

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Marija M. Takić

Semenke lana, susama i golice i njihovi ekstrakti, ferulinska kiselina i enterolignani: efekti na lipidni status kod osoba na hemodijalizi, vezivanje za humani serum-albumin *in vitro* i uticaj na reaktivnost Cys34 tiolne grupe

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Marija M. Takić

**Seeds of flax, sesame and pumpkin and their
extracts, ferulic acid and enterolignans: effects on
the lipid status in patients on hemodialysis,
binding to human serum albumin *in vitro* and
influence on Cys34 thiol group reactivity**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Danijela Ristić-Medić, viši naučni saradnik
Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Ljuba Mandić, redovni profesor
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Danijela Ristić-Medić, viši naučni saradnik
Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

dr Milan Nikolić, docent
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Vesna Jovanović, naučni saradnik
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Marija Glibetić, naučni savetnik
Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Izuzetnu zahvalnost dugujem dr Ljubi Mandić na nesebičnoj pomoći, ukazanom poverenju i razumevanju, kao i stručnim savetima pri izradi ove doktorske teze.

Zahvaljujem dr Danijeli Ristić-Medić na lepoj, dugogodišnjoj saradnji, kao i u toku izrade ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Mariji Glibetić za svesrdnoj podršci, razumevanju i pomoći u toku istraživanja i izrade teze.

Dr Milanu Nikoliću se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći oko pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Vesni Jovanović, na lepoj saradnji, ukazanom poverenju i podršci tokom zajedničkom eksperimentalnog i rada na pisanju disertacije.

Dr Zorici Rašić-Milutinović i dr Gordani Peruničić-Peković se zahvaljujem na saradnji tokom studije suplementacije ishrane bolesnika na hemodijalizi, koja je sprovedena u Kliničko-bolničkom centru Zemun.

Srdačno se zahvaljujem svim neposrednim saradnicima iz Centra za ishranu, na saradnji tokom istraživanja i izrade ove doktorske disertacije dr Gordani Ristić, dr Vanji Ristić, dr Mirjani Gurinović, dr Vesni Vučić, dr Manji Zec, dr Jasmini Martačić-Debeljak, dr Tamari Popović, dr Aleksandri Konić-Ristić, dr Neveni Kardum, dr Mariji Ranić, dr Snježani Petrović, dr Aleksandri Arsić, dr Gordani Petrović-Oggiano, Jeleni Malešević, Slavici Ranković, Milici Kojadinović, Marini Nikolić, Vuku Stevanoviću, Filipu Stojanoviću, Biljani Pokimici, Suzani Avramović, Jeleni Jovančić, Sofiji Nikolić i Gorici Andrić. Posebnu zahvalnost dugujem kolegama Tamari Uzelac, Ivanu Pavićeviću i dr Jeleni Aćimović na lepom druženju i saradnji.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici. Mnogo se zahvaljujem kćerki Milici i sinu Vuku, zahvaljujući kojima sve poprima poseban, potpuno drugačiji smisao, pre svega što su strpljivo čekali dan da se eksperimentalni rad i pisanje teze privede kraju. Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima na bezgraničnoj ljubavi, kamenu temeljcu svih mojih težnji u životu.

Semenke lana, susama i golice i njihovi ekstrakti, ferulinska kiselina i enterolignani: efekti na lipidni status kod osoba na hemodijalizi, vezivanje za humani serum-albumin *in vitro* i uticaj na reaktivnost Cys34 tiolne grupe

Rezime

Poznato je da su semenke lana, susama i golice bogate esencijalnim masnim kiselinama i da predstavljaju značajni dijetarni izvor vitamina E i polifenola. Kod osoba sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, na programu hemodijalize, aktuelna su ispitivanja dijetarnih mera u cilju smanjenja incidence kardiovaskularnih oboljenja. Iz navedenog proizišao je cilj ove disertacije da se ispituju efekti suplementacije ishrane smešom semenki lana, susama i golice kod bolesnika na hemodijalizi.

Antioksidativna uloga humanog serum-albumina (HSA) u značajanoj meri određuje ukupnu antioksidativnu aktivnost u plazmi, a analiza HSA pokazala je da je kod bolesnika na programu hemodijalize smanjen sadržaj redukovane Cys34 tiolne grupe (od koje potiče antioksidativni potencijal HSA) i povećan stepen karbonilacije HSA. Stoga je drugi cilj ove disertacije bio da se *in vitro* ispita uticaj vezivanja komponenti ekstrakta smeše semenki lana, susama i golice, ferulinske kiseline (FE) i metabolita lignana (enterolaktona (EL) i enterodiola (ED), koji se povećavaju u cirkulaciji nakon konzumiranja namirnica bogatih biljnim lignanima), kao i masnih kiselina, na promenu konformacije HSA i reaktivnosti (antioksidativnog potencijala) Cys34 tiolne grupe, a da bi se sagledali mogući mehanizmi kojima komponente lana, susama i golice ostvaruju svoje *in vivo* efekte, pre svega antioksidativno dejstvo.

Analizom masnokiselinskih profila ukupnih lipidnih ekstrakata smeše semenki gasno-tečnom hromatografijom potvrđeno da je u semenkama lana najzastupljenija α -linolenska kiselina (ALA), a u semenkama susama i golice linolna kiselina (LA). Hladnoceđena ulja ispoljila su različitu antioksidativnu aktivnost (rafinisano suncokretovo ulje>maslinovo ulje>ulje lana>ulje golice> ulje susama) pri DPPH testu, u opsegu od 970 do 2000 μ mola TE/1000 g ulja. Sadržaj hidrofilnih antioksidanasa u hladnoceđenim uljima je veoma nizak, sem za hladnoceđeno maslinovo ulje. Pored lipofilnih antioksidanasa, pokazano je da metanolni ekstrakti obezmašćenih semenki (posebno lana) sadrže polifenole. Antioksidativna aktivnost ekstrakata,

određena DPPH i ABTS testom (lan>susam>golica), odgovarala je redosledu sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima.

Suplementacijom ishrane pacijenata na programu hemodijalize uočene su pozitivne promene parametara lipidnog statusa, glikoregulacije, krvnog pritiska i inflamacije u odnosu na vrednosti na početku studije. Kako je smeša semenki lan/susam/golica (3:1:1) značajan dijetarni izvor ALA, LA i oleinske kiseline (OA), došlo je do značajnog povećanja zastupljenosti ukupnih mononezasićenih, n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.001$) u fosfolipidima seruma na kraju studije. Prevođenje ALA u dugolančane n-3 masne kiseline (eikozapentaensku i dokozaheksaensku kiselinu) je prema literaturnim podacima ograničeno. Kako je kod osoba na hemodijalizi došlo je do značajnog porasta zastupljenosti ovih masnih kiselina tokom suplementacije, uočene promene u masnokiselinskim profilima mogle bi biti posledica promena u njihovom antioksidativnom statusu.

Ispitivanja u okviru ove disertacije potvrdila su da vezivanje stearinske kiseline (S) za HSA (pri odnosima 1:1, 2:1 i 4:1) povećava reaktivnost Cys34 tiolne grupe, ali je utvrđeno i da sastojci metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice utiču na njenu reaktivnost. Vezivanje S za HSA utiče kompetitivno na efekat sastojaka metanolnog ekstrakta golice na reaktivnost HSA-Cys34 tiolne grupe, što ukazuje da neke druge komponente ovog ekstrakta utiču na promene u reaktivnosti tiolne grupe, a ne masne kiseline.

Vezivanje FE za odmašćeni i S zamašćeni HSA ispoljava blage efekte na reaktivnost slobodne tiolne grupe. Sa druge strane, vrednosti konstanti brzine reakcije pseudo-prvog reda (k') HSA-Cys34 tiolne grupe, posle vezivanja EL i ED, u svim kompleksima sa HSA (sa i bez masnih kiselina) su povećane. Najizraženiji efekat (povećanje reaktivnosti za 33.1 %) dobijen je za kompleks odmašćeni HSA-EL, koji je pokazao sličnu reaktivnost tiolne grupe kao kompleks S/HSA 1:1 (vrednost k' $11.8 \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ naspram $11.6 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom). Vezivanje enterolignana za kompleks S/HSA 1:1 dovodi do dodatnog povećanja reaktivnosti, ali je ono manje izraženo (za oko 11 %). Dakle, uticaj FE i EL na reaktivnost tiolne grupe zavisi od molarnog odnosa vezanih masnih kiselina za HSA, u prisustvu S efekti FE i EL na povećanje reaktivnosti se smanjuju.

Fluorescentnom spektroskopijom utvrđeno je da pri vezivanju FE za kompleks S/HSA 4:1 dolazi do značajnih promena u načinu i afinitetu vezivanja u odnosu na komplekse sa odmašćenim HSA i S/HSA 1:1. Vrednosti konstanti vezivanja enterolignana za odmašćeni HSA, S/HSA 1:1 i S/HSA 4:1 nalaze se u opsegu od 1.92 do 11.64 x10⁴ M⁻¹. EL i ED se vezuju umerenim afinitetom za HSA vezujuće mesto II u subdomenu IIIA, pri čemu prisustvo S dovodi do smanjenja intenziteta interakcija u kompleksima HSA-enterolignani. Između vrednosti konstanti vezivanja enterolignana (EL, ED) za HSA i porasta reaktivnosti slobodne tiolne grupe utvrđena je visoka pozitivna korelacija (r=0.974). Ovo ukazuje da jačina interakcija između enterolignana (EL, ED) i HSA u subdomenu IIIA, i promena konformacije HSA indukovana ovim interakcijama, predstavlja značajan faktor koji utiče na porast reaktivnost i Cys34 tiolne grupe.

Značajan doprinos ove disertacije ogleda se u pokazanim pozitivnim efektima suplementacije ishrane bolesnika na hemodijalizi smešom semenki lan, susam i golica na masnokiselinske profile fosfolipida plazme i na pokazatelje kardiometaboličkog rizika. Značajan doprinos je i u *in vitro* karakterizaciji vezivanja komponenti navedenih semenki, FE i njihovih metabolita enterolignana, za HSA i sagledavanju uticaja vezivanja ovih jedinjenja na reaktivnost Cys34 tiolne grupe. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost modulacije reaktivnosti (antioksidativnog potencijala) HSA-Cys34 tiolne grupe fenolnim jedinjenjima, odnosno dijetarnim unosom hrane bogate lignanima pri suplementaciji ishrane. Ispitivanje kompeticije masnih kiselina i fenolnih jedinjenja pri vezivanju za HSA omogućilo je bolje razumevanje uticaja kompleksne smeše liganada na reaktivnost tiolne grupe, i ukazalo je na moguće razlike koje postoje u patološkim stanjima kada su u pitanju antioksidativna svojstva slobodne tiolne grupe HSA.

Ključne reči: lan, susam, golica, n-3 masne kiseline, n-6 masne kiseline, ferulinska kiselina, enterodiol, enterolakton, hemodijaliza, humani serum-albumin, antioksidativna aktivnost humanog-serum albumina, reaktivnost Cys34 tiolne grupe

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija proteina i hrane

UDK broj: 577.112

Seeds of flax, sesame and pumpkin and their extracts, ferulic acid and enterolignans: effects on the lipid status in patients on hemodialysis, binding to human serum albumin *in vitro* and influence on Cys34 thiol group reactivity

Abstract

It is known that seeds of flax, sesame, and pumpkin are rich in essential fatty acids, and represent significant dietary source of vitamin E and polyphenols. In patients with chronic renal insufficiency, on hemodialysis treatment, research topics about dietary supplementations with aims to reduce incidence of cardiovascular diseases, are actual. Therefore, the goal of this dissertation was to investigate the effects of diet supplementation with the mixture of flax, sesame, and pumpkin seeds in patients on hemodialysis.

The total antioxidative activity in plasma is significantly determined by antioxidative role of human serum albumin (HSA), and analysis of the HSA in patients on hemodialysis showed that the content of the free Cys34 thiol group (from which the HSA antioxidative potential originates) is reduced and on the other hand, degree of HSA carbonylation is increased. Thus, the second goal of this dissertation was *in vitro* investigation of the binding of flax, sesame, and pumpkin seeds extracts components, ferulic acid (FE) and lignan metabolites (enterolactone (EL), enterodiol (ED), which are increased in circulation after consumption of food rich with plants lignan), as well as fatty acids, on the conformational change of the HSA and on the reactivity (antioxidative potential) of Cys34 thiol group, with the final goal to perceive the possible mechanisms with which the flax, sesame, and pumpkin seeds explore *in vivo* antioxidative effects.

Analysis of fatty acids profiles of total lipid extracts of seeds mixture using gas-liquid chromatography, confirmed that flaxseeds are the most abundant with α -linolenic acid (ALA), and sesame and pumpkin with linoleic acid (LA). Cold pressed oils showed different antioxidative activity (refined sunflower oil>olive oil>flaxseed oil>pumpkin oil>sesame oil) in the DPPH test (ranged from 970 to 2000 $\mu\text{mol TE}/1000\text{g oil}$). Content of hydrophilic antioxidants in cold pressed oils was extremely low, except for cold pressed olive oil. Besides lipophilic antioxidants, it was shown that methanol extracts of defatted seeds (particularly flaxseed) contain polyphenols. Antioxidative activity of the extracts (flax>sesame>pumpkin seeds), determined using DPPH and ABTS tests, was corresponded to the contents of total phenols in extracts.

Using dietary supplementation of patients on hemodialysis, positive changes in parameters of lipid status, gluco-regulation, blood pressure, and inflammation have been identified comparing to the values from the study beginning. As the mixture of flaxseed/sesame/pumpkin seeds (3:1:1) represents significant dietary source of ALA, LA, and oleic acid (OA), a significant increase in abundance of monounsaturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.001$) in serum phospholipids at the end of the study, was found. Conversion of ALA to the long-chain n-3 fatty acids (eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acid) is limited according to present literature data. Because in patients on hemodialysis the content of those fatty acids was significantly increased during supplementation, obtained changes in fatty acids profiles could be a consequence of their antioxidative status changes.

The increase of the Cys34 thiol group reactivity influenced by stearic acid (S) binding to the HSA (in 1:1, 2:1, and 4:1 ratios) was confirmed in this dissertation, but it was also shown that compounds from methanol extracts of defatted flaxseed, sesame, and pumpkin, influence on its reactivity. As the effect of the pumpkin seeds methanol extract compounds on the reactivity of the HSA-Cys34 group is competitively influenced by binding of S to HSA, it could be concluded that some other extract components lead to the changes of thiol group reactivity, rather than fatty acids.

Binding of FE to the defatted and S re-fatted HSA expressed mild effects on the free thiol group reactivity. On the other hand, the values of pseudo-first order rate constants (k') of HSA-SH group with DTNB, obtained after binding of EL and ED to all HSA complexes (with and without fatty acids), were increased. The most pronounced increase (of 33.1 %) in reactivity was obtained for the defatted HSA-EL thiol group, and it was almost equal to the thiol group reactivity of S/HSA 1:1 complex (k' values: $11.8 \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $11.6 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectively). Binding of enterolignans to the S/HSA 1:1 complex, leads to further increase of reactivity, but it is less pronounced (about 11 %). Thus, the influence of FE and EL on the reactivity of the thiol group depends on bound fatty acids/HSA molar ratio. In the presence of S, the effects of FE and EL on increase of Cys34 thiol group reactivity is less pronounced.

Using fluorescence spectroscopy it was shown that FE binding to the complex S/HSA 4:1 produces the significant changes in the way and affinity of binding, compared to the complexes with defatted HSA and S/HSA 1:1. Values of the binding constants of enterolignans to the

defatted HSA, S/HSA 1:1, and S/HSA 4:1 were in the range from 1.92 to 11.64 x 10⁴ M⁻¹. EL and ED bind to site II in subdomain IIIA of HSA with medium binding affinity, wherein presence of the S leads to decrease in the intensity of interactions between HSA and enterolignans. A high positive correlation ($r=0.974$) between the values of EL, ED-HSA binding constants and increases of free thiol group reactivities was determined. Thus, the strength of interactions among enterolignans (EL, ED) and HSA in subdomain IIIA, and change of HSA conformation induced with these interactions represent significant factor that influences on Cys34 thiol group reactivity increase.

Significant contribution of this dissertation is reflected in positive effects of diet supplementation (with mixture of flax, sesame, and pumpkin seeds), found in patients on hemodialysis, on the fatty acids profiles of plasma phospholipids and on the cardio-metabolic risk markers. Significant contribution is also *in vitro* characterization of the binding of seeds components, fatty acids, FE, and enterolignans metabolites to HSA, as well as in perceiving of the competitive effects of their binding on the reactivity of the Cys34 thiol group. In addition, the obtained results pointed out possibility of the modulation of HSA-Cys34 reactivity (antioxidative potential) with phenolic compounds, i.e. during dietary consumption of food rich in lignans. Investigation of the competition between fatty acids and phenolic compounds during binding to the HSA allowed better understanding of the influence of complex mixture of ligands on the reactivity of thiol group, and pointed out possible differences presented in pathologies when antioxidative properties of free thiol group of the HSA were in the focus.

Keywords: flaxseed, sesame, pumpkin seed, n-3 fatty acids, n-6 fatty acids, ferulic acid, enterodiol, enterolactone, hemodialysis, human serum albumin, antioxidative properties of the human serum albumin, Cys34 thiol group reactivity.

Scientific field: Biochemistry

Special topic: Biochemistry of proteins and foods

UDC number: 577.112

LISTA SKRAĆENICA

AA - arahidonska kiselina - eng. arachidonic acid

AAPH - 2, 2- azobis (2-amidinopropan)-dihlorid

ABTS - 2, 2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina

AFP - α -fetoprotein-eng. α -fetoprotein

ALA - α -linolenska kiselina - eng. α -linolenic acid

ATP- adenzin trifosfat

BHT - 2, 6-di-terc-butic-4-metilfenol

BMI-eng. body mass index

BSA - goveđi serum-albumin-eng. bovine serum albumin

CAT – katalaza - eng. catalase

COX – ciklooksigenaza - eng. cyclo-oxigenase

CRP – C - reaktivni protein

DAG- diacilgliceroli

D5D - Δ^5 desaturaza

D6D - Δ^6 desaturaza

DDT - ditiotreitol

DGLA - dihomogama linolenska kiselina - eng. dihommo-gamma-linolenic acid

DHA - dokozaheksaenska kiselina - eng. docosaheenoic acid

DMSO- dimetil-sulfoksid

DPA - dokozopentaenska kislina - eng. docosopentaenoic acid

DPPH - 1, 1- difenil-2-pikrilhidrazin

DTNB- 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)

ED - enterodiol

EL - enterolakton

Elo - elongaza

EPA - eikozapentaenska kiselina - eng. eicosapentaenoic acid

FFA–HSA- vezane FFA za HSA

FC reagens – Folin Ciocalteu reagens

FFA - ne-esterifikovane masne kiseline - eng. free fatty acids

FE - ferulinska kiselina

GLC- gasno-tečna hromatografija

GSH – glutation - eng. glutathion

GSPx - glutation peroksidaza - eng. glutathion peroxidase

DBP - dijastolni krvni pritisak - eng. diastolic blood pressure

HDL – lipoproteinske čestice velike gustine - eng. high density lipoprotein

HMA - redukovani humani serum albumin, merkptoalbumin

HMG-CoA - 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A - eng. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

HNA - oksidovani humani ne-merkptoalbumin

HOMA-IR- eng. homeostasis model assessment

HP-TLC- tankoslojna hromatografija visokih performansi

HSA - humani serum-albumin - eng. human serum albumin

HSA-SNHR₂ - sulfonamid humanog - serum albumina

HSA-S-NO - humani serum albumin kod koga je cisteinski ostatak Cys34 modifikovan sa azot (II) monoksidom

HSA-SO₂H - humani serum albumin kod koga se cisteinski ostatak Cys34 nalazi u obliku sulfinske kiseline

HSA-SO₃H - humani serum albumin kod koga se cisteinski ostatak Cys34 nalazi u obliku sulfonske kiseline

HSA-S(O)SR₃ - tiosulfid humanog-serum albumina

HSA-S-S-R - mešoviti disulfid humanog serum-albumina sa malim tiolima

IL-6 - interleukin 6 - eng. interleukine-6

K_A- konstanta vezivanja

K_a- konstanta vezivanja

(k') - konstanta brzine pseudo-prvog reda

K_{SV}- Stern-Volmerove konstante gašenja fluorescence

k_q- konstanti brzine gašenja fluorescencije

LA - linolna kiselina - eng. linoleic acid

LDL - lipoproteinske čestice male gustine-eng. low density lipoprotein

LOX – lipooksigenaza - eng. lipo-oxygenase

MA - miristinska kiselina - eng. myristic acid

MAG- monoacilgliceroli

MDA - malon-dialdehid

MUFA - mononezasićene masne kiseline - eng. monounsaturated fatty acids

NMR - nuklearna magnetna rezonanca

OA - oleinska kiselina - eng. oleic acid

PA - palmitinska kiselina - eng. palmitic acid

PL-fosfolipidi

PPAR - eng. peroxisome proliferator-activated receptors

PUFA - polinezasićene masne kiseline - eng. polyunsaturated fatty acids

S - stearinska kiselina - eng. stearic acid

SBPr - steroid-vezujući protein - eng. steroid binding protein

SBP – sistolni krvni pritisak - eng. systolic blood pressure

SDG - sekoizolaricirezinol-diglukozida

SFA - zasićene masne kiseline - eng. saturated fatty acids

SOD - superoksid dismutaza - eng. superoxide dismutase

TAG - triacilgliceroli

TC - ukupni holesterol - eng. total cholesterol

TCA- trihlor sirćetna kiselina

TE- Trolox ekvivalenti

TLC – tanko slojna hromatografija - eng. thin layer chromatography

TNF- α – tumor nekroziz faktor- α - eng. tumor necrosis factor- α

TRIS- tris-(hidroksimetil)-aminometan

VLDL - lipoproteinskečesticeveoma male gustine - eng. very low density lipoprotein

SADRŽAJ

	Strana
1. Uvod	1
2. Pregled literature	
2.1. Semenke lana, susama i golice su značajan dijetarni izvor esencijalnih masnih kiselina i antioksidanasa	4
2.1.1. Semenke lana, susama i golice su dijetarni izvor esencijalnih masnih kiselina	4
2.1.1.1. Metabolizam esencijalnih masnih kiselina;aktivnost elongaza i desaturaza	5
2.1.1.2. Efekat n-3 masnih kiselina na faktore povezane sa razvojem kardiovaskularnih oboljenja (hiperlipidemija, insulinska senzitivnost, hipertenzija, oksidativni stres, inflamacija)	7
2.1.2. Antioksidativni potencijal semenki lana, susama i golice	8
2.1.2.1. Semenke lana, susama i golice kao dijetarni izvor vitamina E	8
2.1.2.2. Semenke lana, susama i golice - dijetarni izvorlignana	10
2.1.2.2.1. Lignani u semenkama lana	11
2.1.2.2.2. Lignani u semenkama susama	11
2.1.2.2.3. Semenke golice kao dijetarni izvori lignana	12
2.1.2.2.4. Biljni lignani se u gastrointestinalnom traktu transformišu u enterolignane	13
2.1.2.3. Semenke lana, susama i golice - dijetarni izvori fenolnih kiselina	14
2.2.Hronična bubrežna insuficijencija-status esencijalnih masnih kiselina i antioksidativni status	15
	18
2.3. Humani serum-albumin-struktura i funkcije	
2.3.1. Struktura humanog serum-albumina	18
2.3.2. Uloga humanog serum-albumina u transportu egzogenih i	

<i>endogenih supstanci</i>	19
<i>2.3.2.1. Vezujuća mesta za masne kiseline na molekulu humanog serum-albumina</i>	20
<i>2.3.2.2. Glavna mesta vezivanja endogenih liganada (I i II)</i>	22
<i>2.3.2.3. Uticaj vezivanja masnih kiselina na vezivanje liganada za glavna vezujuća mesta I i II</i>	23
<i>2.4. Interakcije polifenola sa albuminom</i>	24
<i>2.4.1. Interakcije lignana i albumina</i>	24
<i>2.4.2. Interakcije ferulinske kiseline sa albuminom</i>	25
<i>2.5. Antioksidativna uloga humanog serum-albumina</i>	28
<i>2.5.1. Reaktivnost slobodne tiolne grupe Cys34 humanog serum-albumina</i>	31
<i>2.5.2. Uticaj vezivanja masnih kiselina na reaktivnost tiolne grupe Cys34 humanog serum albumina</i>	32
<i>2.5.3. Uticaj His39 i Tyr84 na reaktivnost HSA Cys34 tiolne grupe</i>	32
<i>2.5.4. Primena komercijalnih preparata humanog serum-albumina</i>	35
<i>3. Materijali i metode</i>	
<i>3.1. Hemikalije</i>	36
<i>3.2. Aparati korišćeni pri radu</i>	36
<i>3.3. Metode</i>	37
<i>3.3.1. Estrakcija ukupnih lipida modifikanom metodom po Folch-u</i>	37
<i>3.3.2. Razdvajanje klasa lipida TLC hromatografijom</i>	37
<i>3.3.3. Hidroliza lipida i derivatizacija masnih kiselina</i>	38
<i>3.3.4. Analiza metil-estara masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom</i>	38
<i>3.3.5. Priprema metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki semenki lana, susama i golice</i>	39

3.3.6. Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja	40
3.3.7. Određivanje antioksidativnog kapaciteta hladno-ceđenih ulja i metanolnih ekstrakata semenki	40
3.3.7.1. DPPH test	40
3.3.7.2. ABTS test	42
3.3.8. Izbor pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, na programu hemodijalize, za suplementaciju ishrane	43
3.3.9. Suplementacija ishrane pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, na programu hemodijalize, smešom semenki	44
3.3.9.1. Anketni upitnik za uremijski pruritus	44
3.3.10. Određivanja biohemijskih parametara u serumu	44
3.3.10.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fosfolipida seruma	44
3.3.10.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze, triacilglicerola, ukupnog i HDL-holesterola u serumu	45
3.3.10.2. 1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze	45
3.3.10.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije triacilglicerola u serumu	46
3.3.10.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnog holesterola	47
3.3.10.2.4. Određivanje koncentracije HDL-holesterola	49
3.3.10.2.5. Izračunavanje koncentracije LDL-holesterola	50
3.3.10.3. Određivanje koncentracije insulina	50
3.3.10.3.1. Izračunavanje HOMA-IR vrednosti	50
3.3.10.4. Određivanje koncentracije faktora inflamacije	50
3.3.11. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina	50
3.3.12. Određivanje koncentracije tiola Ellman-ovim reagensom	51
3.3.13. Određivanje konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda	52
3.3.14. Priprema uzoraka HSA za in vitro ispitivanja	52
3.3.14.1. Redukcija komercijalnog HSA	52

3.3.14.2. <i>Odmašćivanje HSA</i>	53
3.3.14.3. <i>Zamašćivanje uzorka HSA</i>	53
3.3.14.4. <i>Pripremanje uzoraka HSA određenog sadržaja Cys34 tiolne grupe</i>	54
3.3.15. <i>Fluorescentno-spektroskopska ispitivanja vezivanja liganada za HSA</i>	54
3.4. <i>Statistička obrada rezultata</i>	56
4. <i>Rezultati i diskusija</i>	
4.1. <i>Masnokiselinski sastav lipida semenki lana, susama i golice</i>	57
4.2. <i>Analiza masnokiselinskih profila i klasa lipida u metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki lana, susama i golice</i>	63
4.3. <i>Analiza antioksidativnog potencijala ulja i metanolnih ekstrakata semenki lana, susama i golice</i>	70
4.3.1. <i>Antioksidativni potencijal hladno-cedenih ulja lana, susama i golice</i>	70
4.3.2. <i>Antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki</i>	74
4.4. <i>Suplementacija ishrane pacijenata na hemodijalizi smešom semenki lan/susam/golica</i>	76
4.4.1. <i>Uticaj suplementacije na lipidni status pacijenata na hemodijalizi</i>	77
4.4.2. <i>Suplementacija ishrane pacijenata na hemodijalizi smešom semenki dovodi do snižavanja krvnog pritiska</i>	79
4.4.3. <i>Promena parametara glikoregulacije pri suplementaciji ishrane pacijenata na hemodijalizi smešom semenki</i>	80

4.4.4. Efekat suplementacije na faktore inflamacije osoba na hemodijalizi	81
4.4.5. Efekat suplementacije smešom semenki na masnokiselinske profile PL seruma kod osoba na hemodijalizi	82
4.5. Reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA	86
4.5.1. Uticaj vezivanja stearinske kiseline za HSA reaktivnost slobodne Cys34 tiolne grupe	87
4.5.2. Ispitivanje uticaja sastojaka metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA	91
4.5.3. Uticaj vezivanja FE za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe	95
4.5.4. Ispitivanje uticaja vezivanja EL i ED za HSA na reaktivnost njegove Cys34 grupe	98
4.6. Ispitivanje interakcija FE i enterolignana sa HSA fluorescentnom spektroskopijom	102
4.6.1. Ispitivanje interakcija FE sa HSA fluorescentnom spektroskopijom	102
4.6.1.1. Efekat vezivanja FE na fluorescenciju HSA	102
4.6.1.2. Karakterizacija vezivanja FE za HSA i komplekse S/HSA	105
4.6.2. Interakcije EL i ED sa HSA	107
4.6.2.1. Fluorescentni spektri kompleksa enterolignana i HSA	107
4.7. Mesta vezivanja EL i ED za HSA	114
4.8. Povezanost afiniteta vezivanja FE, EL i ED za HSA sa promenom reaktivnosti Cys34 tiolne grupe	119

5. Zaključak	121
6. Literatura	126

1. UVOD

Semenke lana, susama i golice predstavljaju značajne dijetarne izvore polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), ali se njihovi masnokiselinski profili međusobno razlikuju. Sadržaj α -linolenske kiseline (18:3 n-3, ALA) izuzetno je visok u lanenom semenu (oko 50 %), a semenke susama i golice bogate su linolnom (18:2 n-6, LA) i oleinskom kiselinom (18:1 n-9, OA). Važeće preporuke za unos lipida ističu značaj odnosa n-6/n-3 PUFA u ishrani, zbog čega su ispitivanja sadržaja PUFA u semenkama lana, susama i golice od izuzetne važnosti.

Za semenke bogate uljima karakteristično je prisustvo značajnih količina liposolubilnih antioksidanasa, izomera vitamina E. Semenke lana i susama pored vitamina E, sadrže i značajne količine drugih antioksidanasa. Lignani su sekundarni metaboliti biljaka, koji su privukli veliku pažnju zbog ispoljenih fizioloških funkcija, najviše u prevenciji koronarnih bolesti, kancera i inflamacije, a semenke lana i susama predstavljaju najbogatije poznate dijetarne izvore lignana. Određene količine lignana identifikovane su i u semenkama golice. Biljni lignani se u gastrointestinalnom traktu prevode u metabolite enterolignane, čija se koncentracija u cirkulaciji povećava prilikom konzumiranja namirnica bogatih lignanima. Fenolne kiseline su veoma rasprostranjene u biljnim namirnicama, a za semenke lana, susama i golice potvrđeno je prisustvo ferulinske kiseline (FE).

Zastupljenost n-3 esencijalnih masnih kiselina je snižena kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću u odnosu na zdrave osobe. Istovremeno, kod pacijenata na programu hemodijalize oksidativni stres je povećan u odnosu na zdrave osobe i pretpostavlja se da doprinosi visokoj stopi nastanka kardiovaskularnih oboljenja kod ove grupe pacijenata. Promene u lipidnom statusu, glikoregulaciji, pojava hipertenzije i hronična inflamacija, karakteristične za bolesnike na hemodijalizi, mogle bi biti povezane sa masnokiselinskim i antioksidativnim statusom u njihovoj krvi i tkivima, što daje osnov za sprovođenje nutritivne intervencije ishranom obogaćenom esencijalnim masnim kiselinama i antioksidansima.

Ispitivanja suplementacije ishrane bolesnika na programu hemodijalize, uljem i/ili semenkama lana, veoma su aktuelna zbog njihovog visokog sadržaja ALA, međutim, u većini publikovanih rezultata interventnih studija nisu praćene promene u status masnih kiselina tokom suplementacije ishrane. Kako status masnih kiselina u krvi i tkivima, pored dijetarnog unosa,

određuje i njihov metabolizam i antioksidativni status, praćenje promena u masnokiselinskim profilima ispitanika tokom studije suplementacije je od velikog značaja.

Obezmaščene semenke lana, susama i golice predstavljaju otpadni industrijski materijal u toku proizvodnje ulja, a prema literaturnim podacima njihovi metanolni ekstrakti pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost, zbog prisustva jedinjenja sa fenolnom strukturom. Brojne *in vitro* studije pokazale su antioksidativni potencijal ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima, ali su mehanizmi *in vivo* antioksidativnog delovanja tema intenzivnih istraživanja. Pojedine studije pokazale su da suplementacija ishrane polifenolima dovodi do porasta nivoa PUFA, kao indirektnih pokazatelja lipidne peroksidacije u organizmu.

Humani serum-albumin (HSA) učestvuje u transport brojnih endogenih i egzogenih jedinjenja, a istovremeno predstavlja jedan od najvažnijih vanćelijskih antioksidanasa. Antioksidativni potencijal HSA potiče od prisustva slobodne tiolne grupe ostatka Cys34, ali i od njegove sposobnosti da veže jone metala. Oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi nekih bolesti, kao što su dijabetes, alkaptonurija, preeklampsija, apnea i bolesti jetre, bubrega i srca, i povezan je sa smanjenjem sadržaja slobodne tiolne grupe HSA usled reakcije tiolne grupe sa reaktivnim oksidativnim vrstama.

U brojnim studijama ispitivano je vezivanje različitih fenolnih jedinjenja za HSA, i pokazano je da čak i male razlike u njihovoj strukturi značajno utiču na vezivanje za molekule HSA. Utvrđeno je, takođe, da pri vezivanju fenolnih jedinjenja za HSA dolazi do promena konformacije molekula ovog proteina. Međutim, do sada nije ispitivan uticaj vezivanja jedinjenja sa fenolnom strukturom na reaktivnost slobodne tiolne grupe Cys34, odnosno na njen antioksidativni potencijal. Stoga je jedan od ciljeva ove disertacije *in vitro* ispitivanje uticaja vezivanja jedinjenja sa fenolnom strukturom, prisutnih u metanolnim ekstraktima obezmaščених semenki (lana, susama i golice), za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe. Rezultati istraživanja u ovoj oblasti mogu doprineti sagledavanju mogućnosti primene fenolnih jedinjenja u modulaciji antioksidativnog potencijala Cys34 tiolne grupe, odnosno molekula HSA.

Jedna od komponenti metanolnih ekstrakata semenki, prema literaturnim podacima, je FE. Utvrđeno je da se ona vezuje za molekul govedeg serum albumina (BSA) i/ili HSA u okviru subdomena IIA, odnosno za vezujuće mesto I. Afinitet FE za BSA ili HSA ispitivan je u

nekoliko studija različitim metodama (fluorescentna spektroskopija, nuklearna magnetna rezonanca (NMR), afinitetna kapilarna elektroforeza, izotermalna mikrokalorimetrija), ali se dobijene konstante vezivanja FE za HSA/BSA značajno razlikuju, kao i rezultati o tome koji tip interakcija je najznačajniji prilikom vezivanja FE za HSA.

U cirkulaciji se pored fenolnih jedinjenja iz hrane pojavljuju i njihovi metaboliti - enterolignani (enterolakton (EL) i enterodiol (ED), čiji je sadržaj posle konzumiranja namirnica bogatih lignanima povećan i u urinu). Do sada nije ispitivano njihovo vezivanje (tip vezivanja - statičko, dinamičko, konstante vezivanja, broj mesta vezivanja, karakterizacija mesta vezivanja) za molekule HSA, uticaj vezivanja na promenu konformacije HSA molekula i posledično na promenu reaktivnosti Cys34 grupe HSA. Rezultati ovih ispitivanja mogu doprineti rasvetljavanju biološkog efekta konzumiranja namirnica bogatih lignanima.

Za određena fiziološka (npr. gladovanje, intenzivna fizička aktivnost) i patološka stanja (kao što je hronična bubrežna slabost), karakteristično je da se povećava molarni odnos ne-esterifikovanih masnih kiselina (FFA)/HSA u cirkulaciji. Do sada je pokazano da vezivanje FFA dovodi do značajnih konformacionih promena molekula HSA i do povećanja reaktivnosti Cys34 tiolne grupe HSA. Kako se mesta vezivanja masnih kiselina i fenolnih jedinjenja preklapaju, ispitivanje kooperativnih i kompetitivnih interakcija liganada (masnih kiselina i fenolnih jedinjenja) pri vezivanju za HSA i posledica ovih vezivanja, posebno na reaktivnost Cys34 tiolne grupe, ima veliki značaj.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Semenke lana, susama i golice su značajan dijetarni izvor esencijalnih masnih kiselina i antioksidanasa

Konзумiranje lana, susama i golice daje povoljne efekte na zdravlje ljudi. Semenke lana, susama i golice su značajan dijetarni izvor PUFA i antioksidanasa, pa je ispitivanje njihovih sadržaja i posledično efekata na zdravlje tema brojnih, pa i naših ispitivanja.

2.1.1. Semenke lana, susama i golice su dijetarni izvor esencijalnih masnih kiselina

Sve je više dokaza koji potvrđuju da dijetarni unos različitih vrsta lipida nema istovetan efekat na zdravlje (Ristić-Medić, 2013). Postoji više različitih preporuka (FAO, 1994; ISSFAL, 2004; NHMRC, 2003; Eurodiet, 2000) vezanih za dijetarni unos lipida, koje generalno ukazuju da treba smanjiti ukupan unos lipida, ograničiti unos zasićenih masnih kiselina (SFA) i obezbediti adekvatne količine PUFA. Smernice za unos lipida ističu i veliki značaj odnosa zastupljenosti n-6/n-3 PUFA u ishrani, uz preporuke da se unose adekvatne količine n-3 PUFA.

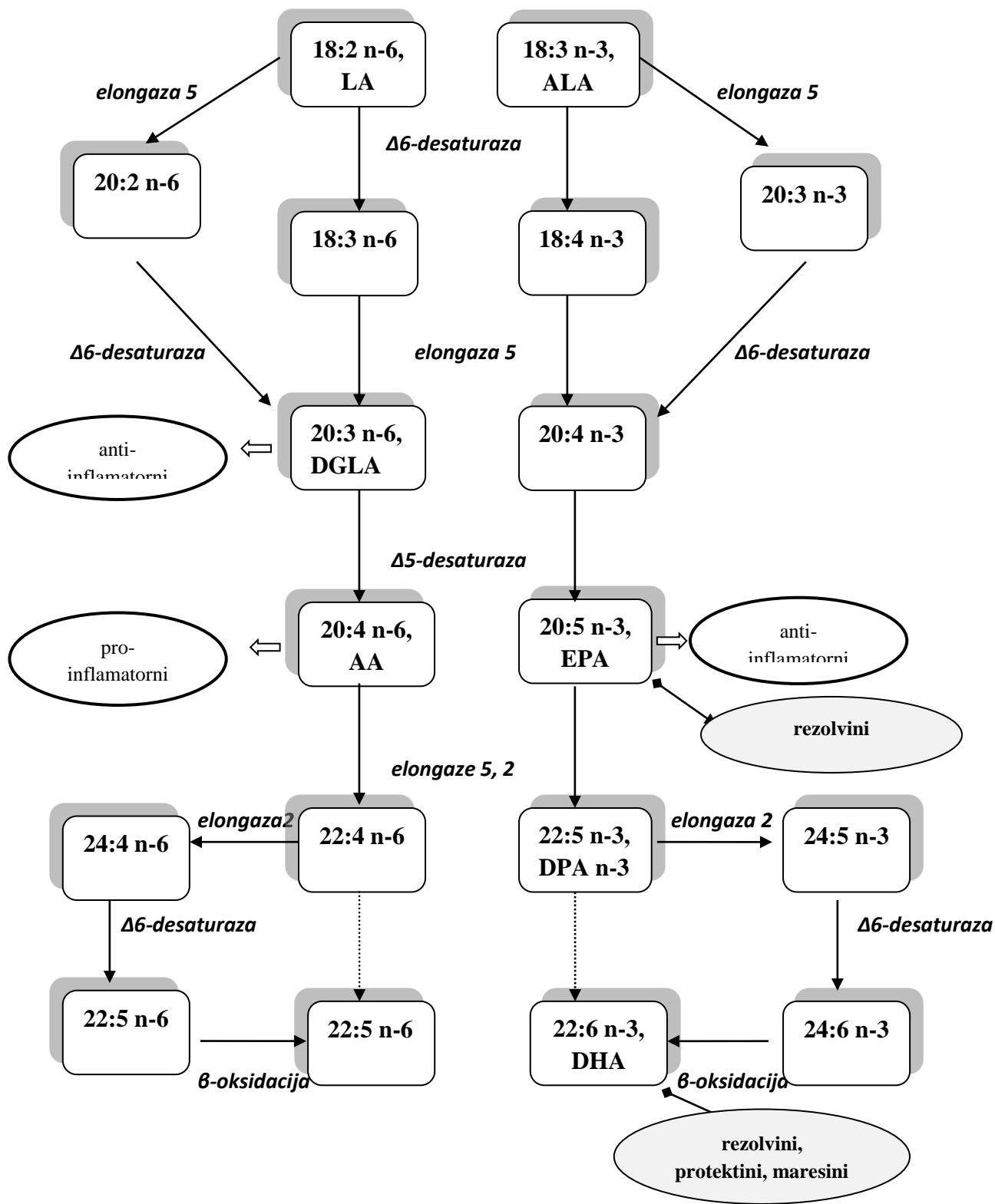
Biljna ulja i semenke bogate uljima su značajan dijetarni izvor kako n-6, istovremeno i n-3 PUFA, jer se i njihovi masnokiselinski sastavi značajno razlikuju (Dubois, 2007). U uljima susama i golice najzastupljenija je LA sa oko 50 %. Međutim, ulja golice i susama mogla bi se značajno razlikovati po sadržaju OA. OA je u uljima susama zastupljena sa oko 40 %, dok podaci za ulje golice pokazuju da ono sadrži oko 25 % (Dubois, 2007), odnosno oko 40 % OA (Rabrenović, 2014). Sadržaj ALA, izuzetno je visok u lanenom ulju (50-55 %). Kako biljna ulja predstavljaju najznačajniji izvor ALA, zastupljenost ove masne kiseline je od izuzetnog značaja za nutritivnu vrednost ulja. Druga ulja, koja sadrže značajne količine ALA, su sojino (7.8 %), ulje konoplje (19.7 %), uljane repice (9.9 %) i oraha (10 %) (Dubois, 2007).

2.1.1.1. Metabolizam esencijalnih masnih kiselina; aktivnost elongaza i desaturaza

Za ostvarivanje bioloških efekta dijetarnog unosa PUFA, ključnu ulogu igra i njihov metabolizam, koji se zasniva na aktivnosti desaturaza i elongaza. LA i ALA predstavljaju esencijalne masne kiseline za sisare i kako se ne mogu sintetisati, obezbeđuju se isključivo ishranom. Aktivnošću desaturaza Δ^5 (D5D, gen FADS1), Δ^6 (D6D, gen FADS2) i elongaza (Elo-2, Elo-5, Elo-4) LA i ALA se prevode u dugolančane PUFA n-6 i n-3 serije (Slika1). Potvrđeno je postojanje klasičnog i alternativnog metaboličkog puta, kojim se direktno 20:2 n-6 pretvara u arahidonsku kiselinu (20:4 n-6, AA) (Slika 1). Međutim, kako proizvod FADS2 gena pokazuje veću Δ^6 -desaturaznu aktivnost prema LA, odnosno ALA kao supstratu u odnosu na 20:2 n-6, klasičan put se favorizuje (Park,2009). Iako su isti enzimi uključeni u sintezu dugolančanih PUFA n-6 i n-3 serija masnih kiselina, između ALA i LA postoji kompeticija, pa odnos LA/ALA, odnosno n-6/n-3 u ishrani utiče na akumulaciju dokozeheksaenske kiseline (22:6 n-3, DHA).

Delovanjem lipoksigenaze (LOX) i ciklooksigenaze (COX) nastaju pro-inflamatorni eikozanoidi iz AA, kao i anti-inflamatorni eikozanoidi iz eikozapentaenske kiseline (20:5 n-3, EPA). Takođe, prostaglandini serije-1 i tromboksani, koji nastaju iz dihomogama-linolenske kiseline (20:3 n-6, DGLA) pokazuju anti-inflamatorni, vazodilatatorni i anti-agregacijski efekat. Pored stvaranja eikozanoida, metabolizmom EPA i DHA generišu se rezolvini, protektini i maresini, koji takođe igraju značajnu ulogu u imunom odgovoru (Slika 1).

Postavlja se pitanje da li se ishranom sa odgovarajućim unosom ALA može obezbediti adekvatna količina DHA za tkiva? I da li unos biljnih ulja bogatih sa ALA, može obezbediti adekvatne nivoe EPA i DHA? Pokazano je da je efikasnost pretvaranja ALA u EPA ograničena (10 %), a u DHA i slabija (manje od 5 %), a to je pokazano i za prevođenje EPA u DHA (Burdge 2002; Burdge, 2002a; Brenna, 2002). Istovremeno, prevođenje ALA u DHA je efikasnije kod žena (10 %) nego kod muškaraca (<1 %) (Burdge, 2002a). Međutim, istraživanja Igarashi i saradnika (2008) pokazuju da jetra povećava pretvaranje ALA u DHA kada je nivo n-3 masnih kiselina nizak i da je u potpunoj meri sposobna da obezbedi potrebne količine DHA.



Slika 1. Shematski prikaz elongacije/desaturacije esencijalnih masnih kiselina

2.1.1.2. Efekat n-3 masnih kiselina na faktore povezane sa razvojem kardiovaskularnih oboljenja (hiperlipidemija, insulinska senzitivnost, hipertenzija, oksidativni stres, inflamacija)

Za dijetarni unos n-3 masnih kiselina (ALA, EPA, DHA) pokazao je da dovodi do smanjenja kliničkih parametara povezanih sa nastankom i razvojem kardiovaskularnih oboljenja: hiperlipidemije (Mandasescu, 2005; Lucas, 2002; Valdivielso, 2009), hipertenzije (Paschos, 2007; Lungerhausen, 1994) i inflamacije (He, 2009; Cornish, 2009). Rezultati studija o uticaju ovih masnih kiselina na oksidativni stres su neusaglašeni, ali EPA i DHA utiču na nivo enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu (Tayyebi-Khosroshahi, 2010). Istovremeno, za veće dijetarne doze EPA i DHA pokazan je pro-oksidativni efekat na životinjskim modelima (Poudyal, 2011). Studije na životinjskim modelima su pokazale da dolazi do povećanja osetljivosti ćelija na insulin (Sener, 2010), dok kod ljudi nakon suplementacije sa n-3 PUFA nije bila uočena promena u osetljivosti na insulin (Fakhrzadeh, 2010).

Kada se uporede efekti sve tri n-3 PUFA (ALA, EPA i DHA) na osetljivost na insulin, hipertenziju i inflamaciju, one ostvaruju uporedive efekte, što ukazuje na sličan mehanizam delovanja. Kako ALA pokazuje veći afinitet za D6D nego LA, fiziološki efekti ALA mogli bi se ostvarivati ne direktno, već posle prevođenja u EPA i eventualno u DHA (Poudyal, 2011).

Međutim, utvrđene su značajne razlike za efekte suplementacije ALA i EPA+DHA na lipidni status. Suplementacija ishrane sa 20 do 50 g lanenog semena/dnevno bogatog sa ALA kod osoba sa hiperlipidemijom i žena u postmenopauzi rezultovalo je sniženjem ukupnog, LDL-holesterola i HDL-holesterola (Mandasescu, 2005; Lucas, 2002). Dijetarni unos 3 do 4 g EPA+DHA pokazao je pozitivan efekat na lipidni status, snižavajući nivo triacilglicerola (TAG) i povećavajući nivo HDL-holesterola kod hiperlipidemičnih osoba i obolelih od dijabetesa tipa 2 (Valdivielso, 2009). Glavni doprinos razlikama u ostvarenim efektima na lipidemiju pripisuju se uticaju EPA i DHA na oksidaciju i sintezu masnih kiselina na nivou ekspresije enzima (peroksizomalna acil-CoA oksidaze, karnitin-palmitoil-transferaze, lipoproteinske i hepatične lipaze) uključenih u metabolizam masnih kiselina preko aktivacije peroksizom aktivator proliferirajući receptori α i γ (Poudyal, 2011).

