QE и EC примењени самостално или у котретману са баком, допринели су значајном повећању нивоа GSH. Котретман баком и DPA је такође повећао ниво GSH у поређењу са групом која је добијала само бакар. Слични резултати добијени су и испитивањем нивоа укупног GSH у јетри (Табела 14 и Графици 32–34). Ниво GSH, као и GSH RI, значајно су смањени након третмана баком у поређењу са контролом. Котретман баком и DPA, као и котретман баком и флавоноидима, обновили су ниво редукованог глутатиона.

У ћелијама се у току интеракције Cu(II)-јона и редукованог глутатиона формира Cu(I)-глутатион комплекс, који учествује у транспорту Cu(I)-јона до ензима SOD и осталих купропротеина у ћелији (Speisky и сар., 2011). Иако се дуго сматрало да је овај комплекс редокс неактиван, истраживање Speisky и сар. (2011) је показало да је Cu(I)-глутатион комплекс у стању да реагује са молекуларним кисеоником у реакцији која реверзибилно доводи до формирања супероксид анјон радикала.

GSH је кључна компонента антиоксидативне одбране и функционише као „скевенџер“ реактивних врста (Matés, 2000). Реактивне врсте  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  су главни узрок за смањење редукованог глутатиона и других ћелијских антиоксиданата. Смањен садржај GSH и GSH RI у еритроцитима и хепатоцима након третмана баком у нашем истраживању, упућује на појачан утрошак у процесу детоксикације, као одговор на повећану продукцију ROS. Да је дошло до повећања концентрација  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  у еритроцитима након третмана баком показују резултати приказани у Табели 9. Смањењем ћелијских резерви GSH, хемоглобин и остале компоненте ћелије у еритроцитима, али и биомолекули у хепатоцима, изложене су повећаном ризику од оксидативних оштећења. Наши резултати показали су да је дошло до повећања липидне пероксидације у еритроцитима и ткиву јетре (Табела 10), и тако оксидативна оштећења



Ћелија пацова третираних бавром могу да буду у вези са недовољним антиоксидативним потенцијалом. Друге студије показале су да бакар у вишку доводи до смањења ћелијских резерви редукованог глутатиона (Cartañà и сар., 1992; Ozcelik и сар., 2003; Letelier и сар., 2005).

Поред директног уклањања реактивних врста, смањењу резерви GSH могу да допринесу и други фактори. Показано је да бакар блокира глукозо-6-фосфат дехидрогеназу (G6PD) *in vitro* (Kumar 1987) и *in vivo* (Cartañà и сар., 1992), и да код еритроцита код којих недостаје G6PD долази до смањења редукованог глутатиона након излагања бакру (Moore и Calabrese, 1980). G6PD је цитосолни ензим који учествује у пентозофосфатном путу, метаболичком путу који снабдева енергијом ћелије одржавајући ниво коензима NADPH, који је неопходан за редукцију оксидованог глутатиона. Пентозофосфатни пут је једини извор редукованог глутатиона у еритроцитима, а бакар у вишку умањује способност еритроцита за продукцију GSH.

Смањење активности ензима G6PD и концентрација GSH у серуму и еритроцитима показано је код оваца третираних бакар сулфатом (Sansinanea и сар., 1996). Иако су људи толерантни на повећане концентрације бакра у храни, пацијенти оболели од Вилсонове болести или они са недостатком овог ензима могу бити изложени повећаном ризику од хемолитичке анемије (Cappellini и Fiorelli, 2008), иако су мишљења подељена (Committee on Copper in Drinking Water, 2000). Недостатак G6PD може да доведе до нагомилавања глукозе и тиме повећања напредне гликације крајњих продуката (енг. *Advanced glycation end products*, AGEs) који воде развоју или погоршању дегенеративних болести, дијабетеса, атеросклерозе, Алцхајмерове болести и хроничног оштећења бубрега (Vistoli и сар., 2013). Унутар зида васкуларних судова AGEs могу да „заробе“ протеине плазме, умање активност азот оксида и да интерагују са специфичним рецепторима, модулишући ћелијску активност. Такође, AGEs иницирају оксидативне реакције које промовишу формирање оксидованог LDL (Basta и сар., 2004).

Након администрације DPA, као и флавоноида QE и EC у котретману са бакром, повећан је ниво GSH у еритроцитима (Табела 11) и у јетри (Табела 14). То може да буде резултат директног везивања јона бакра од стране DPA и QE и EC, чиме се спречава његова редокс активност. Може да буде резултат и уклањања ROS, што спречава прекомерни утрошак GSH, или стимулације синтезе GSH. Друга истраживања потврђују

добијене резултате да примена флавоноида повећава ниво интрацелуларног редукованог глутатиона (Prior и сар., 2006; Chouhan и сар., 2011; Mishra и Flora, 2008). Интраперитонеална администрација ЕС у дози од 30 mg/kg значајно је повећала концентрацију редукованог глутатиона и смањила концентрације LPO код дијабетичних пацова у студији Quine и Raghu (2005). Moskaug и сар. (2005) су констатовали да флавоноиди повећавају експресију гама-глутамилцистеин синтетазе, ензима одговорног за синтезу глутатиона, *in vitro* и *in vivo*.

Аскорбинска киселина (Vit C) је примарни антиоксиданс у плазми и у цитосолу и делује као снажан редокс систем. Оксидацијом L-аскорбинска киселина прелази у аскорбил радикал ( $AsA^{\cdot}$ ) и даље у дехидро-L-аскорбинску киселину (DAsA) деловањем L-аскорбат оксидазе (May и сар., 1997). Формирање молекула DAsA може да буде последица директне реакције између Vit C и ROS. Аскорбил радикал се редукује помоћу NADPH-зависне семидехидроаскорбат редуктазе (Wells и Jung, 1997), и NADPH-зависног селеноензима тиоредоксин редуктазе (May и сар., 1997). DAsA се редукује у Vit C неензимским путем помоћу GSH и липолитичке киселине (Wells и Jung, 1997), али и ензимском тиоредоксин редуктазом (May и сар., 1997) и GSH-зависним глутаредоксином (Park и Levine, 1996).

Метаболизам бакра и Vit C блиско су повезани. Vit C антагонистички делује на апсорпцију бакра у цреву (Solomons и Viteri, 1982). *In vitro*, Vit C интерагује са металотионеинима и спречава везивање бакра за металотионеине и церулоплазмин у хепатоцитама (Evans и сар., 1970). У присуству бакра Vit C *in vitro* може да има прооксидативно деловање, али истовремено Vit C и његов оксидативни продукт DAsA инхибирају оксидацију LDL холестерола индуковану бакром (Retsky и сар., 1999). Соли бакра оксидују Vit C, а присуство аминокиселина или протеина који везују бакар умањује његову способност оксидације (Mystkowski, 1942). L-аскорбат оксидаза, која преводи L-аскорбинску киселину у дехидро-L-аскорбинску киселину, садржи бакар као кофактор. Овај ензим, у мањој мери, такође, катализује оксидацију о-катехола. Поред L-аскорбат оксидазе, и церулоплазмин, који такође садржи бакар као кофактор, показује аскорбат оксидазну активност *in vivo* (Solomons и Viteri, 1982). Антиоксидативно деловање Vit C остварује директно, као дозор водоника у реакцијама са пероксил радикалима и другим реактивним врстама, и индиректно, обнављајући антиоксидативна својства витамина Е,

чиме прекида ланчане реакције липидне пероксидације ћелијских мембрана и мембрана органела, и спречава оксидацију других биомолекула (Bendich и сар., 1986; Ognjanović и сар., 2003).

Наши резултати показују да је бакар довео до значајног смањења концентрације Vit C у јетри (Табела 14, График 31). Смањење концентрације Vit C може да се констатује и након примене DPA. Флавоноиди апликовани самостално или у котретману са багром вишеструко су повећали концентрацију Vit C, не само у односу на друге две групе третиране багром, већ и у односу на контролу.

Смањење концентрације Vit C након третмана багром може да буде последица повећане продукције малондиалдехида (MDA), продукта липидне пероксидације, који инхибира ензим L-гулонолактон оксидазу, неопходан за синтезу Vit C (Hudcová и Ginter, 1992). Бакар у вишку такође доводи до смањења нивоа токоферола (Gaetke и Chow, 2003). Да је након третмана багром повећана липидна пероксидација у ткиву јетре показују резултати у Табели 10. DPA у котретману са багром, иако је значајно снизио LPO у јетри у односу на групу третирану само багром, није успео да спречи повећани утрошак Vit C.

Пораст концентрација Vit C након третмана флавоноидима може да се припише њиховој антиоксидативној способности. Показано је да QE остварује инхибиторне ефекте на оксидацију Vit C катализовану Cu(II)-јонима формирањем комплекса QE+Cu, при чему доводи до смањења концентрације слободних јона (Takamura и Sakamoto, 1978). QE и EC захваљујући уклањању реактивних врста такође имају значајну улогу у очувању витамина E на биолошким мембранама (Middleton и сар., 2000).

Утицај третмана на активности ензима SOD (CuZn SOD) у еритроцитима приказани су у Табели 12 и на Графику 27. Након третмана багром, активност SOD у еритроцитима животиња значајно је повећана у односу на контролу. DPA примењен са багром довео је до значајног смањења активности SOD у односу на групу која је примала само бакар, док флавоноиди на активност SOD у еритроцитима нису значајно утицали.

Резултати третмана на активности ензима укупне SOD, Mn SOD и CuZn SOD у јетри приказани су у Табели 15 и на Графицима 35 и 36. Бакар је активност укупне SOD повећао, док је активност CuZn SOD значајно повећао у односу на контроле. Котретман багром и DPA значајно је повећао активност укупне SOD и Mn SOD у јетри, док је активност CuZn SOD значајно смањио. Флавоноиди у котретману са багром значајно су

смањили активност укупне SOD и Mn SOD, као и активност CuZn SOD у јетри животиња у поређењу са групом која је добијала бакар и DPA.

SOD представља важну компоненту у биолошким механизмима одбране. Овај ензим катализује дисмутацију  $O_2^{\bullet-}$  и тиме штити ћелије од токсичности  $O_2^{\bullet-}$ , чиме доприноси одржавању редокс баланса. SOD представља поуздан биомаркер оксидативног стреса (Halliwell и Gutteridge, 2007). Активни центар CuZn SOD чине јони бакра и цинка, а јон бакра одговоран је за реакцију дисмутације  $O_2^{\bullet-}$  чиме се спречавају оксидативна оштећења ћелија. Као саставни део ензима CuZn SOD, бакар је битан за функцију ендогеног антиоксидативног система. Око 60% бакра у еритроцитима је везано за SOD. У условима смањеног уноса бакра, смањена је и активност SOD, а тиме и способност ћелија да се одбране од токсичног деловања реактивних врста (Milne и Nielsen, 1996). Постоји позитивна корелација између активности CuZn SOD и уноса бакра храном (Gibson, 2005). С друге стране, повећан унос бакра може да доведе до смањења концентрација цинка, услед конкуренције за апсорпцију и тиме смањи активност SOD (Russo, 2010). Повећану активност SOD у плазми и јетри, након третмана бакром у концентрацијама од 100  $\mu\text{g/ml}$  током 4 недеље, уз смањење GSH и повећање LPO у јетри, констатовали су и Ozcelik и сар. (2003). Супротно, у истраживању Zhang и сар. (2000), након субхроничног третмана бакром активност SOD у еритроцитима и јетри је смањена, али су повећани LPO.

Како наши резултати показују, након хроничне интоксикације бакром долази до повећања концентрација  $O_2^{\bullet-}$  у еритроцитима (Табела 9), а повећање активности SOD у директној је корелацији са повећаном количином супстрата (Fridovich, 1975). Такође, значајно повећање активности CuZn SOD у јетри након третмана бакром, вероватно може да се припише повећаној продукцији  $O_2^{\bullet-}$ , с обзиром да приказани резултати показују да је у ткиву јетре дошло до оксидативних оштећења, повећања липидне пероксидације (Табела 10) и отпуштања ћелијског садржаја у циркулацију (Табела 7).

Котретман бакром и DPA повећао је активност укупне SOD, у поређењу са контролом, и активност Mn SOD, у поређењу са групом третираном само бакром у јетри животиња. Пораст активности укупне SOD одражава повећано присуство  $O_2^{\bullet-}$ . Повећање активности Mn SOD представља прву линију одбрамбеног механизма ћелије (Wispe и сар., 1992), па повећана активност Mn SOD, може да представља рани адаптивни одговор на оксидативни стрес, с обзиром да су главно место продукције ROS реакције везане за

митохондријални респираторни ланац. Како показују резултати, након котретмана баком и DPA није дошло до значајног пораста липидних пероксида у јетри, што би могло да значи да је DPA умањио прооксидативно деловање бакра.

Значајно смањена активност укупне SOD, Mn SOD и CuZn SOD у јетри након котретмана баком и флавоноидима може да буде резултат хелирања јона бакра од стране QE и EC или директног уклањања ROS. QE и EC су потентни скевенџери супероксид анјон радикала и у стању су да лимитирају митохондријалну продукцију  $O_2^{\cdot-}$  (Middleton и сар., 2000, Muthukumaran и сар., 2008). Неутрализацијом  $O_2^{\cdot-}$  редукована је активност SOD.

Каталаза (CAT) је најважнији ензим који катализује деградацију  $H_2O_2$  продукованог током процеса дисмутације  $O_2^{\cdot-}$  деловањем ензима SOD (Halliwell и Gutteridge, 2007). Резултати нашег истраживања показују да је третман баком значајно повећао активност CAT у еритроцитима (Табела 12 и График 27) и у јетри животиња (Табела 15 и График 37). Активност CAT у јетри такође је била значајно повећана након котретмана баком и DPA. Пораст активности CAT представља заштитни механизам одбране од повећане продукције  $H_2O_2$  и указује на повећано присуство  $H_2O_2$  као супстрата (Percy, 1984) насталог услед повећане активности SOD. Како претходно изнети резултати показују, у групи третираној баком дошло је до значајног пораста концентрација  $H_2O_2$  у еритроцитима, док је у групи третираној баком и DPA концентрација повећана, али не статистички значајно (Табела 9). Са друге стране, у групи која је третирана баком и DPA активност CAT у јетри значајно је повећана, што указује на присуство повећаних концентрација водоник пероксида. Иако се користи за уклањање вишка бакра (у третману Вилсонове болести) DPA може да испољи цитотоксичне ефекте, продукцијом водоник пероксида услед оксидације тиолних група у присуству бакра (Chou и Panayi 1999).

Котретман баком и флавоноидима је активност CAT у еритроцитима значајно умањио у односу на групу третирану баком (Табела 12 и График 27), као и активност CAT у јетри, у поређењу са групом третираном баком и DPA (Табела 15 и График 37). Уклањањем супероксид анјон радикала флавоноиди су смањили концентрацију супстрата за SOD, а како је активност CAT у директној зависности од концентрација присутног водоник пероксида, смањена је и њена активност.

У Табели 13 и на Графику 28 приказани су резултати активности ензима глутатион-пероксидазе (GSH-Px) у еритроцитима животиња. Активност GSH-Px повећана је у свим

групама третираним бавром у поређењу са контролом, а највеће повећање може се запазити у групи која је уз бакар примала и DPA. Са друге стране, активност GSH-Px у јетри значајно је увећана само код групе која је третирана бавром и флавоноидима, у поређењу са осталим експерименталним групама (Табела 16 и График 38).

Унутарћелијска концентрација  $H_2O_2$  представља важан фактор који утиче на ниво ензимске функционалности CAT и GSH-Px (Brigelius-Flohé, 1999). Познато је да GSH-Px има већи афинитет за  $H_2O_2$  у односу на CAT и има важну улогу у примарној одбрани при ниским концентрацијама  $H_2O_2$ , док је CAT значајнији ензим у условима изразитог оксидативног стреса. Како је активност каталазе повећана након третмана бавром у еритроцитима, као и у јетри, то сугерише на присуство оксидативног стреса у еритроцитима и ћелијама ткива јетре, што показују и претходно изнети резултати концентрације  $H_2O_2$  у еритроцитима.

Антиоксидативни ензими SOD, CAT и GSH-Px делују заједно и у нормалним физиолошким условима њихово деловање спрегнуто је са другим неензимским антиоксидансима, глутатионом, и витаминима Е и Це. Излагањем токсичним супстанцама њихов заштитни капацитет може бити премашен и повећање активности представља механизам којим се побољшава антиоксидативна заштита (Handy и сар., 2009). Повећана активност GSH-Px ефикасно уклања водоник пероксид за време спонтане оксидације хемоглобина и спречава његову оксидацију, као и липидне хидропероксиде, чиме се одржава интегритет мембрана. Антиоксиданти спречавају утросак редукованог глутатиона и повећавају његову интрацелуларну концентрацију, а како је GSH супстрат за деловање ензима GSH-Px, стимулирана је његова активност. На основу приказаних резултата може се видети да су DPA, као и флавоноиди повећали концентрације GSH у еритроцитима (Табела 11) и у јетри (Табела 14). Ипак, претходно приказани резултати показују да је код групе третиране бавром и DPA дошло до повећања липидне пероксидације у еритроцитима и смањења концентрације хемоглобина. Способност да уклања реактивне врсте поседује и церулоплазмин (Goldstein и сар., 1982), поред ферооксидазне активности којом конвертује токсичне феро у нетоксичне фери јоне (Patel и сар., 2002). Резултати овог истраживања показују да је концентрација церулоплазмине у плазми значајно нижа код ове експерименталне групе (Табела 18), па је могуће да је то допринело повећању LPO у еритроцитима.

Активност ензима глутатион-редуктазе (GR) обезбеђује циклирање глутатиона између оксидоване и редуковане форме, обнављање ћелијског пула редукованог глутатиона, и тиме заштиту ћелија од оксидативних оштећења (Sies, 1991). Промене активности GR често су повезане са променама активности других антиоксидативних ензима, GSH-Px и SOD (Sies, 1991). Резултати овог истраживања показују да је активност GR у еритроцитима животиња повећана у свим групама третираним бавром у поређењу са контролом, а значајно повећана у групи која је примала само флавоноиде у поређењу са осталим експерименталним групама (Табела 13 и График 29). Активност GR у јетри (Табела 16 и График 39) није промењена и вредности су приближне контролним код свих третираних група.

Ензим фазе II биотрансформације глутатион-S-трансфераза (GST) је коњугациони ензим који игра кључну улогу у детоксификацији ендогених супстанци, ксенобиотика и метаболита насталих у оксидативном метаболизму (Mantle и сар., 1990). GST катализује реакције коњугације редукованог глутатиона са јонима метала и различитим електрофилним једињењима. У Табели 13 и на Графику 30 приказани су резултати активности ензима GST у еритроцитима животиња. Активност GST у еритроцитима значајно је умањена након третмана бавром. Котретман бавром и DPA, као и котретман бавром и флавоноидима повећали су активност GST у еритроцитима, у односу на групу која је примала само бакар, а најизразитије повећање запажа се у групи која је примала само флавоноиде.

