

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



**Dijana D. ĐUROVIĆ**

**ISPITIVANJE KONCENTRACIJE GVOŽĐA, CINKA I  
BAKRA I ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA U  
MAJČINOM MLIJEKU, SERUMU BEBA I MAJKI I  
HRANI ZA ODOJČAD**

**Doktorska disertacija**

**Beograd**

**2017.**

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



**Дијана Д. ЂУРОВИЋ**

**ИСПИТИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ГВОЖЂА,  
ЦИНКА И БАКРА И АНТИОКСИДАТИВНОГ  
СТАТУСА У МАЈЧИНОМ МЛИЈЕКУ, СЕРУМУ  
БЕБА И МАЈКИ И ХРАНИ ЗА ОДОЈЧАД**

**Докторска дисертација**

**Београд**

**2017.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF CHEMISTRY**



**Dijana D. ĐUROVIĆ**

**EXAMINATION OF CONCENTRATION OF IRON,  
ZINC AND COPPER AND ANTIOXIDATIVE  
STATUS IN HUMAN MILK, SERUM OF BABY AND  
MOTHERS AND INFANT FORMULA**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade**

**2017.**

## **MENTORI**

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

Dr Nikoleta Lugonja, naučni saradnik  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju - Centar za  
hemiju u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

Dr Dragan Manojlović, redovni profesor  
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Vladimir Beškoski, docent  
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Boban Mugoša, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Podgorici

Datum odbrane doktorske disertacije:

Datum promocije doktorske disertacije:

*Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji za Sanitarnu hemiju i ekotoksikologiju Instituta za javno zdravlje Crne Gore.*

*Temu za doktorsku disertaciju je predložio prof. dr Miroslav M. Vroić, redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ovim putem srdačno se zahvaljujem mom dragom mentoru na neizmornoj podršci i strpljenju vezanom kako za temu istraživanja tako na mnogim životnim savjetima. Njegov izvanredan metodološki pristup mi je pokazao put ka kreativnosti i inventivnosti u nauci, na čemu sam mu neizmerno zahvalna.*

*Dr Nikoleti Lugonji želim da se zahvalim na podršci i savjetima u toku izrade doktorske disertacije, kao na i pažljivom i strpljivom čitanju i korisnim sugestijama tokom pisanja.*

*Dr Vladimiru Beškoskom zahvaljujem na korisnim sugestijama i pažljivom čitanju u korigovanju doktorske disertacije.*

*Dr Snežani Spasić zahvaljujem na nesebičnoj podršci i motivisanju u toku pisanja disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Branki dr Milisavljević iz Bolnice u Subotici koja je uložila ogroman napor i trud kako bi sakupila uzorke majčinog mlijeka i seruma beba što je omogućilo da ovaj rad bude realizovan.*

*Neizmjernu zahvalnost dugujem mojoj drugarici Prof. dr Ireni Nikolić na savjetima, podršci i tehničkom uobličavanju ove doktorske disertacije.*

*Zahvalnost i ljubav dugujem svojim roditeljima, mom ocu Draganu i majci Mariji na beskrajnoj podršci i optimizmu koju sam dobijala u toku svog školovanja.*

*Konačno, moja inspiracija i izvor snage je moja porodica, veliko hvala mom suprugu Luki i sinovima Slobodanu i Andriji, koji su svojim beskrajnim strpljenjem i ljubavlju doprinijeli oblikovanju ove doktorske disertacije.*

*Beograd, April 2017.*

*Dijana Đurović*

# ISPITIVANJE KONCENTRACIJE GVOŽĐA, CINKA I BAKRA I ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA U MAJČINOM MLIJEKU, SERUMU BEBA I MAJKI I HRANI ZA ODOJČAD

## IZVOD

Mikroelementi, odnosno elementi u tragovima, su supstance koje čine manje od 0,01% ukupne tjelesne mase. Gvožđe, cink i bakar spadaju u osnovne elemente koji su neophodni za rast i razvoj kako odojčadi tako i tokom cijelog života, obzirom da ulaze u sastav velikog broja enzima.

Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da neki elementi u tragovima, koji se ponašaju kao redoks katalizatori, mogu biti dio aktivnog mjesta ili kofaktori antioksidativnih enzima, te se mogu ponašati i kao antioksidansi. Elementi u tragovima imaju važnu ulogu u rastu i razvoju. Iako su potrebni samo u malim količinama, unos ne mora uvijek biti adekvatan. Nedostatak elemenata u tragovima može se pojaviti u dojenčadi iz različitih razloga.

Biodostupnost esencijalnih mikroelemenata kod odojčadi isključivo zavisi od kvaliteta majčinog mlijeka, tj. od sadržaja nutrijenata u majčinom mlijeku, dužine dojenja i fizioloških faktora kao što su apsorpcija nutrijenata i uzimanje suplemenata, kako u trudnoći tako i u procesu dojenja. Smanjen unos cinka utiče na zastoj u rastu oštećujući i imuni sistem. Nedostatak bakra utiče na povećavanje slobodnih radikala i smanjuje sposobnost odbrane organizma od oksidativnog stresa. Smanjenje Zn i Cu kod odojčadi povezano je sa nedostatkom gvožđa što može dovesti do većeg broja komplikacija.

Zahvaljujući različitim sastojcima, majčino mlijeko je najbolja hrana za odojče, koja pored nutritivnih i bioloških vrijednosti neophodnih za rast, doprinosi jačanju odbrambenih mehanizama, stimulišući imuni sistem, poboljšavajući razvoj endogenih odbrambenih mehanizama, kao i rast zdrave mikroflore. Sastav mlijeka majki prijevremeno rođene djece se razlikuje od mlijeka majki terminske djece.

Veoma je važno poznavanje koncentracija esencijalnih mikroelemenata (kao što su Zn, Cu, Fe i dr.) i oksidativnog statusa humanog mlijeka tokom laktacije i u infant formulama, za definisanje prehrambenih potreba za pojedine nutrijente i razumijevanje fiziologije njihovog izlučivanja. Mnogi mikroelementi ulaze u sastav enzima (preko 300), učestvuju u sintezi RNK i DNK, stoga je nutritivni sastav humanog mlijeka u periodu dojenja izuzetno važan.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje sadržaja gvožđa, cinka i bakra kao i antioksidativnog statusu u majčinom mlijeku terminskih beba i prijevremeno rođenih beba, serumu beba i majki i hrani za odojčad. Ispitivanje sadržaja navedenih mikroelemenata urađeno je na uzorcima mlijeka, seruma i infant formula za odojčad starosti od 0-6 mjeseci. Uporedo su sprovedena i ispitivanja uticaja sadržaja Fe, Zn i Cu na ukupan antioksidativni status mlijeka.

Na osnovu dosadašnjih rezultata i aktuelnih naučnih saznanja u okviru ove oblasti istraživanja, u ovoj doktorskoj disertaciji primijenjene su moderne laboratorijske tehnike i instrumentalne metode za određivanje koncentracije Fe, Zn i Cu u majčinom mlijeku, serumu i infant formulama, kao i ukupnog antioksidativnog statusa.

Sadržaj mikroelemenata je određen primjenom nove, brze i jednostavne metode pripreme, bez razaranja uzoraka mlijeka, seruma i hrane za odojčad primjenom tehnike indukovano spregnute plazme - optičke emisije spektrometrije (ICP-OES). Uporedo, kroz validaciju ICP-OES metode koja je zasnovana na jednostavnom rastvaranju uzoraka u ultra čistoj vodi sprovedeno je i upoređivanje metoda ICP-OES i FAAS (plamena atomska apsorpciona spektrometrija) da bi se procijenila osjetljivost, preciznost i tačnost metoda. Antioksidativni status infant formula, majčinog mlijeka, seruma majki i beba određen je primjenom različitih metoda kao što su; elektron-paramagnetna rezonanca (EPR), određivanje oksidativno-redukcionog potencijala (ORP) i metoda DPPH.

Primijenjene metode mogu da budu relevantne za brzo i rutinsko mjerenje ukupnog antioksidativnog potencijala mlijeka, infant formula kao i za kvantitativno određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala mlijeka.

*Ključne riječi: mikroelementi, gvožđe, bakar, cink, majčino mlijeko, serum, hrana za odojčad, indukovana kuplovana plazma, optički emisijski spektrometar, atomska apsorpcijska spektrometrija, antioksidativni status, EPR, ORP.*

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Biohemija hrane i ishrane

UDK broj:



## **EXAMINATION OF CONCENTRATION OF IRON, ZINC AND COPPER AND ANTIOXIDATIVE STATUS IN HUMAN MILK, SERUM OF BABY AND MOTHERS AND INFANT FORMULA**

### **ABSTRACT**

Micro-elements or trace elements, are substances that make less than 0.01% of total body weight. Iron, zinc and copper are among basic elements necessary for growth and development of infants and further throughout life, as they are part of a large number of enzymes.

Previous researches has found that some trace elements, which act as redox catalysts, may be part of the active site or cofactors of antioxidant enzymes, and they can act also as antioxidants. Trace elements play an important role in growth and development of humans. Although they are needed only in small amounts, their intake do not have to be appropriate. The lack of trace elements may occur in infants, for various reasons.

The bioavailability of essential microelements in infants depends exclusively on the quality of breast milk, ie. of nutrients content in breast milk, duration of breastfeeding and physiological factors such as the absorption of nutrients and supplements intake, both in pregnancy and in breastfeeding period. Decreased intake of zinc causes the growth arrest, damaging the immune system. Copper deficiency causes the increase of free radicals and reduces the ability of defenses against oxidative stress. Reduction of Zn and Cu in infants is associated with iron deficiency which can lead to greater number of complications.

Thanks to a variety of ingredients, breast milk is the best food for infants, which in addition to nutritional and biological value necessary for growth, contributes to strengthening defense mechanisms, stimulating the immune system, improving the development of endogenous defense mechanisms, as well as the growth of healthy

mikroflora. Composition of milk of mothers of preterm infants differs from the milk of mothers of term infants.

It is very important to know the concentration of essential trace elements (such as Zn, Cu, Fe, etc.) and the oxidative status of human milk during lactation and in infant formulas, for both reasons, to define the nutritional needs for certain nutrients and understand the physiology of their production. Many trace elements are part of enzymes (over 300), they are included in RNA and DNA synthesis, so the nutritional composition of human milk during lactation is extremely important.

The aim of this PhD thesis is to examine iron, zinc and copper concentration as well as the antioxidant status in breast milk of term and preterm babies, serum of babies and mothers and infant formulas. Examination of the concentration of indicated trace elements was done in samples of milk, serum and infant formulas for infants aged 0-6 months. At the same time, the effect of Fe, Zn and Cu concentration in the total antioxidant status of milk was analyzed.

Based on recent results and current scientific knowledge within this field of research, modern laboratory techniques and instrumental methods for determining Fe, Zn and Cu concentration in breast milk, serum and infant formulas, as well as total antioxidant status, were applied in this doctoral dissertation.

The concentration of trace elements was determined by applying new, fast and simple preparation method, without destruction of milk samples, serum and infant formulas by using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) technique. Simultaneously, through the validation of ICP-OES method which is based on simple dissolution of samples in ultra pure water, comparison of ICP-OES method and FAAS (flame atomic absorption spectrometry) was done to assess the sensitivity, precision and accuracy of methods. Antioxidant status in infant formula, breast milk, maternal and infant serum was determined by using different methods such as; electron paramagnetic resonance (EPR), by determination of oxidation reduction potential (ORP) and DPPH method.

Applied methods can be relevant for fast and routine measurement of total antioxidant potential of milk infant formulas and quantitative determination of total antioxidant potential of milk.

*Keywords: micro-elements, iron, copper, zinc, breast milk, serum, infant formulas, induced coupled plasma optical emission spectrometer, atomic absorption spectrometry, antioxidant status, EPR, ORP.*

Science topic: Biochemistry

Topic field: Food biochemistry

UDC number:

## SPISAK SKRAĆENICA

**A\*** - Antioksidans radikal

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

**ABAP** - Dihidro-2,7-dihlorofluorescein sa 2,2'-azobis(2-amidopropan)

**AH** - Primarni antioksidans

**BMPO** - 5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi

**CAT** - Katalaza

**CV** - Ciklična voltometrija

**DcyB** - Duodenalni citohrom B

**DMT1** - Dvovalentni metal transporter 1

**DEMPO** - 5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi

**DEMPO/ONO** - 5,5-dimetil-pirolin-azot-dioksidi

**DEMPO/O** - 5,5-dimetil-pirolin-acil-nitroksida

**DMPO** - 5,5-dimetil-pirolin-N-oksidi

**DNK/DNA** - Dezoksiribonukleinska kiselina

**DPPH** - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

**EPR** - Elektron-paramagnetna rezonanca

**ET-AAS** - Elektro termalna atomska apsorpciona spektrometrija

**EFSA** - European Food Safety Agency (Evropska agencija za bezbjednost hrane)

**ESR** - Elektron spin rezonanca

**ESPGHAN** - The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition - Evropsko društvo za pedijatrijsku gastroenterologiju hepatologiju i ishranu

**FAAS** - Plamena atomska apsorpciona spektrometrija

**FRAP** - Metoda bazirana na redukciji antioksidanata sa Fe(III)-kompleksom

**GR**- Glutation-reduktaza

**GSH-Px** - Glutation-peroksidaza

**ICP-MS** - Indukovano spregnuta plazma-maseni spektrometar/spektrometrija

**ICP-OES** - Indukovano spregnuta plazma-optički emisijski spektrometar/spektrometrija

**IP** - Inozitol fosfat

**IAEA** - The International Atomic Energy Agency - Međunarodna agencija za atomsku energiju

**IZiNCG** - International Zinc Nutrition Consultative Group - Međunarodna konsultativna grupa za ishranu cinkom

**IUPAC** - The International Union of Pure and Applied Chemistry - Međunarodna unija za čistu i primijenjenu hemiju

**LDL** - Low-density lipoprotein - Lipoprotein male gustine

**LOOH** - Lipidni hidroperoksid

**LO\*** - Lipidni alkoksilni radikal

**MM** - Majčino mlijeko

**MDA** - Malondialdehid

**NADPH** - Nikotinamidadenindinukleotid-fosfat

**NIST** - The National Institute of Standards and Technology - Nacionalni institut za standarde i tehnologiju

**ORP**- Oksidativno-redukциони potencijal

**\*OH**- Hidroksil radikal

**ORAC** - Metoda određivanja kapaciteta apsorbanse kiseoničnog radikala

**O<sub>2</sub>\*** - Superoksid anjon

**PUFAs** - Polinezasićene masne kiseline

**RNA** - Ribonukleinska kiselina

**ROOH** - Hidroperoksid

**RO\*** - Alkoksil radikal

**ROO\*** - Alkil-peroksi-radikal

**ROS** - Reaktivna kiseonična vrsta

**RDI** - recommended daily intake - Preporučeni dnevni unos

**RNS** - Reaktivna vrsta azota

**SZO** - Svjetska zdravstvena organizacija

**SOD** - Superoksid-dismutaza

**SRM** - Sertifikovani referentni materijal

**TAC** - Totalni antioksidativni kapacitet

**TIBC** - Total iron binding capacity - Ukupan kapacitet vezivanja gvožđa

**TBARS** - Tiobarbiturna kiselina

**TIL** - Tolerable intake level - Prihvatljiv nivo unosa

**UNICEF** - United Nations International Children's Emergency Fund

**ZIP** - Metal transporter

## Sadržaj

I.	UVOD .....	1
II.	PREGLED LITERATURE .....	8
2.1.	Mikroelementi i njihova funkcija .....	9
2.1.1.	Gvožđe .....	10
2.1.2.	Bakar .....	19
2.1.3.	Cink .....	27
2.2.	Metode pripreme uzoraka i instrumentalne metode analize elemenata u tragovima .....	34
2.3.	Mehanizam dejstva antioksidanasa .....	39
2.4.	Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija .....	42
2.4.1.	Elektron-paramagnetna rezonantna spin-trapping detekcija kratkoživećih slobodnih radikala .....	43
2.4.1.1.	Reaktivne kiseonične vrste (ROS) .....	43
2.5.	Oksidativni-redukциони potencijal (ORP) .....	47
2.6.	Humano mlijeko .....	48
2.6.1.	Minerali u majčinom mlijeku .....	52
2.7.	Antioksidativni potencijal majčinog mlijeka .....	55
2.8.	Infant formule .....	57
III.	MATERIJAL I METODE .....	60
3.1.	Uzorci majčinog mlijeka, seruma beba i hrane za bebe .....	61
3.2.	Validacija ICP-OES i FAAS metode .....	66
3.2.1.	Kalibraciona kriva i linearnost .....	66
3.2.2.	Preciznost i tačnost .....	67

3.2.3. Osjetljivost metode .....	67
3.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta .....	67
3.3.1. Mjerenje ORAC i ORP .....	67
3.3.2. Određivanje EPR .....	68
3.3.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta mjerenjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala .....	69
3.6. Statistička analiza .....	70
IV. REZULTATI I DISKUSIJA.....	72
4.1. Rezultati validacione studije .....	73
4.1.1. Kalibracione krive i linearnost.....	73
4.1.2. Određivanje tačnosti .....	77
4.2. Ispitivanje koncentracije gvožđa FAAS, bakra i cinka ICP-OES metodom u majčinom mlijeku terminskih beba i serumu beba.....	82
4.3. Ispitivanje koncentracije gvožđa FAAS, bakra i cinka ICP-OES metodom u majčinom mlijeku preterminkih beba i serumu beba.....	95
4.4. Ispitivanje uticaja koncentracije gvožđa, bakra i cinka na antioksidativni status majčinog mlijeka, seruma i infant formula .....	107
V. ZAKLJUČCI.....	119
VI. LITERATURA .....	124
VII. BIOGRAFIJA AUTORA.....	xv
VIII. IZJAVE .....	xviii



# **I. UVOD**

Elementi u tragovima i minerali su esencijalni u brojnim biološkim procesima i imaju značajnu ulogu za normalan rast i razvoj. Rano djetinjstvo karakteriše veoma brz rast te je zadovoljavanje potreba za elementima u tragovima veoma značajno u tom periodu života [1].

Rast i razvoj različitih sistema organa u djetinjstvu zahtijeva izbalansiranu ishranu bogatu nutrijentima. Minerali učestvuju u mnogim značajnim procesima u organizmu, kao što su enzimske reakcije, zaštita ćelija i lipida u biološkim membranama, ulaze u sastav kostiju. Nizak unos ili smanjena biodostupnost minerala dovodi do nedostataka koji izazivaju oštećenja funkcije organizma [2].

Elementi u tragovima, odnosno mikroelementi, su supstance koje čine 0,01% tjelesne mase. Elementi u tragovima u humanom mlijeku su gvožđe, cink, bakar, mangan, selen, jod, fluor, molibden, aluminijum, kobalt, hrom i nikl [3]. Mikroelementi su glavni sastojci velikog broja molekula, kao što su proteini, koji predstavljaju izvor komponenti koje učestvuju u enzimskim katalizama.

U svakom organizmu za većinu biohemijskih procesa cink je neophodan mikroelement, naročito kod novorođenčadi, učestvujući kao kofaktor ili sastavni dio većine enzima, oko 300. Cink učestuje u metabolizmu DNK, sintezi i metabolizmu proteina, lipida, ugljenih hidrata, ćelijskoj replikaciji, replikaciji gena, itd. [4,5]. Više od 10% humanih proteina vezano je za cink i učestvuju u transportu. U trudnoći, ranom djetinjstvu i adolescenciji cink omogućava zdrav razvoj i normalan rast [6–9].

Bakar je izuzetno važan mikronutrijent jer ima krucijalnu ulogu u metabolizmu, omogućavajući mnogim enzimima da pravilno funkcionišu [10]. Bakar je odgovoran za produkciju mijelinskog omotača nervnog sistema, melanina i pomaže u normalnom funkcionisanju tiroidne žlijezde a takođe ima i antioksidativne i prooksidativne osobine [11].

Sledeći elemenat u tragu od izuzetnog interesa je gvožđe, koje je neophodno za hemoglobin i formiranje crvenih krvnih zrnaca, kao i za neke važne funkcije organizma, kao što je biološka oksidacija [7,12]. Pretpostavlja se da neke bakteriostatske osobine koje ima majčino mlijeko zavise od sadržaja i/ili

biodostupnosti gvožđa u majčinom mlijeku. Mnoge *in vivo* i *in vitro* studije su pokazale da je gvožđe ključni faktor u borbi protiv patogena u majčinom mlijeku [13].

Nedostatak ili prekomjerna količina navedenih mikronutrijenata može ugroziti enzimsku aktivnost i biološke procese u organizmu. Definisane nutritivne potrebe kao i same fiziologije sekrecije mlijeka za novorođenčad zasniva se na adekvatnim podacima sadržaja mikroelemenata u majčinom mlijeku tokom laktacije [14,15].

Naime, ishrana u periodu od rođenja do kraja prve godine može uticati na kompletan budući život pojedinca [16]. Humano mlijeko je kompleksna smješa nutrijenata. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je preporučila majčino mlijeko kao idealnu hranu za rast beba mlađih od 12 mjeseci [17]. Humano mlijeko sadrži skoro sve esencijalne komponente (minerale, vitamine, esencijalne amino i masne kiseline) kao zaštitne faktore neophodne za normalan rast i razvoj novorođenčadi [18-21].

Humano mlijeko u ranom djetinjstvu, posebno u prvih nekoliko mjeseci bebinog života, obezbjeđuje zaštitu imunog sistema i zdrav razvoj [22]. Dojenje se smatra najvažnijim i najboljim načinom ishrane ukoliko se i nakon prvih šest mjeseci života nastavi na godinu do dvije ili duže [23,24].

Zahvaljujući različitim sastojcima majčinog mlijeka u odnosu na hranu za odojčad, majčino mlijeko doprinosi jačanju odbrambenih mehanizama stimulišući imuni sistem, poboljšavajući razvoj endogenih odbrambenih mehanizama kao i rast zdrave mikroflore [25].

Dojenje može se koristiti u ishrani odojčadi u prvih 6 mjeseci života, ali nakon toga dopunska ishrana je neophodna [16]. Dopunska hrana je definisana kao sva hrana i tečnosti različite od majčinog mlijeka koje se daju odojčadima. Obzirom da posebno adaptirana hrana za odojčad tj. infant formule igra važnu ulogu u ishrani novorođenčadi i djece izuzetno je važno da takva hrana sadrži dovoljne količine minerala.

Današnje infant formule su zamjena za majčino mlijeko, napravljene za ishranu odojčadi na bazi kravljeg ili sojinog mlijeka. Infant formula odgovara nutritivnom profilu majčinog mlijeka i to je jedina hrana koju medicinska zajednica smatra nutritivno prihvatljivom za djecu uzrasta do jedne godine [26]. Hrana za odojčad – infant formule se koriste u slučajevima kada majke nisu u mogućnosti da doje svoje novorođenče, usljed bolesti, prestanka laktacije, neuhranjenost i sl.

Veliki broj studija o ishrani novorođenčadi je sproveden kako u zemljama u razvoju tako i u industrijski razvijenim zemljama [27–30]. Svjetska zdravstvena organizacija dala je preporuke za dnevni unos minerala za novorođenčad i djecu [31]. Neki minerali mogu predstavljati potencijalni rizik po zdravlje kada se konzumiraju u količinama iznad prihvatljivog gornjeg nivoa unosa u dužem vremenskom periodu, kao na primjer jod i gvožđe, koji u visokim koncentracijama mogu dovesti do trovanja. Za ostale minerale, negativni efekti su manje očigledni, poput gastrointestinalnih problema. Za neesencijalne elemente kao što su aluminijum i teški metali (npr. živa, kadmijum i olovo) bilo kakvo izlaganje je nepoželjno, ali prihvatljiv sadržaj u hrani je definisala SZO obzirom da su elementi u trgovima prisutni u mnogim namirnicama [31].

Poznato je da oksidativni stres može izazvati modifikacije proteina i malih ćelijskih molekula, te stoga doprinosi nastanku mnogih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, kancer, dijabetes, arteroskleroza, neurološke bolesti i Alchajmerovo oboljenje [32].

Majčino mlijeko sadrži veliki broj enzimskih i neenzimskih antioksidativnih komponenti koje pružaju osnovnu antioksidativnu zaštitu novorođenčadi u ranom stadijumu života u cilju zaštite od komplikacija izazvanih kiseoničnim slobodnim radikalima. Mnogi mikroelementi ulaze u sastav enzima, najčešće kao kofaktori. Enzimi mlijeka imaju ključnu ulogu u regulisanju laktogeneze, uključujući aktivnu funkciju mliječne žlijezde. Povrh svega, oni su osnovni sastojci antioksidanata i predstavljaju osnovu imunog sistema mlijeka. Sadržaj enzima u kolostrumu je uglavnom veći u odnosu na zrelo mlijeko [33].

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) su hemijski reaktivni molekuli koji sadrže kiseonik. ROS su radikali koji sadrže najmanje jedan nesparen elektron ili reaktivna neradikalna komponenta nastala iz radikala koja je sposobna da oksiduje biomolekul i oštetiti sve biološke makromolekule [34,35].

ROS normalno nastaju u živim organizmima u niskim ali ipak značajnim koncentracijama i mogu biti korisni čak i krucijalni u precesima kao što su intracelularni prenos signala i odbrana od mikroorganizama. ROS, takođe, učestvuju u ćelijskom rastu, dijeljenju, progresiji i smrti [36].

Ćelije koje koriste kiseonik a samim tim i ROS treba da razviju sistem antioksidativne odbrane koji neutrališe ROS i štiti ćeliju od oštećenja slobodnim radikalima [37]. Stanje poznato kao oksidativni stres nastaje kada produkcija ROS premaši kapacitet antioksidativne odbrane organizma kojim se on detoksifikuje. Visoke koncentracije ROS-a mogu da oštete sve glavne ćelijske komponente kao što su lipidi, proteini (denaturacija), ugljeni hidrati i nukleinske kiseline, što dovodi do funkcionalnih oštećenja [38,39].

Na rođenju, novorođenče je izloženo hiperoksičnoj vanmateričnoj sredini prouzrokovanoj povećanom dostupnošću kiseonika pri čemu je povećana mogućnost nastanka ROS. Kao rezultat toga, novorođenče je izloženo oksidativnom stresu usljed slabe adaptacije na kiseonik, posebno zbog toga što je antioksidativni odbrambeni mehanizam slabo razvijen u neonatalnom periodu. Pretpostavlja se da je oksidativni stres uključen u patogenezu mnogih neonatalnih bolesti [32].

Prijevremeno rođene bebe, koje imaju smanjen antioksidativni kapacitet, su izložene oksidativnom stresu koji je često posljedica infekcije, kiseonika, mehaničke ventilacije ili transfuzije. Smatra se da mnogi poremećaji koji nastaju kod prijevremeno rođenih beba, nastaju kao rezultat disbalansa između oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta [40]. Osim toga dojenje je povezano sa niskom stopom obolijevanja kod prijevremeno rođenih beba, uključujući nekrotični enterokolitis, respiratorne bolesti, i retinopatiju [41].

Nekoliko analitičkih tehnika je dostupno za određivanje elemenata u tragovima. Atomska spektrometrija je jedna od osnovnih tehnika za analizu elemenata u tragovima u biološkim uzorcima i mliječnim proizvodima [42]. Plamena atomska apsorpciona spektrometrija (FAAS), elektrotermalna atomska apsorpciona spektrometrija (ET-AAS), indukovanospregnuta plazma-optička emisiona spektrometrija (ICP-OES) i indukovanospregnuta plazma-masena spektroskopija (ICP-MS) [30,31] su osnovne tehnike koje se koriste danas [43–48].

ICP-MS daje rezultate sa najboljom osjetljivošću i tačnošću, ali je izuzetno skupa tehnika koja zahtijeva rigidne operativne protokole što u mnogome prevazilazi mogućnosti primjene ove tehnike u rutinskoj kliničkoj dijagnostici [49]. Visoki troškovi primjene ICP-OES i ET-AAS u klinikama takođe onemogućuju primjenu ovih tehnika uprkos činjenici da daju dobru tačnost, imaju širok radni opseg i omogućavaju simultano određivanje više elemenata u jednom mjerenju [46,50,51].

Određivanje ukupnog sadržaja svih ili samo nekih komponenti koje doprinose prooksidativnom/antioksidativnom potencijalu mlijeka je vrlo zahtjevan zadatak [52]. Brojne metode za mjerenje pojedinačnih antioksidativnih aktivnosti u biološkim tečnostima su razvijene u posljednjih nekoliko decenija. Spektrofotometrijske metode kao što su DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, FRAP (Metoda bazirana na redukciji antioksidanata sa Fe(III)-kompleksom) i ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzotiazolinsulfonat)) kao i kinetička metoda zasnovana na oksidaciji ABAP (dihidro-2,7-dihlorofluorescein sa 2,2'-azobis(2-amidopropan)) se koriste za procjenu antioksidativne aktivnosti u tjelesnim tečnostima i njihovim promjenama u različitim uslovima [53,54].

Poznate koncentracije individualnih antioksidativnih komponenata u mlijeku veoma je važno odrediti i znati i totalan antioksidativni kapacitet, TAC, mlijeka kao i ORP, mada se detaljne informacije o pojedinim komponentama na osnovu mjerenja TAC-a ne mogu uvijek dobiti [55–57].

Cilj ove doktorske disertacije je da se primjenom nove metode pripreme uzoraka, zasnovane na ekološkim principima, bez utroška agresivnih hemikalija, ispita sadržaj

gvožđa, cinka i bakra u mlijeku majki djece koja su rođena u terminu i prijevremeno rođene djece, serumu beba, majki i hrani za odojčad kao i antioksidativni status humanog mlijeka, infant formula i seruma majki. Takođe je urađena i studija zavisnosti koncentracije cinka, gvožđa i bakra u majčinom mlijeku i serumu beba u prvih šest mjeseci laktacije.

Cilj disertacije je da se validacijom primijenjenih metoda ICP-OES i FAAS uporedi i evaluira njihova osjetljivost za ispitivanje sadržaja Fe, Cu i Zn. Određivanje ukupnog antioksidativnog statusa mlijeka urađeno je mjerenjem oksidativno-redukcionog potencijala (ORP) i elektron paramagnetne rezonancije (EPR), nakon čega je bilo potrebno uraditi korelaciju između ORP i sadržaja Fe, Cu i Zn. DPPH metoda je korištena za evaluaciju antioksidativnog kapaciteta infant formula, seruma majki i beba, nakon čega je urađena korelacija sa sadržajem Fe, Cu i Zn.

## **II. PREGLED LITERATURE**



## 2.1. Mikroelementi i njihova funkcija

Biodostupnost minerala ili elemenata u tragovima predstavlja onu frakciju hrane koja se nakon ingestije apsorbira i koristi za normalne fiziološke funkcije. Neki od elemenata se ugrađuju u različite metaloproteine, kao npr. gvožđe u hemoglobinu [58].

Fiziološki zahtjevi za pojedine minerale su veoma širokog opsega i variraju u zavisnosti od starosti, pola, uzrasta, trudnoće i laktacije. Dijetetske potrebe se računaju na osnovu fizioloških potreba i efekta apsorpcije iz hrane, koji može biti manji od 1% ili 100%. Varijacije zavise od dijetetskih i prirodnih faktora uključujući i količinu mikroelementa koja se konzumira [58].

Esencijalni mikronutrijenti bakar (Cu), cink (Zn) i gvožđe (Fe) su važni za održavanje života. Oni su uključeni u mnoge složene enzimske sisteme koji funkcionišu u različitim biološkim procesima [59–61]. Njihov nedostatak se češće susreće kod djece i žena, stoga su sprovedena brojna istraživanja kako bi se ispitaio njihov status u tim populacijama [62].

Cink kao element u tragovima ima tri važne funkcionalne uloge: katalitičku, strukturnu i regulatornu [60,63]. Bakar ima antioksidativnu ulogu, odnosno štiti ćelije od dejstva slobodnih radikala [60,64]. Takođe doprinosi stvaranju ceruloplazmina, koji ima ulogu u metabolizmu gvožđa. Bakar je potreban za apsorpciju i upotrebu Fe [64–66].

Gvožđe je još jedan esencijalni element u tragovima koji funkcionišu u sintezi hemoglobina i mioglobina [67].

Koncentracije u serumu su korisni parametri za procjenu elemenata u tragovima, ali nisu dovoljno specifični i osjetljivi da uoče blagi nedostatak [68,69].

Između pojedinih elemenata u tragovima javljaju se određene interakcije. Manjak jednog može ometati apsorpciju drugog (npr. nedostatak Cu ometa apsorpciju Fe). Fe i Zn interaguju na nivou crijevne sluznice, a Fe ometa apsorpciju Zn [70]. Takođe postoji i jaka interakcija između Zn i Cu, a oni se nadmeću na nivou crijevne

apsorpcije [71]. Visok nivo Zn u ishrani može smanjiti apsorpciju Cu, ali visok sadržaj Cu u ishrani ne utiče na smanjenje apsorpcije Zn [72].

Nedovoljan unos Zn smatra se uzrokom smrtnosti djece u svijetu u 20 % slučajeva. Djeca sa anemijom usljed nedostatka gvožđa imaju visok nivo Cu u serumu i nizak nivo Zn u serumu [65].

Nedostaci elemenata u tragovima rezultat su slabog dijetetskog unosa i razvijaju se posebno kada su zahtjevi povećani ili zalihe tijela iscrpljene. Apsorpcija elemenata u tragovima može se narušiti povećanim unosom dijetetskih namirnica, kao što je fitati, ili prekomjernim unosom mineralnih suplemenata [73]. Još jedan mogući uzrok nedostatka elemenata u tragovima je pretjerano izlučivanje ili upotreba.

Smatra se da je 25% svjetske populacije pogođeno nedostatkom Fe. Odojčad starosti između 4 i 24 mjeseca, djeca školske dobi, žene, mladi, trudnice i dojilje najviše su pogođeni ovim nedostatkom [74]. Odojčad i mlađa djeca u zemljama u razvoju su posebno osjetljivi na nedostatak Fe i Zn zbog povećanih potreba, niske bioraspoloživosti, i čestih infekcija [66,75].

Nedostatak bakra je rijedak, ali je zabilježen kod nedonoščadi, odojčadi hranjenih kravljim mlijekom i odojčadi koja su se oporavljala od neuhranjenosti praćene dijarejom [76]. Nedostatak Cu dovodi do anemije, neutropenije, ometanja rasta, abnormalnosti u metabolizmu glukoze i holesterola, kao i do povećane stope infekcija [77].

### **2.1.1. Gvožđe**

Gvožđe je neophodno za rast i razvoj i njegov nedostatak u toku gestacije i ranog djetinjstva može imati doživotne posljedice. Gvožđe je ključno u procesu transporta, deponovanja i korišćenja kiseonika, kao dio hema u hemoglobinu, mioglobinu, citohromima i drugim enzimima [78,79].

Sadržaj gvožđa u majčinom mlijeku opada tokom laktacije, od 1 mg/l u kolostumu do 0,3-0,6 mg/l u zreom mlijeku. Način ishrane majke ne utiče na sadržaj gvožđa u mlijeku, čak ni suplementacija gvožđem do 30 mg/dan [17].

U majčinom mlijeku 1/3 gvožđa je vezana za laktoferin, i za globule mliječne masti. Međutim, koncentracija laktoferina je mnogo veća od koncentracije gvožđa pa je samo 3-5 % laktoferina zasićeno gvožđem. Laktoferin, takođe, može vezati gvožđe oslobođeno iz nekih drugih komponenti tokom digestije [79].

Gvožđe je prelazni metal koji se javlja u dva oksidaciona stanja kao fero (2+) i feri jon (3+) koja mu omogućavaju da učestvuje u redoks reakcijama. U biohemijskim sistemima, gvožđe se često nalazi na katalitičkom mjestu u enzimima i olakšava redoks reakcije. Njegove redoks osobine omogućavaju funkciju proteina ali mogu biti i opasne jer neadekvatna oksidacija može izazvati oštećenje ćelije. Slobodno gvožđe u biološkim sistemima mijenjajući oksidaciona stanja može da utiče na generisanje slobodnih radikala. Da bi se organizam zaštitio a gvožđe obavljalo svoju fiziološku funkciju odvojeno je proteinima u toku apsorpcije, transporta i deponovanja [80].

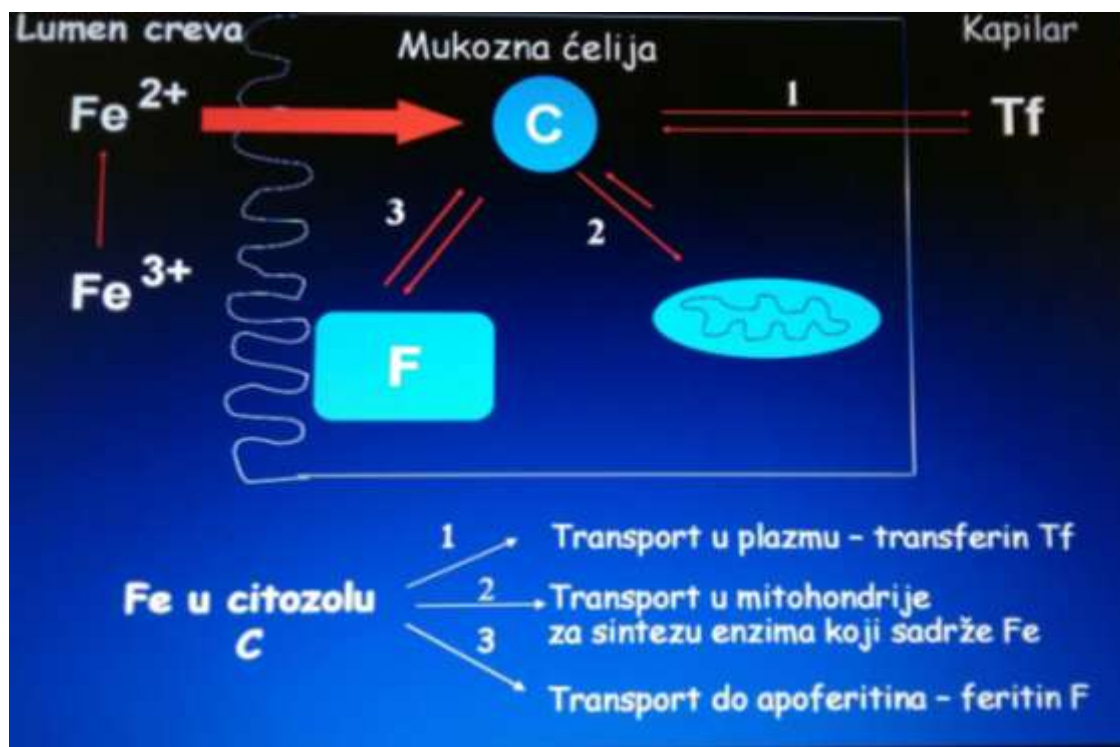
Među mnogobrojnim funkcijama gvožđe je esencijalno za razvoj nervnog sistema. Mijelizacija, neurotransmisija, dendritogeneza i neurometabolizam direktno zavise od gvožđa [81-83].

Status gvožđa kod novorođenčeta predstavlja balans između porasta gvožđa tokom gestacije, njegove potrošnje i gubitaka i potrebno je da se unosi postnatalno, prirodnim putem ishranom ili supelmentima [82].

Nedostatak gvožđa kod novorođenčadi može da izazove dugotrajne posljedice na kongitivne, socioekonomske i motorne funkcije [83]. Zbog toga je veoma važno da sadržaj gvožđa bude optimalan jer i nedostatak i višak mogu imati štetne posljedice po zdravlje.

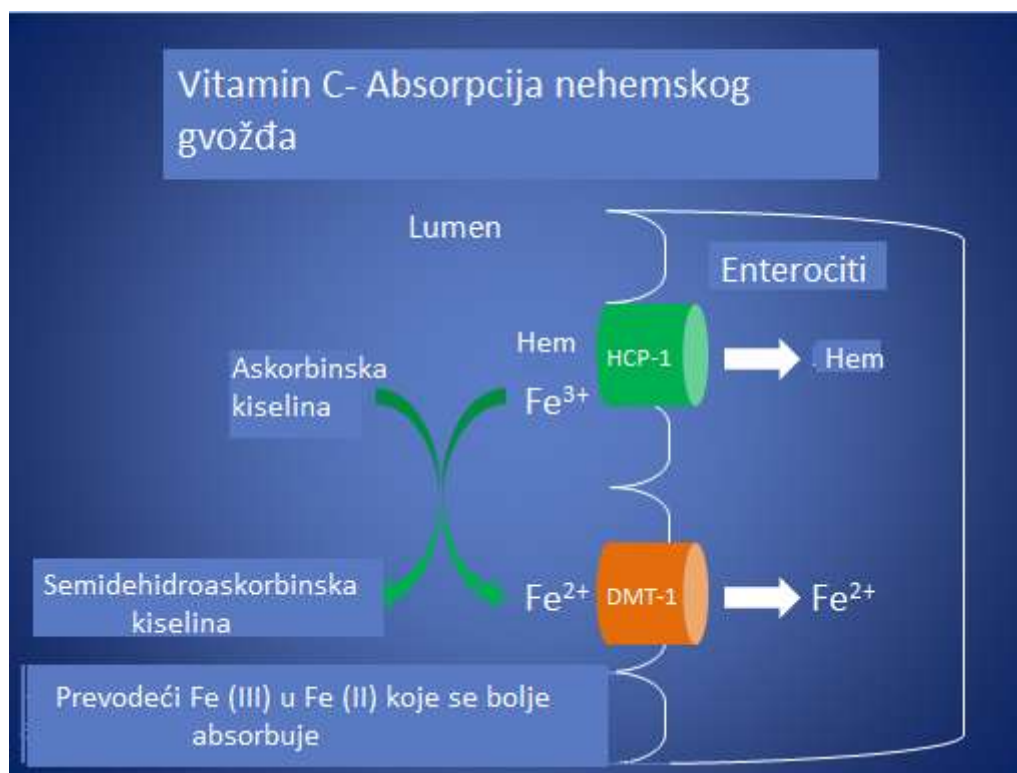
Jedan od važnih regulatornih koraka u sadržaju gvožđa je njegovo preuzimanje u enterocitima. Gvožđe se apsorbuje u enterocitima kao hemska i nehemska gvožđe (u fero i feri obliku). Gvožđe u hemu je rastvorno u duodenumu i apsorbuje se kao samostalni metaloprotein preko protein nosača hema1 (HCP-1) (Slika 1). Fero jon se

zatim otpušta iz hema preko hem oksigenaze [84]. Količina gvožđa koja se usmjerava u cirkulaciju ili u rezervni depo zavisi od potreba organizma. Gvožđe koje neposredno ne pređe u krv vezuje se u ćeliji za apoferitin. Apoferitin je protein koji ima sposobnost da ga vezuje i tako opterećen gvožđem naziva se feritin.



Slika 1. Apsorpcija gvožđa

Nevezano gvožđe se apsorbuje u enterocitima kao fero ili feri jon. U duodenumu se ne-hemsko gvožđe prevodi u fero jon koji se bolje apsorbuje uz prisustvo askorbinske kiseline i duodenalnog citohroma B (DcyB) na površini ćelijske membrane [85]. Fero jon se zatim veže za dvovalentni metal transporter 1 (DMT1) i prenosi do enterocita (Slika 2) [84]. Ekspresija DcyB i DMT1 je regulisana sadržajem gvožđa u enterocitima, transkripcionim faktorima osjetljivim na hipoksiju i intracelularnom koncentracijom gvožđa [85,86].



**Slika 2.** Apsorpcije nehemskog gvožđa

Feri jon se veže za helatore i nakon ulaska u enterocite paraferitin ga redukuje i veže za mobilni feritin. Feri jon se otpušta u intracelularni prostor i koristi za ćelijski metabolizam, deponuje se kao feritin ili se prenosi iz enterocita [85,87].

Feroportin oslobađa gvožđe, hefestin (ferooksidaza) ga oksiduje i veže za transferin koji ga dalje transportuje. Oslobađanje gvožđa u krvotok iz enterocita je strogo regulisan proces. Kada ima dovoljno gvožđa hepcidin veže feroportin na površini enterocita indukujući degradaciju proteina. Gvožđe se oslobađa i ugrađuje u feritin u enterocitima gdje se gubi kada su ćelije uništene. Ekspresija hepcidina se povećava usljed hemohromatoza i zapaljenja, a redukuje se na račun povećanja eritropoeze, hipoksije i nedostatka gvožđa [84]. Produkcija hepcidina je takođe smanjena u toku trudnoće obezbjeđujući apsorpciju gvožđa kod majki [85].

Najnovije studije kod miševa su pokazale da su H-feritin i hepcidin neophodni za regulaciju efluksa intestinalnog gvožđa [88]. Feri jon se transportuje kroz krvotok prvenstveno vezan za transferin, protein koji ima dva mjesta vezivanja [80]. Dio

gvožđa je takođe vezan za albumin ili male molekule. U krvi 1/3 transferina je zasićena gvožđem. Vezivanje slobodnog gvožđa za proteine ne štiti organizam samo od slobodnih radikala već odvaja gvožđe od bakterija koje ga koriste za reprodukciju [88].

Neke informacije o nedostatku gvožđa kod humanog fetusa mogu se dobiti na osnovu praćenja njegovog nedostatka tokom trudnoće jer je sprovođenje studija na fetusu veoma teško. Mnogi dokazi su dostupni i iz literaturnih podataka praćenja suplementacije gvožđem tokom trudnoće. Placenta se prilagođava povećanju transporta gvožđa u fetusu i štiti ga čak i u slučaju nedostatka gvožđa kod majki sve dok ne dođe do ozbiljnog nedostatka. Mnoge studije su potvrdile da na rođenju nema razlike u statusu gvožđa (hemoglobin u krvi, serumsko gvožđe i feritin, ukupan kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC)) između suplementiranih i nesuplementiranih majki, mada je u serumu veća koncentracija feritina kod novorođenčadi anemičnih majki [89].