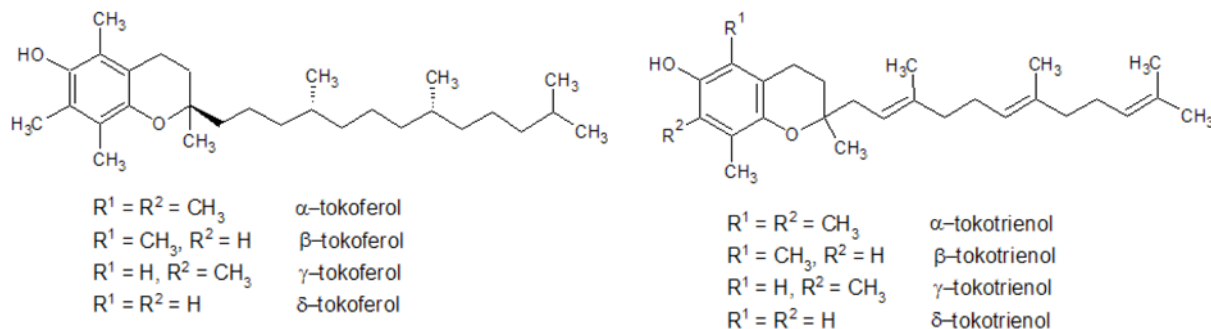
Zastupljenost esencijalnih masnih kiselina smanjena je u serumu i tkivima u brojnim patološkim stanjima (Ristić-Medić, 2013). Stoga suplementacija ishrane smešom semenki bogatih n-3 PUFA može biti jedna od dijetarnih mera koja se preporučuje obolelima u cilju prevencije i smanjenja incidence kardiovaskularnih oboljenja.

2.1.2. Antioksidativni potencijal semenki lana, susama i golice

Semenke lana, susama i golice nisu samo bogate uljima sa visokim sadržajem PUFA, već i jedinjenjima sa antioksidativnom aktivnošću (vitaminom E, lignanima i fenolnim kiselinama), supstancama koje prisutne u niskoj koncentraciji u poređenju sa oksidansom, značajno smanjuju ili preveniraju oksidaciju supstrata.

2.1.2.1. Semenke lana, susama i golice kao dijetarni izvor vitamina E

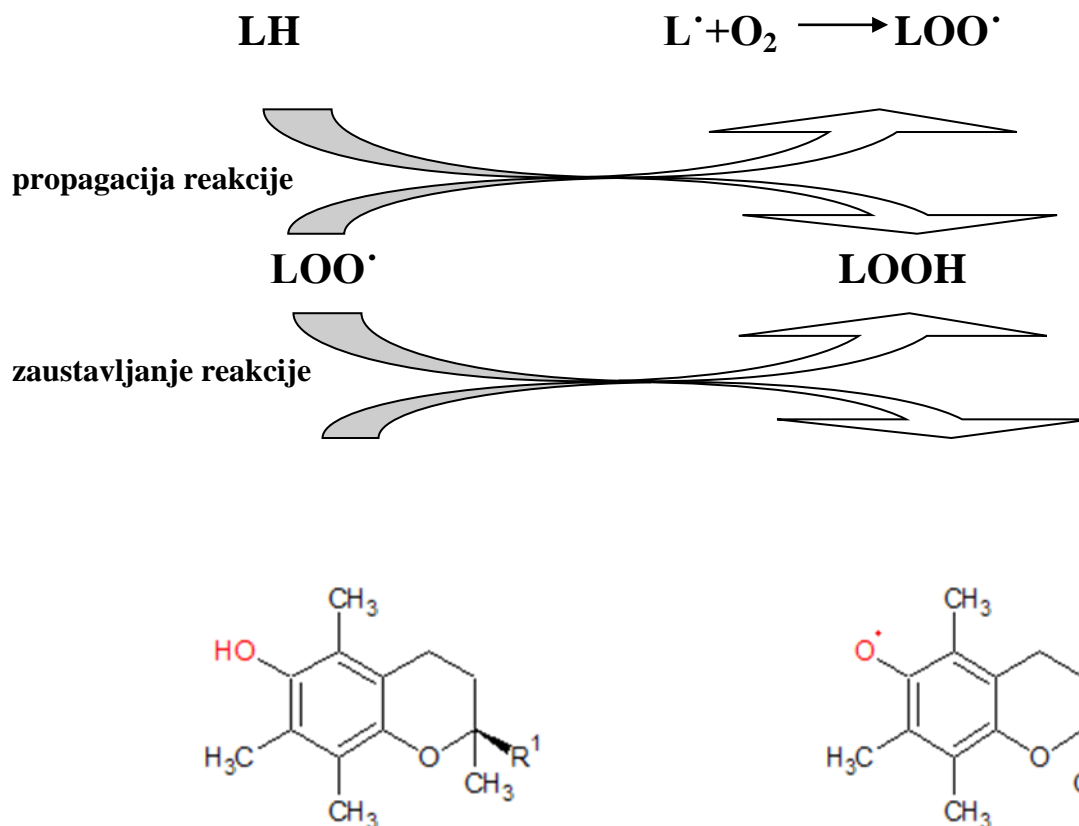
Značajni dijetarni izvori vitamina E su biljna ulja, među kojima i ulja lana, susama i golice. Tokoferoli i tokotrienoli su antioksidansi rastvorni u lipidima, sa hromanolskim prstenom i hidrofobnim bočnim nizom (fitil- u slučaju tokoferola, izoprenil- u slučaju tokotrienola) (Slika 2) i njih zajednički nazivamo vitaminom E. Izomeri tokoferola i tokotrienola (α -, β -, γ - i δ -) razlikuju se po broju i poziciji metil-supstituenata na hromanolskom prstenu, a razlike u strukturi izomera određuju njihovu biološku aktivnost.



Slika 2. Struktura izomera tokoferola i tokotrienola

LDL lipoproteinske čestice sadrže od 6 do 12 molekula α -tokoferola i oko 0.5 molekula/LDL γ -tokoferola (Wang, 1999). Dok je koncentracija α -tokoferola najviša u plazmi i tkivima, u biljnim uljima je obično najzastupljeniji γ -tokoferol. Ispitivanjem sadržaja vitamina E u prirodnim proizvodima utvrđeno je da postoje značajne varijacije, ali u semenkama lana, susama i golice po zastupljenosti uvek je bio dominantan γ -izomer. Određeno je da ulje susama sadrži od 32.9 do 111.4 mg γ -tokoferola /100 g (Jannat, 2013), golice od 29.92 do 53.6 mg/100 g ($\beta + \gamma$ izomera) (Rabrenovic, 2014) i lana 57.5 mg/100 g ($\beta + \gamma$ izomera) (Tuberoso, 2007).

Glavna uloga α -tokoferola je u zaustavljanju propagacije lančane reakcije lipidne peroksidacije, “hvatanjem” lipidnih peroksida (Slika 3).



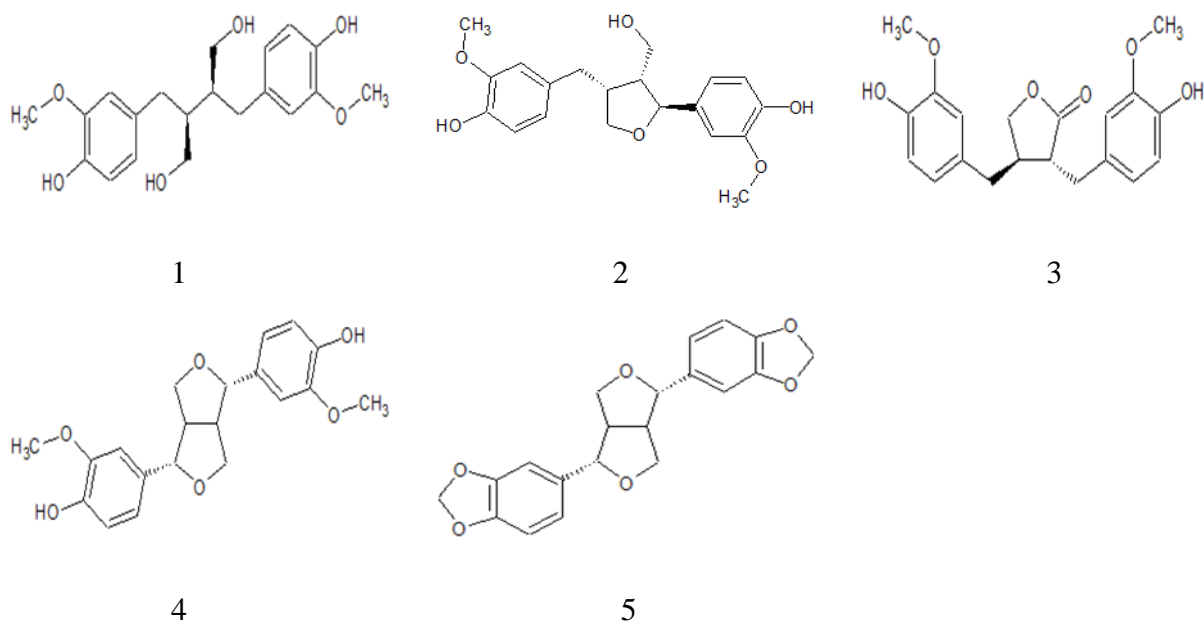
Slika 3. Delovanje α -tokoferola na lipidnu peroksidaciju

Za γ -tokoferol pokazani su brojni pozitivni efekti: antiproliferativni efekat na humanim ćelijskim linijama kancera (Gysin, 2002), anti-inflamatorna aktivnost (Jing, 2003) i delimična

prevencija promena u transkripciji uslovljenih starenjem u srcu i mozgu miševa (Park, 2008). Pokazano je da konzumiranje umerenih količina susama dovodi do velikih promena u koncentraciji γ -tokoferola, koje se objašnjavaju i sinergističkim delovanjem γ -tokoferola i lignana prisutnih u semenkama susama (Cooney, 2001).

2.1.2.2. Semenke lana, susama i golice - dijetarni izvor lignana

Utvrđeno je da neke semenke bogate uljima pored vitamina E sadrže i značajne količine drugih antioksidanasa, a među njima su i semenke susama i lana (Anwar, 2012). Lan (*Linum usitatissimum*) i susam (*Sesamum indicum*) predstavljaju najbogatije poznate dijetarne izvore lignana (Peterson, 2010). Silica i saradnici (2003) identifikovali su određene količine lignana i u semenkama golice.



Slika 4. Najzastupljeniji lignani, prisutni u biljkama kao sekundarni metaboliti biljaka:
1) sekoizolaricirezinol, 2) laricirezinol, 3) matairezinol, 4) pinorezinol, 5) sesamin

Lignani su privukli veliku pažnju istraživača zbog ispoljenih fizioloških funkcija, najviše u prevenciji koronarnih bolesti, kancera i inflamacije. Sadržaj lignana u namirnicama obično je manji od 2 mg/100 g i procenjeno je da prosečan dnevni unos lignana iznosi oko 1mg (Peterson, 2010). Od lignana u biljkama su najrasprostranjeniji i najzastupljeniji: sekoizolaricirezinol, matairezinol, laricirezinol, pinorezinol, sesamin (Slika 4).

2.1.2.2.1. Lignani u semenkama lana

Sekoizolaricirezinol je dominantan lignan u lanu, prisutan u obliku sekoizolaricirezinol-diglukozida (SDG). SDG je umrežen sa 3-hidroksi-3-metilglutarnom kiselinom u oligomere ravnog lanca, u kojima je 5 molekula SDG povezano sa 3 molekula 3-hidroksi-3-metilglutarne kiseline (Peterson, 2010; Eliasson, 2003; Sicilia 2003). Pored SDG u semenkama lana identifikovano je prisustvo malih količina matairezinola, izolaricirezinola, laricirezinola i pinorezinola (Toure, 2010). Pozitivne efekte na zdravlje, prvenstveno na prevenciju nastanka kancera, lignani lana ostvaruju zahvaljujući estrogenskom i anti-estrogenskom delovanju (Thomson, 1996; Frische, 2003) i antioksidativnoj aktivnosti (Kitts 1999, Prasad 2000).

U literaturi je opisano mnogo različitih metoda kojima su polifenoli lana izolovani u cilju određivanja sadržaja SDG (Toure, 2010). U prvom koraku se semenke lana ekstrahuje organskim rastvaračima, ponekad uz dodatak vode. Potom se ekstrakti semenki lana hidrolizuje da bi se SDG oslobodio iz kompleksa (bazna hidroliza) i da bi se oslobodio aglikon (kisela ili enzimski hidroliza), što je rezultovalo velikim razlikama u izolovanim i određenim količinama SDG. Eliasson i saradnici (2003) su pri direktoj alkalnoj hidrolizi uzoraka lana utvrdili da je sadržaj (+) -SDG u semenu lana od 11.9 do 25.9 mg/g, odnosno (-) -SDG od 2.2 do 5.0 mg/g.

2.1.2.2.2. Lignani u semenkama susama

Susamovo ulje pokazuje veliku stabilnost prema oksidaciji zbog prisustva liposolubilnih lignana sa furofuranskim skeletom. Sesamin i sesamolin (8.80 mg/g i 4.50 mg/g, redom) (Pathak, 2014) su najzastupljeniji lignani u susamu i pokazano je da oni inhibiraju ekspresiju lipogenih enzima (Ide, 2013), inhibiraju intestinalnu apsorpciju holesterola (Liang, 2015) i aktivnost 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze (Hirose, 1991). Svoj anti-inflamatorni efekat ostvaruju inhibicijom aktivnosti Δ^5 -desaturaze (Shumizu, 1991), koja igra

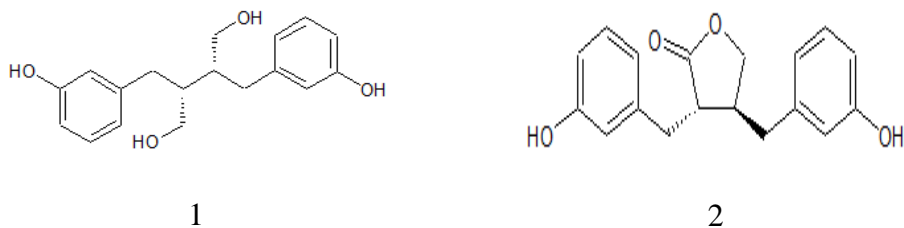
značajnu ulogu u sintezi AA, prekursora pro-inflamatornih eikozanoida. Pokazan je njihov antihipertenzivni efekat (Miyawaki, 2009), kao i značajna uloga u detoksifikaciji jetre usled konzumiranja etanola (Akimoto, 1993). Glikozilovani lignani su prisutni u obezmašćenim semenkama, a od njih su najzastupljeniji sesaminol-triglukozid, sesaminol-diglukozid i sesaminol-monoglukozid (Petersen, 2010). Sesamol, sesaminol, sesamolinol, pinorezinol, matairezinol, laricirezinol i episesamin su lignani koji su identifikovani u semenkama i uljima susama, ali u znatno manjim količinama (Petersen, 2010). Farmakološki efekti sesamina i sesamolina su direktno ili indirektno povezani sa njihovim antioksidativnom aktivnošću, odnosno ovi lignani mogu smanjiti oksidativni stres *in vivo*.

2.1.2.2.3. Lignani u semenkama golice

Značajne količine sekoizolaricirezinola (21 mg/100 g suve mase) su pronađene u semenkama bundeve (Aldercreutz, 1997), a Sicilia i saradnici (2003) su u njima identifikovali i prisustvo laricirezinola.

2.1.2.2.4. Biljni lignani se u gastrointestinalnom traktu transformišu u enterolignane

Biljni lignani se u gastrointestinalnom traktu transformišu delovanjem bakterija crevne mikroflore u enterolignane, EL i ED (Slika 5). U gastrointestinalnom traktu i/ili jetri enterolignani se konjuguju sa glukuronskom ili sumpornom kiselinom, pre nego što se oslobode u cirkulaciju. Glukuronidi i sulfati sekoizolaricirezinola, EL i ED, se ili eliminišu putem žuči i urina, ili dolazi do njihove enterohepatičke recirkulacije. Eliminacija putem urina je spora, u urinu je identifikovano prisustvo pored EL, ED i sekoizolaricirezinola, matairezinola, laricirezinola i izolalaricirezinola (Bannwart, 1984).



Slika 5. Struktura enterodiola (1) i enterolaktona(2)

EL je glavni enterolignan prisutan u cirkulaciji i zbog toga se koristi kao biomarker dijetarnog unosa biljnih lignana. Međutim, u nekim studijama se pokazalo da je koeficijent korelacije EL sa procenom dijetarnog unosa lignana, utvrđenom na osnovu anketa o ishrani ispitanika, bio vrlo nizak (Petersen, 2010). Pored dijetarnih navika, na koncentraciju enterolignana utiču genetski faktori, metabolizam intestinalnih bakterija, endogeni hormoni i upotreba antibiotika (Sonedtedt, 2008; Kuijsten, 2005).

Estrogenska i anti-estrogenska aktivnost EL i ED je važna za ispoljavanje njihovih efekata na zdravlje. Antioksidativna aktivnost EL, ED pokazana je u lipidnim i u vodenim *in vitro* sistemima (Kitss, 1999; Prasad 2000a), kao i da je antioksidativna aktivnost EL i ED u ispitivanom sistemu (gde su generisani lipidni peroksidi i hidroksil-radikali) veća u poređenju sa SDG (Kitss 1999, Prasad 2000). Zbog svoje antioksidativne aktivnosti, kao i slabe estrogenske i anti-estrogenske aktivnosti, enterolignani mogu imati mnoge pozitivne efekte na funkciju jetre (Xu, 2015) ili na smanjenje rizika za nastanak kancera dojke (Pietinen, 2001), prostate (Hedelin, 2006) i kardiovaskularnih oboljenja (Vanharanta, 2003).

2.1.2.3. Semenke lana, susama i golice - dijetarni izvori fenolnih kiselina

Kao sekundarni metaboliti biljaka fenolne kiseline su veoma rasprostranjena jedinjenja. Ispitivanja obezmašćenih semenki (bogatih uljima) (Dabrowski, 1984; Dabrowski, 1984a) pokazala su da se u njima nalaze značajne količine fenolnih kiselina. Njihov sadržaj u obezmašćenim semenkama lana iznosio je 81.1 mg/100 g semenki, a u obezmašćenim semenkama susama 22.7 mg/100 g semenki (Dabrowski, 1984). Najzastupljenija fenolna kiselina u lanu je FE sa 37.6 mg/100 g, dok je njen sadržaj u susamu iznosio 5.7 mg/100 g obezmašćenih semenki (Dabrowski, 1984). U semenkama susama najzastupljenija je kafeinska kiselina sa 9.8 mg/100 g, a značajan je bio sadržaj i p-kumarinske kiseline sa 7.2 mg/100 g obezmašćenih semenki (Dabrowski, 1984). U uzorcima nisu nađene slobodne fenolne kiseline, i većina njih se nalazila u frakciji estara koji su ekstrahovani sistemom metanol/acetone/voda (Dabrowski, 1984a). Eliasson i saradnici (2003) su pokazali da je seme lana, posle direktne hidrolize, sadržalo glukozide p-kumarinske kiseline (u iznosu od 1.2 do 8.5 mg/g) i FE (od 1.6 do 5.0 mg/g obezmašćenih semenki). Kansoula (2010) je pokazao da u obezmašćenim semenkama susama, pored glikozida lignana, nalaze i fenolne kiseline. Ben Othman i saradnici (2015) su u vodenim

ekstraktima obezmašćenih semenki susama identifikovali vanilinsku kiselinu i FE. Semenke golice nisu bogate polifenolima (sadrže od 34.3 do 82.4 mg/100 g semenki; Nawirska-Olszanska, 2013), ali je i u hladno ceđenim uljima golice identifikovano prisustvo FE (Morrison, 2015).

Oksidativni stres se često definiše kao narušavanje ravnoteže između pro-oksidanasa i antioksidanasa, koje vodi oštećenju lipida, proteina i nukleinskih kiselina, a javlja se u različitim fiziološkim (Powers, 2008; Wasselin, 2014) i patološkim stanjima (Uttara, 2009; Spittle, 2001). Oksidativni stres može biti rezultat ili smanjene koncentracije antioksidanasa i/ili povećane produkcije reaktivnih vrsta. U nekoliko studija pokazan je pozitivan efekat antioksidanasa na kardiovaskularna oboljenja (Tribble, 1999; Myung, 2013). Stoga bi dijetarni unos semenki lana, susama i golice, u kojima su pored esencijalnih masnih kiselina prisutni i antioksidanasi, mogao uticati na prevenciju nastanka i razvoja kardiovaskularnih oboljenja kod ugroženih grupa, kao što su bolesnici sa hroničnom bubrežnom slabošću na programu hemodijalize.

2.2. Hronična bubrežna insuficijencija-status esencijalnih masnih kiselina i antioksidativni status

Poznato je da je status PUFA povezan sa nastankom aterosklerotskih promena i inflamacije, budući da su PUFA glavne komponente plazmine membrane i prekursori za sintezu prostaglandina i leukotriena (Dyerberg, 1986). Literaturni podaci ukazuju da kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću, koji su na programu hemodijalize, dolazi do smanjenja zastupljenosti n-6 i/ili n-3 PUFA (Dessi, 2014; Dasgupta, 1990; Koorts, 2002; Friedman, 2006). Međutim, kada se analiziraju ovi podaci, uočava se da postoji neusaglašenost u pogledu promena u masnokiselinskim profilima. U jednoj od naših pređašnjih studija, poređenjem statusa masnih kiselina u fosfolipidima plazme i eritrocita bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću na programu hemodijalize, sa profilima zdravih osoba, utvrđeno je povećanje zastupljenosti OA i smanjenje zastupljenosti EPA i DHA kod bolesnika na hemodijalizi, kao i niži procentualni udeo ukupnih n-6 i n-3 PUFA u odnosu na zdrave osobe (Ristić, 2006).

Promene u lipidnom statusu, glukoregulaciji, pojava hipertenzije i hronična inflamacija karakteristične su za bolesnike sa hroničnom bubrežnom slabošću na hemodijalizi (Dessi, 2014; Khalatbari Soltani, 2013; Mak, 1996). Kako bi one mogle biti povezane sa

masnokiselinskim statusom u njihovoj krvi i tkivima, to predstavlja osnovu za sprovođenje nutritivne intervencije ishranom obogaćenom esencijalnim masnim kiselinama. Aktuelna istraživanja su vezana za uticaj suplementacije ishrane lanenim semenom i/ili uljem lana kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom slabošću na programu hemodijalize (Lemos, 2012; Khalatbari Soltani, 2013). Pokazano je da dodatak i semena, i ulja lana dovodi do značajnih promena lipidnog statusa i koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP). Međutim, saglasno prikazanom u poglavlju 2.1.1., nameće se pitanje: mogu li se konzumiranjem semenki lana obezbediti optimalne koncentracije EPA i DHA u plazmi i ćelijskim membranama? Kao što je već rečeno, prema dostupnim literaturnim podacima ALA se u organizmu ne prevodi efikasno u EPA i DPA n-3, a i dalje prevođenje DPA n-3 veoma je ograničeno (Brenna, 2002; Burdge, 2002; Burdge, 2002). U većini publikovanih rezultata interventnih studija nisu praćene promene u statusu masnih kiselina tokom suplementacije ishrane. Status masnih kiselina u serumu i tkivima, pored dijetarnog unosa određuje i njihov metabolizam (Yang, 2016), kao i antioksidativni status organizma (Kardum, 2014). Praćenjem promena masnokiselinskih profila plazme ili tkiva tokom studije suplementacije ishrane semenkama i/ili uljem lana, omogućava sagledavanje uticaja suplementacije ishrane sa ALA na nivo EPA i DHA.

Kada je narušena ravnoteža između stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i antioksidativnih mehanizama odbrane dolazi do oksidativnog stresa. Lipidna peroksidacija PUFA ćelijske membrane, uz oksidativno oštećenje proteina i nukleinskih kiselina, je glavna posledica oksidativnog stresa. Kod pacijenata na programu hemodijalize oksidativni stres je povećan u odnosu na zdrave osobe i pretpostavlja se da doprinosi visokoj stopi nastanka kardiovaskularnih oboljenja kod ove grupe pacijenata.

U studiji Raja i saradnika (2013) pokazano je da je nivo enzima antioksidativne zaštite (glutation-peroksidaze - GSPx, superoksid-dismutaze - SOD, katalaze - CAT), kao i koncentracija glutaciona (GSH) i antioksidanasa (vitamina E, A i C), snižen u serumu bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću na programu hemodijalize. Istovremeno, uočeno je da dolazi do povećanja nivoa lipidne peroksidacije, tj. povećanja sadržaja malon-dialdehida (MDA). Zachara i saradnici (2009) su pokazali da je kod pacijenata na hemodijalizi povećano stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i smanjena aktivnost GSPx. Selen-zavisna izoforma GSPx, prisutna u plazmi se u najvećoj meri sintetiše u bubrezima, a njena aktivnost je redukovana kod obolelih

sa hroničnim oboljenjima bubrega, proporcionalno progresiji bolesti (Toccone-Gallucci, 2009). Od markera oksidativnog stresa povećan je nivo F₂-izoprostanona, lipidnih hidroperoksida, antitela na oksidovani-LDL, oksidabilnost LDL, sadržaj karbonilnih grupa i 3-hlorotirozina.

Serum albumin (HSA) igra značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti, o čemu će biti više reči u poglavlju 2.3.3., ali će ovde biti ukratko navedeni podaci vezani za antioksidativnu ulogu HSA kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na programu hemodijalize. Prvo, kod pacijenata na hemodijalizi koncentracija HSA može biti značajno smanjena. Pokazano je da nivoa HSA nije biomarker malnutricije, već ukazuje na stepen progresije samog oboljenja (Friedman, 2010). Soejima i saradnici (1999) utvrdili su da HSA štiti masne kiseline membrane eritrocita od lipidne peroksidacije i da se njegova antioksidativna sposobnost povećava posle hemodijalize. Sadržaj redukovane tiolne grupe u HSA je smanjen kod bolesnika na programu hemodijalize, a stepen karbonilovanja je povećan (Takahashi, 2016). Na reaktivnost tiolne grupe HSA utiče koncentracija FFA u serumu (Pavićević, 2014). Činjenica da kod pacijenata na hemodijalizi dolazi do značajnog porasta FFA, ukazuje na mogućnost povećanja reaktivnosti Cys34 grupe HSA, odnosno njenog antioksidativnog kapaciteta.

Oksidativni stres kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću na programu hemodijalize može biti povećan zbog gubitka antioksidanasa tokom dijalize, zbog interakcija krvi i membrane za dijalizu, stimulisanja oslobađanja reaktivnih vrsta od strane neutrofila, sniženog dijetarnog unosa antioksidanasa zbog malnutricije. Kod pre-hemodijaliznih pacijenata sa hroničnom bubrežnom slabošću oksidativni stres je takođe povećan, pa je zaključeno da i samo oboljenje doprinosi nastanku oksidativnog stresa (Obergh, 2004).

Terapija antioksidansima mogla bi imati značajan uticaj na sprečavanje nastanka kardiovaskularnih oboljenja kod bolesnika na programu hemodijalize. U meta-studiji Coombes-a i saradnika (2012) analizirani su efekti terapija antioksidansima na smanjenje rizika za kardiovaskularna oboljenja kod bolesnika na hemodijalizi. Sistematičnom pretragom literature, autori su pronašli da je najviše ispitan efekat α -tokoferola i da je u 20 od 25 studija pokazano sniženje markera oksidativnog stresa, a u jednoj studiji istaknut je zaštitni efekat u odnosu na razvoj kardiovaskularnih oboljenja. U nekoliko studija ispitan je uticaj vitamina C, i smanjenje parametra oksidativnog stresa postignuto je u četiri od jedanaest studija. N-acetilcistein se pokazao veoma efikasnim antioksidativnim agensom, za koji je antioksidativni efekat utvrđen u

sve četiri sprovedene studije. Pored toga, dve studije iste istraživačke grupe pokazale su da posle konzumiranja soka crvenog grejpfruta dolazi do smanjenja koncentracije oksidovanog LDL. Rezultati ove meta-analize pokazuju da bi suplementacija ishrane bolesnika na hemodijalizi antioksidansima mogla dovesti do smanjenja incidenci kardiovaskularnih oboljenja.

Suplementacijom ishrane pacijenata, sa hroničnom bubrežnom slabošću na programu hemodijalize, smešom semenki lan, susam i golica, mogle bi se obezbediti adekvatne količine esencijalnih masnih kiselina i povećati dijetarni unos antioksidanasa. Od značaja je ispitati da li ovakva suplementacija ishrane utiče na faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja kod bolesnika na hemodijalizi. Istovremeno, zbog uloge HSA u antioksidativnoj odbrani bilo bi značajno ispitati da li antioksidansi prisutni u semenkama (polifenoli-lignani i fenolne kiseline) utiču na antioksidativna svojstva HSA.

2.3. Humani serum-albumin - struktura i funkcije

HSA je najzastupljeniji protein plazme, koji učestvuje u transportu brojnih endogenih i egzogenih jedinjenja (masne kiseline, hem, bilirubin, hormoni, joni metala, fenolna jedinjenja i lekovi). Istovremeno, HSA igra važnu ulogu u održavanju pH i osmotskog pritiska plazme. Pored navedenog, veoma je značajna antioksidativna uloga HSA, koja potiče od prisustva slobodne tiolne grupe ostatka Cys34, koja može postojati u redukovanom i oksidovanom obliku.

2.3.1. Struktura HSA

HSA sa koncentracijom od 0.6 mM, predstavlja oko 60 % ukupnih proteina plazme (Kraght-Hansen, 1981), a polu-život ovog protein u plazmi je oko 20 dana (Roche, 2008). Sastoji se od jednog polipeptidnog niza koga čini 585 aminokiselinskih ostataka i ima molekulsku masu 66 kDa (Meloun, 1975). HSA molekul sadrži 15 ostataka Cys, ali je samo Cys34 tiolna grupa slobodna, dok ostali ostaci Cys učestvuju u formiranju disulfidnih mostova (Carter, 1994). Izoelektrična tačka HSA je 5.2 i na fiziološkom pH 7.4 ima oko 19 negativnih naelektrisanja (Turell, 2009). Kristalografski podaci (Sugio, 1999) su pokazali da se HSA sastoji od 3 domena (I, II i III) koja sačinjavaju po 10 α -heliksa, a svaki od njih čine dva subdomena (A i B) (Slika 6).

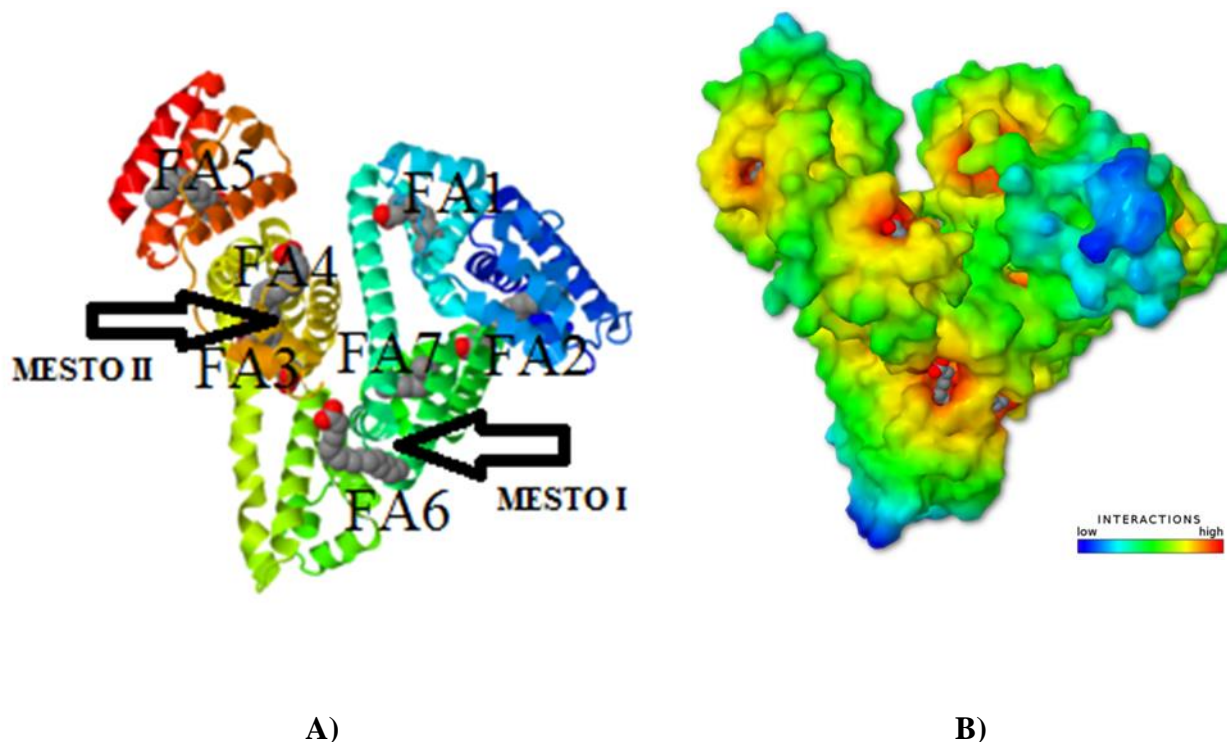


Slika 6. Model strukture molekula humanog serum-albumina. Prikaz domena (I-III) i subdomena (oznake A i B)

2.3.2. Uloga HSA u transportu egzogenih i endogenih supstanci

HSA je uključen u transport brojnih egzogenih i endogenih supstanci (npr. FFA, bilirubina, žučnih kiselina, tiroksina, metalnih jona, polifenola, lekova). Vezivanje za HSA mnogostruko uvećava kapacitet plazme za transport pojedinih jedinjenja (Zsila, 2011). U strukturi HSA zastupljenost α -heliksa je oko 70 %, dok praktično da nema β -pločica (Carter, 1994), što obezbeđuje molekulu HSA veliku konformacionu fleksibilnost, veoma važnu da bi molekul HSA mogao da ostvari svoju ulogu u transportu velikog broja jedinjenja različitih struktura. Za masne kiseline srednje dužine lanca i dugolančane masne kiseline identifikovano je sedam vezujućih mesta različitog afiniteta (Bhattacharya, 2000), koja su raspoređena po celom molekulu u svih 6 subdomena (Slika 6). Egzogeni ligandi se vezuju u okviru dva glavna vezujuća mesta (I i II) u okviru subdomena IIA i IIIA, redom (Slika 7) (Zsila, 2011). Konstante vezivanja su obično od 10^4 do 10^6 M^{-1} (Carter, 1994), pa HSA utiče na koncentraciju slobodnog

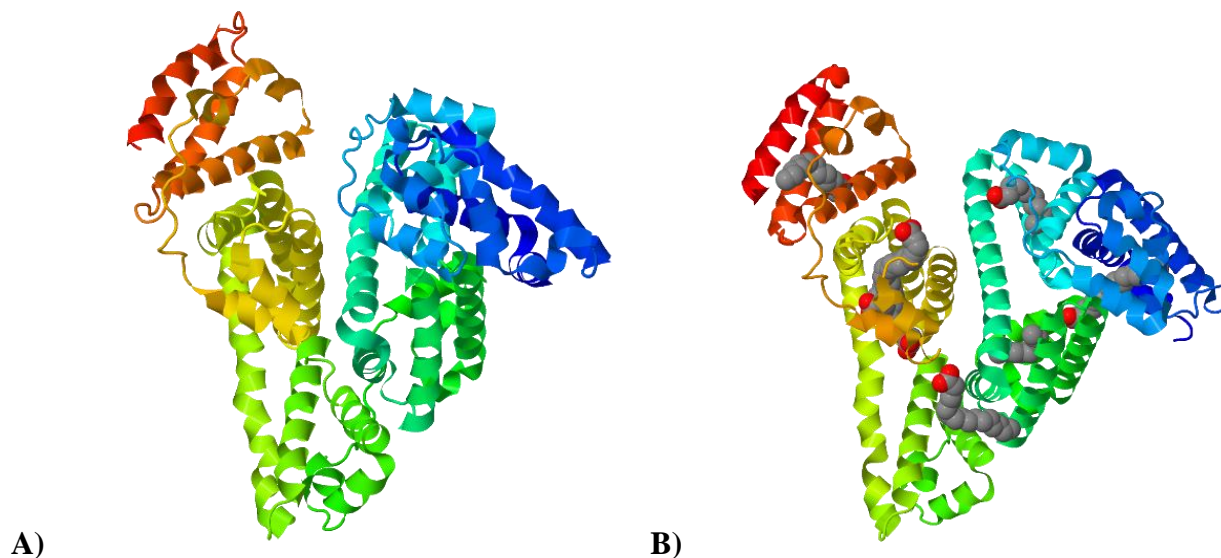
liganda, eliminaciju i poluživot, učestvuje u transportu i određuje biološku aktivnost vezanog liganda. Identifikovana su i četiri mesta za vezivanje tiroksina i nekoliko mesta za vezivanje metalnih jona, uključujući i mesto na N-kraju polipeptidnog lanca HSA (Li, 2015). Vezujuće mesto I, locirano u subdomenu IIA, preklapa se sa vezujućim mestom 7 za masne kiseline, a vezujuće mesto II u subdomenu IIIA sa vezujućim mestima 3 i 4 za masne kiseline (Simard, 2006) (Slika 7).



Slika 7. A) Prikaz vezujućih mesta za masne kiseline (FA 1-7) i glavna vezujuća mesta (I i II) za egzogene ligande. B) Model molekula HSA sa vezanim dugolančanim masnim kiselinama. Ilustracija je zasnovana na kristalografskim podacima iz PDB ID 1E7I, i sačinjena korišćenjem Jmol 14.0.11. Molekul stearinske kiseline je predstavljen modelom ispunjenih sfera. Obojena površina molekula HSA predstavlja interakcije sa okolinom: slabe interakcije površina (plavo), jake interakcije (crveno).

2.3.2.1. Vezujuća mesta za masne kiseline na molekulu HSA

Rastvorljivost dugolančanih masnih kiselina u vodi je veoma mala ($<1 \mu\text{M}$), pa se one vezuju za u vodi rastvoran HSA da bi se obezbedio njihov transport i da bi se obezbedilo povećanje koncentracije masnih kiselina u plazmi u mM opsegu (Hamilton, 2013). Ako se uporede kristalografske strukture HSA, sa i bez vezanih masnih kiselina, uočava se da vezivanjem masnih kiselina dolazi do značajnih konformacionih promena u molekulu HSA (Slika 8).



Slika 8. Razlike u konformaciji molekula HSA bez (A) i sa vezanim masnim kiselinama (B).

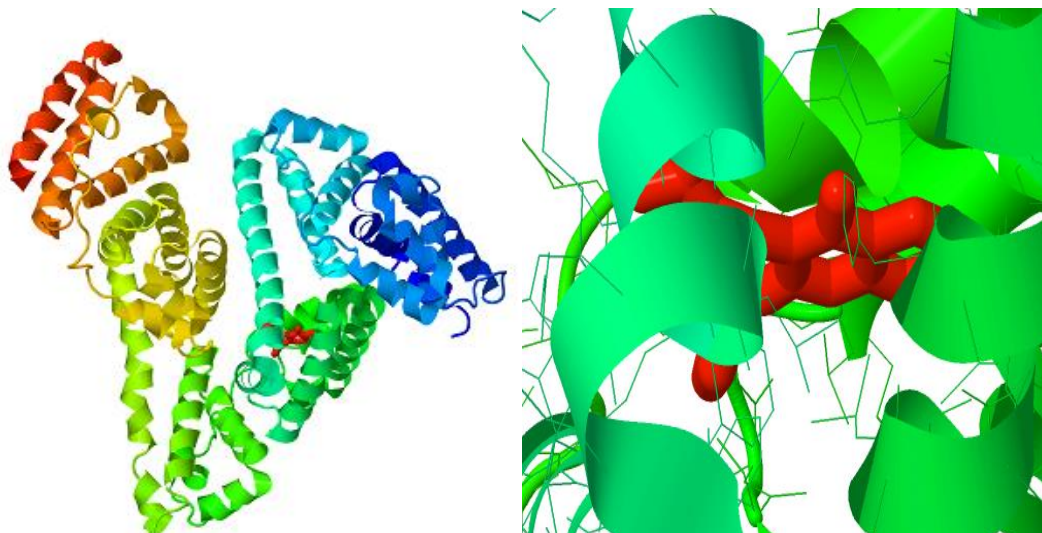
Analiza kristalnih struktura FA–HSA kompleksa pokazala je da masne kiseline srednje dužine lanca, kao i SFA, mononezasićene (MUFA) i PUFA dugolančane masne kiseline, dele istih sedam vezujućih mesta na molekulu HSA (Curry, 1999). Simard i saradnici (2006) pokazali su da se mesta vezivanja razlikuju po afinitetu i utvrđeno je da su visokoafinitetna vezujuća mesta za palmitat (PA): 2 (u subdomenima IA-IB-IIA), 4 (u subdomenu IIIA) i 5 (u subdomenu IIIB) (Slika 7). Utvrđeno je da se četvrti pik u NMR spektrima pojavljuje tek pri odnosu masna kiselina/HSA 3:1 i da on potiče od niskoafinitetnog sedmog vezujućeg mesta za masne kiseline (Hamilton, 2013; Simard, 2006).

Zajedničko za sva visokoafinitetna vezujuća mesta je da je karboksilna grupa masne kiseline tako pozicionirana da dolazi do elektrostatičkih interakcija sa bar jednim baznim aminokiselinskim ostatkom u okviru HSA, dok se metilenski lanac masne kiseline vezuje tako da ne dolazi do njegovog savijanja (Simard, 2006).

2.3.2.2. Glavna mesta vezivanja egzogenih liganada (I i II)

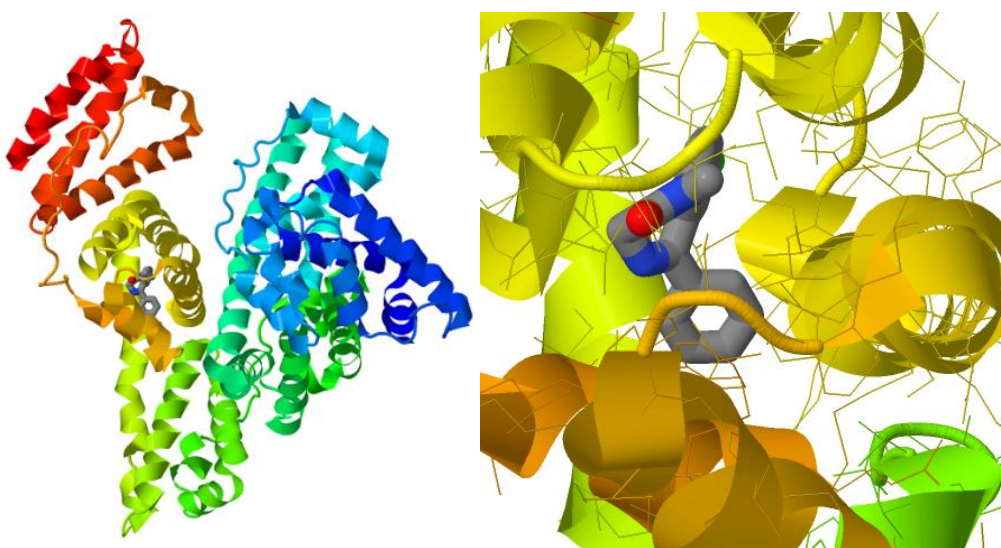
Proučavanja struktura liganada koji se vezuju za mesto I molekula HSA pokazala su da se radi o većim heterocikličnim jedinjenjima sa negativnim naelektrisanjem, koje je obično delokalizovano, u blizini centralnog dela pretežno nepolarnog molekula (Buttar, 2010; Yang, 2014). Za mesto II uglavnom se vezuju aromatične karboksilne kiseline sa negativnim naelektrisanjem koje je lokalizovano na ugljenikovom atomu udaljenom od hidrofobnog regiona (Ghuman, 2005).

Vezujuće mesto I je velika, fleksibilna, više-komorna šupljina unutar subdomena IIA HSA, koju stvaraju svih 6 α -heliksa ovog subdomena, a dodatno i aminokiselinski ostaci subdomena IB, IIB i IIIA (Zsila, 2011). Trp214 u okviru ovog vezujućeg mesta je značajan strukturni element mesta I. Rotacija njegovog indolnog prstena omogućava nekim ligandima da se smeste u okviru ovog vezujućeg mesta i da se ostvare π - π interakcije između prstenova (indolni prsten Trp214 i heterociklični prsten liganda)(Buttar, 2010; Ghutman, 2005). Pri vezivanju većine liganada, u stvaranju vodoničnih veza uključen je Tyr150, što ukazuje na značajan doprinos ovog ostatka prilikom vezivanja liganada za mesto I (Buttar, 2010; Ghutman, 2005; Petitpas 2001). Pokazano je, takođe, da se u okviru mesta I može vezivati više liganada istovremeno (Ghutman, 2005). U okviru mesta I vezuju se brojni ligandi kao što su: kvercetin, hidroksicinamične kiseline, daizdein, a interakcije HSA sa varfarinom prikazane su na Slici 9.



Slika 9. Vezivanje varfarina za vezujuće mesto I HSA u okviru subdomena IIA.

Mesto II predstavlja hidrofobnu šupljinu, koju formira 6 α -heliksa subdomena IIIA HSA (Ghutman, 2005). Ona je manja i rigidnije strukture u odnosu na mesto I (Zsila, 2011). Ipak, mesto II pokazuje izvesni stepen konformacione fleksibilnosti, jer se za ovo mesto mogu vezati dva molekula masnih kiselina istovremeno (Simard, 2006; Hamilton, 2013; Curry, 1999). Interakcije između diazepama i HSA u okviru vezujućeg mesta II prikazane su na Slici 10, a ono je i mesto vezivanja brojnih drugih molekula npr. ibuprofena, propranolola, triptofana.



Slika 10. Vezivanje diazepama za vezujuće mesto II HSA u okviru subdomena IIIA.

2.3.2.3. Uticaj vezivanja masnih kiselina na vezivanje liganada za glavna vezujuća mesta I i II

Masne kiseline utiču na vezivanje liganada u okviru vezujućih mesta I i II, a svoj efekat mogu ostvarivati kompeticijom za vezivanje u okviru mesta koja se međusobno preklapaju (Slika 7) i/ili alosternom regulacijom.

U okviru subdomena IIIA nalaze se dva vezujuća mesta za masne kiseline (mesta 3 i 4) (Slika 7), pa se očekuje da će masne kiseline imati veći uticaj na vezivanje drugih supstanci u okviru ovog mesta. Zbog preklapanja mesta 7 (niskoafinitetnog mesta za vezivanje masnih kiselina) i vezujućeg mesta I, može se očekivati da pri visokim koncentracijama masnih kiselina može doći do inhibicije vezivanja liganada ili ligand može da zameni masnu kiselinu koja se nalazi u okviru ovog mesta vezivanja. Simard i saradnici (2006) pokazali su da postoje i interakcije između vezujućeg mesta I i susednog vezujućeg mesta 2 za masne kiseline. U prisustvu visokih koncentracija masnih kiselina, ostaci Tyr150 i Arg257 u vezujućem mestu 2 rotiraju da bi interagovali sa karboksilnom grupom masnih kiselina. Obrnuto, pri visokim koncentracijama liganada, koji se vezuju za mesto I, i niskih koncentracija masnih kiselina slabi vezivanje masnih kiselina u okviru vezujućeg mesta 2.

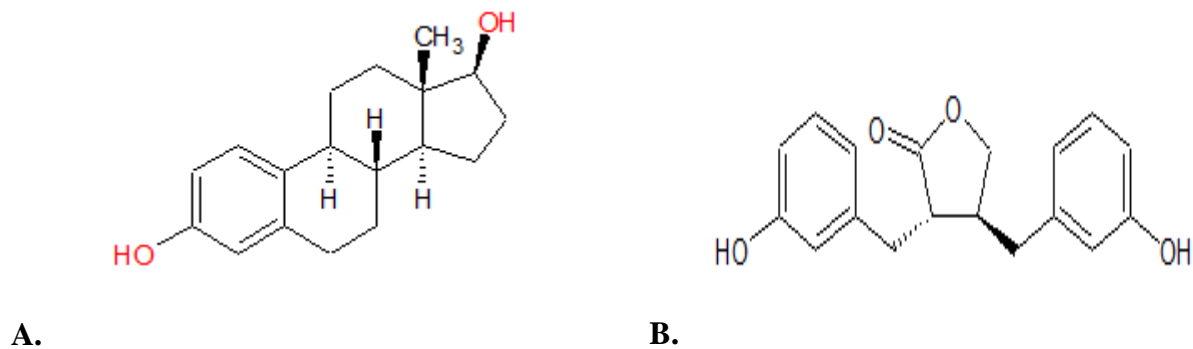
2.4. Interakcije polifenola sa albuminom

Polifenoli su velika grupa jedinjenja, sekundarni metaboliti biljaka sa fenolnom strukturom. U brojnim studijama ispitivano je vezivanje nativnih polifenola za albumin (najčešće odmašćeni BSA i/ili odmašćeni HSA) i otkriveno je da postoje značajne razlike u pogledu vezivanja, čak i kad razlike u strukturi ispitivanih polifenola nisu bile velike.