Смањена активност GST у еритроцитима након третмана бавром може да буде последица оксидативне модификације ензима потенциране губитком интраћелијског GSH пула. Бакар показује висок афинитет за  $\text{NH}_2^-$  и SH- групе протеина и специјални купропротеини везивањем спречавају његову потенцијалну токсичност. Када је присутан у вишку, везивањем за протеине који нису укључени у метаболизам бакра, може да поремети њихову структуру и биолошку функцију (Letelier и сар., 2005). С обзиром да GST представља биомаркер оксидативног стреса, његова повећана активност могла би да упућује на постојање оксидативног стреса у еритроцитима. Међутим, на основу досад приказаних резултата, није забележено повећање осталих биомаркера оксидативног стреса након примене флавоноида у еритроцитима животиња. Концентрације липидних пероксида и реактивних врста кисеоника у овој третираној групи приближне су

контролним вредностима. Сматра се да индукција активности ензима антиоксидативне заштите представља компензаторни механизам који омогућава превазилажење негативних утицаја, односно спречавање оштећења која могу да настану услед деловања оксиданата. У току антиоксидативног деловања кверцетин се конвертује у оксидоване продукте (о-семихиноне и о-хиноне) који у присуству глутатиона могу да формирају глутатионил адукте и да узрокују инхибицију тиол садржавајућих ензима (Paulíková и Berczeliová, 2005). Повећана активност GST у еритроцитима може да буде резултат уклањања потенцијално токсичних продуката насталих антиоксидативним деловањем флавоноида.

Табела 16 и График 40 приказују активности ензима GST у јетри. Активност GST у групи третираној само бакром и групи третираној бакром и DPA није измењена у поређењу са контролом. Флавоноиди су повећали активност овог ензима примењени самостално или у котретману са бакром, у поређењу са контролом и друге две групе третиране бакром.

Јетра је најважније место детоксификације екзогенних и ендогених електрофилних једињења и важно је да поседује адекватну активност ензима GST и одговарајућу количину његовог супстрата GSH. Јетра је такође и главни орган за метаболизам флавоноида, где се каталитичком активношћу ензима II фазе детоксификације обављају метаболички процеси метилације, сулфатације и глюкоронидације (D'Archivio и сар., 2007), заједнички за многе ксенобиотикуе. Повећање активности ензима GST након третмана флавоноидима може да буде резултат индукције активности постојећих ензима или његове *de novo* синтезе. Индукција ензима II фазе детоксификације је један од механизма којим флавоноиди остварују антиканцерогено деловање (Moon и сар., 2006).

Студије ефеката QE и EC на оксидативни статус у стањима и болестима повезаним са оксидативним стресом, као што су хипертензија (Duarte и сар., 2001) или дијабетес (Quine и Raghu, 2005; Abdelmoaty и сар., 2010), показују да ови флавоноиди доводе до побољшања антиоксидативног статуса, повећањем активности ензима SOD, CAT и GSH-Px. Код ових болести активности антиоксидативних ензима су смањене, што смањује способност заштите од оксидативних оштећења и доводи до акумулације ROS и липидне пероксидације. Резултати *in vitro* истраживања на хуманим хепатоцитима Martín и сар. (2010) показују да флавоноиди из какаоа повећавају активност GSH-Px и GR. Заштитни ефекти QE и катехина против токсичности индуковане H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у култури хепатоцита (BL-9)



пацова у вези су са активацијом GSH-Px (Nagata и сар., 1999). Abdelmoaty и сар. (2010), нису забележили промене у активности GSH-Px након инкубације хомогената јетре QE, али су констатовали повећану активност *in vivo*, што може да буде резултат промена у експресији ензима, механизма који недостају у *in vitro* ефектима. Показано је да флавоноиди испољавају директно геномско деловање преко ДНК секвенце EREs (енг. *estrogen responsive elements*), индукцијом експресије интрацелуларних антиоксиданата, одржавајући ензимске активности вишим, као и ниво GSH, чиме спречавају дисфункцију јетре (Vina и сар., 2005). Такође, флавоноиди могу да испоље модулаторно деловање на ћелије посредовањем у протеин киназним и липид киназним сигналним путевима. Забележено је да учествују у сигналним каскадама фосфоинозитид 3-киназа (PI 3-киназа), Akt/протеин киназа В (Akt/PKB), тирозин киназа, протеин киназа С (PKC) и митоген протеин киназа (MAP киназа), (Williams и сар., 2004). Модификација активности ћелијских ензима II фазе детоксификације вероватно је главни механизам којим флавоноиди остварују заштиту улогу на ћелије.

Организам одраслог човека садржи 100-150 mg бакра. Концентрација бакра у плазми здравих особа варира између 0,7 и 1,6 µg/ml. Препоручени унос бакра од стране Светске здравствене организације (WHO) износи између 0,9 и 1,3 mg дневно, а не би требало да прелази 10 mg дневно (NOAEL енг. *No observed adverse effect level*).

Скоро сав бакар у телу везан је за протеине, тако да је концентрација слободних јона бакра веома мала, осим ако нема неких других поремећаја у организму. Око 95% укупног бакра у плазми је везано за церулоплазмин, а осталих 5% за албумин, транскупреин или аминокиселине (Linder, 1991). Екскреција бакра корелира са количином бакра унетом храном, што представља адаптивни одговор са циљем да се спречи недостатак бакра када је унос бакра смањен, или токсичност када је унос бакра повећан (Turnlund и сар., 2004). Међутим, уношење повећаних количина бакра током дужег временског периода, може да доведе до промена у статусу бакра и повећа његово акумулирање. Различите животињске врсте различито реагују на присуство повећаних количина бакра у храни или води. Код коња је смањена апсорпција и повећано излучивање преко жучи, па се не јавља оштећење јетре (George и Carlson, 2002). Свиње су јако толерантне на високе количине бакра, али може да се примети пораст концентрација

у серуму, док је код оваца изражено акумулирање у јетри због ограничене билијарне екскреције (Soli и Froslie, 1977; George и Carlson, 2002).

Иако постоје начини да се утврди недостатак бакра, за утврђивање вишка бакра у организму не постоје поуздани маркери. Најпоузданији показатељ вишка бакра унетог храном је концентрација бакра у јетри. Повећане концентрације серумског бакра или церулоплазмина (СР) не морају стриктно да буду у вези са токсичним концентрацијама бакра, јер се срећу и код инфламација и инфекција, малигнитета, трудноћа и присуства разних стресора (Eagon и сар., 1999; Arredondo и Nunez, 2005). Нивои бакра у бакар зависним ензимима, као што су цитохром *c*-оксидазе, супероксид-дисмутаза или оксидазе диаминида, варирају, не само као одговор на статус бакра, већ и као одговор на различите физиолошке и биохемијске факторе (Olivares и сар., 1998).

У табели 17 и на Графицима 41–44 приказани су резултати концентрација бакра у плазми и јетри третираних животиња. Концентрације укупног бакра у плазми не варирају значајно у третираним групама, али резултати показују да је субхроничан третман бакром повећао концентрације укупног бакра у плазми третираних животиња. Концентрација бакра невезаног за церулоплазмин („слободни“ бакар, енг. *non-ceruloplasmin-bound copper*, NCPC), добијена на основу формуле, значајно је увећана у плазми бакром третираних животиња. Котретман бакром и DPA и котретман бакром и флавоноидима донекле је умањио концентрације укупног бакра у плазми, а значајно је умањио концентрације NCPC, у односу на контролу и групу која је третирана само бакром.

Повећање концентрација NCPC упућује да бакар „цури“ из протеина или ћелија, или да није адекватно транспортован унутар или ван ћелија. За клиничке сврхе, фракција NCPC се рутински изводи на основу тога да СР везује шест атома бакра, али је овај приступ ограничен (Arredondo и Nunez, 2005). Упркос њиховој клиничкој улози, аспектима везаним за биолошке варијације концентрација укупног бакра и СР у серуму и даље није посвећено довољно пажње, док информације о биолошким варијацијама NCPC, односно „слободног“ бакра потпуно недостају (Braga и сар., 2013).

Како у плазми не постоји бакар у јонском облику (Walshe, 2012) NCPC, односно „слободни“ бакар, односи се на ону фракцију бакра која се, уместо за церулоплазмин, налази слабо везана за албумине или аминокиселине. За разлику од бакра везаног за церулоплазмин, који се излучује преко жучи или урина, бакар везан за албумине се не

филтрира у гломерулима, осим ако не постоји значајна протеинурија (Walshe 2012), што значи да његова концентрација у серуму расте. Бакар везан на овај начин и даље задржава способност да катализује реакције између супероксид анјон радикала и водоник пероксида и да допринесе продукцији хидроксил радикала (Uriu-Adams и Keen, 2005). Arnal и сар. (2010) су констатовали повећане концентрације бакра у плазми оболелих од Алцхајмерове и Паркинсонове болести, као и оболелих од деменције, а концентрације NCBC су биле у директној корелацији са неуролошким поремећајима.

Резултати нашег истраживања показују да су концентрације укупног бакра и концентрације NCPC у јетри значајно повећане у свим групама третираним багром у односу на контролне вредности. У Cu+QE+EC групи концентрација укупног бакра је већа у односу на Cu групу. Концентрација NCPC, већа је у Cu+DPA групи у односу на Cu групу. Такође, концентрација NCPC већа је у Cu+QE+EC групи у односу на остале две групе које су примале бакар (Табела 17).

Након апсорпције у цревима већи део бакра се брзо одлаже у јетру где се метаболичим процесима припрема за складиштење, транспорт и екскрецију. Постоје три одвојена пута укључена у ове процесе: припрема бакра за секрецију у жуч и екскрецију путем жучи, привремено складиштење бакра и инкорпорација бакра у церулоплазмин за дистрибуцију кроз организам (Evans, 1973). Половина количине бакра се у хепатоцитама налази у нуклеарној фракцији, микрозомима, митохондријама и лизозомима, а остатак је у цитосолу, у ензимима или металотионеинима. Кад достигне одређени ниво у односу на потребе ћелије, вишак бакра се складишти у лизозомима (Evans, 1973). Поремећаји у метаболизму и измењена билијарна или уринарна екскреција, као и смањена секреција у плазму, резултују повећаном акумулацијом бакра.

Акумулација бакра у јетри не мора да узрокује токсичност (Bingle и сар., 1992). До оштећења хепатоцита долази када се бакар, који је ускладиштен у лизозомима, из њих ослободи у цитоплазму (Fuentealba и Aburto, 2003). Ослобођен бакар у цитоплазми хепатоцита може да испољи редокс активност. Важно је напоменути да за деловање бакра као катализатора у *Fenton*-овој реакцији, најмање два услова мора да буду испуњена, да се налази у облику Cu(I)-јона, и да буде слободан, односно невезан. Иако се присуство слободних јона доводи у питање, чињеница да до реакција долази иде у прилог њиховом присуству, с обзиром да слободни јони лакше дифундују и доступнији су (Montes, 2014).

У цитоплазми хелија бакар могу да вежу металотионеини (Bremner, 1987), глутатион (Arredondo и Nunez, 2005) или једињења попут флавоноида (Takamura и Sakamoto, 1978) и DPA (Brewer, 1995).

Резултати овог истраживања показују да је након субхроничног третмана бакар испољио хепатотоксично деловање, што се манифестује повећаном липидном пероксидацијом мембрана, деструкцијом хепатоцита и ослобађањем хепатоцелуларних ензима у циркулацију. То је у складу са другим студијама које су показале да услед нагомилавања бакра у јетри долази до повећане продукције ROS и оксидативних оштећења биомолекула (Kadiiska et al., 1993; Zhang и сар., 2000; Ozelik и сар., 2003). Студија Rahelić и сар. (2006), показала је да су концентрације серумског бакра значајно повишене код пацијената са цирозом јетре.

Котретман бакром и DPA, као и бакром и флавоноидима, иако је довео до акумулирања бакра у хепатоцима, није изазвао њихово оштећење, што потврђују претходно наведени резултати концентрације липидних пероксида и активности ензима биомаркера оштећења јетре. Овакав резултат је највероватније последица способности флавоноида, као и DPA да вежу бакар, чиме је спречена његова редокс активност. Показано је да *o*-дихидроксифенил групе проантоцијанидина, полимера катехина, као и хидроксилне групе кверцетина имају кључну улогу у везивању Cu(II)-јона (Mira и сар., 2002; Zhou и сар., 2006; Karamać 2009).

Церулоплазмин (CP) се синтетише у јетри као апо-CP и излучује у циркулацију као холопротеин са везаних 6 атома бакра. CP служи као извор бакра за ткива (Vulpe и Rackman, 1995) и одговоран је за секрецију бакра у жуч и преко жучи у црево, одакле се углавном поново не ресорбује (Evans, 1973). CP делује и као ферооксидаза (Patel и сар., 2002) чиме је омогућено везивање гвожђа за трансферин (Utiu-Adams и сар., 2005). Смањена концентрација CP за последицу има нагомилавање гвожђа у јетри услед немогућности да се угради у трансферин. Истовремено, уклањањем токсичних феро јона, који могу да индукују формирање супероксид анјон радикала и хидроксил радикала, CP делује као антиоксидант. Церулоплазмин за који није везан бакар не показује оксидазну активност и брзо бива деградиран (Utiu-Adams и сар., 2005).

У Табели 18 и на Графику 45 приказане су концентрације CP у плазми. Резултати показују да је концентрација CP у плазми животиња третираних бакром и животиња

третираних бакром и DPA значајно смањена у односу на контролу. Концентрација CP у плазми животиња третираних Cu+QE+EC је умањена у односу на контролу, али је већа у односу на остале две групе третиране бакром.

У Табели 18 и на Графику 46 приказана је концентрација CP у јетри животиња. Концентрација CP у јетри повећана је у групи третираној флавоноидима и бакром, а значајно је повећана у групи третираној само бакром и бакром и DPA.

После третмана бакром смањена је концентрација CP у плазми, а повећана концентрација CP у јетри, што сугерише повећано одлагање бакра у ткивима (Eagon и сар., 1999). Смањена ферооксидазна активност CP, и последично смањен капацитет за уклањање реактивних врста, примећена је код пацова са хепатоцелуларним тумором (Eagon и сар., 1999). Код оболелих од Вилсонове болести и LEC соја пацова (модел за Вилсонову болест) серумски бакар, као и CP су смањени, док је ниво бакра у јетри повећан, као и екскреција урином (Kodama и Fujisawa, 2009; Aliosmanoglu 2013). Смањен ниво CP у плазми, уз повећан или нормалан ниво бакра у плазми, може да сугерише повећан ниво бакра који није везан за церулоплазмин (NCPC). Повећане вредности NCPC у циркулацији могу да буду последица наглог ослобађања бакра из хепатоцита услед оштећења јетре, као код акутног оштећења било којег порекла, или интоксикације бакром (Patil и сар., 2013). На основу резултата може да се закључи да је након третмана бакром дошло до незнатног пораста концентрација укупног бакра у плазми (Табела 17), а како је ниво CP у плазми низак, већи део бакра невезан је за CP. Повећане концентрације слободног бакра у плазми вероватно потичу из оштећених хепатоцита, а њихово оштећење потврђују и резултати активности маркер ензима јетре и повећана липидна пероксидација.

DPA је лек избора у третману Вилсонове болести. Као тиолно једињење хелира бакар и омогућава његово излучивање урином. У литератури је показано да третман DPA код оваца (Humann-Ziehanck и Bickhardt, 2001) и код пацова (Eagon и сар., 1999) резултује смањеним нивоом бакра у серуму и његовим појачаним излучивањем. Међутим, код пацијената током дуготрајне терапије DPA поред ефикасности у хелирању метала испољава и нежељена дејства. DPA има релативно велику токсичност, око 30% пацијената је хиперсензитивно на овај лек, а такође је контраиндикуван код особа са неуролошким симптомима (Perrett, 1981; Fishel и сар., 1989; Drosos и сар., 1993; Kianoush и сар., 2012).

У Табели 18 и на Графику 47 приказане су концентрације укупних протеина јетре. Концентрација укупних протеина јетре значајно је смањена у Cu третираној групи и у Cu+DPA третираној групи. Супротно, повећане концентрације укупних протеина јетре забележене су у QE+EC и Cu+QE+EC групама у односу на друге две групе третиране бакром.

Из претходно приказаних резултата се констатује да су концентрације укупног бакра у јетри након котретмана флавоноидима значајно повећане, а како ниво CP у јетри није битно измењен, повећане су и концентрације слободног бакра. То сугерише да је дошло до акумулације бакра у хепатоцима и да бакар није везан за CP. Бакар се у ћелији везује поред CP и за друге протеине, металотионеине (Sugawara и Sugawara, 1987; Bremner, 1987), CuZn SOD (Prohaska, 2008) или GSH (Arredondo и Nunez, 2005). Повећана концентрација укупних протеина у јетри након котретмана бакром и флавоноидима сугерише повећану синтезу протеина, вероватно ензима AOS, што потврђује и повећање њихове активности (Табела 16), као и повећање нивоа редукованог глутатиона (Табела 14). Флавоноиди су тиме допринели повећању антиоксидативног капацитета ћелија. Акумулирани бакар у хепатоцима након третмана флавоноидима није довео до њиховог оштећења, а на очуван интегритет хепатоцита упућују претходно приказани резултати. Способност флавоноида да хелирају двовалентне јоне метала вероватно је одговорна за овакав резултат. Да су флавоноиди везали јоне бакра и спречили њихово отпуштање из ћелија јетре показују и смањене концентрације укупног и слободног бакра у плазми.

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

---

На основу експерименталних резултата истраживања ефеката субхроничне интоксикације бакром и улоге флавоноида кверцетина (QE) и епикатехина (EC) на оксидативно-антиоксидативни статус у еритроцитима и јетри пацова *Wistar albino* соја, добијених у овој докторској дисертацији, могу се извести следећи закључци:

1. Субхронична интоксикација бакром доводи до смањења прираста телесне тежине третираних животиња, што сугерише интензивирање катаболичких процеса.
2. У условима субхроничне интоксикације бакром долази до значајних промена хематолошких параметара, смањења броја еритроцита, хемоглобина и хематокрита, односно до хемоллизе еритроцита и појаве анемије. До анемије долази и након примене комерцијалног лека Д-пенициламина (DPA) са бакром. Анемија, која се јавља карактерише се израженом микроцитозом и хипохромијом, што показују промењене вредности еритроцитних индекса (MCV, MCH, MCHC, RDW). Бакар као и DPA повећавају број гранулоцита.
3. Субхронична интоксикација бакром доводи до поремећаја у метаболизму липида, што се огледа у повећању концентрација укупног холестерола. До сличних ефеката доводи и DPA са бакром.
4. Бакар у субхроничном третману доводи до повећања концентрација реактивних врста кисеоника: супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) и водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) у еритроцитима, као биомаркера оксидативног стреса, упућујући на појаву оксидативних оштећења у еритроцитима и ткиву јетре. Котретман QE и EC са бакром редукује концентрације  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$  у еритроцитима, док DPA примењен са бакром значајно смањује концентрацију  $O_2^{\bullet-}$ .
5. Повећање липидне пероксидације (LPO) у еритроцитима и ткиву јетре узроковано је повећаним стварањем реактивних врста кисеоника након субхроничног третмана бакром. QE и EC у третману са бакром, као и DPA умањују концентрације LPO.