Suplementacija majki u toku trudnoće može da spriječi pojavu anemije kod novorođenčadi. Kod novorođenčadi rođenih sa niskim zalihama feritina nastavlja se smanjivanje zaliha gvožđa u toku prve godine, u odnosu na kontrolnu grupu od 9 do 12 mjeseci starosti [90].

U prvih 6 mjeseci života zalihe gvožđa na rođenju trebale bi da zadovolje potrebe novorođenčeta. Ove zalihe gvožđa nastaju u zadnjem trimestru u toku poslednjih nedelja trudnoće. Međutim ukoliko se dijete rodi prije vremena (npr. u 37 nedelji) tada je i vrijeme stvaranja zaliha gvožđa skraćeno. Bez dovoljnih količina gvožđa u tom periodu usporen je rast te se potrebe za gvožđem nakon rođenja ne mogu normalno održati [91].

Tokom prva dva mjeseca života, koncentracija hemoglobina opada zbog boravka novorođenčeta u okolini bogatoj kiseonikom u odnosu na fetus. Takva situacija omogućava da se gvožđe redistribuira iz crvenih krvnih zrnaca u zalihe gvožđa. U normalnim okolnostima ima dovoljno gvožđa za potrebe novorođenčeta u prvih 6 mjeseci života. To gvožđe prvenstveno potiče iz zaliha gvožđa majki, čime se i objašnjava činjenica da u prvih 6 mjeseci limitirane koncentracije gvožđa u majčinom

mlijeku ne predstavljaju problem. Iako majčino mlijeko sadrži gvožđe koje je nezavisno od statusa gvožđa kod majki, sadržaj ovog gvožđa je ipak limitiran. Nakon 6 mjeseci potrebe za gvožđem su najveće i moraju se nadoknaditi kroz ishranu. Prijevremeno rođene bebe nemaju benefite od zaliha gvožđa koje nastaju u zadnjem trimestru jer su rođene ranije. Zbog toga prijevremeno rođena djeca sa manjom tjelesnom težinom zahtijevaju dodatak gvožđa i u prvih 6 mjeseci života [92,93].

Tokom trudnoće veći dio gvožđa u organizmu se koristi sa ciljem da obezbijedi snabdijevanje krvi kao i da podrži mnogobrojne fizičke promjene kod majke, fetusa i placente. Potrebe za gvožđem kod trudnica su duplo veće. Kao posljedica nedostatka gvožđa tokom trudnoće može dovesti do prijevremenog porođaja, smanjene težine novorođenčeta, smrti bebe i/ili majke. Do smrti majke može doći usljed nemogućnosti krvnih ćelija da prenose kiseonik do srca [94].

Kod djece sa nedostatkom gvožđa javljaju se određeni problemi sa okolinom, više su stidljivi, neodlučni, povučeni i teško ih je umiriti. Ozbiljan nedostatak gvožđa izaziva i velike razlike u socioemotivnom ponašanju [95].

Na osnovu studije praćenja uticaja suplementacije gvožđem na djecu primijećeno je da dolazi do povećanja psihomotornog indeksa razvoja u 13. mjesecu starosti što ukazuje na moguće benefite suplementacije dojene novorođenčadi [96]. Američka pedijatrijska akademija preporučuje da novorođenčad koja se samo doje primaju 1 mg/kg Fe na dan u prva 4 mjeseca starosti [97].

Za razvoj nervnog sistema gvožđe je neophodno jer je uključeno u ćeljski metabolizam i kao kofaktor enzima koji učestvuju u sintezi i kontroli neurotransmitera i različitih hormona (kao npr. dopamine, efedrin, norefedrin i serotonin) [81]. Ispitivana je takođe i korelaciju između uticaja sadržaja feritina u krvi i mentalnih i psihomotornih testova kod petogodišnjaka. Djeca sa nižim sadržajem feritina u serumu su bila lošija na testovima [98].

Na osnovu kohortne studije slučaja kod petogodišnjaka, rođenih sa malom tjelesnom težinom, ispitan je uticaj suplementacije gvožđem na razvoj nervnog sistema.

Studija je ukazivala na činjenicu da se nervni sistem bolje razvio kod one djece koja su ranije počela sa suplementacijom gvožđem, ali nije u potpunosti dokazana [99].

Visoke koncentracije gvožđa mogu imati negativne efekte po zdravlje. Gvožđe kao pro-oksidant može da ošteti lipide, polisaharide, DNK i proteine formirajući slobodne radikale [80]. Gvožđe prije svega izaziva peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina u slučaju kada odgovarajući antioksidans, posebno vitamin E, nije dostupan [100].

Obezbjedivanje povećanih doza gvožđa je praktično bezbjedno kod prijevremeno rođene djece koja su pod povećanim oksidativnim rizikom uključujući i nerazvijen antioksidativni sistem odbrane [101]. Povećane doze gvožđa mogu da uzrokuju povećanje oksidativnog stresa koji vodi ka nekim komplikacijama kao što su retinopatija ili bronhopulmoralna displazija kod prijevremeno rođenih beba [102,103]. Kratkotrajne studije su pokazale da gvožđe ne indukuje oksidativni stres ako se daje prijevremeno rođenim bebama sa smanjenom težinom u dozama od 2-12 mg/dan ili dva puta dnevno 9 mg/kg na dan [104,105].

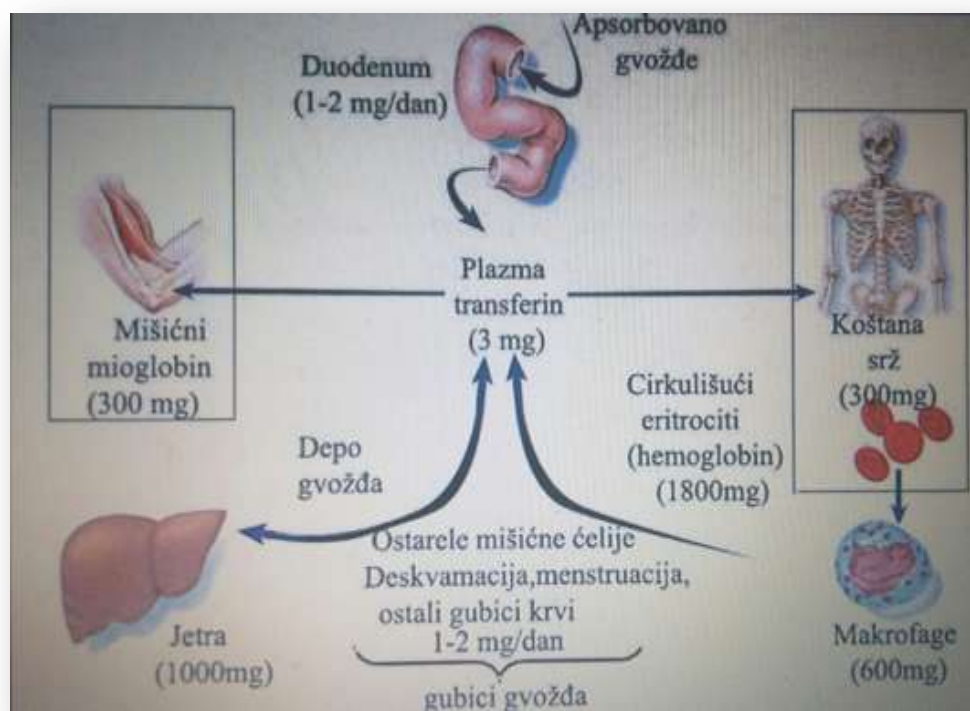
Način ishrane prijevremeno rođenih beba (infant formula, majčino mlijeko, sojino mlijeko ili upotreba fortifajera) je izuzetno važan za distribuciju gvožđa, zbog povećanog rizika od njegovog nedostatka. Intestinalni epitel se brzo razvija nakon porođaja, stimulišući faktore rasta u amniotskoj tečnosti, kolostrumu i majčinom mlijeku [106].

Prijevremeno rođene bebe imaju smanjene zalihe gvožđa i brže gube krv, stoga je rana suplementacija neophodna. Majčino mlijeko predstavlja najbolji izbor ishrane, ali samo po sebi ne obezbeđuje dovoljno nutrijenata za rast prijevremeno rođene djece. Apsorpcija gvožđa zavisi od sastava proteina.

Poređujući apsorpciju Fe iz majčinog mlijeka, infant formula kravljeg mlijeka i soja formula, dokazano je da se najbolje apsorbuje gvožđe iz majčinog mlijeka [107,108]. Iako se gvožđe iz majčinog mlijeka najbolje apsorbuje, njegove količine su prilično niske tako da se preporučuje dohrana odgovarajućim formulama. Procijenjene dnevne potrebe za prijevremeno rođene bebe su 2-4 mg/kg na dan, koje mogu biti manje ako se krv daje transfuzijom. Američka pedijatrijska akademija preporučuje da



se novorođenčad koja se ne doje hrane infant formulama obogaćenim gvožđem i primaju najmanje 2 mg/kg na dan elementarnog gvožđa, oralno, u period od 1-12 mjeseci [97]. Put apsorbovanog gvožđa u organizmu prikazan je na slici 3.



**Slika 3.** Raspodjela i deponovanje Fe u organizmu

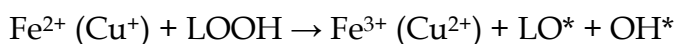
Hem je važan dio enzima koji učestvuju u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta u tijelu, što mu daje antioksidativna svojstva. Međutim, gvožđe takođe može katalizovati reakcije u kojima dolazi do stvaranja slobodnih radikala. Gvožđe je jedinstveno po tome što se može prebacivati između +2 i +3 stanja. Slobodni radikali su sporedni proizvodi metabolizma kiseonika, povezani sa nizom hroničnih bolesti. Da bi se zaštitilo od toga, tijelo ima sigurnosni mehanizam koji reguliše količinu apsorbovanog gvožđa na osnovu individualnog statusa gvožđa zahvaljujući blokadi sluznice [91,92].

Gvožđe ima zadatak prenosnika elektrona između kiseonika i bioloških molekula [109,110]. Područje oksidacije organskih jedinjenja u prisustvu gvožđa i vodonik peroksida naziva se Fentonova reakcija, u čast Henry John Horstman Fentonu koji je u 19. vijeku sprovodio istraživanja vezana uz oksidaciju vinske kiseline [111].

Hidroksilni radikal (HO<sup>\*</sup>), jedan od najsnažnijih poznatih oksidansa, može nastati Fentonovom reakcijom:



Gvožđe može reagovati i s lipidnim hidroperoksidima (LOOH), dajući reaktivne lipidne alkoksilne radikale LO<sup>\*</sup> koji dalje učestvuju u širenju lipidne oksidacije:



Gvožđe je direktno povezano s lipidnom peroksidacijom, a ta je pojava praćena povećanjem malondialdehida (MDA) i drugih reaktivnih jedinjenja sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) [112]. Unos velikih količina gvožđa i bakra dovodi do degenerativnih bolesti mozga i razvoja tumora, a zabilježene su i promjene u aktivnosti superoksid dismutase. Također, gvožđe je odgovorno za promjene u metabolizmu prostaglandina E2 [113].

S obzirom na to da su slobodni radikali toksični za ćelije, tijelo je razvilo specifičan antioksidativni sistem koji zavisi od antioksidativnih supstanci (Tabela 1). Mehanizmi odbrane tkiva od štetnih uticaja slobodnih radikala obuhvataju vitamin C, vitamin E i beta-karoten (i ostale karotenoide) kao glavne izvore vitaminskih antioksidanasa. Osim toga, neki metaloenzimi kao što su glutation peroksidaza (Se), katalaza (Fe) i superoksid dismutaza (Cu, Zn i Mn) su takođe značajni u zaštiti unutrašnjih ćelijskih komponenti od oksidativnih oštećenja. Tek kad se ti metali unesu hranom u dovoljnim količinama organizam može sintetisati enzime ovih antioksidanasa. Nasuprot tome, nedostatak tih elemenata uzrokuje oksidativni stres i oštećenja bioloških molekula i membrana [114].

Bakar je potreban za apsorpciju gvožđa, metabolizam gvožđa i za stvaranje crvenih krvnih zrnaca. Gvožđe se akumulira u jetri sa deficitom bakra, što znači da je bakar potreban za transport gvožđa. Velike doze gvožđa mogu smanjiti apsorpciju cinka iz suplemenata. Međutim, kada se uzima s hranom, dodatno gvožđe ne usporava apsorpciju cinka. Kalcijum usporava apsorpciju hemske i nehemske gvožđa kada se konzumiraju zajedno u obroku [92].

**Tabela 1.** Vitamini i minerali u antioksidativnom sistemu [115]

Nutrijent	Komponenta (nalaženje u ćeliji)	Funkcija
Vitamin C	Askorbinska kiselina (citosol)	Reaguje sa nekoliko vrsta ROS/RNS
Vitamin E	$\alpha$ -tokoferol (membrane)	Raskida veze u masnim kiselinama peroksidaciona lančana reakcija
$\beta$ -karoten	$\beta$ -karoten (membrane)	Sprečava inicijaciju peroksidacije lančane reakcije masnih kiselina
Se	Glutationperoksidaza (citosol)	Enzim koji konvertuje $H_2O_2$ u $H_2O$
Cu i Zn	Superoksid dizmutaza (citosol)	Enzim koji konvertuje superoksid u $H_2O_2$
Mn i Zn	Superoksid dizmutaza (mitohondrije)	Enzim koji konvertuje superoksid u $H_2O_2$
Cu	Ceruloplazmin (vodena faza)	Antioksidativni protein koji sprečava Cu i Fe da učestvuju u reakcijama oksidacije
Fe	Katalaza (citosol)	Enzim (u jetri) koji prevodi $H_2O_2$ u $H_2O$

### 2.1.2. Bakar

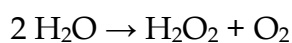
Bakar je potreban za korišćenje gvožđa i kao kofaktor za enzime uključene u metabolizam glukoze, kao i za sintezu hemoglobina, fosfolipida i vezivnog tkiva. Njegov deficit je rijedak, osim u uslovima teške nehranjenosti.

Zrelo humano mlijeko sadrži bakar u koncentraciji od 0,3 mg/l. Koncentracija bakra se smanjuje sa kasnijim dojenjem, od 0,6 mg/l u prvoj i drugoj sedmici dojenja, do 0,36 mg/l 6-8 sedmica, a od 0,21 do 0,25 mg/l do 20 sedmica dojenja. Ne postoji značajna korelacija između koncentracije bakra u mlijeku i unosa bakra iz hrane. Bakar u majčinom mlijeku se vezuje za albumin i citrat, a može se naći i u membrani masne globule, iako ligand još nije poznat [116].

Bakar ima važnu ulogu u ljudskom metabolizmu, uglavnom zato što omogućava pravilno funkcionisanje mnogih značajnih enzima [10]. Bakar je neophodan za održavanje jačine kože, krvnih sudova, epitelnog i vezivnog tkiva u cijelom tijelu. Cu učestvuje ustvaranju hemoglobina, mijelina, melanina, i omogućava normalno funkcionisanje štitne žlijezde [10,117].

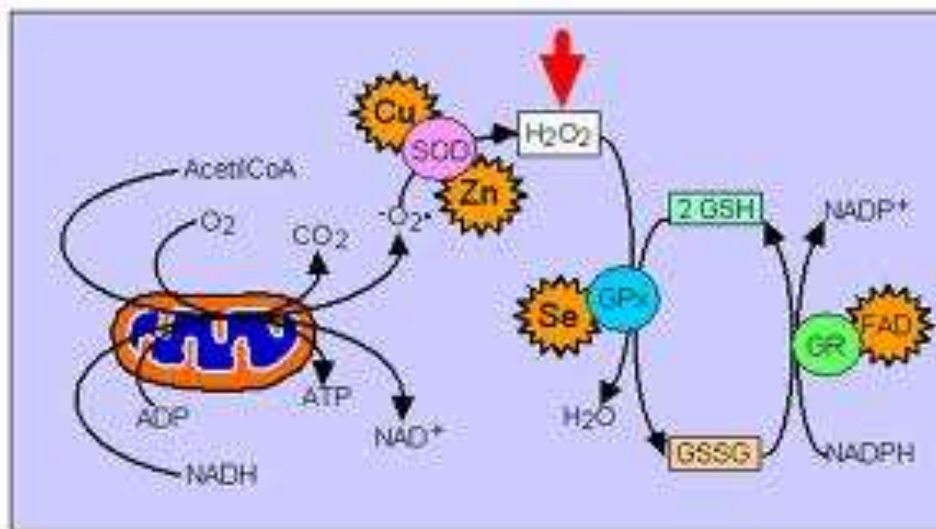
Bakar može djelovati i kao antioksidans i kao prooksidans. Slobodni radikali se prirodno nalaze u tijelu i mogu da oštete zidove ćelija, budu u interakciji sa genetskim materijalom i doprinesu razvoju niza zdravstvenih problema i bolesti. Kao antioksidans, Cu neutrališe slobodne radikale i može da smanji ili spriječi štetu koju izazivaju [118–120]. Kada bakar djeluje kao prooksidans, podstiče štetne efekte slobodnih radikala i može da doprinese razvoju Alchajmerove bolesti [121,122]. Održavanje odgovarajuće dijetetske ravnoteže bakra, zajedno sa drugim mineralima poput cinka i mangana, veoma je važno [118].

Proteini bakra imaju različite uloge u biološkom transportu elektrona i transportu kiseonika, procesima koji iskorištavaju jednostavnu interkonverziju Cu (I) i Cu (II) [123]. U citohrom C oksidazi, koja je potrebna za aerobno disanje, bakar i gvožđe zajednički utiču na smanjenje kiseonika. Bakar se takođe nalazi u Cu/Zn superoksid dizmutazi (SOD), enzimu koji vrši detoksifikaciju superoksida, pretvarajući ga u kiseonik i vodonik peroksid [124]:

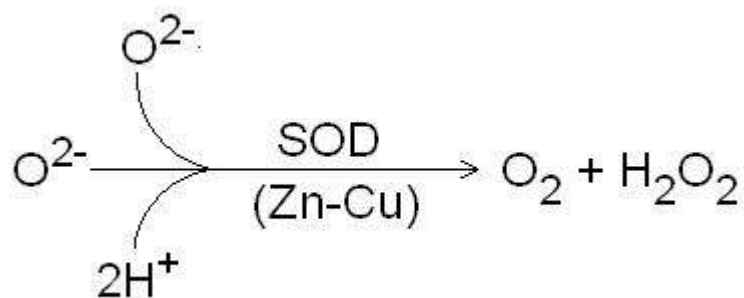


Bakar je takođe komponenta lizil-oksidaze, enzima koji učestvuje u sintezi kolagena i elastina, dva važna strukturna proteina koji se nalaze u kostima i vezivnom tkivu. Superoksid radikali se stvaraju tokom normalnog metabolizma, kao i kad leukociti napadaju invazivne bakterije i viruse (fagocitoza). Ako se brzo ne eliminišu, superoksid radikali prouzrokuju oštećenja na ćelijskim membranama [118,120]. Ukoliko bakar nije prisutan u dovoljnim količinama, aktivnost superoksid dizmutaze je smanjena, a oštećenje ćelijske membrane izazvano superoksidnim radikalima je

veće. Kada djeluje u okviru tog enzima, bakar radi zajedno sa mineralnim cinkom, a odnos bakra i cinka, a ne apsolutna količina bakra ili cinka samih po sebi, pomaže odgovarajućem funkcionisanju enzima (Slika 4 i 5) [117,125].



**Slika 4.** Cu/Zn SOD najviše prisutna u citoplazmi



**Slika 5.** Mehanizam dejstva SOD

Humano mlijeko sadrži 200 - 600  $\mu\text{g/l}$  bakra. Apsorpcija iz majčinog mlijeka je visoka zbog prisustva liganda koji olakšavaju apsorpciju. Kravljje mlijeko sadrži oko 150  $\mu\text{g/l}$ . Sastav formula za odojčad se razlikuju u svijetu [124].

Deseto izdanje Američkog odsjeka za poljoprivredu za preporučeni dnevni unos (RDI-recommended daily intake) nije uključivalo RDI za bakar, već je predložen

bezbjedan i odgovarajući dnevni unos [126]. Neki nutricionisti misle da komisije koje ustanovljavaju RDI treba da se vrate tradiciji iz prethodnih publikacija i daju preporuke koje zadovoljavaju funkcionalne potrebe, jer nedostatak preporučenog dnevnog unosa za bakar može biti opasan za zdravlje [126,127]. Tabela 2 prikazuje preporučeni dnevni unos (RDI) bakra za djecu i odrasle i tolerantne nivoe unosa bakra TIL (tolerable intake limits) [128,129].

Bakar se apsorbuje u želucu i tankom crijevu (40% ukupno unesenog bakra), što zavisi od načina ishrane i prisustva drugih minerala. Apsorbovani bakar transportuje se vezan za albumin u portalnoj cirkulaciji ka jetri. Ceruloplazmin nastaje u jetri i veći dio bakra cirkuliše u krvi vezan za ceruloplazmin. Bakar vezan za ceruloplazmin se razmjenjuje na dnevnom nivou, tako da ceruloplazmin ne može da igra glavnu ulogu u apsorpciji i transportu. Preostali bakar se vezuje za albumin i vjeruje se da predstavlja pravi transportovani bakar [127].

**Tabela 2.** Preporučeni dnevni unos (RDI) i prihvatljiv nivo unosa (TIL) bakra

Godine	Žensko (µg)	Muško (µg)	Prihvatljiv unos-gornji limit (µg)
0-6 mjeseci	200	200	<b>Nije moguće definisati, Cu potiče isključivo iz hrane i infant formule</b>
7-12 mjeseci	220	220	
1-3 godina	340	340	1000
4-8 godina	440	440	1000
9-13 godina	700	700	5000
14-18 godina	890	890	8000
19+ godina	900	900	10000
Trudnoća	1000		8000 (14-18 god.) 10000 (19+ god)
Laktacija	1300		8000 (14-18 god.) 10000 (19+ god)

Količina bakra koju sadrži ljudsko tijelo je 100-150 mg. Potrebnu dnevnu količinu bakra od 1-2 mg generalno obezbjeđuje normalna ishrana. Bakar je komponenta mnogih oksidoreduktaza. Različiti faktori u ishrani mogu uticati na biorasploživost bakra. Poznato je da djeca apsorbuju više bakra iz majčinog mlijeka nego iz kravljeg.

Povećane koncentracije kompleksnih agenasa kao što je fitat, dijetetskavlakna, minerala kao što su cink, gvožđe i kalcijum kao i vitamina C smanjuju apsorpciju.

Uzimanje suplementa cinka može dovesti do smanjenog djelovanja bakar-cink-superoksid dizmutaze u eritrocitima. Stoga dnevna količina cinka od 50 mg, što je količina četiri puta veća od preporučene, smanjuje aktivnost superoksid dizmutaze za 20%. Drugi minerali kao što je gvožđe, kalaj, kalcijum, fosfor, kadmijum i molibden mogu imati interakciju sa bakrom, a njihov efekat kod ljudi je slabiji nego kad je cink u pitanju. Interakcija između bakra i askorbinske kiseline nije jasno poznata. Moguće je da se  $\text{Cu}^{2+}$  joni redukuju askorbinskom kiselinom do  $\text{Cu}^{+}$  jone, što smanjuje apsorpciju bakra u tijelu. S druge strane, bioraspoloživost povećavaju određene esencijalne aminokiseline, kao i oksalat i fumarat [71,130].

Postoje dvije uloge bakra. Kao sastojak superoksid dizmutaze može doprinijeti antioksidantskoj aktivnosti. Kao kofaktor za apo-bakar-cink-superoksid dizmutazu, bakar može da zaštiti od štetnih uticaja slobodnih radikala proteine, membranske lipide i nukleinske kiseline u različitim ćelijama i organima. Ovaj enzim je, dakle, važan antioksidans. Aktivnost superoksid dizmutaze u eritrocitima može se koristiti za procjenu statusa bakra kod ljudi.

Osim učešća u metabolizmu gvožđa, bakar je takođe uključen u formiranje eritrocita (crvenih krvnih zrnaca), to jest u hematopoezu, naročito u stvaranje hemoglobina (crvenog krvnog pigmenta). Bakar je dio ceruloplazmina, koji katalizuje oksidaciju dvovalentnog do trovalentnog gvožđa, što se opisuje kao aktivnost feroksidaze ovog enzima. Dakle, usljed izrazitog deficita bakra (mikrocitičnog) može doći do anemije. Uz to bakar učestvuje u formiranju kolagena i elastina u vezivnom tkivu, a doprinosi i sintezi epinefrina i norepinefrina u adrenalnom i nervnom sistemu. Bakar je potreban i za formiranje melanina u koži. Ovaj element utiče i na stimulaciju imunog sistema i sprječavanje upala [131].

S druge strane, slobodni bakar ima potencijal da izazove prooksidantski efekat. Detaljne studije u protekle dvije decenije pokazale su da se redoks aktivni metali kao što su gvožđe, bakar, hrom, kobalt i drugi podvrgavaju redoks cikličnim reakcijama i posjeduju sposobnost da proizvedu reaktivne radikale poput superoksid anjon

radikala i azot-oksida u biološkim sistemima. Poremećaj homeostaze jona metala može dovesti do oksidativnog stresa, stanja u kom povećano formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta razbija antioksidativnu zaštitu organizma, a zatim dovodi do oštećenja DNK, lipidne peroksidacije, modifikacije proteina i drugih efekata, što je simptomatično za brojne bolesti, uključujući kancer, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, aterosklerozu, neurološke poremećaje, hronične upale i dr. [132].

Već 70-ih godina se pretpostavljalo da relativni ili apsolutni nedostatak bakra, sa većim unosom cinka u odnosu na bakar u ishrani vodi ka hiperholesterolemiji, što je potvrđeno različitim testovima na životinjama [133].

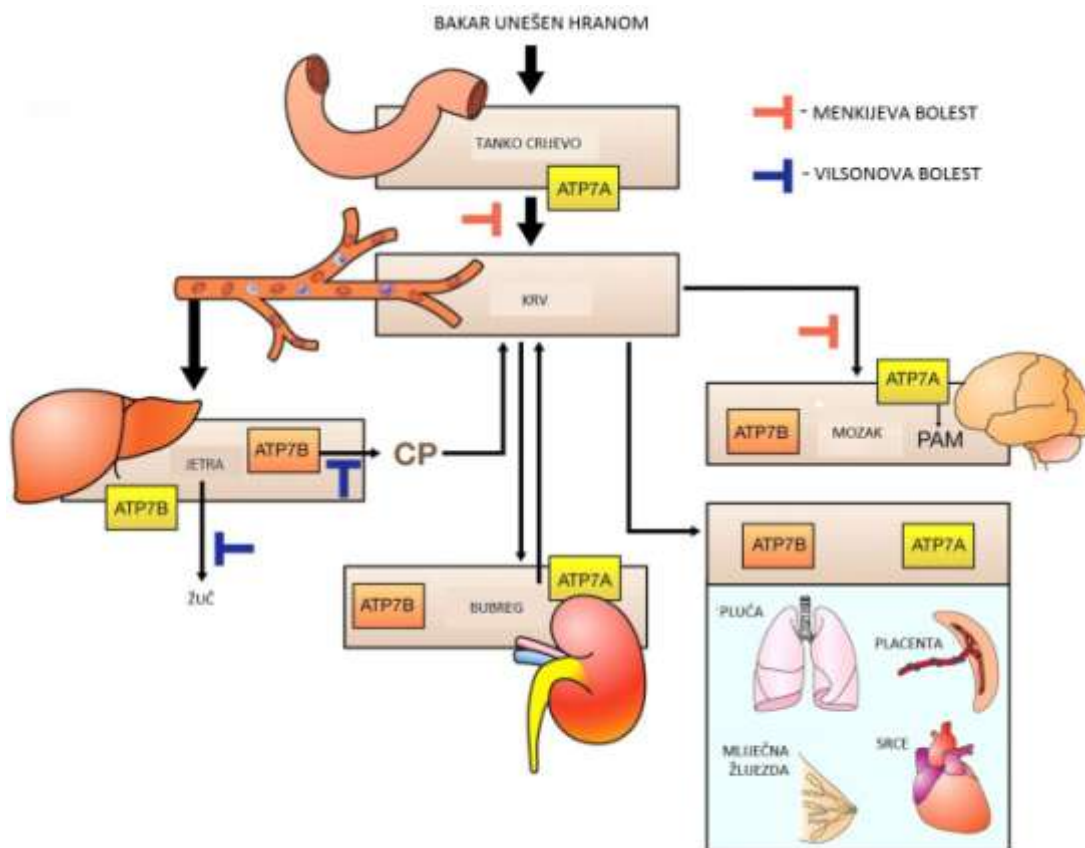
To se može objasniti pomoću dva mehanizma: smanjenom aktivnošću superoksid dizmutaze i visokim koncentracijama bakra. Povećano stvaranje lipidnih peroksida i smanjeno formiranje prostaglandina izazvano je nedostatkom bakra u aorti kroz sniženu aktivnost superoksid dizmutaze zasnovane na bakru. Pacovi čija je ishrana bila zasnovana na hrani sa deficitom bakra i obogaćenoj fruktozom prerano su uginuli zbog abnormalnosti srca. Ipak, sa istovremenim smanjenim unosom gvožđa nisu primijećene srčane abnormalnosti.

Kao drugi mehanizam, visok nivo bakra u vidu povećane koncentracije bakra u serumu treba smatrati nezavisnim faktorom rizika za koronarnu bolest srca. Slobodni bakar vodi *in vivo* do stvaranja slobodnih radikala, koji se pojavljuju u formiranju oksidisanog LDL-a putem lipidne peroksidacije ili holesterolske oksidacije, a time i do povećane aterogeneze. Ostali faktori, kao što su niske koncentracije selena ili antioksidanasa u serumu takođe igraju ulogu u cijelom tom procesu. Tako se "francuski paradoks" (pretpostavljena kompatibilnost između ishrane bogate mastima i niske učestalosti koronarne ateroskleroze) objašnjava uticajem fenolnih jedinjenja sadržanih u crnom vinu na oksidaciju LDL-a sa bakrom kao katalizatorom. S druge strane, kao komponenta superoksid dizmutaze, bakar takođe može biti efikasan kao antioksidans, razlažući dva superoksida ( $O_2^-$ ) na kiseonik ( $O_2$ ) i peroksid ( $H_2O_2$ ), koji potom koriste drugi enzimi (katalaza, glutation peroksidaza) [133].



Bolest koja nastaje usljed nedostatka bakra je rijetka osim kod određenih grupa, kao što su bebe sa veoma niskom težinom na rođenju, kod djece liječene od proteinsko-energetske neuhranjenosti ishranom baziranom na mlijeku s niskom koncentracijom bakra tokom dužeg perioda, kod djece sa dugotrajnom dijarejom i tokom parenteralne ishrane [127].

Nedostatak bakra dovodi do unutarćelijske abnormalnosti metabolizma gvožđa zbog slabog transporta gvožđa, izazivajući neefikasnu proizvodnju hema i hipohromsku anemiju koja ne reaguje na gvožđe. Kod prevremeno rođenih odojčadi nedostatak bakra može se manifestovati kao teška osteoporoza sa udubljenjima i iskrzanošću koštanih krajeva, periostalnom reakcijom i frakturom sub-metafize. Suplementacija prijevremeno rođenih beba 1% rastvorom bakar-sulfata (2-3 mg dnevno) dovodi do brzog i adekvatnog odgovora organizma u slučajevima deficita bakra [127]. Do sada su poznata dva stanja/sindroma izazvana poremećajem metabolizma bakra (slika 6). Wilsonova bolest (hepatolentikularna degeneracija) je autosomno recesivno stanje u kom dolazi do prekomjerne akumulacije bakra u tkivu. Akumulacija u eritrocitima, jetri, mozgu i bubrezima razlog je za većinu simptoma. Kod eritrocita dovodi do akutne hemolitičke anemije. Insuficijencija jetre praćena je cirozom i otkazivanjem jetre. Akumulacija bakra u nervnim ćelijama izaziva tremor, horeo-atetoidne pokrete i na kraju demenciju. Menkeov sindrom čelične boje kose je teško, na kraju i fatalno oštećenje centralnog nervnog sistema zbog poremećaja metabolizma bakra u ćelijama mozga [127].



Slika 6. Distribucija bakra u organizmu

Sadržaj bakra u humanom mlijeku je procijenjivan u tri studije. ICP-MS kao analitička metoda je korištena u 2 studije i FAAS u jednoj. Svi ispitivani uzorci su bili uzorci zrelog mlijeka. Uzorci mlijeka majki terminskih i prijevremeno rođenih beba su kombinovani u jednoj studiji dok period gestacije nije bio definisan u dvije studije [134]. Takođe informacije o upotrebi suplemenata na bazi bakra nisu postojale. Izmjerena srednja vrijednost sadržaja bakra na 95% intervala povjerenja (IP) za sve uzorke bila je 264,05 (206,64 – 321,46)  $\mu\text{g/l}$ .

### 2.1.3. Cink

U ljudskom organizmu cink ima 3 glavne funkcije: katalitičku, strukturnu i regulatornu. Cink je uključen u procese katalize preko enzima koji kontrolišu ćelijske procese, kao što su sinteza DNK, normalan rast i razvoj mozga, bihevioralni odgovor, reprodukcija, razvoj fetusa, stabilnost membrane, formiranje kostiju i zarastanje rana. Takođe ima strukturnu i funkcionalnu ulogu u proteinima koji učestvuju u replikaciji DNK i reverznoj transkripciji i izuzetno je značajan za funkcionisanje niza metaloproteina. Pored toga, cink reguliše enzimske aktivnosti i stabilnost proteina, kao aktivator ili inhibitor, i modulira proces prenosa celularnog signala [135].

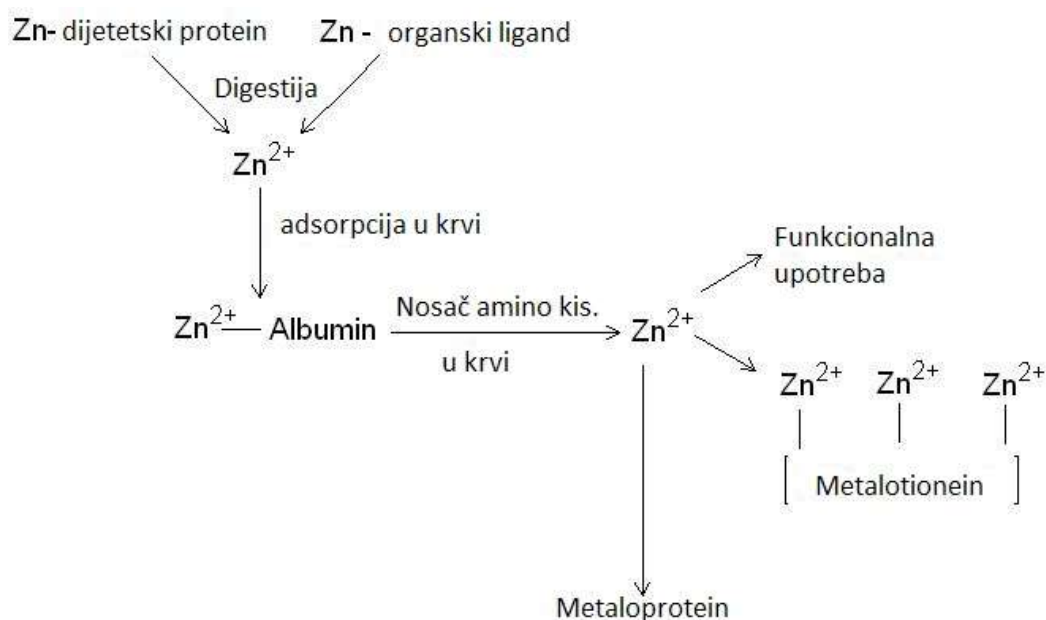
Cink koriste i reproduktivni hormoni i predstavlja kofaktor za mnoge enzime koji učestvuju u većini velikih metaboličkih procesa [3,136,137]. Uključen je u brojne aspekte ćelijskog metabolizma [138]. Procenjuje se da oko 10% ljudskih proteina potencijalno vezuje cink, pored onih koji ga transportuju i prenose u organizmu. Joni cinka su efikasni antimikrobni agensi čak i pri malim koncentracijama.

Put apsorpcije, transporta i skladištenja cinka u organizmu je veoma sličan kao kod gvožđa. Nakon što se cink unese preko hrane, apsorpcija počinje u tankom crijevu. Kada se cink apsorbuje u intestinalne ćelije, on indukuje sintezu metalotioneina - proteina koji vezuje cink. (Metalotionein i cink su analogni feritinu i gvožđu - i služe kao mehanizmi za vezivanje i skladištenje).

Cink mora biti vezan iz istih protektivnih razloga kao i gvožđe, jer slobodni cink može uticati na stvaranje slobodnih radikala koji oštećuju ćelije i mogu dovesti do pojave kancera. Cink se čuva (privremeno) u metalotioneinu. Međutim, ne postoje stalna skladišta cinka u organizmu, pa ako organizmu nije potreban cink, on se odbacuje zajedno sa ćelijom i izlučuje [91].

Metalotionein oslobađa cink (ili ga predaje) na albumin i transferin kojim se transportuje do tkiva kojima je potreban. Cink mora biti vezan za albumin ili transferin da ne bi došlo do nastajanja slobodnih radikala. Najveća koncentracija cinka kod ljudi se nalazi u mišićima (60%) i kostima (30%) [91,92].

U krvnoj plazmi, albumini (60%) i transferini (10%) vežu i transportuju cink (Slika 7) [139]. Pošto se transportom cinka prenosi i gvožđe, visoke koncentracije gvožđa mogu da smanje apsorpciju cinka, i obrnuto [140]. Koncentracija cinka u krvnoj plazmi ostaje relativno konstantna bez obzira na unos cinka [141]. Može da se čuva u rezervama metalotioneina i da se transportuje metalnim transporterom iz porodice ZIP i ZnT protein [142]. Metalotioneini u intestinalnim ćelijama imaju sposobnost prilagođavanja apsorpcije cinka za 15-40% [143]. Povećane koncentracije cinka otežavaju apsorpciju bakra, jer metalotionein apsorbuje oba metala [144].



Slika 7. Metabolizam cinka

Cink u majčinom mlijeku je važan biološki izvor ovog elementa za odojčad. Međutim, koncentracija cinka u mlijeku opada brže nego koncentracija drugih minerala, tokom dojenja [145,146]. Srednji prag unosa cinka od 13 mg/dan preko hrane tokom perioda laktacije neophodan je da se obezbijedi potrebna koncentracija u majčinom mlijeku [147].

Cink se luči u mlijeko preko različitih vrsta njegovih transportera koji se nalaze u mliječnoj žlijezdi. Izlučivanje cinka u majčinom mlijeku je aktivan proces transporta i

ima čvrsto regulisanu homeostazu [148,149]. Osim toga, homeostatička prilagođavanja metabolizma cinka u organizmu tokom perioda laktacije osigurava potrebnu koncentraciju u majčinom mlijeku [150].

Teorijski, koncentracija cinka u majčinom mlijeku ne zavisi od statusa Zn majke; ali rezultati iz prethodnih studija koje se odnose na povezanost između statusa Zn majki, unosa cinka, i koncentracije cinka u majčinom mlijeku su i dalje kontroverzni.

Ako su kod trudnice vrijednosti cinka u krvi ispod normale, može doći do nepravilnog razvoja fetusa u materici. Nedostatak ovog elementa u materici može negativno uticati na dugoročno funkcionisanje imunog sistema djeteta.

Nedostatak cinka kod majki može uticati i na neurološki razvoj i promjene u ponašanju djeteta. Nizak status cinka kod majki je povezan sa smanjenom pažnjom kod novorođenčadi i slabim motornim funkcijama kod odojčadi starosti 6 mjeseci. Nizak nivo cinka je takođe povezan sa brojnim negativnim ishodima u trudnoći. Ovo uključuje nisku težinu beba na rođenju, prijevremeni porođaj, komplikacije prilikom porođaja i urođene anomalije [151].

Kod odojčadi koja su rođena prije vremena postoji rizik od nedostatka cinka iz istog razloga koji je naveden i za gvožđe (gvožđe se skladišti kod djeteta u posljednjem trimestru trudnoće, a isto važi i za cink), međutim, obim njegovog nedostatka nije dovoljno dobro proučen.

Kako je fetusu cink veoma potreban, postoji povećani rizik da kod trudnica dođe do smanjenja nivoa cinka u organizmu. Ovo je posebno slučaj kada na početku trudnoće žene imaju granične vrijednosti cinka u krvi. Takođe, laktacija može uticati na smanjenje vrijednosti cinka kod majki [92].

Djeci mlađoj od godinu dana treba 5 mg cinka dnevno [152], tako da relativni nedostatak cinka može izazvati fizičke, kognitivne i poremećaje ponašanja [153]. Iako su trudnice, djeca i stare osobe rizične grupe, nedostatak cinka prisutan je u svim populacionim grupama [154]. U istraživanju sprovedenom u Iranu, koncentracija cinka u majčinom mlijeku, kod majki koje nijesu koristile suplemente cinka, u

četvrtom mjesecu dojenja je izosila  $1,29 \pm 0,57$  mg/l, što je manje od preporučenih referentnih vrijednosti (3 - 5 mg/l) [155].

Od 41 studija sprovedenih tokom skoro dvije decenije (1977-1994), samo 17 studija je pokazalo povezanost između lošeg statusa cinka majke i male težine djeteta na rođenju ili nepravilnog razvoja fetusa, pri čemu su rezultati bili ravnomjerno raspoređeni i između razvijenih i zemalja u razvoju, te nije dokazan ni uticaj geografskog porijekla [156]. Međutim, čini se da novije studije podržavaju vezu između statusa ili unosa cinka kod majke i težine djeteta na rođenju. Iako koncentracija cinka u mlijeku pada tokom prvih šest mjeseci, prosječna potrebna apsorpcija cinka iznosi 1,35 mg/dan [157]. Dodatne potrebe za cinkom kod djeteta u prvih šest mjeseci, kada je ishrana djeteta bazirana isključivo na dojenju, iznosi približno 227 mg, više nego duplo od potreba za cinkom tokom trudnoće. Ako pretpostavimo da je prosjek apsorpcije cinka 27%, dodatne potrebe nadoknađuju se dodatnim unosom 4 mg cinka na dan, što predstavlja povećanje od 50% u odnosu na period trudnoće i laktacije [9].

Majčinim mlijekom izluči se u prosjeku 2-3 mg cinka dnevno tokom prvog mjeseca, a do trećeg mjeseca oko 1 mg cinka dnevno, nakon čega koncentracija cinka nastavlja da opada do oko 0,5 mg/dan. Visoke potrebe cinka u ranoj laktaciji mogu biti djelimično zadovoljene aktivacijom zaliha cinka iz tkiva koja su se vratila na svoj normalan oblik nakon porođaja (materica i majčina krv) [9] i trabekularne kosti [158,159].

Distribucija cinka među raznim komponentama krvi se mijenja tokom trudnoće [160,161]. Koncentracija u plazmi ili serumu smanjuje se za 15% - 35% do kraja trudnoće u odnosu na period prije trudnoće ili početak trudnoće [162-164]. Ovaj pad nivoa cinka u plazmi se odnosi na ekspanziju volumena plazme koji se povećava za oko 40% do 30. nedelje trudnoće [156].

Preporučeni dnevni unos cinka RDI je naveden u tabeli 3 [9]. U tabeli su prikazane vrijednosti za dnevni unos cinka za bebe uzrasta 0-6 mjeseci [127,165]. Američki Nacionalni istraživački savjet postavio je dozvoljene gornje vrijednosti unosa za odrasle od 40 mg/dan [166,167].

**Tabela 3.** Preporučeni dnevni unos za Zn

Godine	Žensko (mg)	Muško (mg)	Trudnoća	Laktacija
0-6 mjeseci	2	2		
7-12 mjeseci	3	3		
1-3 godina	3	3		
4-8 godina	5	5		
9-13 godina	8	8		
14-18 godina	9	11	12	13
19+ godina	8	11	11	12

Nedostatak cinka može biti uzrok patuljastog rasta, nepravilnog seksualnog razvoja i anemije. Srednja vrijednost koncentracije cinka u zreлом majčinom mlijeku tokom prvih 6 mjeseci laktacije iznosi oko 2 mg/l, mada može varirati između 0,65 i 5,3 mg/l. Unos cinka adekvatnom ishranom nije povezan sa njegovim sadržajem u majčinom mlijeku i ne utiče značajno na nivo koncentracije u mlijeku. Cink je u majčinom mlijeku prisutan u serumskom albuminu 28%, kazeinu 14%, u masti 29% najvjerojatnije vezan za alkalnu fosfatazu u membranske masne globule dok se preostalih 29% nalazi u vodenom dijelu [26].

Cink je osnovni nutrijent za normalnu embriogenezu [168,169]. Najznačajnije sakupljanje zaliha cinka se dešava u posljednjem tromjesečju trudnoće. Između 24. i 34. nedelje trudnoće, prosječna dnevna količina cinka se kreće oko 850 mg/kg [170,171]. Skladišti se u jetri, kao cink metalotionein.

Ovaj protein koji veže cink je glavni izvor cinka za fetus i može zaštititi novorođenče od nedostatka cinka u neposrednom postnatalnom periodu [172,173]. Broj istraživačkih studija koje se odnose na procjenu kliničkog značaja nedostatka cinka za zdravlje majke i djeteta je ograničen [174–176] i odnose se na posljedice ozbiljnog nedostatka ovog elementa. Postoji nekoliko hipoteza o tome kako cink utiče na imuni sistem [177]. Za stvaranja i aktivnost T-limfocita – kojima se organizam brani od infekcije i bakterija – neophodno je prisustvo dovoljne količine cinka. Otuda i postoji veza između nedostatka cinka i povećane osjetljivosti na infekcije. Organizmu treba

cink radi stvaranja i aktiviranja T-limfocita, jer slabost timusa izazvan njegovim nedostatkom dovodi do povećane osjetljivosti na infekcije, posebno kod djece.