Semenke lana, susama i golice sadrže značajne količine lignana i fenolnih kiselina (Petersen, 2010; Scilia, 2003; Eillason, 2003; Dabrowski, 1984). Istovremeno, pokazano je da sve pomenute semenke sadrže određenu količinu ferulinske kiseline (Dabrowski, 1984, Morrison, 2015).

2.4.1. Interakcije lignana i albumina

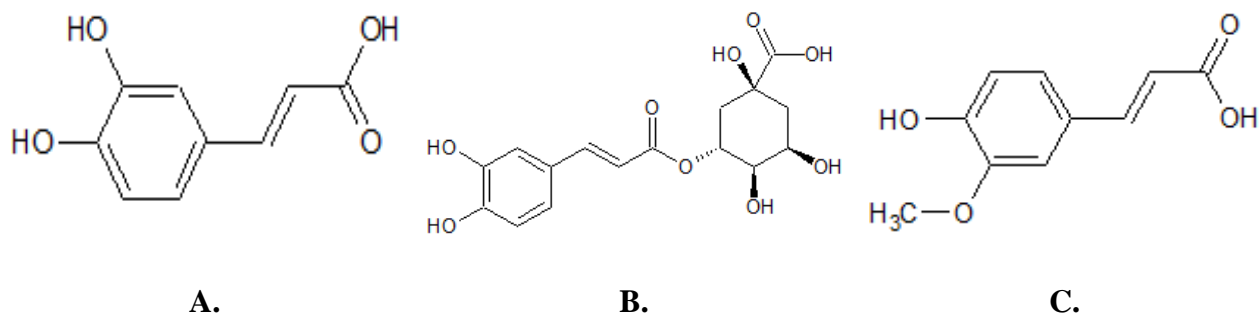
Nema literaturnih podataka o ispitivanju interakcija kako dijetarnih lignana, tako ni njihovih gastrointestinalnih metabolita, sa albuminom. Zbog svoje strukturne stereospecifične sličnosti sa 17- β -estradiolom (Slika 11) lignani (i proizvodi njihovog metabolizma) pokazuju estrogensko i anti-estrogensko delovanje, zbog čega bi se mogli vezivati i za proteine koji imaju specifičnu ulogu u transportu estrogena u cirkulaciji. Stoga su Martin i saradnici (1996) ispitali vezivanje fitoestrogena, pa i EL i ED, za steroid-vezujući protein (SBPr), a ispitivane su i interakcije sa α -fetoproteinom (AFP) (Garreau, 1991). Pored toga, nađeno je da se izoflavon soje genistein (Mahesha, 2006), koji je takođe fitoestrogen, vezuje za molekul HSA u subdomenu IIA sa konstantom afiniteta $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.



Slika 11. Strukturne formule 17- β -estradiola (A) i enterolaktona (B)

2.4.2. Interakcije ferulinske kiseline sa albuminom

U nekoliko studija ispitane su interakcije hidroksicinamičnih kiselina (Slika 12) sa albuminima (BSA i HSA). Ispitivanjem i poređenjem interakcija kafeinske, hlorogenske i FE (Slika 12) sa odmašćenim BSA (fluorescentnom spektroskopijom), Li i saradnici (2010) su pokazali da zamena 3-OH grupe metil-grupom, kao i esterifikacija sa hininskom kiselinom, igraju značajnu ulogu u vezivanju za BSA. Najmanje vrednost konstanti vezivanja su dobili za



Slika 12. Strukturne formule kafeinske (A), hlorogenske kiseline (B) i ferulinske kiseline (C)

FE ($1.793 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $25.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $80.68 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $45 \text{ }^\circ\text{C}$), dok je afinitet za kafeinsku (vrednosti konstanti vezivanja bile su $42.64 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $115.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $149.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $45 \text{ }^\circ\text{C}$) bio manji od afiniteta za hlorogensku (vrednosti konstanti vezivanja bile su $63.44 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $138.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $583.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na $45 \text{ }^\circ\text{C}$). Zaključili su da mogućnost stvaranja vodonične veze (odnosno broj hidroksi-, fenil-, karboksi $-\text{OH}$ grupa u strukturi) može biti od velikog značaja prilikom stvaranja kompleksa sa BSA.

Istovremeno, određeno je da je broj mesta vezivanja po molekulu BSA bio 1 za sve tri hidroksicinamične kiseline. Analizom sinhronih spektara za Tyr ostatke pokazano je da pri velikim molarnim odnosima ispitivanih polifenola prema BSA (50:1) dolazi do pomeranja talasne dužine maksimuma emisije ka većim talasnim dužinama. Navedeno ukazuje da dolazi do porasta hidrofilnosti oko Tyr ostataka, kao i da Tyr ostaci pri tim odnosima značajno učestvuju u smanjenju intenziteta fluorescencije. Sve to upućuje na zaključak da pri velikim molarnim odnosima dolazi do značajnih promena u konformaciji albumina, usled čega se fluorescencija ne prenosi efikasno sa Tyr ostataka na Trp. Ispitivanje interakcija FE i hlorogenske kiseline sa HSA (Kang, 2004) pokazalo je da pri molarnim odnosima ovih kiselina prema HSA do 10:1 postoji samo jedno mesto vezivanja na molekulu HSA, dok pri višim odnosima dolazi do promena u sekundarnoj strukturi HSA i moguće pojave sekundarnih mesta vezivanja na molekulu HSA sa manjim afinitetom.

Ispitivanjem interakcija odmašćenog BSA i hidroksicinamičnih kiselina (Jin, 2010) NMR tehnikom i fluorescentnom spektroskopijom pokazano je da je redosled afiniteta za odmašćeni BSA hlorogenska > kafeinska > m-kumarinska \geq p-kumarinska > FE > sinapinska kiselina.

Utvrđeno je da pri stvaranju kompleksa hidrociniamička kiselina-BSA postoje sličnosti u vezivanju benzenovih prstenova hlorogenske, kafeinske, m-kumarinske, p-kuraminske kiseline, kao i sterne smetnje pri vezivanju FE i sinapinske kiseline zbog metilacije fenil-OH grupa kod ovih kiselina, što za posledicu ima slabljenje interakcija njihovog fenolnog prstena sa BSA. Jin i autori (2012) su, takođe, utvrdili da se hidroksiciniamičke kiseline vezuju u okviru subdomena IIA za vezujuće mesto I, kao i da vezivanju značajno doprinosi hidrofobni efekat i vodonične veze. Pokazano je da dolazi i do elektrostatičkih interakcija u kojima učestvuje ostatak Arg222 u subdomenu IIA. Li i saradnici (2014) utvrdili su da na vezivanje varfarina za HSA utiče FE, što takođe govori u prilog tome da se one vezuju za isto vezujuće mesto, tj. mesto I.

Ojha i saradnici (2012) su ispitivali termodinamiku interakcija FE sa odmašćenim BSA, izotermalnom mikrokolorimetrijom i uporedo spektralnom fluorimetrijom. Rezultati njihovih ispitivanja pokazuju da su prilikom vezivanja FE za BSA vrednosti promena entalpije i entropije manje od nule ($\Delta H < 0$; $\Delta S < 0$), što govori u prilog tome da pri stvaranju kompleksa FE-BSA na fiziološkom pH (7.4), na kome je FE negativno naelektrisana ($pK = 4.58$), najveći doprinos imaju elektrostatičke interakcije i vodonične veze. U studiji He i saradnika (2010), takođe, je pokazana dominantna uloga elektrostatičkih interakcija i vodoničnih veza prilikom vezivanja FE za BSA. Primenom izotermalne mikrokolorimetrije Ojha i saradnici (2012) našli su da postoji jedno mesto vezivanja FE za BSA, velikog afiniteta (vrednost konstante vezivanja je $9.70 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, Tabela 1), sa brojem mesta vezivanja po molekulu BSA od 0.470, i drugo mesto vezivanja sa značajno manjim afinitetom ($1.87 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), ali brojem mesta vezivanja 2.2 po molekulu BSA. Zaključili su da ispitivanja interakcija fluorescentnom spektroskopijom ne pruža mogućnost da se ispituju delovi BSA, koji su udaljeni od ostatka Trp214, lociranog u subdomenu IIA.

Sumarno, rezultati ispitivanja interakcija FE sa albuminom pokazuju da pri vezivanju dolazi do statičkih interakcija. Sve studije su potvrdile značajnu ulogu hidroksilnih grupa u vezivanju hidroksiciniamičkih kiselina. Molekul FE ima samo jednu fenil-hidroksilnu grupu koja može učestvovati u stvaranju vodoničnih veza. 3-metoksi-grupa dovodi do slabljenja interakcija sa fenil-prstenom (zbog sternih smetnji) i time do slabljenja hidrofobnih sila. Kako je molekul FE negativno naelektrisan na fiziološkom pH, i elektrostatičke interakcije mogu imati značajnu ulogu u njenom vezivanju za albumin. Literaturni podaci za konstante vezivanja za komplekse

FE i albumina se značajno razlikuju (Tabela 1), što govori u prilog neophodnosti daljih ispitivanja interakcija FE sa albuminom.

Tabela 1. Literaturni podaci za konstante vezivanja (K_a) i broj mesta (n) vezivanja za komplekse FE-HSA i FE-BSA.

Kompleks	$K_a \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	n	Metoda određivanja	Referenca
1 FE-BSA	1.793 (25 °C)	0.9257	spektrofluorimetrija	Li, 2010
	25.47 (35 °C)	0.9953		
	80.68 (45 °C)	1.291		
2 FE-HSA	2.23	1.17	spektrofluorimetrija	Kang, 2004
3 FE-BSA	6.97 (25°C)		NMR	Jin, 2012
	0.51 (25°C)	0.82	spekrofluorimetrija	
4 FE-BSA	97.87 (22°C)	1.31	spekrofluorimetrija	Ojha, 2012
	40.15 (25°C)	1.22		
	24.21 (32°C)	1.17		
	10.23 (37°C)	1.06		
FE-BSA	187	2.20	izotermalna	
	97000	0.47	mikrokalorimetrija	
5 FE-BSA	2.49 (25°C)	0.91	spekrofluorimetrija	He, 2010
	5.09 (25°C)		afinitetna kapilarna elektroforeza	

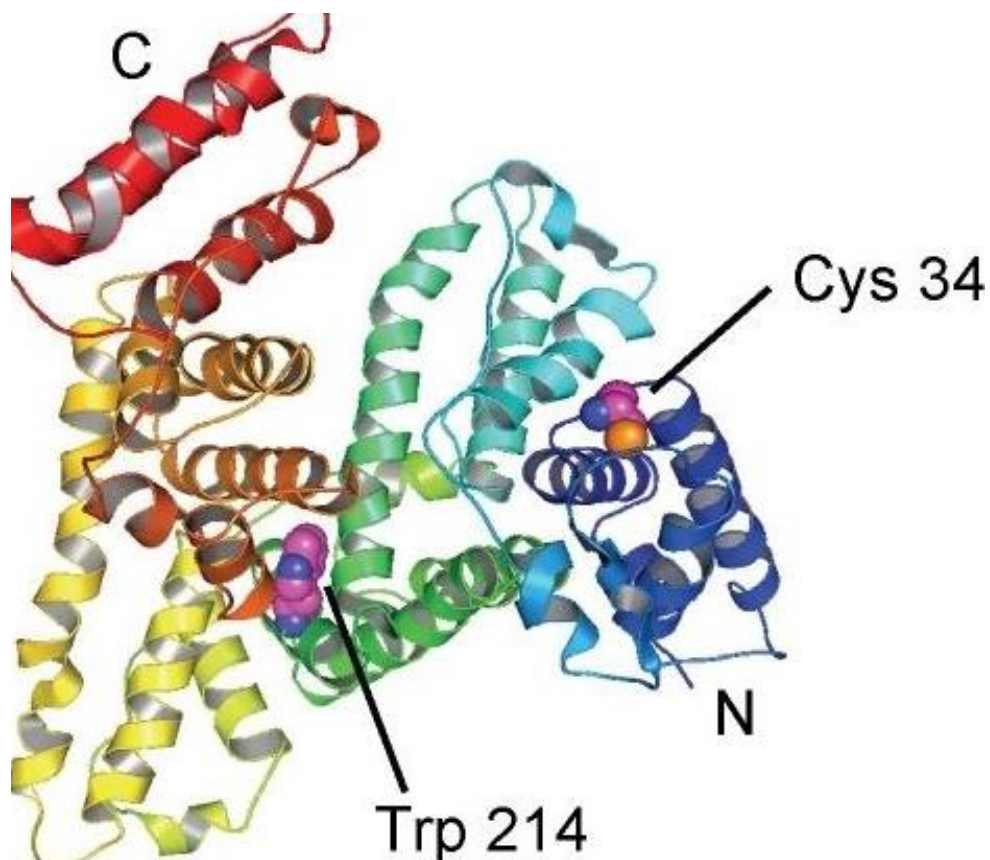
Važno je istaknuti da razlike u strukturi hidroksicinamičnih kiselina dovode do različitih bioloških efekata. Wen i saradnici (2003) su pokazali da se antimikrobna aktivnost hidroksicinamičnih kiselina prema pet sojeva *L. monocytogenes* razlikuje, pri čemu je najveću aktivnost pokazala cinamička kiselina, a za njom su sledile p-kuraminska, FE i kafeinska, dok hlorogenska nije pokazala nikakav efekat. Na biološki efekat mogle bi uticati interakcije sa proteinima, zbog čega je od velikog značaja njihovo ispitivanje.

2.5. Antioksidativna uloga HSA

HSA ostvaruje specifičnu antioksidativnu funkciju zahvaljujući svojoj sposobnosti da vezuje brojne ligande i da neutrališe („hvata“) reaktivne vrste, a oba ova svojstva su tesno povezana sa njegovom strukturom (Taverna, 2013). Antioksidativnoj ulozi HSA značajno doprinosi slobodna tiolna grupa Cys34, koja može da reaguje sa oksidativnim vrstama. Pored toga, značajni doprinos antioksidativnoj funkciji HSA može se pripisati tome što vezuje pro-oksidativne jone metala Fe^{2+} i Cu^{2+} , koji u reakciji sa H_2O_2 grade izuzetno reaktivni hidroksi-radikal ($\cdot OH$). Istovremeno, mogućnost stvaranja kompleksa HSA sa bilirubinom, koji dovodi do smanjenja lipidne peroksidacije, je od značaja za antioksidativna svojstva HSA.

Iwao i saradnici (2006) su utvrdili da oksidacija nekoliko aminokiselinskih ostataka HSA utiče na farmakokinetiku HSA, tako da se njegov poluživot u cirkulaciji smanjuje. Pored oksidacije i nitrozilovanja, hemijska post-translaciona modifikacija HSA koja vodi promeni njegove strukture i posledično promeni u vezivanju liganada i antioksidativnoj aktivnosti, je reakcija glikacije (Taverna, 2013; Pavićević, 2014). Ove promene mogu imati veliki značaj u modulaciji antioksidativne funkcije HSA, posebno u stanjima kada je koncentracija HSA već smanjena (hemodijaliza, sepsa, ciroza).

Pri normalnim, fiziološkim uslovima Cys34 ostatak HSA (Slika 13) postoji u dva različita oblika, u redukovanom (humani merkptoalbumin, HMA) i oksidovanom obliku (humani ne-merkptoalbumin, HNA). Zastupljenost frakcije HSA sa redukovanom slobodnom tiolnom grupom, HMA, iznosi oko 70 do 80 % od ukupnog HSA, dok ostatak HNA (20 do 30 % od ukupnog HSA) čine mešoviti disulfidi sa malim tiolima (HNA1) (HSA-S-S-R), uglavnom cisteinom, homocisteinom i GSH (Carballal, 2003). U minornoj frakciji HNA2 po zastupljenosti (2 do 5 %) tiolna grupa je ireverzibilno oksidovana u sulfinsku (HSA-SO₂H) i sulfonsku kiselinu (HSA-SO₃H) (Torress, 2012). Istovremeno, nitrozo-HSA (HSA-S-NO), čija je koncentracija <0.2 μM , predstavlja depo NO, kao i donor NO u terapijske svrhe (Anraku, 2013). Detektovana je i mala količina dimera i oligomera HSA, čija zastupljenost raste tokom prečišćavanja i čuvanja uzorka (Jovanović, 2013; Pavićević, 2014). Veoma je značajno da ireverzibilne promene u molekulu HSA vode gubitku funkcije i degradaciji modifikovanog proteina (Anraku, 2012).

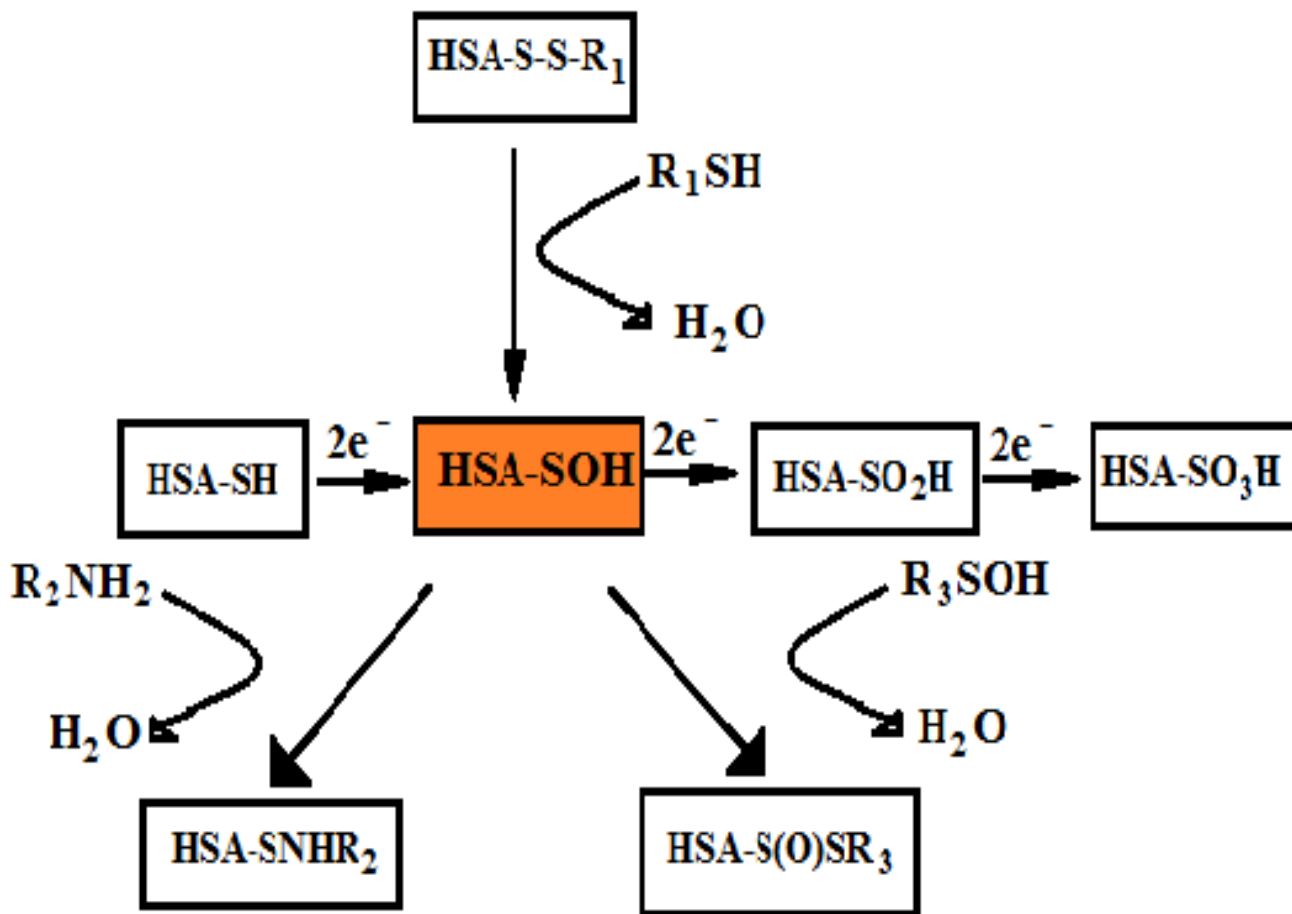


Slika 13. Model dela molekula HSA sa obeleženim ostatkom Cys34

Sadržaj tiolnih grupa HSA (oko 450 μM) čini 80 % ukupnih tiolnih grupa plazme (Turell, 2013) i daleko je veći u odnosu na ne-proteinske redukovane tiole (15 do 20 μM). Odnos slobodni tioli/disulfidi je nizak za ostale tiole, osim za GSH i HSA, što ukazuje na značajnu antioksidativnu ulogu slobodne tiolne grupe HSA u plazmi. Dakle, glavni antioksidansi u plazmi su askorbat, urat, tokoferol i HSA (Anraku, 2013).

Ispitivanjem antioksidativne funkcije HSA, kao i eksperimentima u kojima je ostatak Cys34 bio zamenjen sa Ala, dokazan je značajan doprinos slobodne tiolne grupe pri reakcijama sa superoksid-anjonom (61 %), H_2O_2 (68 %), $\cdot\text{OH}$ (38 %), HOCl (36 %) i azot (II)-monoksidom (51 %) (Iwao, 2012). Predloženo je i potvrđeno da zastupljenost frakcije HSA, u kojoj je tiolna grupa oksidovana do disulfida (HSA-S-S-R) i ireverzibilno modifikovana u HSA-SO₂H i HSA-SO₃H, može predstavljati validan biomarker oksidativnog stresa (Anraku, 2013). Kod pacijenata

sa hroničnim oboljenjima bubrega, sadržaj oksidovanih frakcija HSA je povećan (Takahashi, 2016; Terawaki, 2007).



Slika 14. Stvaranje sulfenske kiseline pri oksidaciji Cys34 tiolne grupe humanog serumalbumina. Potencijalni reaktanti i proizvodi reakcije sulfenske kiseline HSA.

In vitro ispitivanja su pokazala da je HSA, sa ostatkom Cys34 u obliku sulfenske kiseline (HSA-SOH), intermedijer koji može da se u prisustvu viška oksidanasa dalje oksiduje do HSA-SO₂H i HSA-SO₃H. Može i da reaguje sa tiolima pri čemu nastaje disulfid (HSA-S-S-R₁). U reakciji sa aminima (R₂NH₂) nastaju sulfenamidi HSA-SNHR₂. Sa drugim molekulom sulfenske kiseline (R₃SOH) gradi se tiosulfid HSA-S(O)SR₃ (Slika 14). Proučavanjem kinetika reakcija sulfenske kiseline utvrđeno je da je glavni put njene transformacije građenje mešovitih disulfida (HSA-S-S-R₁).

2.5.1. Reaktivnost slobodne tiolne grupe Cys34 HSA

Kako je podvučeno u poglavlju 2.5., slobodna tiolna grupa HSA značajno doprinosi njegovoj antioksidativnoj aktivnosti. Stoga je od interesa proučavati brzinu reakcije tiolne grupe sa različitim oksidansima. Za reakciju tiolne grupe sa H_2O_2 i peroksinitritom (ONOO^-) određene su brzine reakcije (2.2 do $2.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i $3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, redom) na pH 7.4 i 37°C , a ove vrednosti su slične brzini reakcije slobodnog cisteina i GSH (Turell, 2009). Iako slobodna tiolna grupa HSA ne reaguje izuzetno brzo sa navedenim oksidansima, njena antioksidativna aktivnost je značajna zbog velike koncentracije HSA u plazmi.

Novija istraživanja su pokazala da vezivanje masnih kiselina za HSA utiče na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA grupe sa H_2O_2 i ONOO^- , kao i sa 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoevom kiselinom) (DTNB) (Jovanović, 2013; Pavićević, 2014). Torres i saradnici (2012) su utvrdili da na fiziološkom pH kompleks stearinske kiseline (S)/HSA (5/1) reaguje 6 puta brže sa DTNB-om i 2 puta brže sa H_2O_2 i ONOO^- , u odnosu na odmašćeni HSA. Istovremeno, utvrđeno je da je u prisustvu S porast reaktivnosti HSA-SOH manji u odnosu na redukovani HSA-SH, čime se favorizuje stvaranje reversibilnih oksidovanih vrsta HSA-S-S- R_1 u odnosu na ireverzibilne proizvode oksidacije (HSA-SO₂H i HSA-SO₃H).

U studiji u kojoj je ispitivan uticaj različitih masnih kiselina na brzinu reakcije (konstantu brzine pseudo-prvog reda) tiolne grupe HSA sa DTNB-om, pokazano je da porast reaktivnosti zavisi ne samo od koncentracije, već i od vrste masne kiseline (dužine lanca i zasićenosti/nezasićenosti) koja se vezuje za HSA (Pavicevic, 2014). Pri vezivanju masnih kiselina konstanta brzine reakcije se povećavala za 2 do 3.5 puta, pri čemu je redosled porasta reaktivnosti u zavisnosti od vrste masnih kiselina bio: PA < DHA < OA < S < miristinska kiselina (MA) < EPA. Dugolančane masne kiseline dele ista mesta vezivanja na molekulu HSA, ali se priroda interakcija i afiniteti razlikuju (Pepitpas, 2001).

Pri normalnim fiziološkim uslovima, od 0.1 do 2 molekula masnih kiselina se vezuje po molekulu HSA (Turell, 2013). U određenim fiziološkim (gladovanje, intenzivno vežbanje) i patološkim stanjima (npr. hronična bubrežna slabost, dijabetes, bolesti jetre) povećava se molarni odnos FFA/HSA u krvi, i može da bude 6:1 (Brodersen, 1990; Hostmark, 1995; Zhang, 2014).

Za ova stanja utvrđeno je da dolazi i do povećanja oksidativnog stresa. Vezivanje masnih kiselina za HSA, i posledično povećanje reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA, mogli bi biti adaptacioni mehanizam u navedenim stanjima koji vode bržoj eliminaciji oksidanasa (Torres, 2012).

2.5.2. Uticaj vezivanja masnih kiselina na reaktivnost tiolne grupe Cys34 HSA

Masne kiseline se ne vezuju direktno za Cys34, ali dovode do konformacionih promena u molekulu HSA (Simard, 2006; Hamilton, 2013) (Slika 8). Na osnovu kristalografskih određivanja, ispitano je da li pri vezivanju masnih kiselina dolazi do promena u blizini ostatka Cys34. Utvrđeno je da je kod odmašćenog HSA Cys34 zaklonjen u pukotini veličine 9.5 Å, i da vezivanje masnih kiselina dovodi do otvaranja pukotine. Dostupnost Cys34 ostatka raste od 0.7 %, koliko iznosi u odmašćenom HSA, do 4.9 % u kompleksu sa S (Torres, 2012). U kompleksima S/HSA povećavaju se i rastojanja između atoma sumpora Cys34 i atoma kiseonika karboksilne grupe Asp38, atoma azota imidazolskog prstena His39 i atoma kiseonika u hidroksilnoj grupi Tyr84 (Torres, 2012).

Usled vezivanja masnih kiselina dolazi do promene pK_a vrednosti tiolata Cys34 za oko 0.5 pH jedinica. Dobijene razlike u porastu konstanti brzine reakcija tiolne grupe sa DTNB-om i H_2O_2 i $ONOO^-$ ukazuju da postoji još neki dodatni faktor, koji utiče na reaktivnost ove grupe. Promena pK_a vrednosti je naverovatnije posledica promene polarnosti mikro-okoline oko ostatka Cys34, nastale usled konformacionih promena koje indukuje vezivanje masnih kiselina u blizini Cys34 (Tabela 2). Dodatno, menjaju se i rastojanja ostataka His i Tyr koji igraju ulogu u stabilizaciji tiolata Cys34. Torres i saradnici (2012) su zaključili da zbog konformacionih promena dolazi i do smanjenja sternih restrikcionihi faktora (geometrija Cys34) i time do najvećih promena u reaktivnosti tiolne grupe prema DTNB (koji je veći molekul u poređenju sa H_2O_2).

Tabela 2. *Ostaci aminokiselina koji se nalaze na rastojanju od 7 Å u odnosu na ostatak Cys34 i vrednosti hidrofobnosti izolovanih ostataka u odnosu na izračunate vrednosti u mikrookolini Cys34 (STING report, 2005).*

Amino kiselina	Hidrofobnost	Izračunata hidrofobnost
Leu31	4.92	4.8
Gln32	-5.54	-0.23
Gln33	-5.54	-1.16
Gln34	1.28	1.24
Pro35	3.5	2.6
Asp38	-8.72	-1.42
His39	-4.66	-0.01
Leu42	4.92	4.87
Leu74	4.92	4.91
Val77	4.04	3.69
Ala78	1.81	1.81
Thr83	-2.57	-0.91
Tyr84	-0.14	-0.01

2.5.3. Uticaj His39 i Tyr84 na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA

Da bi se veći deo bočnog ostatka Cys34 u cirkulaciji nalazio u redukovanoj formi, kao i da bi HSA reagovao kao antioksidans, reaktivnost Cys34 mora biti regulisana sa ostacima aminokiselina koji ga u molekulu HSA okružuju.

Proučavanje zavisnosti promene reaktivnosti tiolne grupe od pH su pokazale da u oblasti od 6 do 8 dolazi do izraženog porasta reaktivnosti ostatka Cys34 (Stewart, 2004). U oblasti pH

od 6 do 8 dobijeno je povećanje reaktivnosti za oko 4 puta za molekul HSA kod koga postoji mutacija Tyr84Phe, dok u slučaju mutacije His39Leu brzina reakcije sa DTNB-om se smanjuje do pH 8. U oblasti pH između pH 8 i 8.5 dolazi do porasta reaktivnosti kod His39Leu i Tyr84Phe mutiranih HSA u odnosu na HSA bez mutacija, ali je efekat izuzetno izražen kod Tyr84Phe mutacija HSA. Na pH 8.4 brzina reakcije pseudo prvog reda tiolne grupe HSA bez mutacija dostiže plato, dok za His39Leu i Tyr84Phe mutirane molekule raste i pri pH > 9. Na pH 10.2 reakcija DTNB sa tiolnom grupom HSA sa His39Leu mutacijom je za oko 3 puta brža, a sa Tyr84Phe mutacijom oko 170 puta brža u odnosu na HSA bez mutacija.

Kako se reakcija stvaranja disulfida sa DTNB odvija nukleofilnim napadom deprotonovanog tiolata na disulfide, za očekivati je da dolazi do promene brzine reakcije sa promenom pH. Na osnovu rezultata ispitivanja zavisnosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda od pH utvrđeno je da pK_a vrednost bočnog ostatka Cys34 iznosi 6.7, što je značajno niže u odnosu na ostatak slobodnog Cys (pK_a 8 do 9; Stewart, 2005). Ovakve promene u pK_a vrednosti su utvrđene i za neke druge proteine, a u većini slučajeva pokazano je da dolazi do stabilizacije tiolatnog jona elektrostatičkim interakcijama sa pozitivno naelektrisanim aminokiselinskim lancima ili dipolima α -heliksa (Stewart, 2005). U nekim proteinima stvara se jonski par sa protonovanim His, čija blizina može smanjiti vrednost pK_a i za 5 jedinica (Stewart, 2005). Sa druge strane, u nekim studijama utvrđeno je da je pK_a Cys34 HSA značajno viši, oko 8 (Torres, 2012; Alvarez, 1999).

Rezultati ispitivanja su pokazali i da His39 i Tyr84 učestvuju u stabilizaciji tiolatnog jona Cys34: kod mutacija HSA, kod kojih su ovi ostaci zamenjenu nepolarnim aminokiselinskim ostacima, vrednost pK_a Cys34 tiolne grupe je za oko 0.5 jedinica viša. Tyr84 igra trostruku ulogu, jer povećava nukleofilnost tiolata Cys34, doprinosi relativno velikom redoks-potencijalu i simultano ograničava pristup drugim molekulima do Cys34 HSA, stabilišući efektom Tyr84-OH \cdots S-Cys34 vodonične veze.

2.5.4. Primena komercijalnih preparata HSA

Iako je antioksidativna uloga HSA nesumljivo dokazana, kao i njen značajan doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti plazme (Anraku, 2013; Turell, 2013) dodavanje komercijalnih HSA preparata pri infuziji, u situacijama kada dolazi do smanjenja zapremine krvi, ili sepse, ili insuficijencije jetre, su u nekim studijama pokazala pozitivan efekat (Taverna, 2013).

Da bi se pojasnili pokazani pozitivni efekti HSA, izgleda da je od najvećeg značaja antioksidativna uloga HSA (odnosno preparata HSA), čemu u prilog ide i centralna uloga oksidativnog stresa u patologijama kao što je sepsa ili insuficijencija jetre (Quinlan, 1998). U komercijalnim preparatima HSA zastupljeni su mešoviti disulfidi (HSA-S-S-R₁), glikozilovani i nitrozilovani HSA, kao i dimeri HSA (Jovanović, 2013; Pavićević, 2014). Uočena heterogenost preparata može biti razlog zbog koga su dobijeni različiti rezultati pri dodavanju HSA u infuzione rastvore. Još uvek je nejasno da li administracija komercijalnih HSA preparata, koji su značajno oksidovani, povećava ili smanjuje oksidativni stres kod obolelih (Taverna, 2013). Kako povećana koncentracija oksidovanog oblika HSA vodi promenama u antioksidativnoj funkcionalnosti HSA, razvoj pouzdane metode kojom bi se odredio kvalitativni i kvantitativni sastav komercijalnih preparata HSA je od kritične važnosti za njihovu kliničku upotrebu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Hemikalije

Sve hemikalije primenjene u ovom radu bile su p.a. čistoće:

- Kalijum-natrijum-tartarat, natrijum-hidroksid, bakar(II)-sulfat-pentahidrat, kalijum-jodid, DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina), standardi masnih kiselina: 13:0, 18:0, PUFA-2 mix, 2,6-di-terc-butyl-4-metilfenol (BHT), enterolakton (EL), enterodiol (ED), ferulinska kiselina (FE), galna kiselina, 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH)-radikal, 2,2-azobis(2-amidinopropan)-dihidrohlorid (AAPH), Folin Ciocalteu (FC) reagens (Sigma Chemicals, St. Louis);
- Hloroform, metanol, petroletar (frakcija 40 do 60 °C), n-heksan, natrijum-sulfat, sumporna kiselina, sirćetna kiselina (Centrohem, Stara Pazova);
- natrijum-hidrogen fosfat, natrijum-dihidrogen-fosfat, fosforna kiselina, ditiotreititol (DTT), dimetil-sulfoksid (DMSO), trihlor sirćetna kiselina (TCA), amonijum-molibdat, amonijum-vanadat, azotna kiselina, vodonik-peroksid (Merck, Darmstadt);
- 20 % rastvor HSA je nabavljen od Baxter-a, Beč, Austrija. Ovaj preparat, namenjen je za kliničku upotrebu, obično sadrži ~ 0,4 mol –SH/mol HSA;
- TRIS (tris-(hidroksimetil)-aminometan) proizvođača (ICN, Galenika, Beograd).

3.2. Aparati korišćeni pri radu

U radu je korišćena sledeća oprema:

centrifuge Tehnica LC 320 i Ependorf MiniSpin[®], pH metar Radiometar PHM 26, sušnica Instrumentaria ST 05, centrikoni za ultrafiltraciju (Amicon Ultra-15, Millipore, Carrigtwohill, Ireland), vodeno kupatilo NeoMedica, automatske pipete Brand, tehnička vaga Chyo MK 500C, magnetna mešalica Labortechnik i vorteks Tehnica EF 102, spektrofotometar Shimadzu UV 1800 spektrofotometar (Kyoto, Japan), spektrofluorimetar Fluoromax-4 Jobin Yvon (Horiba Scientific, Japan), i gasni hromatograf Shimadzu GC 2014 (Kyoto, Japan).

3.3. Metode

3.3.1. Estrakcija ukupnih lipida modifikanom metodom po Folch-u

Ukupni lipidi seruma i semenki lana, susama i golice estahuju se smešom organskih rastvarača hloroform/metanol 2:1 (v/v). U ovoj modifikaciji Folch-ove metode, lipidi seruma ekstrahovani su sa smanjenom zapreminom hloroform/metanola 2:1 (v/v) u odnosu na originalnu, metodu po Folch-u (1957), dodajući rastvarač u tri porcije i potom bez centrifugiranja sloja proteina ekstrakt prečišćen filtriranjem kroz sloj natrijum-sulfata (Mpagi, 2000).

Postupak: U 1mL seruma ili 1g semenki tri puta se dodaje po 3mL smeše hloroform/metanol 2:1 (v/v). Posle svakog dodavanja rastvarača smeša se izmučka na Vorteksu 2 minuta i potom dobiveni ekstrakt filtrira kroz sloj od 2 g natrijum-sulfata, kojim je napunjena staklena kolona zapremine 3ml.

3.3.2. Razdvajanje klasa lipida tankoslojnom hromatografijom

a) Izolovanje fosfolipidne frakcije seruma

Fosfolipidi seruma izolovani su jednodimenzionalnom tankoslojnom hromatografijom (TLC) na silika-gelu GH, debljine 0.5 mm. Totalni lipidni ekstrakt iz 1mL seruma nanosi se na ploču u vidu linije dužine 3 cm, na visini 2 cm od donje ivice ploče, koja je prethodno aktivirana na 110 °C u toku 1 sata. Kao sistem za razvijanje korišćena je smeša petroletar (frakcija 40 do 60 °C)/dietiletar/sirćetna kiselina (87:12:1 v/v/v). Razdvojene frakcije lipida identifikuju se pod UV lampom (Ristić, 1991).

b) Analiza frakcija fosfolipida metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki

Zastupljenost frakcija lipida u metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki ispitivana je jednodimenzionalnom HP-TLC na komercijalnim pločama debljine 0.2 mm (Macherey Nagel, Germany) u sistemu razvijaača, koji je primenjen i pri izolovanju fosfolipida seruma. Uzorci su nanošeni na ploče u vidu linije dužine 1 cm na visini 2cm od donje ivice ploče. Razdvojene frakcije lipida identifikuju se bojenjem ploče parama joda, a njihovi intenziteti određivani su posle skeniranja ploča, u programu dostupnom on-line (www.justquantify.com).

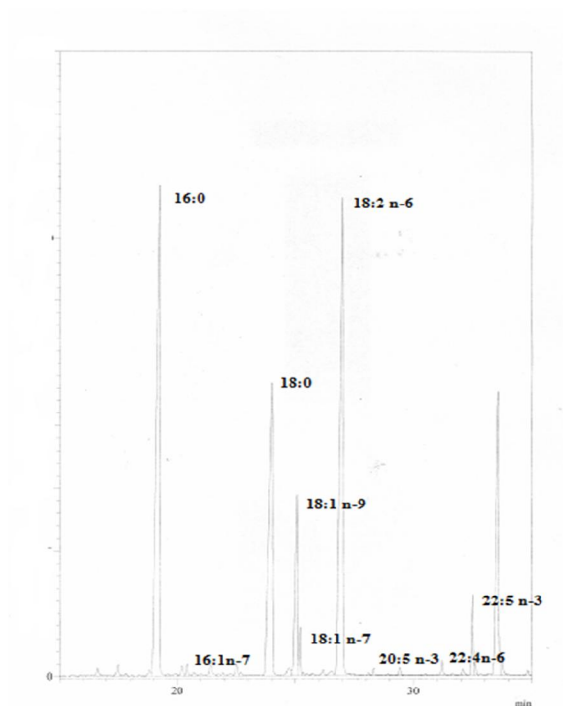
3.3.3. Hidroliza lipida i derivatizacija masnih kiselina

Masne kiseline se oslobode hidrolizom ukupnih lipida ispitivanih semenki, lipida obezmašćenih semenki (ekstrahovanih metanolom) i fosfolipidne frakcije seruma pacijenata na hemodijalizi, a potom se direktno esterifikuju metanolom, metodom transesterifikacije modifikovanom od strane Christopherson i Glass-a (1969).

Postupak: Ukupni lipidni ekstrakti semenki upare se do suva u struji azota, pre metilacije, dok se frakcija fosfolipida seruma sastruže sa TLC ploče. Doda se 2.0 mL n-heksana i promućka. Potom se doda 0.2 mL 2M NaOH u metanolu. Epruvete se ostave u termostatu na 85 °C u toku jednog sata. Potom se doda 0.2 mL 1M H₂SO₄ u metanolu i epruvete termostatiraju tokom dva sata na 85 °C. Nakon hlađenja, smeša se centrifugira na 3000 obrtaja/min. Odvojeni heksanski sloj upari se do suva u struji azota.

3.3.4. Analiza metil-estara masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom

Metil-estri masnih kiselina razdvajani su na gasnom hromatografu Shimazu GC 2014 (Kyoto, Japan), koji je opremljen sa plameno-jonizacionim detektorom i kapilarnom kolonom Restek-2330 (polietilenglikolna stacionarna faza), dužine 60 m i prečnika 0.20 mm ID. Uzorak metil-estara masnih kiselina, neposredno pre analize, rastvora se u odgovarajućoj zapremini heksana i od toga 0.5 do 1 µL se injektuje u kolonu. Protok nosećeg gasa (helijuma) je 11 mL/min. Protok vazduha sa zatvorenim MAKE UP-om je 500 mL/min, a vodonika 50 mL/min. Hromatograf je povezan sa kompjuterom, koji putem programa Lab Solutions obrađuje podatke razdvajanja. Pojedinačne masne kiseline identifikovane su upoređivanjem retencionih vremena pikova uzorka sa retencionim vremenima standarda masnih kiselina (PUFA-2 mix, Supelco) (Slika 15). Kvantifikacija masnih kiselina je urađena upoređivanjem integraljenih površina pikova svih metil-estara masnih kiselina sa površinom inertnog standarda (masne kiseline 13:0) poznate koncentracije.



Slika 15. Tipičan GLC hromatogram masnih kiselina fosfolipida seruma

3.3.5. Priprema metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice

a) Obezmašćivanje semenki lana, susama i golice

Postupak: Semenke lana, susama i golice samlevene su mlinom za kafu i potom su obezmašćene dodatkom n-heksana (1:6 w/v), stajanjem na sobnoj temperaturi u toku 16 h (Gaafar, 2013). Posle filtriranja na Bihnerovom levku, pod vakuum-om, obezmašćeni ostatak semenki je sušen na vazduhu u toku 18 h, i čuvan na -20 °C.

b) Priprema metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice

Postupak: Metanolni ekstrakti obezmašćenih semenki pripremljeni su modifikovanom metodom Bartheta i saradnika (2014). Obezmašćene semenke lana, susama i golice (10 g) estrahovane su sa 200 mL metanola, u toku 1 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje na magnetnoj mešalici. Smeša se potom filtrira na Bihnerovom levku, filtrat se upari do suva na vakuum-uparivaču, a ostatak re-ekstrahuje sa 200 mL metanola.

3.3.6. Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja

Metoda za određivanje sadržaja ukupnih fenola zasniva se na reakciji između FC reagensa i fenolnih jedinjenja, pri čemu nastaje obojeni kompleks sa maksimumom apsorpcije na 734 nm. FC reagens predstavlja smešu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Redukcijom, molibden i volfram prelaze u niža oksidaciona stanja gradeći molibdensko-plavo (Singleton, 1965).

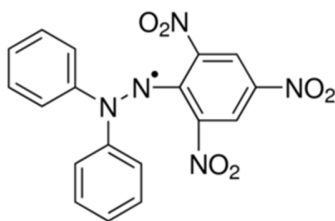
Postupak: Koncentracija fenola u uzorcima određuje se modifikovanim metodama Dewanto-a i saradnika (2002) i Wolfe-a i saradnika (2003). Odmeri se 0.5 mL ddH₂O, 0.125 mL uzorka (5 mg/mL u metanolu) i 0.125 mL komercijalnog 2N FC reagensa. Smeša se inkubira 6 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se u smešu doda 1.25 mL 7 % Na₂CO₃ i 0.75 mL ddH₂O. Nakon inkubacije u trajanju od 90 min (u mraku), meri se apsorbanca na 760 nm. Koncentracija ukupnih fenola je određena pomoću standardne prave ($y=0.00508x+0.01924$, $r=0.999$) pripremljene od galne kiseline (od 37.5 do 600 µg/mL). Sadržaj ukupnih fenola je izražen u jedinicama mg-ekvivalenata galne kiseline.

3.3.7. Određivanje antioksidativnog kapaciteta hladno-ceđenih ulja i metanolnih ekstrakata semenki

Za određivanje antioksidativne aktivnosti namirnica najčešće se primenjuju spektrofotometrijski DPPH i ABTS test. Glavni nedostatak ovih testova je to što se zasnivaju na sintetičkim radikalima, koji nisu prisutni u organizmu.

3.3.7.1. DPPH test

DPPH radikal je komercijalno dostupan azotni, dugoživeći radikal, tamno-ljubičaste boje (Slika 16). Pri redukciji DPPH radikala, u prisustvu antioksidanasa, gradi se hidrazin (jedinjenje žute boje), što omogućava merenje apsorbanca u opsegu talasnih dužina od 515 do 528 nm. DPPH radikal se rastvara u organskim rastvaračima, pa je upotrebu DPPH testa ograničena za hidrofobne antioksidanse.



Slika 16. Struktura DPPH radikala

DPPH testom određivan je antioksidativni kapacitet hladno-ceđenih ulja i metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice.

a) Određivanje antioksidativnog kapaciteta hladno-ceđenih ulja

Postupak: Za određivanje antioksidativnog kapaciteta hladno-ceđenih ulja pripremljen je 1 mM rastvor DPPH radikala u etil-acetatu (Espin, 2000). Pripremljena su razblaženja hladno-ceđenih ulja u etil-acetatu (1:10) i odmeravano je po 50 μ L ovih rastvora i mešano sa 950 μ L DPPH reagensa. Praćena je promena (smanjenje) apsorbance na 517 nm smeše ulja i DPPH u odnosu na slepu probu.

Istovremeno, pripremljeni su i metanol/vodeni ekstrakti ulja 60:40 (v/v) (Pirisi, 1997). Odmereno je 2 g ispitivanog ulja, 1 mL n-heksana i 2 mL smeše rastvarača metanol/voda 60:40 (v/v) i dobijena smeša je intenzivno promešana na Vorteksu. Centrifugiranjem na 3000 g, u trajanju od 3 minuta, odvojeni su slojevi. Donji metanolno/vodeni sloj 60:40 (v/v) je prebačen u drugu epruvetu, dodato je ponovo 2 mL smeše rastvarača metanol/voda 60:40 (v/v) u n-heksanski rastvor ulja i cela procedura ponovljena je još dva puta. Kombinovani metanol-vodeni ekstrakti ulja su isprani sa n-heksanom (1 mL), upareni do suva, rastvoreni u metanolu, pa je i u njima analizirana antioksidativna aktivnost DPPH testom. Rezultati su izraženi kao:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = (A_{\text{uzorka}} - A_{\text{slepe probe}}) / A_{\text{slepe probe}}$$

b) Određivanje antioksidativnog kapaciteta metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice

Antioksidativni kapacitet metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice određen je metodom opisanom u literaturi (Brand-Williams, 1995; Kim, 2002).

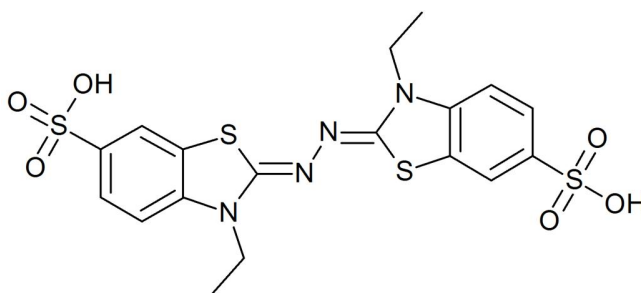
Postupak: Apsorbancija 1 mM DPPH radikala u metanolu doterana je na vrednost 0.650 ± 0.020 dodavanjem metanola. Suvi ostatak metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki, rastvoren je u DMSO-u (50 mg/mL), razblažen 10 puta metanolom do finalne koncentracije uzoraka od 5 mg/mL. Potom je 50 μ L uzorka dodato u 950 μ L DPPH reagensa i dobijeni rastvor je inkubiran u mraku 30 min. Zbog fotosenzitivnosti DPPH radikala, epruvete su bile obavijene aluminijskom folijom. Izračunato je smanjenje apsorbancije na 517 nm uzorka u odnosu na slepu probu.

c) Kalibraciona prava za određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH testom

Dodatkom metanola u 1 mM rastvor DPPH radikala u metanolu doterana je vrednost apsorbance na 0.650 ± 0.020 . Standardna serija rastvora Trolox-a (25, 50, 100, 200, 400 μ M u metanolu), je iskorišćena za konstruisanje kalibracione prave. Praćeno je smanjenje apsorbance na 517 nm nakon dodavanja 50 μ L rastvora Trolox-a u 950 μ L DPPH reagensa u odnosu na slepu probu. Rezultati antioksidativnog kapaciteta hladno-cedenih ulja, metanol/vodenih 60:40 (v/v) ekstrakata hladno-cedenih ulja i semenki izraženi su u μ M Trolox ekvivalenta (TE).