6. Оксидативна оштећења јетре након субхроничног третмана багром потврђују повећане активности ензима маркера цитотоксичности јетре (AST, ALT, ALP, GGT и LDH) у серуму. Третман QE и EC *per se* не доводи до промена ових маркера, али у котретману са багром значајно умањује њихову активност у серуму.
7. Бакар у субхроничном третману доводи до поремећаја хомеостазе електролита, односно инхибиције Na/K транспортера и до повећања концентрација натријума у плазми. Такође, бакар доводи до смањења концентрација гвожђа у плазми.
8. Бакар у субхроничном третману повећава утросак редукованог глутатиона (GSH) у еритроцитима и ткиву јетре и ремети редокс баланс ових ћелија. Флавоноиди QE и EC, примењени у котретману са багром обнављају GSH у ћелијама. Сличан ефекат показује и DPA.
9. Концентрација Vit C у ткиву јетре смањена је након третмана само багром, као и третмана багром и DPA. Флавоноиди QE и EC, као и котретман QE и EC са багром значајно повећавају концентрацију овог антиоксиданта.
10. Повећање активности ензима AOS: CuZn SOD и CAT у еритроцитима и у ткиву јетре након субхроничне интоксикације багром указује на повећано присуство реактивних врста  $O_2^{\bullet -}$  и  $H_2O_2$  који су супстрат за ове ензиме. DPA у котретману са багром значајно повећава само активност Mn SOD у јетри. Флавоноиди QE и EC у котретману са багром смањују активности ових ензима.
11. DPA примењен са багром значајно повећава активност GSH-Px у еритроцитима, док флавоноиди QE и EC у котретману са багром значајно повећавају активност овог ензима у јетри.
12. Флавоноиди примењени самостално значајно повећавају активност ензима GR у еритроцитима што за резултат има повећање GSH „пула“ у ћелијама.

13. Након субхроничног третмана бакром смањена је активност GST у еритроцитима, што указује на опадање капацитета ћелија за детоксификацију. Флавоноиди QE и EC примењени самостално или у котретману са бакром повећавају активност GST у еритроцитима и у јетри.
14. Пад концентрације церулоплазмина у плазми након субхроничне интоксикације бакром упућује на повећане концентрације јона бакра који нису везани за овај протеин синтетисан у јетри, те да су вероватно ослобођени из оштећених ћелија јетре.
15. У јетри свих експерименталних група које су добијале бакар повећана је концентрација укупног бакра и церулоплазмина. Такође, повећана је и концентрација бакра невезаног за церулоплазмин, што указује на повећану акумулацију бакра у јетри.

## ОПШТИ ЗАКЉУЧАК

Истраживања ове докторске дисертације показала су да бакар у субхроничном третману испољава директан прооксидативни ефекат на еритроците и ткиво јетре пацова *Wistar albino* соја и доводи до промена хематолошких и биохемијских параметара. Промене у активностима ензима AOS после субхроничне интоксикације бакром, такође, указују на његове прооксидативне ефекте и појаву оксидативног стреса у еритроцитима и ткиву јетре. Оксидативним оштећењима еритроцита и ткива јетре доприноси и смањење неензимских антиоксиданата, ћелијског пула глутатиона и Vit C. Бакар показује значајне токсичне ефекте на хематолошко-биохемијске процесе у крви и утиче на оксидативно-антиоксидативни статус у еритроцитима и јетри.

Флавоноиди QE и EC показују антиоксидативну способност и умањују оксидативни стрес настао након субхроничног излагања бакру. QE и EC стабилизују мембране, блокирају липидну пероксидацију и тиме имају улогу у ублажавању манифестација токсичности у еритроцитима и ткиву јетре. Значајно повећавају концентрације неензимских антиоксиданата GSH и Vit C у ћелијама, индукују синтезу ензима AOS чиме доприносе повећању антиоксидативног капацитета ћелија. Синергистичко деловање флавоноида QE и EC, као и цитопротективна улога коју показују, може се приписати њиховој способности да хелирају метале и/или уклањају слободне радикале. QE и EC су ефективнији у антиоксидативном деловању у поређењу са комерцијалним леком DPA. DPA поред ефикасности у хелирању метала испољава и прооксидативне ефекте и доводи до липидне пероксидације у еритроцитима и јетри.

Ова докторска дисертација представља допринос комплетирању научних сазнања о токсичним ефектима бакра на метаболизам еритроцита, као и комплексности протективног деловања флавоноида кверцетина и епикатехина на оксидативно-антиоксидативни статус еритроцита и ћелија ткива јетре пацова. Због широког спектра биохемијских и фармаколошких дејстава, посебно треба истакнути значај испитиваних флавоноида у здравој исхрани, као и у превенцији и терапији многих обољења.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. ABDELMOATY MA, IBRAHIM MA, AHMED NS, ABDELAZIZ MA. (2010): Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. *Indian J Clin Biochem* 25(2): 188-192.
2. ADAMS KF, JOHNSON GJR., HORNOWSKI KE, LINEBERGER TH. (1979): The effect of copper on erythrocyte deformability. A possible mechanism of hemolysis in acute copper intoxication. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* 550 (2): 279-287.
3. AHUJA KD, KUNDE DA, BALL MJ, GERAGHTY DP. (2006): Effects of capsaicin, dihydrocapsaicin, and curcumin on copper-induced oxidation of human serum lipids. *J Agric Food Chem* 54(17): 6436-6439.
4. AKHAN O, AKPINAR E, OTO A, KÖROGLU M, OZMEN MN, AKATA D, BIJAN B. (2002): Unusual imaging findings in Wilson's disease. *Eur Radiol* 12(3): S66-S69.
5. ALANIZ RC, THOMAS SA, PEREZ-MELGOSA M, MUELLER K, FARR AG, PALMITER RD, WILSON CB. (1999): Dopamine beta-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2274-2278.
6. ALIOSMANOGLU I, MURAT K, MESUT G, ZULFU A, AKIN O, FATIH T, MUSTAFA BK. (2013): Efekti eritropoetina na nivoe bakra i cinka u serumu i tkivima jetre kod pacova sa opstruktivnom žuticom. *J Medical Biochemistry* 32(1): 47-51.
7. ALMARIO RU, VONGHAVARAVAT V, WONG R, KASIM-KARAKAS SE. (2001): Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr* 74: 72-79.
8. ALVAREZ B, RADI R. (2003): Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25:295-311.
9. ANDREYEV AY, KUSHNAREVA YE, STARKOV AA. (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70: 200-214.
10. ARAYA M, OLIVARES M, PIZARRO F, LLANOS A, FIGUEROA G, UAUY R. (2004): Community-based randomized double-blind study of gastrointestinal effects and copper exposure in drinking water. *Environ Health Perspect* 112: 1068-1073.
11. ARNAL N, CRISTALLI DO, DE ALANIZ MJ, MARRA CA. (2010): Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res* 1319: 118-130.
12. ARREDONDO M, NUNEZ MT. (2005): Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med* 26: 313-327.
13. ASTER RH, BOUGIE DW. (2007): Drug-Induced Immune Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 357: 580-587.
14. AUCLAIR C, VOISIN E. (1985): Nitroblue tetrazolium reduction. In: GREENWALD RA, ed. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press, pp. 123-132.
15. BALLATORI N.(1994): Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv Pharmacol* 27: 271-298.

16. BASTA G, SCHMIDT AM, DE CATERINA R. (2004): Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 63(4): 582-592.
17. BATAINEH H, AL-HAMOOD MH, ELBETIEHA AM. (1998): Assessment of aggression, sexual behavior and fertility in adult male rat following long-term ingestion of four industrial metals salts. *Hum Exp Toxicol* 17(10): 570-576.
18. BATRA P, SHARMA AK. (2013): Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech* 3(6): 439-459.
19. BEECHER GR. (2003): Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 133(10): 3248S-3254S.
20. BENDICH A, MACHLIN LJ, SCANDURRA O, BURTON GW, WAYNER DDM. (1986): The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radical Biol Med* 2(2): 419-444.
21. BENITO S, LOPEZ D, SÁIZ MP, BUXADERAS S, SÁNCHEZ J, PUIG-PARELLADA P, MITJAVILA MT. (2002): A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol* 135(4): 910-916.
22. BENOVA LC, BENCHEV IC, MONOVICH OH. (1990): Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem Biol Interactions* 76: 321-332.
23. BENZI G, PASTORIS O, MARZATICO F, VILLA RF. (1988): Influence of aging and drug treatment on the cerebral glutathione system. *Neurobiol Aging* 9: 371-375.
24. BEUTLER, E. (1975a): Reduced glutathione (GSH). In: BEUTLER E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune and Stratton, pp. 112-114.
25. BEUTLER E. (1975b): Oxidized glutathione (GSSG). In: BEUTLER E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune and Stratton, pp. 115-117.
26. BEUTLER E. (1982): Catalase. In: BEUTLER E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune and Stratton, pp. 105-106.
27. BINGLE CD, SRAI SK, EPSTEIN O. (1992): Copper metabolism in hypercupremic human livers. Studies of its subcellular distribution, association with binding proteins and expression of mRNAs. *J Hepatol* 15(1-2): 94-101.
28. BOADI WY, IYERE PA, ADUNYAH SE. (2003): Effect of quercetin and genistein on copper- and iron-induced lipid peroxidation in methyl linolenate. *J Appl Toxicol* 23(5): 363-369.
29. BØHN SK, WARD NC, HODGSON JM, CROFT KD. (2012): Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. *Food Funct* 3: 575-591.
30. BORS W, HELLER W, MICHEL C, SARAN M. (1990): Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186: 343-355.
31. BOYDEN R, POTTER V R, ELVEHJEM C A. (1938): Effect of Feeding High Levels of Copper to Albino Rats. *J Nutr* 15(4): 397-402.

32. BOZYNSKI CC, EVANS TJ, KIM DY, JOHNSON GC, HUGHES-HANKS JM, MITCHELL WJ, et al. (2009): Copper toxicosis with hemolysis and hemoglobinuric nephrosis in three adult Boer goats. *J Vet Diagn Invest* 21: 395-400.
33. BRAGA F, SZÓKE D, VALENTE C, PANTEGHINI M. (2013): Biologic variation of copper, ceruloplasmin and copper/ceruloplasmin ratio (Cu:Cp) in serum. *Clin Chim Acta* 415: 295-296.
34. BREINHOLT VM, OFFORD EA, BROUWER C, NIELSEN SE, BRØSEN K, FRIEDBERG T. (2002): In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem Toxicol* 40(5): 609-616.
35. BREMNER I. (1987): Involvement of Metallothionein in the Hepatic Metabolism of Copper. *J Nutr* 117: 19-29.
36. BREMNER I. (1998): Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* 67(5): 1069S-1073S.
37. BREWER GJ. (1995): Practical recommendations and new therapies for Wilson's disease. *Drugs* 50(2): 240-249.
38. BREWER GJ. (2000): Is heterozygosity for a Wilson's disease gene defect and important underlying cause of infantile and childhood copper toxicosis syndromes? *J Trace Elem Exp Med* 13: 249-254.
39. BRIGELIUS-FLOHÉ R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27: 951-965.
40. BUETTNER GR, JURKIEWICZ BA. (1996): Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 145: 532-541.
41. BURKITT MJ. (2001): A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 394(1): 117-135.
42. CADENAS E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 58: 79-110.
43. CAI Q, RAHNH R, ZHANGA R. (1997): Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett* 19: 99-107.
44. CAPPELLINI MD, FIORELLI G. (2008): Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371(9606): 64-74.
45. CARTAÑÀ J, ROMEU A, AROLA L. (1992): Effects of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*). *Comp Biochem Physiol C*. 101(2): 209-213.
46. CATALÁ A. (2006): An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1482-1495.
47. CHEN DB, FENG L, LIN XP, ZHANG W, LI FR, LIANG XL, LI XH. (2012): Penicillamine Increases Free Copper and Enhances Oxidative Stress in the Brain of Toxic Milk Mice. *PLoS ONE* 7(5): e37709.

48. CHEUNG DY, KIM JI, PARK S, KIM JK. (2014): Proanthocyanidin from Grape Seed Extracts Protects Indomethacin-Induced Small Intestinal Mucosal Injury. *Gastroenterol Res Pract* vol. 2014, Article ID 618068, 8 pages, doi:10.1155/2014/618068.
49. CHIRULESCU Z, SUCIU A, TĂNĂSESCU C, PÎRVULESCU R. (1990): Possible correlation between the zinc and copper concentrations involved in the pathogenesis of various forms of anemia. *Med Intern* 28: 31-35.
50. CHOUHAN S, YADAV A, KUSHWAH P, KAUL RK, FLORA SJS. (2011): Silymarin and quercetin abrogates fluoride induced oxidative stress and toxic effects in rats. *Mol Cell Toxicol* 7: 25-32.
51. CHOY E, PANAYI G. (1999): Mechanisms of action of second-line agents and choice of drugs in combination therapy. *Clin Exp Rheumatol* 17 (18): S20-S28.
52. CIZEWSKI CULOTTA V, GITLIN JD. (2001): Disorders of copper metabolism. In: SCRIVER CR, BEAUDETT AI, et al., editors. *Metabolic and molecular bases of inherited disorders*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, pp. 3105-3126.
53. CLEMENS MR, WALLER HD. (1987): Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 45: 251-268.
54. CLOPTON DA, SALTMAN P. (1997): Copper-specific damage in human erythrocytes exposed to oxidative stress. *Biol Trace Elem Res* 56: 231-240.
55. COHEN AM, TEITELBAUM A, MILLER E, BEN-TOR V, HIRT R, FIELDS M. (1982): Effect of copper on carbohydrate metabolism in rats. *Isr J Med Sci* 18(8): 840-844.
56. COPPER IN DRINKING WATER. (2000): Committee on Copper in Drinking Water, National Research Council. pp 162. ISBN 0-309-59406-5.
57. COTGREAVE IA, MOLDEUS P, ORRENIUS S. (1988): Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 28: 189-212.
58. CRAWFORD MA, SCHALL WD, JENSEN RK, TASKER JB. (1985): Chronic Active Hepatitis in 26 Doberman Pinschers. *J Am Vet Med Assoc* 187 (12): 1343-1349.
59. CUPERUS RA, HOOGLAND H, WEVER R, MUIJSERS AO. (1987): The effect of D-penicillamine on myeloperoxidase: formation of compound III and inhibition of the chlorinating activity. *Biochim Biophys Acta* 912(1): 124-131.
60. CUSHNIE TPT, LAMB AJ. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26: 343-356.
61. D'ARCHIVIO M, FILESI C, Di BENEDETTO R, GARGIULO R, GIOVANNINI C, MASELLA R. (2007): Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* 43(4): 348-361.
62. DARGEL R. (1991): Lipid peroxidation—a common pathogenic mechanism? *Exp Toxicol Pathol* 44: 169-181.
63. DAY AJ, GEE JM, DuPONT MS, JOHNSON IT, WILLIAMSON G. (2003): Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol* 65(7): 1199-1206.



- 
64. De COURSEY TE, LIGETI E. (2005): Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life* 62: 2173-2193.
  65. DEJAM A, HUNTER CJ, PELLETIER MM, HSU LL, MACHADO RF, SHIVA S, POWER GG, KELM M, GLADWIN MT, SCHECHTER AN. (2005). Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 106: 734-739.
  66. DESCHNER EE, RUPERTO J, WONG G, NEWMARK HL. (1991): Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 12(7): 1193-1196.
  67. DIETRICH-MUSZALSKA A, KONTEK B, OLAS B, RABE-JABŁOŃSKA J. (2012): Epicatechin inhibits human plasma lipid peroxidation caused by haloperidol in vitro. *Neurochem Res* 37(3): 557-562.
  68. DILLARD CJ, TAPPEL AL. (1984): Lipid peroxidation and copper toxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 7: 477-487.
  69. DOGAN P, TANRIKULU G, SOYUER U, KOSE K. (1994): Oxidative enzymes of polymorphonuclear leukocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behcet's disease. *Clin Biochem* 27: 413-418.
  70. DONNELLY S, LEVISON DA, DOYLE DV. (1993): Systemic lupus erythematosus-like syndrome with focal proliferative glomerulonephritis during D-penicillamine therapy. *Br J Rheumatol* 32(3): 251-253.
  71. DONOVAN JL, BELL JR, KASIM KS, GERMAN JB, WALZEM RL, HANSEN RJ, WATERHOUSE AL. (1999): Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 129: 1662-1668.
  72. DRABKIN D, AUSTIN H. (1935): Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *J Biol Chem* 112: 51-55.
  73. DRÖGE W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
  74. DROSOS AA, CHRISTOU L, GALANOPOULOU V, TZIOUFAS AG, TSIAKOU EK. (1993): D-penicillamine induced myasthenia gravis: clinical, serological and genetic findings. *Clin Exp Rheumatol* 11(4): 387-391.
  75. DUARTE J, GALISTEO M, OCETE MA, PÉREZ-VIZCAINO F, ZARZUELO A, TAMARGO J. (2001): Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 221(1-2): 155-160.
  76. DUFOUR C, LOONIS M, DANGLES O. (2007): Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic Biol Med* 43: 241-252.
  77. EAGON PK, TEEPE AG, ELM MS, TADIC SD, EPLEY MJ, BEILER BE, SHINOZUKA H, RAO KN. (1999): Hepatic hyperplasia and cancer in rats: alterations in copper metabolism. *Carcinogenesis* 20 (6): 1091-1096.
  78. EASL. European Association for Study of Liver. (2012): Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 56: 671-685.

- 
79. ETENG MU, IBEKWE HA, ESSIEN AD, ONEAMA HP. (2008): Effects of *Catharanthus roseus* on Electrolyte Derangement induced by Chlopropamide (Diabinese)R on Normoglycemic Albino Wistar Rat. *Bio Res* 6(2): 364-366.
  80. EVANS GW, MAJORS PF, CORNATZER WE. (1970): Ascorbic acid interaction with metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun* 41: 1244-1247.
  81. EVANS GW. (1973). Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol Rev* 53: 535-570.
  82. FALCONE FERREYRA ML, RIUS SP, CASATI P. (2012): Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 3: 222-237.
  83. FERENCI P. (2004): Pathophysiology and Clinical Features of Wilson Disease. *Metab Brain Dis* 19(3-4): 229-239.
  84. FERNANDES A, MIRA ML, AZEVEDO MS, MANSO C. (1988): Mechanisms of hemolysis induced by copper. *Free Radic Res Commun* 4(5): 291-298.
  85. FERNS GA, LAMB DJ, TAYLOR T. (1997): The possible role of copper in atherogenesis: The Blue Janus. *Atherosclerosis* 133: 139-152.
  86. FILIPE P, LANÇ V, SILVA JN, MORLIÈRE P, SANTUS R, FERNANDES A. (2001): Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 221(1-2): 79-87.
  87. FISHEL B, TISHLER M, CASPI D, YARON M. (1989): Fatal aplastic anaemia and liver toxicity caused by D-penicillamine treatment of rheumatoid arthritis. *Ann rheum dis* 48 (7): 609-610.
  88. FORMAN HJ, ZHANG H, RINNA A. (2009): Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 1-12.
  89. FRIDOVICH I. (1975): Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44: 147-159.
  90. FUENTEALBA IC, MULLINS JE, ABURTO EM, LAU JC, CHERIAN GM. (2000): Effect of age and sex on liver damage due to excess dietary copper in Fischer 344 rats. *J Toxicol Clin Toxicol* 38(7): 709-717.
  91. FUENTEALBA C, ABURTO EM. (2003): Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology* 2, 5.
  92. GAETKE LM, CHOW CK. (2003): Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147-163.
  93. GALHARDI CM, DINIZ YS, FAINE LA, RODRIGUES HG, BURNEIKO RC, RIBAS BO, NOVELLI EL. (2004): Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food Chem Toxicol* 42(12): 2053-2060.
  94. GALLEANO M, PECHANOVA O, FRAGA CG. (2010): Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol* 11 (8): 837-848.
  95. GAMMULLE A, RATNASOORIYA WD, JAYAKODY JRAC, FERNANDO C, KANATIWELA C, UDAGAMA PV. (2012): Thrombocytosis and Anti-inflammatory Properties, and Toxicological Evaluation of *Carica papaya* Mature Leaf Concentrate in a Murine Model. *IJMPPR* 1(2): 21-30.