Druge dvije veze između cinka i imunološke funkcije su:

- 1) uloga cinka u kontroli smrti ćelija limfocita (poznata kao apoptoza), nepravilan proces umiranja ćelija limfocita negativno utiče na funkcionisanje imunog sistema
- 2) činjenica da je cink mitogen limfocita (tj izaziva ekspanziju imunih ćelija).

Međutim, dobro definisani, klinički nedostatak cinka je naveden u ograničenom broju slučajeva, koji je povezana sa nepotpunom parenteralnom ishranom, nedovoljnom apsorpcijom i upotrebom lijekova. Procjene zasnovane na analizi unosa cinka hranom i sastava ishrane u različitim djelovima svijeta ukazuju na to da je u populacijama mnogih zemalja u Aziji i Africi prisutan visok rizik za razvoj nedostatka cinka, dok je ovaj rizik nizak u evropskim zemljama i zemljama Sjeverne Amerike [178].

Absorbovani cink se transportuje u krv, uglavnom vezan za albumine. Najveći dio cinka u organizmu se nalazi unutar ćelija. Ukupan sadržaj cinka u tijelu odraslog čovjeka iznosi između 2 i 4 grama, od čega se oko 2/3 nalazi u mišićnom tkivu i 30% u koštanom tkivu.

Cink u plazmi čini samo 0,1% od ukupne tjelesne koncentracije cinka. Jedini biohemijski indikator, prema preporukama SZO/UNICEF/IAEA/IZiNCG (2007) za procjenu statusa cinka u populaciji (a ne individualno) je mjerenje koncentracije cinka u serumu ili plazmi.

Koncentracija cinka u serumu značajno opada kada je unos cinka u ishrani manji od 2 do 3 mg po danu, ali dolazi do blagog i stalnog povećanja kada je unos putem ishrane veći, dostižući maksimum kada unos iznosi od 25 do 30 mg/po danu [179].

Prema EFSA publikaciji iz 2014. godine, EN-629, 41 studija je sprovedena a 42 rada objavljeno o sadržaju cinka u humanom mlijeku [180]. Šest studija je rađeno nezavisno jedna od druge [15,181-185]. Najčešće korišćena analitička metoda za određivanje cinka bila je atomska absorpciona spektrometrija-AAS (25 studija); ICP-



MS je korišćena u 6 studija i voltometrija u jednom istraživanju. U 10 studija nije prikazana metoda za doziranje cinka.

Uzorci mlijeka su prikupljeni od majki beba rođenih u terminu (3 studije) i prijevremeno rođenih beba (6 studija), dok je u ostalim istraživanjima gestacioni period bio izmiješan/nedefinisan (27 studija). Uzorci mlijeka terminskih beba uključujući kolostrum obuhvaćeni su jednom studijom, prelaznog mlijeka (1 studija), zrelog mlijeka (1 studija) i miješani/nedefinisani (2 studije). Unos suplemenata na bazi cinka nije prikazan ni u jednom istraživanju. Procjena unosa cinka obuhvaćena je kroz 3 istraživanja [180,182,186].

Procjena statusa cinka (definisan kao koncentracija cinka u plazmi) je rađena u 8 studija [185,187-192]. Srednja vrijednost koncentracije cinka na 95% intervala povjerenja (IP) za sve uzorke iznosila je 2,06 (2,05 - 2,07) mg/l.

Na osnovu mjerenja srednje vrijednosti na 95% IP, najveći sadržaja cinka je nađen u kolostrumu 8,60 (5,03 - 12,17) mg/l, zatim ovaj sadržaj opada kod tranzicionog mlijeka i iznosi 2,72 (2,33 - 3,11) mg/l dok je kod zrelog mlijeka sadržaj cinka najmanji i to 1,48 (1,46 - 1,51) mg/l. Srednja vrijednost sadržaja cinka u mlijeku majki terminskih beba bio je i do 5 puta veći od humanog mlijeka prijevremeno rođenih odojčad i iznosio je na 95% intervalu povjerenja 2,51 (2,32 - 2,71) mg/l i 0,47 (0,39 - 0,55) mg/l, respektivno.

Dvije studije su pokazale značajnu korelaciju između sadržaja cinka u humanom mlijeku i plazmi majki [15,187]. Neke druge pak nisu utvrdile nikakav odnos između dijetetskog unosa cinka i njegovog sadržaja u majčinom mlijeku [15].

## 2.2. Metode pripreme uzoraka i instrumentalne metode analize elemenata u tragovima

U cilju određivanja sadržaja elemenata u tragovima u humanim uzorcima, uzorcima životne sredine i hrane od izuzetne važnosti je način pripreme uzoraka, odnosno uklanjanje organske materije i dobijanje kiselog rastvora sa neorganskim analitom. Priprema uzoraka može se vršiti na nekoliko načina i to razaranjem (digestijom), odnosno vlažnim i suvim putem. Ova dva načina pripreme koriste se za digestiju različitih vrsta uzoraka.

Digestija suvim putem predstavlja jednostavan postupak koji podrazumijeva žarenje uzoraka na 450-600°C u dužem vremenskom period i ne zahtijeva intenzivan laboratorijski rad i skupe hemikalije, a može se koristiti za analizu većeg broja uzoraka. Međutim osnovni nedostaci ovog postupka pripreme su dugo vrijeme koje je potrebno utrošiti za razaranje (12-24 h) kao i mogućnost gubitka lako isparljivih elemenata kao što su: bakar (Cu), gvožđe (Fe), živa (Hg), nikal (Ni), cink (Zn), arsen (As).

Drugi način pripreme uzoraka je digestija vlažnim putem koja omogućava prevođenje metala od interesa u rastvor za analizu. Za pripremu uzoraka digestijom vlažnim putem, uzorak se nakon odmjeravanja razara dodatkom različitih jakih kiselina (azotna, perhlorna, sumporna) i/ili oksidacionog sredstva (vodonik peroksid), a zatim se vrši zagrijavanje. Vlažna digestija može se izvoditi na dva načina: zagrijavanjem u otvorenim posudama (klasična digestija) ili u zatvorenom sistemu, mikrotalasna digestija. Prednosti postupka klasične digestije vlažnim putem u odnosu na digestiju suvim putem ogleda se u tome da je zbog primjene nižih temperatura smanjen gubitak isparljivih elemenata kao i kraći vremenski period pripreme. Međutim nedostaci ovog postupka su obiman laboratorijski rad, specijalne posude za pripremu uzoraka (u slučaju kada se koristi perhlorna kiselina) kao i priprema manjeg broja uzoraka po radnom ciklusu.

Kao efikasna alternativa klasičnoj digestiji vlažnim putem, posljednjih godina, mikrotalasna digestija se koristi za pripremu različitih vrsta uzoraka. Pod

kontrolisanim uslovima, povišene temperature i pritiska, u zavisnosti od vrste uzorka koji se priprema u mikrotalasnom sistemu, uzorak je u direktnom kontaktu sa kiselinom i/ili oksidacionim sredstvom u zatvorenoj posudi. Prednosti primjene mikrotalasne digestije u pripremi uzoraka su: mogućnost kontaminacije uzorka tokom digestije je svedena na minimum kao i gubitak lako isparljivih elemenata, smanjena potrošnja kiseline tokom pripreme uzorka i znatno kraće vrijeme digestije što omogućava veći broj analiza na dnevnom nivou (obično program sa hlađenjem traje max. 1 sat). Efikasnost mikrotalasne digestije zavisi od više faktora kao što su temperaturni program, radni pritisak, zapremine i vrste korišćene kiseline za pripremu uzoraka. Svaka mikrotalasna ima definisane programe u zavisnosti od vrste uzorka propisane od strane proizvođača.

Nakon digestije dobijeni rastvor može se analizirati u odnosu na sadržaj elemenata u tragovima različitim tehnikama kao što su: FAAS, GFAAS, ICP-OES i ICP-MS. Ove instrumentalne tehnike dijele se prema načinu dobijanja spektra na: optičke apsorpcione i optičke emisione metode.

Optičke apsorpcione metode zasnivaju se na mjerenju smanjenja intenziteta zračenja usled apsorpcije pri prolasku kroz ispitivanu supstancu. Optičke emisione metode zasnivaju se na ispitivanju svjetlosti koju emituje analizirana supstanca. Poređenje instrumentalnih tehnika za određivanje elemenata u tragovima prikazano je u tabeli 4, dok je opseg granica detekcije za ove tehnike prikazan na slici 8. (Atomic Spectroscopy, A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System, Perkin Elmer, 2009; [www.perkinelmer.com/atomicspectroscopy](http://www.perkinelmer.com/atomicspectroscopy)).

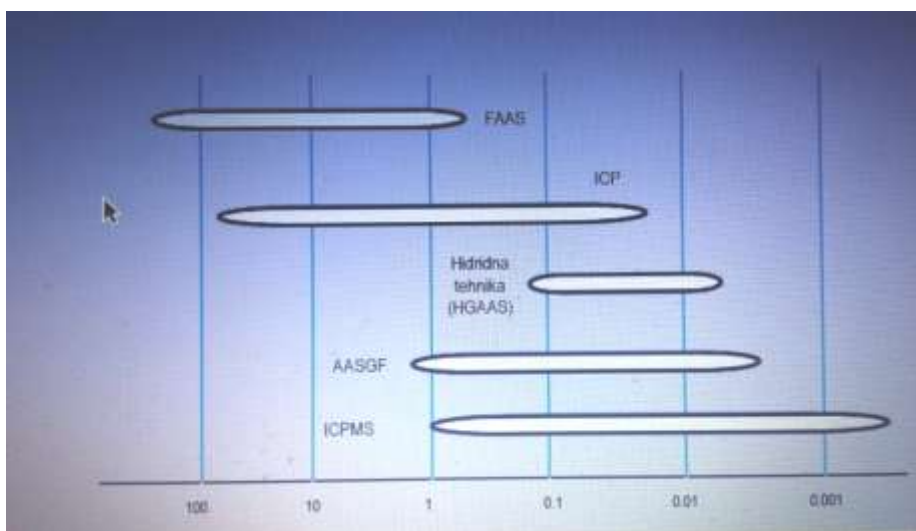
**Tabela 4.** Poređenje instrumentalnih tehnika za određivanje elemenata u tragovima

	FAAS	GFAAS	ICP-OES	ICP-MS
<b>Broj elemenata</b>				
Jedan	*			
Nekoliko		*		
Mnogo			*	*
<b>Opseg</b>				
ppb	*		*	
>ppb		*	*	*
>ppb-ppm				*
ppt				*
<b>Zapremina uzorka</b>				
>5ml	*	*	*	*
<1-2ml		*		

Danas su najčešće korišćene metode za određivanje elemenata u tragu plamena atomska apsorpciona spektrometrija i induktivno spregnuta plazma - optička emisiona spektrometrija.

Plamenom atomskom apsorpcionom spektrometrijom se detektuje jedan po jedan element i ponekad je neophodna predhodna priprema uzorka. Određivanje je brzo i tačno. Osim toga metoda daje dobru specifičnost i osjetljivost. FAAS je jeftinija tehnika i zahtijeva znatno niži nivo vještine i obučenosti analitičara u poređenju sa GFAAS. Vrijeme trajanja analize sa FAAS je kraće u poređenju sa GFAAS. Bez obzira na vrstu tehnike, FAAS i GFAAS zahtijevaju korišćenje šuplje katodne lampe za svaki analit od interesa. Metode koje uključuju aspiraciju razblaženih uzoraka seruma ili plazme kao i drugih bioloških uzoraka direktno u plamen AAS-a efikasne su u određivanju Fe, Cu i Zn. Elektrotermalne ili mikrometode bez plamena koriste samo 10 µl seruma i primjenjuju se za određivanje elemenata u ultratragu ili kod nedovoljne količine uzorka. Generalno, ova mikrometoda se koristi kada je koncentracija elementa u uzorku ispod 50 ng/l. Sadržaj elemenata u tragovima u raznim vrstama dječije hrane koja se konzumira u Turskoj određivan je plamenom i grafitnom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije [193]. Upoređivane su

suva, mokra i mikrotalasna procedura pripreme uzoraka, pri čemu je utvrđeno da je metoda mikrotalasne digestije najbolji postupak pripreme [193].

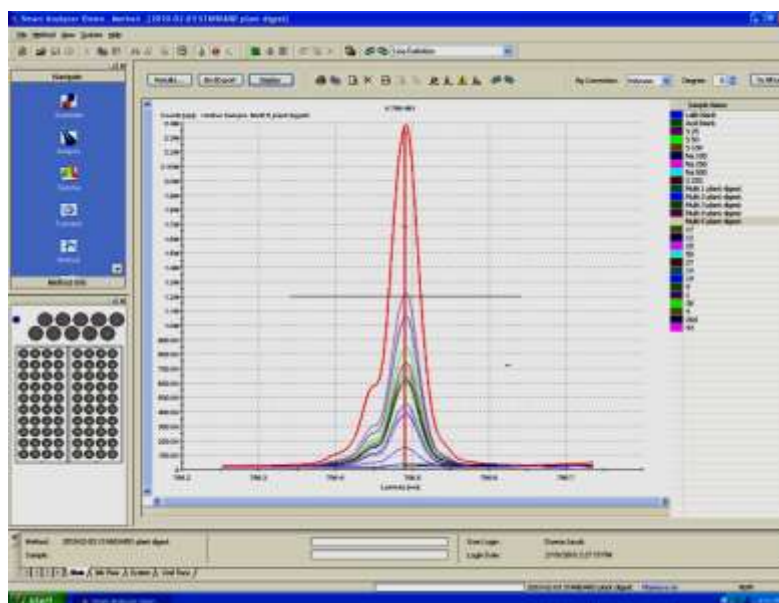


**Slika 8.** Opseg granica detekcije ( $\mu\text{g}/\text{l}$  ili ppb) za različite instrumentalne tehnike

Induktivno spregnuta plazma- optička emisiona spektrometrija (ICP-OES). ICP-OES ima mogućnost simultanog određivanja više elemenata i danas je kao metoda izbora zamijenila FAAS. Osim mogućnosti da simultano određuje više elemenata ICP-OES ima i širok linearni dinamički opseg, čak i do 1000 puta za većinu elemenata, što praktično znači simultano određivanje iz samo jednog razblaženja. Osim toga ICP-OES ima bolju preciznost i tačnost od FAAS i relativnu nezavisnost od hemijskih interferenci. ICP-OES-om se može analizirati veliki uzoraka na dnevnom nivou i u svakom uzorku odrediti po 20 i više elemenata. Za razliku od ICP-OES čija je granica detekcije u zavisnosti od ispitivanog matriksa i elemenata od interesa u opsegu od ppm-ppb, ICP-MS ima veću osjetljivost, sa mogućnošću detekcije koncentracionih nivoa i ispod ppt nivoa ( $1\text{ppm}=1000\text{ppb}=1000000\text{ppt}$ ). Vještine i obučenos analitičara za rad sa ICP-OES i ICP-MS su na višem nivou nego za FAAS i GFAAS, dok među ove četiri tehnike ICP-MS zahtijeva najveći stepen znanja i obučenos analitičara i ujedno je najskuplja tehnika od ovih instrumentalnih tehnika i zahtijeva

dotatne troškove održavanja. Ovakav sistem zahtijeva i dobru kompjutersku opremu za obradu podataka.

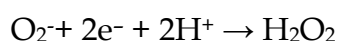
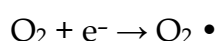
U optičkoj emisionoj spektrometriji (OES), vodeni rastvor uzorka se uvodi u jezgro induktivno povezane plazme argona (ICP), koji generiše temperaturu od približno 8000°C. Na toj temperaturi svi elementi postaju toplotno pobuđeni i emituju svjetlost na svojim karakterističnim talasnim dužinama. Spektrometar skuplja tu svjetlost koja prolazi kroz difrakcionu rešetku koja služi za razlaganje svjetlosti u spektar karakterističnih talasnih dužina za svaki element. U spektrometru se signal pojačava i njegov intenzitet se može pretvoriti u koncentraciju elementa i porediti sa standardima iz kalibracione krive (Sl. 9).



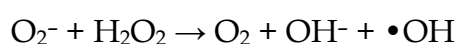
Slika 9. Izgled signala na ICP-OES

## 2.3. Mehanizam dejstva antioksidanasa

Kod aerobnih organizama kiseonik je neophodan za preživljavanje, međutim usljed svoje visoke reaktivnosti u procesu neadekvatnog metabolisanja ispoljava svoje toksične osobine opasne po organizam. Pri količinama 3-5% O<sub>2</sub> dolazi do redukcije sa manje od 4 elektrona tj. nastaju ROS koje mogu oštetiti ćeliju [194].



Toksični hidroksilni radikal može nastati u Haber-Weiss-reakciji:



i Fentonovoj reakciji:

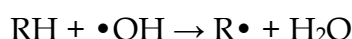


ROS i drugi slobodni radikali mogu nastati mnogim enzimskim i neenzimskim mehanizmima tj. pod dejstvom jona prelaznih metala, metaloproteina, jonizujućeg zračenje, aktivnosti redoks-enzima, toksičnih ksenobiotika, metabolizmom membranskih lipida, svjetlosti, toplote itd.

Hidroksiradikal (OH•), peroksi-radikal (ROO•), superoksid-anjon (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), i alkoksiradikal (RO•), spadaju u grupu najvažnijih ROS i radikalskih vrsta kao i neradikalske vrste - hipohloritna kiselina (HOCl), vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ozon (O<sub>3</sub>) i singlet-kiseonik (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Hidroksi-radikal je najreaktivniji i sposoban je da inicira lipidnu peroksidaciju. Drugu značajnu grupu toksičnih vrsta predstavljaju reaktivni oblici azota (RNS i RNOS). ROS i RNS utiču na oštećenja ćelijskih lipida, ugljenih

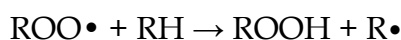
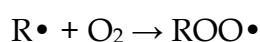
hidrata, proteina i DNK, pri čemu su posljedice po ćeliju katastrofalne (od smrti ćelije do neoplazija). Lipidna peroksidacija, tj. slobodnoradikalska oksidacija polinezasićenih masnih kiselina je jedan od najčešćih procesa. Slobodnim radikalima posredovane lančane reakcije uključuju procese inicijacije, propagacije, dekompozicije i terminacije [195].

### Inicijacija



RH - supstratni molekul, na primjer lipid, R• - početni radikal. Pod dejstvom •OH koji uzima proton sa molekula lipida, reakcija počinje, a kao rezultat nastaje slobodni -početni radikal sa konjugovanim dvostrukim vezama. Ovako dobijen radikal može reagovati sa slobodnim kiseonikom pri čemu nastaju peroksil radikali koji reaguju sa drugim molekulima polinezasićenih masnih kiselina, tj. mogu oksidovati lipide, proizvodeći lipidne hidroperokside (ROOH) koji se mogu prevesti u širok spektar jedinjenja, kao što su alkoholi, aldehidi, alkil-grupe, ketoni, ugljeni-hidrati i radikali, uključujući alkoksil-radikale (RO•).

### Propagacija



### Dekompozicija



Reakcije dekompozicije često uključuju jone prelaznih metala kao katalizatore u reakciji sličnoj onoj sa vodonik-peroksidom, dajući lipidne peroksil- i alkoksil-radikale.



## Terminacija

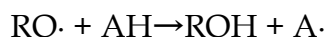
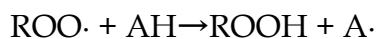
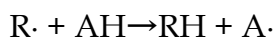
Prevođenje radikala u formu ne-radikalskih proizvoda:



Pod dejstvom  $\text{OH}\cdot$  može doći i do oštećenja proteina tako što su aminokiseline prolin, histidin, arginin, cistein i metionin izuzetno podložne dejstvu hidroksil radikala a samim tim i oksidativnim oštećenjima. Kao rezultat te reakcije dolazi do fragmentacija ili unakrsnog povezivanja, pri čemu proteini gube svoje prvobitne funkcije. Pod dejstvom ROS na DNK dolazi do promjena u azotnim bazama i raskidanja polinukleotidnih lanaca.

Primarni antioksidansi (AH) prisutni u tragovima mogu usporiti ili inhibirati inicijacioni korak pri čemu reaguju sa lipidnim radikalima ili inhibiraju propagacioni korak reakcije sa peroksil- ili alkoksil-radikalima.

## Inhibicija



Jedinjenja koja usporavaju stepen oksidacije su sekundarni ili preventivni antioksidansi, što se najčeće postiže uklanjanjem supstrata [196].

## 2.4. Elektron-paramagnetna rezonantna spektroskopija

Elektron-paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija (poznata kao elektron-spin rezonanca (ESR)) pruža najdirektniji uvid u biohemiju slobodnih radikala i antioksidanasa. EPR predstavlja zlatni standard u redoks istraživanjima [197–200].

EPR je spektroskopska tehnika koja služi za detektovanje paramagnetskih centara (centri koje posjeduju nesparene elektrone). EPR spektroskopija se zasniva na principu rezonance - mjeri se apsorpcija mikrotalasnog zračenja u homogenom magnetnom polju, u sistemima koji poseduju najmanje jedan nespareni elektron. Ti sistemi mogu biti molekuli, joni, intermedijeri, radikali. Zahvaljujući velikoj osjetljivosti EPR spektroskopije moguća je detekcija veoma malih koncentracija paramagnetskih centara/čestica u nekom molekulu (znatno manja od 1 ppm). Obzirom da veliki broj jedinjenja posjeduje nesparene elektrone, u obliku raznih defekata u strukturi kako na molekularnom tako i na atomskom nivou EPR se koristi za razna mjerenja u fizici, hemiji, biologiji, medicini kao i u mnogim drugim interdisciplinarnim naučnim oblastima.

Ukupni magnetni moment je nula jer su u većini sistema elektroni u paru. Ukoliko je prisutan nesparen elektron, njegov magnetni moment može da interaguje sa magnetnim poljem. Elektronski procesi oko ose polja sa njihovim magnetnim momentom mogu biti paralelni ili antiparalelni sa poljem vektora što definiše dva nivoa energije. Drugo oscilirajuće magnetno polje rezonantne frekvencije izaziva prelaz između nivoa. EPR spektrometar detektuje energiju apsorpcije, pošto je veći broj nesparenih elektrona na nižem energetsom nivou dok se EPR spektar prikazuje kao prvi izvod apsorpcionog spektra. Od interakcije nesparenih elektrona sa jezgrom zavisi oblik EPR signala.

U redoks studijama bioloških sistema koriste se tri različita EPR pristupa:

1. dugoživeće paramagnetne vrste prirodno prisutne u biološkim uzorcima koji mogu biti detektovani direktno EPR spektroskopijom;

2. kratkoživeće vrste moraju da se "zarobe".
3. specifične EPR "tihe" komponente spin-trap se dodaju u uzorak. One reaguju sa kratkoživećim radikalima i formiraju stabilne EPR aktivne spin-adekte

Detekcija paramagnetnih vrsta je na rezonanci pri magnetnom polju od 300 mT, ako je frekvencija 9-10 GHz. Ove frekvencije su u regionu mikrotalasa, koji ne utiču na mjerenja *in vitro* ili *in vivo* [201].

### **2.4.1. Elektron-paramagnetna rezonantna spin-trapping detekcija kratkoživećih slobodnih radikala**

Prema lokaciji nesparenih elektrona fiziološki bitni kratkoživeći slobodni radikali mogu da se podijele u četiri strukturne kategorije:

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

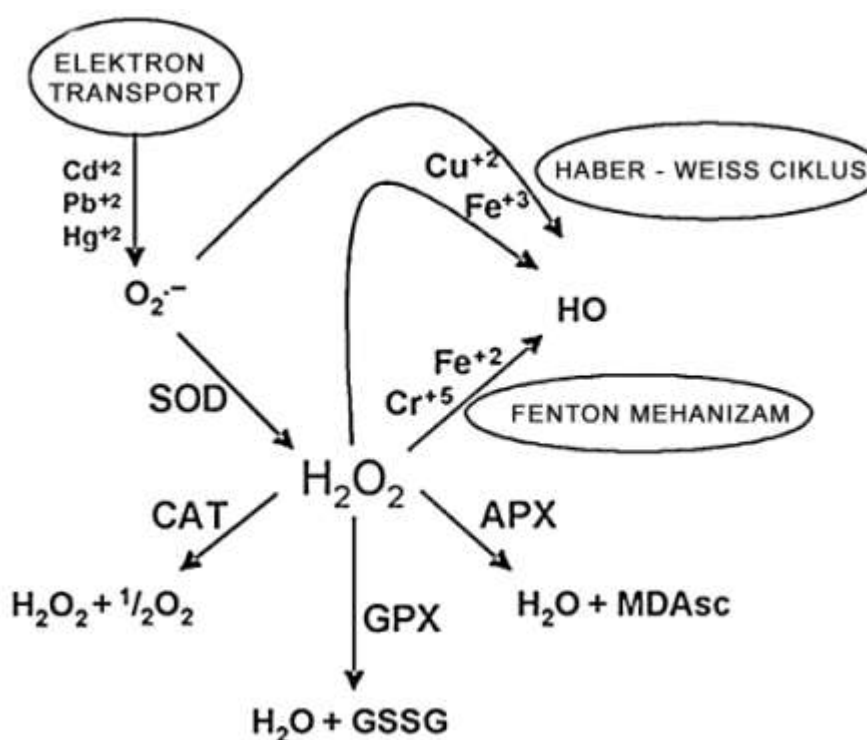
#### **2.4.1.1. Reaktivne kiseonične vrste (ROS)**

Prvi i osnovni izvor ROS je superoksidni anjon-radikal,  $O_2^-$ , koji nastaje u mitohondrijama u toku prelaza elektrona iz respiratornog lanca na  $O_2$  kod aerobnih organizama. Drugi izvor  $O_2^-$  su imune ćelije koje sadrže NADPH oksidaze kojima se redukuje  $O_2$  i proizvode velike količine  $O_2^-$ .

Superoksidni anjon reaguje sa gvožđem u aktivnom centru gvožđe/sumpor enzimai transkripcionim faktorima, pri čemu utiče na promjenu njihove funkciju [202,203]. Većina  $O_2^-$  se pod dejstvom SOD prevodi u  $H_2O_2$  (pripada ROS porodici, ali nije slobodni radikal) koji učestvuje u redoks signalizaciji (slika 10).  $O_2^-$  mogu biti

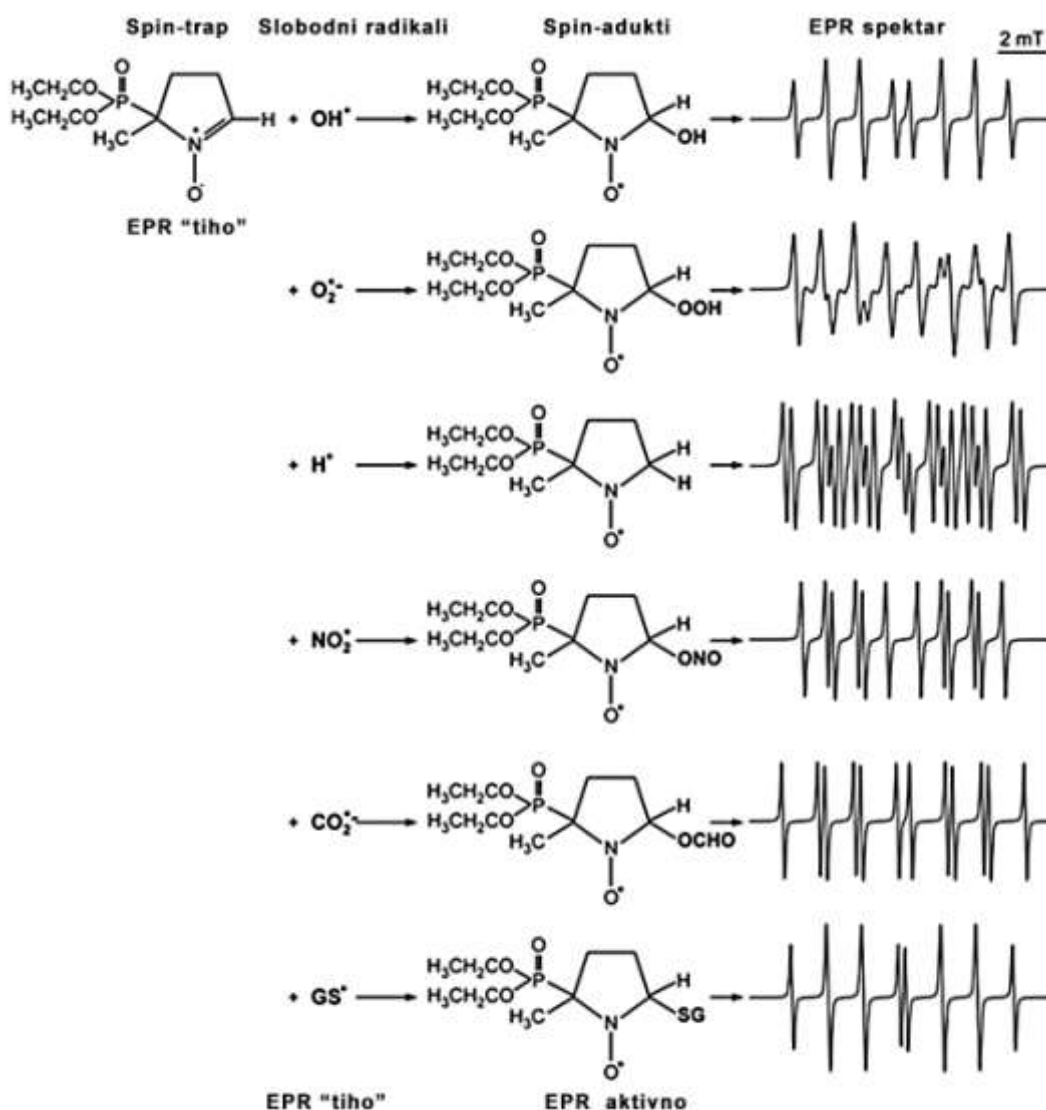
uključeni u reakcije redoks-aktivnih metala ili Haber-Weiss-ov mehanizam, pri čemu se stvaraju reaktivni  $\text{OH}\cdot$ .  $\text{OH}\cdot$  skoro neselektivno reaguje sa biomolekulima u okolini, pa je vrijeme poluživota  $\text{OH}\cdot$  u biološkim sistemima  $\sim 10^{-9}$  s.

Glavni izvor  $\text{OH}\cdot$  je Fentonova reakcija u kojoj učestvuju nepravilno heliran jon gvožđa ili neki prelazni jon metala i  $\text{H}_2\text{O}_2$  [140,204].



Slika 10. Stvaranje ROS pod dejstvom teških metala [205]

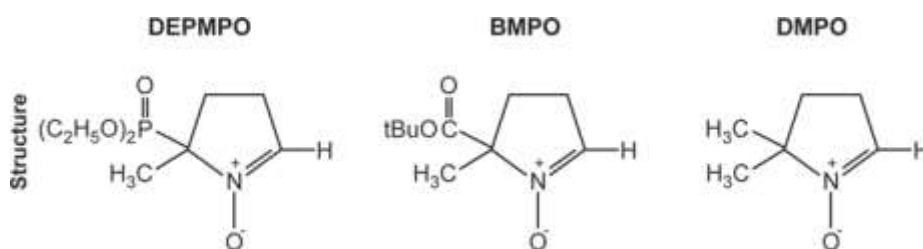
Osnovni principi spin-trapping tehnika su prikazani na slici 11. EPR "tiha" komponenta (spin-trap) hvata reaktivne intermedijerne radikale i formira stabilne paramagnetne vrste (spin-adukt).



**Slika 11.** Osnovni principi EPR spin-trapping metoda, na primjeru dodatog spin-trap DEMPO i različitih fiziološki značajnih slobodnih radikala – hidroksil-radikal, superoksid-anjon-radikal, atom vodonika, azot-dioksid-radikal, ugljendioksid-radikal i glutation-tiil-radikal. DEPMPO/ONO adukt je intermedijer koji se oksiduje do acil-nitroksida (DEPMPO/O). Svaki adukt pokazuje različit EPR signal [206].

Najčešće upotrebljavani spin-trap molekuli prikazani su na slici 12:

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



**Slika 12.** Formule najčešće upotrebljivanih spin-trap molekula

EPR spektroskopija je zlatni standard prema kojem se procjenjuju sve druge metode određivanja antioksidativne aktivnosti.

EPR tehnika koja omogućava mjerenje antioksidativne aktivnosti na bilo kojoj selektovanoj koncentraciji ispitivane komponente u odnosu na fiziološki relevantne radikale je spin-trapping EPR. Mjerenje relativne koncentracije radikala u prisustvu i odsustvu potencijalnog antioksidansa na osnovu sistema za stvaranje specifičnih radikala je osnovni princip ove metode. Prisustvo aktivnog antioksidansa smanjuje intenzitet spektra. EPR metoda sa Fentonovom reakcijom je najčešće upotrebljavana za proučavanje antioksidativnih aktivnosti [207,208].

## 2.5. Oksidativni-redukциони potencijal (ORP)

Brojne naučne studije potvrđuju klinički značaj mjerenja oksidativnog stresa. U posljednje vrijeme, veliki broj krvnih i ćelijskih testova se koristi u istraživanjima u cilju mjerenja pojedinih biomarkera oksidativnog stresa, kao što su lipidna peroksidaza, oksidacija proteina i ukupnih antioksidansa.

Međutim da bi se procijenio ukupan oksidativni stres potrebno je sprovesti više odvojenih ispitivanja pojedinih biomarkera jer se dobijaju nepotpuni podaci zahvaljujući činjenici da mnogi oksidansi i antioksidansi još uvijek nisu identifikovani. Oksidativni stres je često marker upale, što pak ukazuje na prisutnost procesa razvoja bolesti ili uslova/stanja nastanka širokog spektra bolesti. Oksidativni stres je izučavan u mnogobrojnim studijama, ali tradicionalne metode ispitivanja su nepotpune i zahtijevaju veliki utrošak vremena. Klasični laboratorijski testovi za procjenu oksidativnog stresa uključuju mjerenja:

- Aktivnosti katalaze
- Ćelijski antioksidativni test
- Test na glutation
- Antioksidativni test kapaciteta hidroksil radikala
- Antioksidativni test kapaciteta kiseoničnog radikala
- Superoksid dismutaze (SOD)

Oksidativni-redukциони potencijal (ORP) je opšta mjera oksidativnog stresa kome su izložene mnoge biološke komponente i u korelaciji su sa disfunkcijom organa.

ORAC predstavlja mjerenje sposobnosti agenasa u biološkim uzorcima da doniraju atom vodonika i usko je vezan za njihovu sposobnost da djeluju kao antioksidansi koji kidaju lanac.

ORP se u biološkim sistemima definiše kao integralna mjera balansa između ukupnih oksidanata (oksidovani tioli, superoksid radikal, hidroksil radikal, vodonik peroksid, azotni oksid, peroksinitrit i joni prelaznih metala) i ukupnih reduktanata (slobodni tioli, askorbat,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten i urea), kao i drugih nepoznatih biomarkera [209]. ORP je definisan kao sistem integralnog mjerenja svih elemenata oksidativnog stresa uključujući sve poznate i nepoznate oksidante i reduktante. U nekoliko radova je opisana upotreba i značaj određivanja ORP korišćenjem sistema RedoxSYS diagnostic system [210]. Stagos i saradnici su mjerili ORP u plazmi sportista/košarkaša korišćenjem pomenutog instrumenta. ORPu plazmi je kao nova metoda mjenen na početku i na kraju sezone kako bi se izvršila procjena oksidativnog stresa igrača [210].

Takođe se ORP metoda po prvi put koristi iza mjerenje oksidativnog stresa u humanom mlijeku (kolostrum i zrelo mlijeko) prije i nakon pasterizacije i zamrzavanja/čuvanja [211]. Na osnovu dobijenih ORP vrijednosti može se zaključiti da pasterizacija i 30 dana čuvanja na  $-20^{\circ}\text{C}$  nisu uticali na ukupan neenzimski antioksidativni kapacitet i ukupan redukcionni kapacitet mlijeka.

## 2.6. Humano mlijeko

Majčino mlijeko se smatra optimalnim izvorom ishrane za odojčad. Majčino mlijeko je nutritivno kvalitetnije u odnosu na formule za ishranu beba i može da obezbijedi novorođenčetu adekvatne hranljive i biološki aktivne komponente u prvih 6 mjeseci života [212].

Majčino mlijeko ima jedinstven hemijski i biohemijski sastav. Sastavljeno je od vode, proteina, lipida, ugljenih hidrata, mineralnih supstanci i vitamina. Voda je glavna komponenta, i čini oko 87%. Lipidi čine oko 3,8%, obezbjeđujući 50% ukupne energetske vrijednosti mlijeka. Sadržaj proteina iznosi oko 1,0%, a oko 70% proteina obezbjeđuje protein surutke [26].



Humano (majčino) mlijeko se sastoji od 7% laktoze, i to je najviši nivo laktoze nađen kod sisara. Ovaj šećer obezbjeđuje 40% ukupne energetske vrijednosti mlijeka. Sadržaj pepela u majčinom mlijeku je relativno nizak, i iznosi 0,2% (u poređenju sa 0,7% u kravljem mlijeku) [136]. U Tabeli 5 prikazan je sadržaj vitamina i minerala u majčinom mlijeku u odnosu na kravlje mlijeko.

**Tabela 5.** Uporedni prikaz sadržaja vitamina i minerala u majčinom i kravljem mlijeku [137]

<b>Vitamini (mg/ml)</b>	<b>Majčino mlijeko</b>	<b>Kravlje mlijeko</b>
Vitamin A	0,53	0,37
Karoten	0,24	0,21
Holekalciferol (D)	0,001	0,0008
Tokoferol (E)	5,4	1,1
Vitamin K	0,015	0,03
Tiamin (B1)	0,15	0,42
Riboflavin (B2)	0,37	1,72
Piridoksin (B6)	0,10	0,48
Kobalamin (B12)	0,0003	0,0045
Niacin	1,7	0,92
Folna kiselina	0,043	0,053
Askorbinska kiselina C	47	18
Biotin	0,007	0,036
Pantoteinska kiselina	2,1	3,6
Inozitol	300	160
<b>Minerali</b>		
Zn (µg/ml)	1-3	4
Cu(µg/ml)	0,2-0,4	0,05-0,2
Mn (ng/ml)	3-6	21
I (ng/ml)	12-178	70-219
F (ng/ml)	4-15	19
Se (ng/ml)	15-20	10
Al (ng/ml)	4-14	27
Cr (ng/ml)	0,2-0,4	5-15
Mo(ng/ml)	1-2	22
Co (µg/ml)	~0,1	

Humano mlijeko i sve formule koje ga zamjenjuju razlikuju se od njega, što znači da je majčino mlijeko najbolja ishrana za bebe [213]. To je kompleksna tjelesna tečnost, koja nastaje sekrecijom iz mliječnih žlijezda.

Mlijeko se mijenja tokom dana, kao i tokom čitavog perioda laktacije, te stoga razlikujemo: kolostrum, prelazno i zrelo majčino mlijeko. Kolostrum je za novorođenče prva hrana, gotovo savršena, koja je u potpunosti prilagođena nutritivnim potrebama novorođenčeta. Kod nekih majki već od sedmog mjeseca trudnoće počinje stvaranje kolostruma u grudima. Kolostrum je ljepljiva, gusta blijedo do žuta tečnost. Sadržaj masti i ugljenih hidrata je manji, dok je sadržaj proteina, vitamina A i minerala veći nego u zreлом mlijeku. Novorođenčetu zaštitu od virusa i bakterija obezbjeđuju imunoglobulini (uglavnom IgA) u kolostrumu. Zahvaljujući laksativnom dejstvu kolostruma, omogućava se novorođenčetuda eliminiše prvu stolicu (mekonijum) [214].

Prelazno mlijeko se luči tokom prve dvije nedelje nakon porođaja. Prelazno mlijeko sadrži više masti, laktoze i energetski je "jače" od kolostruma. Poslije 15 dana sastav mlijeka se stabilizuje i počinje da se luči zrelo mlijeko.

U zavisnosti od doba dana, potreba novorođenčeta, dužine podoja, kao i od preležanih bolesti majke, sastav zrelog majčinog mlijeka se mijenja. Na početku podoja (prvo) mlijeko se luči u velikim količinama i bogato je proteinima i laktozom. Zbog visokog sadržaja masti mlijeko koje se luči na samom kraju podoja je svjetlije boje, što ukazuje na značaj dužine podoja u cilju zadovoljavanja energetskih potreba novorođenčeta („zadnje mleko“).

Majčino mlijeko se sastoji od hranljivih sastojaka, kao što su proteini, lipidi, ugljeni hidrati, minerali, vitamini i elemenata u tragovima koji su od najvećeg značaja za zadovoljavanje nutritivnih potreba odojčadi i obezbjeđuju normalan rast i razvoj djeteta [215].

U poređenju sa kravljim mlijekom, humano mlijeko ima manji ukupni sadržaj proteina (8-10 g/l), ali ima veću biološku vrijednost i proteini humanog mlijeka imaju pravi balans kazeina i proteina surutke koji zadovoljavaju nutritivne i

funkcionalne potrebe odojčeta, koje se ogledaju u specifičnom postprandijalnom odgovoru [216].

Humano mlijeko zdrave majke karakteriše optimalan odnos n-3 i n-6 dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina (PUFAs) koje su osnovni sastojci triglicerida i fosfolipida, koji formiraju kompleksne strukture važne za metabolizam i razvoj mozga. Sadržaj lipida u humanom mlijeku varira tokom perioda laktacije [217,218].

Glavni ugljeni hidrati majčinom mlijeku je disaharid laktoza. Pored laktoze, majčino mlijeko sadrži monosaharide (glukoza i galaktoza) i preko 130 različitih oligosaharida. Humano mlijeko sadrži velike količine (10-12 g/l) neutralnih i kiselih oligosaharida složene molekulske strukture koji utiču na mikrofloru gastrointestinalnog trakta i razvoj imunog sistema, dok kravlje mlijeko sadrži samo tragove ovih nutrijenata [219,220].

Humano mlijeko takođe obuhvata brojne komponente koje se odnose na imunitet, kao što su IgA, leukociti, lizozimi, laktoferin, interferon-  $\gamma$ , nukleotide, citokine i dr. Neka od ovih jedinjenja pružaju pasivnu zaštitu gastrointestinalnog trakta i gornjeg respiratornog trakta, sprečavajući lijepljenje patogena za sluznicu i na taj način štite odojče od invazivnih infekcija. Majčino mlijeko takođe sadrži esencijalne masne kiseline, enzime, hormone, faktore rasta, poliamine i druga biološki aktivna jedinjenja.

Dakle, majčino mlijeko je zaista funkcionalna hrana jer ne obezbjeđuje samo hranjive materije, već i biološki aktivne komponente koje imaju i kratkoročne i dugoročne prednosti na zdravlje i razvoj odojčeta [221]. Na osnovu raspoloživih podataka, ESPGHAN Komitet predlaže da je poželjno da majke isključivo doje svoju djecu do 6 mjeseci. Kod beba koje se isključivo ili djelimično hrane majčinim mlijekom, dohranjivanje, čvrstom ili tečnom hranom osim majčinog mlijeka, mliječnih formula ili prelaznih formula, ne treba uvoditi do 17. nedelje života ili odlagati nakon 26 nedelje života bebe [222].

SZO i Američko udruženje pedijatarata preporučuje isključivo dojenje u prvih 6 mjeseci nakon rođenja i nastavak dojenja, uz dohranu, do 24 mjeseca ili duže. Kod djece koja se isključivo hrane dojenjem, mlijeko mora imati odgovarajuće nutritivne

vrijednosti i sastav, kao i da sadrži elemente u tragovima neophodne za normalan rast i razvoj. Iako su koncentracije minerala relativno niske u majčinom mlijeku i krvi, oni ipak imaju ključnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima [223].

Američko udruženje pedijatarata preporučuje dojenje kao primarnu ishranu odojčadi, posebno tokom prvih 4 mjeseca života. Ako ne postoji mogućnost dojenja, potrebno je koristiti donirano majčino mlijeko, ili formule za bebe [224]. Prema smjernicama Velike Britanije, individualno podudarno majčino mlijeko ili donirano mlijeko predstavlja prikladniji izbor za ishranu beba nego vještačka hrana, odnosno formule, a posebno za prijevremeno rođenu djecu [225].

### **2.6.1. Minerali u majčinom mlijeku**

Zalihe bakra (Cu) u organizmu na rođenju su dovoljne da zaštite dijete od nedostatka ovog elementa od 4. do 6. mjeseca života, ali zalihe cinka (Zn) u organizmu nijesu velike, te ga je neophodno uzimati u adekvatnim količinama neophodnim za optimalan rast i razvoj [226]. U majčinom mlijeku, vrijednost gvožđa ostaje relativno stabilna, bez obzira na status majke (što takođe važi za folnu kiselinu, vitamin D, kalcijum i cink). Iako beba uzima dio gvožđa iz majčinog mlijeka, najbolji izvor predstavljaju „rezerve“ gvožđa stvorene dok je beba bila u materici i one obezbjeđuju dovoljnu količinu za prvih 6 mjeseci života. Nakon 6 mjeseci, od ključnog je značaja da se u ishranu uvedu i ostali izvori gvožđa.

Svaki od elemenata u tragovima, gvožđe, cink, bakar, imaju određene funkcije i imaju važnu ulogu za razvoj odojčeta [227,228].