3.3.7.2. ABTS test

U ABTS testu se u prvom koraku generiše zeleno/plavo obojeni $ABTS^{\cdot+}$ katjon-radikal, koji se redukuje u prisustvu antioksidanasa i prati se smanjenje apsorbancije na 734 nm.



Slika 17. Struktura ABTS-a

Postupak: ABTS testom određivan je antioksidativni kapacitet metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki (finalna koncentracija uzoraka 5 mg/mL) metodom van der Berg-a i

saradnika (1999), koja je modifikovana od strane Kim i saradnika (2003). Smeša rastvora 2.5 mM ABTS-a i 1 mM AAPH u 10 mM fosfatnom puferu pH 7.4 zagreva se na vodenom kupatilu (na 68 °C) u toku 40 minuta. Nagrađeni plavo/zeleni rastvor ABTS^{•+} katjon-radikala ohladi se do sobne temperature i filtrira. Apsorbanca rastvora ABTS na 734 nm podesi se na 0.650 ± 0.020 fosfatnim puferom pH 7.4. U 980 µL rastvora ABTS^{•+} katjon-radikala doda se 20 µL uzorka ili standarda, promeša se i nakon inkubiranja 10 minuta na 37 °C, izmeri se apsorbanca na 734 nm, i izračuna smanjenje apsorbance u odnosu na slepu probu. Standardna serija rastvora Trolox-a (25, 50, 100, 200, 400 i 800 µM u metanolu), je iskorišćena za konstruisanje kalibracione prave. Rezultati su izraženi u µM Trolox ekvivalenata (TE).

3.3.8. Izbor pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, na programu hemodijalize, za suplementaciju ishrane

U studiju je uključeno 30 pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom (slabošću), na programu hemodijalize Odeljenja za nefrologiju Kliničko-bolničkog centra Zemun, koji su dali saglasnost za učešće u istraživanju. Pribavljena je i odluka/saglasnost Etičkog odbora Kliničko-bolničkog centra Zemun, za sprovođenje istraživanja. Kriterijumi po kojima su pacijenti odabrani za istraživanja bili su:

- starosna dob (od 42 do 64 godina);
- pol (oba pola 18 muškarca i 12 žena);
- nutritivni status (samo dobar);
- program hemodijalize (3 puta nedeljno);
- trajanje hemodijalize (bar 6 meseci pre početka studije);
- BMI < 30 kg/m²;
- ne konzumiranje alkohola i cigareta
- ne korišćenje hipolipemika, L-karnitina, beta-blokatora i vitamina B12 (bar tri meseca pre početka studije).

Lekovi za hipertenziju prepisivani su pacijentima kada im je krvni pritisak pre dijalize bio > 160/90 mm Hg. Pacijenti su bila na njihovoj uobičajnoj ishrani, sa restrikcijom unosa natrijuma i kalijuma.

3.3.9. Suplementacija ishrane pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, na programu hemodijalize, smešom semenki lana/susama/golice

Tokom studije bolesnici su konzumirali 30 g smeše samlevenih semenki lana/susama/golice (18 g : 6 g : 6 g) koju su dodavali u 200 mL obranog mleka, kao večernji obrok u trajanju od 12 nedelja.

3.3.9.1. Anketni upitnik za uremijski pruritus

Uremijski pruritus se javlja kod 60 do 90 % pacijenata na programu hemodijalize. Anketni upitnik (Peck, 1996; Prilog 1), koji se odnosio na prisustvo i frekvencu pojave pruritusa, je ispunjavan na početku i kraju sprovedene studije suplementacije ishrane smešom semenki.

3.3.10. Određivanja biohemijskih parametara u serumu

3.3.10.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fosfolipida seruma

Za određivanje sadržaja ukupnih fosfolipida seruma primenjena je metoda po Zilversmitu (Harth, 1978). Fosfolipidi seruma se talože TCA i oksiduju do fosfata perhlornom kiselinom i vodonik-peroksidom. U reakciji fosfata sa molibdatom i vanadatom, u prisustvu azotne kiseline, stvara se obojeni kompleks.

Reagensi:

1. 1.2 M TCA

- 19.6 g TCA rastvoriti u 100 mL destilovane vode.

2. Rastvor 1

- 0.2457 g amonijum-vanadata

- 1.94 mL azotne kiseline

Rastvoriti i dopuniti destilovanom vodom do 100 mL.

3. Rastvor 2

- 4.944 g amonijum-molibdata

- 6.66 mL sumporne kiseline

Pomešati i dodati destilovanu vodu do 100 mL.

4. Standardni rastvor (5 mg % fosfor)

- 219.5 mg kalijum-dihidrogenfosfata, rastvoriti u 1000 mL destilovane vode.

Postupak: Fosfolipidi seruma se u prvom koraku istalože: u 0.1 mL seruma doda se 2.0 mL 1.2 M TCA. Smeša se promućka, ostavi da stoji 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugira na 3000 obrtaja/min u toku 15 minuta. Supernatant se odlije, a na talog se doda 0.5 mL 70 % perhlorne kiseline i 0.2 mL 30 % vodonik-peroksida za mineralizaciju.

Za pripremu slepe probe odmeri se 0.5 mL 70 % perhlorne kiseline i 0.2 mL 30 % vodonik-peroksida, a za standard 0.5 mL 70 % perhlorne kiseline, 0.2 mL 30 % vodonik-peroksida i 0.1 mL rastvora standarda fosfora. Uzorci se promešaju i mineralizuju na peščanom kupatilu u toku 12 do 16 sati.

Kada se uzorci ohlade, dodaje se po 2 mL destilovane vode, 1 mL rastvora 1 i 1 mL rastvora 2. Apsorbanca rastvora na 405 nm se meri naspram slepe probe. Sadržaj fosfolipida (mg % i mM) u uzorku se izračuna prema formulama:

$$\text{mg \% fosfolipida} = A_{\text{analize}} / A_{\text{standarda}} \times 125$$

$$\text{mM fosfolipida} = \text{mg \% fosfolipida} \times 0.01292$$

3.3.10.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze, triacilglicerola, ukupnog i HDL-holesterola u serumu

Ispitanicima su uzimani uzorci krvi natašte, posle dvanaestčasovnog gladovanja. Serum je izdvajan centrifugiranjem na 3000 obrtaja/min u toku 15 min na sobnoj temperaturi i čuvan na temperaturi od +4 °C. U serumu su određivane koncentracije glukoze, ukupnog holesterola, HDL-holesterola i triglicerida. Koncentracija LDL-holesterola je izračunata po Friewald-ovoj formuli.

3.3.10.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glukoze

Glukoza se oksiduje uz prisustvo glukozo-oksidade, izdvaja se vodonik-peroksid, koji reaguje sa fenolom i amino-antipirinom i dobija se obojeni kompleks (Trinder, 1969).

Reagensi: Za određivanje koncentracije glukoze korišten je test Glucose ELITECH Diagnostic, France.

Reagens 1

- fosfatni pufer pH 7.40 (100 mM)
- fenol (10 mM)

Reagens 2

- glukoza-oksidaza (≥ 10000 U/L)
- peroksidaza (≥ 600 U/L)
- 4-aminoantipirin (270 μ M)

Radni reagens priprema se mešanjem reagenasa 1 i 2 u odnosu 1:1.

Standardni rastvor

- glukoza (5.56 mM)

Postupak: Koncentracija glukoze određivana je prema sledećoj shemi:

	<i>Standard</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Slepa proba</i>
<i>Radni reagens (mL)</i>	1	1	1
<i>Destilovana voda (mL)</i>	-	-	0.01
<i>Standard (mL)</i>	0.01		-
<i>Serum (mL)</i>	-	0.01	-
Inkubacija na 37 °C, 5minuta			
Merenje apsorbancije (A) na 500 nm naspram slepe probe			

Izračunavanje sadržaja glukoze:

$$\text{Sadržaj glukoze (mM)} = A_{\text{analize}} / A_{\text{standarda}} \times C_{\text{standarda}} (5.56 \text{ mM})$$

3. 3.10.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije triacilglicerola u serumu

Triacilgliceroli se hidrolizuju uz prisustvo lipoprotein-lipaze, dobijeni glicerol se fosforiluje uz pomoć ATP-a i glicerol-kinaze. Glicerol-3-fosfat se dalje enzimski (glicerol-3-fosfat-oksidaza) oksiduje, pri čemu nastaje vodonik-peroksid. Vodonik-peroksid reaguje sa 4-aminoantipirinom i p-hlorfenolom, u prisustvu peroksidaže, i gradi se obojeni kompleks (McGowan, 1983).

Reagensi: Za određivanje koncentracije triacilglicerola korišten je test Triglycerides ELITECH Diagnostic, France.

Reagens 1

- Pipes pufer, pH 7.5 (50 mM)

- Mg^{2+} (15 mM)

- ADPS (1 mM)

- Reagens 2

- ATP (0.3 mM)

- 4-aminoantipirin (0.7 mM)

- lipoprotein lipaza (≥ 1100 U/L)

- glicerol-kinaza (≥ 800 U/L)

- glicerol-3-fosfat oksidaza (≥ 5000 U/L)

- peroksidaza (≥ 350 U/L).

Radni reagens priprema se rastvaranjem reagensa 2 u 250 mL reagensa 1.

- Standardni rastvor

- glicerol (2.28 mM)

Postupak: Koncentracija triacilglicerola u serumu određivana je prema sledećoj shemi:

	<i>Standard</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Slepa proba</i>
<i>Radni reagens (mL)</i>	1	1	1
<i>Destilovana voda (mL)</i>	-	-	0.01
<i>Standardni rastvor (mL)</i>	0.01	-	-
<i>Serum (mL)</i>	-	0.01	-
Inkubacija na 37 °C, 5 minuta			
Merenje apsorbancije (A) na 550 nm naspram slepe probe			

Izračunavanje sadržaja triacilglicerola:

$$\text{Sadržaj triacilglicerola (mM)} = A_{\text{analize}} / A_{\text{standarda}} \times C_{\text{standarda}}$$

3.3.10.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnog holesterola

Sadržaj ukupnog holesterola u serumu određivan je metodom po Allian-u (Allian, 1974). Inicijalna faza je reakcija hidrolize holesterol-estara, koju katalizuje holesterol-esteraza.

Oslobodeni holesterol se enzimski oksiduje, u prisustvu holesterol-oksidade, pri čemu se izdvaja vodonik-peroksid. Vodonik-peroksid reaguje sa fenolom i 4-aminoantipirinom u prisustvu peroksidaze i nastaje obojeni kompleks.

Reagensi: Za određivanje koncentracije holesterola korišćen je komercijalno dostupan kit Cholesterol ELITECH Diagnostic, France.

- Reagens 1
 - Pipes pufer pH 6.90 (50 mM)
 - fenol (24 mM)
 - natrijum-holat (0.5 mM)
- Reagens 2
 - 4-aminoantipirin (0.5 mM)
 - holesterol-esteraza (≥ 180 U/L)
 - holesterol-oksidaža (≥ 200 U/L)
 - peroksidaza (≥ 1000 U/L)
- Standard
 - holesterol 5.17 mM

Radni reagens priprema se rasvaranjem reagensa 1 u 250 mL reagensu 2.

Postupak: Koncentracija holesterola u serumu određivana je prema sledećoj shemi:

	<i>Standard</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Slepa proba</i>
<i>Radni reagens (mL)</i>	1	1	1
<i>Destilovana voda (mL)</i>	-	-	0.01
<i>Standard (mL)</i>	0.01	-	-
<i>Serum (mL)</i>	-	0.01	-
Inkubacija na 37 °C, 5 minuta			
Merenje apsorbancije (A) na 500 nm naspram slepe probe			

Izračunavanje sadržaja ukupnog holesterola:

$$\text{Sadržaj ukupnog holesterola (mM)} = A_{\text{analize}} / A_{\text{standarda}} \times C_{\text{standarda}}$$

3.3.10.2.4. Određivanje koncentracije HDL-holesterola

Metoda za određivanje HDL-holesterola zasniva se na taloženju lipoproteinskih čestica seruma (hilomikrona, lipoproteina veoma male gustine (VLDL), lipoproteina male gustine (LDL)) pomoću polianjonskih rastvora, pri čemu u supernatantu nakon centrifugiranja zaostaju lipoproteini velike gustine (HDL). Holesterol lipoproteina velike gustine (HDL-holesterol) se enzimski određuje u supernatantu (Lopez Virela, 1977).

Reagensi:

Reagens 1

- fosfovolframat (14 mM)

Reagens 2

- magnezijum-hlorid (1 mM)

Radni precipitacioni reagens se priprema mešanjem reagensa 1 i 2 u odnosu 1:2.

Standard

- holesterol (1.30 mM)

Postupak: U 0.5 mLseruma doda se 50 μ L precipitacionog reagensa. Rastvor se promućka i ostavi na temperaturi + 4 °C u toku 10 min, a zatim centrifugira na 3000 obrtaja/min 15 min. Odvoji se supernatant za određivanje HDL-holesterola. U supernatantu se koncentracija holesterola određuje prema metodi Aillin-a, prema sledećoj shemi:

	<i>Standard</i>	<i>Uzorak</i>	<i>Slepa proba</i>
<i>Radni reagens (mL)</i>	1	1	1
<i>Destilovana voda (mL)</i>	-	-	0.05
<i>Standard (mL)</i>	0.05	-	-
<i>Supernatant (mL)</i>	-	0.05	-
Inkubacija na 37 °C, 5minuta			
Merenje apsorbancije na 500 nm naspram slepe probe			

Izračunavanje sadržaja HDL-holesterola:

$$\text{HDL-holesterol (mM)} = A_{\text{analize}}/A_{\text{standarda}} \times C_{\text{standarda}} (1.30 \text{ mM}) \times F_{\text{razblaženja}} \quad (1.1)$$

3.3.10.2.5. Izračunavanje koncentracije LDL-holesterola

LDL holesterol se izračunava po Friedwald-ovoj formuli (Friedwald, 1992):

$$\text{LDL-holesterol (mM)} = \text{ukupni holesterol (mM)} - \text{HDL-holesterol (mM)} - \frac{\text{triacilgliceroli (mM)}}{2.2}$$

3.3.10.3. Određivanje koncentracije insulina

Koncentracija insulina (natašte) određivana je RIA metodom (Morgan, 1963) korišćenjem komercijalno dostupnog kita (INEP, Zemun).

3.3.10.3.1. Izračunavanje HOMA-IR vrednosti

HOMA-IR (homeostasis model assesment) vrednost izračunata je po formuli (Matthews, 1985):

$$\text{HOMA-IR vrednost} = \text{koncentracija glukoze (mM)} \times \text{insulin natašte (mU/mL)} / 22.5$$

3.3.10.4. Određivanje koncentracije faktora inflamacije

Kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na programu hemodijalize određivana je koncentracija faktora inflamacije: C-reaktivni protein (CRP), tumor nekrozis faktor (TNF- α) i interleukin-6 (IL-6). Koncentracije IL-6 i TNF- α su određivane u duplikatu ELISA metodom pomoću komercijalno dostupnih kitova (Immunotech, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), a koncentracija CRP imunoturbidimetrijskom metodom kitom Olympus (LATEX) test na Olympus AU 400 analizatoru (Olympus, PA, USA).

3.3.11. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina u fazama izolovanja i modifikovanja HSA određena je Biuretskim reagensom (Robinson, 1940).

Reagensi:

Biuretski reagens:

- 4.5 g kalijum-natrijum-tartarata,
- 4 g natrijum- hidroksida,

- 1.5 g bakar-sulfata pentahidrata,
- 2.5 g kalijum-jodida

Rastvoriti supstance u ddH₂O, i dopuniti do 500 mL.

Postupak: 20 µL uzorka i 1 mL biuretskog reagensa se pomeša u epruveti. Nakon 30 minuta inkubiranja na 25 °C meri se apsorbancu na 546 nm naspram slepe probe reagensa. Dobijena apsorbancu se potom koriguje za slepu probu uzorka. Koncentracija HSA se izračunava pomoću standardne prave ($y=0.00517x + 0.00294$, $r=0.999$) pripremljene sa rastvorima komercijalnog HSA (koncentracija od 1 do 100 g/L). Određivanja koncentracije proteina su rađena u triplikatu.

3.3.12. Određivanje koncentracije tiola Ellman-ovim reagensom

Sadržaj slobode tiolne grupe HSA, određen je spektrofotometrijski, modifikovanom Ellmanovom metodom (Bulaj, 1998).

Reagensi:

- 1 M Tris pH 8.0
- 2 mM DTNB reagens:
 - 7.92 mg DTNB,
 - 68 mg natrijum-acetata
 - ddH₂O do 10 mL
- 0.1 M natrijum-fosfatni pufer pH 7.4

Postupak: U epruveti se pomeša 100 µL uzorka, 100 µL 1 M Tris pufera (pH 8.0) i 100 µL DTNB reagensa, a zatim se smeša dopuni sa ddH₂O do 1 mL. Nakon inkubiranja u trajanju od 30 minuta na 25 °C, meri se apsorbancija na 412 nm, prema slepoj probi reagensa. Dobijena apsorbancu se koriguje za apsorbancu uzorka. Koncentracija tiola je izračunata na osnovu standardne prave ($y=0.00136x-0.00935$, $r=0.999$) snimljene sa rastvorima Cys (koncentracije od 0.001 do 1 mM). Sadržaj slobodne tiolne grupe HSA u mol-SH/mol HSA. Sva određivanja su urađena u triplikatu.

3.3.13. Određivanje konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda

Za praćenje kinetike reakcije između slobodne tiolne grupe HSA i DTNB- a i određivanje konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k'), molarni odnos HSA i DTNB-a u inkubacionoj smeši bio je 1:20.

Reagensi:

- 1 M Tris pH 8.0
- 3.5 mM DTNB reagens
- 0.1M natrijum-fosfatni pufer pH 7.4

Postupak: Pre određivanja k' , za reakciju slobodne tiolne grupe HSA sa DTNB-om, svi uzorci HSA su prethodno preinkubirani 30 minuta na 37 °C. U epruveti se pomeša 100 μ L uzorka HSA (0.25 mM) i 100 μ L Tris pufera (1M, pH 8.0) sa 700 μ L ddH₂O i potom se u reakcionu smešu dodaje 100 μ L 3.5 mM DTNB reagensa. U intervalima od 5 s (prvih 90 s), pa od 10 s (od 90 do 270 s) i potom od 30 s (od 270 do 1800 s), merena je apsorbancija prema slepoj probi reagensa na 37 °C. Linearizovanjem logaritma koncentracije slobodne tiolne grupe HSA u funkciji vremena konstruiše se prava linija čiji nagib predstavlja negativnu vrednost k' , za reakciju slobodne tiolne grupe HSA sa DTNB-om.

3.3.14. Priprema uzoraka HSA za *in vitro* ispitivanja

U normalnim fiziološkim uslovima, kod zdravih osoba sadržaj HSA-SH grupa je oko 70 do 80 %, a po molekulu HSA je vezano od 0.2 do 2 molekula masnih kiselina. Za potrebe *in vitro* eksperimenata, komercijalni HSA je prethodno trebalo odmastiti, redukovati, i kontrolisano zamastiti.

3.3.14.1. Redukcija komercijalnog HSA

Za potrebe *in vitro* eksperimenata u kojima sadržaj HSA-SH grupa treba da bude oko 0.6 mol-SH/mol HSA (odgovara fiziološkim vrednostima), komercijalni HSA (sa sadržajem HSA-SH grupa oko 0.4 mol-SH/mol HSA) je redukovan sa DTT.

Postupak: Pre redukcije, potrebno je odrediti sadržaj HSA-SH grupa u komercijalnom HSA. Odgovarajuća količina HSA (2 mL, koncentracije 200 g/L) pomeša se sa DTT u molarnom

odnosu 1:1 (molarni odnos oksidovanih tiol grupa u HSA : DTT). Smeša se inkubira 1 h na 37 °C, u 0.1 M natrijum-fosfatnom puferu, pH 7.4. Ultrafiltracijom korišćenjem centrikona (Ultracel®-30K centrikon, Millipore, USA) višak DTT iz rastvora redukovano HSA se ukloni višestukim ispiranjem sa 0.1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7.4. Redukovani HSA se potom skoncentruje do oko 100 g/L.

3.3.14.2. Odmašćivanje HSA

Komercijalni rastvor HSA sadrži vezane FFA u odnosu FFA/HSA oko 0.5:1. Za potrebe *in vitro* eksperimenata u kojima je korišćen odmašćeni i kontrolisano zamašćeni HSA, komercijalni HSA je prethodno tretiran aktivnim ugljem u cilju pripremanja odmašćenog HSA (Chen, 1967).

Postupak: Komercijalni HSA (koncentracije 200 g/L) razblaži se 2 puta sa 0.1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7.4. U razblaženi rastvor HSA, uz mešanje dodaje se 1.0 g aktivnog uglja (sračunato na 10 mL komercijalnog nerazblaženog HSA) i pomoću 3 M HCl pH rastvora podesi se na 3.0. Zakišeljani rastvor meša se na ledu u trajanju od 1 h, a potom aktivni ugalj uklanja centrifugiranjem 15 minuta na 6000 x g. Odvoji se supernatant i njegov pH podesi na 7.0 pomoću 1 M NaOH. Odmašćeni HSA ispira se sa 10 puta većom zapreminom 0.1 M natrijum-fosfatnog pufera (pH 7.4), i nakon ispiranja rastvor HSA skoncentruje ultrafiltracijom u centrikonu (Ultracel®-30K centrikon, Millipore, USA) do oko 100 g/L.

3.3.14.3. Zamašćivanje uzorka HSA

Za potrebe *in vitro* eksperimenata sa kontrolisano zamašćenim HSA, u pripremljen rastvor odmašćenog HSA sa sadržajem HSA-SH grupa oko 0.65 mol-SH grupa/mol HSA dodat je rastvor stearinske kiseline (50 mM) u metanolu.

Postupak: Odredi se koncentracija odmašćenog HSA u rastvoru. Rastvor odmašćenog HSA razblaži sa 0.1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7.4 do željene koncentracije (mM) i prema njoj se izračuna potrebna količina štoka rastvora stearata (50 mM), koja se dodaje da bi molarni odnos S/HSA bio 1:1, 2:1 odnosno 4:1. Odmeriti rastvor S, otkloniti organski rastvarač uparavanjem pod strujom azota, a zatim dodati rastvor odmašćenog HSA. Smešu inkubirati u tokom 90 minuta na 37 °C na vodenom kupatilu. Nakon inkubacije, rastvor zamašćenog HSA je upotrebljen za *in*

vitro ispitivanja vezivanja FE, enterolignana (ED i EL) za HSA, snimanjem fluorescentnih spektara, za određivanje k' za reakciju Cys34 tiolne grupe kompleksa HSA (sa S, FE i enterolignanima) i DTNB-a.

3.3.14.4. Pripremanje uzoraka HSA određenog sadržaja Cys34 tiolne grupa

Nakon primene postupka odmašćivanja i/ili redukcije komercijanog HSA određen je sadržaj slobodne tiolne grupe HSA. Za potrebe eksperimenata, u kojima sadržaj slobodne tiolne grupe HSA grupa treba da bude veći od 0.4 mol-SH grupe/mol HSA (koliko obično iznosi za komercijalni HSA), pripremljeni su uzorci HSA sa sadržajem slobodne tiolne grupe HSA od oko 0.6 do 0.7 mol-SH grupe/mol HSA mešanjem odgovarajućih zapremina odmašćenog redukovanog i neredukovani komercijalnog HSA.

3.3.15. Fluorescentno-spektroskopska ispitivanja vezivanja liganada za HSA

Za ispitivanje vezivanja FE i enterolignana (EL i ED) za HSA, kao i efekata (kompetitivnih i kooperativnih) vezivanja masnih kiselina za HSA na vezivanje fenolnih jedinjenja, korišćena je metoda fluorescentne spektroskopije.

Fluorescentni spektri HSA su snimljeni na spektrofluorimetru Fluoromax-4 Jobin Yvon (Horiba Scientific, Japan). Finalni emisioni spektri 0.5 μ M HSA (odmašćeni HSA, kompleksi S/HSA 1:1, S/HSA 4:1) predstavljeni su kao srednja vrednost dva skeniranja u kvarcnoj kivetu dužine 1cm, uz širinu slita 5 nm, uz korekciju dobijenih spektara za odgovarajuću slepu probu (pufer + ligand: FE, EL, ED).

Rastvori odmašćenog HSA, S/HSA 1:1 i S/HSA 4:1 su pripremani uvek sveži, razblaživanjem štok rastvora HSA (0.25 mM u 100 mM natrijum-fosfatnom puferu) sa 100 mM natrijum-fosfatnim puferom pH 7.4 i FE, EL, ED (25 mM rastvor u DMSO-u) do finalnih koncentracija 0.5 μ M HSA i 100 μ M FE, EL, ED u svim eksperimentima. Alikvoti 100 μ M rastvora liganada (FE, EL, ED) su dodavani u 2.5 mL 0.5 μ M rastvora HSA, tako da su finalne koncentracije liganada bile: 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 i 2.5 μ M. Talasna dužina ekscitacije bila je 280 nm, a emisioni spektri su snimani na 25 °C (za FE) i 37 °C (za FE, EL, ED).

Kako ligandi mogu apsorbovati energiju i na talasnim dužinama ekscitacije i emisije HSA, da bi se prevazišao tkz. „inner- filter“ efekat, izmerene su apsorbance ispitivanih liganada (FE, EL, ED) (pomoću spektrofotometra Shimadzu UV 1800, Japan) i intenziteti fluorescencije su korigovani prema jednačini 1 (van der Veert, 2011):

$$F_c = F_u \times 10^{(A_{ex} \cdot d_{ex} + A_{em} \cdot d_{em})/2} \quad (1)$$

gde je F_u izmeren intenzitet emisije fluorescencije, F_c je korigovan intenzitet fluorescencije, koji bi bio izmeren da nema „inner- filter“ efekta, d_{ex} i d_{em} su dužine ćelije za merenje u pravcu ekscitacije i emisije (1cm), A_{ex} i A_{em} su apsorbance liganada izmerene na talasnoj dužini ekscitacije i talasnoj dužini maksimuma emisinog spektra (340nm).

Konstante gašenja intenziteta fluorescencije kompleksa HSA sa FE i enterolignanima su određene korišćenjem Stern-Volmer-ove jednačine (2):

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

gde F_0 i F su intenziteti fluorescencije HSA na 340 nm, pre i posle dodatka liganada (FE, EL, ED), K_{sv} je Stern-Volmer-ova konstanta gašenja fluorescencije, k_q predstavlja konstantu brzine gašenja fluorescencije, τ_0 je poluzivot fluorofore i $[Q]$ koncentracija liganda, koji dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije (Lakovicz, 2006).

Konstante statičkog vezivanja izračunate su pomoću modifikovane Stern-Volmerove formule prikazane jednačinom 3 (Lakovicz, 2006):

$$F_0/\Delta F = 1/f_a + 1/[Q] * 1/f_a K_A \quad (3)$$

u kojoj je F_0 predstavlja intenzitet fluorescencije HSA na 340 nm pre dodatka liganda, ΔF je promena intenziteta fluorescence usled dodatka liganda, f_a efikasnost gašenja fluofore, $[Q]$ koncentracija liganda, koji dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije i K_A konstanta statičkog vezivanja liganda za HSA.

Za izračunavanje konstante vezivanja (K_a) i broja vezujućih mesta (n) na molekulu HSA korišćena je jednačina 4 (Bi, 2001):

$$\log (F_0 - F)/F = -n \log (1/([Q] - [P]) \times (F_0 - F)/F_0) + n \log K_a \quad (4)$$

gde su $[Q]$ i $[P]$ ukupne koncentracije liganada i proteina (odmašćeni HSA, S/HSA 1:1 i 4:1).

Za određivanje mesta vezivanja enterolignana korišćen je diazepam, kao marker vezivanja za vezujuće mesto II. U tu svrhu, 2.5 mL 0.5 μ M rastvora kompleksa HSA-EL ili HSA-ED titrovani su sa 100 μ M diazepamom (sveže pripremljen razblaživanjem 50 mM štok rastvora u DMSO-u sa 100 mM natrijum-fosfatnim puferom, pH 7.4) i finalna koncentracija diazepamata je bila od 0 do 1.5 μ M, uz porast koncentracije za 0.125 μ M.

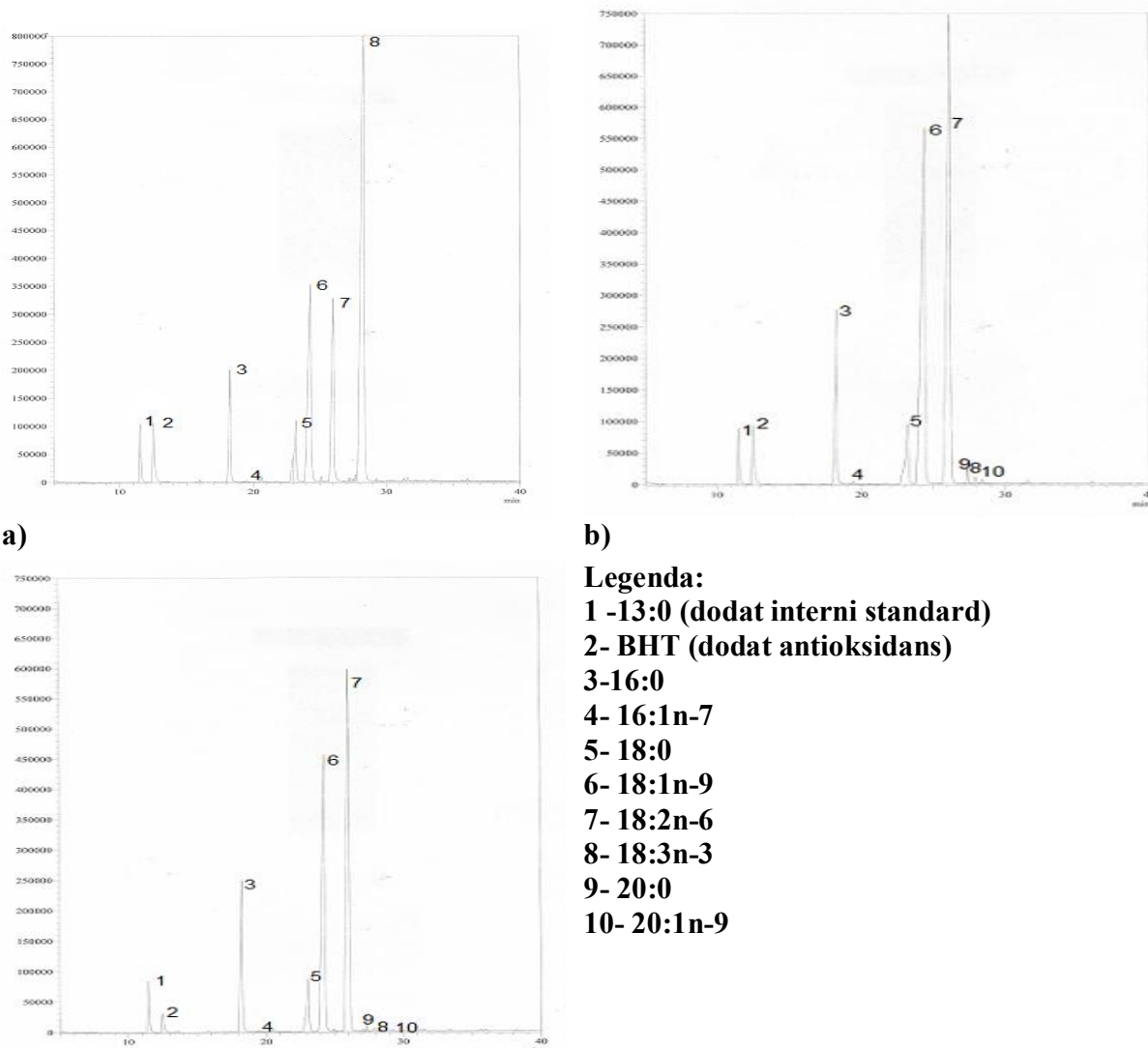
3. 4. Statistička obrada rezultata

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. Pre statističke analize podataka, normalnost distribucije podataka ispitana je Shapiro-Wilks-ovim testom. Razlike u srednjim vrednostima parametara analizirane su Studentovim *t*-testom (spareni i nesporeni). Pirsonovi koeficijenti varijacije su izračunati kada je korelacionom analizom ispitivan odnos između varijabli. Razlike su smatrane statistički značajnim kada je $p < 0.05$. Za statističku obradu rezultata korišćen je program Origin Lab 8.0 (Origin Corporation, USA).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Masnokiselinski sastav lipida semenki lana, susama i golice

Biljna ulja predstavljaju značajne dijetarne izvore PUFA, ali istovremeno postoje velike razlike u njihovim masnokiselinskim profilima, koji određuju njihov efekat na zdravlje. Masnokiselinski sastav ulja semenki lana, susama i golice određivani su u uzorcima semenki posle ekstrakcije ukupnih lipida po Folch-ovoj proceduri (Materijali i metode, 3.3.1). Tipični hromatogrami GC analize metil-estara masnih kiselina navedenih semenki prikazani su na Slici 18. i između njih postoje uočljive razlike.



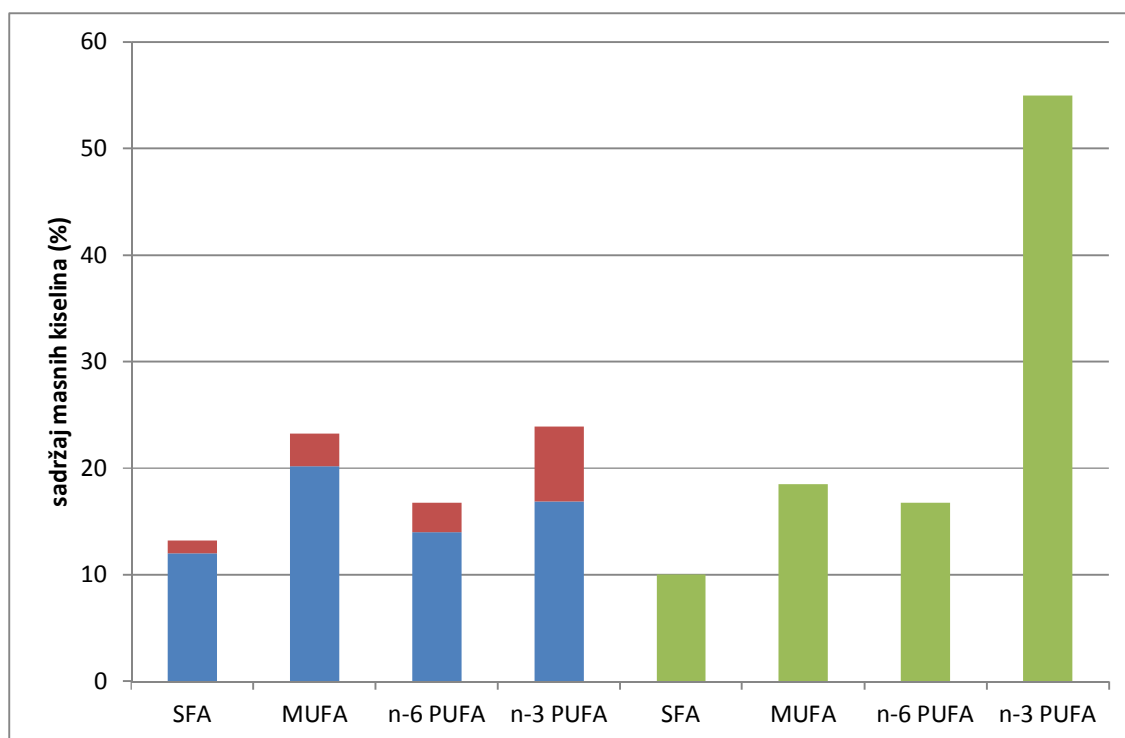
c)
Slika 18. Hromatogrami dobijeni GC analizom metil-estara masnih kiselina lipidnih ekstraktata semenki: a) lana, b) susama i c) golice.

Analiza lipidnih ekstrakata lana potvrđuje da lan predstavlja značajan dijetami izvor ALA (sadržaj u estrahovanim lipidima semenki lana iznosi 50.38 %, Tabela 3), dok je u lipidima susama i golice zastupljenost ove kiseline niska (0.38 % i 0.27 %, redom) (Tabela 4, 5). Po Eurodiet preporukama za unos lipida, odgovarajući dnevni unos ALA je 2 g (Eurodiet, 1994). Ova količina se može obezbediti dnevnim konzumiranjem oko 4 mL hladno ceđenog ulja lana, odnosno oko 10 g semenki lana.

Tabela 3. Masnokiselinski sastav lipidnih ekstrakata semenki lana.

Masna kiselina	Sadržaj masnih kiselina	
	mg/100 g semenki	g/100 g lipida
14:0	-	-
16:0	3007±291	6.70±0.30
18:0	2580±160	5.85±0.34
20:0	-	-
SFA	5536±380	12.56±0.64
16:1n-7	40±10	0.09±0.01
18:1n-7	-	-
18:1n-9	9521±485	21.61±1.49
20:1n-9	-	-
MUFA	9561±496	21.70±1.47
18:2n-6	6758±206	15.36±1.37
18:3 n-3	22377±4205	50.38±3.48
n-6 PUFA	6758±206	15.36±1.37
n-3 PUFA	22377±4205	50.38±3.48
Ukupno	44286±5359	-

Analiza masnokiselinskih profila semenki lana dostupnog na našem tržištu (Tabela 3) pokazuju dobro slaganje sa literaturnim podacima, prikazanim u preglednom radu o masnokiselinskim profilima biljnih ulja Dubois i saradnika (2007), prema kojima je sadržaj SFA 10 %, MUFA 18.5 %, n-6 PUFA 16.8 %, a n-3 PUFA 55.0 % (Slika 19).

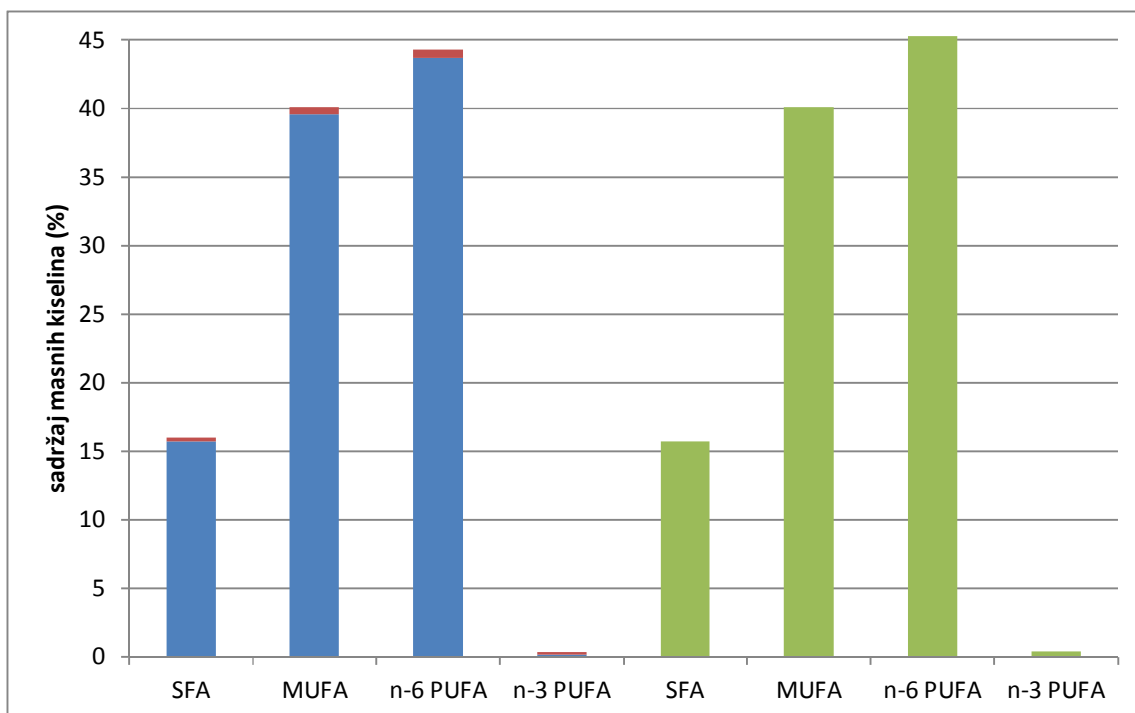


Slika 19. Poređenje dobijenih rezultata (plava+crvena boja; srednja vrednost \pm 2 SD %) za masnokiselinske profile semenki lana sa podacima Dubois-a i saradnika (zelena boja).

Rezultati analize masnokiselinskih profila lipidnih ekstrakata semenki susama pokazuju da susam predstavlja značajan dijetarni izvor LA (43.98 %), ali je i sadržaj OA visok (39.48 %) (Tabela 4). Dobijeni masnokiselinski profil pokazuje dobro slaganje sa literaturnim podacima po kojima je zastupljenost SFA 15.7 %, MUFA 40.1 %, n-6 PUFA 45.3 % i n-3 PUFA 0.4 % (Dubois, 2007) (Slika 20).

Tabela 4. Masnokiselinski sastav lipidnih ekstrakata semenki susama.

Masna kiselina	Sadržaj masnih kiselina	
	mg/100 g semenki	g/100 g lipida
14:0	-	-
16:0	5024±279	10.00±0.08
18:0	2640±129	5.25±0.06
20:0	276±17	0.55±0.01
SFA	7940±424	15.80±0.15
16:1n-7	66±5	0.13±0.01
18:1n-7	-	-
18:1n-9	7940±424	39.48±0.22
20:1n-9	117±34	0.23±0.06
MUFA	20027±1195	39.84±0.23
18:2n-6	22106±1211	43.98±0.30
18:3 n-3	188±37	0.38±0.10
n-6 PUFA	22106±1211	43.98±0.30
n-3 PUFA	188±37	0.38±0.10
Ukupno	50261±2777	

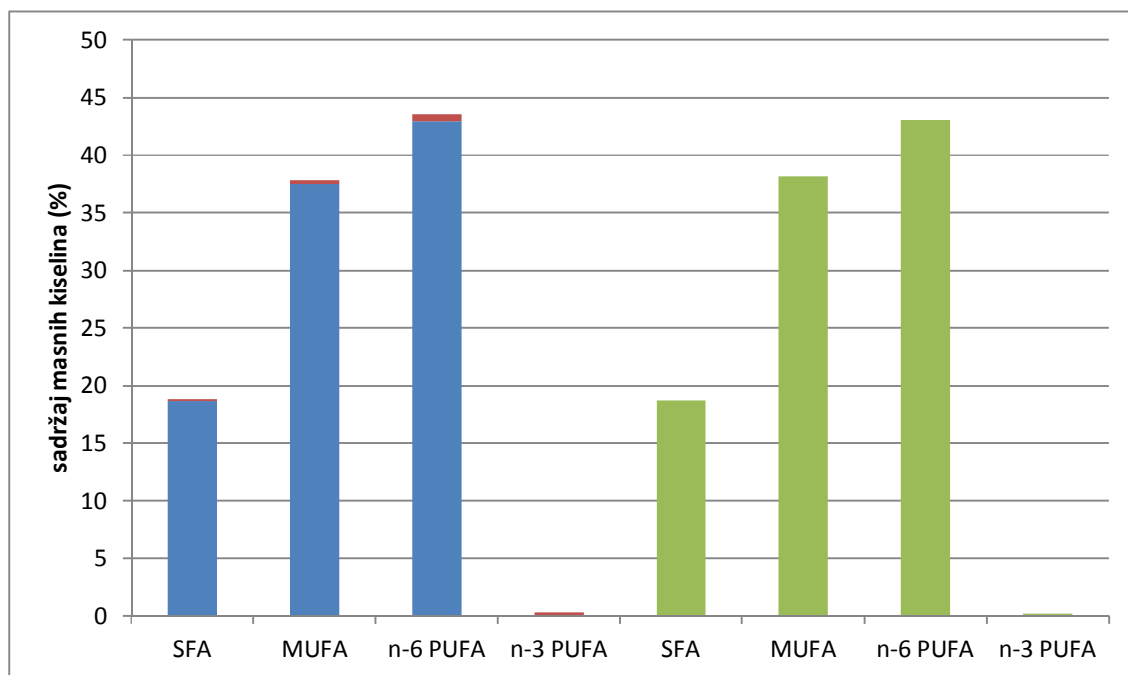


Slika 20. Poređenje masnokiselinskog sastava (plava+crvena boja; srednja vrednost \pm 2 SD %) lipidnih ekstrakata analiziranih uzoraka semenki susama sa literaturno dostupnim podacima Dubois-a i saradnika (zeleno boja).

Dve najzastupljenije masne kiseline u lipidima semenki golice su OA (37.66 ± 0.16 g/100 g lipida) i LA (43.28 ± 0.33 g/100 g lipida). PA i S su takođe prisutne u značajnom iznosu (12.09 ± 0.09 i 6.11 ± 0.06 g/100g lipida) (Tabela 5). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa objavljenim rezultatima za hladnoceđena ulja dobijena iz različitih vrsta semenki golice, koja je bila uzgajana u Srbiji (Rabrenović, 2014). Rabrenović i saradnici pokazali su da je sadržaj OA bio 37.1 i 39.2 g/100 g (srednja vrednost 38.15 g/100 g), a LA 41.7 i 44.5 g/100g (srednja vrednost 38.15g/100 g) u uljima dobijenim ceđenjem semenki golice bez otklanjanja omotača sa semenki (Slika 21).

Tabela 5. Masnokiselinski sastavi lipidnih ekstrakata semenki golice.

Masna kiselina	Sadržaj masnih kiselina	
	mg/100 g semenki	g/100 g lipida
14:0	-	-
16:0	4948±268	12.09±0.09
18:0	2462±147	6.11±0.06
20:0	156±17	0.39±0.03
SFA	7565±429	18.79±0.16
16:1n-7	52±9	0.13±0.02
18:1n-7	-	-
18:1n-9	15058±817	37.40±0.18
20:1n-9	52±8	0.13±0.02
MUFA	15163±822	37.66±0.16
18:2n-6	17420±770	43.28±0.33
18:3 n-3	109±55	0.27±0.13
n-6 PUFA	17420±770	43.28±0.33
n-3 PUFA	109±55	0.27±0.13
Ukupno	40256±2031	



Slika 21. Poređenje dobijenih rezultata (plava+crvena boja; srednja vrednost \pm 2SD %) za masnokiselinske profile semenki lana sa literaturno dostupnim podacima Rabrenović i saradnika (zelena boja).

4.2. Analiza masnokiselinskih profila i klasa lipida u metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki lana, susama i golice

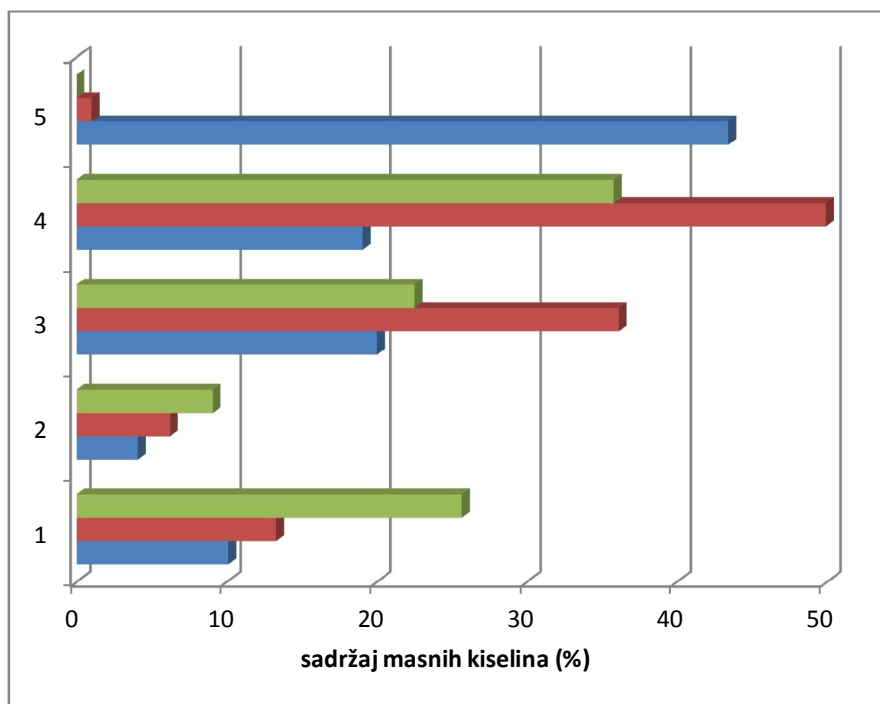
Pre pripreme metanolnih ekstrakata bogatih polifenolima, semenke lana, susama i golice su obezmašćene n-heksanom (Materijali i metode, 3.3.5.a). Sadržaj lipida i masnokiselinski profili metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki (suvog ostatka posle uparavanja metanola do suva), određivani u cilju praćenja efikasnosti obezmašćivanja, prikazani su u Tabeli 6. Uočljive su velike razlike u profilima masnih kiselina. Rezultati za ukupan sadržaj lipida (mg), koji je dobijen iz 100 g obezmašćenih semenki pri ekstrakciji metanolom, pokazali su da je najveći sadržaj lipida ekstrahovan iz susama (1696 mg/100 g obezmašćenih semenki), zatim iz lana (1001 mg/100 g obezmašćenih semenki), a najmanji sadržaj iz golice (870 mg/100 g). Sadržaj zaostalih lipida posle odmašćivanja semenki n-heksanom (od 2.2 do 3.4 %) pokazuje da je odmašćivanje semenki bilo efikasno.