- 
96. GARCÍA-SAURA MF, GALISTEO M, VILLAR IC, BERMEJO A, ZARZUELO A, VARGAS F, DUARTE J. (2005): Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem* 270(1-2): 147-155.
  97. GEORGE LW, CARLSON GP. (2002): Copper toxicosis. In: SMITH BP ed. Large animal internal medicine, 3rd ed. Mosby, St. Louis, MO, pp. 1061-1062.
  98. GEORGE J, CHANDRAKASAN G. (1997): Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Dimethylnitrosamine - Induced Hepatic Fibrosis in Rats. *J Clin Biochem Nutr* 22: 51-62.
  99. GIBSON RS. (2005): Assessment of chromium, copper and zinc status, In: Principles of Nutritional Assessment 2nd ed. New York: Oxford University Press Inc., pp. 700-710.
  100. GIPP WF, POND WG, KALLFELZ FA, TASKER JB, VAN CAMPEN DR, KROOK L, VISEK WJ. (1974): Effect of dietary copper, iron and ascorbic acid levels on hematology, blood and tissue copper, iron and zinc concentrations and <sup>64</sup>Cu and <sup>59</sup>Fe metabolism in young pigs. *J Nutr* 104(5): 532-541.
  101. GLATZLE D, VULLIEMUIER JP, WEBER F, DECKER K. (1974): Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 665-668.
  102. GOLDSTEIN IM, KAPLAN HB, EDELSON HS, WEISSMANN G. (1982): Ceruloplasmin: An acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals. *Ann N Y Acad Sci* 389: 368-379.
  103. GOODMAN VL, BREWER GJ, MERAJVER SD. (2004): Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer* 11(2): 255-263.
  104. GRAF BA, AMEHO C, DOLNIKOWSKI GG, MILBURY PE, CHEN CY, BLUMBERG JB. (2006): Rat Gastrointestinal Tissues Metabolize Quercetin. *J Nutr* 136 (1) 39-44.
  105. GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. (1982): Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
  106. GRIFFITH OW. (1999): Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27: 922-935.
  107. GUNSHIN H, MACKENZIE B, BERGER UV, GUNSHIN Y, ROMERO MF, BORON WF, NUSSBERGER S, GOLLAN JL, HEDIGER MA. (1997): Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388(6641): 482-488.
  108. HABIG WH, PUBST MJ, JAKOBY WB. (1974): Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
  109. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. (2007): Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC, eds. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press, pp. 1-29.
  110. HANDEL ML, WATTS CK, SIVERTSEN S, DAY RO, SUTHERLAND RL. (1996): D-penicillamine causes free radical-dependent inactivation of activator protein-1 DNA binding. *Mol Pharmacol* 50(3): 501-505.

- 
111. HANDY DE, LUBOS E, YANG Y, GALBRAITH JD, KELLY N, ZHANG YY, LEOPOLD JA, LOSCALZO J. (2009): Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J Biol Chem* 284(18): 11913-11921.
  112. HANDY RD. (2003): Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 135: 25-38.
  113. HARRIS ED. (2004): A Requirement for Copper in Angiogenesis. *Nutr Rev* 62(2): 60-64.
  114. HARRIS ZL, GITLIN JD. (1996): Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am J Clin Nutr* 63: S836-S841.
  115. HARRIS ZL, DURLEY AP, MAN TK, GITLIN JD. (1999): Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 10812-10817.
  116. HEIM KE, TAGLIAFERRO AR, BOBILYA DJ. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13(10): 572-584.
  117. HEISS C, KELM M. (2010): Chocolate consumption, blood pressure, and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 31, 1554-1556.
  118. HELLMAN NE, GITLIN JD. (2002): Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 22: 439-458.
  119. HERNÁNDEZ I, ALEGRE L, VAN BREUSEGEM F, MUNNÉ-BOSCH S. (2009): How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends Plant Sci* 14: 125-132.
  120. HIRANO T, OKA K, AKIBA M. (1989): Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Aspects of the structure-activity relationship and action mechanism. *Life Sci* 45 (12): 1111-1117.
  121. HOLLMAN PCH. (2004): Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharm Biol* 42: 74-83.
  122. HORN D, BARRIENTOS A. (2008): Mitochondrial Copper Metabolism and Delivery to Cytochrome c Oxidase. *IUBMB Life* 60(7): 421-429.
  123. HSIEH CL, PENG CC, CHEN KC, PENG RY. (2013): Rutin (quercetin rutinoside) induced protein-energy malnutrition in chronic kidney disease, but quercetin acted beneficially. *J Agric Food Chem* 61(30): 7258-7267.
  124. HUDECOVÁ A, GINTER E. (1992): The influence of ascorbic acid on lipid peroxidation in guinea pigs intoxicated with cadmium. *Food Chem Toxicol* 30(12):1011-1013.
  125. HUMANN-ZIEHANK E, BICKHARDT K. (2001): Effects of D-penicillamine on urinary copper excretion in high-copper supplemented sheep. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48(9): 537-544.

126. ICIEK M, POLAK M, WŁODEK L. (2000): Effect of thiol drugs on the oxidative hemolysis in human erythrocytes. *Acta Pol Pharm* 57(6): 449-454.
127. IGNARRO LJ, FUKUTO JM, GRISCAVAGE JM, ROGERS NE, BYRNS RE. (1993): Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(17): 8103-8107.
128. IKEDA I, IMASATO Y, SASAKI E, NAKAYAMA M, NAGAO H, TAKEO T, YAYABE F, SUGANO M. (1992): Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta* 1127: 141-146.
129. ISHISAKA A, ICHIKAWA S, SAKAKIBARA H, PISKULA MK, NAKAMURA T, KATO Y, et al. (2011): Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Bio Med* 51: 1329-1336.
130. ISHIZAWA K, YOSHIZUMI M, KAWAI Y, TERAJO J, KIHIRA Y, IKEDA Y, TOMITA S, MINAKUCHI K, TSUCHIYA K, TAMAKI T. (2011): Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. *J Pharmacol Sci* 115(4): 466-470.
131. ISKRA M, MAJEWSKI W. (2000): Copper and zinc concentrations and the activities of ceruloplasmin and superoxide dismutase in atherosclerosis obliterans. *Biol Trace Elem Res* 73(1): 55-65.
132. JAVORKOVÁ V, PECHÁNOVÁ O, ANDRIANTSITOHAINA R, VRBJAR N. (2003): Effect of polyphenolic compounds on the renal  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase during the restoration of normotension after experimentally induced hypertension in rats. *Exp Physiol* 88(4): 475-482.
133. JOSHI MS, FERGUSON TB JR, HAN TH, HYDUKE DR, LIAO JC, RASSAF T, BRYAN N, FEELISCH M, LANCASTER JR Jr. (2002): Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10341-10346.
134. KADIISKA MB, HANNA PM, JORDAN SJ, MASON RP. (1993): Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper treated Vitamin E- and Selenium-deficient rats: in vivo spin-trapping investigation. *Mol Pharmacol* 44: 222-227.
135. KAGAN HM, LI W. (2003): Lysyl Oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88(4): 660-672.
136. KAMINIWA J, HONDA K, KUROSU A, NISHI T, SUGANO Y, YANO S. (2013): Application of trace element measurement for diagnosis of metabolic disorders. *Rom J Leg Med* 21: 259-262.
137. KANG, KW, PARK EY, KIM SG. (2003): Activation of CCAAT/enhancer-binding protein beta by 20-amino-30-methoxyflavone. (PD98059): leads to the induction of glutathione S- transferase A2. *Carcinogenesis* 24: 475-82.
138. KARAMAĆ M. (2009): Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts. *Int J Mol Sci* 10: 5485-5497.

- 
139. KARMAKER S, SAHA TK, SAKURAI H. (2007): Investigation of a CuII-poly ( $\gamma$ -glutamic acid) complex in aqueous solution and its insulin-mimetic activity. *Macromol Biosci* 7: 456-466.
140. KAUL TN, MIDDLETON E Jr, OGRA PL. (1985): Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 15(1): 71-79.
141. KAWAI M, HIRANO T, HIGA S, ARIMITSU J, MARUTA M, KUWAHARA Y, OHKAWARA T, HAGIHARA K, YAMADORI T, SHIMA Y, OGATA A, KAWASE I, TANAKA T. (2007): Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol Int* 56(2): 113-123.
142. KAZI TG, AFRIDI HI, KAZI N, JAMALI MK, ARAIN MB, JALBANI N, KANDHRO GA. (2008): Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol Trace Elem Res* 122(1): 1-18.
143. KĘDZIERSKA K, BOBER J, CIECHANOWSKI K, GOŁEMBIEWSKA E, KWIATKOWSKA E, NOCEN I, DUTKIEWICZ G, CHLUBEK D. (2005): Trace elements modify the activity of sodium transporting systems in erythrocyte membrane in patients with essential hypertension—preliminary study. *Nephrol Dial Transplant* 20(2): 469-471.
144. KEHOE CA, FAUGHNAN MS, GILMORE WS, COULTER JS, HOWARD AN, STRAIN JJ. (2000): Plasma diamine oxidase activity is greater in copper-adequate than copper-marginal or copper-deficient rats. *J Nutr* 130(1): 30-33.
145. KIANOUSH S, BALALI-MOOD M, MOUSAVI SR, MORADI V, SADEGHI M, DADPOUR M, RAJABI O, SHAKERI MT. (2012): Comparison of Therapeutic Effects of Garlic and D-Penicillamine in Patients with Chronic Occupational Lead Poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110: 476-481.
146. KIMATA M, SHICHIJO M, MIURA T, SERIZAWA I, INAGAKI N, NAGAI H. (2000): Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy* 30: 501-508.
147. KLOTZ LO, SIES H. (2003): Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol Lett* 140: 125-132.
148. KODAMA H, FUJISAWA C. (2009): Copper metabolism and inherited copper transport disorders: molecular mechanisms, screening, and treatment. *Metallomics* 1: 42-52.
149. KORNER A, PAWELEK J. (1982): Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217 (4565), pp. 1163-1165.
150. KOSTIĆ MM, OGNJANOVIĆ B, DIMITRIJEVIĆ S, ŽIKIĆ RV, ŠTAJN A, ROSIĆ GL, ŽIVKOVIĆ RV. (1993). Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur J Haematol* 51: 86-92.
151. KOTTRA G, DANIEL H. (2007): Flavonoid Glycosides Are Not Transported by the Human Na<sup>+</sup>/Glucose Transporter When Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes, but Effectively Inhibit Electrogenic Glucose Uptake. *JPET* 322(2): 829-835.
-

- 
152. KRSTIĆ D, KRINULOVIĆ K, VASIĆ V. (2005): Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase and Mg<sup>(2+)</sup>-ATPase by metal ions and prevention and recovery of inhibited activities by chelators. *J Enzyme Inhib Med Chem* 5: 469-476.
  153. KUMAR A, SHARMA CB. (1987): Hematological indices in copper-poisoned rats. *Toxicol Lett* 38(3): 275-278.
  154. KUMAR V, DOOLEY DM, FREEMAN HC, GUSS JM, HARVEY I, McGUIRL MA, WILCE MC, ZUBAK VM. (1996): Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* 4(8): 943-955.
  155. KUTIL Z, TEMML V, MAGHRADZE D, PRIBYLOVA M, DVORAKOVA M, SCHUSTER D, VANEK T, LANDA P. (2014): Impact of Wines and Wine Constituents on Cyclooxygenase-1, Cyclooxygenase-2, and 5-Lipoxygenase Catalytic Activity. *Mediators Inflamm* 2014:178931. doi: 10.1155/2014/178931.
  156. LADURNER A, SCHMITT CA, SCHRACHNER D, ATANASOV AG, WERNER ER, DRISCH VM, HEISS EH. (2012): Ascorbate stimulates endothelial nitric oxide synthase enzyme activity by rapid modulation of its phosphorylation status. *Free Radic Biol Med* 52: 2082-2090.
  157. LARSON AJ, SYMONS JD, JALILI T. (2012): Therapeutic Potential of Quercetin to Decrease Blood Pressure: Review of Efficacy and Mechanisms. *Adv Nutr* 3: 39-46.
  158. LEONE N, COURBON D, DUCIMETIERE P, ZUREIK M. (2006): Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 17(3): 308-314.
  159. LETELIER ME, LEPE AM, FAUNDEZ M, SALAZAR J, MARIN R, ARACENA P, SPEISKI H. (2005) Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact* 151: 71-82.
  160. LIAO JC, HEIN TW, VAUGHN MW, HUANG K, KUO L. (1999): Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8757-8761.
  161. LIAPIS K, CHARITAKI E, DELIMPASI S. (2011): Hemolysis in Wilson's disease. *Ann Hematol* 90: 477-478.
  162. LIEN EJ, REN S, BUI HH, WANG R. (1999): Quantitative structure activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* 26: 285-294.
  163. LINDER MC. (1991): Biochemistry of copper. In: Biochemistry of the Elements series. (ed.) FRIEDEN E, Elsevier, New York, pp. 43-52.
  164. LINDER MC, HAZEGH-AZAM M. (1996): Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63(5): 797S-811S.
  165. LOKE WM, HODGSON JM, PROUDFOOT JM, MCKINLEY AJ, PUDDEY IB, CROFT KD. (2008): Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr* 88(4): 1018-1025.

- 
166. LOTITO SB, FRAGA CG. (1998): (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic Biol Med* 24 (3): 435-41.
167. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-272.
168. LU C, KOPPENOL WH. (2005): Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide. *J Biol Inorg Chem* 10(7): 732-738.
169. MANACH C, TEXIER O, MORAND C, CRESPIY V, REGERAT F, DEMIGNE C, REMESY C. (1999): Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Rad Biol Med* 27: 1259-1266.
170. MANTHEY JA. (2000): Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* 7: 29-34.
171. MANTLE TJ, McCUSKER FM, PHILLIPS M, BOYCE S. (1990): Glutathione S-transferases. *J Biochem Soc Trans* 18(2): 175-177.
172. MARAL J, PUGET K, MICHELSON AM. (1977): Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 77: 1525-1535.
173. MARKLUND S, MARKLUND G. (1974): Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a constituent assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-479.
174. MARTÍN MA, SERRANO AB, RAMOS S, PULIDO MI, BRAVO L, GOYA L. (2010): Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 21(3): 196-205.
175. MARTÍNEZ V, UGARTONDO V, VINARDELL MP, TORRES JL, MITJANS M. (2012): Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *J Agric Food Chem* 60(16): 4090-4095.
176. MASSIE HR, OFOSU-APPIAH W, AIELLO VR. (1993): Elevated serum copper is associated with reduced immune response in aging mice. *Gerontology* 37: 136-145.
177. MATÉS JM. (2000): Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104.
178. MATOUK AI, TAYE A, HEEBA GH, EL-MOSELHY MA. (2013): Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 36(2): 443-450.
179. MAY JM, MENDIRATTA S, HILL KE, BURK RF. (1997): Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 272(36): 22607-22610.
180. McCORD JM, FRIDOVICH I. (1969): Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoprotein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
181. MEHTA SW, EIKUM R. (1989): Effect of estrogen on serum and tissue levels of copper and zinc. *Adv Exp Med Biol* 258: 155-162.
-



- 
182. MEISTER A. (1992): Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *J Nutrit Sci Vitaminol Spec No*: 1-6.
183. MIDDLETON E Jr, KANDASWAMI C, THEOHARIDES TC. (2000): The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751.
184. MILNE DB, NIELSEN FH. (1996): Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 63(3): 358-364.
185. MILTON PS, MUTHUMANI M, SHAGIRTHA K. (2013): Quercetin potentially attenuates cadmium induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17(5): 582-595.
186. MINERVINO AH, BARRÊTO JÚNIOR RA, QUEIROZ GF, HEADLEY SA, ORTOLANI EL. (2008): Predictive values of aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transferase for the hepatic accumulation of copper in cattle and buffalo. *J Vet Diagn Invest* 20(6): 791-795.
187. MIR MM, DAR NA, SALAM I, MALIK MA, LONE MM, YATOO GN, AHMAD A, SHAH A. (2007): Studies on Association Between Copper Excess, Zinc Deficiency and TP53 Mutations in Esophageal Squamous Cell Carcinoma From Kashmir Valley, India-A High Risk Area. *Int J Health Sci (Qassim)* 1(1): 35-42.
188. MIRA L, FERNANDEZ MT, SANTOS M, ROCHA R, FLORÊNCIO MH, JENNINGS KR. (2002): Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 36(11): 1199-1208.
189. MISHRA D, FLORA SJS. (2008): Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic induced oxidative stress in mouse. *Biol Trace Elem Res* 122:137-147.
190. MISHRA N, RIZVI SI. (2012): Quercetin modulates Na(+)/K(+) ATPase and sodium hydrogen exchanger in type 2 diabetic erythrocytes. *Cell Mol Biol* 58(1): 148-152.
191. MOMTAZ M, MUGHAL N, SIDDIQUE A, MAHBOOB T. (2000): Changes in blood levels of trace elements and electrolytes in hypertensive patients. *MJIRJ* 14(2): 115-118.
192. MONTES S, RIVERA-MANCIA S, DIAZ-RUIZ A, TRISTAN-LOPEZ L, RIOS C. (2014): Copper and copper proteins in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2014:147251. doi: 10.1155/2014/147251.
193. MOON YJ, WANG X, MORRIS ME. (2006): Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20: 187-210.
194. MOORE GS, CALABRESE EJ. (1980): G6PD-deficiency: a potential high-risk group to copper and chlorite ingestion. *J Environ Pathol Toxicol* 4(2-3): 271-279.
195. MORIDANI MY, SCOBIE H, SALEHI P, O'BRIEN PJ. (2001): Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450. *Chem Res Toxicol* 14 (7): 841-848.
196. MORIDANI MY, POURAHMAD J, BUI H, SIRAKI A, O'BRIEN PJ. (2003): Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 34: 243-253.
-

- 
197. MORIN CL, ALLEN KGD, MATHIAS M. (1993): Thromboxane production in copper-deficient and marginal platelets: influence of Superoxide dismutase and lipid hydroperoxides. *Proc Soc Exp Biol Med* 202: 167-173.
198. MOSKAUG JO, CARLSEN H, MYHRSTAD MC, BLOMHOFF R. (2005): Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81: 277S-283S.
199. MUTHUKUMARAN S, SUDHEER AR, MENON VP, NALINI N. (2008): Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats. *Toxicology* 243: 207-215.
200. MYSTKOWSKI EM. (1942): The Oxidation of Ascorbic Acid in the Presence of Copper. *Biochem J* 36: 494.
201. NAGARAJAN S, NAGARAJAN R, BRAUNHUT SJ, FERDINANDO BRUNO F, MCINTOSH D, SAMUELSON L, KUMAR J. (2008): Biocatalytically Oligomerized Epicatechin with Potent and Specific Anti-proliferative Activity for Human Breast Cancer Cells. *Molecules* 13(11): 2704-2716.
202. NAGATA H, TAKEKOSHI S, TAKAGI T, HONMA T, WATANABE K. (1999): Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med* 24(1): 1-11.
203. NAKAYAMA T, YAMADA M, OSAWA T, KAWAKISHI S. (1993): Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 45: 265-267.
204. NEKOHASHI M, OGAWA M, OGIHARA T, NAKAZAWA K, KATO H, MISAKA T, ABE K, KOBAYASHI S. (2014): Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann-pick c1-like 1 in caco-2 cells and rats. *PLoS One* 9(5):e97901.
205. NIJVELDT RJ, van NOOD E, van HOORN DEC, BOELENS PG, van NORREN K, van LEEUWEN PAM. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74 (4): 418-425.
206. NIKOLIĆ R, KRSTIĆ N, JOVANOVIĆ J, KOCIĆ G, CVETKOVIĆ TP, RADOSAVLJEVIĆ-STEVENOVIĆ N. (2013): Monitoring the toxic effects of Pb, Cd and Cu on hematological parameters of Wistar rats and potential protective role of lipoic acid and glutathione. *Toxicol Ind Health* Published online January, 4, 2013, DOI: 10.1177/0748233712469652.
207. NUTRIENT DATA, LABORATORY, USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.0. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, USDA. 2011.
208. OGNJANOVIĆ BI, PAVLOVIĆ SZ, MALETIĆ SD, ŽIKIĆ RV, ŠTAJN AŠ, RADOJIČIĆ RM, SAIČIĆ ZS, PETROVIĆ VM. (2003): Protective influence of vitamin E an antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiol Res* 52: 563-570.
209. OHARA K, WAKABAYASHI H, TANIGUCHI Y, SHINDO K, YAJIMA H, YOSHIDA A. (2013): Quercetin-3-O-glucuronide induces ABCA1 expression by LXRA activation in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 441(4): 929-934.
-