Nedostatak mikronutrijenata je veoma rasprostranjen u mnogim zemljama u razvoju. Nizak nivo gvožđa i cinka u organizmu je vrlo čest kod majki i djece, a njihov nedostatak predstavlja veliki problem. Učestalost ovog nedostatka je veća kod dojilja nego kod trudnica, usljed čega teret od bolesti pogađa majku i novorođenče, a kasnije i dijete. Nedostatak gvožđa u ranom životu može imati dugotrajne štetne efekte na kognitivni razvoj [229].

Sadržaj gvožđa iz majčinog mlijeka iskorišćava se izuzetno dobro, međutim svi aspekti mehanizma apsorpcije još nijesu objašnjeni [137]. Usvojivost gvožđa iz majčinog mlijeka je pet puta bolja nego iz kravljeg mlijeka, zbog laktoferina koji vezuje gvožđe. Na osnovu sprovedenih različitih studija gvožđe se vezuje za peptide male molekulske mase (18-56%), molekule masti (15-46%) i laktoferin (16-40%) [230-233]. Koncentracija glavnih proteina koji prenose metale smanjuje se tokom perioda laktacije, ali sa smanjenjem koncentracije laktoferina koncentracija gvožđa u mlijeku se ne mijenja. Na osnovu istraživanja potencijalne veze između hemoglobina ili rezervoara gvožđa (ferritina) i nivoa gvožđa u mlijeku, došlo se do zaključka je veća vjerovatnoća da se mliječna žlijezda snabdijeva gvožđem iz krvotoka, odnosno, gvožđem iz seruma [234]. Slično tome, veća bioraspoloživost cinka i bakra se objašnjava proteinskim sastavom mlijeka. S toga, proteini u majčinom mlijeku, prije svega laktalbumin, su lako svarljivi za razliku od kazeina koji je glavna komponenta kravljeg mlijeka, tako da je vezani cink dostupniji za apsorpciju i usvojivost [235].

Vrijednosti gvožđa u majčinom mlijeku kreću u širokom opsegu (0,1- 1,6 mg/l) tokom svih faza laktacije, ukazujuću da je srednja vrijednost gvožđa u kolostrumu 1,0mg/l, dok se u zrelom mlijeku koncentracije gvožđa kreću u rasponu 0,20-0,80 mg/l (15 dana-15 mjeseci nakon porođaja) [236-239].

Sadržaj gvožđa u majčinom mlijeku je najveći u ranom prelaznom mlijeku (0,97mg/l) [240]. U jednoj od studija srednje koncentracije cinka i bakra su bile 625 (475-889) µg/l za Zn i 239 (200-296) µg/l za Cu [134]. Vrijednosti navedene u različitim studijama mogu biti uzrokovane razlikama u postupcima uzimanja uzoraka, kao i različitim fazama laktacije. Metod analize, vrijeme uzorkovanja (prvo-zadnje mlijeko ili mlijeko ujutro - poslijepodne - tokom noći), metode uzorkovanja (pumpe, ručno izmuzanje), faze laktacije i među-individualna varijabilnost mogu biti mogući razlozi različitih rezultata u studijama [181,241].

Koncentracija mikronutrijenata u kolostrumu su visoke i smanjuju se tokom perioda laktacije [242-245]. Srednja vrijednost sadržaja gvožđa je bila od 0,56 mg/l u kolostrumu treći dan, do 0,39 mg/l tridesetog dana nakon porođaja, a vrijednosti su ostale stabilne do završetka studije koja je trajala 15 mjeseci [242].

Slično kao u ovom istraživanju, u okviru jednog drugog istraživanja koncentracije cinka i bakra su bile visoke u kolostrumu- vrijednost cinka u kolostrumu je bila 5,32  $\mu\text{g/ml}$  do 1,12  $\mu\text{g/ml}$ , a nivo bakra pao je sa 0,46  $\mu\text{g/ml}$  u kolostrumu na 0,17  $\mu\text{g/ml}$  u 7. mjesecu nakon porođaja [245].

S obzirom da kod beba koje se isključivo hrane majčinim mlijekom ono predstavlja jedini izvor hrane u prvih nekoliko mjeseci života, važno je znati tačne podatke o sastavu majčinog mlijeka. S toga su sprovedene različite studije o faktorima koji utiču na koncentraciju mikronutrijenata u majčinom mlijeku, kao što su faza laktacije ili nivo mikronutrijenata u serumu.

Različite studije su sprovedene s ciljem utvrđivanja faktora koji utiču na sadržaj gvožđa, cinka i bakra u majčinom mlijeku u različitim fazama laktacije. Sadržaj mikronutrijenata u majčinom mlijeku opada značajno u periodu od druge nedjelje do četvrtog - sedmog mjeseca nakon porođaja [208–211,244,245].

Dobijeni rezultati ukazuju da koncentracija mikronutrijenata u serumu nije u korelaciji sa koncentracijama u majčinom mlijeku. Nedostatak gvožđa i anemije uzrokovane nedostatkom gvožđa su veoma česta pojava širom svijeta, a potencijalni uticaj niskog nivoa gvožđa u organizmu majke na koncentraciju gvožđa u majčinom mlijeku je ispitivan kod dojilja. U studiji koja je sprovedena među ženama u Švajcarskoj, utvrđeno je da nivo gvožđa u organizmu majki, koji je procjenjivan na osnovu hemoglobina, serumskog feritina i zasićenja transferina nije u korelaciji sa nivoom gvožđa u mlijeku [238].

Slične opservacije su rađene u grupi nigerijskih žena sa znatno promjenljivijim statusom gvožđa [239]. Za razliku od ovih studija, studija koja je sprovedena u Indiji pokazala je pozitivan efekat nedostatka gvožđa kod majki na nivo gvožđa u majčinom mlijeku [246].

Ispitivan je sadržaj gvožđa, cinka i bakra u mlijeku kod 191 majke u Švedskoj i Hondurasu, kao i veza sa mineralnim statusom majke. Zaključeno je da nivo mikronutrijenata u serumu majke ne utiče na sadržaj gvožđa, cinka i bakra u mlijeku u periodu od devet mjeseci nakon porođaja [247].

Gvožđe, cink i bakar su osnovni mikronutrijenti za rast i razvoj. Majčinski faktori su veoma važni faktori koji mogu uticati na sadržaj mikronutrijenata u majčinom mlijeku. Mnoge studije su dokazale da sadržaj mikronutrijenata u majčinom mlijeku ne zavisi od antropometrijskih parametara majke, socioekonomskog statusa, navika u ishrani, suplementacije, godina života, uhranjenosti, mjesta stanovanja, pušenja, obrazovanja i faktora životne sredine [212].

## 2.7. Antioksidativni potencijal majčinog mlijeka

Ishrana predstavlja osnovu za zaštitu od oksidativnog stresa/oštećenja, čemu su posebno sklone prijevremeno rođene bebe, zbog nedovoljno razvijenog endogenog antioksidativnog sistema i povećane osjetljivosti proliferativnih ćelija na oksidativna oštećenja [248]. Pored toga, prijevremeno rođene bebe su u povećanom riziku od oksidativnog stresa zbog oksigenacije, infekcije i povreda vezanih za invazivne kliničke procedure [249]. Brojni poremećaji u ranom periodu odojčeta, kao što su sepsa, nekrotizirajući enterokolitis, retinopatija, bronhopulmonalna displazija, periventrikularne leukomalacije, su povezani sa oksidativnim oštećenjem [248]. Smatra se da ishrana bogata antioksidansima ima veliki značaj kao preventivna mjera protiv ovih bolesti [250]. Svježe majčino mlijeko pokazuje drugačiji antioksidativni profil i ima bolje antioksidativno dejstvo nego formule za bebe [251,252]. Međutim, na redoks svojstva može da utiče i postupak prerade mlijeka [249,253,254].

Donirano mlijeko je obično pasterizovano (30 minuta na 62,5°C) i čuva se na -20°C za ublažavanje zagađenja patogenim agensima. Alternativno, sirovo mlijeko se može čuvati na -20°C do tri mjeseca prije ishrane bebe [225]. Raspoloživi podaci o efektima pasterizacije i zamrzavanja/skladištenja redoks svojstava humanog mlijeka su ograničeni.

Antioksidativni status majke utiče na antioksidativni status novorođenčeta preko antioksidativnog potencijala mlijeka. Humani kolostrum ima antioksidativne

osobine, zahvaljujući činjenici da može spontano da redukuje citohrom C, utiče na razlaganje  $H_2O_2$  nastalog u polimorfonuklearnim leukocitima, i štiti epitelijalne ćelije od odvajanja koje uzrokuju polimorfonuklearni leukociti [255,256].

Nekoliko endogenih antioksidativnih mehanizama za kontrolu oksidativnih procesa postoji u biološkim sistemima. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS) obuhvata kako primarnu tako i sekundarnu antioksidativnu zaštitu. Primarna antioksidativna zaštita sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenata. Enzimske komponente čine superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px) i glutation-reduktaza (GR). Pored ova četiri enzima enzimskoj kontroli kiseoničnih radikala i njihovih proizvoda doprinose i enzimi glutation-transferaza, ceruloplazmin, hemokisgenaza i drugi [257].

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

Preko mehanizma povećanja autooksidacije gvožđa kazeini mlijeka mogu da inhibiraju lipidnu peroksidaciju, pri čemu peptidi nastali hidrolizom kazeina "hvataju" superoksid-anjon-radikal. Izoflavonoidi u majčinom mlijeku igraju važnu ulogu u sprečavanju nekih kancera zahvaljujući svojim antioksidativnim osobinama i to vjerovatno preko mehanizma multiplikativnih efekata povezanih sa inhibicijom karcinogeneze.

Zahvaljujući prisustvu navedenih komponenti majčino mlijeko ispoljava antioksidativne osobine i time omogućava zaštitu ćelijama novorođenčadi što je izuzetna važno za prijevremeno rođene bebe [258].

Reaktivne kiseonične vrste koji oštećuju ćelije, kao što su superoksid- i hidroksil-radikali i druge ROS nastaju prilikom rođenja pri prelazu iz relativno hipoksične sredine uterusa u hiperkiseoničnu spoljašnju sredinu [259]. Pretpostavlja se da je pojava nekrotičnog enterokolitisa, bronhopulmonalne displazije i retinopatije kod prijevremeno rođenih beba povezana sa oksidativnim stresom. Veći oksidativni kapacitet u krvi i niži intenzitet oksidativnog stresa imaju bebe koje se hrane majčinim mlijekom u odnosu na one hranjene infant formulama. Pušenje u trudnoći,



takođe utiče na povećanje oksidativnih oštećenja kod novorođenčadi i snižava antioksidativni potencijal mlijeka [260]. Takođe, ishrana majke, geografski položaj kao i upotreba vitamina u toku trudnoće i laktacije utiču na koncentraciju antioksidanasa u majčinom mlijeku [261].

## 2.8. Infant formule

U Egipatskom tekstu, Papyrus Ebers, prvi put je zabilježena ideja o alternativama dojenju, koje datira još iz 1550 godine prije nove ere.

Današnje infant formule su industrijski proizvodi, zamjena za majčino mlijeko, napravljene za ishranu odojčadi na bazi kravljeg ili sojinog mlijeka. Infant formula teži da imitira nutritivni profil majčinog mlijeka, i to je jedina hrana koju medicinska zajednica smatra nutritivno prihvatljivom za djecu uzrasta do jedne godine [26].

Hrana za odojčad se koristi u slučajevima kada majke nisu u mogućnosti da doje svoje novorođenče, usljed bolesti, prestanka laktacije, neuhranjenosti i sl. Infant formule se takođe koriste kod prijevremeno rođene djece, male tjelesne težine, usljed pojave sindroma nedostatka majčinog mlijeka kao i u cilju smanjivanja unosa zagađivača iz životne sredine ukoliko su majke bile izložene povećanim koncentracijama [262].

Međutim, mnogi antioksidativni faktori, koji isključivo zavise od ishrane majke su odsutni ili slabo prisutni u kravljem mlijeku i infant formulama [19]. U odnosu na kontrolnu grupu odojčadi hranjene infant formulama, prijevremeno rođene bebe, hranjene majčinim mlijekom, imaju veću sposobnost uklanjanja peroksil-radikala u plazmi *in vitro* [263].

Sastav mlijeka majki prijevremeno rođene djece se razlikuje od mlijeka majki terminske djece [264]. Kompleksan sastav majčinog mlijeka je nemoguće u potpunosti zamijeniti formulama za ishranu beba, a ovo se posebno odnosi na biološki aktivne komponente (imunoprotektivne i druge ne-imunogene zaštitne supstance, faktore rasta, hormone i enzime) [265,266].

Pored toga, majčino mlijeko sadrži preko stotinu različitih oligosaharidnih struktura koje zajedno sa ostalim komponentama mlijeka, predstavljaju glavni izvor prebiotskog dejstva [267,268]. Nesvarljivi oligosaharidi u majčinom mlijeku doprinose stvaranju dominantne bifidogene flore kod odojčadi. U cilju poboljšanja simulacije sastava majčinog mlijeka mnogi proizvođači infant formula dodaju prebiotike. Najčešće se koristi smješa frukto-oligosaharida i galakto-oligosaharida. Osim navedenih dodaju se i inulin, laktuloza i laktitol [269].

Proizvođači se takođe trude da naprave takve infant formule koje imaju antioksidativni kapacitet što sličniji majčinom mlijeku, što se postiže dodavanjem-obogaćivanjem hrane za odojčad dugolančanim polinezasićenim masnim kiselinama i nukleotidama sa selenom, pri čemu se postiže takav sastav infant formula koji je po svojstvima i antioksidativnom potencijalu sličan majčinom mlijeku [270].

Formule za ishranu odojčadi se koriste u tri osnovne namjene:

1. kao zamjena ili dopuna majčinom mlijeku kod odojčadi čije majke odluče da ne doje ili koje dohranjuju svoje bebe;
2. kao zamjena za majčino mlijeko kod odojčadi kod kojih je dojenje medicinski kontraindikovano, npr, neki urođeni poremećaji metabolizma, i
3. kao dodatak ishrani odojčadi kod kojih je majčino mlijeko nedovoljno za postizanje potrebne tjelesne težine.

Sve formule za ishranu odojčadi koje su trenutno dostupne na tržištu su testirane u studijama rasta i tolerancije i dokazano je da pružaju adekvatnu ishranu zdravim bebama, ako se koriste kao isključiva hrana u prvih 4-6 mjeseci života bebe [224].

Da bi se postigao odgovarajući rast i sačuvalo dobro zdravlje, formule za odojčad moraju da sadrže odgovarajuću količinu vode, ugljenih hidrata, proteine, masti, vitamine i minerale.

Postoje tri glavne grupe formula za odojčad [271,272] :

1. *Formule na bazi mlijeka*: pripravljene od kravljeg mlijeka sa dodatkom biljnih ulja, vitamina, minerala i gvožđa, i pogodne su za većinu zdravih terminskih beba.
2. *Formule na bazi soje*: pripravljene su od proteina soje sa dodatkom biljnih ulja (za masti), kukuruznog sirupa i/ili saharoze (za ugljene hidrate) i pogodne su za ishranu odojčadi koja su netolerantna na laktozu ili su alergična na protein iz kravljeg mlijeka ili mliječnih formula. Američka akademija pedijatara preporučuje korišćenje formula na bazi soje za navedenu grupu odojčadi, kao i za odojčad čiji roditelji traže vegetarijansku ishranu za svoje dijete. Ove formule se ne preporučuju za ishranu novorođenčadi sa malom težinom na rođenju i za prijevremeno rođene bebe, ili za sprečavanje grčeva ili alergije.
3. *Specijalne formule*: mali procenat novorođenčadi zahtjeva ishranu specijalnim formulama (npr. novorođenčad sa malom tjelesnom težinom na rođenju i prijevremeno rođene bebe i odojčad sa metaboličkim bolestima i crijevnim malformacijama). To mogu biti formule sa niskim procentom natrijuma za odojčad kod kojih treba ograničiti unos soli, ili "predigestivne" proteinske formule za odojčad koja ne tolerišu ili su alergična na, proteine (kazein i surutka) iz kravljeg mlijeka ili mliječnih formula.

Cilj savremenih istraživanja je postizanje sastava infant formula koje neće biti samo kopiranje sastava majčinog mlijeka nego i obezbjeđivanje dostizanja funkcionalnih osobina majčinog mlijeka sa akcentom na bioaktivne komponente [252,273].

Infant formule su u poslednjih nekoliko godina pored suplementacije prebioticima, obogaćene i probiotskim bakterijama (*Bifidobacterium* i *Lactobacillus*), kojima se stimuliše rani razvoj bifidogene flore odojčadi. Antioksidativne aktivnosti laktobacila potvrđene su kroz mnogobrojne studije. Različiti mehanizmi antioksidativne aktivnosti u laktobacilima ispoljavaju se zahvaljujući hvatanju slobodnih radikala kojima se završava lančana reakcija oksidacije [274-276].

### **III. MATERIJAL I METODE**

### **3.1. Uzorci majčinog mlijeka, seruma beba i hrane za bebe**

Uzorci majčinog mlijeka (MM) dobijenih od zdravih majki beba rođenih u terminu, (60 uzoraka) i mlijeka majki prijevremeno rođene djece, (56 uzoraka) uzimani su u toku prva 24 časa, nakon 28 dana i nakon 6 mjeseci od porođaja u periodu od januara do juna 2013. godine. Uporedo sa uzimanjem uzoraka mlijeka uzimani su i uzorci seruma njihovih beba, (116 uzoraka) u istom periodu laktacije. Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog Fakulteta u Beogradu Br. 01-434/4, od 22/05/2012. Ispitivani uzorci mlijeka, seruma i formula kao i demografski podaci za kohort studiju koja se odnosi na humano mlijeko i serume terminskih i prijevremeno rođenih beba prikazani su u Tabeli 6, 7 i 8. Svi navedeni uzorci majčinog mlijeka i seruma su uzeti sa Odjeljenja za neonatologiju iz bolnice u Subotici, dok su uzorci pretermanskog majčinog mlijeka (pool) i seruma majki i beba uzeti sa Instituta za Neonatologiju u Beogradu. U studiji ispitivanja uzoraka pretermanskog mlijeka i seruma (9) praćene su promjene antioksidativnih osobina mlijeka i seruma, kao i sadržaja ispitivanih minerala u različitim fazama laktacije, kolostrum i zrelo mlijeko, kao i nakon različitih tretmana pasterizacijom i zamrzavanja i čuvanja na  $-20^{\circ}\text{C}$ , 7 i 30 dana. Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Instituta za Neonatologiju u Beogradu Br. 2401/4 od 18/04/2014.

**Tabela 6.** Uzorci majčinog mlijeka, infant formula i seruma beba u periodu laktacije

Uzorak	Mlijeko	Serum
1-60	Humano mlijeko majki terminske djece u prva 24 časa nakon porođaja	Serum terminske djece u prva 24 časa nakon porođaja
1-60	Humano mlijeko majki terminske djece nakon 28 dana	Serum terminske djece nakon 28 dana
1-60	Humano mlijeko majki terminske djece nakon 6 mjeseci	Serum terminske djece nakon 6 mjeseci
1-56	Humano mlijeko majki prijevremeno rođene djece u prva 24 časa nakon porođaja	Serum prijevremeno rođene djece u prva 24 časa nakon porođaja
1-56	Humano mlijeko majki prijevremeno rođene djece nakon 28 dana	Serum prijevremeno rođene djece nakon 28 dana
1-56	Humano mlijeko majki prijevremeno rođene djece nakon 6 mjeseci	Serum prijevremeno rođene djece nakon 6 mjeseci
1-9	Humano zrelo mlijeko majki prijevremeno rođene djece	Serum majki prijevremeno rođene djece
1-9	Kolostrum majki prijevremeno rođene djece	
1-9		Serum prijevremeno rođene djece
Uzorak 1	Aptamil 1	
Uzorak 2	Bebelac 1	
Uzorak 3	HIPP	
Uzorak 4	NAN 1	
Uzorak 5	Impamil Mil 1	

**Tabela 7.** Demografski podaci majki i antropometrijske karakteristike terminskih beba

Parametar	Vijednost
Starost majki (godine)	28,6 ± 4,3 (opseg: 16–36)
Gestacija (nedelje)	39,4 ± 1,2 (opseg: 38–42)
Masa novorođenčeta na porođaju (g)	3424 ± 381 (opseg: 2440–4100)
Pol (muški/ženski)	32/28
Broj novorođenčadi sa žuticom	20/60

**Tabela 8.** Demografski podaci majki i antropometrijske karakteristike prijevremeno rođenih beba

Parametar	Vijednost
Starost majki (godine)	29,9 ± 17,9 (opseg: 19–43)
Gestacija (nedelje)	34,3 ± 1,6 (opseg: 30–37)
Masa novorođenčeta na porođaju (g)	2050 ± 436 (opseg: 1270–3300)
Pol (muški/ženski)	24/32
Broj novorođenčadi sa žuticom	14/56

Sve majke su dobrovoljno pristale da zajedno učestvuju sa svojom djecom u studiji. 10-20 ml mlijeka je uzeto od svake majke u skladu sa odgovarajućim protokolom. Svaka majka je prethodno očistila grudi i bradavice ultra čistom Mili-Q vodom koristeći zaštitne rukavice. Uzorci mlijeka su uzimani ili ručnom pumpicom za izmuzavanje i/ili uzorkivačem mlijeka. Majke su uzimale uzorke mlijeka kako na početku tako i nakon dojenja. Uzorci mlijeka su sakupljeni u čiste plastične posude prethodno isprane Mili-Q vodom. Uzorci majčinog mlijeka su označeni i čuvani na -20°C do početka analize.

Da bi izdvojili serum kod novorođenčadi, uzimana je venska krv beba u epruvete bez antikoagulansa. Nakon centrifugiranja, odvojen je serum i označeni uzorci su čuvani na -20°C do početka analize.

Uporedo sa ovim uzorcima uzeti su uzorci kolostruma i pretermiskog zrelog majčinog mlijeka kao zajednički uzorak (pool). Uzorci mlijeka su uzeti od 9 zdravih majki prijevremeno rođene djece (gestacijske starosti 28-36 nedelja, porođajne težine 900-2470 g), u toku prva četiri dana nakon porođaja (kolostrum) i 6 nedjelja posle porođaja (zrelo mlijeko). Sve majke su dale pisanu saglasnost o dobrovoljnom učestvovanju u ovom ispitivanju. U skladu sa odgovarajućim protokolom 10-20 ml mlijeka i 5 ml krvi je uzimano od svake majke učesnice u studiji. Majke su izmuzale mlijeko između 8:00h i 10:00h. Mlijeko je podijeljeno na jednake djelove i ispitano prije (0 dan) i posle pasterizacije (62,5°C u toku 30 minuta) i/ili čuvanja na -20°C (7 ili

30 dana). Pisana saglasnost je dobijena od svih učesnica istraživanja. Uzorci humanog zrelog mlijeka su čuvani u sterilnim bočicama, transportovani na ledu u laboratoriju i čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Neposredno prije mjerenja uzorci su homogenizovani miješanjem na magnetnoj mješalici, da ne bi došlo do raslojavanja faza, kao u slučaju mehaničkog homogenizovanja. Venska krv je uzimana u epruvete bez antikoagulansa, inkubirana 30 minuta na  $37^{\circ}\text{C}$  i zatim centrifugirana 10 minuta ( $1500\times g$  na  $4^{\circ}\text{C}$ ). Nakon centrifugiranja, odvojen je serum i označeni uzorci su čuvani na  $-20^{\circ}\text{C}$  do početka analize.

Pet uzoraka hrane za odojčad su uzeti kao slučajni uzorci iz maloprodaje. Svi uzorci hrane za bebe su formule za uzrast od rođenja do 6 mjeseci starosti, prikazano u tabeli br 6.

Svi korišćeni reagensi su bili hemijski čisti. Standardni rastvor miksa (Periodic Table mix 1 ICP - Ultra Trace) minerala (Fe, Cu i Zn) je korišćen za pripremu radnih, kalibracionih rastvora nakon serije razblaživanja referentnog rastvora koji sadrži 1000 mg/l svakog elementa (LGC-ICP-OES osnovni rastvor) u gradijentu, po potrebi. Za određivanje tačnosti ove studije korišćen je Standardni Referentni Materijal Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (NIST), nutritivne formule za odojčad/odrasle (SRM-1849) (United States Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland 20899-0001).

### 3.1.1 Priprema uzoraka za analizu

Prije analize, uzorci humanog mlijeka su odmrznuti do sobne temperature, 1ml mlijeka je razblažen na 10 ml sa Mili-Q vodom. Zbog većih koncentracija elemenata i veće gustine uzoraka formula za bebe i SRM-1849 u poređenju sa uzorcima majčinog mlijeka uzorci infant formula i SRM-1849 su pripremani na sledeći način: 1g je razblažen u 100 ml Mili-Q vode, kako bi se dobile odgovarajuće koncentracije koje su u opsegu kalibracione krive. Ova metodologija obuhvata direktnu analizu uzoraka bez digestije uzimajući u obzir uticaj matriksa, odnosno gustinu dok prisustvo



organske materije ne utiče na uzorak zbog visoke temperature u plazmi argona (10 000K). Korišćenjem ove procedure razblaživanja, uzorci majčinog mlijeka i infant formule se pripremaju na način da budu veoma slični (sadržaj masti, proteina, itd), kako bi se omogućila ispravna potvrda metodologije. Osim toga, sadržaj analiziranih elemenata u uzorcima je sličan izabranom referentnom materijalu. Sadržaj Zn, Fe i Cu posle razblaživanja uzoraka je određen na ICP-OES instrumentu proizvođača Spectro Arcos sa aksijalnom plazmom (Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germany). ICP-OES koristi softver Smart Analyzer Vision verzija 5.01.0928 povezan sa autosamplerom ASX-520 Auto Sampler (CETAC). Spectro ICAL rastvor (10x koncentrat, Berd Kraft Der Standard) se koristi za samoprovjeru i samopodešavanje cijelog instrumenta, za sve talasne dužine tj. cijeli polihromator. Uslovi pod kojim je korišten za rad ICP-OES za određivanje mikroelemenata u uzorcima humanog mlijeka i infant formulama prikazani su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Karakteristike ICP-OES instrumenta

Parametar	Vrijednosti
Snaga plazme	1.4 KW
Brzina pumpe	30 Rpm
Protok hlađenja	14 L min <sup>-1</sup>
Pomoćni protok	0.7 L min <sup>-1</sup>
Protok kroz nebulajzer	0.9 L min <sup>-1</sup>
Sprej komora	Ciklonik
Vrsta plazme	Aksijalna
Režim obrade podataka	Površina
Metal (talasna dužina, nm)	Zn(213.857), Fe (238.204), Cu (327.396)
Korelacioni koeficijent	0.999
Broj ponavljanja	3

## 3.2. Validacija ICP-OES i FAAS metode

Za validaciju i optimizaciju metoda za određivanje minerala Fe, Zn i Cu korišteni su uzorci mlijeka majki terminskih beba, SRM-1849 i infant formule bez prethodne digestije primjenom uporedno ICP-OES i FAAS metoda.

Nakon konstrukcije kalibracione krive za svaki element određena je linearnost serijskim razblaživanjem rastvora osnovnih elemenata sa Milli-Q vodom. Analitičke karakteristike, kao što su preciznost, osjetljivosti, tačnost i granice detekcije, su zatim procijenjivane. Sadržaj Zn i Cu u kliničkim uzorcima određen je ICP-OES metodom u skladu sa uputstvom proizvođača (Spectro Arcos) dok je sadržaj Fe određen FAAS metodom.

### 3.2.1. Kalibraciona kriva i linearnost

Linearnost metode je procijenjivana na osnovu pripreme pet kalibracionih standarda. Svi standardi su mjereni u triplikatu. Kalibracione krive su pripremljene razblaživanjem 10 ml standardnog/osnovnog rastvora miksa od 1000mg/l (Periodic Table mix 1 ICP - Ultra Trace) u 100 ml Milli-Q vode (provodljivost 0,056  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), kako bi se dobio radni standard koncentracije od 100 mg/l Fe, Cu i Zn u miksu. Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su kalibracioni standardi koncentracije: 0; 0,1; 0,5; 1,0 i 2mg/l, koji su napravljeni rastvaranjem 0; 0,1; 0,5; 1,0 i 2,0 ml radnog standarda u 100 ml Milli-Q vode, respektivno. Na osnovu površine pika u odnosu na koncentracije metala konstruisane su kalibracione krive za Fe, Cu i Zn. Uzorci slijepe probe (Milli-Q voda) su takođe mjereni kako bi se pratila kros-kontaminacija i eventualni gubici.

Kalibraciona kriva za određivanje Fe tehnikom FAAS je napravljena razblaživanjem standardnog rastvora (ULTRA Scientific Iron standard) koncentracije 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  takođe u 100 ml Milli-Q vode u opsegu od 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 i 3,0 mg/l.

Koncentracije u uzorcima majčinog mlijeka su bile veće od gornje granice kalibracije, i zbog toga su, uzorci razblaženi 10 puta, dok su formule za bebe i SRM-1849 razblaženi 100 puta, do odgovarajuće koncentracije koja odgovara opsegu linearnosti kalibracione krive.

### 3.2.2. Preciznost i tačnost

Tačnost metode procenjena je pomoću SRM-1849, pošto nije bilo odgovarajućeg referentnog materijala za majčino mlijeko kao i spakjovanjem uzorka mlijeka majke terminske bebe na dva nivoa tj. sa 10 i 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  miksa Zn, Fe i Cu. Kontrola kvaliteta je verifikovana kroz eksperimentalnu studiju procjene prinosa (recovery). Preciznost je procijenjena na osnovu vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) mjerenjem relativne standardne devijacije dobijene za šest mjerenja uzorka u duplikatu. Uzorci slijepe probe i kontrolni standard koncentracije 0,25 mg/l su mjereni u svakoj seriji uzoraka.

### 3.2.3. Osjetljivost metode

Za procjenu osjetljivosti analitičke metode limit detekcije (LOD) je određen kao  $3\sigma/S$  i limit kvantifikacija (LoQ) kao  $10\sigma/S$ . Prema preporukama Međunarodne unije za čistu i primijenjenu hemiju (IUPAC), izračunati su limiti detekcije i kvantifikacije ograničenja gde je  $\sigma$  standardna devijacija (SD) dobijena na osnovu deset ponovljenih mjerenja slijepe probe, a S je nagib analitičke krive.

## 3.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta

### 3.3.1. Mjerenje ORAC i ORP

Fluorescein (standardni rastvor pripremljen u vodi) je rastvoren u radnom rastvoru (75 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ; pH 7,4) pri koncentraciji od 1,7 nM. Rastvor (150  $\mu\text{L}$ ) je inkubiran na

37°C tokom 20 minuta i zatim pomiješan sa uzorcima (25 µL) i inkubiran dodatnih 10 minuta. Nakon toga, test je iniciran dodavanjem 25 µL rastvora 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidrohlorida (9,2 mM; svježe napravljen svaki dan). Fluorescencija (ekscitacija na 485 nm i emisije na 511 nm) je očitavana svakog minuta u toku jednog sata. ORAC vrijednosti su izražene kao ekvivalenti Troloks potencijala statičko oksido-redukcionog potencijala. ORP je integrisana, sveobuhvatna mjera ravnoteže između pro oksidativnih i antioksidativnih komponenti u biološkim sistemima. Niža vrijednost za ORP ukazuje na veći redukcionu potencijal biološkog sistema. ORP je određivan na sobnoj temperature mjerenjem na RedoxSYS Analyzer (Aytu BioScience, Inc, Englewood, CO).

### 3.3.2. Određivanje EPR

Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR) spin-trapping spektroskopija je primijenjena u cilju da se ispita sposobnost humanog mlijeka za zahvatanje hidrosil radikala ( $\text{HO}\bullet$ ), a da se definišu reaktivni proizvodi oksidacije različitih sastojaka mlijeka. Većina slobodnih radikala koji su proizvedeni u biološkim i biohemijskim sistemima pokazuju prilično kratak život koji sprječava njihovu direktnu detekciju.

EPR spin-trapp reaguje sa radikalima da stvori dugoživeće EPR-aktivne proizvode (spin proizvodi pripajanja) koji daju karakteristične spektre za različite radikale [277].  $\text{HO}\bullet$  radikali su generisani preko Fentonove reakcije koja je izvedena kombinacijom 0,6 mM  $\text{FeSO}_4$  i 3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Spin-trap DEPMPO (5- (diethokiphosphoril)-5-metil-1-pirolin-N-oksidi) je korišćen u konačnoj koncentraciji od 4 mM prije početka reakcije. Svi rastvori su pripremljeni u dejonizovanoj vodi i dopunjeni do finalne zapremine uzorka do svega 6% (mlijeko 94%). Uzorci su uvučeni u 10 cm dužine gas-propusne teflonske cijevi koje su upakovane u kvarcne kapilare. Inkubacija (1 minut) i mjerenja su izvršena na 20°C. EPR spektri su snimani na Varian E104-A EPR spektrometru koji radi na X-band (9,56 GHz) sa EV softverom (Scientific Software, Bloomington, IL), i sa sljedećim postavkama: modulacija amplitude, 2 G; modulacija frekvencija, 100 kHz;

mikrotalasna snaga, 20 mV; vremenska konstanta, 32 milisekundi; vrijeme skeniranja, 2 minuta. Identifikacija signala EPR i procjena intenziteta (u relativnim jedinicama-AU) urađena je simulacijom i dvostrukom integracijom korišćenjem kompjuterskog programa VINEPR Simfonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Darmstadt, Njemačka).

### **3.3.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta mjenjenjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala**

Antioksidativni kapacitet pet uzoraka infant formula i uzoraka seruma majki i beba određivan je mjenjenjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala, primjenom spektrofotometrijske DPPH metode. Zahvaljujući stabilnosti DPPH radikala u alkoholnom rastvoru ovakva vrsta testova se može rutinski izvoditi u metanolu, etanolu ili nekom drugom organskom rastvaraču [278,279]. Rezultati se izražavaju u procentima smanjenja apsorbance.

Antioksidativna aktivnost sposobnosti hvatanja DPPH radikala određena je u uzorcima infant formulai majčinog mlijeka uz određene modifikacije [260] i uzorcima seruma [54].

1 ml uzorka mlijeka i infant formule, pripremljenog kao obrok, doda se u 9 ml metanolnog rastvora DPPH (0,1 mM). Nakon inkubacije u trajanju od 30 min na 37 °C u mraku, doda se 5 ml hloroforma i centrifugira 5 minuta na 3000 g. Snimanjem nastalih obojenih kompleksa iz bistrog supernatanta na 517 nm izmjerena je apsorbance rastvora, čime je određena koncentracija uzoraka mlijeka. Kontrolni uzorak je 100 mM metanolni rastvor DPPH koji se dobija miješanjem 9 ml DPPH sa 1 ml demineralizovane vode.

Prilikom određivanja DPPH u serumu mora se izvršiti njegova deproteinizacija, upotrebom acetonitrila, a zatim sposobnost hvatanja DPPH radikala odrediti mjenjenjem apsorbance na 517 nm [54]. 200 µL seruma je pomiješano sa 200 µL acetonitrila (finalna koncentracija acetonitrila 9,5 mol/L), inkubirano je 2 min na sobnoj temperature (20°C) i zatim centrifugirano 10 min (4°C, 9500xg), i u daljem

radu je korišten deproteinizirani supernatant. 5  $\mu$ L 10 mM/L DPPH u metanolu je pomiješano sa 970  $\mu$ L metanola, nakon 3 min inkubacije na 20°C izmjerena je apsorbanca rastvora na 517 nm (A kontrole) zatim je 25  $\mu$ L deproteiniziranog seruma dodato u smještu, promiješano i nakon 30 min inkubacije ponovo snimljeno na 517nm (A uzorka).

Procenat kapaciteta hvatanja DPPH radikala se izračunava iz jednačine:

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

Sva određivanja u uzorcima mlijeka, seruma majki i slijepoj probi rađena su u triplikatu za DPPH metodu.

### 3.6. Statistička analiza

Nakon validacije metoda, analiziran je sadržaj Zn i Cu u 28 uzoraka terminskog majčinog mlijeka uzetih prvi dan nakon porođaja (u prva 24 časa) pomoću ICP-OES, dok je koncentracija gvožđa analizirana pomoću FAAS. Statistički podaci su dobijeni korišćenjem softvera SPSS 17.0. Za procjenu koeficijenta korelacije koncentracija Zn, Fe i Cu u uzorcima majčinog mlijeka je korišćen Pearson-ov koeficijent korelacije.

Za uzorke humanog mlijeka prijevremeno rođenih i terminskih beba statističke analize su rađene pomoću softvera Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Rezultati su prikazani i preko boks plotova. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentila i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-autlajer oblast. Autlajeri i ekstremi su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 1,5x i 3x interkvartilne oblasti van boksova. P-vrijednosti su određivane korišćenjem dvosmjerne analize varijanse sa post hoc Duncan testom ili korišćenjem neparametarskog Mann-Whitney U testa. Korelacije su određivane primjenom

Pearsonovog koeficijenta (R). Rezultati su takođe predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

## **IV. REZULTATI I DISKUSIJA**



## 4.1. Rezultati validacione studije

### 4.1.1. Kalibracione krive i linearnost

Parametri senzitivnosti i linearnosti za ICP-OES i FAAS metode su prikazani u Tabeli 10 i 11, dok su kalibracione krive za Fe, Cu i Zn prikazane na slikama 13, 14 i 15 za ICP-OES i 16, 17 i 18 za FAAS instrument. Za procjenu linearnosti utvrđen je koeficijent korelacije od  $R^2 > 0,999$  po definiciji metode kao prihvatljiv za cilj studije. Za ispitivane elemente u tragovima, Zn, Fe i Cu, koeficijenti korelacije su bili veći od vrijednosti potrebnih za metodu. Unutar mijernog opsega, odstupanja od teorijskih vrijednosti nijesu prelazila 5%, pokazujući dobru korelaciju između koncentracije elementa i površine.

**Tabela 10.** Analitički parametri validacije ICP-OES metode

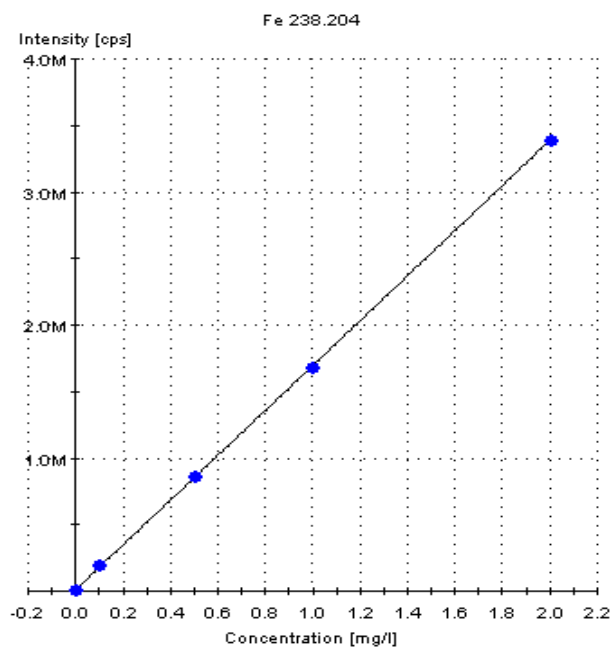
Element	Relativna preciznost (%)	R <sup>2</sup>	Linearni opseg (µg/l)	LoD (µg/l)	LoQ (µg/l)
Zn	4	0,99994	0,9-2400	1,5	5
Fe	8	0,99971	0,7-2400	1,5	5
Cu	1	0,99957	1,24-2400	3,0	10

**Tabela 11.** Analitički parametri validacije FAAS metode

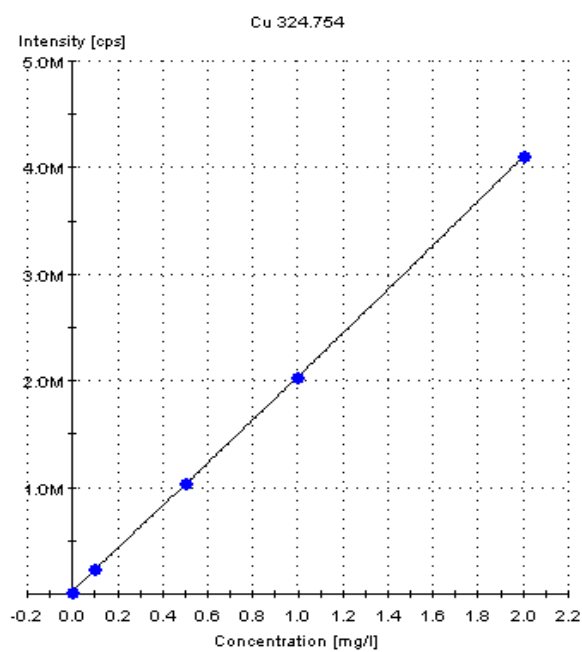
Element	Relativna preciznost (%)	R <sup>2</sup>	Linearni opseg (mg/l)	LoD (mg/l)	LoQ (mg/l)
Zn	3	0,9994	0,1 - 2,5	0,06	0,1
Fe	3	0,9996	0,1 - 3,0	0,05	0,1
Cu	0,6	0,9992	0,1 - 3,0	0,02	0,1

Na osnovu tabela 10 i 11 može se zaključiti da je SD za intra esej (6 mjerenja uzorka humanog mlijeka u duplikatu) bila 4% za Zn, 8% za Fe, 1 % za Cu primjenom ICP-OES metode i 3 % za Zn, 3 % za Fe i 0.6 % i za Cu primjenom FAAS metode. Koeficijent varijacije (CV) je bio prihvatljiv za humane uzorke (CV < 7 %).

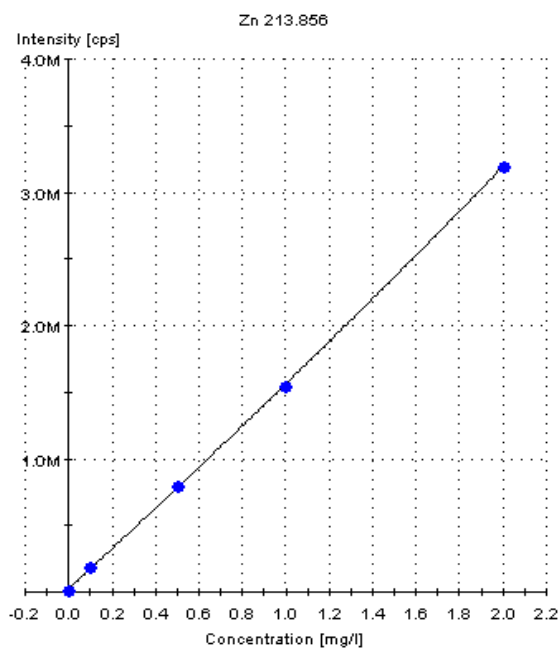
Kalibracione krive za Fe, Cu i Zn dobijene na ICP-OES instrumentu



Slika 13. Kalibraciona kriva za Fe ( $R^2=0,99996$ )

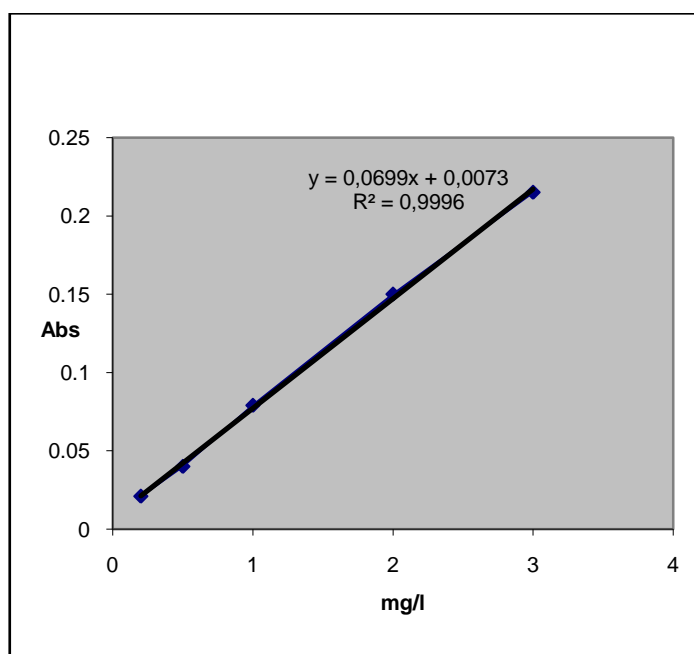


Slika 14. Kalibraciona kriva za Cu ( $R^2=0,99999$ )

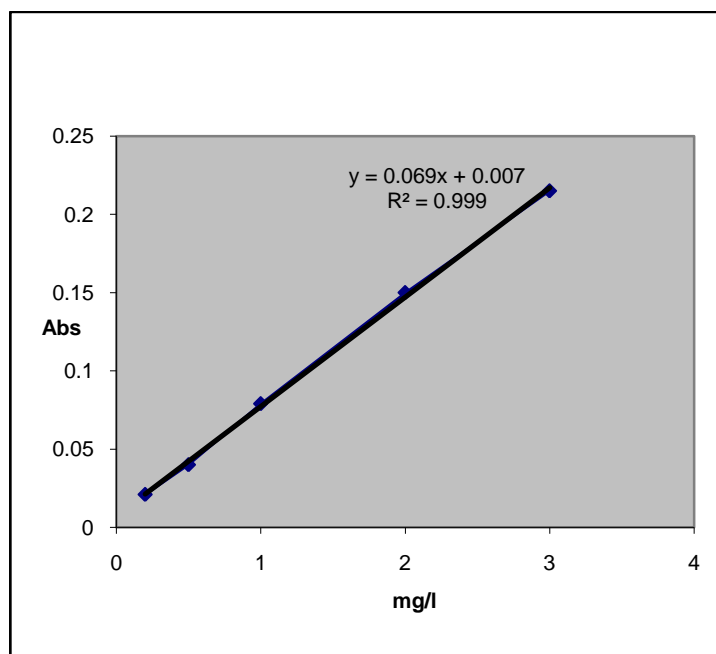


Slika 15. Kalibraciona kriva za Zn ( $R^2=0,99991$ )

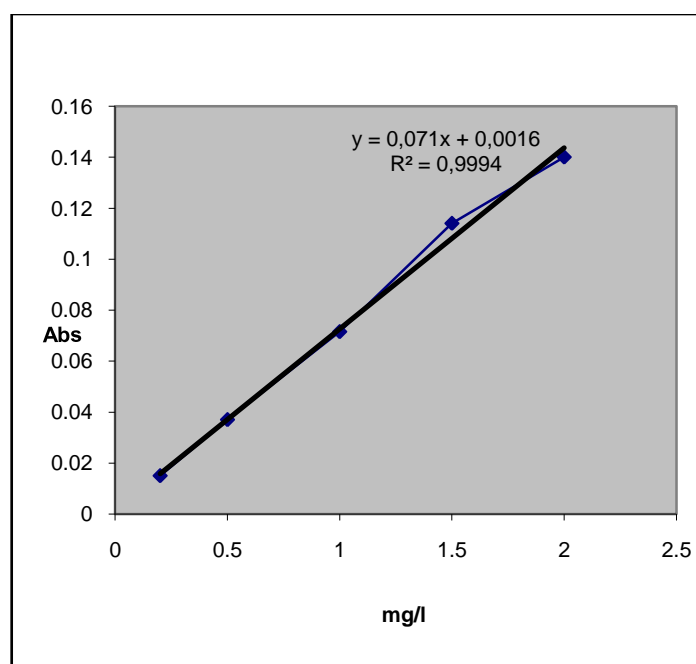
*Kalibracione krive za Fe, Cu i Zn dobijene na FAAS instrumentu*



Slika 16. Kalibraciona kriva za Fe ( $R^2=0,9996$ )



Slika 17. Kalibraciona kriva za Cu ( $R^2=0,9992$ )



Slika 18. Kalibraciona kriva za Zn ( $R^2=0,9994$ )

### 4.1.2. Određivanje tačnosti

ICP-OES i FAAS rezultati za Zn, Fe i Cu u SRM-1849 formuli za ishranu odojčadi/odraslih i formulama za odojčad (Aptamil, Bebelac, NAN1, HIPP i Impamil - Mil1) su prikazani u tabelama 12 i 13. Koncentracije dobijene pomoću FAAS i ICP-OES za SRM-1849 odgovarale su referentnim vrijednostima, sa boljim rezultatima kod ICP-OES za Zn i Cu dok je FAAS pokazao bolje rezultate za Fe, kao i u slučaju procjene procenta prinosa (Tabela 14). Iako je mlijeko kompleksni matriks sastavljen od proteina, ugljenih hidrata i masti, studija preciznosti je pokazala dobar procenat prinosa na dva nivoa koncentracija (spajkovanje uzorka humanog mlijeka terminske bebe sa 10 i 50  $\mu\text{g/l}$ ) (tabela 15). Na osnovu dobijenih podataka za spajkovani uzorak se vidi da se prosječan procenat prinosa kretao u rasponu od 90% do 94% za Zn, 90% do 102% za Cu prema ICP-OES i 97,3% do 103,3% za Fe prema FAAS (Tabela 15).