Tabela 6. Masnoliselinski profili metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice.

Masna kiselina	Lan g/100g lipida	Susam g/100g lipida	Golica g/100g lipida
14:0	1.42±0.48	0.48±0.39	5.21±0.49
16:0	10.11±0.22	13.30±0.01	25.68±1.65
18:0	4.07±0.06	6.23±0.05	9.08±0.66
20:0	-	0.739±0.001	-
SFA	15.60±0.76	20.75±0.47	39.98±1.83
16:1n-7	-	-	-
18:1n-7	1.63±0.08	-	1.700±0.003
18:1n-9	20.01±0.12	36.14±0.24	22.53±0.15
20:1n-9	-	0.167±0.004	-
MUFA	21.64±0.04	36.31±0.24	24.24±0.15
18:2n-6	19.078±0.003	49.93±0.20	35.78±1.98
18:3 n-3	43.68±0.81	0.99±0.01	-
Ukupno (mg lipida/100g obezmašćenih semenki)	1001	1696	870
% u odnosu na ukupne lipide	2.3	3.4	2.2

Najzastupljenije masne kiseline u metanolnom ekstraktu su, kao i u masnokiselinskim profilima neodmašćenih semenki lana, PA, S, OA i LA, kao i ALA (Slika 5). Zastupljenost ALA je najveća (43.68 ± 0.81 g/100 g lipida), a zatim slede OA (20.01 ± 0.12 g/100 g lipida) i LA (19.078 ± 0.003 g/100 g lipida). Analizom metanolnog ekstrakta susama utvrđeno je da su najzastupljenije LA sa 49.93 ± 0.20 i OA sa 36.14 ± 0.24 g/100 g lipida. Za seme golice u

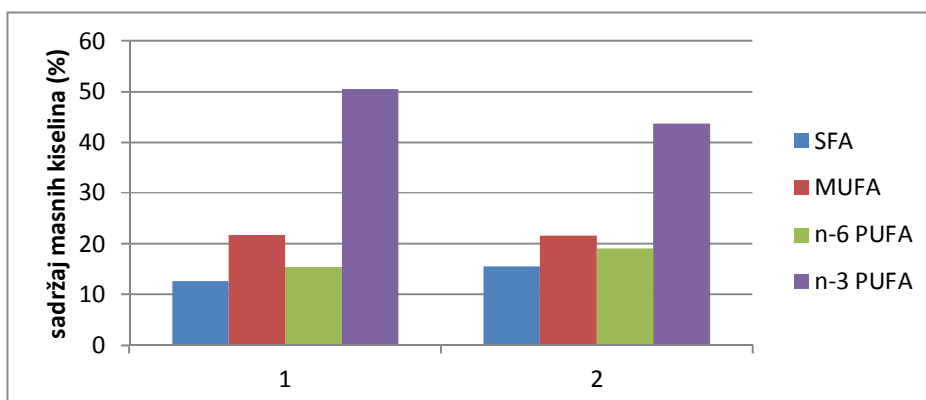
metanolnim ekstraktima najzastupljenije su bile LA sa 35.78 ± 1.98 , PA sa 25.68 ± 1.65 i OA sa 22.53 ± 0.15 g/100 g lipida (Slika 22, Tabela 6).



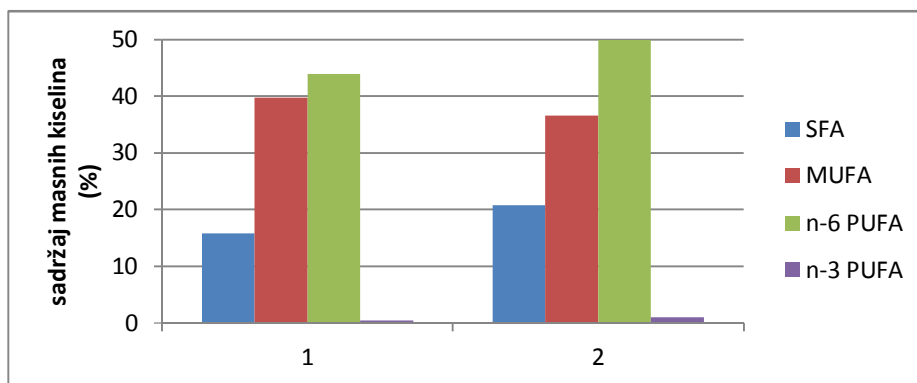
Slika 22. *Masnokiselinski profili lipida metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki (1-palmitinska, 2-stearinska, 3-oleinska, 4-linolna, 5-linolenska; plava-ekstrakt lana, crvena-ekstrakt susama, zelena- ekstrakt golice).*

Dobijeni masnokiselinski profili lipida metanolih ekstrakata obezmašćenih semenki upoređeni su sa masnokiselinskim profilima ukupnih lipidnih ekstrakata semenki (Tabele 3, 4, 5) i prikazani su na Slici 23. Rezultati pokazuju razlike u masnokiselinskim sastavima, koje su najviše izražene za semenke golice. Sadržaj SFA je veći u svim ispitivanim metanolim ekstraktima obezmašćenih semenki u odnosu na ukupne lipide semenki, a MUFA manji. Kada su u pitanju PUFA, sadržaj LA u metanolim ekstraktima obezmašćenih semenki lana i susama raste u odnosu na lipide semenki, dok kod golice opada. Sa druge strane, sadržaj ALA opada kod lana i golice, a raste kod susama.

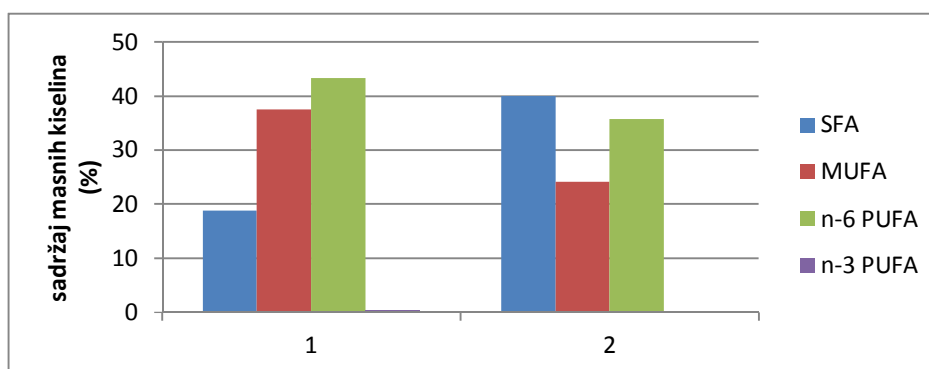
a)



b)

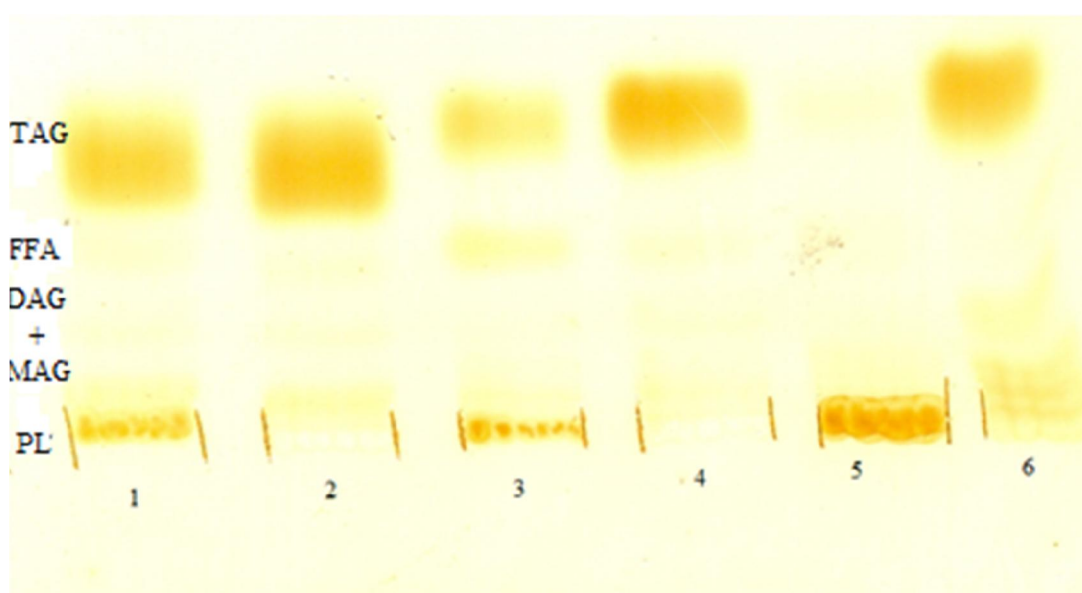


c)



Slika 23. Uporedni prikaz masnokiselinskih sastava ukupnih lipidnih ekstrakata semenki (1) i metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki (2) lana (a), susama (b) i golice (c).

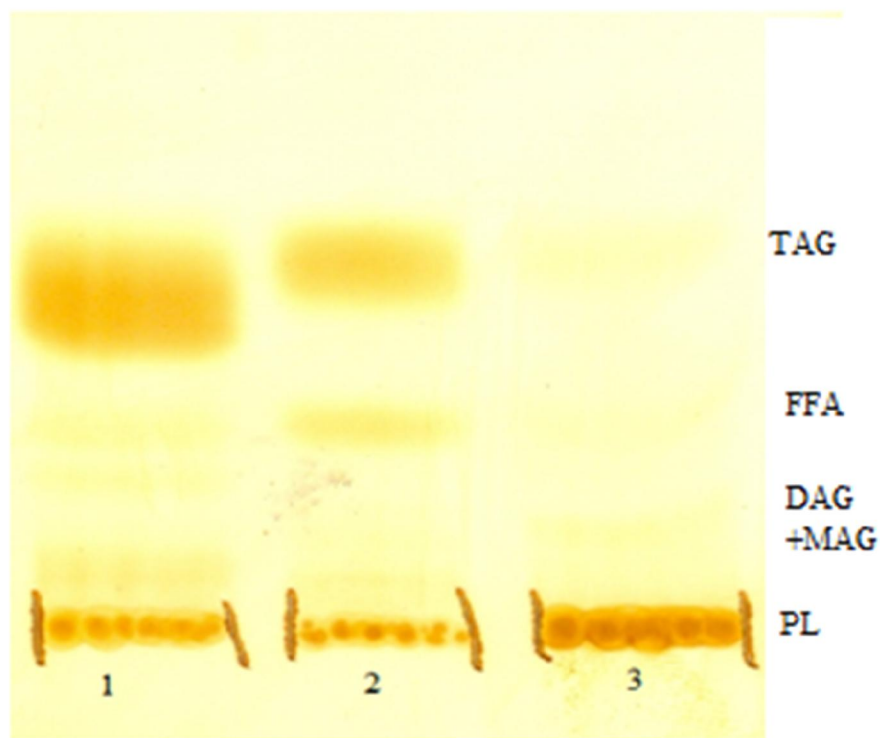
Zastupljenost različitih klasa lipida u semenkama i ekstraktima analizirana je HP-TLC-om (Materijali i metode, 3.3.2.a) (Slika 24). U ukupnim lipidnim ekstraktima semenki lana, susama i golice najzastupljeniji su TAG. Zbog razlika u polarnosti n-heksana (sa kojim su ekstrahovani ukupni lipidi) i metanola (upotrebljenog za ekstrakciju lipida prethodno odmašćenih semenki) za očekivati je da su u metanolnim ekstraktima zastupljenije polarnije klase lipida (fosfolipidi (PL), monoacilgliceroli (MAG), diacilgliceroli (DAG) i FFA). Na Slici 24 uočava se da su, pored TAG, najintenzivnije trake PL, a da su trake slobodnih FFA slabog intenziteta.



Slika 24. *TLC razdvajanje klasa lipida ukupnih lipidnih ekstrakata semenki i metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki: 1-metanolni ekstrakt lipida lana, 2-lipidi semenke lana, 3-metanolni ekstrakt lipida susama, 4-lipidi semenke susama, 5-metanolni ekstrakt lipida golice i 6-lipidi semenke golice.*

Metanolni ekstrakt lipida obezmašćenih semenki lana bogat je sa TAG i PL, dok su zastupljenosti drugih klasa lipida male (Slika 25). U metanolnim ekstraktima golice praktično da nema drugih klasa lipida, osim PL. Analizom intenziteta traka u programu <http://www.justquantify.com/AnalysisLanesHD.aspx> određeni su odnosi intenziteta traka PL, TAG i FFA (Tabela 7). Dobijeni rezultati sugerišu da bi se klase lipida mogle razlikovati po

masnokiselinskim profilima i pojašnjavaju zašto su razlike u masnokiselinskim profilima između ukupnih lipida i metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki golice najizraženije (Tabela 7, Slika 23, 24, i 25). Yoshida i saradnici (2007) pokazali su da se kod semenki susama masnokiselinski sastavi ukupnih lipida i frakcije PL razlikuju i da je procentualni udeo PA viši, a OA i LA niži u PL u odnosu na ukupne lipide. Takođe, ispitivanja masnokiselinskih profila PL semenki bundeve pokazala su zastupljenost PA od 36.8 do 50.7 %, OA od 9.8 do 21.1 %, i LA od 3.3 do 19.3 %, zaključeno je, takođe, da je zastupljenost SFA veća u PL u odnosu na TAG u kojima su najzastupljenije PUFA (Petakova, 2014).



Slika 25. *TLC razdvajanje klasa lipida metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana (1), susama (2) i golice (3).*

Tabela 7. Relativne zastupljenosti klasa lipida u metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki lana, susama i golice.

	Sadržaj klasa lipida (%)		
	Lan	Susam	Golica
Fosfolipidi	29.2	42.8	94.0
Triacilgliceroli	68.5	47.0	4.2
Masne kiseline	2.3	10.2	1.9

Može se zaključiti i da je u uzorcima koji su imali veći sadržaj ukupnih masnih kiselina: susam (50261 mg/100 g semenki, Tabela 4) > lan (44289 mg/100 g semenki, Tabela 3) > golica (40256 mg/100 g semenki, Tabela 5), efikasnost ekstrakcije lipida n-heksanom bila manja.

Na osnovu vrednosti sadržaja ukupnih masnih kiselina i rezultata TLC analize klasa lipida u metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki procenjene su maksimalne količine i zastupljenosti (%) FFA u metanolnim ekstraktima (Tabela 8). Sadržaj FFA je najviši u ekstraktu susama (oko 3.0 %), šest puta je veći u odnosu na lan, odnosno 15 puta veći u odnosu na golice.

Tabela 8. Sadržaj ne-esterifikovanih masnih kiselina u metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki lana, susama i golice.

Sadržaj FFA	Lan	Susam	Golica
mg /100 g obezmašćenih semenki	23	172	16
% od ukupne mase suvog ostatka metanolnih ekstrakta	0.5	3.0	0.2

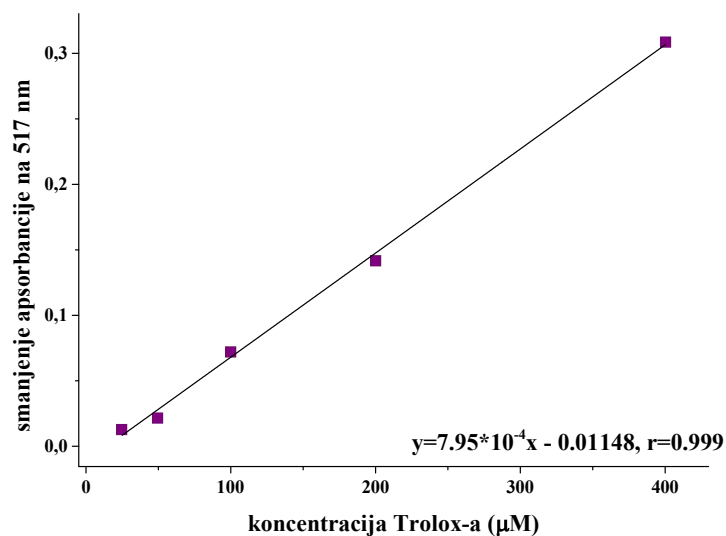
4.3. Analiza antioksidativnog potencijala ulja i metanolnih ekstrakata semenki lana, susama i golice

4.3.1. Antioksidativni potencijal hladno-ceđenih ulja lana, susama i golice

Semenke lana, susama i golice, nisu samo semenke bogate uljima sa visokim sadržajem PUFA. Lan i susam su namirnice sa najvećim sadržajem lignana u do sada ispitivanim namirnicama. Semenke bogate uljima sadrže i fenolne kiseline, čiji kvalitativni sastav zavisi od vrste semenki. FE kiselina je rasprostranjeno fenolno jedinjenje u biljnim vrstama. U značajnoj količini prisutna je u semenu lana i susama, a ima je i u golici. Obezmašćene semenke predstavljaju otpadni industrijski materijal u toku proizvodnje ulja, a njihovi metanolni ekstrakti su bogati lignanima, fenolnim kiselinama i, u slučaju golice, hlorofilima. Brojne *in vitro* studije pokazale su antioksidativni potencijal ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima, kao i hlorofilima, ali su mehanizmi *in vivo* antioksidativnog delovanja tema intenzivnih istraživanja.

Polifenolima bogati ekstrakti obično se pripremaju ekstrakcijom polaznog materijala sa smešom metanol/voda, etanol/voda, metanol, etanol i/ili aceton (Dai, 2010). Da bi se odredili i/ili uporedili antioksidativni potencijali ulja i obezmašćenog ostatka semenki, pripremljeni su metanolni ekstrakti posle obezmašćivanja semenki n-heksanom (Materijali i metode, poglavlje 3.3.5.b).

Antioksidativni potencijali hladno-ceđenih ulja semenki određeni su DPPH testom (Materijali i metode, poglavlje 3.3.7.1.a) u etil-acetatnim rastvorima ulja. Da bi dobijeni rezultati mogli da se uporede sa literaturno-postojećim, kao i sa rezultatima za antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice, rezultati su izraženi u jedinicama Troloks ekvivalenta (TE) (Slika 26). Uporedo sa određivanjem antioksidativnih potencijala ulja lana, susama i golice određen je i antioksidativni potencijal hladno-ceđenog maslinovog ulja i rafinisanog ulja suncokreta, zbog njihove značajne zastupljenosti u ishrani.



Slika 26. Kalibraciona prava za određivanje antioksidativnog potencijala ulja i ekstrakata semenki pomoću DPPH testa (u metanolu).

Analiza je pokazala da je redosled antioksidativne aktivnosti ulja: rafinisano suncokretovo ulje > maslinovo ulje > ulje lana > ulje golice > ulje susama (Tabela 9). Dobijeni rezultati upoređeni su sa literaturno-dostupnim podacima (takođe određenim pomoću DPPH testa, Tuberoso, 2007; Prescha, 2014) i prikazani su na Slici 27. Prema Tuberoso i saradnicima (2007) redosled antioksidativne aktivnosti ulja je: maslinovo ulje > suncokretovo ulje > ulje lana > ulje golice, dok ulje susama nije ispitivano. Razlike u vrednostima antioksidativnih potencijala ulja lana i golice mogu biti posledica razlika u načinu prikazivanja rezultata određivanja (merne jedinice u našoj studiji su µM TE/kg, a u studiji Tuberoso i saradnika µM TE/L). U maslinovom i suncokretovom ulju najzastupljeniji je α-tokoferol, dok je u uljima lana i golice to γ-tokoferol. Prevc i saradnici (2015) su pokazali da se aktivnosti α- i γ-tokoferola u etil-acetatu značajno razlikuju, i jednak odgovor u promeni apsorbancije na 520 nm posle 30 minuta dobija se pri koncentraciji α-tokoferola od 4 µM i γ-tokoferola od 10 µM. Sa druge strane, Tuberoso i saradnici (2007) su ispitivali antioksidativnu aktivnost u metanolnom rastvoru sa DPPH (u kome je odgovor α- i γ-tokoferola jednak), za razliku od naših ispitivanja, koja su rađena u etil-acetatnom rastvoru. Presch i saradnici (2014) su u odnosu na naše rezultate dobili nešto više

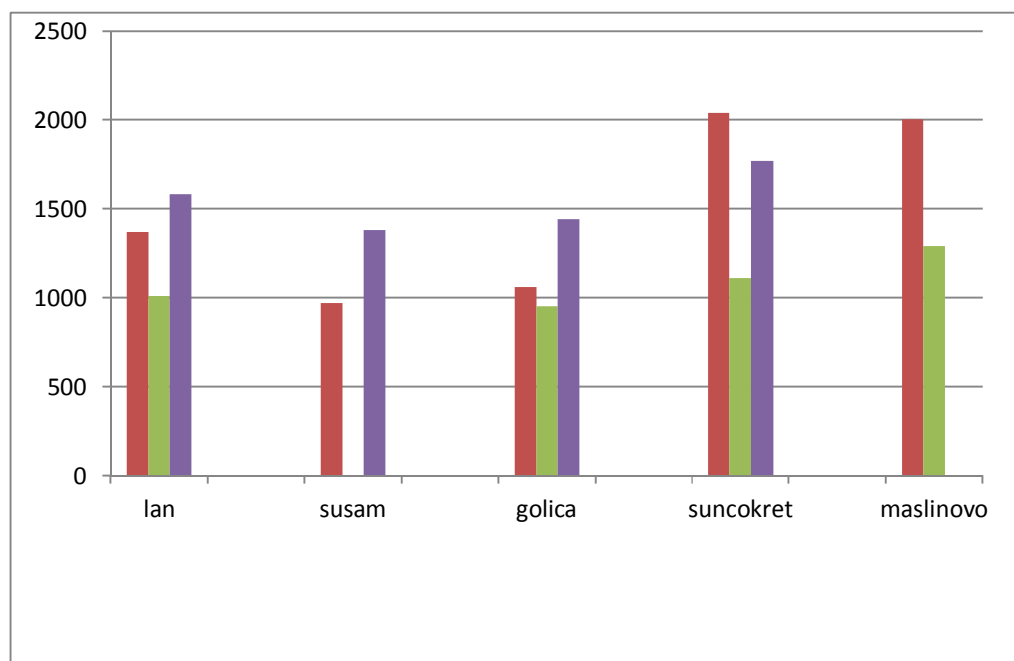
srednje vrednosti antioksidativne aktivnosti za hladnoceđena ulja lana, susama i golice, ali je redosled aktivnosti ulja: suncokretovo ulje > ulje lana > ulje susama > ulje golice, bio istovetan kao i za ispitivana hladnoceđena ulja na našem tržištu. Razlika između antoksidativne aktivnosti suncokretovog ulja je manja nego razlika u odnosu na studiju Tuberosa i saradnika (2007), ali se i dalje uočava.

Tabela 9 . Antioksidativni potencijal hladno-ceđenih ulja semenki određen DPPH testom

Vrsta ulja	Inhibicija DPPH etilacetatnim rastvorom			Inhibicija DPPH metanol/vodenim ekstraktom		
	5 mg ulja (%)	1000 g ulja (μ mol TE)	1000 g ulja (mg TE)	100 mg ulja (%)	1000 g ulja (μ mol TE)	1000 g ulja (mg TE)
Hladno ceđeno ulje lana	32.7	1370	342.90	1.5	5.6	1.40
Hladno ceđeno ulje susama	22.7	970	242.78	1.7	6.1	1.53
Hladno ceđeno ulje golice	25.0	1060	265.31	1.5	5.5	1.38
Rafinisano ulje suncokreta	49.2	2040	510.59	1.7	5.9	1.48
Hladno ceđeno maslinovo ulje	48.2	2000	500.58	54.1	120.0	30.03

Da bi se procenio doprinos antioksidativnoj aktivnosti frakcije ulja bogate polifenolima, ispitana je antioksidativna aktivnost frakcije ulja izolovane ekstrakcijom smešom metanol/voda (60:40, v/v) (Materijali i metode, poglavlje 3.3.7.1.a) pomoću DPPH testa. Utvrđeno je da je doprinos ove frakcije ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti mali, od 0.08 do 0.22 %, sem kod maslinovog ulja kod koga iznosi 6.0 % (izračunato na osnovu Tabele 7). Dobijeni rezultati sugerišu da je koncentracija polifenola, jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću, koji su rastvorljiviji u smeši metanol/voda (60:40, v/v) nego u n-heksanu, u ispitivanim uljima mala, sem kod maslinovog ulja. U nekim studijama dobijene su veće vrednosti za odnos antioksidativne aktivnosti lipofilne i hidrofilne frakcije (ispitivani su metanolni ekstrakti ulja), ali je pokazano da je doprinos lipofilne u odnosu na hidrofilnu frakciju antioksidativnoj aktivnosti u svim ispitivanim uzorcima bio veći (1.83 maslinovo ulje, 7.38 suncokretovo ulje; Tuberoso, 2007). HPLC analiza polifenola u uljima je pokazala da je njihova koncentracija mala (2.5 mg vanilina u

lanenom; 1.8 mg/mL p-kumarinske kiseline i 1.0 mg/mL FE u ulju golice), sem u maslinovom ulju (Tuberoso, 2007).

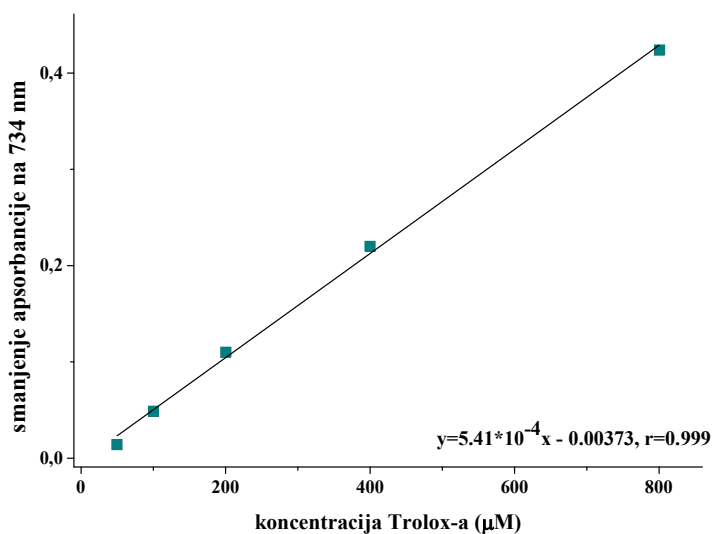


Slika 27. *Uporedni prikaz antioksidativne aktivnosti hladno ceđenih ulja lana, susama, golice, suncokretovog i maslinovog ulja (crveno μmol TE/kg) sa literaturno-dostupnim podacima (zelena (μmol TE/L), Tuberoso, 2007; ljubičasta (μmol TE /kg, Prescha, 2014). Antioksidativna aktivnost određena je DPPH testom.*

Antioksidativnu aktivnost biljnih ulja lana, susama, suncokreta i golice uglavnom određuje sadržaj ukupnih tokoferola (Prevc 2015, Prescha 2014, Tuberoso, 2007), i u manjoj mjeri joj doprinose skvalen, hlorofili, karotenoidi i fenoli, koji su prisutni u značajnim količinama u maslinovom ulju i ulju golice. U susamovom ulju prisutni su lipofilni lignani sesamin i seamolin, koji takođe mogu doprinostiti izuzetnoj oksidativnoj stabilnosti susamovog ulja.

4.3.2. Antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki

Antioksidativni kapacitet metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki određivan je DPPH i ABTS testom i dobijeni rezultati (Tabela 10) su izraženi u TE jedinicama na osnovu kalibracionih prava (Slike 26, 28).



Slika 28. Kalibraciona prava za određivanje antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata semenki pomoću ABTS testa.

Može se uočiti da postoje velike razlike za procenjene antioksidativne aktivnosti. ABTS test se može primeniti za ispitivanje kako hidrofilnih, tako i lipofilnih antioksidativnih sistema, dok se DPPH rastvara u organskom rastvaraču i stoga je primenjiv za hidrofobni sistem (Kim, 2002). Navedenim bi mogli delimično objasniti razlike u dobijenim vrednostima za antioksidativne kapacitete.

Redosled antioksidativne aktivnost, kao i sadržaja fenola u metanolim ekstrakata ispitivanih semenki, u našem radu je: lan > susam > golica (Tabela 10), što je u skladu sa literaturno-postojećim podacima za etanol/vodne (80:20, v/v) ekstrakte obezmašćenih ostataka semenki lana, susama i golice, dobijenih prilikom proizvodnje ulja u prehrambenoj industriji

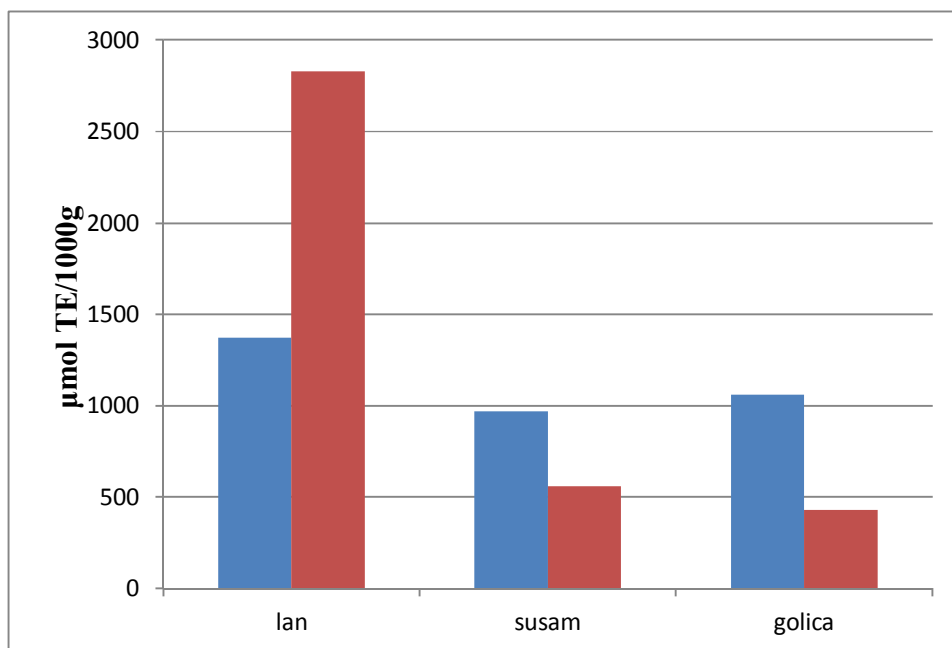
(Sarkis, 2014). U studiji Sarkisa i saradnika (2014) nađeno je da sadržaj polifenola u lanu iznosi 56 mg, a u susamu 71 mg na 100 g obezmašćenog suvog ostatka semenki, dok u golici polifenoli nisu nađeni. Srednje vrednosti sadržaja fenola u metanolnim ekstraktima (određivanja urađena u triplikatu) kretale su se od 16 do 122 mg/100 g ispitivanih, obezmašćenih semenki (Tabeli 10) Rezultati nekoliko studija (Floegel, 2011; Sarkis, 2007) pokazali su veći stepen korelacije između sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti određene ABTS testom.

Tabela 10. Sadržaj polifenola i antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice.

	Ukupni polifenoli (mg ekvivalenta galne kiseline /100 g obezmašćenih semenki)	DPPH test		ABTS test	
		µmol TE/100g obezmašćenih semenki	mg TE/100g obezmašćenih semenki	µmol TE/100g obezmašćenih semenki	mg TE/100g obezmašćenih semenki
Lan	122	283	70.8	535	133.9
Susam	36	56	14.0	178	44.6
Golica	16	43	10.8	74	18.5

Poređenjem antioksidativnih kapaciteta hladnoceđenog ulja i metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, određenih DPPH testom, pokazano je da je antioksidativni kapacitet obezmašćenog lana (na 1000 g semenki estrahovanih metanolom) znatno veći u odnosu na hladnoceđeno ulje (1000 g ulja), dok su antioksidativne aktivnosti hladnoceđenih ulja golice i susama bile veće od aktivnosti njihovih obezmašćenih semenki (Slika 29).

Sprovedena su brojna ispitivanja u kojima su primenjeni različiti uslovi ekstrakcije (vreme trajanja, zapremina rastvarača, različiti rastvarači, uzorci su hidrolizovani da bi se oslobodili polifenoli i sl.) i pokazano je da postoje velike razlike u sadržaju polifenola na različite načine pripremljenih ekstrakata lana, susama i golice. U okviru naših ispitivanja pripremljeni su metanolni ekstrakti, iz kojih se lako odklanja organski rastvarač (što je neophodno prilikom ispitivanja bioloških aktivnosti), uparavanjem na niskim temperaturama na vakuum uparivaču, a ujedno ne dolazi do razgradnje komponenti ekstrakata.



Slika 29. Poređenje antioksidativnih kapaciteta hladnoceđenih ulja (plava), sa antioksidativnim kapacitetima obezmašćenih semenki (u njihovim metanolnim ekstraktima) (crvena) DPPH testom.

4.4. Suplementacija ishrane pacijenata na hemodijalizi smešom semenki lan/susam/golica

Semenke lana, susama i golice predstavljaju značajne, dijetarne izvore PUFA. Kako je prikazano u poglavlju 4.1., sadržaj ALA, esencijalne n-3 masne kiseline, je izuzetno visok u lanenom ulju, a sadržaj LA, esencijalne n-6 masne kiseline, u semenu susama i golice. Kako je zastupljenost n-3 masnih kiselina smanjena kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću (na dijalizi) u odnosu na zdrave osobe, sprovedene su studije suplementacije uljem i/ili semenkama lana, o čemu postoje literaturni podaci. Postoje i brojni podaci o anti-inflamatornim efektima susama, kao i anti-dijabetesnim efektima golice. Međutim, do sada nije istraživan efekat suplementacije smešom ovih semenki, i po našem saznanju ovo je prva studija.

U studiju suplementacije ishrane bilo je uključeno 30 bolesnika (18 muškaraca i 12 žena, prosečne starosti 54.0 ± 11.8 godina) sa hroničnom bubrežnom slabošću, na programu

hemodijalize. Stepen uhranjenosti učesnika studije nije se menjao tokom studije (22.63 ± 3.44 kg/m² na početku studije, u odnosu na 22.81 ± 3.62 kg/m² na kraju studije).

Učesnici studije konzumirali su po 30 grama smeše samlevenih semenki lan/susam/golica (3:1:1, maseni udeo), kao dodatak standardnoj ishrani, u trajanju od 12 nedelja. Maseni udeo semenki u smeši je bio 3:1:1, da bi se obezbedio adekvatan unos n-3 masnih kiselina uz povoljan odnos n-6/n-3 masnih kiselina. Na početku studije analiziran je masnokiselinski sastav smeše semenki, koju su konzumirali učesnici studije, GC analizom posle ekstrakcije ukupnih lipida smeše semenki metodom po Folch-u i utvrđeno je da je sadržaj masnih kiselina u dnevnoj porciji od 30 grama semenki bio: 0.9 g PA; 0.7g S; 3.9 g OA; 2.9g LA i 3g ALA, odnos zastupljenosti PUFA (LA+ALA)/SFA (PA+S) bio je 4:1, a n-6 (LA)/n-3 (ALA) 1:1.

Suplementacija ishrane pacijenata na hemodijalizi dovela je do statistički značajnih promena parametara lipidnog statusa (TAG, ukupnog holesterola (TC)), glikoregulacije (glukoza, insulin, HOMA-IR), krvnog pritiska (dijastolnog (DBP) i sistolnog (SBP)) i faktora inflamacije (TNF- α , hs-CRP, IL-6). Takođe, dodatak smeše semenki u ishranu pacijenata na hemodijalizi doveo je do poboljšanja u simptomima pruritisa kod svih pacijenata.

4.4.1. Uticaj suplementacije na lipidni status pacijenata na hemodijalizi

Suplementacija ishrane osoba na hemodijalizi smešom semenki dovela je do statistički značajnog ($p < 0.05$) smanjenja sadržaja TC od 7 %, dok promene u koncentraciji LDL i HDL-holesterola nisu bile statistički značajne (Tabela 11). Najizraženije je bilo smanjenje koncentracije TAG od 30 % ($p < 0.001$) u odnosu na početne vrednosti. Značajno je i snižen indeks ateroskleroze TAG/HDL, za 27 % u odnosu na početak studije.

Istovremeno, samo 10 učesnika studije je na početku bilo normolipemično (33.3 %), dok je posle 12 nedelja suplementacije 22 učesnika (74.0 %) bilo normolipemično (TG < 1.70 mM, TC < 5.2 mM). Sedamnaest učesnika (56.7 %) imalo je sadržaj TG > 1.70 mM na početku studije, a njih 15 (50 %) sadržaj TC > 5.2 mM. Na kraju studije hipertrigliceridemija je pronađena kod samo 7 (23.3 %) učesnika, i isto toliko (23.3 %) učesnika je bilo hiperholesterolemično.

Tabela 11. Promene lipidnog statusa učesnika studije tokom suplementacije ishrane smešom semenki lana, susama i golice.

	Početak studije	Kraj studije	Promena
	(mM)	(mM)	(%)
Triacilgliceroli (TAG)	2.06 ± 1.20	1.44 ± 0.92**	-30
Ukupni holesterol (TC)	5.47 ± 1.35	5.01 ± 0.81*	-7
HDL-holesterol	1.30 ± 0.11	1.27 ± 0.14	-2
LDL-holesterol	3.24 ± 1.08	3.08 ± 0.40	-5
Odnos TC/HDL	4.26 ± 1.27	4.01 ± 0.75	-6
Odnos LDL/HDL	2.53 ± 0.98	2.47 ± 0.47	-2
Odnos TAG/HDL	1.61 ± 0.98	1.17 ± 0.76**	-27

Srednje vrednosti ± SD

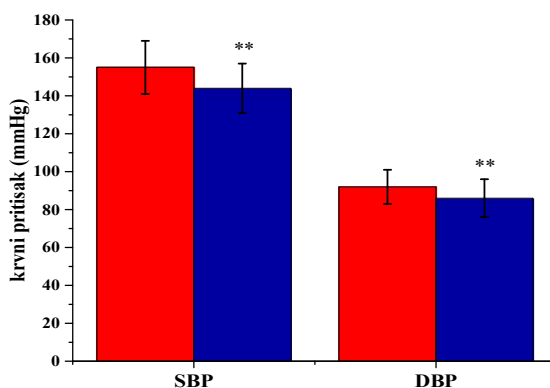
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ - statistička značajnost razlika u odnosu na početne vrednosti

I u nekoliko ranijih studija pokazano je da suplementacija ishrane semenkama lana, susama i golice snižava koncentraciju lipida u krvi (Cunnane, 1993; Pan, 2009; Sedigheh, 2011). Komponente smeše semenki, koje bi mogle imati značajan uticaj na lipidni status, su esencijalne masne kiseline (LA, ALA), dijetarna vlakna, kao i komponente sa antioksidativnom aktivnošću (npr. tokoferoli, lignani). Prilikom suplementacije ishrane pacijenata na hemodijalizi, sa 1 g ulja lana dnevno u trajanju od 120 dana, ili sa 40 g lanenog semena u trajanju od 8 nedelja (Lemos, 2012; Khalatbari Soltani, 2013), uočeno je da dolazi do značajnog pada ukupnog holesterola i LDL-holesterola, dok je zabeležen porast koncentracije HDL-holesterola. Rezultati navedene dve studije su se razlikovali u pogledu efekta na nivo TAG. Suplementacija lanenim uljem nije imala efekta na nivo TAG, dok je suplementacija lanenim semenom dovela do značajnog pada TAG od 31 %. Kako nivo TAG predstavlja faktor koji značajno povećava rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja, rezultati naše studije ukazuju da suplementacija ishrane smešom

semenki lan/susam/golica (koja je dovela do pada sadržaja TAG za 30 %) može biti pogodna za prevenciju kardiovaskularnih oboljenja pacijenata na hemodijalizi.

4.4.2. Suplementacija ishrane pacijenata na hemodijalizi smešom semenki dovodi do snižavanja krvnog pritiska

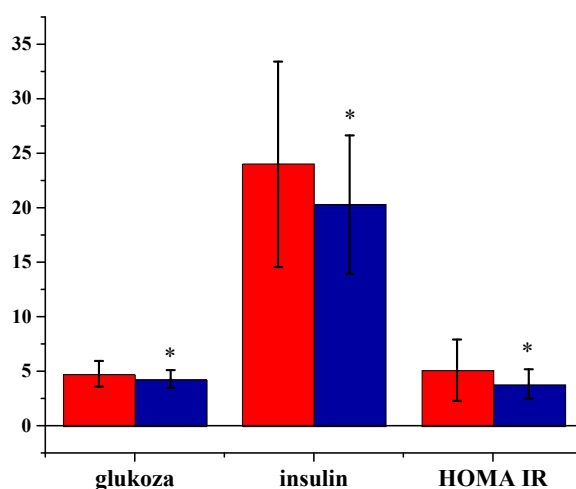
Dodatak smeše semenki lan/susam/golica (3:1:1) standardnoj ishrani pacijenata na hemodijalizi rezultovao je značajnim ($p < 0.01$) padom krvnog pritiska, i to SBP za oko 11 mmHg i DBP za 6 mmHg, posle suplementacije u trajanju od 12 nedelja (Slika 30). Rodriguez-Leyva i saradnici (2013) su utvrdili da suplementacija ishrane sa 30 g samlevenog semena lana, u trajanju od 6 meseci (vremenu znatno dužem u odnosu na našu studiju), dovodi do pada SBP za oko 10 mmHg i DBP za oko 7 mmHg. Istovremeno, utvrdili su da SBP i DBP koreliraju sa nivoom cirkulišuće ALA, kao i da promene u DBP koreliraju sa nivoom lignana u cirkulaciji. U studiji Sankara i saradnika (2006) ispitivan je uticaj dijetarnog unosa susamovog ulja, kao jedinog ulja koje se koristilo u ishrani, na krvni pritisak. Utvrđeno je da je posle 45 dana došlo do statistički značajnog smanjenja krvnog pritiska, ali i do smanjenja nivoa lipidne peroksidacije i poboljšanja antioksidativnog statusa pacijenata. U studiji El-Mosallamy i saradnika (2012) pokazano je da ulje golice pokazuje antihipertenzivni i kardioprotektivni efekat, mehanizmom u koji je uključeno stvaranje NO.



Slika 30. Promena krvnog pritiska kod pacijenata na dijalizi prilikom suplementacije ishrane smešom semenki lana, susama i golice u toku 12 nedelja. Na početku studije (crevena boja) i na kraju studije (plava boja); ** $p \leq 0.01$, statistički značajne razlike ispitivanog parametra u odnosu na početak studije.

4.4.3. Promena parametara glikoregulacije pri suplementaciji ishrane pacijenata na hemodijalizi smešom semenki

Unos smeše semenki lan/susam/golica u trajanju od 12 nedelja pokazao je i statistički značajan uticaj na parametre glikoregulacije. Srednje vrednosti sadržaja glukoze, insulina i vrednost parametra HOMA-IR su bili statistički značajno ($p < 0.05$) niže na kraju suplementacije (Slika 31).



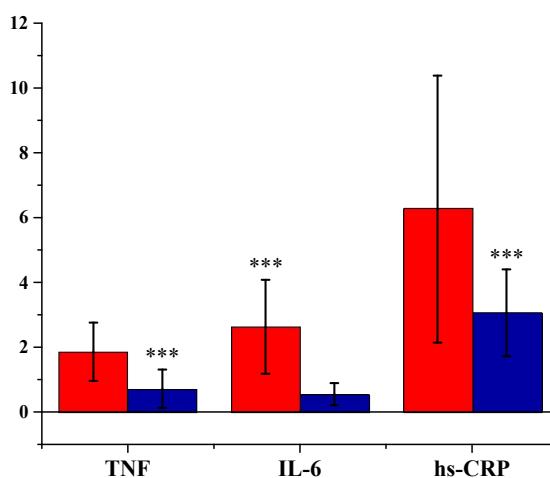
Slika 31. Promena parametara glikoregulacije kod pacijenata na dijalizi, prilikom suplementacije ishrane smešom semenki lana, susama i golice u toku 12 nedelja: glukoza (mM), insulin (pg/mL) i HOMA-IR. Na početku studije (crvena boja) i na kraju studije (plava boja); * $p \leq 0.05$, statistički značajna razlika ispitivanog parametra u odnosu na početak studije.

Slični efekat na parameter HOMA-IR uočen je pri suplementaciji ishrane gojaznih osoba sa smanjenom senzitivnošću na insulin, sa 40 g semena lana u trajanju od 12 nedelja, s tim da nije bilo statistički značajnog uticaja na sadržaj glukoze i insulin (Brunt, 2011). U okviru pomenute studije utvrđeno je i da je promena u rezistenciji na insulin povezana sa antioksidativnim delovanjem semena lana na lipidnu peroksidaciju. Istovremeno, McManus i saradnici (1996) pokazali su da suplementacija ishrane lanenim uljem nema efekta na koncentraciju HbA1c, nivo

glukoze, ni insulina, kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2. Iako je zastupljenost goliće u smeši semenki bila 6 g (tj. petina od ukupne mase) ne treba zanemariti da brojni literaturni podaci ukazuju da se konzumiranjem semena bundeve postižu efekti na glikoregulaciju (Adams, 2014). U studiji Sakka i saradnika (2015) pokazano je da i hidrofobne i hidrofilne komponente ekstrakata semena bundeve inhibiraju aktivnost β -glukozidaze *in vitro*. Kako inhibicija β -glukozidaze u digestivnom traktu produžava vreme varenja ugljenih-hidrata i posledično dovodi do smanjenja nivoa postprandijalne glikemije i insulina, inhibitori β -glukozidaze mogu biti veoma značajni prilikom tretmana dijabetesa tipa 2.

4.4.4. Efekat suplementacije na faktore inflamacije osoba na hemodijalizi

Suplementacija ishrane osoba na hemodijalizi smešom semenki u trajanju od 12 nedelja dovela je do statistički značajnog ($p < 0.001$) smanjenja faktora inflamacije (TNF- α , hs-CRP, IL-6, Slika 32).



Slika 32. Promena faktora inflamacije kod pacijenata na dijalizi, prilikom suplementacije ishrane smešom semenki lana, susama i goliće u toku 12 nedelja: TNF- α (mU/L), IL-6 (pg/mL) i hs-CRP (mg/L). Na početku studije (crevena boja) i na kraju studije (plava boja); *** $p \leq 0.001$, statistički značajne razlike ispitivanog parametra u odnosu na početak studije.

Koncentracija CRP igra značajnu ulogu u aterogenezi. U nekoliko studija pokazano je da postoji inverzna povezanost koncentracija CRP-a sa zastupljenošću EPA i DHA, kako kod zdravih osoba, tako i kod pacijenata sa koronarnim oboljenjima. Lemos i saradnici (2012) su pokazali da suplementacija ishrane pacijenata na hemodijalizi sa 1 g ulja lana u trajanju od 120 dana dovodi do značajnog smanjenja koncentracije CRP. Takođe, studija Khalatbari Spltani i saradnika (2013) u kojoj su pacijenti na hemodijalizi konzumirali 40 g lanenog semena pokazala je da se nivo CRP smanjuje za 37 %.

4.4.5. Efekat suplementacije smešom semenki na masnokiselinske profile PL seruma kod osoba na hemodijalizi

PUFA su esencijalne za normalan rast i razvoj i mogu imati značajnu ulogu u prevenciji i tretmanu koronarnih bolesti, hipertenzije, dijabetesa, artritisa i drugih oboljenja kod kojih dolazi do pojave inflamacije, kao i autoimunih oboljenja. Iz rezultata suplementacije ishrane osoba na dijalizi, smešom semenki evidentan je pozitivan efekat na lipidni status, glikoregulaciju, smanjenje hipertenzije i na hroničnu inflamaciju, komplikacije koje su učestale kod ovih obolelih. Ovaj efekat bi mogao biti povezan sa masnokiselinskim statusom u njihovoj krvi i tkivima. Masnokiselinski profili predstavljaju biomarkere dijetarnog unosa masnih kiselina, ali su i pokazatelji metabolizma masnih kiselina i predstavljaju indirektno markere nivoa lipidne peroksidacije, što praćenje promena u profilima masnih kiselina tokom suplementacije čini veoma značajnim. Značaj statusa masnih kiselina kod pacijenata na hemodijalizi možda najbolje odlikavaju rezultati skorašnjih istraživanja koji su pokazali da je stopa desetogodišnjeg preživljavanja kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom slabošću u direktnoj korelaciji sa statusom n-3 masnih kiselina u eritrocitima (Terashima, 2014). U većini publikovanih rezultata interventnih studija nisu praćene promene u statusu masnih kiselina tokom suplementacije, te stoga ispitivanje efekata suplementacije ishrane ovih pacijenata smešom semenki na profile masnih kiselina ima poseban značaj.