- 
210. OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
  211. OLIVARES M, UAUY R. (1996): Copper as an essential nutrient. *Am J Clin Nutr* 63: 791S-796S.
  212. OLIVARES M, PIZARRO F, SPEISKY H, LÖNNERDAL B, UAUY R. (1998): Copper in infant nutrition: Safety of World Health Organization provisional guideline value for copper content of drinking water. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 26 (3): 251-257.
  213. OMAYE ST, TURNBULL JD, SAUBERLICH HE. (1979): Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods Enzymol* 62: 3-11.
  214. OOSTHUIZEN, N.M. (2011): Undetectable Serum Alkaline Phosphatase Activity in a Patient with Fulminant Hepatic Failure and Hemolytic Anemia. *Clinical Chemistry* 57(3): 382-387.
  215. ORAM JF, LAWN RM (2001): ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 42: 1173-1179.
  216. OZCELIK D, OZARAS R, GUREL Z, UZUN H, AYDIN S. (2003): Copper-mediated oxidative stress in rat liver. *Biol Trace Elem Res* 96(1-3): 209-215.
  217. PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. (2007): Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87(1): 315-424.
  218. PADH H. (1990): Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 68: 1166-1173.
  219. PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
  220. PALUMAA P, KANGUR L, VORONOVA A, SILLARD R. (2004): Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase. *Biochem J* 382: 307-314.
  221. PARK JB, LEVINE M. (1996): Purification, cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils: identification as glutaredoxin. *Biochem J* 315: 931-938.
  222. PARK YS, SUZUKI K, MUMBY S, TANIGUCHI N, GUTTERIDGE JM. (2000): Antioxidant binding of caeruloplasmin to myeloperoxidase: Myeloperoxidase is inhibited, but oxidase, peroxidase and immunoreactive properties of caeruloplasmin remain intact. *Free Radic Res* 33: 261-265.
  223. PARRIS M, KIDD PD. (1997): Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev* 2: 155-176.
  224. PATEL BN, DUNN RJ, JEONG SY, ZHU Q, JULIEN JP, DAVID S. (2002): Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci* 22: 6578-6586.
  225. PATIL M, SHETH KA, KRISHNAMURTHY AC, DEVARBHAVI H. (2013): A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *J Clin Exp Hepatol* 3(4): 321-336.

- 
226. PAULÍKOVÁ H, BERCZELIOVÁ E. (2005): The effect of quercetin and galangin on glutathione reductase. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149(2): 497-500.
227. PENG B, QIAO CF, ZHAO J, HUANG WH, HU DJ, LIU HG, LI SP. (2013): Simultaneous Determination of Flavonoids, Isochlorogenic Acids and Triterpenoids in *Ilex hainanensis* Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array and Evaporative Light Scattering Detection. *Molecules* 18: 2934-2941.
228. PERCY ME. (1984): Catalase: an old enzyme with a new role? *Can J Biochem Cell Biol* 62(10): 1006-1014.
229. PÉREZ-CANO FJ, MASSOT-CLADERA M, FRANCH A, CASTELLOTE C, CASTELL M. (2013): The effects of cocoa on the immune system. *Front Pharmacol* 4: 71.
230. PERRETT D. (1981): The metabolism and pharmacology of D-penicillamine in man. *J Rheumatol* 8:41.
231. PETERING HG, MURTHY L, O'FLAHERTY. (1977): Influence of dietary copper and zinc on rat lipid metabolism. *J Agric Food Chem* 25: 1105-1109.
232. PETRUŠKA P, KALAFOVÁ A, KOLESÁROVÁ A, ZBYŇOVSKÁ K, LATA CZ A, CAPCAROVÁ M. (2013): Effect of quercetin on haematological parameters of rabbits: a gender comparison. *J microb biotech food sci* 2(1): 1540-1549.
233. PICK E, KEISARI Y. (1980): A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38: 161-170.
234. POCINO M, MALAVÉ I, BAUTE L. (1990): Zinc Administration Restores the Impaired Immune Response Observed in Mice Receiving Excess Copper by Oral Route. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 12(4): 697-713.
235. POURCEL L, ROUTABOUL JM, CHEYNIER V, LEPINIEC L, DEBEAUJON I. (2007): Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci* 2(1): 29-36.
236. PRIOR RL, WU X, GU L. (2006): Flavonoid metabolism and challenges to understanding mechanisms of health effects. *J Sci Food Agric* 86: 2487-2491.
237. PROHASKA JR. (2008): Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr* 88(3): 826S-829S.
238. PRYOR WA, SQUADRITO GL. (1995): The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 268: L699-L722.
239. QUINE SD, RAGHU PS. (2005): Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacol Rep* 57(5): 610-615.
240. RADI R, BECKMAN JS, BUSH KM, FREEMAN BA. (1991): Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481-487.
-

- 
241. RAHELIĆ D, KUJUNDŽIĆ M, ROMIĆ Ž, BRKIĆ K, PETROVEČKI M. (2006): Serum Concentration of Zinc, Copper, Manganese and Magnesium in Patients with Liver Cirrhosis. *Coll Antropol* 3: 523-528.
242. RANA SV, KUMAR A. (1980): Biological haematological and histological observations in copper poisoned rats. *Ind Health* 18(1): 9-17.
243. REEVES PG, DEMARS LC. (2004): Copper deficiency reduces iron absorption and biological half-life in male rats. *J Nutr* 134: 1953-1957.
244. REN W, QIAO Z, WANG H, ZHU L, ZHANG L. (2003): Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Med Res Rev* 23(4): 519-534.
245. RETSKY KL, CHEN K, ZEIND J, FREI B. (1999): Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radic Biol Med* 26(1-2): 90-98.
246. RIBAROV SR, BENOVS LS. (1981): Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 640: 721-726.
247. RICE-EVANS CA, PACKER L. (2003): Flavonoids in Health and Disease. 2nd ed. New York: CRC Press, pp. 568.
248. ROBERTS EA, SCHILSKY ML. (2008): Diagnosis and Treatment of Wilson Disease: An Update. American Association for the Study of Liver Diseases. (AASLD): PRACTICE GUIDELINES. Published online in Wiley InterScience. (www.interscience.wiley.com): DOI 10.1002/hep.22261.
249. ROGERIO AP, KANASHIRO A, FONTANARI C et al. (2007): Antiinflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Res* 56: 402-408.
250. RUSSO AJ. (2010): Decreased serum Cu/Zn SOD Associated with High copper in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *J Cent Nerv Syst Dis* 2: 9-14.
251. SAFAEI R, HOLZER AK, KATANO K, SAMIMI G, HOWELL SB (2004): The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem* 98(10): 1607-1613.
252. SALONEN JT, SALONEN R, KORPELA H, SUNTIONEN S, TUOMILEHTO J. (1991): Serum copper and the risk of acute myocardial infarction: a prospective population study in men in Eastern Finland. *Am J Epidemiol* 134: 268-276.
253. SANSINANEAS AS, CERONE SI, ELPERDING A, AUZA N. (1996): Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from chronically copper-poisoned sheep. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 114(3): 197-200.
254. SATYENDRA SB, NIKHIL S, RAJENDRA SB, PREETI A, SARLESH R. (2012): A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharmaceut Sci* 1(1): 146-160.
-

- 
255. SCALBERT A, MORAND C, MANACH C, RÉMÉSY C. (2002): Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56(6): 276-282.
256. SCANDALIOS JG. (2005): Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014.
257. SCHEINBERG IH, STERNLIEB I. (1996): Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am J Clin Nutr* 63(5): 842S-845S.
258. SCHROETER H, HEISS C, BALZER J, KLEINBONGARD P, KEEN CL, HOLLENBERG NK, et al. (2006): (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(4): 1024-1029.
259. SCOTT G. (1995): Antioxidants the modern elixir? *Chem Britain* 31: 879-882.
260. SELVAKUMAR K, BAVITHRA S, SUGANYA S, BHAT FA, KRISHNAMOORTHY G, ARUNAKARAN J. (2013): Effect of Quercetin on Haematobiochemical and Histological Changes in the Liver of Polychlorinated Biphenyls-Induced Adult Male Wistar Rats. *Journal of Biomarkers* Volume 2013, Article ID 960125, 12 pp.
261. SHARP P. (2004): The molecular basis of copper and iron interactions. *Proc Nutr Soc* 63(4): 563-569.
262. SHIBA Y, KINOSHITA T, CHUMAN H, TAKETANI Y, TAKEDA E, KATO Y, NAITO M, KAWABATA K, ISHISAKA A, TERAOKA J, KAWAI Y. (2008): Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chem Res Toxicol* 21(8):1600-1609.
263. SI H, FU Z, BABU PVA, ZHEN W, LeROITH T, MEANEY MP, VOELKER KA, JIA Z, GRANGE RW, LIU D. (2011): Dietary Epicatechin Promotes Survival of Obese Diabetic Mice and *Drosophila melanogaster*. *J Nutr* 141: 1095-1100.
264. SIES H. (1991): Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants. New York: Academic Press.
265. SIES H, STAHL W, SUNDQUIST R. (1992): Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 669: 7-20.
266. SIKDER K, KESH SB, DAS N, MANNA K, DEY S. (2014): The high antioxidative power of quercetin (aglycone flavonoid) and its glycone (rutin) avert high cholesterol diet induced hepatotoxicity and inflammation in Swiss albino mice. *Food Funct* 5(6): 1294-1303.
267. SIMEL DL, DELONG ER, FEUSSNER JR, WEINBERG JB, CRAWFORD J. (1988): Erythrocyte anisocytosis. Visual inspection of blood films vs automated analysis of red blood cell distribution width. *Arch Intern Med* 148(4): 822-824.
268. SOLI NE, FROSLIE A. (1977): Chronic copper poisoning in sheep. I. The relationship of methaemoglobinaemia to Heinz body formation and haemolysis during the terminal crisis. *Acta Pharmacol Toxicol* 40: 169-177.
-

- 
269. SOLOMONS NW, VITERI FE. (1982): Biological Interaction of Ascorbic Acid and Mineral Nutrients. In: SEIB PA, TOLBERT BM Eds. *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses*. American Chemical Society, pp 551-569.
270. SPEISKY H, LÓPEZ-ALARCÓN C, OLEA-AZAR C, SANDOVAL-ACUÑA C, ALIAGA ME. (2011): Role of Superoxide Anions in the Redox Changes Affecting the Physiologically Occurring Cu(I)-Glutathione Complex. *Bioinorg Chem Appl* 2011, Article ID 674149, 8 pp.
271. STADTMAN ER. (2004): Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 11: 1105-1112.
272. STADTMAN TC. (1961): Alkaline phosphatases. In: BOYER PD, LARDY H, MYRBÄCK K. *The Enzymes* 5. (2nd ed.). New York: Academic Press. pp. 55-71.
273. STERNLIEB I, QUINTANA N, VOLENBERG I, MICHAEL L. SCHILSKY ML. (1995): An array of mitochondrial alterations in the hepatocytes of long-evans cinnamon rats. *Hepatology* 22(6): 1782-1787.
274. STOHS SJ, BAGCHI D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18(2): 321-336.
275. STRAUSAK D, HOWIE MK, FIRTH SD, et al. (2003): Kinetic analysis of the interaction of the copper chaperone Atox1 with the metal binding sites of the Menkes protein. *J Biol Chem* 278(23): 20821-20827.
276. SUGAWARA N, SUGAWARA C. (1987): Relationship between ceruloplasmin and Cu status involving metallothionein induced by several heavy metals in the mouse. *Arch Toxicol* 59 (6): 432-436.
277. SUGIHARA N, OHNISHI M, IMAMURA M, FURUNO K. (2001): Differences in Antioxidative Efficiency of Catechins in Various Metal-Induced Lipid Peroxidations in Cultured Hepatocytes. *J Health Sci* 47(2): 99-106.
278. SUNITA P, JHA S, PATTANAYAK SP. (2012): Bronchodilatory and mast cell stabilising activity of *Cressa cretica* L. Evaluation through in vivo and in vitro experimental models. *Asian Pac J Trop Med* 180-186.
279. SUOLINNA E-M, BUCHSBAUM RN, RACKER E. (1975): The Effect of Flavonoids on Aerobic Glycolysis and Growth of Tumor Cells. *Cancer Res* 35: 1865-1872.
280. SVOBODOVÁ A, PSOTOVÁ J, WALTEROVÁ D. (2003): Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 147(2): 137-145.
281. ŠTAJN AŠ, ŽIKIĆ RV, SAIČIĆ ZS. (2007): Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1-449.
282. TAKADA Y, NOGUCHIT T, KAYIYAMA M. (1982): Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res* 42: 4233-4235.
283. TAKAMURA K, SAKAMOTO M. (1978): Spectrophotometric studies on flavonoid-copper(II) complexes in methanol solution. *Chem Pharm Bull* 26(8): 2291-2297.
-

- 
284. TAMURA M, OSCHINO N, CHANCE B. (1982): Some characteristics of hydrogen and alkyl-hydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *J Biochem* 92: 1019-1031.
285. TAN KCB, AIV VGH, CHOW WS, CHAU MT, LEONG L, LAM KSL. (1999): Influence of low density lipoprotein (LDL) subfraction profile and LDL oxidation on endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type-2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3212-3216.
286. TANABE K, TAMURA Y, LANASPA MA, MIYAZAKI M, SUZUKI N, SATO W, MAESHIMA Y, SCHREINER GF, VILLARREAL FJ, JOHNSON RJ, NAKAGAWA T. (2012): Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 303(9): F1264-74.
287. TANAKA A, KANETO H, MIYATSUKA T, YAMAMOTO K, YOSHIUCHI K, YAMASAKI Y, SHIMOMURA I, MATSUOKA TA, MATSUHISA M. (2009): Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr J* 56(5): 699-706.
288. TANDOĞAN B, ULUSU NN. (2006): Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *FABAD J Pharm Sci* 31: 230-237.
289. TANG LQ, WEI W, WANG XY. (2007): Effects and mechanisms of catechin for adjuvant arthritis in rats. *Adv Ther* 24(3): 679-690.
290. TANKO Y, ISMAIL AS, MOHAMMED KA, EZE ED, JIMOH A, SADA NM, MUHAMMAD A, MOHAMMED A. (2013): Ameliorative Effects of Magnesium and Copper Sulphates on Blood glucose and Serum Electrolytes Levels in Fructose-induced Diabetic Wistar Rats. *JAPS* 3(7): 160-163.
291. TAPIERO H, TOWNSEND DM, TEW KD. (2003): Trace elements in human physiology and pathology. *Copper Biomed Pharmacother* 57: 386-398.
292. TOKYOL C, YILMAZ S, KAHRAMAN A, CAKAR H, POLAT C. (2006): The Effects of Desferrioxamine and Quercetin on Liver Injury Induced by Hepatic Ischaemia-Reperfusion in Rats. *Acta chir Belg* 106: 68-72.
293. TURNLUND JR. (1998): Human whole-body copper metabolism. *Am J Clin Nutr* 67: 960S-964S.
294. TURNLUND JR, JACOB RA, KEEN CL, STRAIN JJ, KELLEY DS, DOMEK JM, KEYES WR, ENSUNSA JL, LYKKESFELDT J, COULTER J. (2004): Long-term high copper intake: effects on indexes of copper status, antioxidant status, and immune function in young men. *Am J Clin Nutr* 79: 1037-1044.
295. UAUY R, OLIVARES M, GONZALEZ M. (1998): Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 67: 952S-959S.
296. URIU-ADAMS JY, KEEN CL. (2005): Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med* 26(4-5): 268-298.
297. UZUN FG, KALENDER Y. (2013): Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. *Food Chem Toxicol* 55: 549-556.
-



- 
298. VAGDATLI E, GOUNARI E, LAZARIDOU E, KATSIBOURLIA E, TSIKOPOULOU F, LABRIANOU I. (2010): Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia* 14(1): 28–32.
299. VAIDYANATHAN JB, WALLE T. (2003): Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-) epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 307(2): 745-752.
300. VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
301. VERMA AK, JOHNSON JA, GOULD MN, TANNER MA. (1988): Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res* 48(20): 5754-5758.
302. VIDELA LA, FERNANDEZ V, TAPIA G, VARELA P. (2003): Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: Role of Kupffer cells. *BioMetals* 16: 103-111.
303. VILLAR D, CARSON TL, JANKE BH, PALLARÉS FJ, FERNÁNDEZ G, KINKER JA. (2002): Retrospective study of chronic copper poisoning in sheep. *An Vet (MURCIA)* 18: 53-60.
304. VINA J, BORRAS C, GAMBINI J, SASTRE J, PALLARDO FV. (2005): Why females longer than males? Importance of the upregulation of longevity associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS lett* 579: 2541-2545.
305. VISTOLI G, DE MADDIS D, CIPAK A, ZARKOVIC N, CARINI M, ALDINI G. (2013): Advanced glycoxidation and lipoxidation end products. (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 47(12): Suppl 1: 3-27.
306. VULPE CD, PACKMAN S. (1995): Cellular copper transport. *Annu Rev Nut* 15: 293-322.
307. WADHWA S, MUMPER RJ. (2013): D-penicillamine and other low molecular weight thiols: Review of anticancer effects and related mechanisms. *Cancer Letters* 337(1): 8-21.
308. WALLE T, BROWNING AM, STEED LL, REED SG, WALLE UK. (2005): Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr* 135(1): 48-52.
309. WALSHE JM. (2012): Serum 'free' copper in Wilson disease. *Q J Med* 105: 419-423.
310. WANG T, GUO Z. (2006): Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem* 13(5): 525-537.
311. WEKSLER BB. (1988): Platelets. In: GALLIN JI, GOLSTEIN IM, SYNDERMAN R. eds. Raven, New York. pp. 543-557.
312. WELLS WW, JUNG CH (1997): Regeneration of vitamin C. In: PACKER L, FUCHS J, eds. Vitamin C in Health and Disease. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 109-122.
-

- 
313. WHO/FAO/IAEA (1996): Trace Elements in Human Nutrition and Health. World Health Organization, Geneva.
314. WHO/SDE/WSH/03.04/88. (2004) Copper in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
315. WIERNSPERGER N, RAPIN JR. (2010): Trace elements in glucometabolic disorders: an update. *Diabetol Metab Syndr* 2(70): 1-9.
316. WILLIAMS RJ, SPENCER JP, RICE-EVANS C. (2004): Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36(7): 838-849.
317. WINGE DR. (1999): Copper-regulatory domain involved in gene expression. In: LEONE A, MERCER JFB, eds. Copper Transport and its Disorders: Molecular and Cellular Aspects. New York: Kluwer Academic Publishers.
318. Wink DA, Michell JB. (1998): Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25: 434-456.
319. WISPÉ JR, WARNER BB, CLARK JC, DEY CR, NEUMAN J, GLASSER SW, CRAPO JD, CHANG LY, WHITSETT JA. (1992): Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem* 267: 23937-23941.
320. YAMANAKA H, HAKODA M, KAMATANI N, KASHIWAZAKI S, CARSON DA. (1993): Formation of DNA strand breaks by D-penicillamine and bucillamine in human lymphocytes. *Immunopharmacol* 26(2): 113-118.
321. ZHANG SS, NOORDIN MM, RAHMAN SO, HARON J. (2000): Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet Hum Toxicol* 42(5): 261-264.
322. ZHAO B. (2009): Natural Antioxidants Protect Neurons in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Neurochem Res* 34(4): 630-638.
323. ZHOU K, YIN JJ, YU LL. (2006): ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chem* 95 (3): 446-457.
324. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1 (December 2013). Презето марта 2014. са адресе: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>.
325. Public Assessment Report for paediatric studies submitted in accordance with Article 45 of Regulation (EC) No1901/2006, as amended. PENICILLAMINE. UK/W/033/pdWS/001. Презето маја 2014. са адресе: [http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human\\_Medicines/CMD\\_h/Paediatric\\_Regulation/Assessment\\_Reports/Article\\_45\\_work-sharing/Penicillamine - Art.45 PublicAR.pdf](http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h/Paediatric_Regulation/Assessment_Reports/Article_45_work-sharing/Penicillamine - Art.45 PublicAR.pdf).