**Tabela 12.** Izmjerene, sertifikovane i deklarirane vrijednosti elemenata u infant formulama i SRM-1849 određivane ICP-OES (n=12)

	Izmjerene vrijednosti mg/100g			Sertifikovana/deklarirana vrijednost mg/100g praha	
	Min	Max	SV* ± SD		
Zn	SRM-1849	12,89	14,25	<b>13,93 ±0,40</b>	15,23±0,5
	Aptamil 1	3,49	3,71	<b>3,52 ±0,20</b>	3,6
	Bebelac 1	3,28	3,55	<b>3,48 ±0,30</b>	3,6
	HIPP	3,75	4,10	<b>3,86 ±0,40</b>	4,0
	NAN 1	4,65	5,10	<b>4,75 ±0,40</b>	5,4
	Impamil®Mil1	4,25	4,85	<b>4,45 ±0,20</b>	4,3
Fe	SRM-1849	13,88	17,04	<b>16,47±0,80</b>	17,71±0,3
	Aptamil 1	3,59	3,94	<b>3,78±0,40</b>	3,9
	Bebelac 1	3,38	3,71	<b>3,63±0,30</b>	3,9
	HIPP	3,73	4,21	<b>3,89±0,50</b>	4,0
	NAN 1	4,45	4,95	<b>4,56±0,40</b>	5,2
	Impamil®Mil1	3,26	4,00	<b>3,37±0,10</b>	3,6
Cu	SRM-1849	1,83	2,07	<b>2,01±0,10</b>	2,03±0,04
	Aptamil 1	0,26	0,33	<b>0,30±0,05</b>	0,29
	Bebelac 1	0,26	0,31	<b>0,28±0,03</b>	0,29
	HIPP	0,25	0,28	<b>0,26±0,05</b>	0,27
	NAN 1	0,34	0,41	<b>0,38±0,05</b>	0,40
	Impamil®Mil1	0,30	0,36	<b>0,32±0,06</b>	0,36

SV\* - srednja vrijednost

**Tabela 13.** Izmjerene, sertifikovane i deklarirane vrijednosti elemenata u infant formulama i SRM-1849 određivane FAAS (n=12)

	Izmjerene vrijednosti mg/100g praha			Sertifikovana/deklarirana	
	Min	Max	SV*± SD	a vrijednost mg/100g	
Zn	SRM-1849	12,74	13,14	12,90±0,30	15,23±0,5
	Aptamil 1	2,75	3,21	3,10±0,40	3,6
	Bebelac 1	2,85	3,15	3,09±0,40	3,6
	HIPP	3,37	3,75	3,58±0,30	4,0
	NAN 1	4,12	5,00	4,55±0,50	5,4
	Impamil®Mil1	3,89	4,15	4,01±0,10	4,3
Fe	SRM-1849	17,23	18,30	17,74±0,30	17,71±0,3
	Aptamil 1	3,55	3,85	3,61±0,30	3,9
	Bebelac 1	3,67	3,90	3,75±0,30	3,9
	HIPP	3,78	4,10	3,95±0,30	4,0
	NAN 1	4,98	5,29	5,05±0,50	5,2
	Impamil®Mil1	3,25	3,75	3,55±0,10	3,6
Cu	SRM-1849	1,82	2,21	1,99±0,06	2,03±0,04
	Aptamil 1	0,27	0,32	0,29±0,03	0,29
	Bebelac 1	0,25	0,30	0,27±0,03	0,29
	HIPP	0,21	0,27	0,24±0,04	0,27
	NAN 1	0,34	0,40	0,37±0,02	0,40
	Impamil®Mil1	0,31	0,37	0,33±0,08	0,36

SV\* - srednja vrijednost

**Tabela 14.** Uporedni pregled prinosa za ICP-OES  
i FAAS za SRM-1849 (%)

Element	ICP-OES	FAAS
Zn	91	85
Fe	93	100
Cu	99	98

**Tabela 15.** Procenat prinosa ispitivanih elemenata ICP-OES metodom (Zn i Cu) i FAAS metodom (Fe) (n=6)

Element	Koncentracija (mg/l)	Dodato (mg/l)	Očekivana koncentracija (mg/l)	Dobijena koncentracija (mg/l)	Prinos (%)
Zn	5,35	0,10	5,45	4,91±0,60	90,0
		0,50	5,85	5,51±0,40	94,0
Fe	0,83	0,10	0,93	0,91±0,20	97,3
		0,50	1,33	1,37±0,20	103,3
Cu	0,47	0,10	0,57	0,51±0,04	90,0
		0,50	0,97	0,99±0,06	102,0

Na osnovu prethodno prezentovane validacione studije može se zaključiti da su analitički parametri (linearnost, preciznost i tačnost) zadovoljavajući za određivanje Zn i Cu ICP-OES i Fe FAAS tehnikom iz uzoraka pripremljenih bez utroška bilo kakvih agresivnih hemikalija osim čiste Mili-Q vode.

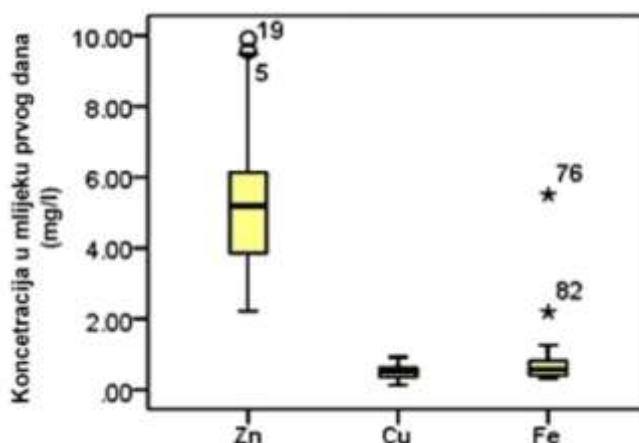
Prije nego što se počelo sa analizom uzoraka humanog mlijeka majki terminskih i prijevremeno rođenih beba i njihovih seruma, urađena je provjera prethodno validovane metode na 28 uzoraka mlijeka majki terminskih beba i to prvog dana nakon porođaja. Uzorci slijepe probe kao i kontrolni standard koncentracije 0,25 mg/l, i SRM-1849 su analizirani u svakoj seriji uzoraka mlijeka i seruma (Tabela 16).

**Tabela 16.** Preciznost i prinos na kontrolnom standardu (0,25 mg/l)

Element	Srednja vrijednost±SD	Prinos (%)	RSD (%)
Zn	0,2632 ± 0,0085	105,3	3,40
Fe	0,2592 ± 0,0043	103,7	1,65
Cu	0,2583 ± 0,0032	103,3	1,23



Na slici 19. su prikazane koncentracije Zn, Cu i Fe u uzorcima terminskog mlijeka prvog dana nakon porođaja, dok su u tabeli 17 prikazani i korelacioni koeficijenti za izmjerene koncentracije Zn, Cu i Fe u majčinom mlijeku prvog dana nakon porođaja.



**Slika 19.** Koncentracija Zn, Cu i Fe u 28 uzoraka terminskog humanog mlijeka prvog dana nakon porođaja. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentil i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-autlajer oblast. Autlajeri i ekstremi su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 1,5x i 3x interkvartilne oblasti van boksova.

**Tabela 17.** Korelacioni koncentracioni koeficijent za Zn, Cu i Fe uzorcima mlijeka majki terminskih beba prvog dana

Element	Zn	Cu	Fe
Zn	1		
Cu	-0,135	1	
Fe	-0,069	0,116	1

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 16 može se zaključiti da ne postoji statistički značajna korelacija ( $p > 0,05$ ) između koncentracije Zn, Cu i Fe u uzorcima terminskog majčinog mlijeka prvog dana nakon porođaja.

## **4.2. Ispitivanje koncentracije gvožđa FAAS, bakra i cinka ICP-OES metodom u majčinom mlijeku terminskih beba i serumu beba**

Nakon validacije ICP-OES i FAAS metoda uz primjenu nove metode pripreme uzoraka majčinog mlijeka – razblaživanjem u destilovanoj vodi, određen je sadržaj Fe, Cu i Zn u 60 uzoraka humanog mlijeka terminskih beba kao i sadržaj ovih mikroelemenata u serumu beba.

Glavni cilj je bio da se urade procjene promjene koncentracija gvožđa, bakra i cinka u humanom mlijeku i serumu odojčadi i definiše postojanje korelacije među uzorcima tokom laktacije.

Ova vrsta studija urađena je po prvi put u Srbiji i dobijeni podaci su veoma korisni za definisanje statusa ispitivanih mikroelemenata kod dojilja i uticaj na njihove vrijednosti u serumu odojčadi. Sve majke i bebe su bile zdrave na dan uzimanja uzoraka, osim prvog dana kada je 1/3 iz grupe odojčadi imala žuticu.

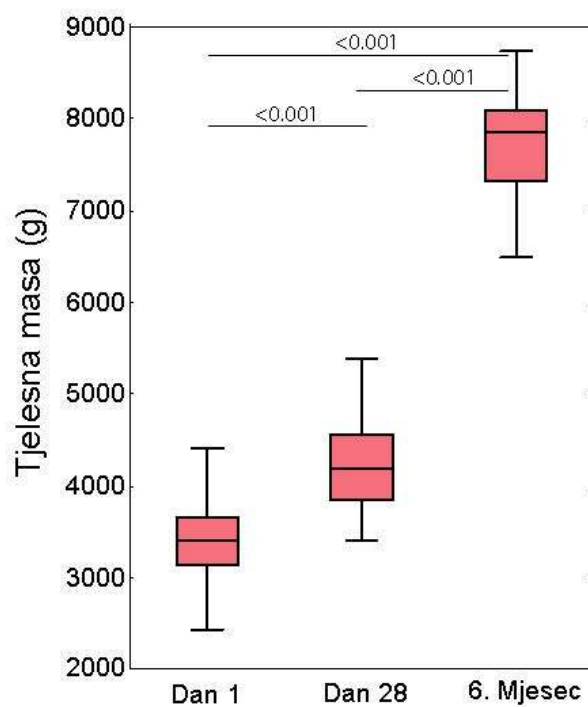
Srednje vrijednosti koncentracije ispitivanih elemenata u uzorcima humanog mlijeka i seruma terminskih beba prvi, 28-i dan i nakon 6 mjeseci laktacije prikazani su u Tabeli 18 i 19. Promjena tjelesne mase terminski rođenih beba u prvom, dvadesetom danu i nakon 6 mjeseci od rođenja prikazana je na slici 20. Promjene koncentracije Fe, Cu i Zn u uzorcima seruma beba i humanog mlijeka majki terminskih beba prvog, dvadesetog dana i nakon 6 mjeseci prikazane su na slikama 21, 22 i 23.

**Tabela 18.** Srednje vrijednosti koncentracija Zn, Cu i Fe u humanom mlijeku terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije

	Koncentracija elementa (mg/l)		
	Zn	Cu	Fe
	Srednja vrijednost ± SD		
1 dan	4,702±1,743	0,433±0,232	0,614±0,521
28 dan	2,648±1,058	0,359±0,132	0,537±0,552
6 mjeseci	0,457±0,359	0,349±0,254	0,401±0,389
N	60		

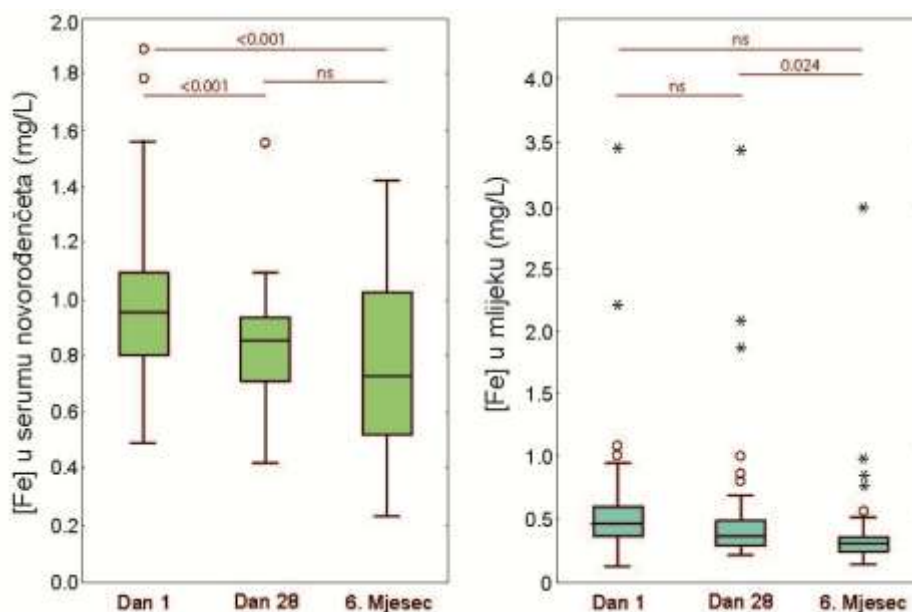
**Tabela 19.** Srednje vrijednosti koncentracija Zn, Cu i Fe u serumu terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije

	Koncentracija elementa (mg/l)		
	Zn	Cu	Fe
	Srednja vrijednost ± SD		
1 dan	0,520±0,116	0,713±0,164	0,982±0,286
28 dan	0,590±0,192	0,421±0,153	0,816±0,187
6 mjeseci	0,684±0,285	0,536±0,231	0,761±0,305
N	60		



**Slika 20.** Tjelesna masa terminskih beba u prvom, 28. danu i šestom mjesecu od rođenja.

Kao što se i očekivalo, tjelesna masa novorođenčadi se povećavala. Tjelesna masa odojčeta nije pokazala značajnu korelaciju sa koncentracijama Zn, Cu i Fe u humanom mlijeku terminskih beba.

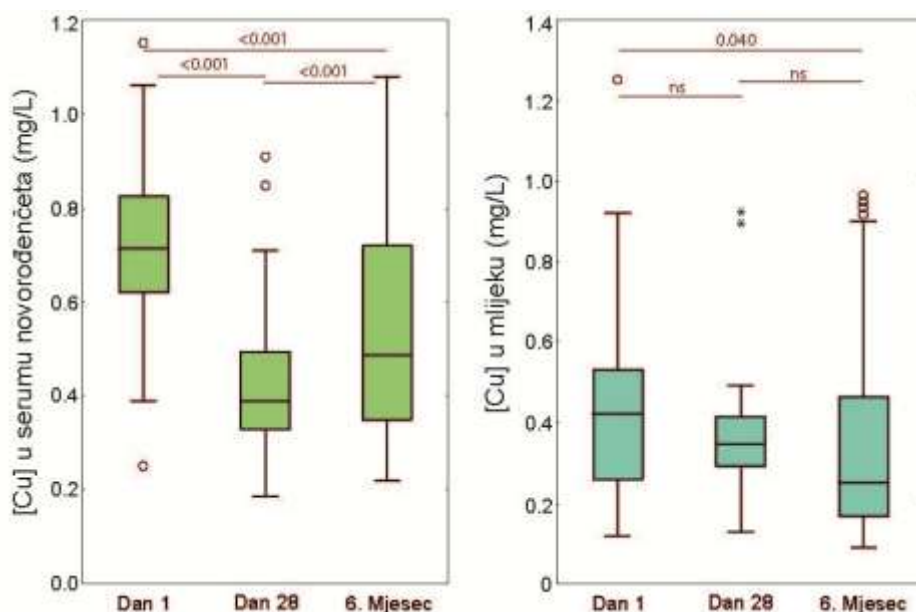


**Slika 21.** Koncentracija gvožđa u serumu novorođenčadi i humanom mlijeku majki terminskih beba prvog, dvadesetosmog dana i nakon 6 mjeseci laktacije. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentil i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-autlajer oblast. Autlajeri (krugovi) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 1.5× interkvartilne oblasti van boksova. Ekstremi (zvjezdice) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 3× interkvartilne oblasti van boksova. ns - statistički nesignifikanto.

Na slici 21 pokazane su promjene u koncentraciji gvožđa u serumu terminskih beba i humanom mlijeku majki na rođenju (prvi dan), na kraju neonatalnog perioda (28. dan) i šest mjeseci nakon rođenja. Nivo gvožđa u serumu opada vremenom, a nivo gvožđa se nije razlikovao u serumima novorođenčadi sa ( $n=20$ ) i bez ( $n=40$ ) neonatalne žutice. Pored toga, nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama gvožđa u serumu odojčadi različitog pola. Koncentracija Fe u serumu prvog dana je pokazala značajnu negativnu korelaciju sa gestacijom ( $R = -0.261$ ;  $p = 0.044$ ). Na rođenju terminski zdrave bebe imaju značajne zalihe Fe oko 75 mg/kg, veliku zapreminu krvi i koncentraciju hemoglobina koja je u skladu sa tjelesnom težinom [280]. Srednja vrijednost koncentracije Fe prvog dana laktacije iznosi 982  $\mu\text{g/l}$  i u skladu je referentnim vrijednostima za odojčad koje se kreću od 1000-2700  $\mu\text{g/l}$  seruma [281]. Primjećuje se pad sadržaja Fe u serumu terminskih beba u period do 6

mjeseca laktacije koji se ipak kreće u granicama dozvoljenih vrijednosti (300-600  $\mu\text{g/l}$  za novorođenčad stariju od 5 mjeseci).

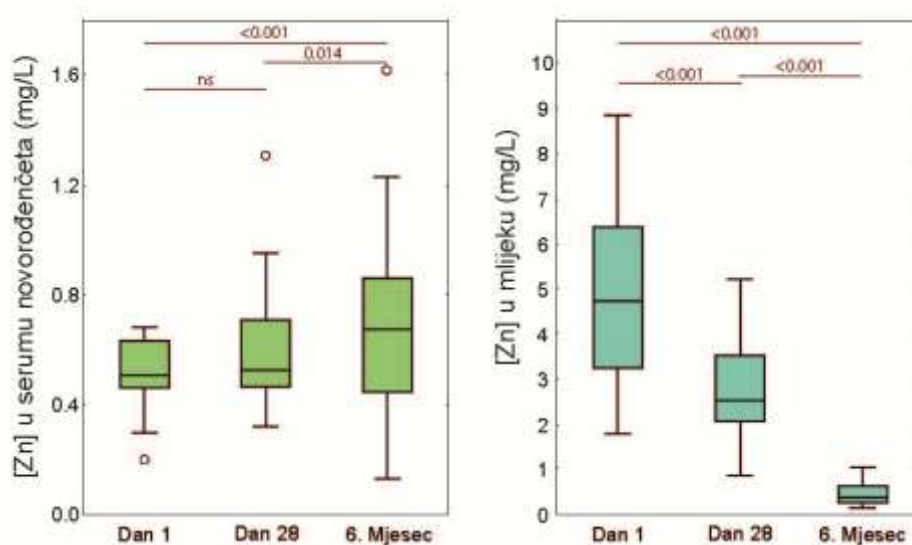
Koncentracija gvožđa u mlijeku pokazuje skoro identičan trend u odnosu na nivo u serumu odojčadi, tj. opada vremenom. Ipak dobijene vrijednosti za sadržaj Fe u humanom mlijeku u cijelom periodu istraživanja, do 6 mjeseci laktacije, su u skladu sa vrijednostima za preporučeni dnevni unos koji iznosi 0,27 mg jer sadržaj Fe izuzetno varira, od 0,1-1,6 mg/l u različitim fazama laktacije.[17,216]



**Slika 22.** Koncentracija bakra u serumu novorođenčadi i humanom mlijeku majki terminskih beba prvog, dvadesetmog dana i nakon 6 mjeseci laktacije. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentil i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-autlajer oblast. Autlajeri (krugovi) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira  $1.5\times$  interkvartilne oblasti van boksova. Ekstremi (zvjezdice) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira  $3\times$  interkvartilne oblasti van boksova. ns - statistički nesignifikanto.

Na slici 22 pokazane su promjene u koncentraciji bakra u serumu terminskih beba i humanom mlijeku majki na rođenju (prvi dan), na kraju neonatalnog perioda (28. dan) i šest mjeseci nakon rođenja. Nivo bakra u serumu i mlijeku opada vremenom, trend sličan gvožđu, a takođe se nije razlikovao u serumima novorođenčadi sa ( $n=20$ ) i bez ( $n=40$ ) neonatalne žutice, niti je bilo statistički značajne razlike u

koncentracijama bakra u serumu odojčadi različitog pola [67,282]. Koncentracija Cu u mlijeku prvog dana je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju sa gestacijom ( $R = 0.364$ ;  $p = 0.004$ ). Dobijene vrijednosti za sadržaj Cu u humanom mlijeku u cijelom periodu istraživanja, do 6 mjeseci laktacije, su u skladu sa vrijednostima za preporučeni dnevni unos koji iznosi 0,20 mg, kao i sa prethodnim istraživanjima [17,248,249].



**Slika 23.** Koncentracija cinka u serumu novorođenčadi i humanom mlijeku majki terminskih beba prvog, dvadesetosmog dana i nakon 6 mjeseci laktacije. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentil i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-autlajer oblast. Autlajeri (krugovi) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 1.5× i 3x interkvartilne oblasti van boksova. ns - statistički nesignifikanto.

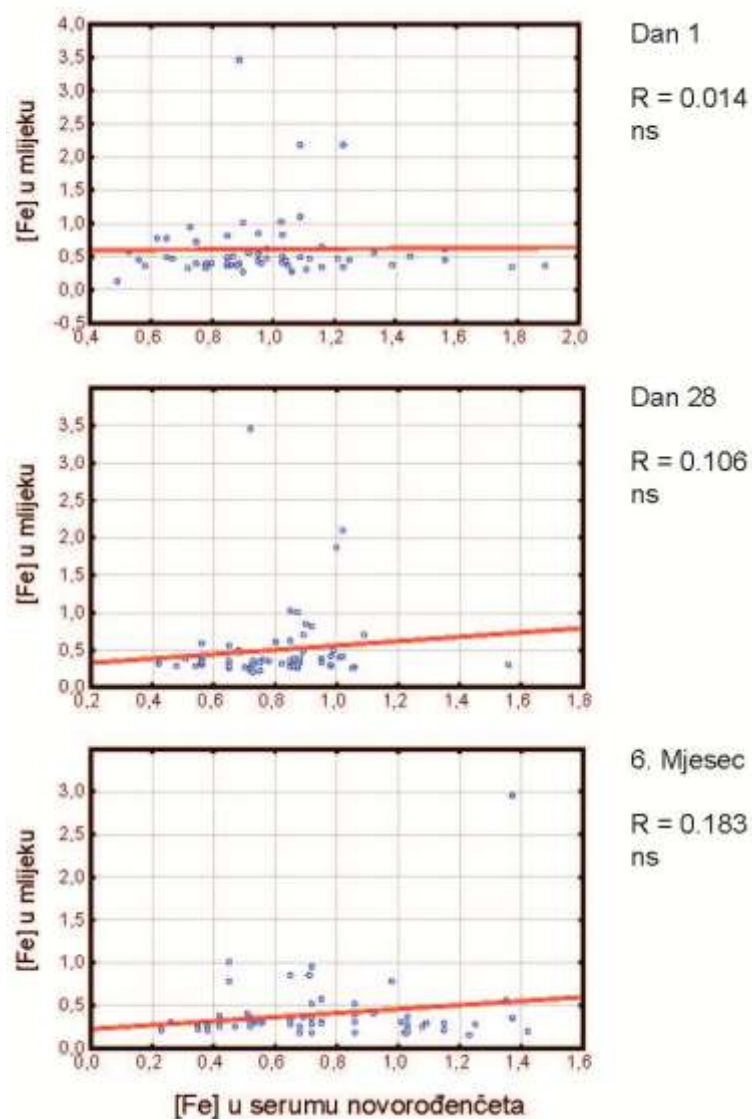
Na slici 23 pokazane su promjene u koncentraciji cinka u serumu terminskih beba i humanom mlijeku majki na rođenju (prvi dan), na kraju neonatalnog perioda (28. dan) i šest mjeseci nakon rođenja. Nivo koncentracije cinka rasteu toku vremena i u šestom mjesecu ima veću vrijednost u odnosu na druge dvije vremenske tačke. Kao i u slučaju gvožđa i bakra nema razlike u sadržaju cinka u serumima novorođenčadi sa ( $n=20$ ) i bez ( $n=40$ ) neonatalne žutice. Pored toga, nije bilo ni statistički značajne razlike u koncentracijama cinka u serumu odojčadi različitog pola [282].

Koncentracija cinka u mlijeku pokazuje suprotan trend u odnosu na nivoe u serumu odojčadi, tj. opada vremenom što je u skladu sa ranijim istraživanjima. Dobijene vrijednosti za koncentraciju cinka u zrelom mlijeku su u skladu sa prethodnim metodološkim studijama i studijama rađenim na različitim populacionim grupama [17,183,283,284]. U slučaju isključivog dojenja, količina cinka od 2 mg/dan (prema Referencama za ishranu), mora biti sadržana u dnevnoj količini majčinog mlijeka koju novorođenče popije [141].

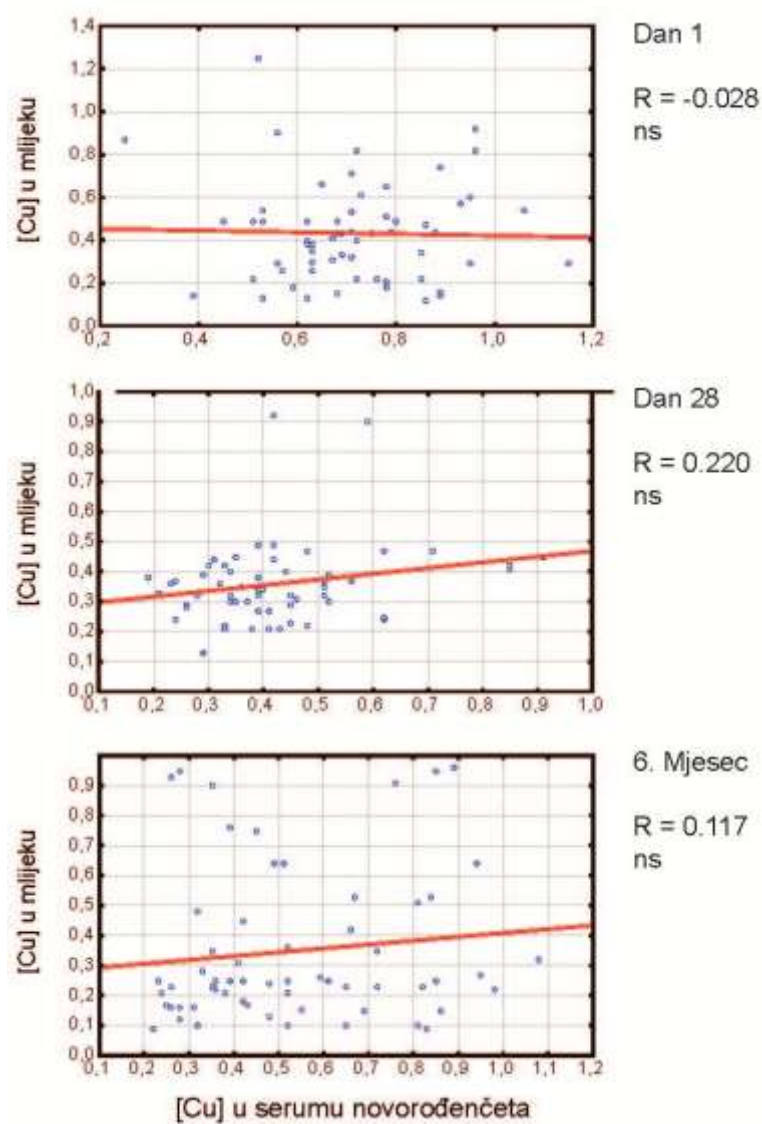
Prema dobijenim rezultatima, mlijeko iz grupe ispitivanih žena iz Srbije obezbjeđuje dovoljne količine cinka u toku prvog mjeseca života djeteta. Šest mjeseci nakon porođaja, koncentracija cinka u mlijeku drastično opada (od  $4,7 \pm 1,7$  mg/l prvog dana do  $0,5 \pm 0,4$  mg /l nakon 6 mjeseci). Ovo ukazuje da treba savjetovati majkama suplementaciju cinka, u cilju ublažavanja nedostatka cinka u kasnijem periodu laktacije. Kolostrum (mlijeko prvi dan nakon porođaja) ima najveću koncentraciju cinka. Adekvatno snabdjevanje cinkom je od suštinskog značaja za novorođenče posebno tokom prvih dana života. Studije na životinjama pokazale su da kod štenadi dolazi do rane smrti usljed nedostatka Zn, zbog mutacije u Zn transporteru (ZnT-4), kojim se prenosi Zn u mlijeku u mliječnim žlijezdama [285].

Visok sadržaj cinka u kolostrumu utiče i na njegove bolje karakteristike u odnosu na zrelo mlijeko, kao što su visoka antioksidativna aktivnost i prisustvo nekih drugih elemenata u tragovima [211,286].

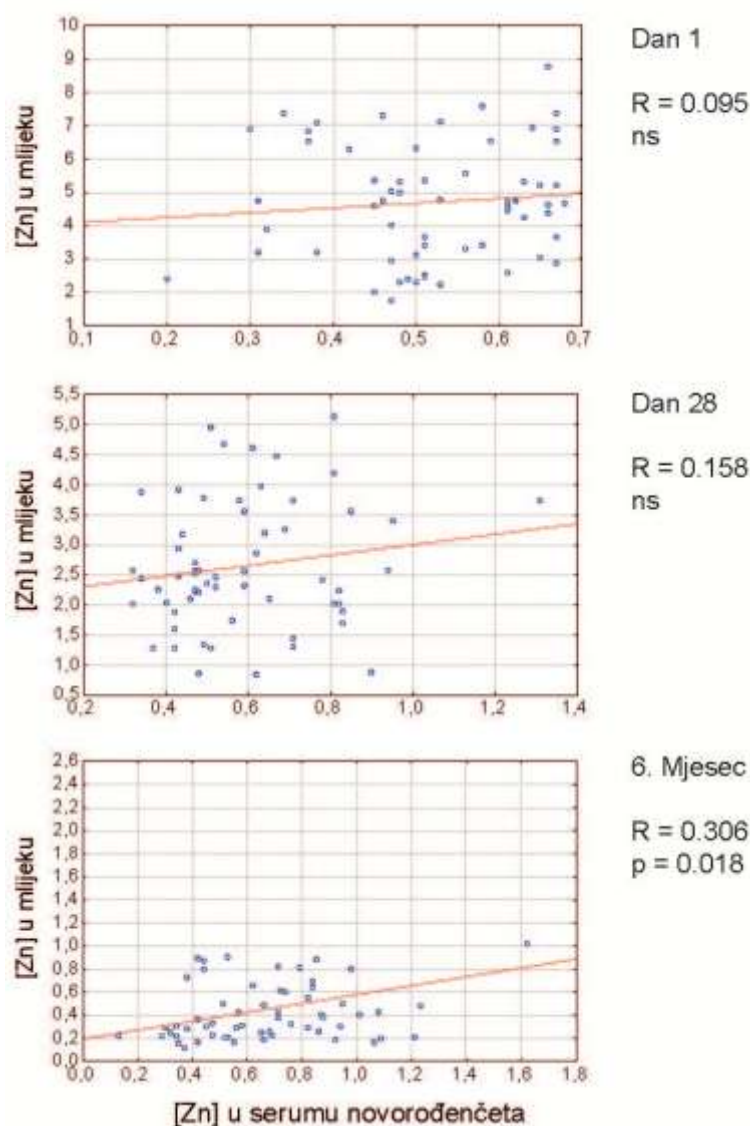




**Slika 24.** Korelacija između koncentracija Fe u serumu novorođenčeta i humanom mlijeku majki terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.



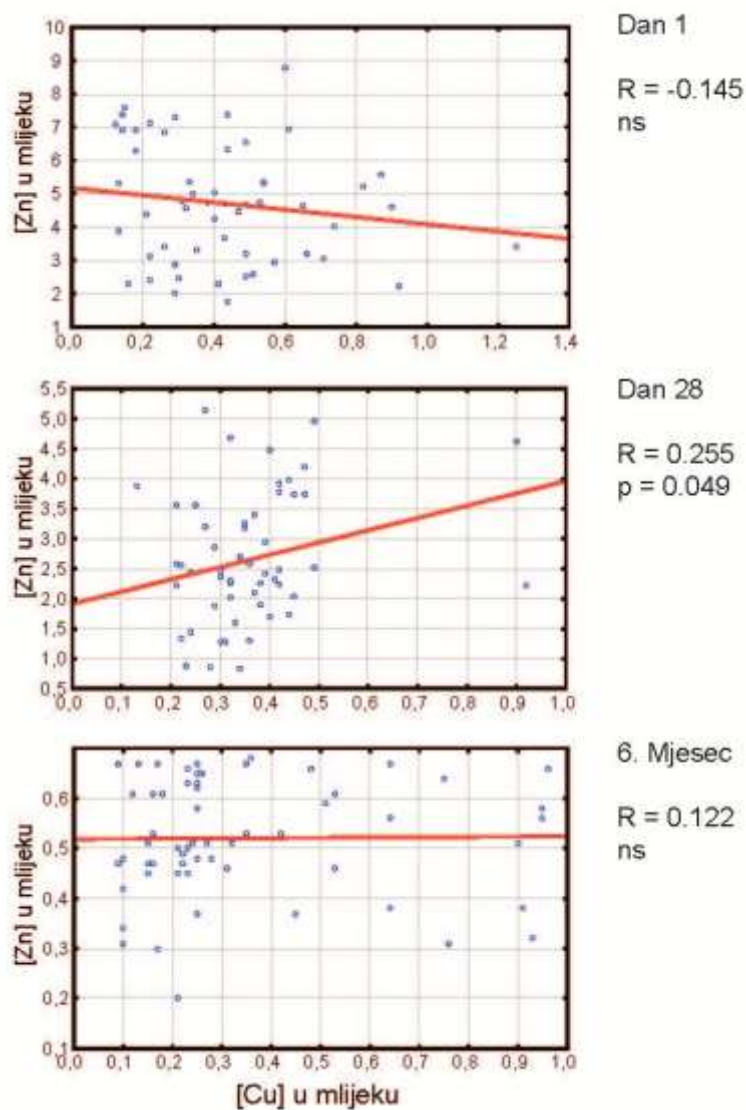
**Slika 25.** Korelacija između koncentracija Cu u serumu novorođenčeta i humanom mlijeku majki terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.



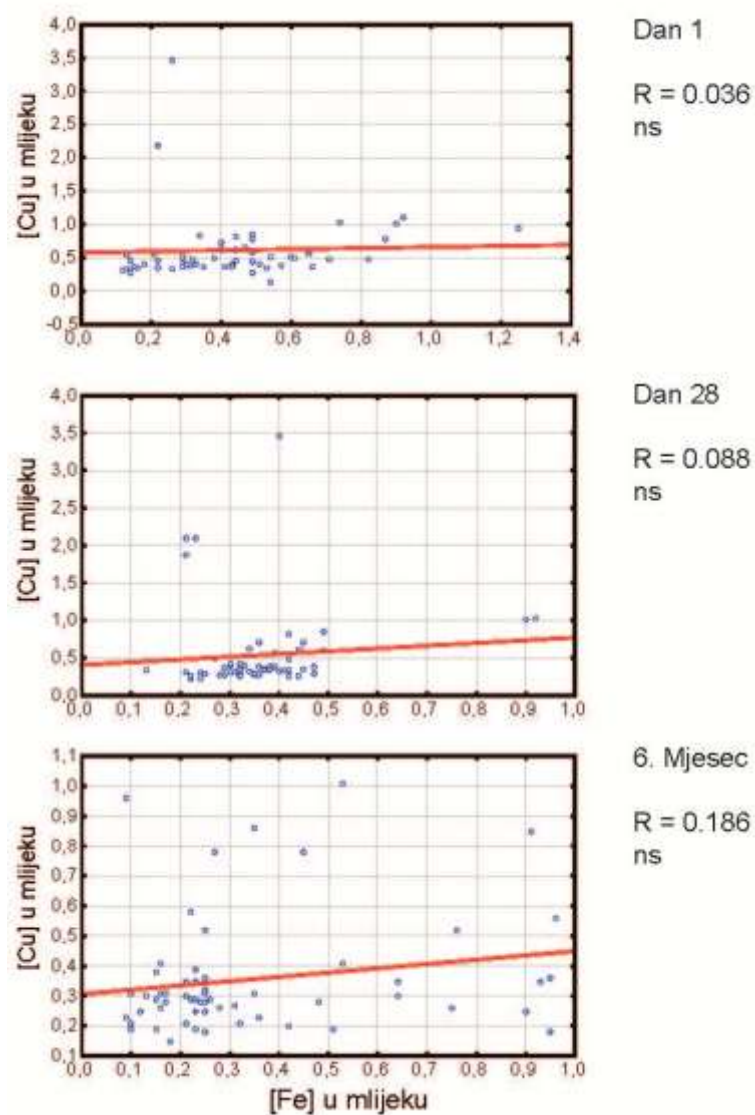
**Slika 25.** Korelacija između koncentracija Zn u serumu novorođenčeta i humanom mlijeku majki terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.

Pearsonovi koeficijenti korelacije su izračunati da se utvrdi zavisnost između koncentracije gvožđa, bakra, cinka u serumu novorođenčadi i humanog mlijeka majki terminskih beba (slike 24, 25 i 26). U ispitivanim uzorcima ne postoji statistički značajna korelacija između koncentracija gvožđa i bakra u serumu i mlijeku.

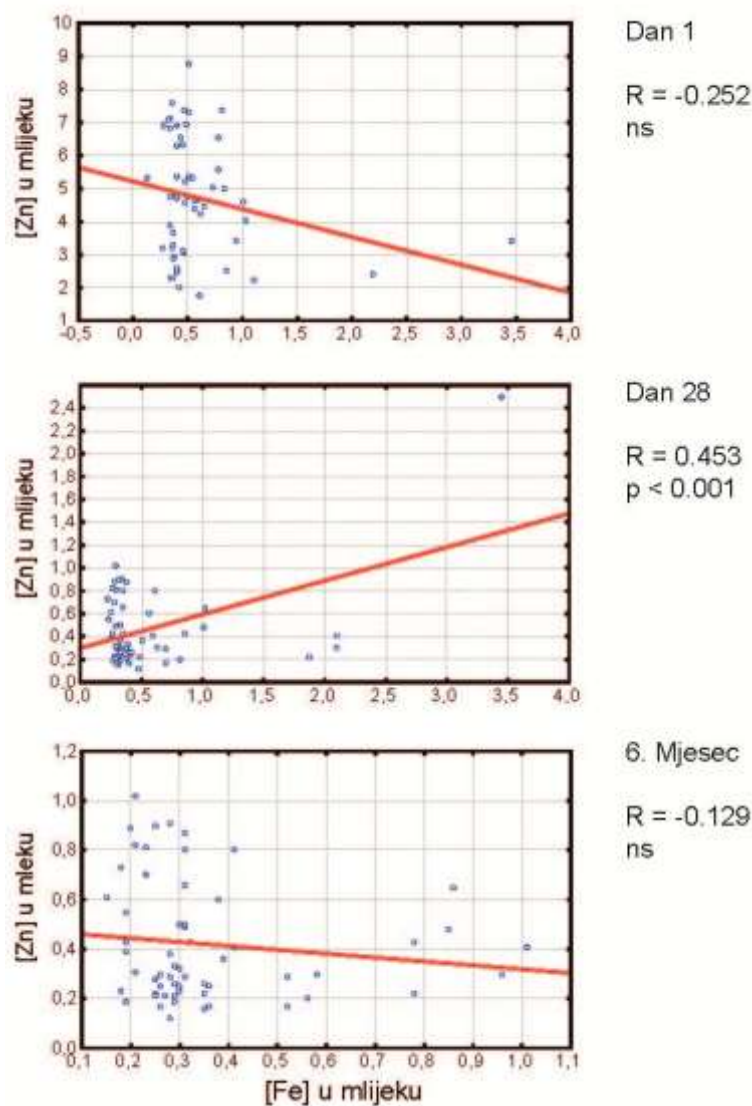
Postoji značajna pozitivna korelacija za koncentraciju cinka u serumu i mlijeku u šestom mjesecu ( $R = 0,306$ ;  $p = 0,018$ ).



**Slika 26.** Korelacija između koncentracije Cu i Zn u humanom mljeku majki terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.



**Slika 26.** Korelacija između koncentracije Cu i Fe u humanom mlijeku majki terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto



**Slika 27.** Korelacija između koncentracije Fe i Zn u humanom mlijeku majki terminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto

Na osnovu izračunatih vrijednosti Pearsonovih koeficijenata za međusobne korelacije Fe, Cu i Zn u uzorcima humanog mlijeka terminskih beba može se zaključiti da se javlja pozitivna korelacija dvadeset osmog dana laktacije između Cu i Zn ( $R=0,255$ ,  $p=0,049$ ) kao i Fe i Zn ( $R=0,453$ ,  $p<0,001$ ), dok ne postoji značajna korelacija između Fe i Cu.

Pozitivne vrijednosti korelacionih koeficijenata ukazuju da su "metabolizam" Cu i Zn u mlijeku povezani, koriste povezan transportni sistem, a takođe ulaze u sastav istog enzima u mlijeku Cu/Zn SOD.

Postoji veza između rezervoara gvožđa (feritina) i nivoa gvožđa u mlijeku, mliječna žlijezda se snabdijeva gvožđem iz krvotoka, odnosno, gvožđem iz seruma [234]. Veća bioraspoloživost cinka objašnjava se proteinskim sastavom mlijeka, njegovim vezivanjem za laktoalbumin, pri čemu je vezani cink dostupniji za apsorpciju i usvojivost [235].

### **4.3. Ispitivanje koncentracije gvožđa FAAS, bakra i cinka ICP-OES metodom u majčinom mlijeku preterminskih beba i serumu beba**

Sadržaj Fe, Cu i Zn određivan je u 56 uzoraka humanog mlijeka majki preterminskih beba kao i sadržaj ovih mikroelemenata u serumu beba.

Cilj je bio da se urade procjene promjene koncentracija gvožđa, bakra i cinka u humanom mlijeku majki preterminskih beba i serumu odojčadi kao i da definiše postojanje korelacije među uzorcima tokom laktacije.

Dobijeni podaci su veoma korisni za definisanje statusa ispitivanih mikroelemenata kod dojilja i uticaj na njihove vrijednosti u serumu preterminskih beba. Sve majke i bebe su bile zdrave na dan uzimanja uzoraka, osim prvog dana kada je 1/4 iz grupe odojčadi imala žuticu.