Tabela 12. Masnokiselinski sastav PL seruma na početku studije i posle 12 nedelja suplementacije smešom semenki lan/susam/golica (u masenom odnosu 3:1:1).

Masna kiselina	Sadržaj masnih kiselina (%)	
	na početku studije	na kraju studije
16:0	25.32 ± 2.39	23.87 ± 2.09**
18:0	16.44 ± 1.74	15.05 ± 1.02 **
SFA	41.76 ± 3.22	38.93 ± 2.34 ***
16:1 n-7	0.39 ± 0.16	0.36 ± 0.15
18:1 n-9	13.83 ± 1.68	14.92 ± 0.86 *
MUFA	14.59 ± 1.66	15.28 ± 0.94 **
18:2 n-6, LA	24.49 ± 2.62	25.73 ± 1.85 **
20:3 n-6, DGLA	2.57 ± 0.79	2.96 ± 0.70 **
20:4 n-6, AA	11.63 ± 2.31	12.77 ± 2.56 *
22:4 n-6	0.56 ± 0.14	0.61 ± 0.11
n-6	39.25 ± 3.25	42.06 ± 2.72 ***
18:3 n-3, ALA	0.08 ± 0.03	0.12 ± 0.02 *
20:5 n-3, EPA	0.18 ± 0.05	0.22 ± 0.08 *
22:5 n-3, DPA n-3	0.46 ± 0.07	0.51 ± 0.10 *
22:6 n-3, DHA	2.75 ± 0.33	2.99 ± 0.39 **
n-3	3.46 ± 0.37	3.84 ± 0.42 ***
PUFA	42.71 ± 3.39	45.90 ± 2.69 ***
PUFA/SFA ratio	1.03 ± 0.15	1.10 ± 0.14 ***

*p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001, statističke značajnosti razlika sadržaja masnih kiselina na kraju suplementacije u odnosu na početne vrednosti.

Posle 12 nedelja suplementacije ishrane pacijenata na hemodijalizi, smešom semenki lana, susama i golice, uočene su i statistički značajne promene u masnokiselinskim profilima PL seruma (Tabela 12). Zastupljenost SFA u PL seruma se značajno smanjuje ($p \leq 0.001$), dok se zastupljenost MUFA i PUFA povećava ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.001$, redom). Nema promena odnosa zastupljenosti n-6/n-3 PUFA u PL seruma (11.34 ± 1.25 na početku studije, 10.91 ± 1.59 na kraju studije). Istovremeno, koncentracija ukupnih PL seruma se značajno ne menja, 2.50 ± 0.51 mM u odnosu na 2.87 ± 0.74 mM/L na početku studije.

Brojne studije pokazuju da je masnokiselinski profil PL seruma validan biohemijski marker dijetarnog unosa masnih kiselina (Ristić-Medić, 2013). Smeša semenki lan/susam/golica (3:1:1) predstavlja značajan dijetarni izvor OA, LA i ALA, pa su i očekivane promene u zastupljenosti OA, ukupnih n-6 i n-3 masnih kiselina. Uočeno je i značajno povećanje sadržaja dugolančanih n-6 i n-3 masnih kiselina, odnosno da je delovanjem elongaza i desaturaza došlo do prevođenja LA i ALA u dugolačane n-6 i n-3 masne kiseline (Tabela 12). Stoga su na osnovu dobijenih rezultata za masnokiselinske profile izračunati i indeksi aktivnosti desaturaza (Tabela 13).

Tabela 13. Indeksi aktivnosti desaturaza.

	Na početku suplementacije	Na kraju suplementacije
Indeks desaturaze $\Delta 6$ (20:3 n-6/18:2 n-6)	0.11±0.04	0.12±0.03
Indeks desaturaze $\Delta 5$ (20:4 n-6/20:3 n-6)	5.01±2.04	4.56±1.42
Indeks desaturaze $\Delta 6$ (22:6 n-3/22:5 n-3)	6.06±1.08	6.06±1.39

Pokazano je da nema značajnih razlika u njihovim aktivnostima u odnosu na početak studije. Literaturni podaci govore o neefikasnom prevođenju ALA u EPA i DPA n-3 i ograničenoj mogućnosti daljeg prevođenja u DHA (Burdge 2002; Burdge, 2002a; Brenna, 2002). Međutim, kod ispitivanih pacijenata na hemodijalizi došlo je do značajnog ($p \leq 0.01$) porasta

zastupljenosti DHA u PL seruma. Suplementacija ishrane antioksidansima (koji su značajno zastupljeni u smeši semenki) može da dovede do porasta nivoa PUFA kao indirektni parametar antioksidativnog statusa. Stoga se može zaključiti da bi promene u zastupljenosti DHA mogle biti i posledica promena u antioksidativnom statusu tokom suplementacije ishrane smešom semenki bolesnika na hemodijalizi. U nekoliko studija suplementacije ishrane lanom, susamom i golicom uočene su promene u antioksidativnom statusu i u svima je utvrđeno da dolazi do smanjenja koncentracije krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije (Khadem Haghighian, 2014; Yung, 2012; Makin, 2010).

Do sada je pokazano da kod pacijenata na hemodijalizi dodatak ulja i semena lana dovode do smanjenja koncentracije CRP (Lemos, 2012; Khalatbari Soltani, 2013). Sličan efekat je dokazan i u našoj studiji, prilikom suplementacije ishrane pacijenata na hemodijalizi smešom semenki lan/susam/golica 3:1:1. Da bi se bolje sagledala i proučila moguća povezanost zastupljenosti masnih kiselina i ispitivanih faktora inflamacije, analizirano je da li između njih postoji linearna zavisnost (Tabela 14). Uočeno je da postoje statistički značajne negativne korelacije n-3, kao i n-6 masnih kiselina sa ispitivanim faktorima inflamacije (Tabela 14). Istovremeno, pokazano je da postoji dobra korelacija između indeksa nezasićenosti (“unsaturation”) sa faktorima inflamacije (-0.410 do -0.477, $p < 0.001$).

Promene u lipidnom statusu, glikoregulaciji, pojava hipertenzije i hronična inflamacija se često javljaju kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi. Suplementacija ishrane osoba na programu hemodijalize, smešom semenki lana, susama i golice (u odnosu 3:1:1), pokazala je pozitivan efekat na lipidni status, hipertenziju, glikoregulaciju i parametre inflamacije. Pokazano je da u postizanju ovih efekata značajnu ulogu imaju PUFA, odnosno indukovane promene u njihovom statusu. Analiza dobijenih rezultata ove studije ukazuje i na moguć veliki značaj komponenti sa antioksidativnom aktivnošću prisutnim u semenkama lana, susama i golice, tj. da je tokom studije moglo doći do značajnih promena u antioksidativnom statusu. Stoga je dalje ispitivanje antioksidativne aktivnosti semenki lana, susama, golice i rasvetljavanja mehanizama uticaja na antioksidativnu aktivnost *in vivo* od velikog značaja.

Tabela 14. Korelacije između parametara inflamacije i sadržaja masnih kiselina u PL seruma osoba na hemodijalizi.

	CRP	IL-6	TNF-α
IL-6	0.455**	-	-
TNF-α	0.392**	0.780***	-
ALA	-0.369**	-0.269*	-0.587***
EPA	-0.112	-0.185	-0.140
DPA	-0.224	-0.286*	-0.197
DHA	-0.282*	-0.213	-0.376**
n-3	-0.343**	-0.308*	-0.403**
LA	-0.123	-0.232	-0.605***
DGLA	-0.523***	-0.262*	-0.319**
AA	-0.255**	-0.293*	-0.203
n-6	-0.379**	-0.438**	-0.370**
indeks nezasićenosti	-0,410***	-0,477***	-0,430***

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

4.5. Reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA

Postoje brojni literaturni podaci o kvalitativnom i kvantitativnom sadržaju fenolnih jedinjenja i hlorofila u ekstraktima semenki lana, susama i golice, kao i njihovoj antioksidativnoj aktivnosti (Sicilia, 2003, Elliason, 2003; Othman, 2015, Dabrowski, 1984). Poznato je i da je sadržaj lignana u ispitivanim semenkama visok, pogotovo u ekstraktima lana. Lignani se u gastrointestinalnom traktu metabolišu u enterolignane od kojih je najzastupljeniji EL, a zatim ED. Semenke bogate uljima sadrže i fenolne kiseline. FE je u značajnoj količini prisutna u semenu lana i susama, a ima je i u golici. Brojne *in vitro* studije i naša ispitivanja (poglavlje 4.3),

pokazale su antioksidativni potencijal ekstrakata sa fenolnim jedinjenjima, ali su mehanizmi *in vivo* antioksidativnog delovanja tema intenzivnih istraživanja.

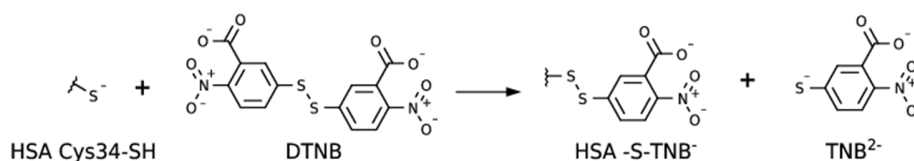
Pri fiziološkim uslovima, HSA transportuje brojna endogena i egzogena jedinjenja, kao i različita fenolna jedinjenja. Novija istraživanja bave se ispitivanjem vezivanja za HSA metabolita fenolnih jedinjenja, prisutnih pri fiziološkim uslovima u organizmu (Galland, 2008; Dufour, 2005). Posle konzumiranja lana i susama u serumu i urinu povećava se koncentracija enterolignana, ali do sada nije ispitivano njihovo vezivanje za molekule HSA. Pored navedenog, HSA ima i antioksidativnu ulogu, koja potiče od prisustva slobodne tiolne grupe ostatka Cys34, koja može postojati u redukovanom i oksidovanom obliku. Slobodna tiolna grupa HSA čini 80 % od ukupnog sadržaja slobodnih tiola plazme i predstavlja jedan od najvažnijih vanćelijskih antioksidanasa.

Vezivanje fenolnih jedinjenja za HSA može da dovede do promene konformacije njegovih molekula, što za posledicu može imati promenu dostupnosti/izloženosti Cys34 tiolne grupe okolnoj sredini, i time uticati na reaktivnost i antioksidativni potencijal ove grupe. Budući da nema literaturnih podataka o ispitivanju uticaja vezivanja fenolnih jedinjenja na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA, rezultati istraživanja u ovoj oblasti mogu doprineti sagledavanju mogućnosti primene fenolnih jedinjenja (suplementacije ishrane proizvodima bogatim fenolnim jedinjenjima) u modulaciji antioksidativnog potencijala HSA Cys34 tiolne grupe.

4.5.1. Uticaj vezivanja stearinske kiseline za HSA na reaktivnost slobodne Cys34 tiolne grupe

Polazeći od činjenica: da vezivanje masnih kiselina dovodi do značajnih konformacionih promena na molekulu HSA, odnosno da utiče na reaktivnost Cys34 molekula HSA (Jovanović, 2013; Pavićević, 2014; Takić, 2016), da je sadržaj FFA povećan u različitim patološkim stanjima (jedno od njih je hronična bubrežna slabost, Ogata, 1984) i da je broj molekula masnih kiselina vezanih po molekulu HSA povećan, da se mesta vezivanja masnih kiselina i fenola preklapaju, ispitivanje kooperativnih i kompetitivnih interakcija liganada (masnih kiselina i fenolnih jedinjenja) pri vezivanju za HSA i posledica ovih vezivanja, posebno na reaktivnost Cys34 tiolne grupe, ima veliki značaj. U tom cilju prvo je ispitana reaktivnost tiolne grupe odmašćenog HSA, kao i HSA za koji je vezana S.

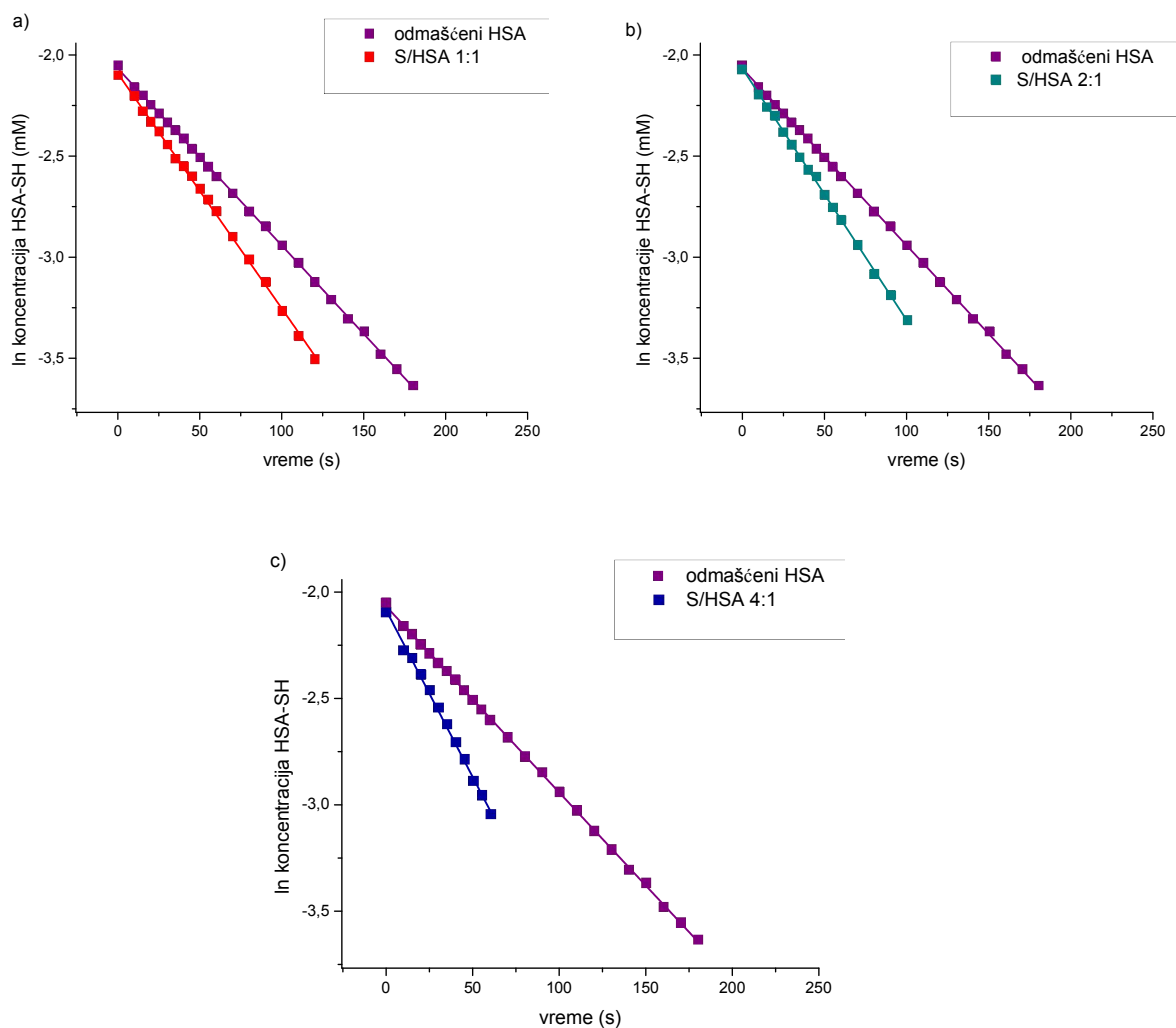
Reaktivnost HSA-SH ispitivana je praćenjem reakcije sa DTNB reagensom:



Koncentracija DTNB bila je 20 puta veća od koncentracije tiolne grupe, da bi se reakcija odvijala po kinetici pseudo-prvog reda. Vremenski tok reakcije (0 do 30 min) praćen je spektrofotometrijski, merenjem apsorbancijena 412 nm, kao što je opisano u odeljku 3.3.13. Grafici dobijeni posle linearizacije kinetičkih podataka pokazuju da se reakcija odigrava po kinetici pseudo-prvog reda u odnosu na koncentraciju HSA-SH (Slika 33).

Vredosti konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k') za odmašćeni HSA, S/HSA 1:1, S/HSA 2:1 i S/HSA 4:1 su bile $8.9 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $11.6 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $12.39 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, i $15.3 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom (Slika 34). Dobijeni rezultati potvrđuju da vezivanje S dovodi do značajnih promena (povećanja za 30.3 %, 39.2 % i 71.9 %, redom) u reaktivnosti HSA-SH grupe. Reaktivnost tiolne grupe S/HSA 4:1 kompleksa je skoro dva puta veća u odnosu na odmašćeni HSA. Dobijeni rezultati za k' su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih ispitivanja pri sličnim uslovima (Pavićević, 2014).

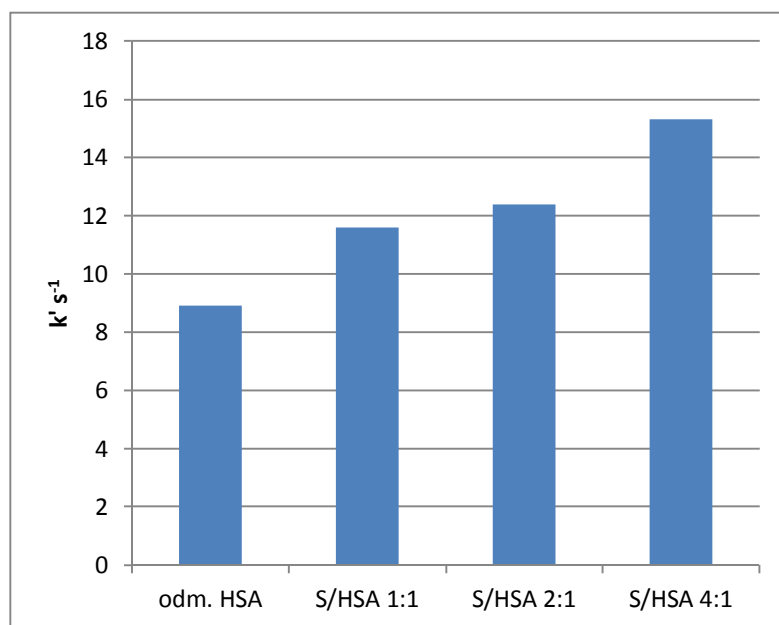
Pri normalnim fiziološkim uslovima 0.1 do 2 molekula FFA vezano je za molekul HSA. U određenim fiziološkim stanjima (npr. gladovanje, intenzivna fizička aktivnost) i kod obolelih (npr. bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću na programu hemodijalize, trudnica sa preklamsijom, obolelih od dijabetesa), kod kojih je uočeno povećanje oksidativnog stresa, dolazi i do povećanja koncentracije FFA, koje se vezuju za HSA (Torres, 2012). Ovaj mehanizam mogao bi predstavljati protektivnu adaptaciju na stanje povećanog oksidativnog stresa u organizmu. Stoga, ispitivanje reaktivnosti S/HSA 1:1 predstavlja model za normalna fiziološka stanja. Odnos S/HSA veći od 2:1 sreće se samo u navedenim (pato)fiziološkim stanjima, dok je S/HSA 4:1 model za stanja u kojim dolazi do izražene promene sadržaja FFA u cirkulaciji.



Slika 33. Linearni modeli kinetike reakcije pseudo prvog reda: a) S/HSA 1:1 b) S/HSA 2:1 c) S/HSA 4:1 sa DTNB-om.

Kao što je i pokazano, reaktivnost HSA-SH se povećava po vezivanju S za HSA, ali poznato je i da porast reaktivnosti zavisi i od tipa masne kiseline koja je vezana za HSA (Pavićević, 2014). Generalno, vezivanje PUFA ispoljava veći efekat na porast reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA nego SFA. Pokazano je da po vezivanju masne kiseline, okolina slobodne tiolne grupe HSA grupe može postati polarnija i da mogu biti indukovane konformacione promene u molekulu HSA koje vode povećanoj dostupnosti Cys34 grupe (Jovanović, 2013). Postavlja se pitanje da li i neki drugi molekuli (npr. polifenoli), za koje je

pokazano da se vezuju za HSA (Sinisi, 2015; Kamaran Khan, 2011; Pastukhov, 2007) mogu dovesti do sličnih promena u okolini Cys34 grupe i uticati na njenu reaktivnost.



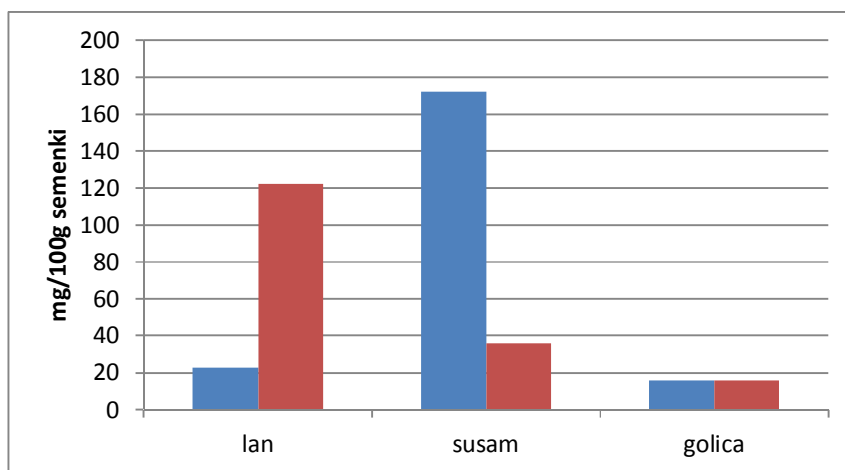
Slika 34. Konstante brzine reakcije pseudo prvog reda (k') za odmašćeni HSA, S/HSA 1:1, S/HSA 2:1 i S/HSA 4:1.

Kao što je i pokazano, reaktivnost HSA-SH se povećava po vezivanju S za HSA, ali poznato je i da porast reaktivnosti zavisi i od tipa masne kiseline koja je vezana za HSA (Pavićević, 2014). Generalno, vezivanje PUFA ispoljava veći efekat na porast reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA nego SFA. Pokazano je da po vezivanju masne kiseline, okolina slobodne tiolne grupe HSA grupe može postati polarnija i da mogu biti indukovane konformacione promene u molekulu HSA koje vode povećanoj dostupnosti Cys34 grupe (Jovanović, 2013). Postavlja se pitanje da li i neki drugi molekuli (npr. polifenoli), za koje je pokazano da se vezuju za HSA (Sinisi, 2015; Kamaran Khan, 2011; Pastukhov, 2007) mogu dovesti do sličnih promena u okolini Cys34 grupe i uticati na njenu reaktivnost.

4.5.2. Ispitivanje uticaja sastojaka metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA

U pripremljenim metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki lana, susama i golice ispitali smo, pored antioksidativnog kapaciteta (poglavlje 3.3.7), i sadržaje FFA (zbog utvrđenih efekata masnih kiselina na reaktivnost Cys34 grupe, prikazanih u prethodnom poglavlju) i sadržaj fenola. Zastupljenost masnih kiselina u metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki bila je: 16 mg u ekstraktu golice, 23 mg u ekstraktu lana i 132 mg u ekstraktu susama/100 g obezmašćenih semenki), dok je određena zastupljenost polifenola izražena u mg/ekvivalenta galne kiseline/100 g obezmašćenih semenki iznosila 16 u ekstraktu golice, 122 u ekstraktu lana i 36 u ekstraktu susama.

Uočavaju se značajne razlike između metanolnih ekstrakata u pogledu odnosa zastupljenosti ove dve klase jedinjenja. Dok je kod metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana sadržaj polifenola oko 6 puta veći od sadržaja FFA, kod susama je obrnuti odnos, tj. sadržaj masnih kiselina je oko 5 puta veći od sadržaja polifenola. U metanolnim ekstraktima golice sadržaj FFA i polifenola je gotovo jednak i najmanji u poređenju sa susamom i lanom. S obzirom na utvrđeni efekat vezivanja masnih kiselina (prikazan u poglavlju 4.5.1.), nameće se pitanje da li je moguće uočiti uticaj polifenola na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA pored prisustva FFA u metanolnim ekstraktima.



Slika 35. Sadržaj ne-esterifikovanih masnih kiselina (plava boja) i polifenola (crvena boja) u metanolnim ekstraktima semenki lana, susama i golice.

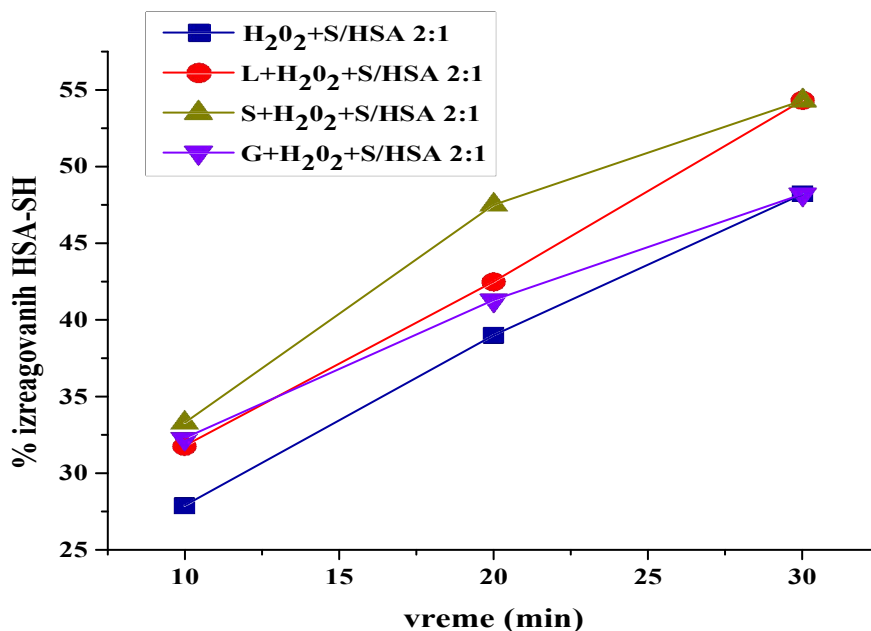
Inkubiranje kompleksa S/HSA 2:1 sa metanolnim ekstraktima (0.5 mg/mL) ispitivanih semenki (lan, susam, golica), u trajanju od 80 minuta na temperaturi 37 °C, dovodi do porasta brzine reakcije pseudo-prvog reda slobodne tiolne grupe HSA sa DTNB-om za 4.8 do 16.5 % (Tabela 15), u odnosu na sam S/HSA 2:1. Redosled porasta reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA je bio lan >> susam > golica i on je jednak redosledu opadanja sadržaja polifenola u ekstraktima semenki (Slika 35). Masnokiselinski profili metanolnih ekstrakata se značajno razlikuju, što komplikuje sagledavanje mogućeg uticaja FFA prisutnih u ekstraktima. Međutim, na osnovu poređenja ukupnog sadržaja fenola i FFA u lanu i susamu i promena k' reakcije tiolne grupe i DTNB može se zaključiti da je efekat fenolnih komponenata na reaktivnost tiolne grupe više izražen u odnosu na FFA.

Tabela 15. Konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k') za reakciju tiolne grupe S/HSA (2:1) i S/HSA (2:1) pre-inkubiranog metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki lana, susama i golice.

Kompleks	$k' \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	Promena reaktivnosti slobodne tiolne grupe (%)
S/HSA (2:1)	12.39 ± 0.03	-
S/HSA (2:1)+ekstrakt lana	14.4 ± 0.10	+16.5
S/HSA (2:1)+ekstrakt susama	13.26 ± 0.03	+8.6
S/HSA (2:1)+ekstrakt golice	12.98 ± 0.06	+4.8

Uticaj sastojaka metanolnih ekstrakata lana, susama i golice na reaktivnost S/HSA 2:1 ispitana je i u reakciji tiolne grupe sa vodonik-peroksidom (Slika 36). Uočava se da u prvih 30 minuta reakcije % izreagovanih slobodnih tiolnih grupa S/HSA 2:1 brže raste u prisustvu ekstrakata+H₂O₂, u odnosu na sam H₂O₂. Uočene razlike mogle bi biti posledica pro-oksidativnog delovanja samih ekstrakata, pa su paralelno postavljane i probe ekstrakti + S/HSA 2:1. Utvrđeno je da samo pri inkubiranju S/HSA 2:1 sa ekstraktom golice dolazi do značajnog sniženja sadržaja slobodnih tiolnih grupa HSA. Iz navedenog rezultata, za ekstrakte golice se ne može reći da li dovode do povećanja reaktivnosti Cys34 grupe, ali rezultati dobijeni za ekstrakte lana i susama

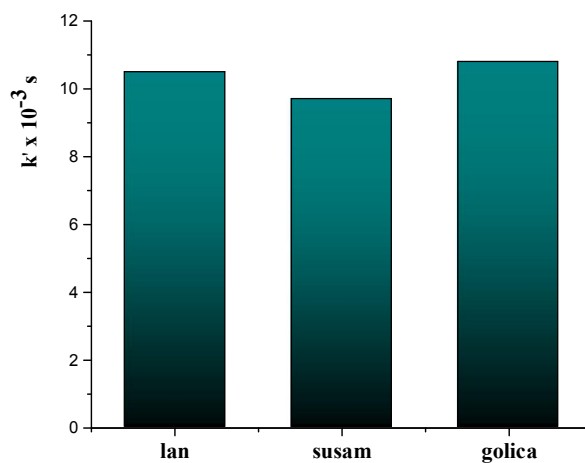
pokazuju da se reaktivnost S/HSA 2:1 prema H_2O_2 povećava kada se kompleks S/HSA 2:1 preinkubira sa pomenutim ekstraktima.



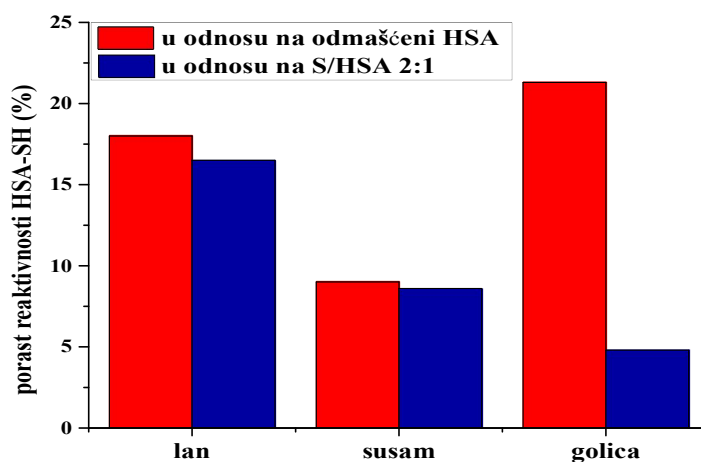
Slika 36. Promene sadržaja Cys34-SH grupa kompleksa S/HSA 2:1, pre-inkubiranog sa metanolnim ekstraktom lana (L), susama (S) i golice (G), u prisustvu vodonik-peroksida.

Ispitivanje uticaja sastojaka metanolnih ekstrakata semenki na kinetiku reakcije slobodne tiolne grupe odmašćenog HSA sa DTNB-om (Slika 37) pokazalo je da ispitivani ekstrakti dovode do povećanja reaktivnosti tiolne grupe za 9.0 do 21.3 %. Ekstrakt golice pokazao je najveći efekat, za njim sledi ekstrakt lana (povećanje reaktivnosti HSA-SH grupe za 18.0 %).

Kada se uporede efekti sastojaka metanolnih ekstrakata na reaktivnost Cys34 tiolne grupe odmašćenog HSA i S/HSA 2:1 (Slika 38) uočava se da je efekat ekstrakta golice na povećanje reaktivnosti tiolne grupe mnogo veći (za +21.3 %) u slučaju odmašćenog HSA, u odnosu na S/HSA 2:1 (+4.8 %). Za ekstrakte lana i susama nisu dobijene značajne razlike.



Slika 37. Konstante brzine reakcije pseudo prvog reda (k') za reakciju tiolne grupe odmašćenog HSA, pre-inkubiranog metanolnim ekstraktima obezmašćenih semenki lana, susama i golice, sa DTNB-om.



Slika 38. Poređenje efekata sastojaka metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana, susama i golice na reaktivnost odmašćenog HSA i kompleksa S/HSA 2:1

Time je pokazano da vezivanje S za HSA utiče na efekat sastojaka metanolnih ekstrakata golice na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA. Svoj kompetitivni efekat S mogla bi ostvarivati ili

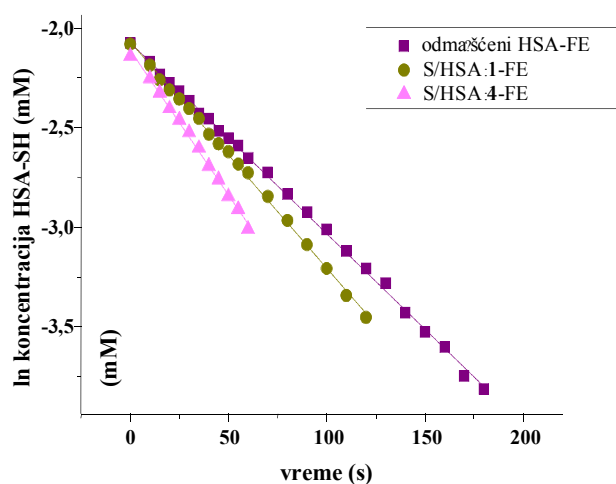
tako što se komponenta/e ekstrakta golice i S vezuju za isto mesto na molekulu HSA i/ili zbog konformacionih promena HSA molekula koje vezivanje S indukuje. Ukoliko bi komponenta bila masna kiselina, izraženiji efekat bi se dobio za ekstrakte lana i susama, jer je sadržaj FFA u njihovim ekstraktima veći. Međutim, komponente metanolnih ekstrakata lana i susama pokazuju gotovo jednak efekat na reaktivnost Cys34 tiolne grupe odmašćenog HSA i S/HSA 2:1. Navedeno govori u prilog tome da bi neke druge komponente metanolnih ekstrakata golice, lana i susama mogle uticati na utvrđene promene u konstantama brzine reakcije pseudoprvog reda (reaktivnosti) tiolne grupe sa DTNB-om, a ne FFA prisutne u metanolnim ekstraktima. Obezmašćene semenke predstavljaju otpadni industrijski materijal u toku proizvodnje ulja, i njihovi metanolni ekstrakti su bogati lignanima, fenolnim kiselinama i u slučaju golice hlorofilima.

4.5.3. Uticaj vezivanja FE za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe

Semenke bogate uljima sadrže fenolne kiseline, čiji kvalitativni sastav zavisi od vrste semenki. FE je rasprostranjeno fenolno jedinjenje u biljnim vrstama. U značajnoj količini prisutna je u semenu lana i susama, a ima je i u golici (Eliasson, 2003; Othman, 2015; Morrison, 2015; Dabrowski, 1984). Da bi se utvrdilo da li vezivanje polifenola prisutnih u semenkama lana, susama i golice, može imati uticaj na k' HSA-SH sa DTNB, ispitivanje je započeto proučavanjem uticaja FE. Za FE pokazano je da se vezuje za BSA i HSA u IIA subdomenu (Li, 2014; Jin, 2012). Određena je konstanta vezivanja, utvrđeno je dolazi do konformacionih promena HSA pri njenom vezivanju. Međutim, do sada nije ispitivan uticaj vezivanja FE za HSA na reaktivnost slobodne Cys34 tiolne grupe, odnosno na njen antioksidativni potencijal.

Kooperativnost i kompetitivnost interakcija između masnih kiselina (tj. S) i FE mogli bi biti značajan faktor, koji pokazuje uticaj na reaktivnost slobodne Cys34 tiolne grupe albumina. Značaj ovih ispitivanja ogleđa se i u tome što nema literaturnih podataka o mogućem uticaju masnih kiselina na interakcije FE sa HSA. Da bi se posmatrali i odgovarajući fiziološki modeli, pored odmašćenog HSA, ispitivani su kompleksi jedinjenja sa fenolnom strukturom i HSA, kod koga je vezan jedan molekul S po molekulu HSA (S/HSA 1:1, prisutan pri normalnim fiziološkim uslovima), i četiri molekula S (S/HSA 4:1, prisutan kod gladovanja, intenzivnog vežbanja ili u patološkim stanjima).

Uticaj interakcija FE i FFA, pri vezivanju za HSA, na reaktivnost tiolne grupe (kinetiku reakcije sa DTNB) ispitan je posle inkubiranja odmašćenog HSA ili S/HSA 1:1 ili 4:1 (0.25 mM) na 37 °C sa FE u trajanju od jednog sata, pri čemu je molarni odnos FE u odnosu na ispitan HSA molekul bio 1:1. Vremenski tok reakcije (0 do 30min) praćen je spektrofotometrijski, merenjem apsorbanije na 412 nm. Grafici dobijeni posle linearizacije kinetičkih rezultata, pokazuju da se reakcija odigrava po kinetici pseudo-prvog reda u odnosu na koncentraciju slobodne tiolne grupe HSA (Slika 39).



Slika 39. Linearni modeli kinetike reakcije pseudo prvog reda tiolne grupe kompleksa odmašćenog HSA-FE, S/HSA 1:1-FE i S/HSA 4:1-FE sa DTNB-om.

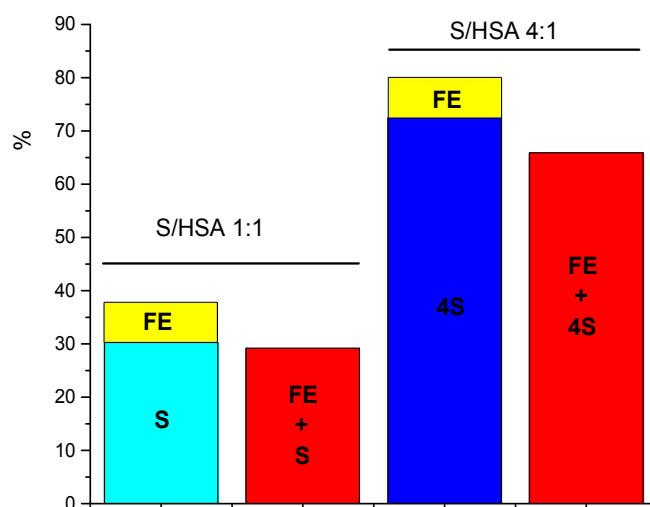
Vezivanje FE za odmašćeni, i S zamašćeni HSA ispoljava blage, ali različite efekte na reaktivnost tiolne grupe. Pri vezivanju FE za odmašćeni HSA reaktivnost tiolne grupe raste za 7.9 %. Vezivanje FE za S/HSA 1:1 ne dovodi do promene k' , dok vezivanje za S/HSA 4:1 dovodi do smanjenja (za 3.9 %) reaktivnosti tiolne grupe HSA (Tabela 16). Vrednosti k' ukazuju da interakcije FE sa HSA utiču na reaktivnost tiolne grupe HSA i da na njen efekat zavisi od molarnog odnosa vezanih masnih kiselina za HSA.

Tabela 16. *Konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k') za reakciju tiolne grupe odmašćenog HSA, S/HSA (1:1 i 4:1), i njihovih kompleksa sa FE. Svako određivanje je urađeno u triplikatu.*

Kompleks	$k' \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	Promena reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA (%) po vezivanju:	
		FE ^a	S+FE ^b
Odmašćeni HSA	8.9 ± 0.1		
Odmašćeni HSA-FE	9.6 ± 0.4	+7.9	
S/HSA 1:1	11.6 ± 0.3		
S/HSA 1:1-FE	11.5 ± 0.2	-0.9	+29.2
S/HSA 4:1	15.3 ± 0.1		
S/HSA 4:1-FE	14.7 ± 0.4	-3.9	+65.2

^a u poređenju sa odmašćenim HSA, S/HSA 1:1 i 4:1, redom; ^b u poređenju sa odmašćenim HSA

U kompleksima S/HSA 1:1 i 4:1 reaktivnost Cys34 je povećana za 30.3 % i 71.9 % u odnosu na odmašćeni HSA, redom. Pojedinačni doprinosi S i doprinosi FE promeni reaktivnosti tiolne grupe HSA su sabrani i upoređeni sa kumulativnim efektom na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA (Slika 40). Kao što se vidi u Tabeli 16, FE dovodi do porasta reaktivnosti slobodne tiolne grupe odmašćenog HSA za 7.9 %. Ako se ova vrednost sabere sa 30.3 %, koliko S (u kompleksu S/HSA 1:1) doprinosi porastu reaktivnosti slobodne tiolne odmašćenog HSA, suma pojedinačnih efekata biće 38.2% (Slika 40), dok je za kompleks S/HSA 1:1-FE dobijena vrednost, kumulativni efekat od 29.2 %, neznatno manji od samog efekta S (Tabela 16, Slika 40). U slučaju kompleksa S/HSA 4:1-FE, kumulativni efekat FE i S dovodi do smanjenja efekta samih FA za 15 %.



Slika 40. *Pojedinačan (kolona sa dve boje) i kumulativni efekat (kolona sa jednom bojom) doprinosa stearinske kiseline (S) i ferulinske kiseline (FE) na promenu reaktivnosti Cys34 grupe S/HSA 1:1 i S/HSA 4:1 u odnosu na odmašćeni HSA.*

Može se zaključiti da vezivanje FE u odnosu FE/HSA 1:1 izaziva slabe promene u reaktivnosti tiolne grupe Cys34. U fiziološkim i patološkim stanjima u kojima je povećana serumska koncentracija FFA, FFA vezane za HSA bi mogle uticati na efekte dijetarnog unosa FE bogatih namirnica (npr. lana) na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA (potencijal kao antioksidanta).

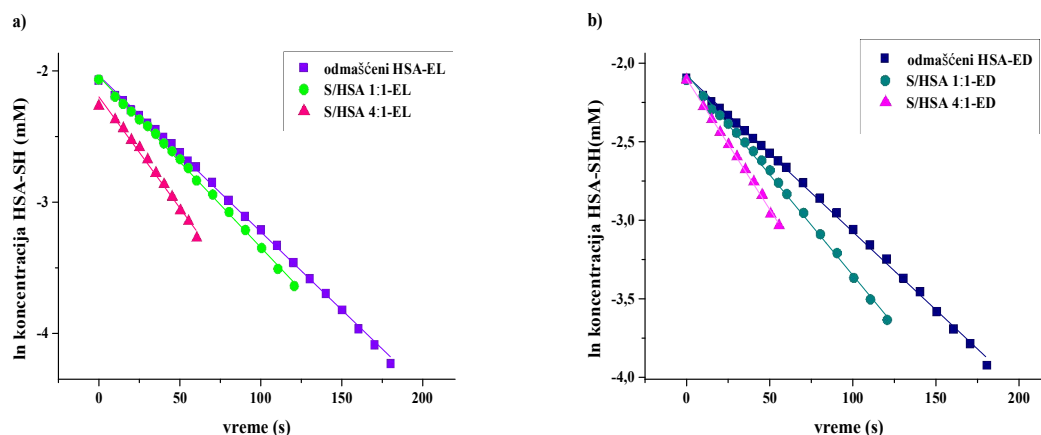
4.5.4. Ispitivanje uticaja vezivanja EL i ED za HSA na reaktivnost njegove Cys34 grupe

Lan i susam su namirnice sa najvećim sadržajem lignana. U lanu je najzastupljeniji SDG, a u susamu sesamin i sesamolin (u nešto manjem iznosu) (Peterson, 2010; Eliasson, 2003; Pathak, 2014). I za golicu je utvrđeno da sadrži lignan sekoizolaricirezinol (Aldercreutz, 1997) i laricirezinol (Sicilia, 2003). Lignani se u gastrointestinalnom traktu metabolišu u enterolignane, od kojih je najzastupljeniji EL, a zatim ED.

Koncentracije gastrointestinalnih metabolita dijetarnih lignana EL i ED, odnosno njihovih glukuronida i sulfata, povećavaju se u plazmi i urinu posle unosa hrane bogate lignanima (susam, lan). Cilj ovog dela teze bio je da se ispita mogući uticaj interakcija enterolignana (EL i ED) sa HSA na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA (antioksidativni potencijal), kao i da se proceni utiču li masne kiseline (S kao model-sistem) na efekat enterolignana.

Kao i u slučaju FE, ispitivani molarni odnos EL i ED u odnosu na HSA (odmašćeni, S/HSA1:1, S/HSA 4:1) bio je 1:1, a k' određena je nakon pre-inkubiranja odmašćenog HSA na 37 °C sa EL ili ED, u trajanju od jednog sata.

Nađeno je da je k' (reaktivnost) slobodne tiolne grupe HSA, posle vezivanja enterolignana, u svim kompleksima sa HSA (sa i bez masnih kiselina) povećana (Slika 41, Tabela 17).



Slika 41. Linearni modeli kinetike reakcije pseudo-prvog reda tiolne grupe kompleksa odmašćenog HSA i S/HSA kompleksa (1:1 i 4:1) sa enterolaktonom (EL) i enterodiolom (ED).

Najizraženiji efekat na porast reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA (%) u odnosu na odmašćeni HSA je dobijen za kompleks odmašćeni HSA-EL, a zatim za odmašćeni HSA-ED (33.1 % i 13.6 %, redom). Kompleks odmašćeni HSA-EL pokazao je sličnu reaktivnost kao kompleks S/HSA 1:1 (vrednost k' $11.8 \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, naspram $11.6 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, Tabela 17). Na osnovu dobijenih k' vrednosti može se zaključiti da vezivanje enterolignana dovodi do

povećanja reaktivnosti tiolne grupe Cys34 i da je ovaj efekat izraženiji pri nižim molarnim odnosima S/HSA.

Tabela 17. *Konstante brzine reakcije pseudo-prvog reda (k') za reakciju tiolne grupe odmašćenog HSA, S/HSA (1:1 i 4:1), i njihovih kompleksa sa enterolignanima sa DTNB-om.*

Kompleks	$k' \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	Promena reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA (%) po vezivanju	
		EL, ED ^a	S + EL, ED ^b
Odmašćeni HSA	8.9 ± 0.1		
Odmašćeni HSA-EL	11.8 ± 0.4	+33.1	
Odmašćeni HSA-ED	10.1 ± 0.1	+13.6	
S/HSA 1:1	11.6 ± 0.3		
S/HSA 1:1-EL	13.0 ± 0.6	+12.6	+46.7
S/HSA 1:1-ED	12.8 ± 0.3	+10.9	+44.4
S/HSA 4:1	15.3 ± 0.1		
S/HSA 4:1-EL	17.0 ± 0.3	+10.8	+91.1
S/HSA 4:1-ED	16.7 ± 0.9	+9.1	+88.1

^a u poređenju sa odmašćenim HSA, S/HSA 1:1 i 4:1, redom; ^b u poređenju sa odmašćenim HSA

Uočava da oba enterolignana (EL i ED) i S povećavaju reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA u svim proučavanim kompleksima (Tabela 17). Pojedinačni doprinosi S i doprinosi EL i ED promeni reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA su sabrani i upoređeni sa kumulativnim efektom na reaktivnost Cys34 (Slika 42). Kao što se vidi u Tabeli 17, EL dovodi do porasta reaktivnosti tiolne grupe odmašćenog HSA za 33.1 %. Ako se ova vrednost sabere sa pojedinačnim doprinosom S povećanju reaktivnosti tiolne grupe odmašćenog HSA (30.3 %), suma pojedinačnih efekata iznosi 63.4 % (Slika 42). Sa druge strane, za kompleks S/HSA 1:1-EL dobijeno je povećanje reaktivnosti (vrednost za kumulativni efekat) od 46.7 % (Tabela 17, Slika 42). Dakle, evidentno je da S utiče/smanjuje efekat EL na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA

i ovaj uticaj (kompeticija) je nešto manje izražen pri manjem molarnom odnosu S/HSA (16.7 % za S/HSA 1:1-EL u odnosu na 14.4 % za S/HSA 4:1-EL). Pri vezivanju ED za S/HSA komplekse, negativni efekti S na reaktivnost tiolne grupe nisu utvrđeni (Slika 42).

Dobijeni rezultati, kojima je dokazano da enterolignani dovode do porasta reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA, mogu biti veoma značajni, jer ukazuju na mogućnost primene fenolnih jedinjenja u modulaciji reaktivnosti (antioksidativnog potencijala) HSA dijetarnim unosom hrane bogate lignanima, odnosno suplementacijom ishrane. Sa druge strane, u nekim fiziološkim i patološkim stanjima, kod kojih je povećana serumska koncentracija FFA, očekuje se da bi one mogle uticati na efekat enterolignana/ lignana unetih sa namirnicama bogatim lignanima.