## Биографија аутора



Јелена М. (Тошић) Младеновић, рођена је 22. октобра 1971. године у Нишу. Основну школу и гимназију завршила је у Нишу. Студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, смер Биологија, започела је 1990/1991. године. Дипломирала је 1998. године дипломским радом под називом „Ефекат прогестерона на фреквенцију микронуклеуса у лимфоцитима периферне крви трудница *in vivo*“, са оценом 10 и просечном оценом 8,69 у току студија. На истом факултету уписала је школске 2007/2008. године докторске академске студије Биологије – смер Физиологија животиња и молекуларна биологија.

По завршеним основним студијама радила је у јавном акваријуму "Крагујевац" на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета, у својству истраживача од октобра 1999. године до априла 2007. године. У школској 2007/2008. години радила је у Другој крагујевачкој гимназији као наставник биологије. Од фебруара 2008. године ради на Факултету педагошких наука у Јагодини, Универзитета у Крагујевцу као сарадник у настави, а потом и асистент на предмету Основе природних наука и изборним предметима на основним и мастер студијама.

Учествовала је као сарадник на пројектима Министарства за науку, технологију и развој Републике Србије: *"Ex-situ заштита биодиверзитета акватичних екосистема Србије"*; Министарства за заштиту природних богатстава и животну средину Републике Србије: *"Ex-situ заштита врсте Umbra krameri - вештачки мрест, узгој и реинтродукција"*; Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије: Програма за популаризацију науке *"Подстицање радозналости деце за проучавање природних феномена: од експеримента до софтвера"*; и Програма за промоцију и популаризацију науке *"Амбијентално учење - откривање научних тајни"*.

Експериментални део докторске дисертације урадила је у Лабораторији за експерименталну физиологију, Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, под менторством др Бранке Огњановић, ванредног професора. Бави се научно-истраживачким радом у области Биологија, а посебан аспект њеног истраживања односи се на проучавање оксидативно/антиоксидативног метаболизма. Осим научних радова везаних за тему и област докторске дисертације, публиковани радови односе се и на резултате из уже научне области Методика наставе природних наука. До сада је објавила 19 библиографских јединица: 3 рада у међународним часописима, 2 рада у часописима националног значаја, 6 конгресних саопштења на скуповима међународног значаја и 8 конгресних саопштења на скуповима националног значаја. Укупно има 14 цитата (извор Scopus).

## БИБЛИОГРАФИЈА

### НАУЧНИ ЧАСОПИСИ МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА (M 20)

Branka I. Ognjanović , Nataša Z. Djordjević, Miloš M. Matić, Jasmina M. Obradović, Jelena M. Mladenović, Andraš Š. Štajn, Zorica S. Saičić (2012). Lipid Peroxidative Damage on Cisplatin Exposure and Alterations in Antioxidant Defense System in Rat Kidneys: A Possible Protective Effect of Selenium. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , 13, 2, 1790-1803.	<b>M21</b>
<u>Mladenović Jelena M.</u> Ognjanović Branka I, Djordjević Nataša Z, Matić Miloš M, Knežević Veroljub, Štajn Andraš Š, Saičić Zorica S (2014). Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats. <i>Arh Hig Rada Toksikol.</i> , 65, 1, 37-46.	<b>M23</b>
<u>Jelena M. Mladenović</u> , Milica G. Paunović, Miloš M. Matić, Veroljub S. Knežević, Branka I. Ognjanović, Andraš Š. Štajn and Zorica S. Saičić. (2014). Copper-induced changes of lipid peroxidation and haemato-biochemical parameters in blood of rats: protective role of flavonoids. <i>Archives of Biological Sciences</i> 66, 3, 1271-1279.	<b>M23</b>

### ЗБОРНИЦИ МЕЂУНАРОДНИХ НАУЧНИХ СКУПОВА (M 30)

Milovanović JM, Ognjanović BI, Trbojević IS, <u>Mladenović JM</u> , Djordjević NZ, Marković SD, Štajn AŠ, Saičić ZS. (2009). Cisplatin induced changes in antioxidative defense enzyme activities in the rat kidneys: Protective role of selenium. <i>2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences"</i> , Abstract P98. Kragujevac: Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia.	<b>M34</b>
<u>Mladenović JM</u> , Ognjanović BI, Trbojević IS, Milovanović JM, Djordjević NZ, Marković SD, Štajn AŠ, Saičić ZS. (2009). Protective effect of vitamin C on antioxidant defense system in the liver of rats treated with cisplatin. <i>2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences"</i> , Abstract P99. Kragujevac: Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia.	<b>M34</b>
Trbojević IS, Ognjanović BI, Milovanović JM, <u>Mladenović JM</u> , Djordjević NZ, Marković SD, Štajn AŠ, Saičić ZS. (2009). Role of selenium in ameliorating the cisplatin induced oxidative damage to kidney and liver in rats. <i>2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences"</i> , Abstract P103. Kragujevac: Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia.	<b>M34</b>
Matić MM, Paunović MG, <u>Mladenović JM</u> , Djordjević NZ, Babić GM, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS. Quercetin and vitamin C protects nicotine-induced oxidative stress in erythrocytes of rats. <i>3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation „Molecular, cellular and integrative basis of health and disease: Transdisciplinary approach“</i> . Abstract 139. Military Medical Academy, October 29-31, 2014. Belgrade, Serbia.	<b>M34</b>

<u>Mladenović JM</u> , Ognjanović BI, Matić MM, Paunović MG, Štajn AŠ, Saičić ZS. The protective effects of Quercetin and (-)-Epicatechin against copper-induced oxidative stress in rat erythrocytes. <i>3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation „Molecular, cellular and integrative basis of health and disease: Transdisciplinary approach“</i> . Abstract 147. Military Medical Academy, October 29-31, 2014. Belgrade, Serbia.	<b>M34</b>
Paunović MG, Matić MM, <u>Mladenović JM</u> , Djordjević NZ, Babić GM, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS. Potential protective effects of beta-glucan and vitamin C on paracetamol-induced oxidative stress in rats. <i>3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation „Molecular, cellular and integrative basis of health and disease: Transdisciplinary approach“</i> . Abstract 152. Military Medical Academy, October 29-31, 2014. Belgrade, Serbia.	<b>M34</b>

#### ЧАСОПИСИ НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА (M 50)

Simić, V., Pavlović, S., Milošević, S., <u>Tošić, J.</u> , Kljunić, L. (1999). Centar za očuvanje biodiverziteta akvatičnih ekosistema Srbije u ex-situ uslovima: „Akvarijum Kragujevac”. <i>Zaštita prirode</i> , 51, 2, 171-181.	<b>(R62)</b>
Ćurčić Svetlana, <u>Mladenović Jelena</u> (2011). Voda, (ne) presušno blago - činjenice o vodi u svesti dece osnovnoškolskog uzrasta. <i>Uzdanica</i> , VIII /2, 267-276.	<b>M52</b>

#### ЗБОРНИЦИ СКУПОВА НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА (M 60)

Milošević, S., Simić, V, <u>Tošić, J.</u> , Andjelković, V., Čolić-Vujadinović, J., (2002). Ispitivanje uticaja bakar II sulfata (CuSO <sub>4</sub> ) na bentosnu makrofaunu u ex-situ uslovima. <i>Zbornik radova konferencije Voda 2002</i> . 149-153.	<b>(R65)</b>
Simić, V., Simić, S., <u>Tošić, J.</u> , Milošević, S., Anđelković, V. (2001). Značaj akvarijuma Kragujevac u očuvanju biodiverziteta vodenih staništa centralne Srbije. <i>Naučni skup posvećen istraživanjima vodenih ekosistema i plavnih zona: "Zasavica 2001"</i> , Zbornik rezimea (62). Sremska Mitrovica.	<b>M64</b>
Trbojević, I., Ognjanović, B., Đorđević, N., <u>Mladenović, J.</u> , Milovanović, J., Petrović, Z, Štajn, A., Saičić, Z. (2009). Toksičnost paladijuma i promene oksidaciono/antioksidacionog statusa u krvi pacova. U Korać, B (ur.), <i>Naučni simpozijum "Mitohondrije i slobodni radikali - nov izazov"</i> , knjiga sažetaka, (34). Beograd: Farmaceutski fakultet.	<b>M64</b>
Milovanović, J., Ognjanović, B., Trbojević, I., Đorđević, N., <u>Mladenović, J.</u> , Glišić, R., Štajn, A., Saičić, Z. (2009). Zaštitna uloga selena u hepatotoksičnosti i lipidnoj peroksidacija indukovanih cisplatinom kod pacova. U Korać, B (ur.), <i>Naučni simpozijum "Mitohondrije i slobodni radikali - nov izazov"</i> , knjiga sažetaka, (70). Beograd: Farmaceutski fakultet.	<b>M64</b>

<p><u>Mladenović, J.</u>, Ognjanović, B., Trbojević, I., Đorđević, N., Milovanović, J., Štajn, A., Saičić, Z. (2009). Efekti vitamina C na antioksidacioni zaštitni sistem u bubregu pacova akutno izloženih dejstvu cisplatina. U Korać, B (ur.), <i>Naučni simpozijum "Mitohondrije i slobodni radikali - nov izazov"</i>, knjiga sažetaka, (74). Beograd: Farmaceutski fakultet.</p>	<p><b>M64</b></p>
<p><u>Mladenović, J.</u>, Matić, M., Đorđević, N., Knežević, V., Štajn, A., Ognjanović, B., Saičić, Z. (2011). Protektivni efekti estradiola na kadmijum indukovanu aktivnost neutrofila. U Korać, B (ur.), <i>Prvi naučni kongres "Mitohondrije i slobodni radikali u biomedicini - perspektive"</i>, knjiga sažetaka, (60). Beograd: Farmaceutski fakultet.</p>	<p><b>M64</b></p>
<p><u>Mladenović, J.M.</u>, Paunović, M.G., Matić, M.M., Đorđević, N.Z., Babić, G.M., Knežević, V.S., Ognjanović, B.I., Štajn, A.Š., Saičić, Z.S. (2013). Prooksidativni efekti bakra na oksidativno-antioksidativni zaštitni status eritrocita pacova. U Korać, B., Otašević, V., (ur.), <i>Drugi naučni kongres „Život sa slobodnim radikalima - Hemija - Biologija - Medicina“</i>, knjiga sažetaka, (60). Niš: Medicinski fakultet.</p>	<p><b>M64</b></p>
<p><u>Младеновић, Ј.</u>, Ђурчић, С. (2014). Физичка активност студената у слободно време. У Игњатовић, А., Марковић, Ж., (ур.), <i>Национална конференција са међународним учешћем „Физичка култура и модерно друштво“</i>, Јагодина, 15. и 16. јун 2013, пос. изд, књ. 17, 75–81.</p>	<p><b>M63</b></p>

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА  
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Редни број:	
Идентификациони број:	
Тип документације:	Монографска публикација
Тип записа:	Текстуални штампани материјал
Врста рада:	Докторска дисертација
Аутор:	Јелена М. Младеновић
Ментор:	проф. др Бранка Огњановић
Наслов рада:	Ефекти кверцетина и епикатехина на оксидативно-антиоксидативни статус пацова третираних бакар(II)-јоном
Језик публикације:	Српски (ћирилица)
Језик извода:	Српски / Енглески
Земља публикавања:	Србија
Година:	2014.
Издавач:	Ауторски репринт
Место и адреса:	Радоја Домановића 12, 34 000 Крагујевац
Физичи опис рада:	Дисертација има 178 страна, 7 поглавља, 9 слика, 18 табела, 47 графика и 325 референци
Научна област:	Биологија
Научна дисциплина:	Физиологија животиња
Предметна одредница / кључне речи:	Бакар, кверцетин, епикатехин, еритроцити, јетра, оксидативни стрес, антиоксидативна заштита
УДК	
Чува се:	У библиотеци Природно-математичког факултета, Радоја Домановића 12, 34 000 Крагујевац
Важна напомена:	
Извод:	<p>Бакар као есенцијални микроелемент има важну улогу у биолошким системима међутим, повећане концентрације могу да изазову токсичне ефекте. Као прелазни метал, бакар може да стимулише продукцију реактивних врста кисеоника преко <i>Fenton</i>-ове и <i>Haber-Weiss</i>-ове реакције и доведе до оксидативних оштећења биомолекула у ткивима, пре свега у јетри која учествује у његовом метаболизму.</p> <p>Флавоноиди су природна биљна полифенолна једињења која показују широк спектар биолошке активности. Антиоксидативна својства могу да испоље различитим механизмима, у директној реакцији са реактивним врстама или хелацијом јона прелазних метала, који би у даљим реакцијама произвели реактивне врсте.</p> <p>Циљ истраживања ове докторске дисертације је испитивање ефеката субхроничне интоксикације баком на хематолошко-биохемијске параметре у крви, оксидативни метаболизам еритроцита и параметре оксидативног стреса у јетри пацова. Такође, циљ је и испитивање протективног капацитета и синергистичког деловања флавоноида кверцетина (QE) и епикатехина (EC), као чистих супстанци, у условима оксидативног стреса. Упореджени су и ефекти примењених флавоноида и комерцијалног лека D-пенициламина (DPA), тиолног једињења које се користи за третман обољења чији је узрок повећано акумулирање бакра у ткивима (Вилсонова болест).</p> <p>Студија је изведена на мужјацима пацова соја <i>Wistar albino</i>, 8 недеља старости на почетку експеримента, насумично подељених у 5 група по 7 животиња: (1) контролна (0.3 ml физиолошког раствора, <i>i.p.</i>); (2) третирана баком (<math>\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math> у концентрацији од 560 mg/L) преко воде за пиће у трајању од 5 недеља; (3) третирана баком (на начин описан претходно) и DPA (50 mg/kg TT, у 0.3 ml редестиловане воде, <i>i.p.</i>) сваког другог дана током последње 2 недеље експеримента (укупно 5 инјекција); (4) третирана баком (на начин описан претходно), а затим флавоноидима QE и EC (40 mg QE/kg TT + 40 mg EC/kg TT, у 0.3 ml редестиловане воде, <i>i.p.</i>) сваког трећег дана током последње 3 недеље експеримента (укупно 7 инјекција); (5) третирана флавоноидима QE и EC (на начин</p>

описан претходно). У пуној крви одређивани су хематолошки параметри: број еритроцита (RBC), концентрација хемоглобина (Hb), хематокрит (Hct), број леукоцита (WBC), број тромбоцита (Plt), хематолошки индекси, и биохемијски параметри: концентрације електролита (K, Na, Ca, Fe, фосфата), концентрације укупних протеина, албумина, глукозе и укупног холестерола, активности ензима аспартат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), алкалне фосфатазе (ALP), гама-глутамил трансептидазе (GGT) и лактат дехидрогеназе (LDH). У лизату еритроцита, применом стандардних аналитичких метода, одређивани су маркери оксидативног стреса: концентрације липидних пероксида (LPO), концентрације реактивних врста кисеоника и азота (супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) и нитрита ( $NO_2^-$ )), концентрације редукованог (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG) и активности ензима супероксид-дисмузе (SOD), каталазе (CAT), глутатион-пероксидазе (GSH-Px), глутатион-редуктазе (GR), глутатион-S-трансферазе (GST). У изолованом ткиву јетре, након хомогенизације, применом стандардних аналитичких метода такође је одређен редокс статус (концентрације LPO, неензимских антиоксиданата GSH, GSSG и Vit C, и активности ензима AOS: укупне SOD, CuZn SOD, Mn SOD, CAT, GSH-Px, GR и GST). Концентрације бабра и церулоплазмина одређене су у плазми и супернатанту ткива јетре.

Резултати истраживања показују да бакар у субхроничном третману испољава директан прооксидативни ефекат на еритроците и ткиво јетре пацова и показује значајне токсичне ефекте на хематолошко-биохемијске процесе у крви. Субхронична интоксикација бабром доводи до повећања LPO у еритроцитима и ткиву јетре, узрокује хемолizu еритроцита и анемију, пораст укупног холестерола, поремећај хомеостазе електролита. Након субхроничне интоксикације бабром повишене су активности ензима AST, ALT, ALP, GGT и LDH, маркера цитотоксичности јетре у серуму. Оксидативним оштећењима еритроцита и ткива јетре доприноси повећана продукција  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  и смањење неензимских антиоксиданата, ћелијског пула GSH и Vit C. Промене у активностима ензима AOS после субхроничне интоксикације бабром такође указују на појаву оксидативног стреса у еритроцитима и ткиву јетре.

Флавоноиди QE и EC показују антиоксидативну способност и умањују оксидативни стрес настао након субхроничног излагања бабру. QE и EC стабилизују мембране, блокирају липидну пероксидацију и тиме играју улогу у ублажавању манифестација токсичности у еритроцитима и ткиву јетре. Значајно повећавају концентрације неензимских антиоксиданата GSH и Vit C у ћелијама, индукују синтезу ензима AOS, чиме доприносе повећању антиоксидативног капацитета ћелија. Синергистичко деловање флавоноида QE и EC, као и цитопротективна улога коју показују, може се приписати њиховој способности да хелирају метале и/или уклањају  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ .

Резултати такође показују да су QE и EC ефективнији у антиоксидативном деловању у поређењу са DPA, који поред ефикасности у хелирању метала испољава и прооксидативне ефекте повећањем липидне пероксидације у еритроцитима и ткиву јетре.