Srednje vrijednosti koncentracije ispitivanih elemenata u uzorcima humanog mlijeka i seruma preterminskih beba prvi, 28-i dan i nakon 6 mjeseci laktacije prikazani su u Tabeli 20 i 21. Promjena tjelesne mase preterminski rođenih beba u prvom, dvadesetosmom danu i nakon 6 mjeseci od rođenja prikazana je na slici 28. Promjene koncentracije Fe, Cu i Zn u uzorcima seruma beba i humanog mlijeka majki preterminskih beba prvog, dvadesetosmog dana i nakon 6 mjeseci prikazane su na slikama 29, 30 i 31. Tjelesna masa preterminskih beba je takođe rasla u periodu prvih

6 mjeseci od rođenja. Tjelesna masa nija pokazala značajnu korelaciju sa koncentracijama Cu, Zn i Fe u mlijeku. Tjelesna masa pozitivno korelira sa koncentracijom bakra u serumu odojčeta u 28. danu ( $R = 0.291$ ;  $p = 0.029$ ).

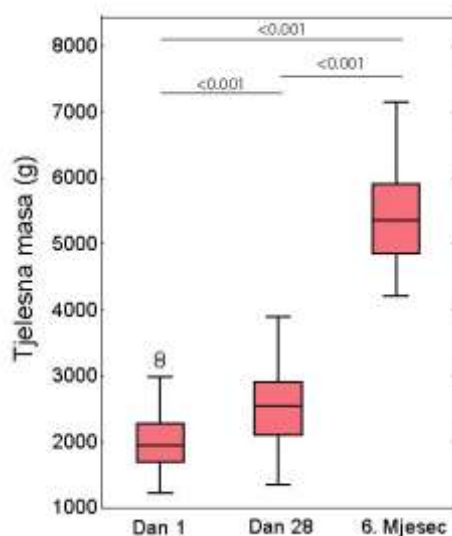
**Tabela 20.** Srednje vrijednosti koncentracija Zn, Cu i Fe u humanom mlijeku preterminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije

	Koncentracija elementa (mg/l)		
	Zn	Cu	Fe
	Srednja vrijednost $\pm$ SD		
1 dan	2,429 $\pm$ 0,230	0,336 $\pm$ 0,026	0,383 $\pm$ 0,244
28 dan	3,996 $\pm$ 0,201	0,414 $\pm$ 0,023	0,496 $\pm$ 0,256
6 mjeseci	2,813 $\pm$ 0,205	0,536 $\pm$ 0,084	0,609 $\pm$ 0,423
N	60		

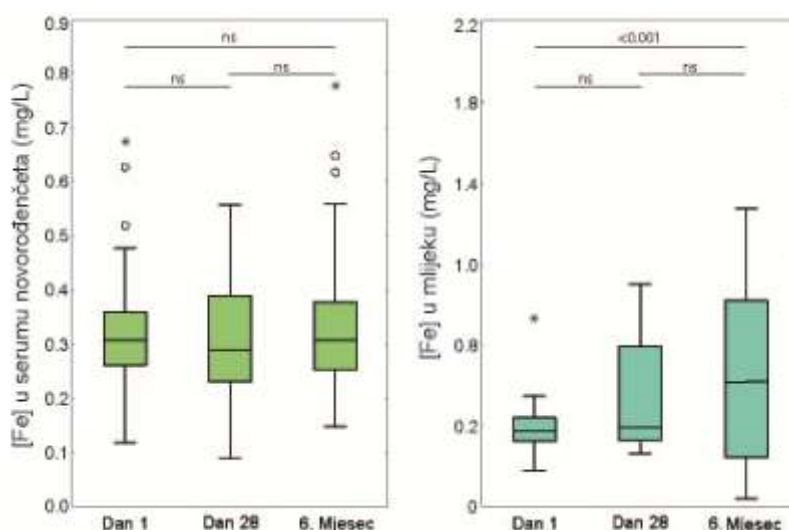
**Tabela 21.** Srednje vrijednosti koncentracija Zn, Cu i Fe u serumu preterminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije

	Koncentracija elementa (mg/l)		
	Zn	Cu	Fe
	Srednja vrijednost $\pm$ SD		
1 dan	0,393 $\pm$ 0,026	0,654 $\pm$ 0,032	0,196 $\pm$ 0,107
28 dan	0,746 $\pm$ 0,049	0,396 $\pm$ 0,023	0,219 $\pm$ 0,111
6 mjeseci	0,987 $\pm$ 0,045	0,626 $\pm$ 0,033	0,311 $\pm$ 1,271
N	60		

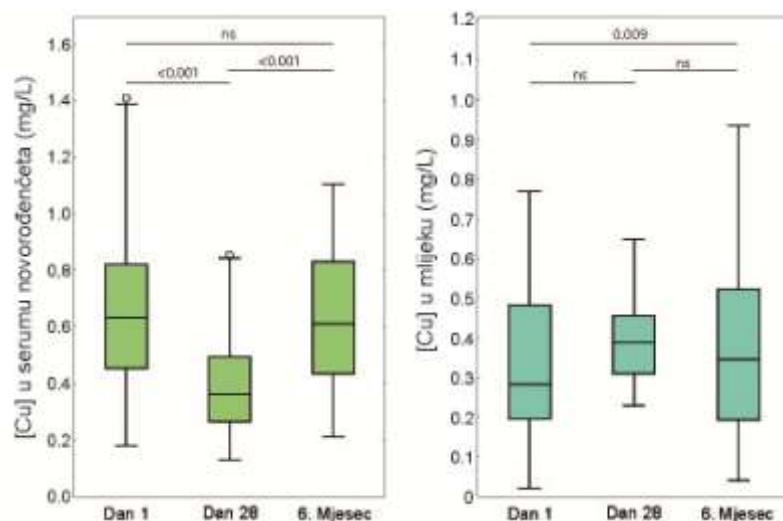




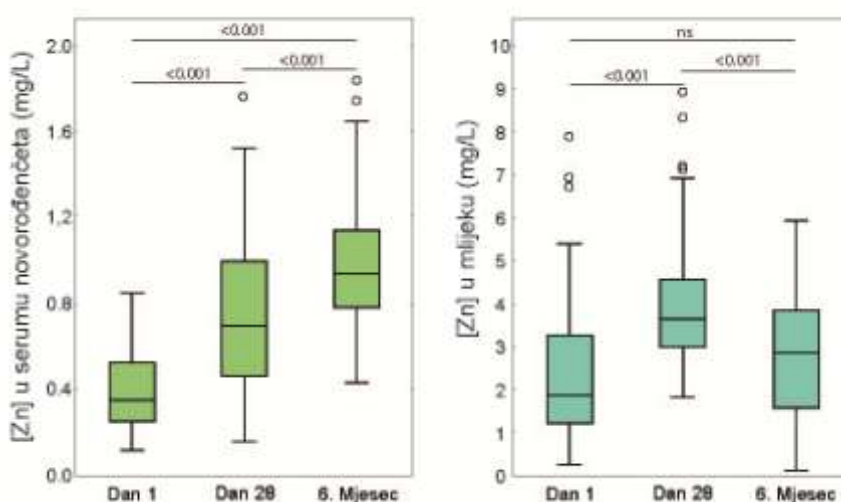
**Slika 28.** Tjelesna masa pretermijskih beba u prvom, 28. danu i šestom mjesecu od rođenja.



**Slika 29.** Koncentracija gvožđa u serumu beba i humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvog, dvadesetosmog dana i nakon 6 mjeseci laktacije. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentil i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-outlajer oblast. Outlajeri (krugovi) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 1.5× interkvartilne oblasti van boksova. Ekstremi (zvjezdice) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 3× interkvartilne oblasti van boksova.  
ns - statistički nesignifikanto.



**Slika 30.** Koncentracija bakra u serumu beba i humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvog, dvadesetosmog dana i nakon 6 mjeseci laktacije. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentil i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-autlajer oblast. Autlajeri (krugovi) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 1,5x i 3x interkvartilne oblasti van boksova. ns-statistički nesignifikantno



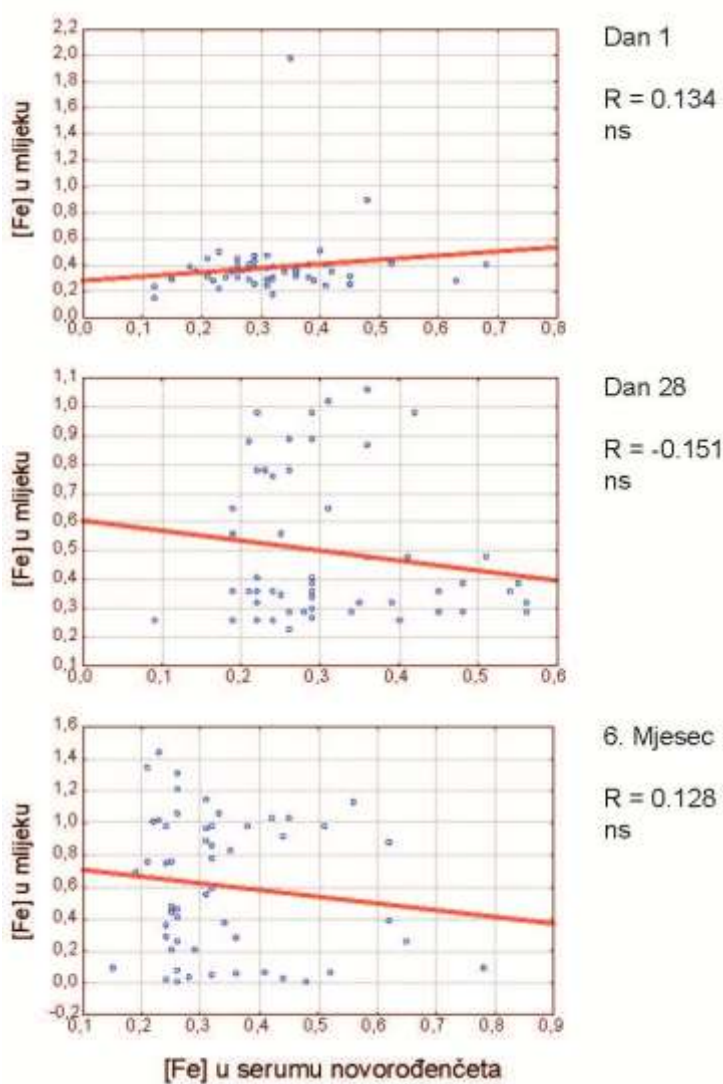
**Slika 31.** Koncentracija cinka u serumu beba i humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvog, dvadesetosmog dana i nakon 6 mjeseci laktacije. Granice boksova predstavljaju 25. i 75. percentil i sadrže vrijednost medijane. Granice barova određuju non-autlajer oblast. Autlajeri (krugovi) su definisani kao vrijednosti koje izlaze iz okvira 1,5x i 3x interkvartilne oblasti van boksova. ns-statistički nesignifikantno

Na slikama 29, 30 i 31 pokazane su promjene u koncentraciji gvožđa, bakra i cinka u serumu pretermijskih beba i humanom mlijeku majki na rođenju (prvi dan), na kraju neonatalnog perioda (28. dan) i šest mjeseci nakon rođenja. Može se primjetiti da se sadržaj ispitivanih elemenata u serumu ne mijenja sa vremenom, osim cinka koji raste. Koncentracije gvožđa, bakra i cinka se nisu razlikovale u serumima novorođenčadi sa (n=14) i bez (n=42) neonatalne žutice. Pored toga, nije bilo ni statistički značajne razlike u koncentracijama elemenata u serumu odojčadi različitog pola.

Upoređujući dobijene podatke za pretermijska mlijeka sa vrijednostima za uzorke termijskog mlijeka uočavaju se jasne razlike. Koncentracije Fe, Cu i Zn su niže u mlijeku pretermijskih beba, što je posljedica prijevremenog porođaja i nemogućnošću stvaranja dovoljnih količina mikroelemenata kao i njihovih zaliha.

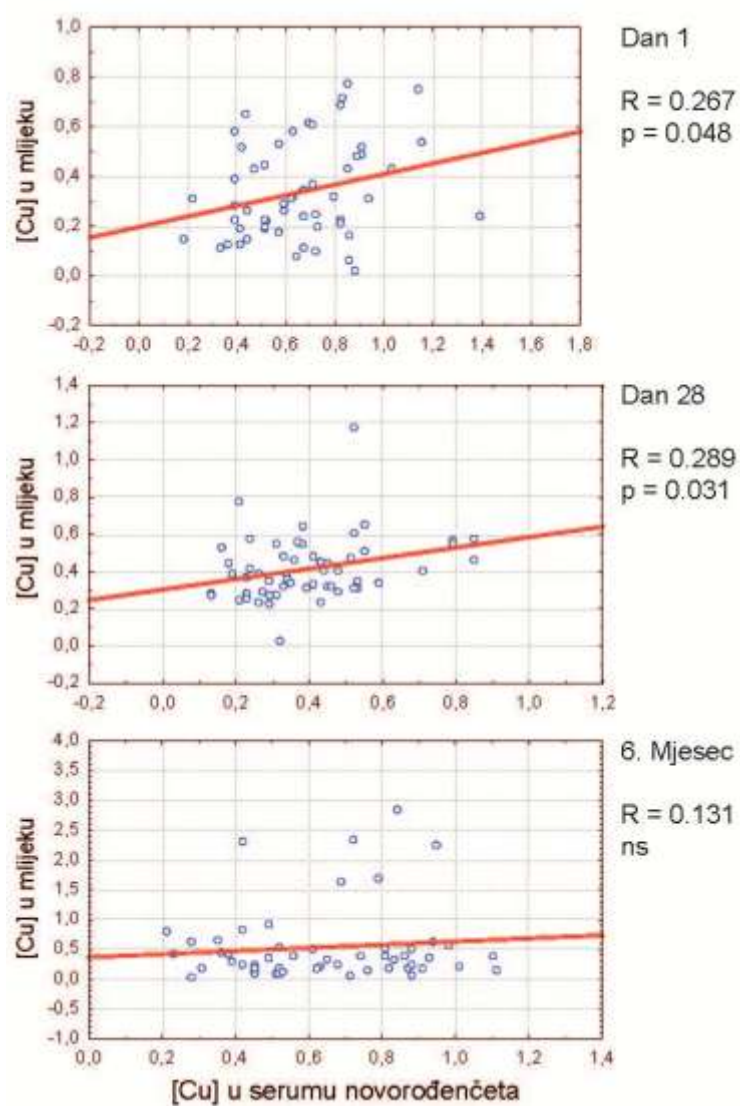
Kao i u slučaju uzoraka humanog mlijeka termijskih beba i za uzorke pretermijskog mlijeka, Pearsonovi koeficijenti korelacije zavisnosti između koncentracije gvožđa, bakra cinka u serumu i mlijeku prikazani su na slikama 32, 33 i 34. U serumu i mlijeku pretermijskih beba ne postoji statistički značajna korelacija za koncentraciju gvožđa.

Značajna pozitivna korelacija za koncentraciju bakra u serumu i mlijeku nađena prvog i dvadeset osmog dana ( $R=0,267$ ,  $p=0,048$ ) i ( $R=0,289$ ,  $p=0,031$ ), respektivno, dok je značajna pozitivna korelacija za cink u serumu i mlijeku nađena dvadeset osmog dana ( $R = 0,283$ ;  $p = 0,034$ ), tj na kraju neonatalne faze. Ovo ukazuje da nivo Cu i Zn u serumu novorođenčeta za ovu fazu razvića (neonatalnu) zavisi od raspoložive količine Cu i Zn u hrani odnosno u mlijeku, tj da je definisano dostupnim Cu i Zn u mlijeku.



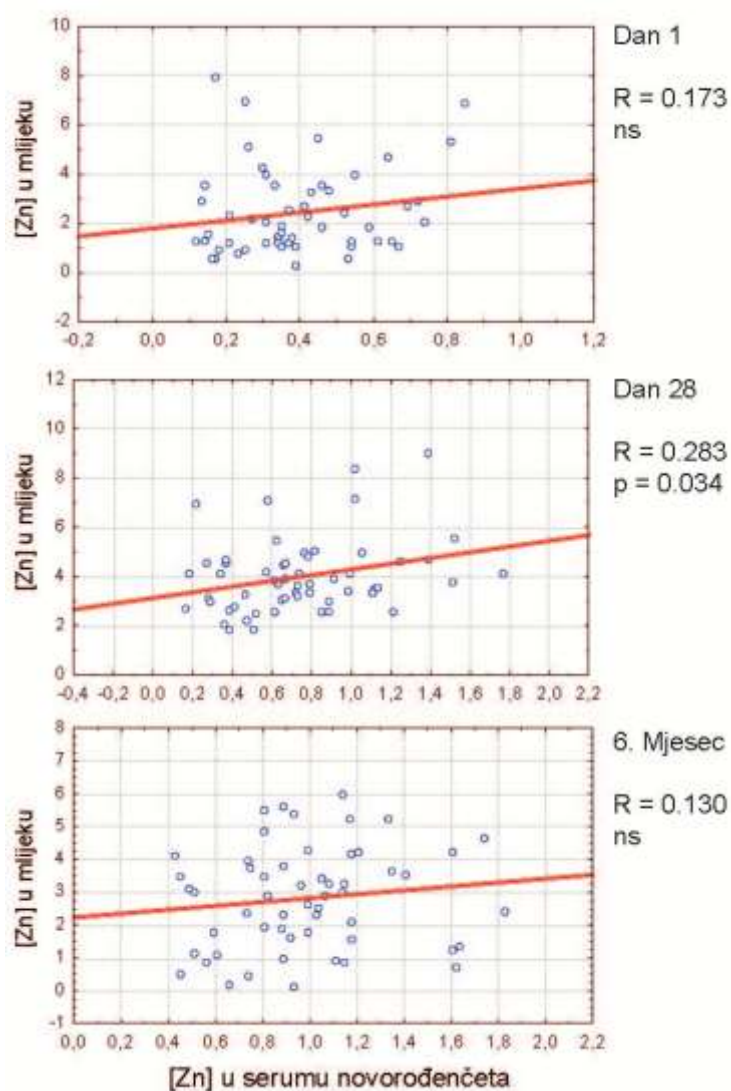
**Slika 32.** Korelacija između koncentracija Fe u serumu novorođenčeta i humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije.

R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.



**Slika 33.** Korelacija između koncentracija Cu u serumu novorođenčeta i humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije.

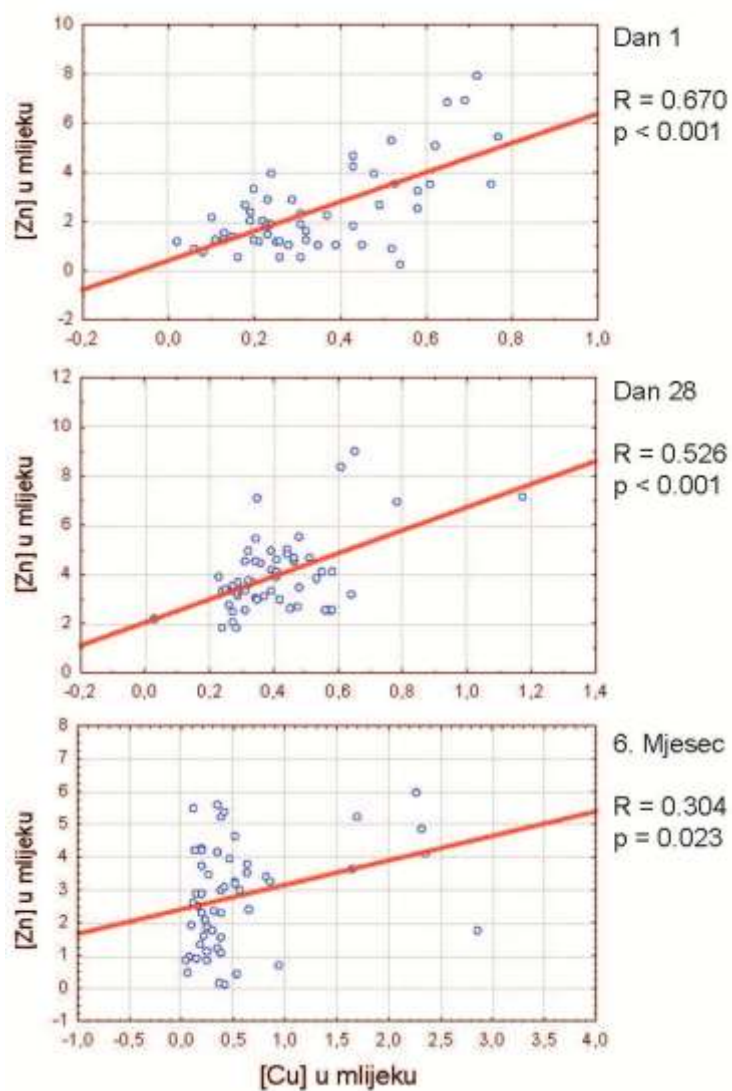
R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.



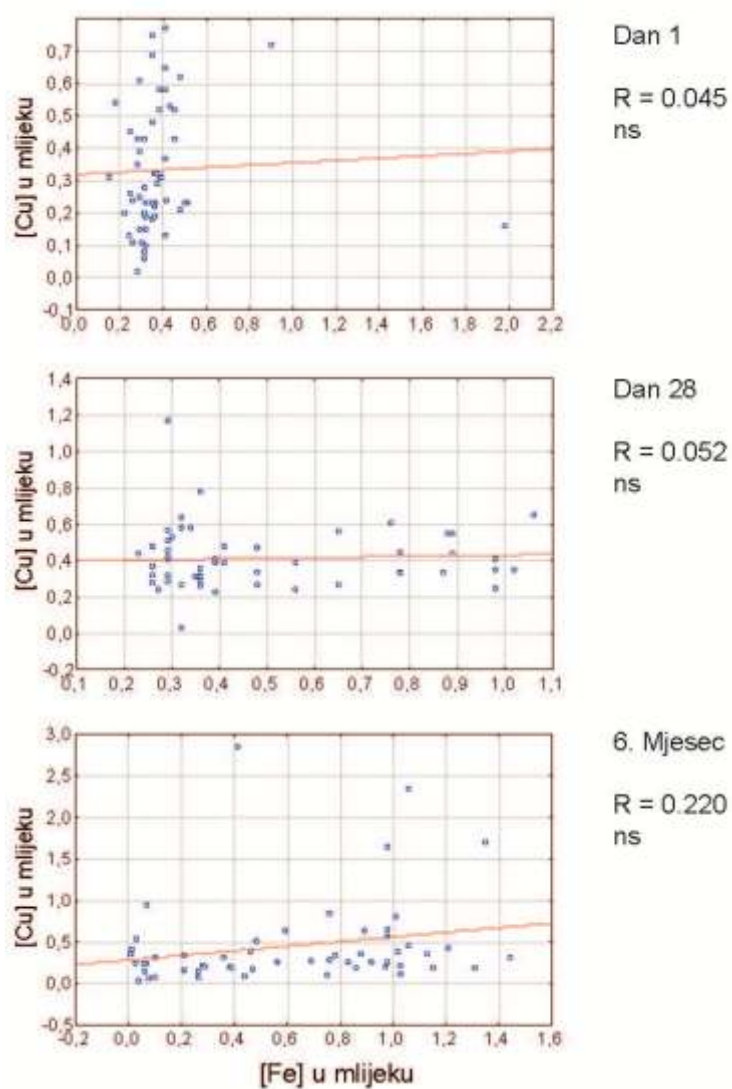
**Slika 34.** Korelacija između koncentracija Zn u serumu novorođenčeta i humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije.

R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.

U studiji koju su sproveli Dumrongwongsiri i saradnici nađena je pozitivna korelacija između koncentracije cinka u majčinom mlijeku i u serumu odojčadi starosti 4-6 mjeseci [287]. Korelacije i trendovi zabilježeni u ovom radu ukazuju na to da se koncentracija cinka u mlijeku mijenja kako bi se prilagodila potrebama djeteta. Nakon 6 mjeseci mlijeko služi za održavanje koncentracije cinka kod odojčadi, a ne za povećavanje koncentracije.

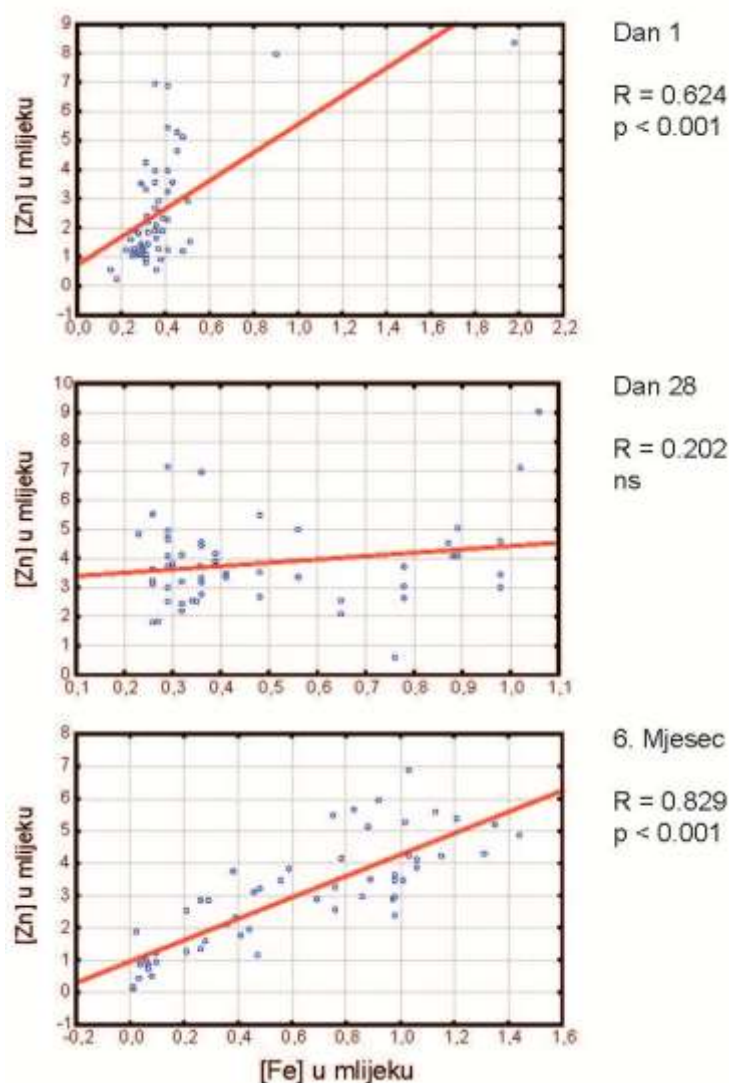


**Slika 35.** Korelacija između koncentracije Cu i Zn u humanom mljeku majki preterminskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.



**Slika 36.** Korelacija između koncentracije Cu i Fe u humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvi, dvadesetosmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.





**Slika 37.** Korelacija između koncentracije Fe i Zn u humanom mlijeku majki pretermijskih beba prvi, dvadeset osmi dan i nakon 6 mjeseci laktacije. R - koeficijent korelacije. ns - statistički nesignifikanto.

Na osnovu izračunatih vrijednosti Pearsonovih koeficijenata za međusobne korelacije Fe, Cu i Zn u uzorcima humanog mlijeka pretermijskih beba može se zaključiti da se javlja pozitivna korelacija tokom cijelog perioda laktacije, prvog, dvadeset osmog dana kao i nakon 6 mjeseci između Cu i Zn ( $R=0,670$ ,  $p<0,001$ ), ( $R=0,526$ ,  $p<0,001$ ) i ( $R=0,304$ ,  $p=0,023$ ), respektivno, koja se mijenja, opada, sa vremenom laktacije.

Srednje jaka pozitivna korelacija je nađena između Fe i Zn prvog dana ( $R=0,624$ ,  $p<0,001$ ) i jaka pozitivna korelacija nakon šest mjeseci ( $R=0,829$ ,  $p<0,001$ ), dok ne postoji značajna korelacija između Fe i Cu.

Kao i u slučaju uzoraka humanog mlijeka terminskih beba i ovdje je rezultat pozitivne korelacije između Cu i Zn "metabolizam" ova dva elementa u mlijeku, vjerovatno koriste povezan transportni sistem, ili je to posljedica porijekla iz istog enzima, tj. Cu/Zn SOD.

Metalotionein i cink su analozi feritinu i gvožđu i oba učestvuju u procesima vezivanja i skladištenja. I gvožđe i cink moraju biti vezani za protein iz istih protektivnih razloga jer u suprotnom potpomažu nastajanje slobodnih radikala koji vode pojavi oksidativnog stresa. Metalotionein oslobađa cink koji se veže za albumin i transferin dok Fe mora biti vezano za feritin ili transferin na svom putu do odgovarajućeg tkiva.

Obzirom da Fe i Zn imaju slične mehanizme apsorpcije, transporta i skladištenja pretpostavlja se da se međusobno takmiče u procesu absorpcije. Pozitivna korelacija Fe i Zn u humanom mlijeku može da nam ukaže da u ovom slučaju postoji izbalansiran odnos Fe i Zn u ispitivanim uzorcima pretermijskih beba.

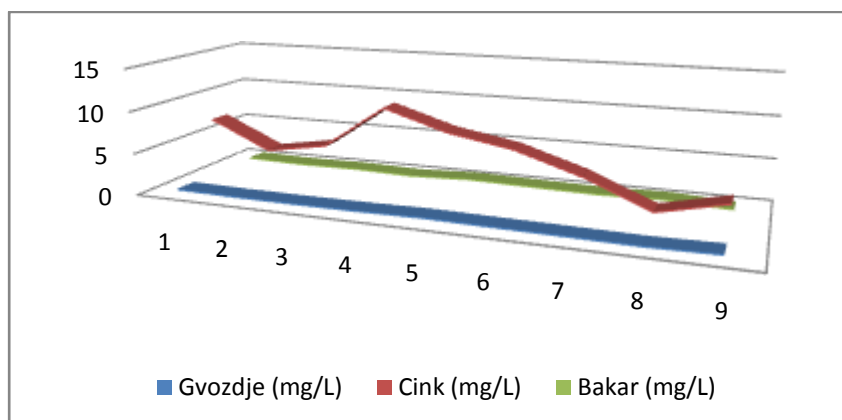
#### 4.4. Ispitivanje uticaja koncentracije gvožđa, bakra i cinka na antioksidativni status majčinog mlijeka, seruma i infant formula

U okviru ove disertacije ispitan je i uticaj pasterizacije i čuvanja (7 i 30 dana na  $-20^{\circ}\text{C}$ ) na glavne antioksidativne parametre zrelog majčinog mlijeka kao i sadržaj esencijalnih mikroelemenata, Fe, Cu i Zn. Sadržaj Fe, Cu i Zn u pojedinim fazama pasterizacije i čuvanja kao i na početku, tj. bez tretmana, kod uzoraka kolostruma i zrelog mlijeka prikazan u tabeli 22.

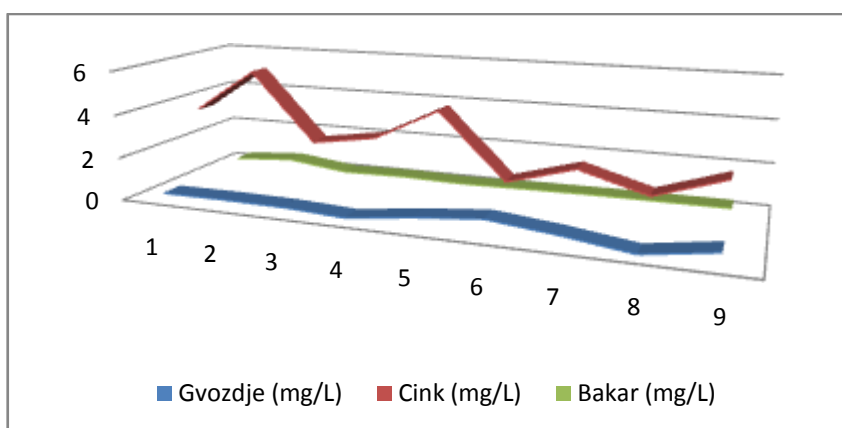
**Tabela 22.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u pojedinim fazama pasterizacije, zamrzavanja i čuvanja kolostruma i zrelog mlijeka

Uzorak	Element		
	Fe (mg/l)	Cu (mg/l)	Zn (mg/l)
	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Srednja vrijednost $\pm$ SD
Kolostrum	0,52 $\pm$ 0,27	0,27 $\pm$ 0,13	5,64 $\pm$ 2,78
Zrelo mlijeko	0,32 $\pm$ 0,23	0,31 $\pm$ 0,11	2,97 $\pm$ 1,36
Zrelo zamrznuto mlijeko 7 dan	0,34 $\pm$ 0,23	0,27 $\pm$ 0,006	2,83 $\pm$ 1,40
Zrelo mlijeko zamrznuto 30 dan	0,32 $\pm$ 0,50	0,29 $\pm$ 0,12	2,48 $\pm$ 0,83
Pasterizovano mlijeko	0,53 $\pm$ 0,29	0,33 $\pm$ 0,11	2,61 $\pm$ 1,16
Pasterizovano mlijeko zamrznuto 7 dan	0,53 $\pm$ 0,30	0,27 $\pm$ 0,07	2,50 $\pm$ 1,00
Pasterizovano mlijeko zamrznuto 30 dan	0,47 $\pm$ 0,30	0,28 $\pm$ 0,009	2,37 $\pm$ 1,08

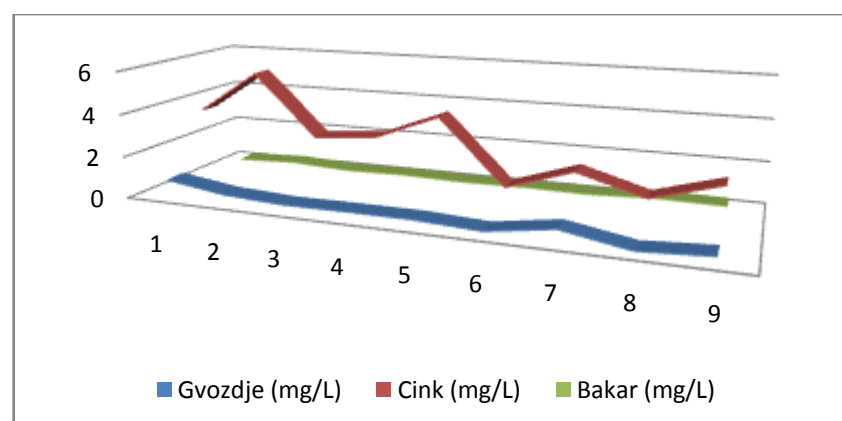
Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 22. može se zaključiti da se sadržaj Fe, Cu i Zn nije značajno razlikovao u uzorcima zrelog i pasterizovanog i zamrznutog mlijeka. Na slikama 38-44 prikazane su promjene ispitivanih elemenata u mlijeku majki u zavisnosti od načina čuvanja uzoraka.



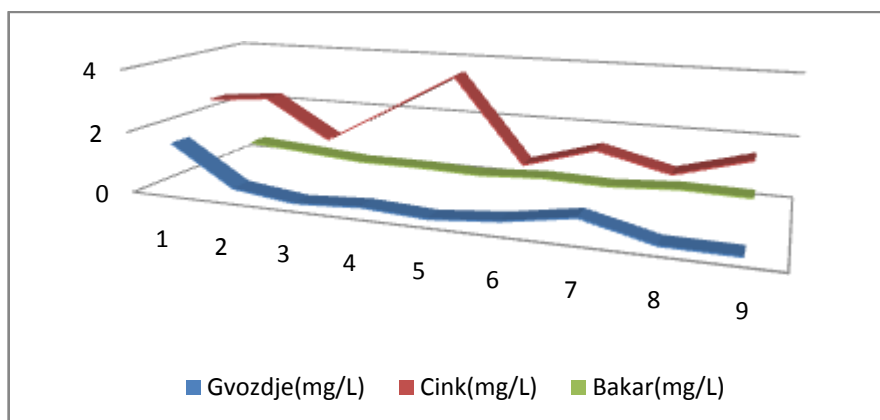
**Slika 38.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u uzorcima kolostruma preterminskog mlijeka



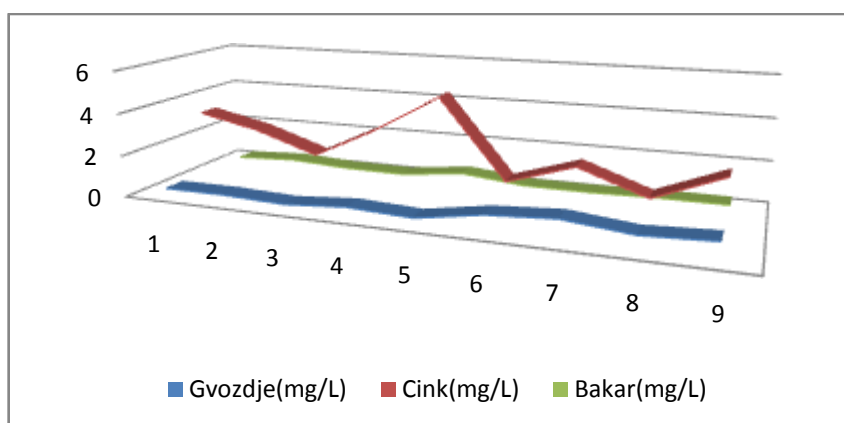
**Slika 39.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u uzorcima preterminskog zrelog mlijeka



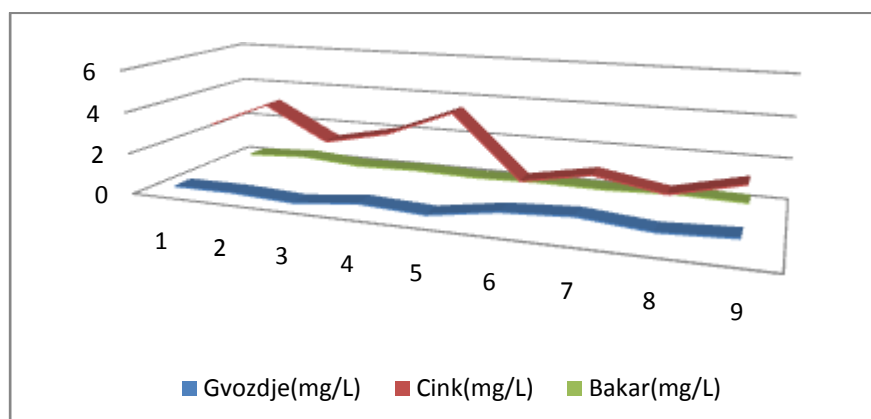
**Slika 40.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u uzorcima preterminskog zrelog mlijeka zamrznutog 7 dana



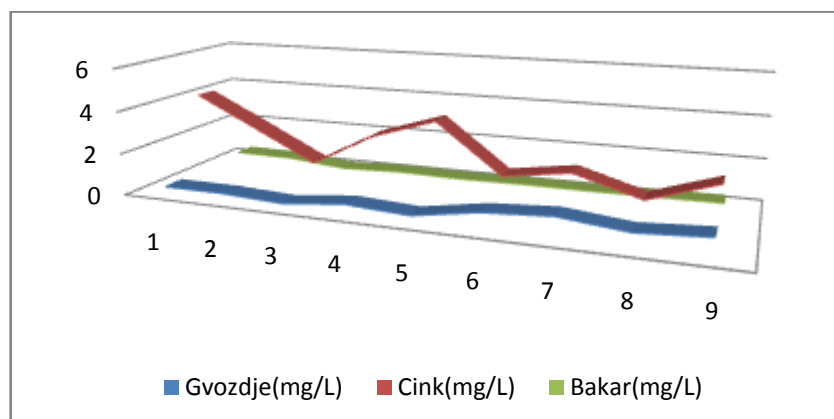
**Slika 41.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u uzorcima preterminskog zrelog mlijeka zamrznutog 30 dana



**Slika 42.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u uzorcima preterminskog pasterizovanog zrelog mlijeka

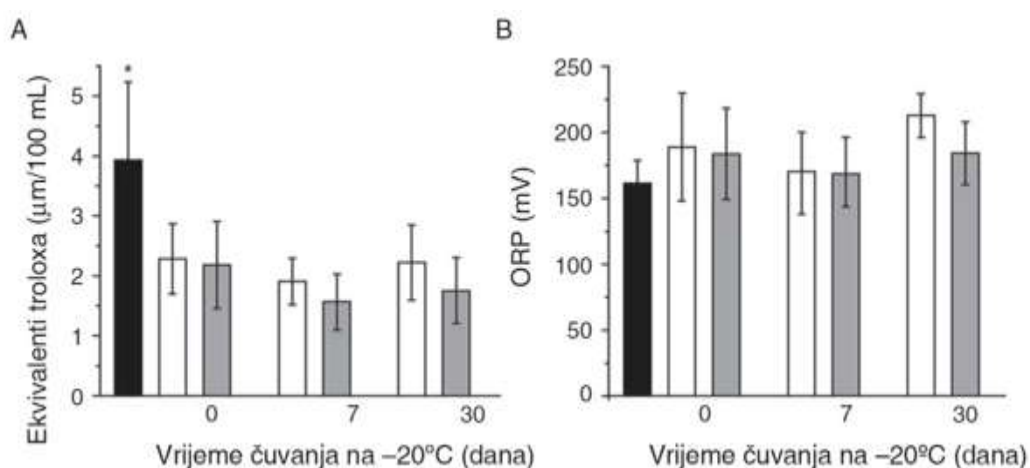


**Slika 43.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u uzorcima pasterizovanog preterminskog zrelog mlijeka zamrznutog 7 dana



**Slika 44.** Sadržaj Fe, Cu i Zn u uzorcima preterminskog pasterizovanog zrelog mlijeka zamrznutog 30 dana

Na slikama 45 a i b je prikazano da kolostrum ima značajno višu vrijednost ORAC i nešto nižu ORP (što ukazuje na bolje antioksidativno dejstvo) u poređenju sa zrelim mlijekom. Pasterizacija i čuvanje zrelog mlijeka nijesu uticali na ukupan neenzimski antioksidativni kapacitet i ORP. Sadržaj esencijalnih mikroelemenata je u kolostrumu bio najveći što zajedno sa nižim vrijednostima za ORP doprinosi činjenici da kolostrum ima najveći antioksidativni potencijal.



**Slika 45.** Neenzimski antioksidativni kapacitet u kolostrumu, svježem i pasterizovanom humanom mlijeku majki preveremeno rođene djece (pool): A-

ORAC; B-ORP.(crno-kolostrum, bijelo-netretirano mlijeko, sivo-pasterizovano mlijeko)

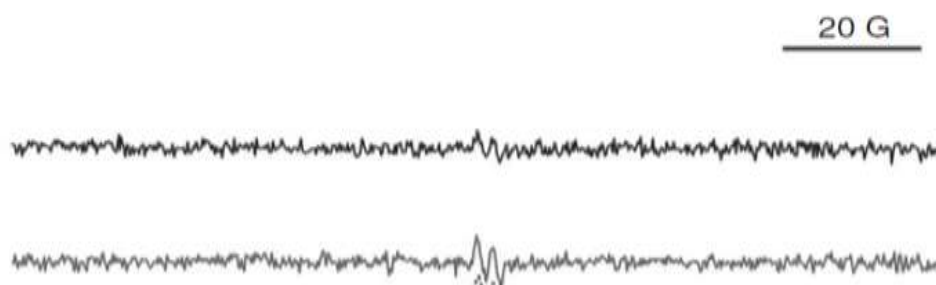
Kolostrum i zrelo mlijeko pokazali su značajnu sposobnost vezivanja HO• radikala. Intenziteti EPR signala u svim analiziranim uzorcima mlijeka su bili tri puta niži u odnosu na kontrolni sistem (Slika 46). Kolostrum je pokazao superiorno antioksidativno dejstvo u poređenju sa zrelim mlijekom, a detektovani su samo slabi/nejasni signali DEPMPO/OA adukta (Slika 47).

Izlaganje mlijeka u sistemima za proizvodnju HO• proizvodnih-sistema rezultiralo je stvaranjem OA radikala (Slika 48). Signal DEPMPO/OA adukta bio je znatno veći, kod pasterizovanog mlijeka u poređenju sa svježim mlijekom (Slika 48,49 i 50). Čuvanje mlijeka zamrzavanjem na -20°C je uticalo na osobine sirovog mlijeka, dok nije izazvalo dalje promjene kod pasterizovanog mlijeka. Naime, intenziteti EPR signala DEPMPO/OA produkata se mijenjao tokom vremena u zavisnosti od načina čuvanja i tretmana pasterizacijom (30 dana).

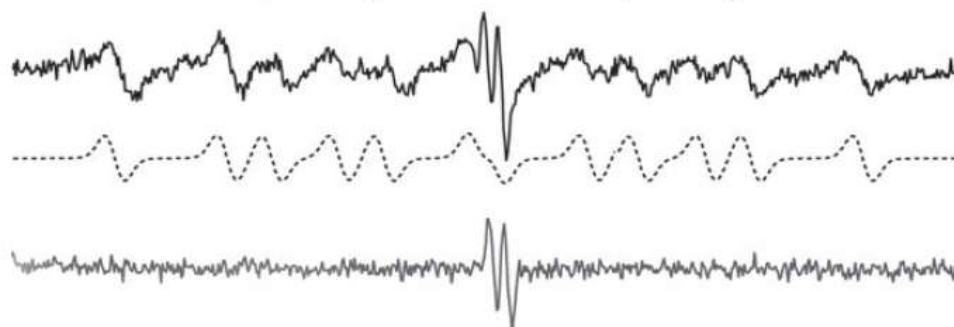
EPR spektri i kvantifikacija redoks aktivnost kolostruma i mlijeka izloženih sistemu stvaranja hidroksilnih radikala prikazani su na slikama 46- 50.