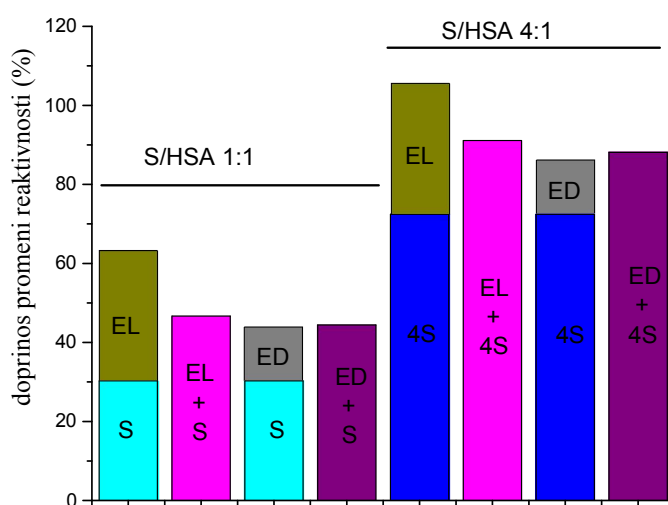


Figure 42. *Pojedinačni (leva kolona sa dve boje) i kumulativni efekti (desna kolona sa jednom bojom) doprinosa stearinske kiseline (S), enterolaktona (EL) i enterodiola (ED) promeni reaktivnosti Cys34 grupe kompleksa S/HSA 1:1 i S/HSA 4:1 u odnosu na odmašćeni HSA.*

4.6. Ispitivanje interakcija FE i enterolignana sa HSA fluorescentnom spektroskopijom

Da bismo bolje sagledali, objasnili i razumeli uticaj FE, EL i ED na reaktivnost HSA-SH grupe, interakcije FE, EL i ED sa odmašćenim HSA i S/HSA (1:1 i 4:1) su ispitane fluorescentnom spektroskopijom. Talasna dužina ekscitacije bila je 280 nm, na kojoj i Trp214 i Tyr ostaci HSA molekula fluoresciraju. Uprkos tome što je u strukturi HSA prisutno 18 Tyr ostataka (Meloun, 1975) fluorescencija molekula pri ekscitiranju na ovoj talasnoj dužini potiče najviše od jedinog Trp214, koji je lociran u subdomenu IIa (Lakovicz, 2006).

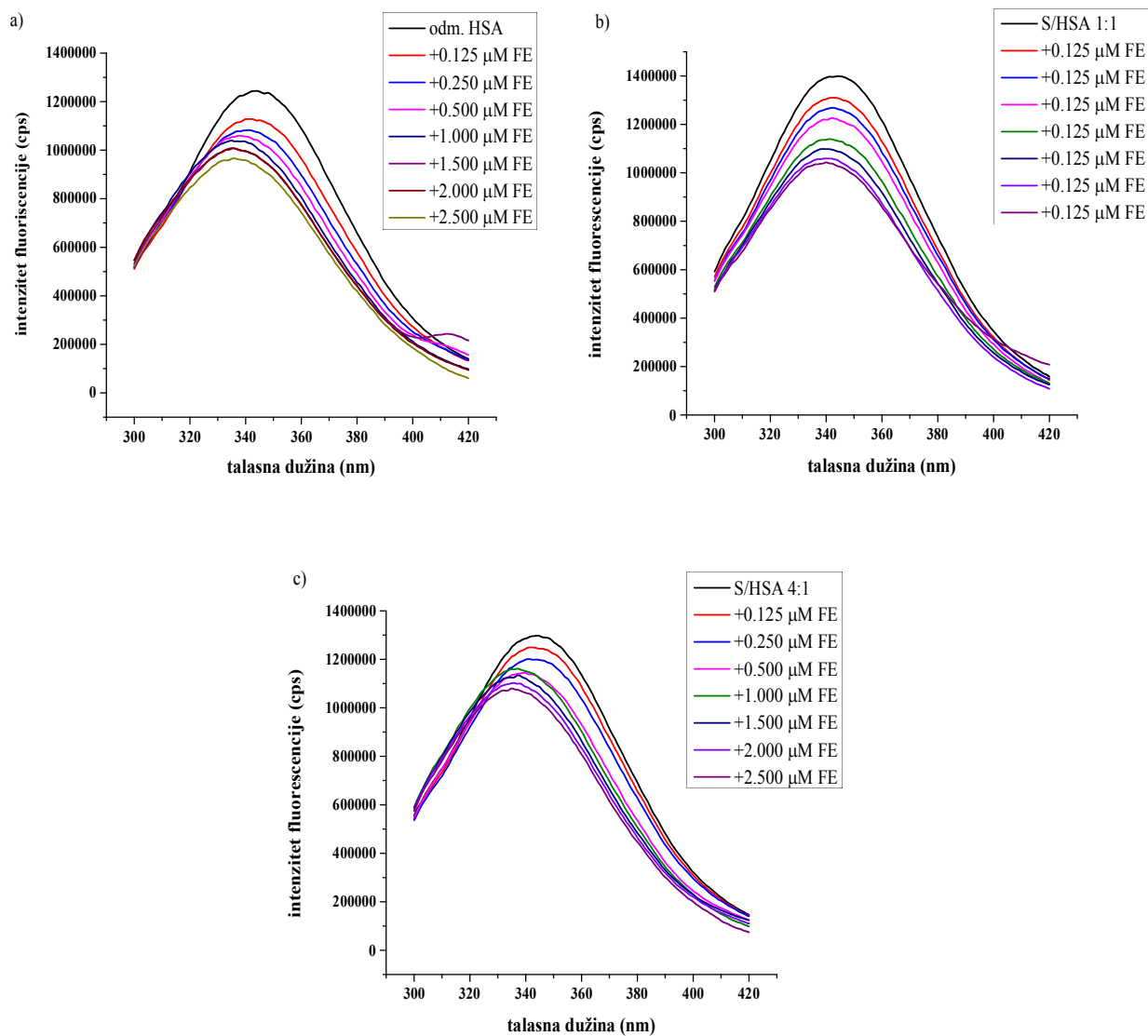
4.6.1. Ispitivanje interakcija FE sa HSA fluorescentnom spektroskopijom

4.6.1.1. Efekat vezivanja FE na fluorescenciju HSA

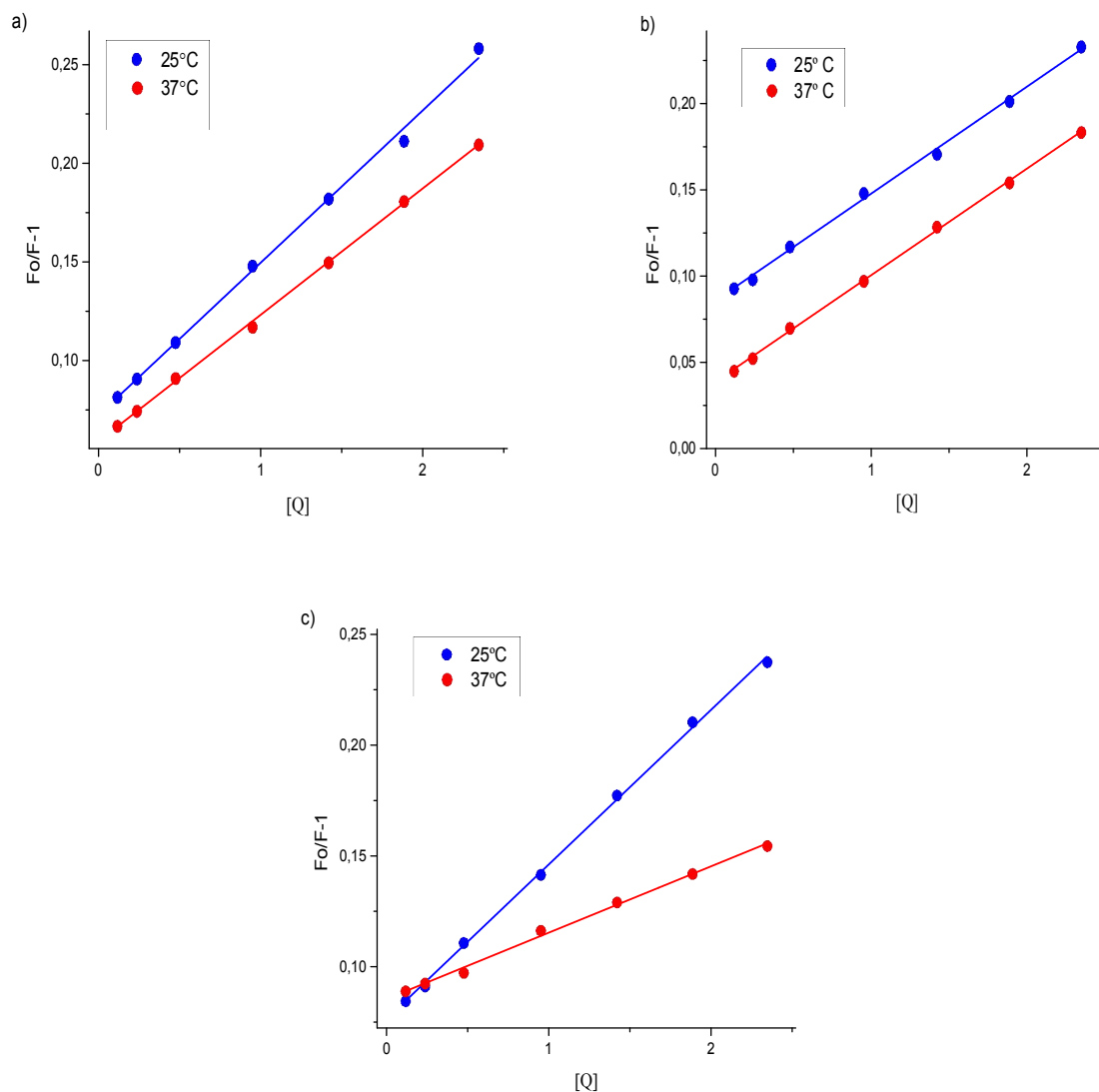
Usled vezivanja FE za odmašćeni HSA i S/HSA (1:1 i 4:1) dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije na talasnoj dužini maksimuma emisije (340 nm) u poređenju sa odmašćenim HSA i (S/HSA 1:1 i 4:1) (Slika 43).

Smanjenje intenziteta fluorescencije je zavisno od koncentracije dodatog liganda (FE), što ukazuje na to da dolazi do interakcija FE sa HSA uz promenu konformacije HSA molekula. Pomeranje talasne dužine emisionog maksimuma ka nižim talasnim dužinama (tzv. plavo pomeranje, "blue shift") se naročito uočava kod kompleksa HSA-FE i S/HSA 4:1-FE. Ovi rezultati ukazuju da bi mikro-okolina fluorofore HSA molekula (Trp214) mogla postati hidrofobnija po vezivanju liganada (Lakovicz, 2006) tj. u prisustvu većih koncentracija FE.

Vrednosti intenziteta fluorescencije na 340 nm su korigovane za "inner filter effect" (Materijali i metode, jednačina 1) i potom su izračunate Stern-Volmerove konstante gašenja fluorescencije (Materijali i metode, jednačina 2) iz nagiba regresione krive $F_0/F-1$ u odnosu na koncentraciju kvenčera [Q] (Slika 44).



Slika 43. Fluorescentni emisioni spektri: a) odmašćenog HSA, b) S/HSA 1 : 1 i c) S/HSA 4 : 1 u prisustvu različitih koncentracija ferulinske kiseline, na 25°C i pH 7.4. Talasna dužina eksitacije je 280 nm. Emisioni spektri su snimani u opsegu od 300 do 420 nm. Koncentracija HSA je bila 0.5 μM , a ferulinske kiseline 0.125 do 2.5 μM .



Slika 44. Stern-Volmerovi grafici za komplekse FE sa: a) odmašćenim HSA; b) S/HSA 1:1; c) S/HSA 4:1 na 25 i 37 °C.

Za sve ispitivane komplekse HSA i liganada zavisnost je bila linearna (Pirsonovi koeficijenti korelacije, r su dati u Tabeli 18), što je omogućilo da se odrede Stern-Volmerove konstante (K_{sv}).

Kako je prosečan poluživot biomolekula 10^{-8} s, izračunate su konstante brzine gašenja fluorescence (k_q). Dobijene vrednosti za k_q (3.08 do $7.72 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) su za dva reda veličina veće od granične vrednosti konstante brzine difuzije biomolekula ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), što ukazuje da je

mehanizam gašenja fluorofore statički (van de Weert, 2011). Kada je mehanizam gašenja fluorescence statički, vrednosti K_{sv} konstanti opadaju sa porastom temperature, što je takođe pokazano u našim ispitivanjima (Tabela 18, Slika 44). Dobijeni rezultati, koji govore o statičkom mehanizmu gašenja fluorescence HSA usled interakcija sa FE (na osnovu k_q i temperaturne zavisnosti vrednosti K_{sv} konstanti) su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Kang, 2004).

Tabela 18. *Stern-Volmerove konstante gašenja fluorescencije (K_{sv}) i Pirsonovi koeficijenti korelacije (r). Prave za određivanje ovih vrednosti dobijene su titracijom 0.5 μ M odmašćenog HSA i S/HSA (1:1 i 4:1) sa FE, koncentracije od 0.125 do 2.5 μ M (na 25 i 37 °C).*

Kompleks	$K_{sv} \times 10^4 (M^{-1})$	r	$K_{sv} \times 10^4 (M^{-1})$	r
FE +	25°C		37°C	
odmašćeni HSA	7.72	0.999	6.40	0.999
S/HSA 1:1	6.20	0.999	6.18	0.999
S/HSA 4:1	6.98	0.999	2.99	0.998

4.6.1.2. Karakterizacija vezivanja FE za HSA i komplekse S/HSA

Kada je potvrđeno da je mehanizam gašenja statički, izračunate su vrednosti konstanti vezivanja (K_A) FE za HSA (odmašćeni, S/HSA 1:1, S/HSA 4:1) (odjeljak Materijali i metode, jednačina 4) (Tabela 19).

Vrednost K_A FE za odmašćeni HSA ($9.71 \times 10^5 M^{-1}$, na 25 °C) slaže se sa vrednošću dobijenom od strane Ojha i saradnika (2012) ($9.787 \times 10^5 M^{-1}$, na 25 °C), ali je veća u odnosu na rezultate dobijene u drugim studijama (Kang, 2004; Jin, 2012; He, 2010). Za komplekse FE-odmašćeni BSA, metodom fluorometrijske spektroskopije, nađeno je da K_A iznosi $0.51 \times 10^4 M^{-1}$, a NMR analizom i $6.7451 \times 10^4 M^{-1}$ (Jin, 2012). Međutim, kada se uporede K_{sv} vrednosti, one su istog reda veličine.

Najveća vrednost K_A FE za HSA dobijena je za kompleks S/HSA 4:1-FE, na temperaturi od 37 °C ($12.32 \times 10^5 M^{-1}$). Ova vrednost je oko 2 puta veća u odnosu na K_A FE za odmašćeni

HSA i 2.5 puta veća u odnosu na konstantu za S/HSA 1:1 (na 37 °C). Na 25 °C vezivanje FE je bilo najjače u kompleksu S/HSA 1:1, ali razlike u odnosu na komplekse FE sa odmašćenim HSA i S/HSA 4:1 nisu bile tako izražene kao na temperaturi od 37 °C (Tabela 19).

Tabela 19. Konstante vezivanja (K_A) FE za odmašćeni HSA, S/HSA 1:1 i S/HSA 4:1

Kompleks FE+	$K_A \times 10^5 (M^{-1})$	
	25 °C	37 °C
odmašćeni HSA	9.71	5.60
S/HSA 1:1	10.23	4.41
S/HSA 4:1	7.39	12.32

Na osnovu dobijenih vrednosti za K_A mogu se izračunati termodinamički parametri (ΔH , ΔG i ΔS) i reći nešto više o vrsti interakcija između ispitivanog liganda i HSA. Kada je $\Delta H < 0$ i $\Delta S < 0$, Van Der Waals-ove interakcije i vodonične veze igraju glavnu ulogu u interakcijama liganda i proteina, a za $\Delta H > 0$ i $\Delta S > 0$ u pitanju su hidrofobne interakcije (Ross, 1981). Promene vrednosti termodinamičkih parametara (Tabela 20) pri vezivanju FE za odmašćeni HSA i S/HSA (1:1 i 4:1) pokazuju da postoje značajne razlike u interakcijama FE i HSA. U kompleksima odmašćeni HSA-FE i S/HSA 1:1-FE Van Der Waals-ove interakcije i vodonične veze igraju glavnu ulogu pri stvaranju kompleksa protein-ligand, dok su u kompleksu S/HSA 4:1-FE dominantne hidrofobne sile. Rezultati spektrofluorimetrijskih određivanja (Jin, 2012; Kang 2004; He 2010) uglavnom su pokazivali da su pri stvaranju kompleksa FE sa odmašćenim HSA dominantne hidrofobne sile, ali Ojha i saradnici (2012) su u direktnim kalorimetrijskim merenjima pokazali da je pri stvaranju kompleksa FE-odmašćeni BSA $\Delta H < 0$ i $\Delta S < 0$, što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Nema puno literaturnih podataka o uticaju masnih kiselina na vezivanje polifenola za HSA. Pantusa i saradnici (2012) su otkrili da na interakcije resveratola sa HSA utiče S. Konstanta vezivanja resveratola za HSA se ne menja do molarnog odnosa S/HSA 3 do 4:1, ali se značajno smanjuje pri molarnom odnosu S/HSA 5:1 i 6:1. Rezultati dobijeni za HSA-FE komplekse u ovoj disertaciji pokazuju da povećanje odnosa S/HSA do 4:1 dovodi do povećanja konstante

vezivanja, odnosno da se uticaj S na vezivanje FE razlikuju u odnosu na onaj za komplekse resveratola sa HSA.

Tabela 20. Termodinamički parametri za formirane komplekse FE sa odmašćenim HSA i S/HSA 1:1 i 4:1.

Kompleks FE+		ΔG (KJ/mol)	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/K)
Odmašćeni HSA	25 °C	-34.15	-35.23	-4
	37 °C	-34.11		
S/HSA 1:1	25 °C	-34.29	-53.86	-65
	37 °C	-33.50		
S/HSA 4:1	25 °C	-33.47	32.71	222
	37 °C	-36.14		

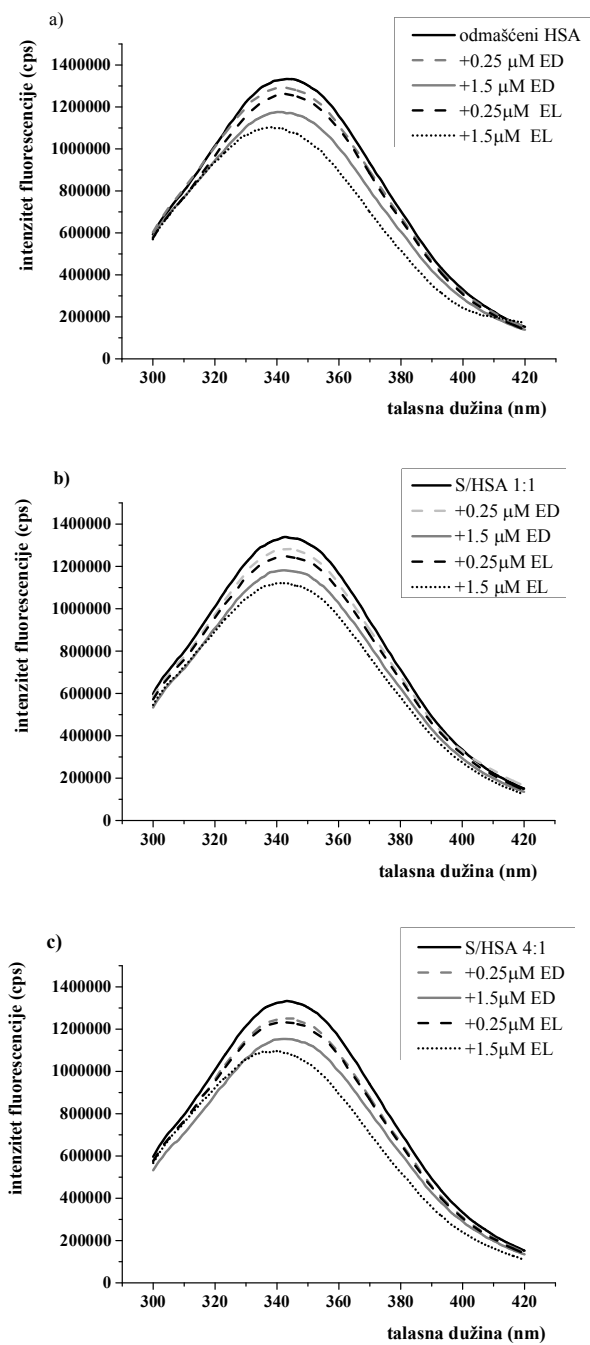
Pri normalnim fiziološkim uslovima 0.1 do 2 mola FFA je vezan po molu HSA, dok molarni odnos masna kiseline/HSA može da poraste iznad 6:1 u perifernoj cirkulaciji tokom gladovanja ili intenzivnog treninga, ili u patološkim stanjima, kao što su dijabetes, bolesti jetre ili kardiovaskularna oboljenja (Turell, 2013). Naši rezultati ukazuju da bi u različitim (pato)fiziološkim stanjima masne kiseline mogle uticati na vezivanje FE za HSA, a time i na efekte FE npr. na anti-trombogeno delovanje FE.

4.6.2. Interakcije EL i ED sa HSA

Vezivanje enterolignana EL i ED za HSA do sada nije ispitivano. U cilju boljeg razumevanja uticaja enterolignana na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA molekula, ispitane su interakcije enterolignana EL i ED sa odmašćenim HSA i S/HSA (1:1 i 4:1) kompleksima fluorescentnom spektroskopijom.

4.6.2.1. Fluorescentni spektri kompleksa enterolignana i HSA

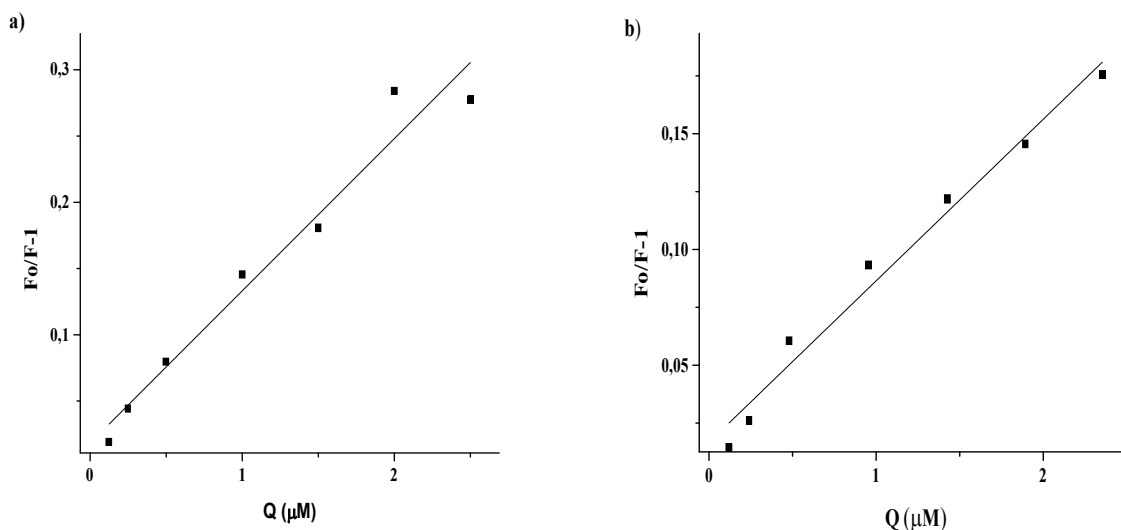
HSA kompleksi su ekcitivani na 280 nm. Vezivanje EL i ED za odmašćeni HSA, S/HSA 1:1 i 4:1 dovodi do gašenja intenziteta fluorescence na talasnim dužinama maksimuma emisije (oko 340 nm) u poređenju sa odmašćenim HSA, S/HSA 1:1 i 4:1 (Slika 45).



Slika 45. *Emisioni spektri odmašćenog, S/HSA 1:1 i S/HSA 4:1 kada se dodaju EL and ED na 37 °C i pH 7.40. Talasna dužina ekscitacije 280 nm, emisioni spektar 300 do 420 nm. Koncentracija HSA 0.5 μM, koncentracije EL i ED 0.25 μM i 1.5 μM.*

Smanjenje fluorescencije je dozno-zavisno od koncentracije enterolignana, što pokazuje da dolazi do interakcija enterolignana i HSA. Za komplekse odmašćeni HSA-EL i S/HSA 4:1-EL uočava se i naročito „plavo“ pomeranje talasne dužine maksimuma emisije ka nižim talasnim dužinama, što može biti posledica promena u okruženju ostatka Trp214. Usled promene konformacije HSA, do koje dolazi u prisustvu velikih koncentracija EL, mikro-okolina Trp postaje hidrofobnija. Promene fluorescencije HSA molekula (konformacione promene), koje indukuje vezivanje ED za HSA su manje izražene u odnosu na promene izazvane vezivanjem EL (Slika 45). Ovi efekti su u skladu sa efektima vezivanja ED i EL na reaktivnost slobodn tiolne grupe HSA. Vezivanje EL dovodi do većih promena reaktivnosti Cys34 tiolne grupe u odnosu na ED (Poglavlje 4.5.4, Tabela 17).

Vrednosti intenziteta fluorescence kompleksa EL i ED na 340 nm korigovane za su „filter inner efekat“ (Materijali i metode jednačina 1) i konstruisane su regresione krive za relativni pad intenziteta fluorescence ($F_0/F-1$) u odnosu na koncentracije EL ili ED ($[Q]$)(Slika 46).



Slika 46. Stern-Volmerovi grafici: a) odmašćeni HSA-EL, b) odmašćeni HSA-ED dobijeni titracijom 0.5 μM odmašćenog HSA sa enterolignanima (EL, ED) na 37 °C. Koncentracija liganda (EL, ED) od 0.125 do 2.5 μM.

Pirsonovi koeficijenti korelacije (r) i vrednosti K_{sv} (izračunate prema jednačini 2, Materijali i metode, poglavlje 3.3.15) prikazani su u Tabeli 21. Polazeći od toga da je poluživot biomolekula 10^{-8} s, izračunate su vrednosti. Dobijene vrednosti kq od 5.87 do $11.49 \times 10^{12} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, su za dva reda veličine veće od granične vrednosti konstante brzine difuzije ($\sim 10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), što ukazuju da je mehanizam gašenja fluorofore statički, kao i u slučaju FE.

Tabela 21. Stern-Volmerove konstante gašenja fluorescence (K_{sv}) i Pirsonovi koeficijenti (r) dobijeni za prave zavisnosti ($F_0/F-1$) od koncentracije enterolignana (EL ili ED) $[Q]$.

Kompleks	$K_{sv} \times 10^4 (\text{M}^{-1})$	r
EL		
+odmašćeni HSA	11.49	0.985
+ S/HSA 1:1	9.55	0.989
+ S/HSA 4:1	5.87	0.979
ED		
+ odmašćeni HSA	6.98	0.989
+ S/HSA 1:1	6.95	0.974
+ S/HSA 4:1	7.02	0.984

Kao što je napred rečeno, nema literaturnih podataka o vezivanju enterolignana za HSA. Odredene vrednosti K_a (izračunate prema jednačini 3, odeljak 3.3.15. Materijala i metoda) EL i ED za HSA (odmašćeni, S/HSA 1:1, S/HSA 4:1 nalaze se u opsegu od 1.92 do $11.64 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ (Tabela 22). Ako se uporede dobijene vrednosti K_a za komplekse EL i ED sa HSA, uočava se da su dobijene K_a za EL više u odnosu na vrednosti za ED u svim slučajevima vezivanja ovih enterolignana za molekule HSA (odmašćeni, S/HSA 1:1 i 4:1). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je vezivanje EL nešto jače od vezivanja ED, i da se oba enterolignana (EL i ED) vezuju za HSA umerenom jačinom, što obezbeđuje da se molekuli ovih enterolignana mogu transportovati vezani za HSA, ali i da u cirkulaciji budu dostupni u slobodnoj formi (da bi ostvarili svoj npr. antioksidativni efekat). Dobijeni rezultati za jače vezivanje EL u odnosu na ED

su u saglasnosti sa rezultatima za efekte na reaktivnost slobodne Cys34 grupe HSA, kao i uočenoj promeni konformacije molekula HSA (plavi pomeraj oko ostatka Trp214 u kompleksima EL-HSA).

Tabela 22. *Konstante vezivanja (K_a) i broj mesta vezivanja (n) enterolignana (EL i ED) po molekulu odmašćenog HSA i kompleksima S/HSA 1:1 i 4:1.*

Kompleks	$K_a \times 10^4$ (M^{-1})	n
37 °C		
EL		
+odmašćeni HSA	11.64	0.896
+ S/HSA 1:1	4.35	0.679
+ S/HSA 4:1	2.43	0.578
ED		
+ odmašćeni HSA	5.59	0.818
+ S/HSA 1:1	2.50	0.610
+ S/HSA 4:1	1.92	0.507

Lignani su grupa polifenola sa pokazanim anti-estrogenskim, anti-mitotičkim i anti-kancerogenim delovanjem. Transport apsorbiranih supstanci sa estrogenskim delovanjem, prisutnih u biljkama, a posebno njihovo vezivanje za proteine određuje farmakodinamiku, farmakokinetiku i njihovu biološku aktivnost. Dobijene vrednosti za K_a EL i ED su u saglasnosti sa vrednostima konstanti tipično dobijenim za polifenole (10^4 do $10^6 M^{-1}$) (Sinisi, 2015; Kamaran Khan, 2011; Pastukhov, 2007). Saglasnost postoji i sa vezivanjem genisteina, izoflavona iz soje, za koji je utvrđeno da se vezuje za odmašćeni HSA sa konstantom vezivanja $1.5 \times 10^5 M^{-1}$ (Mahesha, 2006). Takođe, određene su i konstante disocijacije kompleksa sa enterolignana sa AFP: za kompleks EL-AFP konstanta iznosi $1.7 \times 10^{-5} M$, a za ED-AFP $2.2 \times 10^{-5} M$ (Garreau, 1991). Martin i saradnici (1996) su ispitivali i vezivanje dijetarnih fitoestrogena za SBPr i pokazali inhibitorski efekat vezivanja fitoestrogena na vezivanje polnih hormona. Dobijene vrednosti za K_a EL i ED pokazuju da HSA može biti glavni molekul koji učestvuje u njihovom transportu. Osim toga, HSA je najzastupljeniji protein plazme sa koncentracijom od 0.6 mM,

odnosno mnogo zastupljeniji od proteina specijalizovanog za prenos estrogena, čija je koncentracija u nM opsegu.

Međutim, EL i ED se uglavnom nalaze i u formi glukuronida i sulfata u telesnim tečnostima (Xiao, 2012). Kako se reakcijama konjugacije ksenobiotika sa glukuronskom kiselinom i sulfatom obezbeđuje porast njihove rastvorljivosti u vodi i posledično, eliminacija, pretpostavljeno je da su EL i ED dominantno vezani za HSA u nekonjugovanom obliku. Stoga je u većini studija, koje su do sada urađene, ispitano vezivanje nativnih struktura polifenola za HSA. Ipak, pokazano je i da konjugati polifenola (glukuronidi i sulfati) cirkulišu vezani za albumin (Galland, 2008; Dufour, 2005). Za konjugate hidroksicinamičnih kiselina utvrđeno je da je afinitet vezivanja za albumin istog reda veličine kao i za aglikone (Galland, 2008). Pokazano je, takođe, da promene u afinitetu vezivanja konjugata kvercentin-sulfata zavise od mesta konjugacije (Defour, 2005). U skorašnjoj *in vitro* studiji pokazano je da β -glukurodinaza iz humanih neutrofila može da katalizuje hidrolizu konjugata glukuronida i da ih na taj način aktivira tokom inflamacije (Untergehrer, 2013).

Istovremeno vezivanje više različitih liganada za HSA može dovesti do promena u njihovim pojedinačno određenim afinitetima vezivanja. Ove promene mogu biti posledica konformacionih promena u molekulu proteina i/ili toga što se mesta vezivanja liganda preklapaju. Najviša vrednost K_a dobijena je za kompleks odmašćeni HSA-EL ($11.64 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), a najniža za kompleks S/HSA 4:1-ED (ED: $1.92 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, Tabela 22). Može se zaključiti da sa porastom odnosa S/HSA afinitet vezivanja EL i ED za HSA opada, i to za 2.7 (za S/HSA 1:1) i 4.8 (za S/HSA 4:1) puta za EL, odnosno 2.2 (za S/HSA 1:1) i 2.9 (za S/HSA 4:1) puta za ED, u odnosu na na afinitet vezivanja ovih enterolignana za odmašćeni HSA (Tabela 22).

Ako se analiziraju vrednosti dobijene za n, uočava se da su dobijene n vrednosti za EL više u odnosu na vrednosti dobijene za ED u svim slučajevima vezivanja ovih enterolignana za molekule HSA (odmašćeni, S/HSA 1:1 i 4:1). Takođe, se uočava da za oba enterolignana određene vrednosti n opadaju sa porastom broja vezanih molekula S za HSA (za EL od 0.896 na odmašćenom HSA do 0.578 na S/HSA 4:1 kompleksu i za ED od 0.818 na odmašćenom HSA do 0.507 na S/HSA 4:1 kompleksu).

Koperativne i kompetitivne interakcije između masnih kiselina i raznih klasa liganada uočene su u brojnim studijama (Bojko, 2008; Bojko, 2009; Vorum, 1996), ali nema mnogo

literaturnih podataka o uticaju masnih kiselina na vezivanje polifenola i fitoestrogena za HSA. Podaci o uticaju S na vezivanje resveratola za HSA znatno se razlikuju od dobijenih za vezivanje EL i ED u našim ispitivanjima. Tako su Pantusa i saradnici (2012) utvrdili da se konstanta vezivanja resveratola za HSA ne menja pri porastu molarnog odnosa S/HSA do 3:1 i 4:1, a da se značajno smanjuje pri molarnim odnosima S/HSA 5:1 i 6:1. Naši rezultati, dobijeni za K_a vrednosti HSA-enterolignan kompleksa, pokazuju da S menja afinitet vezivanja enterolignana za HSA (smanjujući vrednosti K_a za oko 2.5 puta), čak i pri odnosu S/HSA 1:1. Povećanje molarnog odnosa S/HSA do 4:1 (Tabela 22) dovodi do daljeg značajnog smanjenja afiniteta vezivanja enterolignana za HSA. Dobijeni rezultati bi mogli biti veoma važni sa fiziološkog aspekta: kako je pri normalnim fiziološkim uslovima 0.1 do 2 mol FFA vezano za HSA, a odnos FFA/HSA može se povećati čak na 6:1 u perifernoj cirkulaciji, tokom intenzivnog vežbanja, ili u drugim patološkim stanjima kao što je dijabetes, bolesti jetre i kardiovaskularna oboljenja (Turell, 2013;), porast sadržaja vezanih FFA za HSA u pobrojanim stanjima moglo bi da dovede do smanjenja frakcije vezanih enterolignana za HSA, pri čemu bi paralelno došlo do porasla frakcije slobodnih enterolignana u cirkulaciji, a to bi dovelo do promene farmakaokinetike i farmakodinamike datih enterolignana. Na ovaj način bi se mogao menjati njihov antioksidativni potencijal, što bi bilo od naročitog značaja u patološkim stanjima koja su praćena povećanjem oksidativnog stresa (dijabetes, bolestima bubrega).

Promene u afinitetu vezivanja ED i EL za HSA mogle bi biti posledica konformacionih promena HSA molekula indukovane od strane S, koje utiču na vezivanje liganada za HSA (Bojko, 2008; Bojko, 2009; Vorum, 1996). Takođe, smanjenje afiniteta vezivanja EL i ED za HSA u prisustvu S moglo bi biti posledica preklapanja dva glavna vezujuća mesta za egzogene supstance (mesto I i II) sa vezujućim mestima za FFA: vezujuće mesto I u subdomenu IIA preklapa se sa mestom 7 za masne kiseline, a vezujuće mesto II, locirano u subdomenu IIIA, preklapa se sa mestima 3 i 4 za masne kiseline.

Broj vezujućih mesta za enterolignane na odmašćenom HSA je oko 1 (Tabela 22). Vezivanje S za HSA (u odnosu 1:1) dovodi do izraženog smanjenja broja vezujućih mesta za EL i ED. Dalje povećanje broja vezanih molekula S po molekulu HSA (do odnosa 4:1) izaziva dalje smanjenje broja vezujućih mesta, ali je ovo smanjenje manje izraženo. EL i ED se za HSA vezuju na mestu vezivanja diazepama (rezultati su prikazani u sledećem odeljku 4.7.). Wong i saradnici

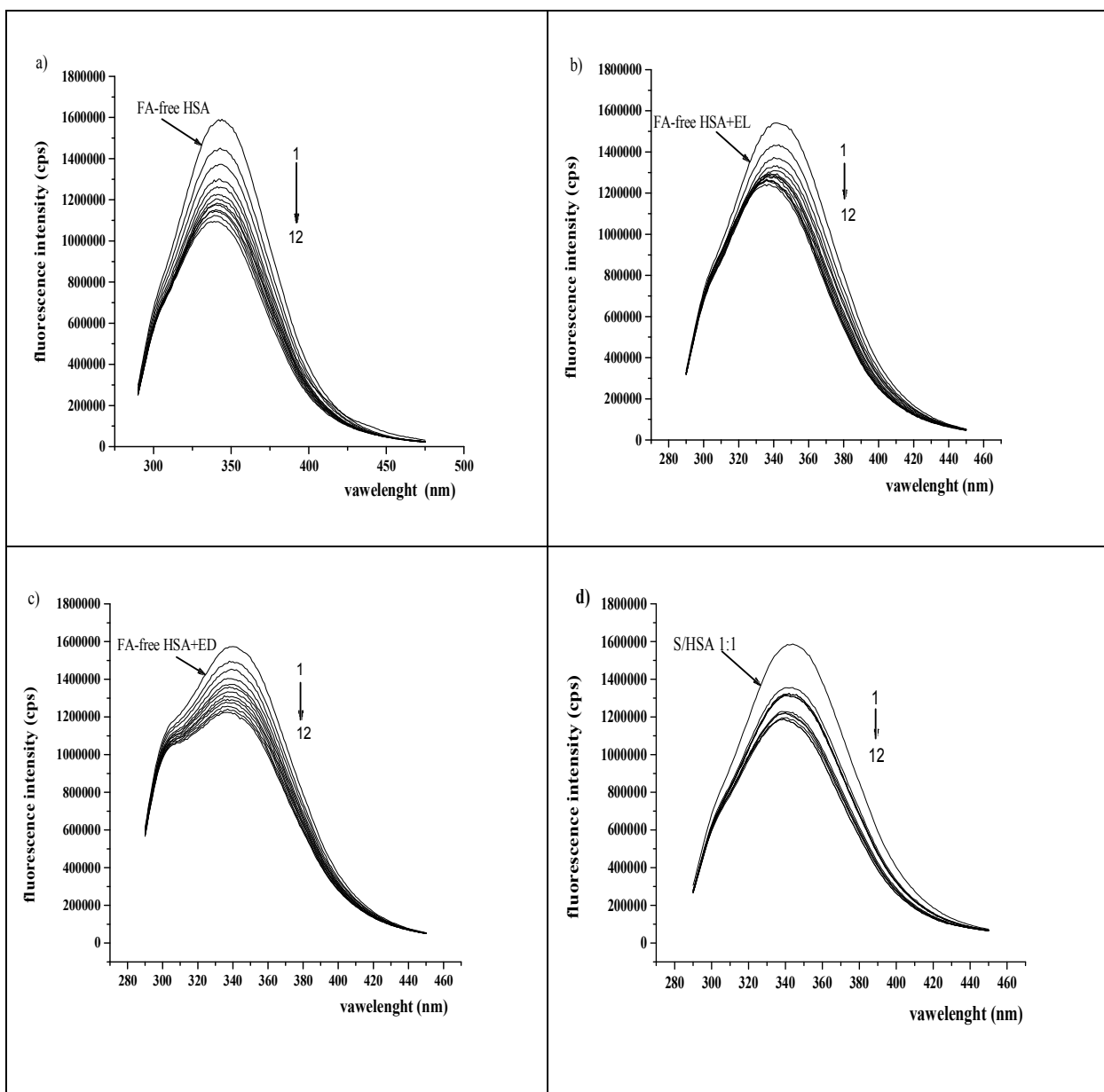
(1979) su pokazali da PA i OA utiču i na K_a i na vrednost n diazepama za HSA. Slično uočenom efektu ovih kiselina, vezivanje S za HSA bi moglo ispoljiti jednak uticaj na broj vezujućih mesta za EL i ED.

4.7. Mesta vezivanja EL i ED za HSA

HSA je molekul koji je uključen u transport brojnih endogenih (FFA, bilirubina, žučnih soli, steroidnih hormona, hematina, triptofana, tiroksina i nekih vitamina), nekoliko metalnih jona i različitih egzogenih supstanci (npr. polifenola i lekova). HSA ima 7 vezujućih mesta za dugolančane i masne kiseline srednje dužine lanca, čiji afiniteti se međusobno razlikuju, a koja su raspoređena u svih šest subdomena HSA molekula. Postoje takođe četiri vezujuća mesta za tiroksin, nekoliko mesta za vezivanje metala, uključujući i mesto na albuminu u blizini Cys34 HSA. Egzogeni ligandi se obično vezuju za jedno ili drugo glavno vezujuće mesto (subdomeni IIA i IIIA). Kao što je već bilo reči, glavna vezujuća mesta I i II se preklapaju sa mestima vezivanja masnih kiselina.

FE se vezuje za vezujuće mesto I u subdomenu IIA molekula BSA/HSA (Li, 2014; Jin, 2012). U okviru vezujućeg mesta II, u subdomenu IIIA, smeštena su dva mesta za vezivanje masnih kiselina (mesta 3 i 4), od kojih je jedno visoko-afinitetno (mesto 3). Masne kiseline bi, stoga, mogle ispoljiti veći uticaj na vezivanje liganada za mesto II. U Poglavlju 4.5.4. je pokazano da vezivanje S za HSA smanjuje efekat EL na reaktivnost tiolne grupe. Postavlja se pitanje da li se EL, odnosno ED, vezuje za HSA na mestu vezivanja II, u okviru subdomena IIIA.

Kako se kao stereotipičan ligand za vezujuće mesto II može koristiti diazepam (Ni, 2011), ispitivano je na koji način prethodno vezivanje EL i ED za HSA može da utiče na vezivanje diazepama za molekule HSA, tj. da li dolazi do promene K_a diazepama za HSA ako su prethodno vezana ova dva enterolignana. Kao model sistem za ispitivanje ovih efekata, enterolignana na vezivanje diazepama za HSA, korišćen je odmašćeni HSA, iz razloga da bi se izbegao istovremeni efekat vezivanja enterolignana i FFA. Kao referentni model u odnosu na ispitivani model uticaja enterolignana na vezivanje diazepama, uzet je odmašćeni HSA i S/HSA 1:1 kompleks. Merena je promene intenziteta fluorescencije Trp 214 prilikom vezivanja diazepama za odmašćeni HSA, S/HSA 1:1, i za komplekse odmašćeni HSA-EL i odmašćeni HSA-ED (Slika 47).



Slika 47. *Efekat vezivanja diazepama na intezitet fluorescencije odmašćenog HSA (a), odmašćenog HSA-EL (b), odmašćenog HSA-ED (c) i S/HSA 1:1 (d), na 25 °C i pH 7.4. Talasna dužina ekscitacije 280 nm, $C(\text{HSA}) = 0.5 \mu\text{M}$, koncentracija diazepama u opsegu od 0 do $1.5 \mu\text{M}$, uz porast od $0.125 \mu\text{M}$ (krive 1-12).*

U svim slučajevima dobijeno je da postepeni porast odnosa diazepama prema HSA od 0:1 do 3:1 ima za posledicu postepeno smanjenje intenziteta fluorescencije. Ako se posmatra pozicija maksimuma pika fluorescencije, uočava se pomeranje ka manjim talasnim dužinama (tkz. “blue shift”) i to pomeranje je naročito izraženo za kompleks odmašćeni HSA-EL za koji je dobijeno značajno pomeranje apsorpcionog maksimuma ka manjim talasnim dužinama (λ_{\max} od 340 do 336 nm) (Slika 47b), što ukazuje da bi ostatak Trp214 mogao biti lociran u hidrofobnijem okruženju posle zamene EL sa diazepamom.

Tabela 23. *Konstante vezivanja diazepama za odmašćeni HSA, komplekse odmašćeni HSA-EL, odmašćeni HSA-ED i S/HSA 1:1.*

Kompleks	$K_a \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
Diazepam +	
odmašćeni HSA	18.28
odmašćeni HSA-EL	2.68
odmašćeni HSA-ED	12.56
S/HSA 1:1	6.05

Da bi se olakšalo poređenje uticaja S, EL i ED na vezivanje diazepama za HSA, na osnovu smanjenja intenziteta fluorescencije izračunate su K_a (primenom jednačine 4, Materijal i metode, poglavlje 3.3.15) diazepama za odmašćeni HSA, komplekse odmašćeni HSA-EL, odmašćeni HSA-ED i S/HSA 1:1 (Tabela 23). Najveća vrednost K_a dobijena je pri vezivanju diazepama za odmašćeni HSA ($18.28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Vezivanje S ili enterolignana (EL ili ED) za odmašćeni HSA dovodi do značajnog smanjenja vrednosti K_a diazepama, u odnosu na dobijenu K_a za kompleks diazepam-odmašćeni HSA. Ako se posmatra efekat pojedinačnih liganada (S, EL ili ED) na K_a diazepama za HSA, može se uočiti da EL pokazuje najveći, a ED najmanji efekat. Vezivanje EL za HSA dovodi do smanjenja K_a diazepama za 6.8 puta, dok vezivanje ED za HSA dovodi do smanjenja K_a diazepama za samo 0.69 puta. Efekat koji vezivanje S za HSA pokazuje

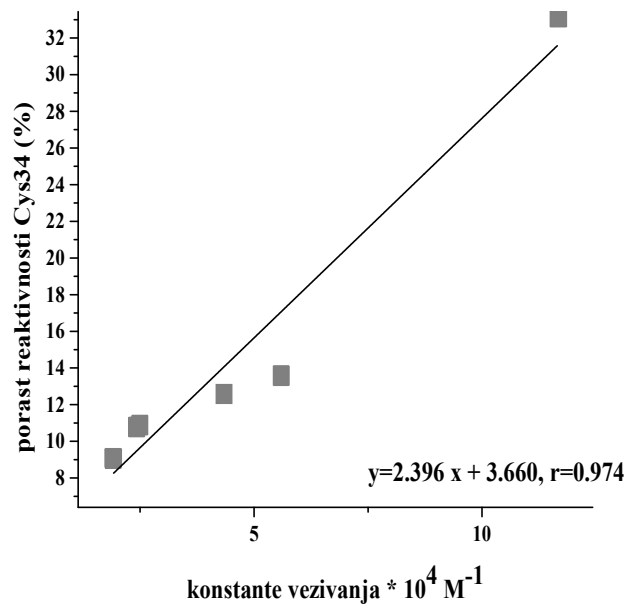
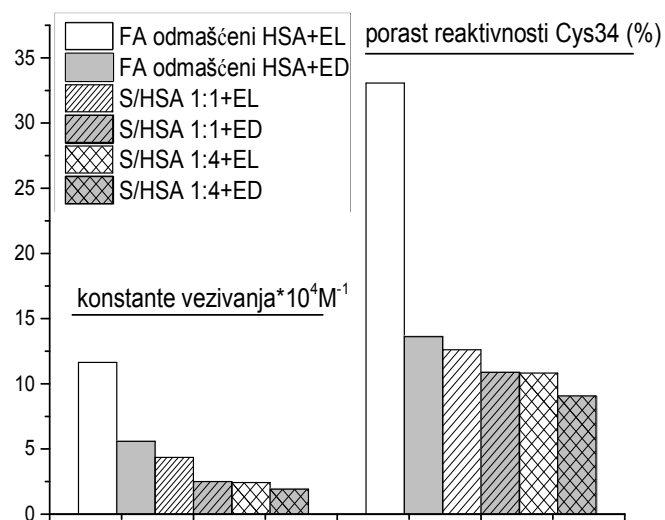
na vezivanje diazepama je između efekta ispitivanih enterolignana (EL i ED) (K_a se smanjuje za 3 puta).

Na osnovu dobijenih rezultata, i sličnosti struktura ispitivanih enterolignana može se zaključiti da se vezivno mesto na molekulu HSA za EL i ED, najverovatnije nalazi u okviru vezujućeg mesta II, tj. u subdomenu IIIA. Budući da je efekat EL na vezivanje diazepama izraženiji u odnosu na ED, moglo bi se zaključiti da je ovaj efekat posledica malih strukturnih razlika koja postoji između ovih molekula. Naime, kod EL je prisutan laktonski prsten, dok ED ima dve hidroksilne grupe koje mogu da učestvuju u formiranju vodoničnih veza između ED i bočnih aminokiselinskih ostataka HSA. U prilog navedenom literaturni podaci ukazuju da kod hidroksicinamičnih kiselina i samog molekula FE različiti tipovi interakcija učestvuju u vezivanju za HSA, kao i da vodonične veze igraju značajnu ulogu u interakcijama sa HSA i da to može značajno da utiče na K_a vrednosti kompleksa hidroksicainamična kiselina-HSA.