Ово истраживање представља допринос комплетирању научних сазнања о токсичним ефектима бабра, као и комплексности протективног деловања флавоноида кверцетина и епикатехина на оксидативно-антиоксидативни статус еритроцита и ћелија ткива јетре. Због широког спектра биохемијских и фармаколошких дејстава, посебно треба истакнути значај испитиваних флавоноида у здравој исхрани, као и у превенцији и терапији многих обољења.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 16.1.2014. године

Датум одбране:

Чланови комисије:

Др Бранка И. Огњановић, ванредни професор  
Природно-математичког факултета Универзитета у  
Крагујевцу;

Др Андраш Ш. Штајн, редовни професор Природно-  
математичког факултета Универзитета у Крагујевцу;

Др Зорица С. Саичић, научни саветник Института за  
биолошка истраживања „Синиша Станковић“,  
Универзитет у Београду.



KEY WORDS DOCUMENTATION  
UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY AND ECOLOGY

Accession number:	
Identification number:	
Documentation type:	Monograph publication
Type of record:	Textual material, printed
Contents code:	Ph.D. Thesis
Author:	Jelena M. Mladenović
Mentor:	Dr Branka I. Ognjanović
Title:	Effects of Quercetin and Epicatechin on oxidative-antioxidative status of rats treated with copper(II)-ions
Language of text:	Serbian (cyrilic)
Language of abstract:	Serbian / English
Country of publication:	Serbia
Publication year:	2014.
Publisher:	Author reprint
Publication place:	Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
Physical description:	Thesis contains 178 pages, 7 chapters, 9 images, 18 tables, 47 graphics and 325 literature references
Scientific field:	Biology
Scientific discipline:	Animal physiology
Subject/key words:	Copper, Quercetin, Epicatechin, erythrocytes, liver, oxidative stress, antioxidant defense
UDC	
Holding data:	In the library of Faculty of Sciences, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
Note:	
Abstract:	<p>Copper is an essential trace element that plays an important role in biological systems, however, the increased concentration may cause toxic effects. As the transition metal, copper may stimulate the production of reactive oxygen species by <i>Fenton's</i> and <i>Haber-Weiss</i> reaction and lead to oxidative damage of biomolecules in the tissues, especially in the liver, which participates in its metabolism.</p> <p>Flavonoids are a natural plant polyphenol compounds which exhibit a wide spectrum of biological activity. They may exert antioxidant properties through different mechanisms, in a direct reaction with a reactive species, or by chelating transition metal ions, which in a further reaction may produce reactive species.</p> <p>The effects of subchronic copper intoxication on haematological and biochemical parameters in blood, oxidative metabolism of erythrocytes and oxidative stress parameters in rat liver are objectives of this dissertation research. The aim is also to examine the protective capacity and synergistic effects of flavonoids quercetin (QE) and epicatechin (EC), as a pure substances, under oxidative stress conditions. We also compared the effects of these flavonoids and a commercial drug D-penicillamine (DPA), a thiol compound used for the treatment of diseases caused by an increased accumulation of copper in the tissues (Wilson's disease).</p> <p>The study was performed on male albino Wistar rats, 8 weeks old at the beginning of the experiment, randomly divided into 5 groups of 7 animals: (1) control (0.3 ml of saline, <i>i.p.</i>); (2) copper-treated (<math>\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math> at a concentration of 560 mg/L) through drinking water for 5 weeks; (3) treated with copper (as described previously), and DPA (50 mg/kg body weight in 0.3 ml of re-distilled water, <i>i.p.</i>) every other day during the last 2 week of the experiment (total number of injections were 5); (4) treated with copper (as described above), and</p>

flavonoids QE and EC (40 mg QE/kg body weight + 40 mg EC/kg body weight, in 0.3 ml of re-distilled water, *i.p.*) every third day during the last 3 weeks of the experiment (total number of injections were 7); and (5) treated with flavonoids QE and EC (as described previously). Hematological parameters: erythrocyte count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Hct), leukocyte count (WBC), platelet count (Plt), hematological indices, and biochemical parameters: concentration of electrolytes (K, Na, Ca, Fe, phosphate), total protein, albumin, glucose, and total cholesterol, the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured in the whole blood. Markers of oxidative stress: lipid peroxidation (LPO), the concentration of reactive oxygen and nitrogen species (superoxide anion radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and nitrite ( $NO_2^-$ )), reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) concentrations, and activities of AOS enzymes: superoxide-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), and glutathione-S-transferase (GST) were determined in the erythrocyte lysate using standard analytical methods. In isolated liver tissue after homogenization, the redox status (LPO concentration, GSH, GSSG and Vit C concentration, and the activities of total SOD, CuZn SOD, Mn SOD, CAT, GSH-Px, GR, and GST) was also determined using standard analytical methods. The concentrations of copper and ceruloplasmin were determined in the plasma and in the liver tissue supernatant.

The results show that copper in subchronic treatment exerts a direct pro-oxidative effect on erythrocytes and liver tissue of rats and significant toxic effects on haematological and biochemical processes in the blood. Subchronic intoxication with copper leads to an increase in LPO in liver tissue and in erythrocytes, causes haemolysis and anemia, increase in total cholesterol, electrolyte homeostasis disbalance. After subchronic copper intoxication activities of cytotoxicity liver markers AST, ALT, ALP, GGT, and LDH, in the serum were elevated. Increased production of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  and the reduction of non-enzymatic antioxidants, GSH and Vit C, contribute to oxidative damage in red blood cells and liver tissue. Changes in the activities of the AOS enzymes after subchronic intoxication with copper also indicated the occurrence of oxidative stress in erythrocytes and liver tissue.

Flavonoids QE and EC exhibit antioxidant capacity and reduce oxidative stress occurring after subchronic copper exposure. QE and EC stabilize the membrane, blocking the lipid peroxidation, and thereby play a role in mitigating the manifestation of toxicity in the erythrocytes and liver tissue. They significantly increase the concentration of non-enzymatic antioxidants GSH and Vit C in cells, induce synthesis of the AOS enzymes, thus contributing to increase the cells antioxidant capacity. The synergistic action of the flavonoids QE and EC, and a cytoprotective role which they exert, can be attributed to their ability to chelate metal ions and/or remove  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ .

The results also show that QE and EC were more effective in antioxidant activity when compared with the DPA, which in addition to the efficiency of chelating metal ions exerts prooxidant effects, by increasing lipid peroxidation in erythrocytes and liver tissue.

This research is a contribution to the scientific knowledge of the toxic effects of copper, as well as the complexity of the protective effect of flavonoids quercetin and epicatechin in the oxidative-antioxidant status of red blood cells and liver tissue cells. Considering their wide range of biochemical and pharmacological effects, we should point out to the importance of the flavonoids in a healthy diet, as well as in the prevention and treatment of many diseases.

Accepted by the Scientific Board on:	16.1.2014.
Defended on:	
Thesis Commission (Degree/name/surname/title/faculty):	Dr Branka I. Ognjanović, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, Serbia; Dr Andraš Š. Štajn, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, Serbia; Dr Zorica S. Saičić, Leading Scientist, Department of physiology (IBISS), University of Belgrade, Serbia.

**ОБРАЗАЦ 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а ДЕЛЕНА М. МЛАДЕНОВИЋ  
број уписа 25/107

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И ЕТИКАТЕХИКА НА  
ОКСИДАТИВНО-АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС ПАЦОВА ТРЕТИРАНИХ БАКАР(II)-ЗОЛОМ

- 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.

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 31.10.2014.

Делена Младеновић

**ОБРАЗАЦ 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јелена М. Младеновић  
Број уписа 25107  
Студијски програм ДОКТОРСКИ АКАДЕМСКИ СТУДИЈЕ БИОЛОГИЈЕ  
Наслов рада ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И ЕПИКАТЕХИНА НА ОКСИДАТИВНО-АНТИОКСИДАТИВНИ  
Ментор СТАТУС ПРАЧОВА РЕТИРАНИК БИОСАР(11)-2014  
Др Бранка Отћаковић  
Потписани Јелена М. Младеновић

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

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 Крагујевцу.

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 31.10.2014.

Јелена Младеновић

**ОБРАЗАЦ 3.**

**Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И ЕПИКАТЕХИНА НА ОКСИДАТИВНО-АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС ПАОЉОВА ТРЕТИРАНИХ БАШАР/II)-ЈОЉОЦУ

која је моје ауторско дело.

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

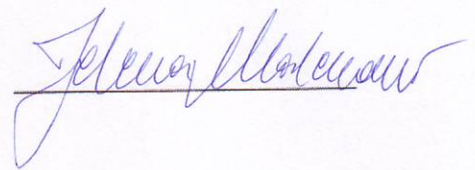
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 31.10.2014.



#### ОБРАЗАЦ 4.

**1. Ауторство -**

Дозвољаваате 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.**

Дозвољаваате 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.**

Дозвољаваате 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.**

Дозвољаваате 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.**

Дозвољаваате 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.**

Дозвољаваате 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.

## COPPER-INDUCED CHANGES OF LIPID PEROXIDATION AND HEMATO-BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RAT BLOOD: PROTECTIVE ROLE OF FLAVONOIDS

JELENA M. MLADENović<sup>1</sup>, MILICA G. PAUNović<sup>1</sup>, MILOŠ M. MATIĆ<sup>1</sup>, VEROLJUB S. KNEŽEVIĆ<sup>2</sup>,  
BRANKA I. OGNJANOVIĆ<sup>1,\*</sup>, ANDRAŠ Š. ŠTAJN<sup>1</sup> and ZORICA S. SAIČIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Laboratory Diagnostics Department, Health Centre of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Department of Physiology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Corresponding author: branka@kg.ac.rs

**Abstract** – The effects of subchronic exposure to copper (Cu) on lipid peroxidation, hemato-biochemical parameters, and the possible protective role of flavonoids Quercetin and (-)-Epicatechin were studied. Male Wistar albino rats were treated with Cu (560 mg/L, *p.o.* as CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O for 5 weeks) and Quercetin and (-)-Epicatechin (40 mg/kg BW each, *i.p.*, every third day during the last 3 weeks) alone or in combination. Cu increased the concentration of lipid peroxides, decreased the number of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit values and increased the activities of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase. Coadministration of Quercetin and (-)-Epicatechin with Cu lowered the process of lipid peroxidation and restored examined hemato-biochemical parameters to control values. Our results indicate that Cu induced oxidative damage in erythrocytes, which led to anemia, while Quercetin and (-)-Epicatechin showed a protective effect on the hemato-biochemical processes in the blood of rats.

**Keywords:** Copper; erythrocyte; flavonoids; hematological parameters; biochemical parameters; lipid peroxidation

### INTRODUCTION

Copper (Cu) is an essential trace element involved in many processes responsible for normal growth and development, as an integral part of specialized cuproproteins, such as ceruloplasmin (CP), cytochrome c oxidase, dopamine β-hydroxylase, superoxide dismutase and tyrosinase (Ferenci, 2004; Kodama and Fujisawa, 2009). However, the accumulation of Cu in amounts that exceed the metabolic requirements of the organism or Cu homeostasis disorders can lead to the manifestation of its toxic effects (Fuentealba and Aburto, 2003). It is well known that redox-active metals, such as Cu, are capable of inducing oxidative stress by increasing the production of reactive oxy-

gen species (ROS) which causes peroxidative degradation of polyunsaturated fatty acids in membrane lipids, and leads to the damage of biomolecules (Halliwell and Gutteridge, 2007).

As a result of increased anthropogenic activities, heavy metals, including Cu, are increasingly present in the environment. Cu salts are widely used as algicides, fungicides and pesticides. Acute consumption of high Cu amounts in water by humans may cause irritation of the stomach, nausea, loss of appetite and dehydration (Araya et al., 2004). The chronic use of water with increased Cu concentrations may also represent a potential risk to sensitive populations, such as children and individuals

with a genetic disorder of Cu metabolism (Brewer, 2000). Increased Cu accumulation in humans occurs mainly due to metabolic disorders of genetic origin, as in Wilson's disease, which causes hepatitis and liver cirrhosis, and nervous system and kidney disorders (Brewer, 2000; Patil et al., 2013). In addition, an excess of Cu adversely affects the cardiovascular system, leading to high blood pressure and promoting atherosclerosis (Iskra and Majewski, 2000).

Quercetin (QE) and (-)-Epicatechin (EC) belong to a group of plant polyphenolic flavonoids present in the daily diet of humans. The main sources of QE are apples, citrus fruits, broccoli, onion, berries, tea and red wine (Nutrient Data, Laboratory, 2011). EC is the most abundant flavonoid in green and black tea, cocoa products, red wine and berries (Nutrient Data, Laboratory, 2011). A diet rich in flavonoids can reduce blood pressure, the risk of cardiovascular disease, improves the liver antioxidant defense system and has a beneficial effect on symptoms of neurodegenerative disorders in Parkinson's and Alzheimer's disease (Middleton et al., 2000; Schroeter et al., 2006; Larson et al., 2012). Apart from plant sources, these flavonoids are components of supplements in an alternative therapy for the treatment of allergies, asthma, bacterial infections, arthritis, gout, eye disorders, hypertension and neurodegenerative disorders (Larson et al., 2012).

Flavonoids exhibit a wide range of biological activities, including anti-oxidative, anti-allergic, antiviral, neuroprotective and cancer inhibiting, *in vitro* or in animal tissues (Verma et al., 1988; Deschner et al., 1991; Middleton et al., 2000; Ishisaka et al., 2011). In recent years attention has been devoted to their antioxidant activity. Due to their structure, flavonoids exhibit the ability to chelate transition metal ions and to "capture" and neutralize free radicals, acting as chain-breaking antioxidant (Bors et al., 1990).

The aim of this study is to investigate the effects of Cu and the protective capacity of these particular flavonoids, QE and EC, on hematological and bio-

chemical parameters in the blood of rats subchronically exposed to Cu in excess.

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals*

Chemicals for this study were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) and Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin and (-)-Epicatechin were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany). Solutions were prepared with double-distilled water. All reagents and chemicals were of analytical grade or higher purity.

### *Experimental animals*

The study included male adult Wistar albino rats, 8 weeks old, weighing  $230 \pm 20$  g at the beginning of the experiment. The animals were maintained in individual cages under standard laboratory conditions (temperature  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ; 12 h light-dark cycle). The animals had unlimited access to drinking water or a solution of  $\text{CuCl}_2$  and standard rodent laboratory diet. The concentration of  $\text{CuCl}_2$  was determined based on the oral median lethal dose for rats ( $\text{LD}_{50}$ ). The amount of water and solutions they drank was measured every third day. At the end of experimental period, the animals were anesthetized with ether and sacrificed by decapitation. The experimental procedures were approved by the University Ethics Committee.

### *Experimental design*

After a period of adaptation for one week prior to the experiment, the animals were randomly divided into 4 groups, 7 animals per group: Group 1 (Control) received saline (0.3 mL/kg BW); Group 2 (Cu) was treated with copper (as  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  at a concentration of 560 mg/L, *p.o.*) via drinking water for 5 weeks; Group 3 (QE+EC) was treated with intraperitoneal injections (*i.p.*) of quercetin coadministered with epicatechin (40 mg QE/kg BW + 40 mg EC/kg BW, in 0.3 mL double-distilled water) every third day for the last 3 weeks of the experiment. A total of seven injec-



tions were administered; Group 4 (Cu+QE+EC) was treated with copper (as  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  at a concentration of 560 mg/L, *p.o.*) via drinking water for 5 weeks, and with quercetin coadministered with epicatechin (40 mg QE/kg BW + 40 mg EC/kg BW, in 0.3 mL double-distilled water) *i.p.*, every third day for the last 3 weeks of the experiment. A total of seven injections were administered.

#### *Analytical procedures*

The animals were measured, anesthetized with ether and decapitated 24 h after the last injection. Blood samples were collected in K-EDTA tubes for hematological analysis or in tubes without anticoagulants for other analyses. Hematological and biochemical parameters were measured on the day of sacrifice. Hematological analysis included the number of erythrocytes (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct) values, as well as hematological indices (mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and red cell distribution width (RDW)) in whole blood, and was performed by standard methods on an automated hematology analyzer (Horiba Medical ABX Micros 60, Japan).

Measurements of biochemical parameters, serum total protein (TP), albumin (Alb), and activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) were performed on BioSystem BTS 330 (Spain), and serum concentrations of ceruloplasmin (CP) was performed on a Roche Hitachi 911 (Swiss) analyzer.

To measure lipid peroxidation (LPO), whole blood samples with EDTA were centrifuged at  $1\,000 \times g$  ( $+4^\circ\text{C}$ ) for 10 min and the plasma was removed. The erythrocytes were washed three times with an equal volume of cold saline (0.9 %, *v/v*). One milliliter of washed erythrocytes was lysed on ice in 3 mL of  $\text{dH}_2\text{O}$  ( $4^\circ\text{C}$ ) for 30 min. LPO in the hemolysate was determined using the method described by Ohkawa et al. (1979), based on the reaction of lipid peroxidation products (MDA-malondialdehydes) with thio-

barbituric acid (TBA) (TBARS analysis). Hemolysate samples were extracted with 28% trichloroacetic acid and centrifuged at  $1\,000 \times g$  for 10 min. The color reaction was carried out by adding 1% TBA and incubation of the samples in a warm bath at  $90^\circ\text{C}$  for 15 min. The absorbances were measured with a Uv-Vis Spectrophotometer (JENWAY 6105, Staffordshire, UK) and results were expressed in nmol MDA/mL erythrocytes, using a molar extinction coefficient for MDA of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### *Statistical analysis*

All data were evaluated using SPSS for Windows (version 13.0) software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons were made using either factorial analysis of variance (ANOVA) with a post hoc Bonferroni/Dunnett's multiple analysis or Kruskal-Wallis test (for comparison across several groups) and Mann-Whitney test (for comparison between two groups). Differences at  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

The effects of treatment with Cu and the flavonoids QE and EC on average animal weight are shown in Table 1. The animals in group 1 (Control), as well as groups 3 (QE+EC) and 4 (Cu+QE+EC) gained in body weight during the 5-week experiment, while in group 2 (Cu) the body weight decreased significantly. The average amount of  $\text{CuCl}_2$  solution emptied in the experimental group 2 (22.0 mL/rats/day) and in group 4 (24.3 mL/rats/day), was significantly lower than the volume of tap water drunk by the control animals (30.3 mL/rats/day) throughout the exposure (Table 1). The calculated average intake of  $\text{Cu}^{2+}$  per rat was about 5 mg/day. There was no mortality among the animals, despite a reduction in body weight that was due to the avoidance of water and food intake and probable dehydration.

A subchronic exposure to Cu significantly decreased RBC counts, Hb and Hct values compared to the control (Table 2). Coadministration of QE and

**Table 1.** Body weights and water consumption of control and treated groups of rats after 5 weeks of treatment.

	Experimental groups			
	Control (n=7)	Cu (n=7)	QE+EC (n=7)	Cu+QE+EC (n=7)
Initial body weight (g)	238.7 ± 13.02	232.7 ± 17.8	230.0 ± 21.3	232.9 ± 19.9
Final body weight (g)	263.3 ± 18.8	215.3 ± 15.5*	265.7 ± 20.7**	255.7 ± 17.6
Water consumption (mL/rat/day)	30.3 ± 1.5	22.0 ± 1.6*	30.8 ± 1.1**	24.3 ± 1.6*

n: number of animals in the group; Cu: copper; QE: quercetin; EC: epicatechin. Values are given as mean ± SD. \**p*<0.05, significantly different from control; \*\**p*<0.05, significantly different from Cu group.