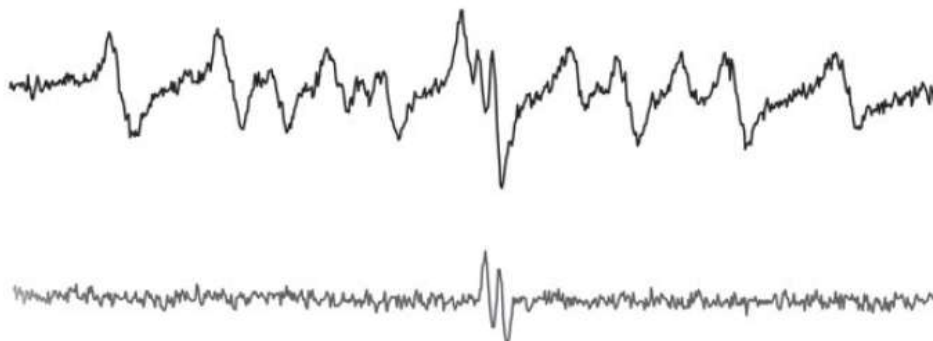
**Slika 46.** Kontrolni sistem-Fentonova reakcija:  $\text{Fe}^{2+}$  (0,6 mM) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mM). Tačkasta linija simulacija EPR signala DEPMPO/OH (intenzitet signalaje bio  $2685 \pm 384$  AU)



**Slika 47.** Kolostrum izložen Fentonovoj reakcije. Siva linija EPR spektar dobijen u istom sistemu u odsustvu spin-trapa

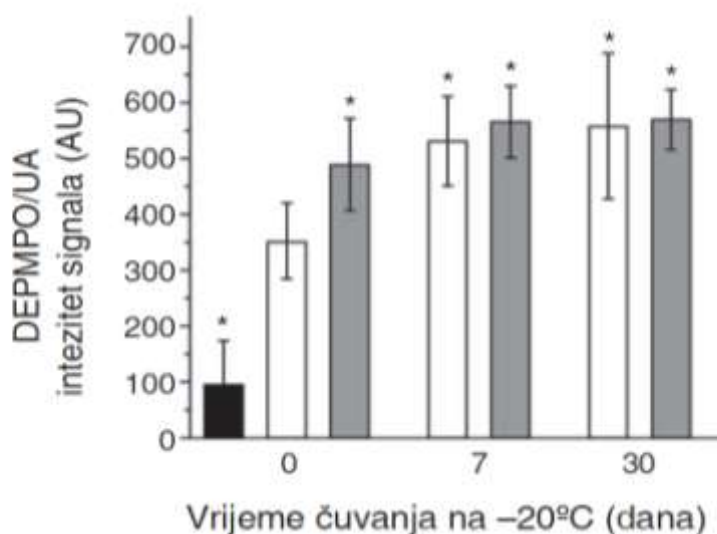


**Slika 48.** Svježe mlijeko izloženo Fentonovoj reakciji. Tačkasta linija simulacija EPR signala DEPMPO/UA



**Slika 49.** Pasterizovano mlijeko izloženo Fentonovoj reakciji





**Slika 50.** Intenzitet EPR signala DEPMPO/UA produkta (crno – kolostrum, bijelo – netretirano zrelo mlijeko, sivo – pasterizovano zrelo mlijeko)

Prema ORAC i ORP vrijednostima, pasterizacija i čuvanje 30 dana na -20°C nije uticalo na ukupne neenzimske antioksidativne kapacitete i ukupani redukcionu kapacitet mlijeka. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnom studijom u kojoj je ispitan uticaj pasterizacije na majčino mlijeko pomoću ORAC testa [288]. S druge strane, u istraživanjima Silvestre i saradnika sprovedenim korišćenjem CUPRAC testa [291] (koji mjeri sposobnost uzoraka da redukuje bakar) pokazalo se da pasterizacija izaziva smanjenje redukcionog kapaciteta majčinog mlijeka. Rezultati opisuju degradaciju askorbata izazvanu pasterizacijom, koji predstavljaju glavni agens za redukciju u majčinom mlijeku, kada su u pitanju prelazni metali, kao što je bakar. Koncentracija askorbata je povezana sa načinom skladištenja i čuvanja mlijeka, što je potvrđeno i našim ispitivanjima.

U dvije studije korišten je ABTS test gde je utvrđeno da čuvanje sirovog kolostruma i zrelog mlijeka na -20°C tokom 7 ili 14 dana izaziva pad ukupnog antioksidativnog kapaciteta [249,254]. Razlika između ORAC i ABTS testova može objasniti razliku između naših i prethodnih rezultata. ORAC se sprovodi do završetka antioksidativne aktivnosti i uzima u obzir antioksidanse koji reaguju i brzo i sporo. ORAC testom je utvrđeno da kolostrum ima veći antioksidativni kapacitet. ABTS se sprovodi

određeno vrijeme i, generalno, osetljiviji je na antioksidanse koji brzo reaguju, kao što je askorbat [203].

Nivo UA radikala raste sa pasterizacijom i skladištenjem sirovog mlijeka. UA predstavlja moćnog hvatača HO• radikala oksidovanih proteina [290,291], dok UA radikali imaju sposobnost uklanjanja superoksida [292]. Specifičnu fiziološku ulogu askorbata ne može da zamijeni UA, jer UA ima manji redukcionni potencijal od 260 mV i zbog toga ne može da redukuje Fe<sup>3+</sup> (110 mV na pH 7) dok askorbat redukuje Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> i poboljšava apsorpciju gvožđa u crijevima [293,294]. Važno je napomenuti da su prijevremeno rođene bebe u povećanom riziku od nedostatka gvožđa [295].

Neenezimski antioksidativni sistemi u kolostrumu i zreloom mlijeku su različiti. Iako je nivo askorbata bio viši u kolostrumu za samo 20% u poređenju sa mlijekom, kolostrum skoro potpuno uništava HO• iz Fenton sistema i pokazuje značajno veći ukupni antioksidativni kapacitet. Ovo je u skladu sa rezultatima prethodnih studija koje su upoređivale kolostrum i zreloom mlijeka preko ORAC-a i drugih testova [260,296].

Naši rezultati ukazuju da treba razmotriti dodavanje askorbata u pasterizovano majčino mlijeko prije hranjenja bebe. Dva ispitivanja rađena kod odojčadi (3-12 mjeseci) i jedno ispitivanje kod djece (12-30 mjeseci) su pokazala da je pojačavanje kravljeg mlijeka u prahu dodavanjem askorbata i gvožđa efikasano u smanjenju stope anemije i nedostatka gvožđa [297-299]. Alternativno, nivo askorbata se može povećati u mlijeku prije prerade, bilo dodavanjem askorbata u mlijeko ili dodavanjem suplementa askorbata u ishranu majki [300].

Obrada obogaćenog mlijeka, međutim, može dovesti do akumulacije produkata procesa oksidacije/raspadanja askorbata, što može imati neželjene efekte. Na primjer, dehidroaskorbat se transportuje preko transportera glukoze u intestinalne ćelije, gdje može prouzrokovati trošenje redukovanog nikotinamid adenine dinukleotidnog-fosfata i glutaciona [303, 304]. Termička obrada mlijeka utiče i na enzimske antioksidativne komponente (posebno SOD), koji je teško nadoknaditi,

tako da treba uzeti u obzir druge metode antimikrobnih tretmana i čuvanja majčinog mlijeka (npr, na  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Uporedo sa prethodno navedenim analizama, rađene su i analize određivanja sadržaja Fe, Cu i Zn i antioksidativni kapacitet seruma majki prijevremeno rođene djece. Sadržaj ispitivanih mikroelemenata i antioksidativni kapacitet seruma prikazani su u Tabelama 23 i 25.

**Tabela 23.** Sadržaj ispitivanih mikroelemenata u serumu i mlijeku majki i serumu pretermijskih beba

	Zn (mg/l)	Cu (mg/l)	Fe (mg/l)
Serum majki Sr. vr.±SD	0,43±0,04	1,99±0,19	1,07±0,51
Serum beba Sr. vr.±SD	0,76±0,05	0,40±0,02	0,22±0,11
Majčino mlijeko Sr. vr.±SD	2,97±1,36	0,31±0,11	0,32±0,23

Srednje vrijednosti sadržaja Fe, Cu i Zn u serumu majki pretermijskih beba je  $1,07\pm 0,51$ ;  $1,99\pm 0,19$  i  $0,43\pm 0,04$  mg/l, respektivno što je slično istraživanjima koja su rađena u Turskoj kada su u pitanju Fe i Cu, dok je sadržaj Zn pokazao nešto niže vrijednosti kao u istraživanjima sprovedenim u Indiji [67,302].

Domelloff i saradnici su ispitivali sadržaj Fe, Cu i Zn u humanom mlijeku i serumu majki i došli do zaključka da sadržaj mikroelemenata u mlijeku ne zavisi od mineralnog statusa majki u prvih devet mjeseci od porođaja, što ukazuje na činjenicu da postoji aktivni transportni mehanizam u mliječnoj žlijezdi [247]. Rezultati u ovoj studiji su u skladu sa literaturnim [26,150]. Korelacije sadržaja Fe, Cu i Zn u uzorcima majčinog mlijeka i seruma majki pretermijskih beba nakon rođenja računati preko Pearson-ovog koeficijenta korelacije prikazani su u tabeli 24 i pokazuju da nema statistički značajne korelacije među ispitivanim elementima ( $p>0,05$ ).

Korelacija ispitivanih mikroelemenata Fe, Cu i Zn u infant formulama i majčinom mlijeku terminskih i pretermijskih beba prikazana je u tabeli 25.

**Tabela 24.** Koeficijent korelacije sadržaja ispitivanih mikroelemenata u humanom mlijeku i serumu majki pretermijskih beba na rođenju

	Fe (serum)	Cu (serum)	Zn (serum)	Fe (MM)	Cu (MM)	Zn (MM)
Fe (serum)	1	0,094	-0,011	-0,147	-0,199	-0,395
Cu (serum)	0,094	1	0,309	0,150	0,291	0,237
Zn (serum)	-0,011	0,309	1	-0,147	-0,328	0,277
Fe (MM)	-0,147	0,150	-0,147	1	0,126	0,650
Cu(MM)	-0,199	0,291	-0,328	0,126	1	0,083
Zn(MM)	-0,395	0,237	0,277	0,650	0,083	1

**Tabela 25.** Koeficijent korelacije sadržaja ispitivanih mikroelemenata u infant formulama i humanom mlijeku terminskih i pretermijskih beba

	Fe	Cu	Zn
Fe	1	-,477	,342
Cu	-,477	1	,517
Zn	,342	,517	1

Korelacije sadržaja Fe, Cu i Zn u uzorcima infant formula i majčinog mlijeka terminskih i pretermijskih beba nakon rođenja računati preko Pearson-ovog koeficijenta korelacije pokazuju da nema statistički značajne korelacije među ispitivanim elementima ( $p > 0,05$ ).

U tabeli 26 su uporedno prikazane vrijednosti antioksidativnog kapaciteta uzoraka infant formula, mlijeka i seruma, određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala, primjenom spektrofotometrijske metode. Na osnovu dobijenih podataka određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala DPPH metodom može se zaključiti da vrijednosti sposobnost hvatanja DPPH radikala u ispitivanim uzorcima infant formula veoma varira u zavisnosti od proizvođača. Uzorak terminskog majčinog mlijeka ima najveću aktivnost, odnosno najveći stepen sposobnosti hvatanja DPPH  $90,35 \pm 5,68\%$ . Infant formula domaćeg proizvođača "Impamil" Mil 1 i Bebelac 1 imaju veoma visok % inhibicije, dok uzorak infant formule NAN 1 ima najmanji antioksidativni potencijal (76, 41 %). Na osnovu dobijenih vrijednosti DPPH za infant

formule i majčino mlijeko može se zaključiti da svaka od formula može zadovoljiti potrebe novorođenčeta u periodu od 1-6 mjeseci obzirom da formule imaju veći antioksidativni kapacitet od majčinog mlijeka. Određivanje antioksidativnog potencijala u serumu primjenom DPPH metode su radili Chrzczanowicz i saradnici na uzorcima seruma zdravih volontera. Kroz validacionu studiju su dokazali da primjenjivost DPPH testa na deproteiniziranim uzorcima seruma pruža brojne prednosti, u validnosti, praktičnosti, jednostavnosti i isplativosti metode kao sredstva u procjeni antioksidantnog statusa kod ljudi [303]. Primjenom DPPH metode može se zaključiti da je sposobnost hvatanja DPPH radikala u serumu majki 9,27-12,24% i prijevremeno rođenih beba 6,01-8,22% dok u mlijeku majki prijevremeno rođenih beba iznosi 75,68% [33]. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim vrijednostima gde je prema studiji Golalizadeh i saradnika utvrđeno da postoji veza između nivoa biomarkera oksidativnog stresa u uzorcima krvi majke i novorođenčadi [304].

**Tabela 26.** Antioksidativni kapacitet infant formula, humanog mlijeka i seruma određen DPPH metodom

Uzorak	Sposobnost hvatanja DPPH radikala, (%)
Aptamil 1	80,56±3,14
NAN 1	76,41±5,77
Bebelac 1	85,26±2,13
HIPP	81,23±6,81
ImpamilMil 1	84,68±8,90
Mlijeko majki terminskih beba	90,35±5,68
Mlijeko majki prijevremeno rođenih beba	75,68±3,24
Serum majki	10,11±2,34
Serum beba	7,21±2,21

Najveći broj adaptiranih mliječnih formula obogaćene su vitaminima i drugim jedinjenjima koja imaju antioksidativni potencijal, što utiče na stvaranje visokog antioksidativnog kapaciteta infant formula. Infant formule imaju visok *in vitro* redoks potencijal, koji treba dodatno ispitati u biološkom okruženju. Najbolju antioksidativnu zaštitu u odnosu na infant formule obezbjeđuje majčino mleko

proizvedeno na način da može biti potpuno usvojivo i da zadovolji potrebe djetetaa takođe sadrži i najsnažniji antioksidativni sistem [255]. Infant formule i majčino mlijeko hvataju hidroksil-radikal pri čemu nastaju ugljenik-centrirani i askorbil-radikal. Direktnim hvatanjem i skupljanjem radikala pomoću tiol-grupa majčino mlijeko posjeduje visok i mnogo snažniji antioksidativni potencijalu odnosu na infant formule [305]. Zahvaljujući navedenoj činjenici majčino mlijeko je veoma značajno za ishranu, rast i razvoj odojčadi, koji imaju nedovoljno razvijen imuni sistem, što ih čini osjetljivijim na unutrašnje sistemske poremećaje i na različite stresore iz okruženja koji su povezani sa povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta.

U tabeli 27 je prikazan Pearsonov koeficijent korelacije između ispitivanih mikroelemenata i sposobnosti hvatanja DPPH radikala u ispitivanim infant formulama.

**Tabela 27.** Pearsonov koeficijent korelacije mikroelemenata i DPPH u infant formulama

Element	Zn	DPPH	Cu	Fe
Zn	1	-,362	,352	,812*
DPPH	-,362	1	,147	-,727
Cu	,352	,147	1	-,043
Fe	,812*	-,727	-,043	1

Na osnovu rezultata iz tabele 27 može se zaključiti da ne postoji statistički značajna korelacija između sadržaja Fe, Cu, Zn i antioksidativnog kapaciteta u uzorcima infant formula određenog DPPH metodom jer je  $p > 0,05$ .

## **V. ZAKLJUČCI**

1. U ovom radu je prikazan jedan brz, lak, ekonomičan i jednostavan način za pripremu uzoraka (bez degradacije) kako bi se odredili Fe, Cu i Zn u tragovima u majčinom mlijeku i infant formulama za uzrast do 6 mjeseci.
2. Ovakan način pripreme uzoraka spada u "zelene" metode pripreme jer ne zahtijeva utrošak agresivnih hemikalija, za razliku od metode pripreme mikrotalasnom digestijom, i u potpunosti je ekološki prihvatljiv.
3. Na osnovu validacione studije zaključilo se da su analitički parametri (linearnost, preciznost i tačnost) zadovoljavajući za određivanje Zn i Cu ICP-OES i Fe FAAS tehnikom.
4. Predloženi metod pripreme uzorka (rastvaranje u Mili Q vodi) je tačan i veoma pouzdan i može se primjeniti i za kliničko određivanje elemenata u tragu u biološkim uzorcima.
5. Tjelesna masa terminske i preterminske novorođenčadi se povećavala u periodu od prvog dana do 6 mjeseci nakon porođaja i nije pokazala značajnu korelaciju sa koncentracijama Fe, Cu i Zn u humanom mlijeku.
6. Sadržaj gvožđa, bakra i cinka se nije razlikovao u serumima terminske i preterminske novorođenčadi sa i bez neonatalne žutice. Pored toga, nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama ispitivanih elemenata u serumu odojčadi različitog pola. Koncentracije ispitivanih elemenata su vremenom opadale u ispitivanim uzorcima mlijeka. Sadržaj cinka u serumu je rastao i kod terminskih i preterminskih beba, dok je sadržaj gvožđa i bakra opadao kod terminskih a bio konstantan kod preterminskih beba.
7. Koncentracije Fe, Cu i Zn su niže u mlijeku majki preterminskih beba što se objašnjava prijevremenim porođajem i nemogućnošću stvaranja dovoljnih količina i zaliha mikroelemenata.
8. Koncentracija Fe u serumu terminskih beba prvog dana pokazala je značajnu negativnu korelaciju sa gestacijom dok je koncentracija Cu u mlijeku prvog dana pokazala značajnu pozitivnu korelaciju sa gestacijom.



9. Postoji značajna pozitivna korelacija koncentracija Zn u serumu i mlijeku u šestom mjesecu kod terminskih beba, dok za gvožđe i bakar ne postoji značajna korelacija.
10. U uzorcima humanog mlijeka terminskih beba može se zaključiti da se javlja pozitivna korelacija dvadeset osmog dana laktacije između Cu i Zn i Fe i Zn, dok ne postoji značajna korelacija između Fe i Cu. Pozitivne vrijednosti korelacionih koeficijenata ukazuju da su metabolizam Cu i Zn u mlijeku povezani, koriste povezan transportni sistem, ulaze u sastav istog enzima u mlijeku Cu/Zn SOD. Korelacija između Fe i Zn može se objasniti korišćenjem istog mehanizma vezivanja, transporta i skladištenja pomenutih elemenata.
11. Za bakar je nađena značajna pozitivna korelacija za serum i mlijeko pretermijskih beba prvog i dvadeset osmog dana, dok je značajna pozitivna korelacija za cink u serumu i mlijeku nađena dvadeset osmog dana, tj. za kraj neonatalne faze. Ovo ukazuje da nivo Cu i Zn u serumu novorođenčeta za ovu fazu razvića (neonatalnu) zavisi od raspoložive količine Cu i Zn u hrani odnosno u mlijeku i definisano je dostupnim Cu i Zn u mlijeku.
12. Srednje jaka pozitivna korelacija se javlja tokom cijelog perioda laktacije, Cu i Zn u uzorcima humanog mlijeka za pretermijske bebe. Srednje jaka pozitivna korelacija je nađena između Fe i Zn u pretermijskom mlijeku prvog dana i jaka pozitivna korelacija nakon šest mjeseci, dok ne postoji značajna korelacija između Fe i Cu. Kao i u slučaju uzoraka humanog mlijeka terminskih beba i ovdje je rezultat pozitivne korelacije između Cu i Zn i Fe i Zn njihov "metabolizam" tj. korišćenje istih transportnih proteina.
13. Količina cinka u mlijeku zadovoljava nutritivne potrebe odojčeta tokom neonatalnog perioda, ali drastičan pad u šestom mjeseci laktacije ukazuje da su odojčad koja se isključivo hrane majčinim mlijekom izložena riziku od nedostatka cinka. Dobijeni podaci bi trebalo da utiču na poboljšanje kvaliteta dojenja u Srbiji.

14. Za razliku od cinka količine gvožđa i bakra u humanom mlijeku mogu zadovoljiti potrebe kako terminske tako i preterminske novorođenčadi u ispitivanom periodu.
15. Sadržaj Fe, Cu i Zn u kolostrumu i zreloom mlijeku podvrgnutom različitim procesima obrade (zamrzavanje i pasterizacija) nije uticao na antioksidativne osobine humanog mlijeka. Majčino mlijeko je hrana koja sadrži antioksidanse i esencijalne mikroelemente. Potvrđeno je da postoji korelacija između sadržaja elementa u tragovima i antioksidativnog potencijala humanog mlijeka. Rezultati ukazuju na moguće mehanizme dobrih efekata majčinog mlijeka.
16. Metoda ORP prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji je primijenjena po prvi put za određivanje antioksidativnog statusa majčinog mlijeka. Niže vrijednosti ORP ukazuju na veći antioksidativni status humanog mlijeka što je u korelaciji sa sadržajem esencijalnih mikroelemenata, dok niži ORP ukazuje na veći sadržaj mikroelemenata u mlijeku.
17. Viša koncentracija Fe, Cu i Zn u humanom mlijeku (kolostrum) utiče na povećanje neenzimskog antioksidativnog potencijala mlijeka.
18. Pasterizacija i čuvanje ne utiču na neenzimski antioksidativni status majčinog mlijeka. Pokazano je da su neenzimski antioksidativni sistemi u kolostrumu i mlijeku različiti. Efekti obrade tj. zamrzavanje i pasterizacija, mogu biti djelimično kompenzovani dodavanjem askorbata u mlijeko, prije upotrebe.
19. Potrebno je sprovesti dalja istraživanja o faktorima koji utiču na status cinka kod odojčadi i majki, posebno kod beba koje se isključivo hrane majčinim mlijekom i dodatno ispitati koncentracije cinka u majčinom mlijeku, krvi i serumu.
20. Ne postoji statistički značajna korelacija između sadržaja Fe, Cu i Zn i antioksidativnog kapaciteta infant formula.
21. Koncentracija elemenata u tragovima, Fe, Cu i Zn, u humanom mlijeku nije povezana sa mineralnim statusom majki što ukazuje da je aktivni transportni mehanizam metala razvijen u mliječnoj žlijezdi.

22. U serumu beba i mlijeku i serumu majki prijevremeno rođenih beba je određena antioksidativna aktivnost koja je u skladu sa literaturno dostupnim podacima za ove grupe ispitanika.
23. Humano majčino mlijeko ima najviši antioksidativni kapacitet u odnosu na infant formule i prilagođeno je potrebama odojčadi. Majčino mlijeko je važno za novorođenčad, koja su izložena djelovanju brojnih slobodnih radikala i reaktivnim kiseoničnim vrstama, u neonatalnim jedinicama. Stoga, veoma je bitno započeti ranu ishranu beba majčinim mlijekom i na taj način zaštititi odojčad od oksidativnog stresa.

## **VI. LITERATURA**

- [1] P. Bratter, I.N. Blasco, B.V.E. Negretti-de, A. Raab, Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition, *Analyst*. 123 (1998) 821–826. doi:10.1039/a801284i.
- [2] E.D. Schlenker, S.R. Williams, *Essential of Nutrition and Diet Therapy.*, Elsevier (Mosby), Amsterdam, 2003.
- [3] a Flynn, Minerals and trace elements in milk., *Adv. Food Nutr. Res.* 36 (1992) 209–52. doi:10.1016/S1043-4526(08)60106-0.
- [4] EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA)s, Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to zinc, *EFSA J.* 7 (9): 122 (2009) 34. doi:10.2903/j.efsa.20 09 . 1229.
- [5] Malhotra VK., *Biochemistry for Students 12th Edition*, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 2012.
- [6] K. Simmer, R.P. Thompson, Zinc in the fetus and newborn, *Acta Paediatr Scand Suppl.* 319 (1985) 158–163.
- [7] N. Fabris, E. Mocchegiani, Zinc, human diseases and aging., *Aging (Milano)*. 7 (1995) 77–93. doi:10.1007/BF03324297.
- [8] W. Maret, H.H. Sandstead, Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20 (2006) 3–18. doi:10.1016/j.jtemb.2006.01.006.
- [9] Institute of Medicine, Panel on Micronutrients, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*, 2001. doi:10.1111/j.1753-4887.1997.tb01621.x.
- [10] E.D. Harris, Copper homeostasis: the role of cellular transporters., *Nutr. Rev.* 59 (2001) 281–285.

- [11] J. Osredkar, N. Sustar, Copper and Zinc , Biological Role and Significance of Copper / Zinc Imbalance, *Clin. Toxicol.* (2011) 18. doi:10.4172/2161-0494.S3-001.
- [12] G.. Larkin, E.C and Rao, Importance of Fetal and Neonatal Iron: Adequacy for Normal Development of Central Nervous System, in: *Frcp. John Dobbing DSc, FRCP (Ed.), Brain, Behav. Iron Infant Diet*, 1990: pp. 43-57.
- [13] J.G. Dorea, Iron and copper in human milk., *Nutrition.* 16 (2000) 209-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10705077>.
- [14] J. Koolman, K.-H. Roehm, Kolman, *Color Atlas of Biochemistry*, 2005. <http://www.nber.org/papers/w17449>.
- [15] M. a. Hannan, B. Faraji, J. Tanguma, N. Longoria, R.C. Rodriguez, Maternal milk concentration of zinc, iron, selenium, and iodine and its relationship to dietary intakes, *Biol. Trace Elem. Res.* 127 (2009) 6-15. doi:10.1007/s12011-008-8221-9.
- [16] C.M.G. Monte, E.R.J. Giugliani, Recommendations for the complementary feeding of the breastfed child, *J. Pediatr. (Rio. J).* 80 (2004) S131-S141. doi:10.2223/JPED.1245.
- [17] R. Mahdavi, L. Nikniaz, S.J. Gayemmagami, Association between zinc, copper, and iron concentrations in breast milk and growth of healthy infants in Tabriz, Iran, *Biol. Trace Elem. Res.* 135 (2010) 174-181. doi:10.1007/s12011-009-8510-y.
- [18] K. Ljung, B. Palm, M. Grandér, M. Vahter, High concentrations of essential and toxic elements in infant formula and infant foods - A matter of concern, *Food Chem.* 127 (2011) 943-951. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.062.
- [19] A. Goldman, R. Goldblum, Defence agents in human milk, in: R. Jensen (Ed.), *Handb. Milk Compos.*, Academic Press, 1995: pp. 727-745.
- [20] M.L. Cross, H.S. Gill, Immunomodulatory properties of milk., *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1 (2000) S81-S89. doi:10.1017/S0007114500002294.
- [21] B.. Lonnerdal, Breast milk: a truly functional food, *Nutrition.* 16 (2000) 509-511.

- doi:10.1016/S0899-9007(00)00363-4.
- [22] O.T. Oftedal, The evolution of milk secretion and its ancient origins, *Animal*. 6 (2012) 355–368. doi:10.1017/S1751731111001935.
- [23] B. Koletzko, S. Baker, G. Cleghorn, U.F. Neto, S. Gopalan, O. Hernell, et al., Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41 (2005) 584–599. doi:10.1097/01.mpg.0000187817.38836.42.
- [24] WHO, Infant and young child feeding. A tool for assessing national practices, policies and programmes, WHO, Geneva (Switzerland), 2003.
- [25] W.H. Oddy, The impact of breastmilk on infant and child health., *Breastfeed. Rev.* 10 (2002) 5–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12592775>.
- [26] M. Guo, ed., *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*, Chapter 1, Elsevier Ltd., 2014.
- [27] S. Noble, P. Emmett, Differences in weaning practice, food and nutrient intake between breast- and formula-fed 4-month-old infants in England, *J. Hum. Nutr. Diet.* 19 (2006) 303–313. doi:10.1111/j.1365-277X.2006.00708.x.
- [28] Z.A. Bhutta, Iron and Zinc Intake From Complementary Foods: Some Issues From Pakistan, *Pediatrics*. 106 (2000) 1295–1298.
- [29] J.E. Kimmons, K.G. Dewey, E. Haque, J. Chakraborty, S.J.M. Osendarp, K.H. Brown, Low nutrient intakes among infants in rural Bangladesh are attributable to low intake and micronutrient density of complementary foods., *J. Nutr.* 135 (2005) 444–451. doi:135/3/444 [pii].
- [30] O.I. Asubiojo, F.Y. Iskander, A trace element study of commercial infant milk and cereal formulas, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 125 (1988) 265–270.
- [31] WHO, *Complementary feeding of young children in developing countries A review of current scientific knowledge*, 1998.
- [32] J.K. Friel, R.W. Friesen, S. V. Harding, L.J. Roberts, Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants, *Pediatr. Res.* 56 (2004) 878–882.

- doi:10.1203/01.PDR.0000146032.98120.43.
- [33] J. Živković, S. Sunarić, N. Trutić, M. Denić, G. Kocić, T. Jovanović, Antioxidants and Antioxidant Capacity of Human Milk, *Acta Fac. Medicae Naissensis*. 32 (2015) 115–125.
- [34] I. Gülçin, Antioxidant activity of food constituents: An overview, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 345–391. doi:10.1007/s00204-011-0774-2.
- [35] E. Granot, R. Kohen, Oxidative stress in childhood--in health and disease states, *Clin. Nutr.* 23 (2004) 3–11. doi:10.1016/s0261-5614(03)00097-9.
- [36] J.M. Matés, C. Pérez-Gómez, I. Núñez de Castro, Antioxidant enzymes and human diseases., *Clin. Biochem.* 32 (1999) 595–603. doi:10.1016/S0009-9120(99)00075-2.
- [37] J. Sastre, F. V Pallardó, J. García de la Asunción, J. Viña, Mitochondria, oxidative stress and aging., *Free Radic. Res.* 32 (2000) 189–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10730818>.
- [38] O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review, *Ann. Bot.* 91 (2003) 179–194. doi:10.1093/aob/mcf118.
- [39] J. Lappalainen, M. Atalay, Protection against oxidative stress. In: *The Encyclopedia of LifeSupport Systems-Volume II*, UNESCO Publishing-Eolss Publishers,Oxford, 2004.
- [40] M. Giribaldi, L. Cavallarin, C. Baro, P. Di Nicola, A. Coscia, E. Bertino, Biological and Nutritional Aspects of Human Milk in Feeding of Preterm Infants, *Food Nutr. Sci.* 3 (2012) 1682–1687. doi:10.4236/fns.2012.312220.
- [41] H. Shoji, T. Shimizu, K. Shinohara, S. Oguchi, S. Shiga, Y. Yamashiro, Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants., *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 89 (2004) F136–F138. doi:10.1136/adc.2002.018390.
- [42] Y. Luo, B. Zhang, M. Chen, J. Wang, X. Zhang, W.Y. Gao, et al., Rapid and



- simultaneous determination of essential minerals and trace elements in human milk by improved flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) with microwave digestion, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 9396–9400. doi:10.1021/jf100940e.
- [43] M. Yaman, N. Çokol, Determination of trace elements in human milk, cow's milk, and baby foods by flame AAS using wet ashing and microwave oven sample digestion procedures, *At. Spectrosc.* 25 (2004) 185–190.
- [44] Bermejo P., E. Peña, D. Fompedriña, R. Domínguez, A. Bermejo, J.M. Fraga, et al., Copper fractionation by SEC-HPLC and ETAAS: study of breast milk and infant formulae whey used in lactation of full-term newborn infants., *Analyst.* 126 (2001) 571–575.
- [45] R.S. Nascimento, R.E.S. Froes, N.O.C. Silva, R.L.P. Naveira, D.B.C. Mendes, W.B. Neto, et al., Quantification of Inorganic Constituents in Brazilian Human Milk by ICP OES, *At. Spectrosc.* 43 (2010) 960–971. doi:DOI: 10.1080/00032710903491096.
- [46] C.S. Kira, F.D. Maio, V.A. Maihara, Comparison of Partial Digestion Procedures for Determination of Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn in Milk by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 151–156.
- [47] Y. Gélinas, a Krushevska, R.M. Barnes, Determination of total iodine in nutritional and biological samples by ICP-MS following their combustion within an oxygen stream., *Anal. Chem.* 70 (1998) 1021–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511475>.
- [48] K. Bierla, J. Szpunar, R. Lobinski, Specific determination of selenoaminoacids in whole milk by 2D size-exclusion-ion-pairing reversed phase high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP MS), *Anal. Chim. Acta.* 624 (2008) 195–202. doi:10.1016/j.aca.2008.06.052.
- [49] R.R. Parrish, M.F. Thirlwall, C. Pickford, M. Horstwood, A. Gerdes, J.

- Anderson, et al., Determination of  $^{238}\text{U}/^{235}\text{U}$ ,  $^{236}\text{U}/^{238}\text{U}$  and uranium concentration in urine using SF-ICP-MS and MC-ICP-MS: an interlaboratory comparison, *Health Phys.* 90 (2006) 127–138. doi:10.1097/01.HP.0000174809.43871.54.
- [50] J. Kumpulainen, J. Lehto, P. Koivistoinen, M. Uusitupa, E. Vuori, Determination of chromium in human milk, serum and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry without preliminary ashing., *Sci. Total Environ.* 31 (1983) 71–80.
- [51] P.R. Silva, J.G. Dorea, G.R. Boaventura, Multielement determination in small samples of human milk by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Biol. Trace Elem. Res.* (1997) 57–62.
- [52] H. Lindmark-Månsson, B. Akesson, Antioxidative factors in milk., *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1 (2000) S103–S110. doi:10.1017/S0007114500002324.
- [53] D. Huang, O.U. Boxin, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841–1856. doi:10.1021/jf030723c.
- [54] a Janaszewska, G. Bartosz, Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62 (2002) 231–236. doi:10.1080/003655102317475498.
- [55] T. Sakurai, M. Furukawa, M. Asoh, T. Kanno, T. Kojima, A. Yonekubo, Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo). 51 (2005) 239–247. doi:10.3177/jnsv.51.239.
- [56] C.P. Gossage, M. Deyhim, S. Yamini, L.W. Douglass, P.B. Moser-Veillon, Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to beta-carotene supplementation., *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 193–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12081834>.
- [57] C. Barbas, E. Herrera, Lipid composition and vitamin E content in human colostrum and mature milk, *J. Physiol. Biochem.* 54 (1998) 167–173.

- [58] S. Fairweather-Tait, R.F. Hurrell, Bioavailability of minerals and trace elements., *Nutr. Res. Rev.* 9 (1996) 295–324. doi:10.1079/NRR19960016.
- [59] ESPGHAN, 7. Iron, Minerals and Trace Elements, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41 (2005) S39–S46.
- [60] I. Voskaki, V. Arvanitidou, H. Athanasopoulou, A. Tzagkaraki, G. Tripsianis, A. Giannoulia-Karantana, Serum copper and zinc levels in healthy greek children and their parents, *Biol. Trace Elem. Res.* 134 (2010) 136–145. doi:10.1007/s12011-009-8462-2.
- [61] A.A. Hegazy, M.M. Zaher, M.A. Abd El-Hafez, A.A. Morsy, R.A. Saleh, Relation between anemia and blood levels of lead, copper, zinc and iron among children., *BMC Res. Notes.* 3 (2010) 133. doi:10.1186/1756-0500-3-133.
- [62] T. Özden, G. Gökçay, M. Cantez, Ö. Durmaz, H. İşsever, B. Ömer, et al., Copper, zinc and iron levels in infants and their mothers during the first year of life: a prospective study, *BioMed Cent. Pediatr.* 15 (2015) 157.
- [63] S.C. Burjonrappa, M. Miller, Role of trace elements in parenteral nutrition support of the surgical neonate, *J. Pediatr. Surg.* 47 (2012) 760–771. doi:10.1016/j.jpedsurg.2012.01.015.
- [64] A.A. Jones, R.A. DiSilvestro, M. Coleman, T.L. Wagner, Copper supplementation of adult men: Effects on blood copper enzyme activities and indicators of cardiovascular disease risk, *Metabolism.* 46 (1997) 1380–1383. doi:10.1016/S0026-0495(97)90135-9.
- [65] A. Ece, B.S. Uyanik, A. Işcan, P. Ertan, M.R. Yiğitoğlu, Increased serum copper and decreased serum zinc levels in children with iron deficiency anemia., *Biol. Trace Elem. Res.* 59 (1997) 31–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9522044>.
- [66] S.H. Zlotkin, C. Schauer, S. Owusu Agyei, J. Wolfson, M.C. Tondeur, K.P. Asante, et al., Demonstrating zinc and iron bioavailability from intrinsically labeled microencapsulated ferrous fumarate and zinc gluconate Sprinkles in young children., *J. Nutr.* 136 (2006) 920–925. doi:136/4/920 [pii].

- [67] M. Worwood, Iron and other trace metals, in: Academic Press, London and New York, 1974: pp. 335–362.
- [68] K.H. Brown, Effect of infections on plasma zinc concentration and implications for zinc status assessment in low-income countries, in: *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998: p. 425S–429S.
- [69] L.J. Hinks, B.E. Clayton, R.S. Lloyd, Zinc and copper concentrations in leucocytes and erythrocytes in healthy adults and the effect of oral contraceptives., *J. Clin. Pathol.* 36 (1983) 1016–21. doi:10.1136/jcp.36.9.1016.
- [70] T. Lind, Iron and zinc in infancy: Results from experimental trials in Sweden and Indonesia, 2004. <http://search.proquest.com/docview/305085222?accountid=13771>.
- [71] B. Lonnerdal, Bioavailability of copper, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 821S–9.
- [72] X. Wu, Z. Liu, J. Guo, C. Wan, T. Zhang, H. Cui, et al., Influence of dietary zinc and copper on apparent mineral retention and serum biochemical indicators in young male mink (*Mustela vison*), *Biol. Trace Elem. Res.* 165 (2015) 56–66.
- [73] B. Lonnerdal, Dietary Factors Influencing Zinc Absorption, *J. Nutr.* 130 (2000) 1378S–1383. <http://jn.nutrition.org/cgi/content/long/130/5/1378S>.
- [74] S.M. Monajemzadeh, M.R. Zarkesh, Iron deficiency anemia in infants aged 12–15 months in Ahwaz, Iran, *Indian J. Pathol. Microbiol.* 52 (2009) 182–184. doi:10.4103/0377-4929.48911.
- [75] H. Kodama, Trace Element Deficiency in Infants and Children – Clinical practice –, *J. Japan Med. Assoc.* 47 (2004) 376–381. <https://www.med.or.jp/english/journal/pdf/jmaj/v47no08.pdf#page=27>.
- [76] A. Cordano, J.M. Baertl, G.G. Graham, Copper deficiency in infancy, *Pediatrics.* 34 (1964) 324–336.
- [77] Q. Shazia, Z.H. Mohammad, T. Rahman, H.U. Shekhar, Correlation of oxidative stress with serum trace element levels and antioxidant enzyme status in beta thalassemia major patients: A review of the literature, *Anemia.* 2012

- (2012) 270923. doi:10.1155/2012/270923.
- [78] C. Cheng, S. Juul, Iron Balance in the Neonate, *Neoreviews*. 12 (2011) 148–158.
- [79] S.M. Donovan, B. Lönnerdal, Non-protein nitrogen and true protein in infant formulas., *Acta Paediatr. Scand.* 78 (1989) 497–504.
- [80] M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, N.C. Andrews, Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism, *Cell*. 117 (2004) 285–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00343-5.
- [81] M.K. Georgieff, Nutrition and the developing brain: Nutrient priorities and measurement, in: *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007: p. 614S–620S. doi:85/2/614S [pii].
- [82] B. Lozoff, J. Beard, J. Connor, B. Felt, M. Georgieff, T. Schallert, Long-lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy., *Nutr Rev.* 64 (2006) S34-43-91. doi:10.1301/nr.2006.may.S34.
- [83] B. Lozoff, M.K. Georgieff, Iron Deficiency and Brain Development, *Semin. Pediatr. Neurol.* 13 (2006) 158–165. doi:10.1016/j.spen.2006.08.004.
- [84] N.C. Andrews, P.J. Schmidt, Iron homeostasis., *Annu. Rev. Physiol.* 69 (2007) 69–85. doi:10.1146/annurev.physiol.69.031905.164337.
- [85] H.J. McArdle, H.S. Andersen, H. Jones, L. Gambling, Copper and iron transport across the placenta: Regulation and interactions, in: *J. Neuroendocrinol.*, 2008: pp. 427–431. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01658.x.
- [86] Y.M. Shah, T. Matsubara, S. Ito, S.H. Yim, F.J. Gonzalez, Intestinal Hypoxia-Inducible Transcription Factors Are Essential for Iron Absorption following Iron Deficiency, *Cell Metab.* 9 (2009) 152–164. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.012.
- [87] M.E. Conrad, J.N. Umbreit, Pathways of iron absorption., *Blood Cells. Mol. Dis.* 29 (2002) 336–355. doi:10.1006/bcmd.2002.0564.
- [88] L. Vanoaica, D. Darshan, L. Richman, K. Schümann, L.C. Kühn, Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption, *Cell Metab.* 12 (2010) 273–282. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.003.
- [89] T. Hokama, S. Takenaka, K. Hirayama, A. Yara, K. Yoshida, K. Itokazu, et al.,

- Iron status of newborns born to iron deficient anaemic mothers., *J. Trop. Pediatr.* 42 (1996) 75–7. doi:10.1093/tropej/42.2.75.
- [90] M.K. Georgieff, S.W. Wewerka, C.A. Nelson, R.A. DeRegnier, Iron status at 9 months of infants with low iron stores at birth, *J. Pediatr.* 141 (2002) 405–409. doi:10.1067/mpd.2002.127090.
- [91] G.M. Wardlaw, *Perspectives in Nutrition*, 6th ed., The McGraw - Hill Companies, New York, 2004.
- [92] Linus Pauling Institute, Iron, (n.d.). <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/iron>. (accessed January 1, 2016).
- [93] Food and Agriculture Organization (FAO)., No Title, (n.d.). <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2809E/y2809e0j.htm>. (accessed July 7, 2016).
- [94] G.A. for I.N. (GAIN), Global Alliance for Improved Nutrition (GAIN), (n.d.). <http://www.gainhealth.org/about-malnutrition/anemia-focusmeet-expert> (accessed January 1, 2016).
- [95] B. Lozoff, K.M. Clark, Y. Jing, R. Armony-Sivan, M.L. Angelilli, S.W. Jacobson, Dose-Response Relationships between Iron Deficiency with or without Anemia and Infant Social-Emotional Behavior, *J. Pediatr.* 152 (2008) 696–702. doi:10.1016/j.jpeds.2007.09.048.
- [96] J.K. Friel, K. Aziz, W.L. Andrews, S. V Harding, M.L. Courage, R.J. Adams, A double-masked, randomized control trial of iron supplementation in early infancy in healthy term breast-fed infants, *J Pediatr.* 143 (2003) 582–586. doi:10.1067/s0022-3476(03)00301-9.
- [97] R.D. Baker, F.R. Greer, Diagnosis and prevention of iron deficiency and iron-deficiency anemia in infants and young children (0-3 years of age)., *Pediatrics.* 126 (2010) 1040–1050. doi:10.1542/peds.2010-2576.
- [98] T. Tamura, R.L. Goldenberg, J. Hou, K.E. Johnston, S.P. Cliver, S.L. Ramey, et

- al., Cord serum ferritin concentrations and mental and psychomotor development of children at five years of age, *J. Pediatr.* 140 (2002) 165–170. doi:10.1067/mpd.2002.120688.
- [99] J. Steinmacher, F. Pohlandt, H. Bode, S. Sander, M. Kron, A.R. Franz, Randomized trial of early versus late enteral iron supplementation in infants with a birth weight of less than 1301 grams: neurocognitive development at 5.3 years' corrected age., *Pediatrics.* 120 (2007) 538–546. doi:10.1542/peds.2007-0495.
- [100] S. Arnon, R.H. Regev, S. Bauer, R. Shainkin-Kestenbaum, Y. Shiff, Y. Bental, et al., Vitamin E levels during early iron supplementation in preterm infants, *Am. J. Perinatol.* 26 (2009) 387–392. doi:10.1055/s-0029-1214233.
- [101] C.P. Ozment, J.L. Turi, Iron overload following red blood cell transfusion and its impact on disease severity., *Biochim. Biophys. Acta.* 1790 (2009) 694–701. doi:10.1016/j.bbagen.2008.09.010.
- [102] T.E. Inder, R.S. Clemett, N.C. Austin, P. Graham, B.A. Darlow, High iron status in very low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity, *J Pediatr.* 131 (1997) 541–544. doi:S0022347697004022 [pii].
- [103] K.M. Silvers, A.T. Gibson, J.M. Russell, H.J. Powers, Antioxidant activity, packed cell transfusions, and outcome in premature infants, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 78 (1998) 214–219. doi:10.1136/fn.78.3.F214.
- [104] K. Braekke, a G. Bechensteen, B.L. Halvorsen, R. Blomhoff, K. Haaland, a C. Staff, Oxidative stress markers and antioxidant status after oral iron supplementation to very low birth weight infants, *J Pediatr.* 151 (2007) 23–28. doi:10.1016/j.jpeds.2007.02.016.
- [105] S.M. Miller, R.J. McPherson, S.E. Juul, Iron sulfate supplementation decreases zinc protoporphyrin to heme ratio in premature infants, *J. Pediatr.* 148 (2006) 44–48. doi:10.1016/j.jpeds.2005.08.052.
- [106] V. Buccigrossi, G. De Marco, E. Bruzzese, L. Ombrato, I. Bracale, G. Polito, et

- al., Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation, *Pediatr. Res.* 61 (2007) 410–414. doi:10.1203/pdr.0b013e3180332c8d.
- [107] D. Bosscher, M. Van Caillie-Bertrand, H. Robberecht, K. Van Dyck, R. Van Cauwenbergh, H. Deelstra, In vitro availability of calcium, iron, and zinc from first-age infant formulae and human milk., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32 (2001) 54–58. doi:10.1097/00005176-200101000-00016.
- [108] S.R. Drago, M.E. Valencia, Influence of Components of Infant Formulas on in Vitro Iron, Zinc, and Calcium Availability, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3202–3207. doi:10.1021/jf035191e.
- [109] K.D. Welch, T.Z. Davis, S.D. Aust, Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators., *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2002) 360–369. doi:10.1006/abbi.2001.2694.
- [110] D.M. Miller, G.R. Buetner, S.D. Aust, Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions, *Free Radic. Biol. Med.* 8 (1990) 95–108. doi:10.1016/0891-5849(90)90148-C.
- [111] H.J.H. Fenton, Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc.* 65 (1894) 899–910. doi:10.1039/ct8946500899.
- [112] R. Domitrović, M. Tota, C. Milin, Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron., *Biol. Trace Elem. Res.* 113 (2006) 177–91. doi:10.1385/BTER:113:2:177.
- [113] V. Gavino, C. Dillard, A. Tappel, The effect of iron overload on urinary excretion of immunoreactive prostaglandin E<sub>2</sub>, *Arch. Biochem. Biophys.* 237 (1985) 322–327.
- [114] L.R. McDowell, N. Wilkinson, R. Madison, T. Felix, Vitamins and minerals functioning as antioxidants with supplementation considerations, in: 18th Symp. Florida Rumin. Nutr. Symp., 2007.
- [115] W. Weiss, Antioxidants nutrients, cow health and milk quality, in: Dairy Cattle



- Nutr. Work. Dep. Dairy Anim. Sci., 2005: pp. 11–18.
- [116] M. Guo, *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*, in: M. Guo (Ed.), Woodhead Publ. Ser. Food Sci. Technol. Nutr., Elsevier, 2014: pp. 19–32. doi:<http://dx.doi.org/10.1533/9780857099150.1.19>.
- [117] J. Groff, S. Gropper, S. Hunt, *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, West Publishing Company, New York, 1995.
- [118] M. Araya, F. Pizarro, M. Olivares, M. Arredondo, M. González, M. Méndez, Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health, *Biol. Res.* 39 (2006) 183–187.
- [119] M. Bonham, J.M. O'Connor, B.M. Hannigan, J.J. Strain, The immune system as a physiological indicator of marginal copper status?, *Br. J. Nutr.* 87 (2002) 393–403. doi:10.1079/BJNBJN2002558.
- [120] C.D. Davis, Low dietary copper increases fecal free radical production, fecal water alkaline phosphatase activity and cytotoxicity in healthy men., *J. Nutr.* 133 (2003) 522–527.
- [121] C. Rottkamp, A. Nunomura, A. Raina, L. Sayre, G. Perry, M. Smith, Oxidative stress, antioxidants, and Alzheimer disease, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 14 (200AD) 62–66.
- [122] Y. Christen, Oxidative stress and Alzheimer disease., *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 621S–629S.
- [123] S.J. Lippard, J.M. Berg, *Principles of bioinorganic chemistry*, University Science Books: Mill Valley, CA., 1994.
- [124] Mother and Child Nutrition in the Tropics and Subtropics Chapter 10 Micronutrients II: Trace Elements, *J. Trop. Pediatr.* (n.d.) 357–382. [http://www.oxfordjournals.org/our\\_journals/tropej/online/mcnts\\_chap10.pdf](http://www.oxfordjournals.org/our_journals/tropej/online/mcnts_chap10.pdf);
- [125] E.D. Harris, Copper homeostasis: the role of cellular transporters, *Nutr Rev.* 59 (2001) 281–285.