Kako se i visokoafinitetno mesto vezivanja masnih kiselina nalazi u IIIA subdomenu, može se zaključiti da su pri odnosu S/HSA 1:1 molekuli S vezani za ovo vezujuće mesto i dovode do uočenog smanjenja K_a diazepama za HSA. U svim ispitivanim kompleksima liganada (S, EL ili ED) sa HSA, uočava se postojanje kompeticije između vezivanja liganada i diazepama za isto vezujuće mesto. Postojanje kompeticije za isto vezujuće mesto može imati značajnu ulogu u patološkim stanjima u kojima se u terapiji koristi diazepam (npr. depresija), jer suplementacija ishrane namirnicama bogatim lignanima može da menja farmakokinetiku i farmakodinamiku diazepama, doprinoseći porastu slobodne frakcije ovog leka.

4. 8. Povezanost afiniteta vezivanja FE, EL i ED za HSA sa promenom reaktivnosti Cys34 tiolne grupe

Najveća vrednost konstante vezivanja (K_a) dobijena je za kompleks odmašćeni HSA-EL (Tabela 23), kao i najveći porast reaktivnosti Cys34 tiolne grupe pri vezivanju EL za odmašćeni HSA (Tabela 17).



Slika 48. Povezanost između vezujućih konstanti (K_a) i porasta reaktivnosti Cys34 tiolne grupe HSA (%) za komplekse EL i ED sa odmašćenim HSA, S/HSA 1:1, 4:1.

Ispitivanjem korelacije između vrednosti K_a kompleksa HSA-enterolignani (odmašćeni HSA-EL, odmašćeni HSA-ED, S/HSA 1:1-EL, S/HSA 1:1-ED, S/HSA 1:4-EL i S/HSA 1:4-ED) i porasta reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA, dobijena je visoka vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije ($r=0.974$, Slika 48). Ovi rezultati ukazuju da jačina interakcija između enterolignana (EL, ED) i HSA u subdomenu IIIA, i promena konformacije HSA indukovana ovim interakcijama, predstavlja značajan faktor koji utiče na porast reaktivnosti i Cys34 tiolne grupe.

Istovremeno, pokazano je da S utiče i na vezivanje FE, kao i na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA u FE-HSA kompleksima. Međutim, nije nađena linearna zavisnost između K_a i promena reaktivnosti Cys34 tiolne grupe HSA, kao u kompleksima EL i ED sa HSA. U kompleksu S/HSA 4:1-FE dolazi do pada reaktivnosti slobodne tiolne grupe u odnosu na S/HSA 4:1, ali je pokazano da se i vrsta interakcija u ovom kompleksu (na osnovu određivanja termodinamičkih parametara) veoma razlikuje u odnosu na komplekse odmašćeni HSA-FE, S/HSA 1:1-FE.

Uočene razlike za enterolignane i FE mogle bi biti posledica vezivanja za različita vezujuća mesta na molekulu HSA (EL i ED se vezuju za vezujuće mesto II, a FE za vezujuće mesto I). Polifenoli predstavljaju veliku, heterogenu grupu jedinjenja za koje postoje podaci o vezivanju za BSA/HSA i za većinu njih utvrđeno je da se vezuju u okviru vezujućeg mesta I (Pantusa, 2012; Ojha, 2012; Jin, 2010), kao i molekul FE. Nema literaturnih podataka o uticaju vezivanja liganada u okviru vezujućih mesta I i II na reaktivnost Cys34 tiolne grupe HSA. Rezultati naših ispitivanja pokazuju da bi vezivanje u okviru subdomena IIIA moglo imati veći uticaj na promenu okruženja i izloženost Cys34 tiolne grupe, a time i na porast njene reaktivnosti. S obzirom da rezultati pokazuju da vezivanje FE dovodi do različitih efekata na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA u zavisnosti od toga da li je i koliko molekula S vezano za HSA, neophodna su dalja ispitivanja uticaja vezivanja liganada za subdomen IIIA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe, posebno jer se i polifenoli uglavnom vezuju u ovom subdomenu. Takođe, važno je i rasvetliti povezanost vezivanja molekula za HSA (jačina interakcija, mesto vezivanja) i promena u reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA.

Zbog uloge HSA molekula u antioksidativnoj zaštiti veoma je značajno ispitati da li je moguće, u kolikoj meri i na koji način uticati ishranom npr. unosom namirnica bogatih polifenolima na antioksidativni potencijal HSA, tj. na reaktivnost slobodne tiolne grupe HSA. Kako u određenim patološkim stanjima raste odnos FFA/HSA, koji dovodi do porasta reaktivnosti tiolne grupe HSA, i to bi moglo predstavljati adaptivni mehanizam na povišen oksidativni stres, potrebno je ispitati i sinergistički uticaj FFA i polifenola na reaktivnost tiolne grupe HSA pri povećanju odnosa FFA/HSA.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja, dobijenih u okviru ove disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Lipidi semenki lana, susama i golice sadrže značajne količine esencijalnih masnih kiselina

Analizom masnokiselinskih profila ukupnih lipidnih ekstrakata semenki potvrđeno je da su semenke lana, susama i golice značajan dijetarni izvor polinezasićenih masnih kiselina (PUFA). Semenke lana bogate su sa α -linolenska kiselina (ALA) (50.38 ± 3.48 g/100 g ukupnih lipida, odnosno 22.377 ± 4.207 g/100 g semenki), dok je njen sadržaj u semenkama susama i golice nizak (0.38 ± 0.10 g/100 g lipida i 188 ± 37 mg/100 g semenki; 0.27 ± 0.13 g/100 g lipida i 109 ± 55 mg/100 g semenki, redom). Linolna kiselina (LA) predstavlja najzastupljeniju masnu kiselinu u semenkama susama (43.98 ± 0.30 g/100 g lipida i 22.106 ± 1.211 g/100 g semenki) i golice (43.28 ± 0.33 g/100 g lipida i 17.42 ± 0.770 g/100 g semenki).

2. Hladno-ceđena ulja sadrže lipofilne antioksidanse

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti hladno-ceđenih ulja rezultiralo je sledećim redosledom: rafinisano suncokretovo ulje > maslinovo ulje > ulje lana > ulje golice > ulje susama. Antioksidativna aktivnost ulja, određena DPPH testom, bila je u opsegu od 970 do 2000 μ mola TE/1000 g ulja. Antioksidativna aktivnost hidrofilne frakcije ulja bila je veoma niska, sem za hladno-ceđeno maslinovo ulje (30.03 mg TE/1000g ulja). Sadržaj hidrofilnih antioksidanasa u ostalim analiziranim hladno-ceđenim uljima bio je daleko manji od sadržaja lipofilnih (od 158 puta za hladno-ceđeno ulje susama, do 345 puta za rafinisano suncokretovo ulje). Dobijeni rezultati ukazuju da bi sadržaj polifenola u uljima mogao biti mali.

3. Pored lipofilnih antioksidanasa, metanolni ekstrakti obezmašćenih semenki (posebno lana) pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost

Za antioksidativne potencijale metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki lana susama i golice, koji su određeni DPPH i ABTS test-om, dobijen je sledeći redosled: lan>>susam>golica, koji odgovara redosledu sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima. Poređenje antioksidativne aktivnosti ulja i metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki pokazalo je da je antioksidativni kapacitet metanolnog ekstrakta lana veći od kapaciteta hladno-ceđenog ulja. U slučaju susama i

golice, hladno-cedena ulja pokazuju veći antioksidativni kapacitet u odnosu na ekstrakte obezmašćenih semenki.

4. Kod obolelih osoba sa hroničnom bubrežnom slabošću, na programu hemodijalize, suplementacija ishrane smešom semenki lan/susam/golica (3:1:1, maseni udeli), u trajanju od 12 nedelja, dovodi do značajnih promena, koje bi mogle voditi smanjenju rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja

Suplementacija ishrane bolesnika na programu hemodijalize dovela je do statistički značajnih promena parametara lipidnog statusa (TG, TC), glikoregulacije (glukoza, insulin, HOMA-IR), krvnog pritiska (DBP, SBP) i faktora inflamacije (TNF- α , hs-CRP, IL-6), kao i do poboljšanja vezanih za simptome pruritusa kod svih pacijenata. Sadržaj ukupnog holesterola smanjen je za 7 % ($p < 0.05$) u odnosu na početne vrednosti, a sadržaj triacilglicerola za 30 % ($p < 0.001$). Smanjenje krvnog pritiska, i to SBP za oko 11 mmHg i DBP za 6 mmHg, posle suplementacije, bilo je značajno na nivou $p < 0.01$. Postignuto je i statistički značajno smanjenje srednjih vrednosti sadržaja glukoze, insulina i parametra HOMA-IR (parametara glikoregulacije, $p < 0.05$), kao i faktora inflamacije (TNF- α , hs-CRP, IL-6, $p < 0.001$).

Zastupljenost zasićenih masnih kiselina (SFA) u fosfolipidima seruma je značajno smanjena ($p \leq 0.001$), dok je zastupljenost mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) i PUFA povećana ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.001$, redom). Nađene su statistički značajne negativne korelacije između n-3, kao i n-6 masnih kiselina, i ispitivanih faktora inflamacije. Istovremeno, pokazano je da postoji dobra korelacija indeksa nezasićenosti ("unsaturation") sa faktorima inflamacije (-0,410 do -0,477, $p < 0,001$).

5. Promene u masnokiselinskim profilima pacijenata (na program hemodijalize) tokom suplementacije, mogle bi biti posledica promena u njihovom antioksidativnom statusu

Masnokiselinski profil fosfolipida seruma predstavlja validan biohemijski marker dijetarnog unosa masnih kiselina. Kako je smeša semenki lan/susam/golica (3:1:1) značajan dijetarni izvor oleinske kiseline (OA), LA i ALA, postignute su promene u zastupljenosti OA, ukupnih n-6 i n-3 masnih kiselina. Sadržaj dugolančanih n-6 i n-3 masnih kiselina značajno je povećan delovanjem elongaza i desaturaza, iako na osnovu izračunatih indeksa aktivnosti desaturaza nije nađena značajna razlika u njihovim aktivnostima na kraju u odnosu na početak

studije. Literaturni podaci govore o ograničenoj mogućnosti prevođenja ALA u eikozapentaenska kiselina (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA). Međutim, kod ispitivanih pacijenata na hemodijalizi došlo je do značajnog ($p \leq 0.01$) porasta zastupljenosti DHA u fosfolipidima seruma. Kako zastupljenost PUFA predstavlja i indirektni parametar antioksidativnog statusa, promene u zastupljenosti DHA mogu da budu i posledica promena u antioksidativnom statusu.

6. Potvrđeno je da vezivanje stearinske kiseline (S) za humani serum-albumin (HSA) povećava reaktivnost Cys34 tiolne grupe

Dobijene vrednosti konstanti brzine reakcije pseudo-prvog reda (k') za reakciju tiolne grupe Cys34, odmašćenog HSA i kompleksa HSA sa S (S/HSA 1:1, S/HSA 2:1 i S/HSA 4:1), i DTNB-a: $8.9 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $11.6 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $12.39 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, i $15.3 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom, potvrdile su da vezivanje S za HSA dovodi do značajnog povećanja (za 30.3 %, 39.2 % i 71.9 % u odnosu na odmašćeni HSA, redom) reaktivnosti slobodne tiolne grupe HSA.

7. Sastojci metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki utiču na reaktivnost Cys34 grupe HSA i ovaj efekat nije posredovan masnim kiselinama, koje su prisutne u značajnim količinama u metanolnim ekstraktima

Inkubiranje kompleksa S/HSA (2:1) sa metanolnim ekstraktima (0.5 mg/ mL) ispitivanih semenki (lan, susam, golica) dovodi do porasta k' HSA-Cys34 tiolne grupe sa DTNB-om za 4.8 do 16.5 %, u odnosu na sam S/HSA 2:1. Efekat sastojaka metanolnih ekstrakata obezmašćenih semenki na porast reaktivnosti HSA-SH ispoljava se prema sledećem redosledu: golica < susam << lan i ovaj redosled odgovara porastu sadržaja polifenola u ekstraktima semenki. Sa druge strane, povećanje reaktivnosti tiolne grupe obezmašćenog HSA (od 9.0 do 21.3%) u prisustvu sastojaka metanolnih ekstrakata semenki odvija se u redosledu: susam < lan < golica. Efekat ekstrakta golice na povećanje reaktivnosti tiolne grupe mnogo je veći (za +21.3 %) u slučaju odmašćenog HSA u odnosu na kompleks S/HSA 2:1 (+4.8 %). Time je dokazano da vezivanje S za HSA utiče kompetitivno na efekat sastojaka metanolnih ekstrakata golice na reaktivnost HSA-SH grupe. Rezultati, takođe, ukazuju da bi i neke druge komponente metanolnih ekstrakata ispitivanih semenki mogle uticati na utvrđene promene u k' (reaktivnosti) tiolne grupe sa DTNB-om, a ne masne kiseline.

8. Vezivanje ferulinske kiseline (FE) za HSA ispoljava blage efekte na reaktivnost slobodne tiolne grupe

Vezivanjem FE za odmašćeni i S zamašćeni HSA ispoljava blage, ali različite efekte na reaktivnost tiolne grupe. Pri vezivanju FE za odmašćeni HSA (čija je vrednost $k' = 8.9 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) reaktivnost tiolne grupe raste za 7.9 % ($k' = 9.6 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), dok vezivanje za S/HSA 1:1 ne dovodi do promene k' ($k' = 11.6 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $11.5 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom), a vezivanje za S/HSA 4:1 dovodi do smanjenja njene vrednosti za 3.9 % ($15.3 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $14.7 \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom). Efekat FE na reaktivnost tiolne grupe zavisi od molarnog odnosa vezanih masnih kiselina za HSA.

9. Interakcije enterolignana sa HSA povećavaju k' HSA-Cys 34 tiolne grupe sa DTNB-om, a vezivanje S za HSA smanjuje efekat enterolignana na reaktivnost

Vrednosti k' (reaktivnost) HSA-Cys 34 tiolne grupe, posle vezivanja enterolignana (enterolaktona-EL i enterodiola-ED), u svim kompleksima sa HSA (sa i bez masnih kiselina) su povećane. Najizraženiji efekat (povećanje reaktivnosti za 33.1 %) dobijen je za kompleks odmašćeni HSA-EL, koji je pokazao sličnu reaktivnost tiolne grupe kao kompleks S/HSA 1:1 (vrednost $k' = 11.8 \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, naspram $11.6 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, redom). Vezivanje enterolignana za kompleks S/HSA 1:1 dovodi do dodatnog povećanja reaktivnosti, ali je ono manje izraženo (za oko 11 %). Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost modulacije reaktivnosti (antioksidativnog potencijala) HSA-SH fenolnim jedinjenjima, odnosno dijetarnim unosom hrane bogate lignanima pri suplementaciji ishrane. Sa druge strane, u nekim fiziološkim i patološkim stanjima, kod kojih je povećana serumska koncentracija ne-esterifikovanih masnih kiselina, očekuje se da bi one mogle uticati na efekat enterolignana/lignana unetih namirnicama.

10. Pri vezivanju FE za kompleks S/HSA (4:1) dolazi do značajnih promena u načinu i afinitetu vezivanja

Dobijeni rezultati, koji govore o statičkom mehanizmu gašenja fluorescence HSA, usled interakcija sa FE (na osnovu k_q i temperaturne zavisnosti vrednosti K_{sv} konstanti), su u saglasnosti sa literaturnim podacima. Najveća vrednost konstante vezivanja FE za HSA dobijena je za kompleks S/HSA 4:1-FE, na temperaturi od 37 °C ($12.32 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Ova vrednost je oko 2 puta veća u odnosu na konstantu vezivanja FE za odmašćeni HSA i 2.5 puta veća u odnosu na

konstantu za S/HSA 1:1 (na 37 °C). Na 25 °C vezivanje FE je bilo najjače u kompleksu S/HSA 1:1, ali razlike u odnosu na komplekse FE sa odmašćenim HSA i S/HSA 4:1 nisu bile tako izražene kao na temperaturi od 37 °C. Na osnovu izračunatih promena vrednosti termodinamičkih parametara pokazano je da su u kompleksima odmašćeni HSA-FE i S/HSA 1:1-FE Van Der Waalsove i vodonične interakcije dominantne, dok su u kompleksu S/HSA 4:1-FE to hidrofobne sile.

11. EL i ED se vezuju umerenim afinitetom za vezujuće mesto II u subdomenu IIIA HSA, pri čemu prisustvo S dovodi do smanjenja intenziteta interakcija u kompleksima HSA-enterolignani

Vrednosti konstanti vezivanja enterolignana za odmašćeni HSA, S/HSA 1:1 i S/HSA 4:1 nalaze se u opsegu od 1.92 do $11.64 \times 10^4 \text{M}^{-1}$, što pokazuje da je afinitet vezivanja EL i ED za HSA umerene jačine. Ovim se obezbeđuje da se molekuli enterolignana mogu transportovati vezani za HSA, ali i da u cirkulaciji budu dostupni u slobodnoj formi (da bi ostvarili svoj npr. antioksidativni efekat). Između vrednosti konstanti vezivanja enterolignana (EL, ED) za HSA i porasta reaktivnosti slobodne tiolne grupe utvrđena je visoka pozitivna korelacija ($r=0.974$). Time je dokazano da jačina interakcija između enterolignana (EL, ED) i HSA u subdomenu IIIA, i promena konformacije HSA indukovana ovim interakcijama, predstavlja značajan faktor koji utiče na porast reaktivnosti Cys34 tiolne grupe.

Razlike u efektu vezivanja FE i enterolignana za HSA na reaktivnost Cys34 tiolne grupe mogu biti posledica njihovog vezivanja za različita mesta na molekulu HSA.

6. LITERATURA

- Adlercreutz H**, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.* 1997; 29: 95-120
- Adams GG**, Imran S, Wang S, *et al.* The hypoglycemic effect of pumpkin seeds, trigonelline, nicotinic acid and D-chiro-inositol in controlling glycemic levels in diabetes mellitus. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014; 54: 1322-1329
- Alvarez B**, Ferrer-Sueta G, Freeman BA *et al.* Kinetics of peroxyxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 842-848
- Akimoto K**, Kitagawa Y, Akamatsu T, *et al.* Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents. *Ann. Nutr. Metab.* 1993; 37: 218-224
- Allain CC**, Poon LS, Chan CS, *et al.* Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 1974; 20: 470-475
- Anraku M**, Chuang VT, Maruyama T, *et al.* Redox properties of serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830: 5465-5472
- Anwar F**, Przybylski R. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2012; 11: 293-301
- Barthet V**, Klensporf-Pawlik D, Przybylski R. Antioxidant activity of flaxseed meal components. *Can. J. Plant Sci.* 2014; 94: 593-602
- Bannwart C**, Adlercreutz H, Fotsis T, *et al.* Identification of O-desmethylnangolensin, one likely plant precursor of the animal lignan enterolactone, in human urine. *Finn. Chem. Lett.* 1984; 4-5: 120-125
- Ben Othman S**, Katsuno N, Kanamaru Y, *et al.* Water-soluble extracts from defatted sesame seed flour show antioxidant activity in vitro. *Food Chem.* 2015; 175: 306-314
- Bhattacharya A**, Grune T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2000; 303: 721-732
- Bi S**, Ding L, Tian Y, *et al.* Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J. Mol. Struct.* 2004; 703: 37-45
- Bojko B**, Sulkowska A, Maciazek-Jurczyk M, *et al.* Investigations of acetaminophen binding to BSA in the presence of fatty acid: Fluorescence and ¹H NMR studies. *J. Mol. Struct.* 2009; 924-926: 332-337
- Bojko B**, Sulkowska A, Maciazek M, *et al.* Changes of serum albumin affinity for aspirin induced by fatty acid. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008; 42: 314-323
- Brand-Williams W**, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology.* 1995; 28: 25-30
- Brenna JT**. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2002; 5:127-132
- Brodersen R**, Andersen S, Vorum H, *et al.* Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur. J. Biochem.* 1990; 189: 343-349
- Bulaj G**, Kortemme T, Goldenberg DP. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry.* 1998; 37: 8965-8972
- Burdge G**, Jones A, Wootton SA. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *Br. J. Nutr.* 2002; 88: 355-363
- Burdge GC**, Wootton SA. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br. J. Nutr.* 2002a; 88: 411-420
- Buttar D**, Colclough N, Gerhardt S, *et al.* A combined spectroscopic and crystallographic approach to probing drug-human serum albumin interactions. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18: 7486-7496

- Carballal S**, Radi R, Kirk MC, *et al.* Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*. 2003; 42: 9906-9914 23.
- Carter DC**, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv. Protein. Chem.* 1994; 45: 153-203
- Chen RF**. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* 1967; 242: 173-181 25.
- Christopherson SW**, Glass RL. Preparation of Milk Fat Methyl Esters by Alcoholysis in an Essentially Nonalcoholic Solution. *J. Dairy Sci.* 1969; 52: 1289-1290
- Clerici M**, Colombo G, Secundo F *et al.* Cigarette smoke induces alterations in the drug-binding properties of human serum albumin. *Blood Cells Mol. Dis.* 2014; 52: 166-174
- Coombes JS**, Fasset RG. Antioxidant therapy in hemodialysis patients: a systematic review. *Kidney International*. 2012; 81: 233-246
- Cooney RV**, Custer LJ, Okinaka L, *et al.* Effects of dietary sesame seeds on plasma tocopherol levels. *Nutr. Cancer*. 2001; 39: 66-71
- Cornish SM**, Chilibeck PD. Alpha-linolenic acid supplementation and resistance training in older adults. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009; 34: 49-59
- Cunnane S**, Ganguli S, Menard C, *et al.* High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br. J. Nutr.* 1993; 69: 443-453
- Curry S**, Brick P, Franks N. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1441: 131-140
- Dabrowski K**, Sosulski FW. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* 1984; 32: 128-130
- Dabrowski K**, Sosulski FW. Quantitation of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1984; 32: 123-127
- Dai J**, Mumper R. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; 15: 7313-7352
- Dasgupta A**, Kenny MA, Ahmad S. Abnormal fatty acid profile in chronic hemodialysis patients: possible deficiency of essential fatty acids. *Clin. Physiol. Biochem.* 1990; 8: 238-243
- Dessi M**, Noce A, Bertucci P, *et al.* Plasma and erythrocyte membrane phospholipids and fatty acids in Italian general population and hemodialysis patients. *Lipids Health Dis.* 2014; 13: 54-63
- Dewanto V**, Wu X, Adom KK, *et al.* Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3010-3014
- Dubois V**, Breton S, Linder M, *et al.* Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2007; 109: 710-732
- Dufour C**, Dangles O. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1721: 164-173
- Dyerberg J**. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.* 1986; 44: 125-134
- El-Mosallamy AE**, Sleem AA, Abdel-Salam OM, *et al.* Antihypertensive and cardioprotective effects of pumpkin seed oil. *J. Med. Food.* 2012; 15: 180-189
- Espín JC**, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using DPPH. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 648-656
- Eurodiet**: Eurodiet core report: European dietary guidelines, 2000. <http://eurodiet.med.uoc.gr/eurodietcorereport.pdf> (accessed 1 October 2008)

- Fakhrzadeh H**, Ghaderpanahi M, Sharifi F, *et al.* The effects of low dose n-3 fatty acids on serum lipid profiles and insulin resistance of the elderly: a randomized controlled clinical trial. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2010; 80: 107–116
- FAO**, Fats and Oils in Human Nutrition, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, FAO, Rome, 1994
- Folch J**, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509
- Friedewald WT**, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18: 499-502
- Friedman A**, Moe S. Review of the effects of omega-3 supplementation in dialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 1: 182-192
- Friedman AN**, Fadem SZ. Reassessment of albumin as a nutritional marker in kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 223-230
- Frische EJ**, Hutchins AM, Martini MC, *et al.* Effect of flaxseed and wheat bran on serum hormones and lignan excretion in premenopausal women. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003; 22: 550-554
- Gaafar AA**, Salama ZA, Askar MS, *et al.* In vitro antioxidant and antimicrobial activities of lignan flax seed extract (*Linum usitatissimum*, L.). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2013; 23: 291-297
- Galland S**, Rakotomanomana N, Dufour C, *et al.* Synthesis of hydroxycinnamic acid glucuronides and investigation of their affinity for human serum albumin. *Org. Biomol. Chem.* 2008; 6: 4253-4260
- Garreau B**, Vallette G, Adlercreutz H, *et al.* Phytoestrogens: new ligands for rat and human alpha-fetoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1094: 339-345
- Ghuman J**, Zunszain PA, Petitpas I, *et al.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2005; 353: 38-52
- Gysin R**, Azzi A, Visarius T. γ -Tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J.* 2002; 16: 1952-1954
- Haghighian MK**, Alipoor B, Sadat BE, *et al.* Effects of Sesame Seed Supplementation on Lipid Profile and Oxidative Stress Biomarkers in Patients with Knee Osteoarthritis. *Health Promot. Perspect.* 2014; 4: 90–97
- Hamilton JA**. NMR reveals molecular interactions and dynamics of fatty acid binding to albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1830: 5418-5426
- Harper CR**, Jacobson TA. Managing dyslipidemia in chronic kidney disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51: 2375-2384
- Harth S**, Dreyfus H, Urban PF, *et al.* Direct thin layer chromatography of gangliosides of a total lipid extract. *Anal. Biochem.* 1978; 86: 543-551
- He T**, Liang Q, Luo T, *et al.* Study on Interactions of Phenolic Acid-Like Drug Candidates with BSA by Capillary Electrophoresis and Fluorescence Spectroscopy. *J. Solution Chem.* 2010; 39: 1653-1664
- He K**, Liu K, Daviglius ML, *et al.* Associations of Dietary Long-Chain n-3 PUFA and Fish with Biomarkers of Inflammation and Endothelial Activation. *Am. J. Cardiol.* 2009; 103: 1238–1243
- Hedelin M**, Klint A, Chang ET, *et al.* Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer: the cancer prostate Sweden study. *Cancer Causes Control.* 2006; 17: 169–180
- Hirose N**, Inoue T, Nishihara K, *et al.* Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. *J. Lipid Res.* 1991; 32: 629-638

- Høstmark AT.** Serum fatty acid/albumin molar ratio and the risk of diseases. *Med. Hypotheses.* 1995; 44: 539-541
- Ide T, Azechi A, Kitade S, et al.** Combined effect of sesamin and α -lipoic acid on hepatic fatty acid metabolism in rats. *Eur. J. Nutr.* 2013; 52: 1015-1027
- Igarashi M, Ma K, Chang L, et al.** Rat heart cannot synthesize docosahexaenoic acid from circulating α -linolenic acid because it lacks elongase-2. *J. Lipid Res.* 2008; 49: 1735-1745
- ISSFAL 2004,** Report of the Sub-Committee on Recommendations for the Intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Healthy Adults, The Sixth International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Brighton, 2004, <http://www.issfal.org.uk/pdfs/>
- Iwao Y, Anraku M, Hiraike M, et al.** The structural and pharmacokinetic properties of oxidized HSA, advanced oxidation protein products. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2006; 21: 140-146
- Jannat B, Reza Oveisi M, Sadeghi N, et al.** Effect of roasting process on total phenolic compounds and γ -tocopherol content in Iranian sesame seeds (*Sesamum indicum*). *Iran. J. Pharm. Res.* 2013; 12: 751-758
- Jiang Q, Ames BN.** Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J.* 2003; 17: 816-822
- Jin XL, Wei X, Qi FM, et al.** Characterization of hydroxycinnamic acid derivatives binding to BSA. *Org. Biomol. Chem.* 2012; 10: 3424-3431
- Jovanovic V, Pavicevic I, Takic M, et al.** The influence of fatty acids on determination of human serum albumin thiol group. *Anal. Biochem.* 2014; 448: 50-57
- Kamran Khan M, Rakotomanomana N, Dufour C, et al.** Binding of citrus flavanones and their glucuronides and chalcones to human serum albumin. *Food Funct.* 2011; 2: 617-626
- Kang J, Liu Y, Xie MX, et al.** Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1674: 205-214
- Kardum N, Takić M, Šavikin K, et al.** Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J. Funct. Foods.* 2014; 9: 89-97
- KhalatbariSoltani S, Jamaluddin R, Tabibi H, et al.** Effects of flaxseed consumption on systemic inflammation and serum lipid profile in hemodialysis patients with lipid abnormalities. *Hemodial. Int.* 2013; 17: 275-281
- Kim D, Lee K, Lee H, et al.** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3713-3717
- Kim D, Chun O, Kim Y, et al.** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh Plums. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 6509-6515
- Kitts DD, Yuan YV, Wiewickreme AN, et al.** Antioxidant activity of the flaxseed lignin SDG and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol. Cell Biochem.* 1999; 202: 91-100
- Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M.** Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. *LWT- Food Sci. Technol.* 2010; 43: 1379-1386
- Koorts AM, Viljoen M, Kruger MC.** Red blood cell fatty acid profile of chronic renal failure patients receiving maintenance hemodialysis treatment. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2002; 67:13-18
- Kragh-Hansen U.** Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol. Rev.* 1981; 33: 17-53
- Kuijsten A, Arts I, Vree T, et al.** Pharmacokinetics of enterolignans in healthy men and women consuming a single dose of secoisolariciresinoldiglucoside. *J. Nutr.* 2005; 135: 795-801

- Lakovicz JR.** Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, New York, 2006
- Lemos JR,** Alencastro MG, Konrath AV, *et al.* Flaxseed oil supplementation decreases C-reactive protein levels in chronic hemodialysis patients. *Nutr. Res.* 2012; 32: 921-927
- Li Q,** Yang W, Qu L, *et al.* Interaction of Warfarin with Human Serum Albumin and Effect of Ferulic Acid on the Binding. *J. Spectroscopy.* 2014; Volume 2014, Article ID 834501, 7 pages
- Li S,** Huang K, Zhong M, *et al.* Comparative studies on the interaction of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A.* 2010; 77: 680-686
- Li X,** Wang S. Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. *New J. Chem.* 2015; 39: 386-395
- Liang YT,** Chen J, Jiao R, *et al.* Cholesterol-Lowering Activity of sesamin is associated with down-regulation on genes of sterol transporters involved in cholesterol absorption. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 2963-2969
- Lopes Virela MF,** Stone P, Ellis S, *et al.* Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem.* 1977; 23: 882-884
- Lucas EA,** Wild RD, Hammond LJ, *et al.* Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 1527-1532
- Lungershausen YK,** Abbey M, Nestel PJ, *et al.* Reduction of blood pressure and plasma triglycerides by omega-3 fatty acids in treated hypertensives. *J. Hypertens.* 1994; 12: 1041-1045
- Mahesha H,** Singh S, Srinivasan N, *et al.* A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. *FEBS J.* 2006; 273: 451-467
- Mak RH.** Impact of end-stage renal disease and dialysis on glycemic control. *Semin. Dial.* 2000; 13: 4-8
- Mandasescu S,** Mocanu V, Dascalita AM, *et al.* Flaxseed supplementation in hyperlipidemic patients. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 2005; 109: 502-506
- Makni M,** Sefi M, Fetoui H, *et al.* Flax and pumpkin seeds mixture ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2010; 48: 2407-2412
- Martin M,** Haourigui M, Pelissero C, *et al.* Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. *Life Sci.* 1996; 58: 429-436
- Matthews DR,** Hosker JP, Rudenski AS, *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28: 412-19
- McGowan M,** Artiss J, Strandberght D, *et al.* A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 1983; 29: 538-542
- McManus RM,** Jumpson J, Finegood DT *et al.* A comparison of the effects of n-3 fatty acids from linseed oil and fish oil in well-controlled type II diabetes. *Diabetes Care.* 1996; 19: 463-467
- Miyawaki T,** Aono H, Toyoda-Ono Y, *et al.* Antihypertensive effects of sesamin in humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 2009; 55: 87-91
- Morgan C,** Lazarow A. Immunoassay of insulin; two antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes* 1963; 12: 115-121
- Mpagi J,** Rainer R, Steinhart H, *et al.* Hyperreactive onchocerciasis exhibits reduction of arachidonate and linoleate levels in serum triglycerides. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 62: 705-710

- Myung SK**, Ju W, Cho B, *et al.* Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2013; 346: f10
- Nawirska-Olszańska A**, Kita A, Biesiada A, *et al.* Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chem.* 2013; 139: 155-161
- Ni Y**, Zhu R, Kokot S. Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA. *Analyst.* 2011; 136: 4794-4801
- Oberg BP**, McMenamin E, Lucas FL, *et al.* Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004; 65: 1009–1016
- Ogasawara Y**, Mukai Y, Togawa T, *et al.* Determination of plasma thiol bound to albumin using affinity chromatography and HPLC with fluorescence detection: ratio of cysteinyl albumin as a possible biomarker of oxidative stress. *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 845: 157-163
- Ogata F**, Takahashi S, Imai K, *et al.* The increase of plasma free fatty acids during a single hemodialysis with heparin and its hazardous effects on the blood components in vitro. *J. Jap. Soc. Dialysis Therapy.* 1984; 17: 353-357
- Pantusa M**, Sportelli L, Bartucci R. Influence of stearic acids on resveratrol-HSA interaction. *Eur. Biophys. J.* 2012; 41: 969-977
- Paschos GK**, Magkos F, Panagiotakos DB, *et al.* Dietary supplementation with flaxseed oil lowers blood pressure in dyslipidaemic patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2007; 61: 1201–1206
- Park SK**, Page GP, Kim K, *et al.* Alpha- and gamma-tocopherol prevent age-related transcriptional alterations in the heart and brain of mice. *J. Nutr.* 2008; 138: 1010-1018
- Park WJ**, Kothapalli K, Lawrence P, *et al.* An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *J. Lipid Res.* 2009; 50: 1195-1202
- Pastukhov AV**, Levchenko LA, Sadkov AP. Spectroscopic study on binding of rutin to human serum albumin. *J. Mol. Struct.* 2007; 842: 60-66
- Pathak N**, Rai AK, Kumari R, *et al.* Value addition in sesame: A perspective on bioactive components for enhancing utility and profitability. *Pharmacogn. Rev.* 2014; 8: 147–155
- Pavićević I**, Jovanović V, Takić M, *et al.* Fatty acids binding to human serum albumin: changes of reactivity and glycation level of Cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal. *Chem. Bio. Inter.* 2014; 224: 42-50
- Peck LW**, Monsen ER, Ahmad S. Effect of three sources of long-chain fatty acids on the plasma fatty acid profile, plasma prostaglandin E2 concentrations, and pruritus symptoms in hemodialysis patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 64: 210-214
- Peterson J**, Dwyer J, Adlercreutz H, *et al.* Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 2010; 68: 571-603
- Petitpas I**, Grüne T, Bhattacharya AA, *et al.* Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Mol. Biol.* 2001; 314: 955-960
- Pietinen P**, Stumpf K, Männistö S, *et al.* Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in eastern Finland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001; 10: 339–344
- Pirisi F**, Angioni A, Cabras P, *et al.* Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by HPLC under isocratic elution. *J. Chromatogr. A.* 1997; 768: 207-213

- Poudyal H**, Panchal S, Diwan V, *et al.* Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog. Lipid Res.* 2011; 50: 372–387
- Powers SK**, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 1243-1276
- Prasad K.** Antioxidant activity of secoisolariciresinoldiglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *Int. J. Angiol.* 2000; 9: 220-225
- Prevc T**, Segatin N, Ulrih NP, *et al.* DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta.* 2013; 109: 13-9
- Quinlan GJ**, Margaron MP, Mumby S, *et al.* Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion. *Clin. Sci. (Lond).* 1998; 95: 459-465
- Rabrenovic B**, Dimić E, Novaković M, *et al.* The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT - Food Sci. Techn.* 2014; 55: 521-527
- Raja G**, Anand Shaker I Evaluation of oxidative stress indices and antioxidant levels in pre and post hemodialysis patients. *Int. J. Pharm. Sci.* 2013; 4: 760-767
- Rhee Y**, Brunt A. Flaxseed supplementation improved insulin resistance in obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. *Nutr. J.* 2011; 10: 44-51
- Ristić-Medić D**, Vučić V, Takić M, *et al.* Polyunsaturated fatty acids in health and disease. *J. Serb. Chem. Soc.* 2013; 78: 1269-1289
- Ristić V**, Tepšić V, Ristić-Medić D, *et al.* Plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid composition in Serbian hemodialyzed patients. *Renal Failure* 2006; 28: 211-216
- Ristić V**: Uticaj diezepama i alkohola na lipide krvne plazme i jetre kod pacova. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, 1991; 3-35
- Robinson H**, Hogden C. The Biuret reaction in the determination of serum protein. *J. Biol. Chem.* 1940; 135: 707-725
- Roche M**, Rondeau P, Singh NR, *et al.* The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582: 1783-1787
- Rodriguez-Leyva D**, Weighell W, Edel AL *et al.* Potent antihypertensive action of dietary flaxseed in hypertensive patients. *Hypertension.* 2013; 62: 1081-1089
- Sakka D**, Karantonis H. In vitro health beneficial of pumpkin seeds from *Cucurbita moshata* cultivated in Lemnos. *Int. J. Food Studies.* 2015; 4: 221-237
- Sankar D**, Rao MR, Sambandam G, *et al.* A pilot study of open label sesame oil in hypertensive diabetics. *J. Med. Food.* 2006; 9: 408-412
- Sedigheh A**, Jamal MS, Mahbubeh S, *et al.* Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) on alloxan-induced diabetic rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 23: 2620-2626
- Sener A**, Zhang Y, Bulur N, *et al.* The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. II. Body weight, adipose tissue mass and glycemic homeostasis. *Int. J. Mol. Med.* 2009; 24: 125–129
- Shimizu S**, Akimoto K, Shinmen Y *et al.* Sesamin is a potent and specific inhibitor of delta 5 desaturase in polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids.* 1991; 26: 512-516
- Sicilia T**, Niemeyer HB, Honig DM, *et al.* Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 1181-1188
- Simard JR**, Zunszain PA, Hamilton JA, *et al.* Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J. Mol. Biol.* 2006, 361: 336-351

- Sinisi V**, Fortzato C, Cefarin N, *et al.* Interaction of chlorogenic acids and quinides from coffee with human serum albumin. *Food Chemistry*. 2015; 168: 332-340
- Singleton VL**, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enology Viticulture* 1965; 16: 144-158
- Soejima A**, Matsuzawa N, Miyake N, *et al.* Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* 1999; 51: 92-97
- Spittle MA**, Hoenich NA, Handelsman GJ, *et al.* Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2001; 38: 1408-1413
- Stewart AJ**, Blindauer CA, Berezenko S, *et al.* Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *FEBS J.* 2005; 272: 353-362
- STING** report: collection of graphic and tabular sequence structure and function descriptors for an individual amino acid of PDB structures, *Nucleic Acids Res.* 1 (33 Database Issue) (2005) D269–D274.
- Sugio S**, Kashima A, Mochizuki S, *et al.* Crystal structure of HSA at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* 1999; 12: 439-446
- Taccone-Gallucci M**, Noce A, Bertucci P, *et al.* Chronic treatment with statins increases the availability of Se in the antioxidant defence systems of hemodialysis patients. *J. Trace Elem, Med. Biol.* 2010; 24: 27-30
- Taverna M**, Marie AI, Mira JP, *et al.* Specific antioxidant properties of HSA. *Ann. Intensive Care.* 2013; 3: 4-11
- Tayyebi Khosroshahi H**, Houshyar J, Tabrizi A, *et al.* Effect of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. *Iran J. Kidney Dis.* 2010; 4: 322–326
- Terawaki H**, Nakayama K, Matduyama Y, *et al.* Dialyzable Uremic Solutes Contribute to Enhanced Oxidation of Serum Albumin in Regular Hemodialysis Patients. *Blood Purif.* 2007; 25: 274–279
- Terashima Y**, Hamazaki K, Itomura M, *et al.* Inverse association between docosahexaenoic acid and mortality in patients on hemodialysis during over 10 years. *Hemodial. Int.* 2014; 18: 625-631
- Thompson LU**, Rickard SE, Orcheson LJ, *et al.* Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 1373-1376
- Torres M**, Turell L, Botti H, *et al.* Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012; 521: 102–110
- Toure A**, Xuening X. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010; 9: 261-269
- Tribble D**. Antioxidant Consumption and Risk of Coronary Heart Disease: Emphasis on Vitamin C, Vitamin E, and β -Carotene. *Circulation* 1999; 99: 591-595
- Trinder P**. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 1969; 6: 24-27
- Tuberoso C**, Kowalczyk A, Sarritzu E, *et al.* Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chem.* 2007; 103: 1494-1501
- Turell L**, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* 2013; 65: 244–253
- Turell L**, Carballal S, Botti H, *et al.* Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009; 42: 305-311

- Untergehrer M**, Kraus B, Heilmann J, *et al.* Deconjugation of polyphenol-glucuronides by a factor with β -glucuronidase activity from human monocytes (Mono Mac 6 cells). *Planta Med.* 2013; 79, PJ48
- Uttara B**, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 2009; 7: 65-74
- Vanharanta M**, Voutilainen S, Rissanen TH, *et al.* Risk of cardiovascular disease-related and all-cause death according to serum concentrations of enterolactone. *Arch. Internal Medicine.* 2003; 163: 1099–1104
- Valdivielso P**, Rioja J, Garcia-Arias C, *et al.* Omega 3 fatty acids induce a marked reduction of apolipoprotein B48 when added to fluvastatin in patients with type 2 diabetes and mixed hyperlipidemia: a preliminary report. *Cardiovasc. Diabetol.* 2009; 8: 1
- van den Berg R**, Haenen G, van den Berg H, *et al.* Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry* 1999; 66: 511-517
- van de Weert M**, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology. *J. Mol. Struct.* 2011; 998: 144-150
- Vorum H**, Honore B. Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48: 870-875
- Xu C**, Liu Q, Zhang Q, *et al.* Urinary enterolactone associated with liver enzyme levels in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey. *Br. J. Nutr.* 2015; 114: 91-7
- Xiao J**, Kai G. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2012; 52: 85-101
- Wang X**, Quinn PJ. Prog. Vitamin E and its function in membranes. *Lipid Res.* 1999; 38: 309-36
- Wasselin T**, Zahn S, Maho YL, *et al.* Exacerbated oxidative stress in the fasting liver according to fuel partitioning. *Proteomics.* 2014; 14: 1905-1921
- Wen A**, Delaquis P, Stanich K, *et al.* Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol.* 2003; 20: 305–311
- Wolfe W**, Wu X, Liu R. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food. Chem.* 2003; 51: 609-614
- Yang B**, Ding F, Wang F L, *et al.* Association of serum fatty acid and estimated desaturase activity with hypertension in middle-aged and elderly Chinese population. *Sci. Reports.* 2016; 6: 23446-23457
- Yang F**, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drug binding to human serum albumin. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15: 3580-3595
- Yang W**, Fu J, Yu M, *et al.* Effects of flaxseed oil on anti-oxidative system and membrane deformation of human peripheral blood erythrocytes in high glucose level. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 88
- Zachara BA**, Gromadzińska J, Wasowicz W, *et al.* Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol.* 2006; 53: 663-677
- Zhang J**, Zhao Y, Xu C, *et al.* Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Scientific reports.* 2014; 4: 5832
- Zsila F**, Bikadi Z, Malik D, *et al.* Evaluation of drug–HSA binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics.* 2011; 27: 1806-1813

7. PRILOG

UPITNIK

PROCENA SIMPTOMA UREMIJSKOG PRURITUSA (SVRABA) KOD BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI

1. Da li ste primetili da vam je koža suva ili vas svrbi? (okružiti) DA NE

2. Koliko učestalo primećujete da vam je koža suva ili se javlja svrab? (okružiti)

- nikad
- mesečno
- svake dve nedelje
- nedeljno
- svakodnevno

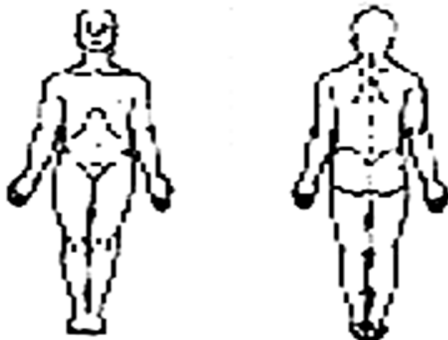
3. Kako biste opisali simptome koji se javljaju: (okružiti)

- kao golicanje
- kao mravi
- kao ubadanje
- kao štipanje
- gori od svega navedenog

4. Da li se simptomi javljaju (okružiti)

- na jednom mestu na telu
- na više mesta na telu
- po celom telu

Obeležite lokalizaciju svraba na slici:



5. Koliko epizoda simptoma svraba se javlja u toku 24h (upisati)

Ime i prezime: _____

br. protokola :

HVALA NA SARADNJI

KBC Zemun-Odeljenje nefrologije i Institut za medicnska istraživanja

Ime i prezime: _____

br. protokola :

HVALA NA SARADNJI

Biografija

Marija Takić rođena je 6.9.1978. godine u Zemunu, a osnovnu školu i gimnaziju opšteg smera završila je u Staroj Pazovi. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu završila je 2002. godine sa prosečnom ocenom 8.91 i ocenom 10 na diplomskom radu ("Izoenzimski profili N-acetil- β -D-glukozaminidaze u dijabetesu"). Po diplomiranju upisala je poslediplomske studije na Hemijskom fakultetu, a magistarsku tezu pod naslovom „Masnokiselinski sastav fosfolipida eritrocita i osetljivost na insulin kod gojaznih osoba“ odbranila je 6.4. 2010. godine.

Od 1.12.2002. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik u Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu, u okviru naučnoistraživačke grupe za Ishranu i metabolizam. Odlukom Naučnog veća od 18.5.2011. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik i radi u okviru Centra izuzetnih vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma, na Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu.

U toku dosadašnjeg naučnoistraživačkog rada Marija Takić je bila angažovana na sledećim projektima koje je finansiralo ili finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije i Ministarstva odbrane Republike Srbije:

- Ishrana kao faktor rizika, profilaktički i terapijski faktor za zdravlje i masovne nezarazne bolesti populacije (2002-2005),
- Razvoj novih terapijskih postupaka u prevenciji i lečenju bolesti jetre - uloga i mehanizmi delovanja polinezasićenih masnih kiselina (2006-2010),
- Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji (2011-2015),
- Integralna studija identifikacije regionalnih genetskih faktora rizika i faktora rizika životne sredine za masovne nezarazne bolesti humane populacije u Srbiji (2011-2015);
- Ishrana, nutritivni status, kardiovaskularni komorbiditet i kvalitet života kod pacijenata sa predijaliznom hroničnom bubrežnom insuficijencijom i na hemodijalizi (2015-2017) MFVMA/8/15-17

Mr Marija Takić bila je saradnik i na međunarodnim projektima:

- OP6 "EuroFIR" (European Food Information Resource Network) u periodu od 2006-2009.
- CHANCE FP7 Low Cost technologies and traditional ingredients for the production of Affordable, Nutritionally correct, Convenient foods enhancing health in population groups at risk of poverty (2011-2014)
- EuroFIR Nexus FP7- EuroFIR Food Platform: Further integration, refinement and exploitation for its long-term self-sustainability 2011-2013 (od 2012. godine).

U sklopu međunarodne saradnje i stručnog usavršavanja pohađala je kurs: "EuroFIR Course on Production of Food Composition Data in Nutrition", 16-27. October 2006, Bratislava, Organized by Division of Human Nutrition, Wageningen UR, The Netherlands and VUP FOOD Research Institute, Slovak Republic.

Koautor je 19 radova sa SCI liste, od toga 12 u vodećim međunarodnim časopisima (7 M21 i 5 M22), a 7 u međunarodnim časopisima (M23). Član je Biohemijskog društva Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана _____ Марија М. Такић _____

број индекса _____ 40/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Семенке лана, сусама и голице и њихови екстракти, ферулинска киселина и ентеролигнани: ефекти на липидни статус код особа на хемодијализи, везивање за хумани серум-албумин *in vitro* и утицај на реактивност Cys34 тиолне групе

- 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 докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Марија М. Такић _____

Број индекса _____ 40/2010 _____

Студијски програм _____ биохемија _____

Наслов рада **Семенке лана, сусама и голице и њихови екстракти,
ферулинска киселина и ентеролигнани: ефекти на липидни статус код особа
на хемодијализи, везивање за хумани серум-албумин in vitro и утицај на
реактивност Cys34 тиолне групе**

Ментори _____ др Љуба Мандић, др Данијела Ристић-Медић _____

Потписана _____ Марија Такић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Семенке лана, сусама и голице и њихови екстракти, ферулинска киселина и ентеролигнани: ефекти на липидни статус код особа на хемодијализи, везивање за хумани серум-албумин *in vitro* и утицај на реактивност Cys34 тиолне групе

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 Београду 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, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.