**Table 2.** Changes in haematological parameters of control and treated groups of rats after 5 weeks of treatment.

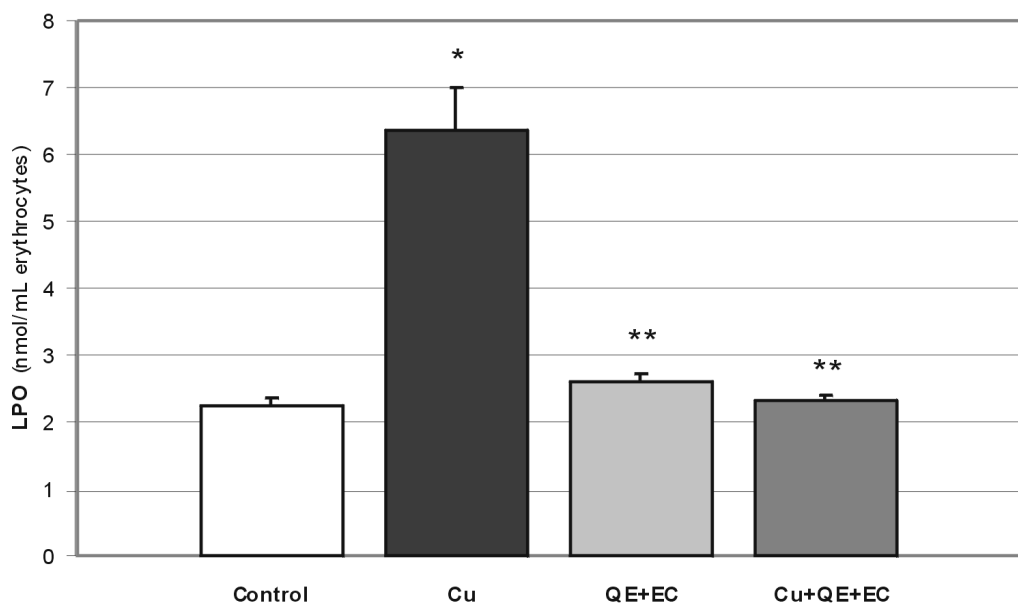
Parameters	Experimental groups			
	Control (n=7)	Cu (n=7)	QE+EC (n=7)	Cu+QE+EC (n=7)
RBC (×10 <sup>12</sup> /L)	6.32 ± 0.89	5.16 ± 0.77*	7.19 ± 0.42**	6.87 ± 0.35**
Hb (g/L)	135.3 ± 4.22	101.1 ± 4.27*	144.0 ± 7.79**	141.3 ± 6.8**
Hct (%)	38.41 ± 4.86	29.52 ± 4.46*	41.05 ± 2.51**	38.35 ± 2.89**
MCV (fL)	59.21 ± 2.08	56.80 ± 1.91	57.03 ± 2.96	56.10 ± 1.83
MCH (pg)	21.1 ± 2.11	19.7 ± 2.46	20.02 ± 1.24	20.57 ± 0.82
MCHC (g/L)	352.75 ± 12.62	347.87 ± 12.27	350.83 ± 7.78	368.75 ± 16.07**
RDW (%)	14.83 ± 1.73	15.95 ± 0.88	14.73 ± 1.67**	13.73 ± 0.4**

n: number of animals in the group; Cu: copper; QE: quercetin; EC: epicatechin; RBC: red blood cell; Hb: haemoglobin; Hct: haematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular haemoglobin; MCHC: mean corpuscular haemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width. Values are given as mean ± SD. \**p*<0.05, significantly different from control; \*\**p*<0.05, significantly different from Cu group.

**Table 3.** Changes in biochemical parameters of control and treated groups of rats after 5 weeks of treatment.

Parameters	Experimental groups			
	Control (n=7)	Cu (n=7)	QE+EC (n=7)	Cu+QE+EC (n=7)
TP (g/L)	60.9 ± 2.6	59.0 ± 2.9	61.4 ± 3.5	60.3 ± 5.1
Alb (g/L)	12.7 ± 1.5	12.0 ± 1.4	12.8 ± 1.9	11.5 ± 1.8
CP (mg/L)	54.4 ± 10.7	37.9 ± 12.2*	45.7 ± 11.4	52.7 ± 12.1
AST (U/L)	141.8 ± 14.7	216.2 ± 18.4*	147.2 ± 13.7**	138.8 ± 18.7**
ALT (U/L)	50.6 ± 6.3	70.1 ± 12.3*	55.2 ± 8.9	61.4 ± 18.1
LDH (U/L)	1084.7 ± 158.3	2012.2 ± 114.2*	1097.7 ± 81.8**	998.3 ± 142.9**

n: number of animals in the group; Cu: copper; QE: quercetin; EC: epicatechin; TP: total protein; Alb: albumin; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; LDH: lactate dehydrogenase; CP: ceruloplasmine. Values are given as mean ± SD. \**p*<0.05, significantly different from control; \*\**p*<0.05, significantly different from Cu group.



**Fig. 1.** LPO values in erythrocytes of control and treated groups of rats after 5 weeks of treatment Cu: copper; QE: quercetin; EC: epicatechin. Values are given as mean  $\pm$  SD ( $n = 7$ ); \* $p < 0.05$ , significantly different from control; \*\* $p < 0.05$ , significantly different from Cu group.

EC with Cu significantly increased the values of the examined parameters compared to the Cu group. We noticed a slight decrease in the values of the hematological indices MCV, MCH and MCHC in the Cu group compared to the control. However, the MCHC value was significantly higher in the Cu+QE+EC group compared to the Cu group.

Table 3 shows the effects of treatment on biochemical parameters. Exposure to Cu led to a slight decrease of TP and Alb, and a significant decrease in CP serum level compared to the control. Coadministration of QE+EC with Cu raised CP to the level of the control.

The Cu treatment caused a significant increase in the activities of AST, ALT and LDH as compared to the control. Coadministration of QE+EC with Cu reversed these changes to the values measured in control.

The data in Fig. 1 show that subchronic treatment with Cu led to a significant increase in LPO in the rats' erythrocytes when compared to the control.

Co-treatment of QE+EC with Cu restored the LPO level to nearly those measured in the control group.

## DISCUSSION

Although Cu is an essential element for a number of biological processes, prolonged exposure to elevated concentrations may have adverse effects (Fuentelba and Aburto, 2003). In this study, we investigated the effects of Cu and the influence of the flavonoids QE and EC on hematological and biochemical parameters in the blood of rats after subchronical exposure to Cu in excess.

Our results show that in animals subchronically exposed to Cu their body weight decreased, which can be a predictor of poor general health. The decrease in body weight may indicate an excessive breakdown of tissue proteins. Similarly, the results of Bataineh et al. (1998) showed that long-term consumption of Cu salts causes growth disorders and weight loss in animals. On the other hand, animals co-treated with EC, QE and Cu continuously gained weight.

Exposure to Cu significantly decreased RBC, Hb and Hct and led to anemia. Similar results were obtained in other studies on animals (Bozynski et al., 2009; Nikolic et al., 2013). The research of Fernandes et al. (1988) showed that the incubation of an erythrocyte suspension with  $\text{Cu}^{2+}$  causes lipid peroxidation and hemolysis as a consequence of oxyhemoglobin oxidation by Cu. The erythrocytes are more susceptible to oxidative damage than other cells because they are constantly exposed to ROS and their membranes are rich in unsaturated fatty acids (Clemens and Waller, 1987). It was found that toxic Cu concentrations reduce deformability of erythrocytes and increase membrane permeability and osmotic fragility of cells, resulting in reduced erythrocyte survival (Adams et al., 1979). The observed reduced number of RBC, Hb and Hct after Cu exposure in our study is probably due to the oxidative damage of erythrocytes and increased erythrocyte destruction.

Coadministration of QE+EC with Cu showed protective effects on hematological parameters. In the study of Chouhan et al. (2011), QE exerted beneficial effect on hematological parameters in rats treated with fluoride. Martinez et al. (2012) found that the presence of EC prevents protein oxidation and positively affects membrane fluidity and erythrocyte morphology, thereby preventing hemolysis resulting from peroxidation. These results suggest that the protective effects of QE and EC are likely due to their ability to capture ROS and thereby prevent erythrocyte damage and hemolysis.

Metabolic processes in rats exposed to Cu were also affected, which is reflected in the disturbance of biochemical parameters. CP, a cuproprotein that is synthesized in the liver, is the major carrier of Cu in the blood. Reduced levels of CP are typically associated with a reduced level of Cu in the serum of patients with Wilson's disease, but reduced CP with normal or increased levels of serum Cu may suggest increased levels of Cu not bound to CP (the so-called free copper or non-ceruloplasmin-bound copper) (Kodama and Fujisawa, 2009). An elevated level of Cu in circulation may be the result of a sudden Cu release from the hepatocytes, caused by liver damage

or intoxication with Cu (Patil et al., 2013). Treatment with Cu in the present study significantly decreased CP but did not lead to significant changes in the serum level of Cu (data not shown) as compared to the control, which may indicate the release of non-ceruloplasmin-bound Cu from damaged hepatocytes. Coadministration of QE+EC with Cu reversed the changes in protein levels and CP, suggesting protective effects of these flavonoids on hepatocytes.

Cu treatment increased the activities of AST, ALT and LDH in the serum. Transaminases are widely distributed in tissues, while their concentrations in the serum are low. Since the liver is the organ of Cu accumulation, these changes may indicate liver damage and, due to the distortion of functional integrity of hepatocyte cell membranes, the release of these enzymes in serum and their enhanced activity. Increased transaminase (AST and ALT) activities in serum serve as parameters in the diagnosis of hepatitis and hemolytic anemia in humans and also indicate liver damage in animal (Fuentealba and Aburto, 2003; Gaetke and Chow, 2003). George and Chandrakasan (1997) reported a significant increase in LDH activity in the serum of rats as a result of hepatic fibrosis.

QE+EC administered alone did not cause significant differences in the activities of these enzymes compared to the control group. However, coadministration of QE+EC with Cu decreased ALT and significantly reduced AST and LDH activities compared to the Cu group. This is consistent with the results of other studies in which QE inhibited the increase of AST, ALT and LDH activities in serum by reducing the LPO in the liver (Tokyol et al., 2006) and myocardium of animals (Matouk et al., 2013; Milton et al., 2013). These results indicate that QE and EC are able to preserve the functional integrity of hepatocyte cell membranes and to prevent leakage of these enzymes into the blood.

Cu is essential for numerous biological functions, including the synthesis of phospholipids in cell membranes that maintains the integrity of the cell (Ferenci, 2004). However, as earlier studies have

shown, an excess of Cu in rat diet may cause LPO and damage of the membrane (Dillard and Tappel, 1984; Burkitt, 2001; Gaetke and Chow, 2003). Fernandes et al. (1988) reported increased LPO after incubation of human erythrocyte suspension with  $\text{Cu}^{2+}$  ions. The  $\text{Cu}^+$  ion generated by the reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  in the presence of superoxide anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) catalyzes the formation of hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) that readily enter into further reactions (Halliwell and Gutteridge, 2007).  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ , or lipid peroxy radicals can cause LPO, a decrease in membrane potential, and an increase in permeability to  $\text{H}^+$  and other ions, which eventually leads to the release of contents from cells (Halliwell and Gutteridge, 2007). Cu in our study significantly increased LPO in erythrocytes, indicating oxidative damage of cell membranes and the occurrence of oxidative stress in erythrocytes.

Our data indicate that QE+EC inhibited Cu-induced LPO. Previous studies have shown that flavonoids can block LPO due to their structure that enables them to chelate metal ions or scavenge ROS as hydrogen- or electron-donating compounds (Middleton et al., 2000; Mira et al., 2002). They thus can be helpful in conditions and diseases caused by increased metal concentrations or in conditions that are the result of oxidative stress. Mira et al. (2002) showed that QE and catechin chelate  $\text{Cu}^{2+}$  ions, due to their hydroxyl groups with interaction probably between the 5-hydroxyl and 4-oxo groups. It has also been reported that catechins have an antioxidant effect on iron-induced LPO due to iron chelation (Sugihara et al., 2001).

LPO could be inhibited by ROS scavenging, and QE as well as EC appears to be an extremely efficient radical scavenger (Middleton et al., 2000). The antioxidant properties of QE and EC may contribute to the improvement of cells' antioxidant defense. Filipe et al. (2001) showed that QE inhibited Cu-induced LPO in human plasma. These authors have also shown that there was a synergy of QE with endogenous urate in antioxidant action against Cu-induced LPO, and that the flavonoids were able to protect urate from oxidative degradation. Dietrich-Muszalska et al. (2012) have shown that EC was more effective

than QE in reducing LPO in human plasma *in vitro*. In an *in vitro* study of Boadi et al. (2003), it was shown that in reducing LPO, combinations of flavonoids provide better antioxidant protection than the individual treatments.

According to Bors et al. (1990), three structural groups of flavonoids are responsible for metal chelating and radical scavenging: i) the O-dihydroxy structure in the B-ring, which is the radical target site for all flavonoids with a saturated C-2/C-3 bond; ii) the C-2/C-3 double bond in conjugation with a 4-oxo function, which is responsible for electron delocalization from the B-ring; and iii) the additional presence of both 3- and 5-hydroxyl groups for strongest radical absorption.

Our data suggest that Cu in excess exerted prooxidant effects on hematological and biochemical processes in the blood and caused oxidative damage in erythrocytes. Treatment with QE and EC could protect against oxidative damage in the blood of rats subchronically exposed to Cu in excess. The cytoprotective role of QE and EC can be ascribed to their ability to chelate the ions of transition metals and scavenge ROS. They managed to inhibit LPO, thus demonstrating a significant role in alleviating the manifestations of Cu toxicity.

*Acknowledgments* – This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant No 173041.

## REFERENCES

- Adams, K. F., Johnson, G. Jr., Hornowski, K. E. and Lineberger, T. H. (1979). The effect of copper on erythrocyte deformability. A possible mechanism of hemolysis in acute copper intoxication. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. **550**, 279-287.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Llanos, A., Figueroa, G. and Uauy, R. (2004). Community-based randomized double-blind study of gastrointestinal effects and copper exposure in drinking water. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1068-1073.
- Bataineh, H., Al-Hamood, M. H. and Elbetieha, A. M. (1998). Assessment of aggression, sexual behavior and fertility in

- adult male rat following long-term ingestion of four industrial metals salts. *Hum. Exp. Toxicol.* **17**, 570-576.
- Boadi, W. Y., Iyere, P. A. and Adunyah, S. E. (2003). Effect of quercetin and genistein on copper- and iron-induced lipid peroxidation in methyl linolenate. *J. Appl. Toxicol.* **23**, 363-369.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**, 343-355.
- Bozynski, C. C., Evans, T. J., Kim, D. Y., Johnson, G. C., Hughes-Hanks, J. M., Mitchell, W. J., et al. (2009). Copper toxicosis with hemolysis and hemoglobinuric nephrosis in three adult Boer goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**, 395-400.
- Brewer, G. J. (2000). Is heterozygosity for a Wilson's disease gene defect and important underlying cause of infantile and childhood copper toxicosis syndromes? *J. Trace Elem. Exp. Med.* **13**, 249-254.
- Burkitt, M. J. (2001). A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols and ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* **394**, 117-135.
- Chouhan, S., Yadav, A., Kushwah, P., Kaul, R. K. and Flora, S. J. S. (2011). Silymarin and quercetin abrogates fluoride induced oxidative stress and toxic effects in rats. *Mol. Cell. Toxicol.* **7**, 25-32.
- Clemens, M. R. and Waller, H. D. (1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids.* **45**, 251-268.
- Deschner, E. E., Ruperto, J., Wong, G. and Newmark, H. L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* **12**, 1193-1196.
- Dietrich-Muszalska, A., Kontek, B., Olas, B. and Rabe-Jabłońska, J. (2012). Epicatechin inhibits human plasma lipid peroxidation caused by haloperidol in vitro. *Neurochem. Res.* **37**, 557-562.
- Dillard, C. J. and Tappel, A. L. (1984). Lipid peroxidation and copper toxicity in rats. *Drug Chem. Toxicol.* **7**, 477-487.
- Ferenci, P. (2004). Pathophysiology and Clinical Features of Wilson Disease. *Metab. Brain Dis.* **19**, 229-239.
- Fernandes, A., Mira, M. L., Azevedo, M. S. and Manso, C. (1988). Mechanisms of hemolysis induced by copper. *Free Radic. Res. Commun.* **4**, 291-298.
- Filipe, P., Lanç, V., Silva, J. N., Morlière, P., Santus, R. and Fernandes, A. (2001). Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.* **221**, 79-87.
- Fuentealba, C. and Aburto, E. M. (2003). Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology* **2**, 5.
- Gaetke, L. M. and Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189**, 147-163.
- George, J. and Chandrakasan, G. (1997). Lactate dehydrogenase isoenzymes in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **22**, 51-62.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2007). Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Eds. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge), 1-29. Oxford University Press, Oxford.
- Ishisaka, A., Ichikawa, S., Sakakibara, H., Piskula, M. K., Nakamura, T., Kato, Y., et al. (2011). Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Bio. Med.* **51**, 1329-1336.
- Iskra, M. and Majewski, W. (2000). Copper and zinc concentrations and the activities of ceruloplasmin and superoxide dismutase in atherosclerosis obliterans. *Biol. Trace Elem. Res.* **73**, 55-65.
- Kodama, H. and Fujisawa, C. (2009). Copper metabolism and inherited copper transport disorders: molecular mechanisms, screening and treatment. *Metallomics* **1**, 42-52.
- Larson, A. J., Symons, J. D. and Jalili, T. (2012). Therapeutic Potential of Quercetin to Decrease Blood Pressure: Review of Efficacy and Mechanisms. *Adv. Nutr.* **3**, 39-46.
- Martínez, V., Ugartondo, V., Vinardell, M. P., Torres, J. L. and Mitjans, M. (2012). Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 4090-4095.
- Matouk, A. I., Taye, A., Heeba, G. H. and El-Moselhy, M. A. (2013). Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **36**, 443-450.
- Middleton, E. J. R., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751.
- Milton, P. S., Muthumani, M. and Shagirtha, K. (2013). Quercetin potentially attenuates cadmium induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 582-595.
- Mira, L., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., Florêncio, M. H. and Jennings, K. R. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.* **36**, 1199-1208.

- Nikolic, R., Krstic, N., Jovanovic, J., Kocic, G., Cvetkovic, T. P. and Radosavljevic-Stevanovic, N. (2013). Monitoring the toxic effects of Pb, Cd and Cu on hematological parameters of Wistar rats and potential protective role of lipoic acid and glutathione. *Toxicol. Ind. Health*. DOI: 10.1177/0748233712469652.
- Nutrient Data, Laboratory*, USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.0. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, USDA; 2011.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- Patil, M., Sheth, K. A., Krishnamurthy, A. C. and Devarbhavi, H. (2013). A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **3**, 321-336.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., et al. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 1024-1029.
- Sugihara, N., Ohnishi, M., Imamura, M. and Furuno, K. (2001). Differences in Antioxidative Efficiency of Catechins in Various Metal-Induced Lipid Peroxidations in Cultured Hepatocytes. *J. Health Sci.* **47**, 99-106.
- Tokyo, C., Yilmaz, S., Kahraman, A., Cakar, H. and Polat, C. (2006). The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Acta chir. Belg.* **106**, 68-72.
- Verma, A. K., Johnson, J. A., Gould, M. N. and Tanner, M. A. (1988). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* **48**, 5754-5758.