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11570430](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11570430).
- [126] L. Klevay, Lack of a recommended dietary allowance for copper may be hazardous to your health, *J. Am. Coll. Nutr.* 17 (1998).
- [127] USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23, 2010. Nutrient Data Laboratory Home Page, /ba/bhnrc/ndl.
- [128] National Research Council (2000) Institute of National Measurement Standards., n.d.
- [129] Copper, in: *Recomm. Diet. Allow.*, 10th ed., National Research Council, Food Nutrition Board, Washington, D.C., 1989: pp. 151–154. <http://www.nap.edu>.
- [130] R.A. Wapnir, Copper absorption and bioavailability, in: *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998: pp. S1054–S1060.
- [131] M.C. Linder, M. Hazegh-Azam, Copper biochemistry and molecular biology., *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 797S–811S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8615367>.
- [132] S. Nazifi, S.M. Razavi, P. Kianiamin, E. Rakhshandehroo, Evaluation of erythrocyte antioxidant mechanisms: Antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and serum trace elements associated with progressive anemia in ovine malignant theileriosis, *Parasitol. Res.* 109 (2011) 275–281. doi:10.1007/s00436-010-2248-5.
- [133] L.M. Klevay, Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper ingested, *Am. J. Clin. Nutr.* 26 (1973) 1060–1068.
- [134] E. Örün, S. Songül Yalçın, O. Aykut, G. Orhan, G.K. Morgil, Zinc and copper concentrations in breastmilk at the second month of lactation, in: *Indian Pediatr.*, 2012: pp. 133–135. doi:10.1007/s13312-012-0021-9.
- [135] C.T. Chasapis, C.A. Spiliopoulou, A.C. Loutsidou, M.E. Stefanidou, Zinc and human health: An update, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 521–534. doi:10.1007/s00204-011-0775-1.

- [136] M. Guo, G. Hendricks, Human milk and infant formula, *Funct. Princ. Technol.* 9 (2007) 299–337.
- [137] M.F. Picciano, Trace Element and Mineral Nutrition During Lactation, in: J.D. Bogden, L.M. Klevay (Eds.), *Nutr. Health*, Humana Press Inc., Totova NJ, 2000: pp. 139–151.
- [138] H.-G. Classen, U. gröber, D. Löw, J. Schmidt, H. Stracke, [Zinc deficiency. Symptoms, causes, diagnosis and therapy]., *Med. Monatsschr. Pharm.* 34 (2011) 87–95.  
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=21736013&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/A904C873-1088-4065-A71E-9B8297F94F61>.
- [139] E. Whitney, S. Rady Rolfes, *Understanding nutrition*, 10th ed., 2010. doi:10.1139/h05-022.
- [140] M. Valko, H. Morris, M.T.D. Cronin, *Metals, Toxicity and Oxidative Stress*, *Curr. Top. Med. Chem.* 12 (2005) 1161–1208. doi:10.2174/0929867053764635.
- [141] Institute of Medicine of the National Academies, *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*, 2006. [http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=11537&page=R1](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=11537&page=R1).
- [142] A.F. Wrona, J.C. Banks, S.M. Brown, B.J. Phipps, J.C. Silvertooth, *No Title*, *Cott. Physiol.* 10 (1999) 625–629.
- [143] T. Aydemir, R. Blanchard, R. Cousins, Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1699–1704.
- [144] G.J. Fosmire, Zinc toxicity, *Am. J. Clin. Nutr.* 51 (1990) 225–227.
- [145] C.M. Mbofung, T. Atinmo, A. Omololu, Mineral content of colostrum and mature milk of lactating Nigerian women as influenced by stage of lactation., *Nutr. Rep. Int.* 30 (1984) 1137–1146.
- [146] K.H. Brown, R. Engle-Stone, N.F. Krebs, J.M. Peerson, *Dietary intervention*

- strategies to enhance zinc nutrition: Promotion and support of breastfeeding for infants and young children, *Food Nutr. Bull.* 30 (2009) S144-171.
- [147] N.F. Krebs, C.J. Reidinger, S. Hartley, A.D. Robertson, K.M. Hambidge, Zinc supplementation during lactation: Effects on maternal status and milk zinc concentrations, *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (1995) 1030-1036.
- [148] B. Lönnerdal, Trace element transport in the mammary gland., *Annu. Rev. Nutr.* 27 (2007) 165-177. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093809.
- [149] S.L. Kelleher, B. Lönnerdal, Molecular regulation of milk trace mineral homeostasis, *Mol. Aspects Med.* 26 (2005) 328-339. doi:10.1016/j.mam.2005.07.005.
- [150] C.M. Donangelo, J.C. King, Maternal zinc intakes and homeostatic adjustments during pregnancy and lactation, *Nutrients.* 4 (2012) 782-798. doi:10.3390/nu4070782.
- [151] M. Dardenne, Zinc and immune function, *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (2002) S20-S23.
- [152] M.J. Salgueiro, M. Zubillaga, A. Lysionek, M.I. Sarabia, R. Caro, T. De Paoli, et al., Zinc as an essential micronutrient: A review, *Nutr. Res.* 20 (2000) 737-755. doi:10.1016/S0271-5317(00)00163-9.
- [153] C. Trahms, K. Mackean, Nutrition during infancy, in: *Krause's Food, Nutr. Diet Ther.*, 11 th, 2008: pp. 199-221.
- [154] M.H. Salmani, M. Vakili, M. Abedi, S.A. Mozaffari, Serum levels of Magnesium, Copper and Zinc in Young Couples, *Int J Food Sci Nutr Diet.* 3 (2014) 85-88. doi:dx.doi.org/10.19070/2326-3350-1400017.
- [155] a S. Prasad, Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model., *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 403-412.
- [156] J.C. King, Physiology of pregnancy and nutrient metabolism, in: *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000: p. 1218S-25S.
- [157] C.A. Swanson, J.C. King, Zinc and pregnancy outcome, *Am. J. Clin. Nutr.* 46 (1987) 763-771.

- [158] N.F. Krebs, Zinc supplementation during lactation, in: *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998: pp. 509–512.
- [159] P. Moser-Veillon, Zinc needs and homeostasis during lactation, *Analyst*. 120 (1995) 895–897.
- [160] T. Tamura, R.L. Goldenberg, Zinc nutriture and pregnancy outcome, *Nutr. Res.* 16 (1996) 139–181. doi:10.1016/0271-5317(95)02068-3.
- [161] C. Swanson, J. King, Reduced serum zinc concentration during pregnancy, *Obstet. Gynecol.* 62 (1983) 313–318.
- [162] T. Tamura, R.L. Goldenberg, K.E. Johnston, M. DuBard, Maternal plasma zinc concentrations and pregnancy outcome., *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 109–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617954>.
- [163] C.M. Donangelo, C.L.V. Zapata, L.R. Woodhouse, D.M. Shames, R. Mukherjea, J.C. King, Zinc absorption and kinetics during pregnancy and lactation in Brazilian women., *Am. J. Clin. Nutr.* 82 (2005) 118–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002809>.
- [164] E.B. Fung, L.D. Ritchie, L.R. Woodhouse, R. Roehl, J.C. King, Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: a longitudinal study., *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 80–88.
- [165] United States Department of Agriculture, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20., 2007.
- [166] C. Bales, C. Ritchie, *Handbook of Clinical Nutrition and Aging*, Springer, 2009.
- [167] J.J. Otten, J.P. Hellwig, L.D. Meyers, Editors, D.M. Linda, *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*, 2006. [http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=11537&page=R1](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=11537&page=R1).
- [168] A. Avcyn, M. Javoronkov, D. Ricsh, A. Strotchkova, *Human microelementoses.*, Medicina, Mosco: Medicina, 1991.
- [169] E. Domenech, N.M. Diaz-Gomez, F. Barroso, C. Cortabarría, Zinc and perinatal growth, in: *Early Hum. Dev.*, 2001: pp. 111–117. doi:10.1016/S0378-

- 3782(01)00213-4.
- [170] E. Widdowson, D. Southgate, E. Hey, Fetal growth and body composition, in: B. Lindblad (Ed.), *Perinat. Nutr.*, Academic Press, New York, 1988: pp. 3–14.
- [171] L.E. Caulfield, N. Zavaleta, a H. Shankar, M. Merialdi, Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival., *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 499S–508S.
- [172] L.A. Scheplyagina, Impact of the mother's zinc deficiency on the woman's and newborn's health status, in: *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005: pp. 29–35. doi:10.1016/j.jtemb.2005.07.008.
- [173] P. Lira, A. Ashworth, S. Morris, Effect of zinc supplementation on the morbidity, immune function, and growth of low-birth-weight, full-term infants in northeast Brazil. *TT -*, *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (1998) 418S–424S.
- [174] A. Kienast, B. Roth, C. Bossier, C. Hojabri, P.H. Hoeger, Zinc-deficiency dermatitis in breast-fed infants, *Eur. J. Pediatr.* 166 (2007) 189–194. doi:10.1007/s00431-006-0218-9.
- [175] N. Lazebnik, B. Kuhnert, P. Kuhnert, K. Thompson, Zinc status pregnancy complications and labor abnormalities, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158 (1988) 161–166.
- [176] C. Swanson, J. King, Zinc and pregnancy outcome, *Am. J. Clin. Nutr.* 46 (1987) 763–771.
- [177] F. Delange, K.W. Jr, eds., *Micro-nutrient deficiencies in the first months of life*, in: Nestec Ltd., Vevey, Switzerland, 2003: p. 370.
- [178] K.H. Brown, J.A. Rivera, Z. Bhutta, R.S. Gibson, J.C. King, B. Lönnerdal, et al., International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control., *Food Nutr. Bull.* 25 (2004) S99-203.
- [179] R.S. Gibson, S.Y. Hess, C. Hotz, K.H. Brown, Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence, *Br J Nutr.* 99 Suppl 3 (2008) S14-23.

doi:10.1017/s0007114508006818.

- [180] EFSA supporting publication, Comprehensive literature search and review of breast milk composition as preparatory work for the setting of dietary reference values for vitamins and minerals, 2014. [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/629e.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/629e.pdf).
- [181] M. Silvestre, M. Lagarda, R. Farré, C. Martínez-Costa, J. Brines, A. Molina, et al., Study of factors that may influence the determination of copper, iron and zinc in human milk during sampling and in sample individuals, *Biol. Trace Elem. Res.* 76 (2000) 212–227.
- [182] S. Turan, S. Saygi, Z. Kiliç, O. Acar, Determination of heavy metal contents in human colostrum samples by electrothermal atomic absorption spectrophotometry., *J. Trop. Pediatr.* 47 (2001) 81–85.
- [183] M. Leotsinidis, A. Alexopoulos, E. Kostopoulou-Farri, Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors, *Chemosphere.* 61 (2005) 238–247. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.084.
- [184] C.E. O'Brien, N.F. Krebs, J.L. Westcott, F. Dong, Relationships among plasma zinc, plasma prolactin, milk transfer, and milk zinc in lactating women., *J. Hum. Lact.* 23 (2007) 179–83. doi:10.1177/0890334407300021.
- [185] S.S. Yalcin, A. Baykan, K. Yurdakok, S. Yalcin, A.I. Gucus, The factors that affect milk-to-serum ratio for iron during early lactation., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 31 (2009) 85–90. doi:10.1097/MPH.0b013e31819146c2.
- [186] B.L. Gulson, K.J. Mizon, M.J. Korsch, K.R. Mahaffey, A.J. Taylor, Dietary intakes of selected elements from longitudinal 6-day duplicate diets for pregnant and nonpregnant subjects and elemental concentrations of breast milk and infant formula, *Environ. Res.* 87 (2001) 160–174. doi:10.1006/enrs.2001.4309.
- [187] W. Wasowicz, J. Gromadzinska, K. Szram, K. Rydzynski, J. Cieslak, Z. Pietrzak,

- Selenium, zinc, and copper concentrations in the blood and milk of lactating women., *Biol. Trace Elem. Res.* 79 (2001) 221–33. doi:10.1385/BTER:79:3:221.
- [188] I. Guillot, B. Roth, A.S. Causeret, D. Jullien, O. Claris, M. Faure, et al., Acquired zinc deficiency in a breast-fed premature infant , *Arch. Pediatr.* 10 (2003) 442–444. doi:10.1016/S0929-693X(03)00094-0.
- [189] M. Domellöf, O. Hemell, K.G. Dewey, R.J. Cohen, B. Lönnerdal, Factors influencing concentrations of iron, zinc, and copper in human milk, *Adv. Exp. Med. Biol.* 554 (2004) 355–8.
- [190] A.A. Almeida, C.M.P. V Lopes, A.M.S. Silva, E. Barrado, Trace elements in human milk: Correlation with blood levels, inter-element correlations and changes in concentration during the first month of lactation, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22 (2008) 196–205. doi:10.1016/j.jtemb.2008.03.007.
- [191] F. Mandato, P. Rubegni, G. Buonocore, M. Fimiani, A case of transient zinc deficiency in a breast-fed preterm infant successfully treated with oral zinc supplementation: review of zinc metabolism and related diseases, *G Ital Dermatol Venereol.* 144 (2009) 729–734. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19907411>.
- [192] EFSA, Scientific opinion on dietary reference values for zinc, *EFSA J.* 12 (2014) 76. doi:10.2903/j.efsa.2014.3580.
- [193] S. Saracoglu, K.O. Saygi, O.D. Uluozlu, M. Tuzen, M. Soy lak, Determination of trace element contents of baby foods from Turkey, *Food Chem.* 105 (2007) 280–285. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.022.
- [194] H. Morishita, M. Ohnishi, Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds, *Stud. Nat. Prod. Chem.* 25 (2001) 919–953. doi:10.1016/S1572-5995(01)80024-7.
- [195] K.U. Ingold, Inhibition of the Autoxidation of Organic Substances in the Liquid Phase, *Chem. Rev.* 61 (1961) 563–584.
- [196] E.T. Denisov, I. V. Khudyakov, . Mechanism of action and reactivities of the



- free radicals of inhibitors, *Chem. Rev.* 87 (1987) 1313–1357.
- [197] J.A. Weil, J.R. Bolton, *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, Wiley and Sons, New York, 2007.
- [198] W.R. Hagen, *Biomolecular EPR Spectroscopy*, 2014. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [199] C.B. Berliner, L.J. Berliner, eds., *EPR: Instrumental Methods*, Springer, 2004.
- [200] S.S. Eaton, G. Eaton, L.J. Berliner, *Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology*, in: *Biol. Magn. Reson.*, Springer Verlag, New York, 2005.
- [201] W. Koppenol, NO nomenclature?, *Nitric Oxide Biol. Chem.* 6 (2002) 96–98.
- [202] C. Jacob, P.G. Winyard, eds., *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine* Editor(s): Claus Jacob, 2009.
- [203] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2007. doi:10.1016/0891-5849(91)90055-8.
- [204] D.B. Kell, Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples, *Arch. Toxicol.* 84 (2010) 825–889. doi:10.1007/s00204-010-0577-x.
- [205] E. Pinto, T.C.S. Sigaud-Kutner, M.A.S. Leitão, O.K. Okamoto, D. Morse, P. Colepicolo, Heavy metal-induced oxidative stress in algae, *J. Phycol.* 39 (2003) 1008–1018. doi:10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x.
- [206] G. Bačić, I. Spasojević, B. Šećerov, M. Mojović, Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 69 (2008) 1354–1366. doi:10.1016/j.saa.2007.09.047.
- [207] I. Spasojević, M. Mojović, D. Blagojević, S.D. Spasić, D.R. Jones, A. Nikolić-Kokić, et al., Relevance of the capacity of phosphorylated fructose to scavenge

- the hydroxyl radical, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 80–84. doi:10.1016/j.carres.2008.09.025.
- [208] J. Živković, Z. Zeković, I. Mujić, D. Gocrossed D Signevac, M. Mojović, A. Mujić, et al., EPR spin-trapping and spin-probing spectroscopy in assessing antioxidant properties: Example on extracts of catkin, leaves, and spiny burs of *castanea sativa*, *Food Biophys.* 4 (2009) 126–133. doi:10.1007/s11483-009-9109-8.
- [209] Y. Spanidis, N. Goutzourelas, D. Stagos, A.S. Kolyva, C.A. Gogos, D. Bar-Or, et al., Assessment of oxidative stress in Septic and Obese patients using markers of Oxidation-Reduction Potential, *In Vivo (Brooklyn)*. 29 (2015) 595–600.
- [210] D. Stagos, N. Goutzourelas, A.M. Ntontou, I. Kafantaris, C.K. Deli, A. Poullos, et al., Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015 (2015) 204615. doi:10.1155/2015/204615.
- [211] V. Marinković, M. Ranković-Janevski, S. Spasić, A. Nikolić-Kokić, N. Lugonja, D. Djurović, et al., Antioxidative Activity of Colostrum and Human Milk: Effects of Pasteurization and Storage, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 62 (2016) 901–906.
- [212] S. Koreti, N. Prasad, Micronutrient Content of Breast Milk, *J. Evol. Med. Dent. Sci.* 3 (2014) 1633–1638. doi:10.14260/jemds/2014/ 2036.
- [213] L. Hambraeus, E. Forsum, B. Lönnerdal, Nutritional aspects of breast milk and cow's milk formulas, in: L. Hambraeus, L. Hanson, H. MacFarlane (Eds.), *Symp. Food Immunol., Almqvist and Wiksell, Stockholm, 1975.*
- [214] M. Musumeci, J. Simpure, A. D'Agata, S. Sotgiu, S. Musumeci, Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkinabe women., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43 (2006) 372–378. doi:10.1097/01.mpg.0000228125.70971.af.
- [215] C. Agostoni, C. Braegger, T. Decsi, S. Kolacek, B. Koletzko, K.F. Michaelsen, et al., Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 49 (2009) 112–125.

- doi:10.1097/MPG.0b013e31819f1e05.
- [216] G. Moro, I. Minoli, G. Boehm, G. Georgi, J. Jelinek, G. Sawatzki, Postprandial plasma amino acids in preterm infants: influence of the protein source., *Acta Paediatr.* 88 (1999) 885–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10503690>.
- [217] G. Harzer, M. Haug, I. Dieterich, P.R. Gentner, Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day, *Am. J. Clin. Nutr.* 37 (1983) 612–621.
- [218] E. Szabó, G. Boehm, C. Beermann, M. Weyermann, H. Brenner, D. Rothenbacher, et al., Fatty acid profile comparisons in human milk sampled from the same mothers at the sixth week and the sixth month of lactation., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 50 (2010) 316–20. doi:10.1097/MPG.0b013e3181a9f944.
- [219] B. Stahl, S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, et al., Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 223 (1994) 218–226.
- [220] G. Boehm, B. Stahl, Oligosaccharides, in: T. Mattila-Sandholm (Ed.), *Funct. Dairy Prod.*, 1st ed., Woodhead Publishing, 2003.
- [221] B. Lonnerdal, Breast milk components – effects of maternal diet, genetics and region, in: 44th Annu. Meet. ESPGHAN, Sorrento, Italy, 2011.
- [222] E. Committee, Æ.C. Agostoni, T. Decsi, M. Fewtrell, O. Goulet, S. Kolacek, et al., Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 46 (2008) 99–110. doi:10.1097/01.mpg.0000304464.60788.bd.
- [223] M.F. Picciano, Nutrient composition of human milk., *Pediatr. Clin. North Am.* 48 (2001) 53–67.
- [224] R. Kleinman, *Pediatric Nutrition Handbook*, Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics, 2009.
- [225] J.H. Baumer, *Guidelines for the establishment and operation of human milk*

- banks in the UK, *Arch. Dis. Child. Educ. Pract.* 89 (2004) 27–28.  
doi:10.1136/adc.2004.053330.
- [226] WHO, *Minor and trace elements in breast milk : report of a joint WHO/IAEA collaborative study*, Geneva, 1989.
- [227] A.S. Prasad, *Impact of the Discovery of Human Zinc Deficiency on Health*, *J. Am. Coll. Nutr.* 28 (2009) 257–265. doi:10.1080/07315724.2009.10719780.
- [228] M.L. Turski, D.J. Thiele, *New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease.*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 717–721.  
doi:10.1074/jbc.R800055200.
- [229] B. Lozoff, A. Wolf, E. Jimenez, *Iron deficiency anaemia and infant development: effects of extended oral iron therapy*, *J. Pediatr.* 129. (1996) 382–389.
- [230] F.J. Cumming, J.J. Fardy, M.H. Briggs, *Trace elements in human milk.*, *Obstet. Gynecol.* 62 (1983) 506–508.
- [231] G.B. Fransson, B. Lönnerdal, *Iron in human milk*, *J. Pediatr.* 96 (1980) 380–384.  
doi:10.1016/S0022-3476(80)80676-7.
- [232] G.B. Fransson, B. Lönnerdal, *Iron, copper, zinc, calcium, and magnesium in human milk fat.*, *Am. J. Clin. Nutr.* 39 (1984) 185–9.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6464735>.
- [233] Y. Hirai, N. Kawakata, K. Satoh, Y. Ikeda, S. Hisayasu, H. Orimo, et al., *Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation.*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 36 (1990) 531–44.  
doi:10.3177/jnsv.36.531.
- [234] B. Lönnerdal, *Regulation of mineral and trace elements in human milk: exogenous and endogenous factors.*, *Nutr. Rev.* 58 (2000) 223–229.
- [235] A. Frković, B. Medugorac, A. Alebić-Juretić, *Zinc levels in human milk and umbilical cord blood.*, *Sci. Total Environ.* 192 (1996) 207–12.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8956527>.

- [236] V. Khurana, K. Agarwal, S. Gupta, Iron content of breast milk, *Indian Pediatr.* 7 (1970) 659–661.
- [237] M.F. Picciano, H.A. Guthrie, Copper, iron, and zinc contents of mature human milk., *Am. J. Clin. Nutr.* 29 (1976) 242–54. <http://ajcn.nutrition.org/content/29/3/242.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/943927>.
- [238] M. Murray, A. Murray, N. Murray, M. Murray, The effect of iron status of Nigerian mothers on that of their infants at birth and 6 months, and on the concentration of Fe in breast milk, *Br. J. Nutr.* 39 (1978) 627–630.
- [239] A. Celada, R. Busset, J. Gutierrez, V. Herreros, No correlation between iron concentration in breast milk and maternal iron stores, *Helv. Paediatr. Acta.* 37 (1982) 11–16. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L12132214>.
- [240] E. Lauber, M. Reinhardt, Studies on the quality of breast milk during 23 months of lactation in a rural community of the Ivory Coast., *Am. J. Clin. Nutr.* 32 (1979) 1159–1173.
- [241] M.C. Neville, R.P. Keller, J. Seacat, C.E. Casey, J.C. Allen, P. Archer, Studies on human lactation. I. Within-feed and between-breast variation in selected components of human milk, *Am. J. Clin. Nutr.* 40 (1984) 635–646.
- [242] M.D. Silvestre, M.J. Lagarda, R. Farré, C. Martínez-Costa, J. Brines, Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion, *Food Chem.* 68 (2000) 95–99. doi:10.1016/S0308-8146(99)00160-0.
- [243] R.M. Feeley, R.R. Eitenmiller, J.B. Jones, H. Barnhart, Copper, iron, and zinc contents of human milk at early stages of lactation, *Am. J. Clin. Nutr.* 37 (1983) 443–448.
- [244] J. Arnaud, A. Favier, Copper, iron, manganese and zinc contents in human colostrum and transitory milk of French women, *Sci. Total Environ.* 159 (1995) 9–15. doi:10.1016/0048-9697(94)04314-D.

- [245] K. Rajalakshmi, S.G. Srikantia, Copper, zinc, and magnesium content of breast milk of Indian women, *Am. J. Clin. Nutr.* 33 (1980) 664–669.
- [246] G.B. Fransson, K.N. Agarwal, M. Gebre-Medhin, L. Hambraeus, Increased breast milk iron in severe maternal anemia: physiological “trapping” or leakage?, *Acta Paediatr. Scand.* 74 (1985) 290–1.
- [247] M. Domellöf., B. Lönnerdal, K. Dewey, R. Cohen, O. Hernell, Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 111–115.
- [248] I. Spasojević, B. Obradović, S. Spasić, Bench-to-bedside review: Neonatal sepsis - redox processes in pathogenesis, *Crit. Care.* 16 (2012) 221. doi:10.1186/cc11183.
- [249] N. Hanna, K. Ahmed, M. Anwar, A. Petrova, M. Hiatt, T. Hegyi, Effect of storage on breast milk antioxidant activity., *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 89 (2004) F518-20. doi:10.1136/adc.2004.049247.
- [250] A. Tsopmo, J. Friel, Human Milk has Anti-Oxidant Properties to Protect Premature Infants, *Curr. Pediatr. Rev.* 3 (2007) 45–51. doi:10.2174/157339607779941615.
- [251] J.K. Friel, S.M. Martin, M. Langdon, G.R. Herzberg, G.R. Buettner, Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula., *Pediatr. Res.* 51 (2002) 612–618. doi:10.1203/00006450-200205000-00012.
- [252] N.M. Lugonja, O.B. Martinov, M.R. Rasovic, S.D. Spasic, G.D. Gojgic, M.M. Vrvic, A Comparative Investigation of an in vitro and Clinical Test of the Bifidogenic Effect of an Infant Formula., *J. Clin. Biochem. Nutr.* 47 (2010) 208–16. doi:10.3164/jcfn.10-54.
- [253] D.L. O'Connor, J.B. Ewaschuk, S. Unger, Human milk pasteurization: benefits and risks., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 18 (2015) 269–75. doi:10.1097/MCO.0000000000000160.

- [254] T. Aksu, Y. Atalay, C. Türkyılmaz, . Gülbahar, I. Hirfanoglu, N. Demirel, et al., The effects of breast milk storage and freezing procedure on interleukine-10 levels and total antioxidant activity., *J. Matern. Neonatal Med.* 28 (2015) 1799–1802.
- [255] D. Newburg, Bioactive components of human milk: evolution, efficiency and protection, *Adv. Exp. Med. Biol.* 501 (2001) 3–10.
- [256] E.S. Buescher, S.M. McIlheran, Antioxidant properties of human colostrum., *Pediatr. Res.* 24 (1988) 14–9. doi:10.1203/00006450-198807000-00005.
- [257] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 577–586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- [258] J. Callen, J. Pinelli, A review of the literature examining the benefits and challenges, incidence and duration, and barriers to breastfeeding in preterm infants, *Adv. Neonatal Care.* 5 (2005) 89–92. doi:10.1016/j.adnc.2005.02.011.
- [259] O.D. Saugstad, Oxygen toxicity in the neonatal period, *Acta Paediatr Scand.* 79 (1990) 881–892.
- [260] A. Zarban, F. Taheri, T. Chahkandi, G. Sharifzadeh, M. Khorashadizadeh, Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk., *J. Clin. Biochem. Nutr.* 45 (2009) 150–4. doi:10.3164/jcbtn.08-233.
- [261] P.M. Emmett, I.S. Rogers, Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition., *Early Hum. Dev.* 49 Suppl (1997) S7–S28. doi:10.1016/S0378-3782(97)00051-0.
- [262] I. of Medicine, Infant Formula: Evaluating the Safety of New Ingredients, in: *Natl. Acad. Press*, 2004: pp. 1–204. <http://www.nap.edu/catalog/10935.html>.
- [263] D. Van Zoeren-Grobbe, J.H.N. Lindeman, E. Houdkamp, R. Brand, J. Schrijver, H.M. Berger, Postnatal changes in plasma chain-breaking

- antioxidants in healthy preterm infants fed formula and/or human milk, *Am. J. Clin. Nutr.* 60 (1994) 900–906.
- [264] B. Lonnerdal, S.A. Atkinson, Nitrogenous components of milk: A. Human Milk Proteins, in: R.G. Jensen (Ed.), *Handb. Milk Compos.*, San Diego, 1995: pp. 351–368.
- [265] M.S. Alles, P.A.M.J. Scholtens, J.G. Bindels, Current trends in the composition of infant milk formulas, *Curr. Paediatr.* 14 (2004) 51–63. doi:10.1016/j.cupe.2003.09.007.
- [266] C. Agostoni, M. Domellöf, Infant formulae: From ESPGHAN Recommendations Towards ESPGHAN-coordinated Global Standards., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41 (n.d.) 580–583.
- [267] M. Gudiel-Urbano, I. Goñi, Human milk oligosaccharides. The rule in the health and the development of the infants, *Arch. Latinoam. Nutr.* 51 (2001) 332–339.
- [268] A.R. Euler, D.K. Mitchell, R. Kline, L.K. Pickering, Prebiotic effect of fructo-oligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 40 (2005) 157–164. doi:10.1097/00005176-200502000-00014.
- [269] L. Wainwright, Does the addition of prebiotics to infant formula have beneficial effects for the baby?, *J. Neonatal Nurs.* 12 (2006) 130–137. doi:10.1016/j.jnn.2006.05.003.
- [270] K.H. Cheeseman, T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry, *Br. Med. Bull.* 49 (1993) 481–493. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625.
- [271] J. Bhatia, F. Greer, Use of soy protein-based formulas in infant feeding, *Pediatrics.* 121 (2008) 1062–1068. doi:10.1542/peds.2008-0564.
- [272] N.R. O'Connor, Infant formula, *Am Fam Physician.* 79 (2009) 565–570. [www.aafp.org/afp%5Cnhttp://www.aafp.org/afp/2009/0401/p565.pdf](http://www.aafp.org/afp%5Cnhttp://www.aafp.org/afp/2009/0401/p565.pdf).
- [273] W. Li, F.S. Hosseinian, A. Tsopmo, J.K. Friel, T. Beta, Evaluation of antioxidant



- capacity and aroma quality of breast milk, *Nutrition*. 25 (2009) 105–114. doi:10.1016/j.nut.2008.07.017.
- [274] C.C. Ou, T.M. Lu, J.J. Tsai, J.H. Yen, H.W. Chen, M.Y. Lin, Antioxidative effect of lactic acid bacteria: Intact cells vs. intracellular extracts, *J. Food Drug Anal.* 17 (2009) 209–216.
- [275] J. Sun, X.L. Hu, G.W. Le, Y.H. Shi, Lactobacilli prevent hydroxy radical production and inhibit *Escherichia coli* and *Enterococcus* growth in system mimicking colon fermentation, *Lett. Appl. Microbiol.* 50 (2010) 264–269. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02786.x.
- [276] T. Virtanen, A. Pihlanto, S. Akkanen, H. Korhonen, Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 102 (2007) 106–115. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x.
- [277] I. Spasojević, Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48 (2011) 114–42. doi:10.3109/10408363.2011.591772.
- [278] J. Nishida, J. Kawabata, F. Biochemistry, A. Bioscience, T. Dpph, T. Kasei, et al., DPPH radical scavenging reaction of hydroxy- and methoxychalcones, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 193–202. doi:10.1271/bbb.70.193.
- [279] S. Saito, Y. Okamoto, J. Kawabata, Effects of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 1221–1227. doi:10.1271/bbb.68.1221.
- [280] K.G. Dewey, C.M. Chaparro, Mineral metabolism and body composition iron status of breast-fed infants, *Proc. Nutr. Soc.* 66 (2007) 412–22. doi:10.1017/S002966510700568X.
- [281] R.D. Miller, L.R. Baehner, W.C. McMillan, H.C. Smith, *Blood Diseases of Infancy and Childhood*, Fifth edit, St. Louis : Mosby, 1984.
- [282] C.-N. Lin, A. Wilson, B.B. Church, S. Ehman, W.L. Roberts, G. a McMillin, Pediatric reference intervals for serum copper and zinc., *Clin. Chim. Acta.* 413

- (2012) 612–5. doi:10.1016/j.cca.2011.12.005.
- [283] J. Mello-Neto, P.H.C. Rondó, M. Oshiiwa, M.A. Morgano, C.Z. Zacari, M.L. dos Santos, Iron supplementation in pregnancy and breastfeeding and iron, copper and zinc status of lactating women from a human milk bank, *J. Trop. Pediatr.* 59 (2013) 140–144. doi:10.1093/tropej/fms055.
- [284] S. Fernandez-Menendez, M.L. Fernandez-Sanchez, B. Fernandez-Colomer, R.R. de la Flor St Remy, G.D. Cotallo, A.S. Freire, et al., Total zinc quantification by inductively coupled plasma-mass spectrometry and its speciation by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry in human milk and commercial formulas: Importance in infant nutrition, *J. Chromatogr. A.* 1428 (2016) 246–254. doi:10.1016/j.chroma.2015.09.021.
- [285] L. Huang, J. Gitschier, A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse., *Nat. Genet.* 17 (1997) 292–7. doi:10.1038/ng1197-292.
- [286] D. Silvestre, C. Martínez-Costa, M.J. Lagarda, J. Brines, R. Farré, G. Clemente, Copper, iron, and zinc contents in human milk during the first three months of lactation: a longitudinal study., *Biol. Trace Elem. Res.* 80 (2001) 1–11. doi:10.1385/BTER:80:1:01.
- [287] O. Dumrongwongsiri, U. Suthutvoravut, S. Chatvutinun, P. Phoonlabdacha, A. Sangcakul, A. Siripinyanond, et al., Maternal zinc status is associated with breast milk zinc concentration and zinc status in breastfed infants aged 4–6 months., *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 24 (2015) 273–280. doi:10.6133/apjcn.2015.24.2.06.
- [288] I. Elisia, D.D. Kitts, Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components., *J. Clin. Biochem. Nutr.* 49 (2011) 147–52. doi:10.3164/jcbtn.10-142.
- [289] D. Silvestre, M. Miranda, M. Muriach, I. Almansa, E. Jareño, F.J. Romero, Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization, *ACTA Paediatr.* 97 (2008) 1070–4. doi:10.1111/j.1651-2227.2008.00870.x.

- [290] I. Spasojević, Z. Stević, A. Nikolić-Kokić, D.R. Jones, D. Blagojević, M.B. Spasić, Different roles of radical scavengers – ascorbate and urate in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients., *Redox Rep.* 15 (2010) 81–86. doi:10.1179/174329210X12650506623320.
- [291] A.S. Domazou, H. Zhu, W.H. Koppenol, Fast repair of protein radicals by urate, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1929–1936. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.045.
- [292] R. Santus, L.K. Patterson, P. Filipe, P. Morliere, G.L. Hug, A. Fernandes, et al., Redox reactions of the urate radical/urate couple with the superoxide radical anion, the tryptophan neutral radical and selected flavonoids in neutral aqueous solutions, *Free Radic Res F. Full J. TitleFree Radic. Res.* 35 (2001) 129–136.
- [293] D.J.R. Lane, D.R. Richardson, The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: Much more than just enhanced iron absorption!, *Free Radic. Biol. Med.* 75 (2014) 69–83. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.007.
- [294] P. Wardman, Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution, *J. Phys Chem. Ref. Data.* 18 (1989) 1637–1753. doi:10.1063/1.555843.
- [295] R. Rao, M.K. Georgieff, Iron Therapy for Preterm Infants, *Clin. Perinatol.* 36 (2009) 27–42. doi:10.1016/j.clp.2008.09.013.
- [296] A. Alberti-Fidanza, G. Burini, G. Perriello, Total antioxidant capacity of colostrum, and transitional and mature human milk, *J. Matern. Neonatal Med.* 11 (2002) 275–279. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036022675&partnerID=tZOtx3y1>.
- [297] A. Stekel, M. Olivares, M. Cayazzo, P. Chadud, S. Llaguno, F. Pizarro, Prevention of iron deficiency by milk fortification. II A field trial with a full-fat acidified milk, *Am. J. Clin. Nutr.* 47 (1988) 265–269.
- [298] E. Hertrampf, M. Olivares, T. Walter, F. Pizarro, G. Heresi, S. Llaguno, et al., [Iron-deficiency anemia in the nursing infant: its elimination with iron-fortified

- milk], *Rev. Med. Chil.* 118 (1990) 1330–1337.
- [299] J.A. Rivera, T. Shamah, S. Villalpando, E. Monterrubio, Effectiveness of a large-scale iron-fortified milk distribution program on anemia and iron deficiency in low-income young children in Mexico, *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (2010) 431–439. doi:10.3945/ajcn.2009.28104.
- [300] A. Zarban, M.M. Toroghi, M. Asli, M. Jafari, M. Vejdan, G. Sharifzadeh, Effect of vitamin C and E supplementation on total antioxidant content of human breastmilk and infant urine., *Breastfeed. Med.* 10 (2015) 214–217. doi:10.1089/bfm.2014.0143.
- [301] J.X. Wilson, The physiological role of dehydroascorbic acid, *FEBS Lett.* 527 (2002) 5–9. doi:10.1016/S0014-5793(02)03167-8.
- [302] S. Jyotsna, A. Amit, A. Kumar, Study of serum zinc in low birth weight neonates and its relation with maternal zinc., *J. Clin. Diagn. Res.* 9 (2015) SC01-3. doi:10.7860/JCDR/2015/10449.5402.
- [303] J. Chrzczanowicz, A. Gawron, A. Zwolinska, J. de Graft-Johnson, W. Krajewski, M. Krol, et al., Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants., *Clin. Chem. Lab. Med.* 46 (2008) 342–9. doi:10.1515/CCLM.2008.062.
- [304] G. Faegheh, S. Fatemeh, R. Akram, N. Mansour, Maternal Parity and Blood Oxidative Stress in Mother and Neonate, *Biotechnol. Heal. Sci.* 3 (2016) e34165. doi:10.17795/bhs-34165.
- [305] N. Lugonja, S.D. Spasić, O. Laugier, A. Nikolić-Kokić, I. Spasojević, Z. Orešanin-Dušić, et al., Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas, *Nutrition.* 29 (2013) 431–435. doi:10.1016/j.nut.2012.07.018.

## **VII. BIOGRAFIJA AUTORA**

Dijana D. Đurović rođena je 11.08.1970. godine u Podgorici, Crna Gora. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Podgorici. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smjer diplomirani hemičar za istraživanje i razvoj 1995.godine. Specijalizaciju iz Sanitarne hemije završila je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2002. godine. Zvanje MSc hemijske tehnologije stekla je 2010. godine na Metalurško-Tehnološkom fakultetu Univerziteta Crne Gore. U aprilu 2013. godine završila Kurs o teškim metalima-validacija metoda (u okviru projekta "Bezbednost hrane u Crnoj Gori) u Teramu, Italija. "Osnovni kurs iz toksikologije" u organizaciji EUROTOX, Beograd, Srbija završila u julu 2011. godine. Razvijanje analitičkih sposobnosti-kurs u organizaciji Tehničkog sekretarijata OPCW (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons) u Holandiji (Delft) završila u julu 2006. godine.

Od novembra 1995. do novembra 1996. zaposlena je kao pripravnik u Institutu za javno zdravlje Crne Gore.

Od novembra 1996. do marta 2002. zaposlena u Institutu za javno zdravlje Crne Gore kao sanitarni hemičar.

Od aprila 2002. do danas zaposlena u Institutu za javno zdravlje Crne Gore kao šef laboratorije za kontrolu kvaliteta vode, zemljišta, vazduha i radioaktivnosti.

Od septembra 2010. godine radi kao saradnik na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta Crne Gore na predmetima Farmaceutska analiza i kontrola lijekova i Toksikologija sa analitikom.

Oblast naučno-istraživačkog rada je u oblasti ispitivanja teških metala, mikro i oligo elemenata u segmentima životne sredine i hrane sa posebnim osvrtom na dijetetske proizvode, kao i pojedine humane uzorke (majčino mlijeko, serum) i njihovog antioksidativnog potencijala. Kao istraživač bila je angažovana na projektu 03-401, a sada je angažovana na projektu prvog Centra izvrsnosti u Crnoj Gori – BIO-ICT, koji su finansirani od strane nadležnog Ministarstva za nauku.

Dijana D. Đurović je na osnovu rezultata proisteklih iz doktoreke disertacije publikovala tri naučna rada u časopisima međunarodnog značaja (M21, M22 i M23), od kojih je na dva prvi autor, a na jednom i koresponding autor. Koautor je i na dva

saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima koji su štampani u izvodu koji su proistekli iz rezultata ove doktorske disertacije.

**M 21 - Rad objavljen u vodećem časopisu međunarodnog značaja**

Vesna Marinković, Milica Ranković-Janevski, Snežana Spasić, Aleksandra Nikolić-Kokić, Nikoleta Lugonja, **Dijana Djurović**, Srdjan Miletić, Miroslav M. Vrvić, and Ivan Spasojević, Antioxidative Activity of Colostrum and Human Milk: Effects of Pasteurization and Storage, *JPGN*, **62** (2016) 901-906.

**M 22 - Rad objavljen u istaknutom časopisu međunarodnog značaja**

**Dijana Djurović**, Branka Milisavljević, Boban Mugoša, Nikoleta Lugonja, Srđan Miletić, Snežana Spasić, Miroslav Vrvić, **Zinc concentrations in human milk and infant serum during the first six months of lactation**, *JTEMB*, **41** (2017) 75-78.

**M 23 - Rad objavljen u časopisu međunarodnog značaja**

**D. Đurović**, B. Milisavljević, M. Nedović-Vuković, B. Potkonjak, S. Spasić, M.M. Vrvić, Determination of microelements in human milk and infant formula without digestion by ICP-OES, *ACS*, DOI: 10.17344/acsi.2016.2582

**M 34 - Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu**

M.M. Vrvić, N. Lugonja, S. Spasić, V. Marinković, **D. Djurović**, B. Mugoša; **Are preterm human milk fortifiers good solution for preterm infants nutrition?**, Book of Abstracts of The Food Factor I Barcelona Conference, Barcelona (Spain), 2016, p. 14

**Dijana Đurović**, Miroslav Vrvić, Boban Mugoša, Determination of zinc and copper in infant formula at Montenegrin market by ICP-OES, Book of Abstract, Food Quality & Safety, Health & Nutrition, Skoplje (Macedonia), 2015, p. 135

## **VIII. IZJAVE**



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани Дијана Ђуровић

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање концентрација гвожђа, цинка и бакра и антиоксидативног статуса у мајчином млијеку, серуму беба и мајки и храни за одојчад“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у цјелини ни у дјеловима 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 истовјетности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора: Дијана Ђуровић

Наслов рада: „Испитивање концентрација гвожђа, цинка и бакра и антиоксидативног статуса у мајчином млијеку, серуму беба и мајки и храни за одојчад“

Ментор: проф. др Мирослав М. Врвић

Потписани \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истовјетна 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 мјесто 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:

„Испитивање концентрација гвожђа, цинка и бакра и антиоксидативног статуса у мајчином млијеку, серуму беба и мајки и храни за одојчад“

која је моје ауторско дјело.

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 – дијелити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – дијелити 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. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.