

**»Mladi za napredek Maribora 2013«
30. srečanje**

**DOLOČANJE IN VITRO ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI IZBRANIH HRANIL S
POMOČJO BRIGGS-RAUSCHERJEVE REAKCIJE IN CAA ANALIZE**

Raziskovalno področje

Interdisciplinarno: Kemija, kemijska tehnologija/Biologija

Raziskovalna naloga

CE d | KROÜP ÒRÁZUÜT CE
T ^} d | KÜCE ROZOXCEŠUXÜUÁ ÖÜPCE
¥[| KÖÖQ POZROÁ CEÜÜ

Maribor, januar 2013

1 Povzetek

V raziskovalni nalogi smo s pomočjo Briggs-Rauscherjeve (BR) oscilirajoče reakcije proučili *in vitro* antioksidativno delovanje dvajsetih vzorcev hrane in pijače. Kompleksni mehanizem BR reakcije med drugimi sestavljajo procesi, v katerih sodelujejo prosti radikali, natančneje peroskidni ($\text{HOO}\cdot$) in hidroksidni ($\text{OH}\cdot$) radikali. Z dodajanjem ekstraktov hranil iz domače pridelave ali lokalne trgovine v reakcijski sistem smo proučevali inhibicijski čas, antioksidanti v testiranih vzorcih namreč reducirajo proste radikale in s tem prekinejo oscilacije. Z merjenjem inhibicijskega časa smo tako določili *in vitro* celokupni antioksidativni potencial uporabljenih hranil pri pH vrednosti okrog 2, kar ustreza kemijskemu okolju v človeškem želodcu. Z meritvami smo v izbranih hranilih potrdili prisotnost antioksidantov. Največjo celokupno antioksidativno kapaciteto smo izmerili v vzorcih kave in zelenega čaja, ki jima v padajočem vrstnem redu sledijo vzorci sadja in sadnih marmelad domače pridelave.

Novejša literatura večino antioksidantov v hrani uvršča med polifenole, zato smo v drugi hipotezi predpostavili linearno korelacijo med celokupnim antioksidativnim potencialom in celokupno vsebnostjo fenolov. Uporabili smo vzorce testiranja z BR reakcijo in njihovo celokupno vsebnost fenolov določili s Folin-Ciocalteaujevim (FC) reagentom. Z 91 % korelacijo med metodama smo potrdili, da so glavni antioksidanti v testiranih vzorcih hranil s kemijskega vidika polifenoli.

V eksperimentalnem delu smo v vzorcih zelenega čaja in nektarine zabeležili enako celokupno antioksidativno kapaciteto in enako vsebnost fenolov. Na osnovi tega smo proučevali vpliv hidroksilnih skupin na aktivnost antioksidantov. Iz podatkovne baze Polyphenol Explorer smo pridobili fenolno sestavo ujemajočih vzorcev in izračunali število fenolnih hidroksilnih skupin. Ker se je število hidroksilnih skupin v vzorcih močno razlikovalo, smo zaključili, da število OH skupin ne vpliva na antioksidativno delovanje.

S CAA analizo (angl. CAA assay) smo antioksidativno delovanje izbrane polifenolne spojine epigalokatehin-3-galat-a (EGCG) testirali *in vitro* na celičnih kulturah žilnega endotelija (Ea.hy926), nevroblastoma (SH-SY5Y) in jetrnega karcinoma (HepG2). S poskusi smo potrdili znotrajcelično antioksidativno aktivnost EGCG, ki smo jo testirali na modelu ishemično-reperfuzijske poškodbe in na modelu normalne celične fiziologije.

KAZALO

1	POVZETEK.....	I
2	UVOD	IV
2.1	RAZISKOVALNO VPRAŠANJE.....	IV
2.2	HIPOTEZE.....	V
2.3	SPREMENLJIVKE.....	V
3	PREGLED LITERATURE	7
3.1	KISIKOV PARADOKS	7
3.2	REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI OZ. PROSTI RADIKALI.....	7
3.3	ANTIOKSIDANTI.....	8
3.3.1	<i>Delitev antioksidantov</i>	<i>9</i>
3.3.1.1	Primarni antioksidanti	9
3.3.1.2	Sekundarni antioksidanti	10
3.3.1.3	Endogeni antioksidanti	10
3.3.1.3.1	Glutationski sistem	10
3.3.1.3.1.1	Glutation reduktaza (GSR).....	11
3.3.1.3.1.2	Glutation peroksidaza (GSX).....	12
3.3.1.3.1.3	Superoksid dismutaza (SOD)	12
3.3.1.3.2	Katalaza	12
3.3.1.3.3	Tioredoksinjski sistem	12
3.3.1.3.4	Bilirubin (BLR).....	12
3.3.1.3.5	Alfa-lipoična kislina (ALA)	13
3.3.1.4	Eksogeni antioksidanti	13
3.4	OKSIDATIVNE POŠKODBE LIPIDOV.....	14
3.5	OSCILIRAJOČE KEMIJSKE REAKCIJE	16
3.5.1	<i>Oscilirajoča jodova ura – Briggs-Rauscherjeva reakcija.....</i>	<i>17</i>
3.1	DOLOČANJE CELOKUPNE VSEBNOSTI FENOLOV (TPC) S FOLIN-CIOCALTEUJEVIM FENOLNIM REAGENTOM	21
3.2	EPIGALOKATEHIN – 3-GALAT (EGCG)	22
3.3	CAA ANALIZA	23
4	METODE IN MATERIALI.....	26
4.1	MERJENJE CELOKUPNE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE (TAC) Z BRIGGS-RAUSCHERJEVO REAKCIJO	27
4.1.1	<i>Priprava vzorcev antioksidantov</i>	<i>27</i>
4.1.2	<i>Priprava raztopin za zagon Briggs-Rauscherjeve reakcije.....</i>	<i>27</i>
4.1.3	<i>Priprava merilnega aparata.....</i>	<i>28</i>
4.2	DOLOČANJE CELOTNE VSEBNOSTI FENOLOV (TPC) S FOLIN-CIOCALTEAUJEVO METODO	29
4.3	VPLIV HIDROKSILNIH SKUPIN NA CELOKUPNI ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL (TAC).....	30
4.4	MERJENJE ZNOTRAJCELICNEGA ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA EGCG S CAA ANALIZO	30

4.4.1	<i>Celične kulture za CAA analizo</i>	30
4.4.2	<i>Kemikalije in material za CAA analizo</i>	30
4.4.3	<i>CAA metoda</i>	31
5	REZULTATI	34
5.1	REZULTATI MERJENJA INHIBICIJ V BRIGGS-RAUSCHERJEVEM SISTEMU	34
5.1.1	<i>Slepa proba brez dodatka antioksidanta</i>	34
5.1.2	<i>Skupna opažanja pri določanju celokupnega antioksidativnega potenciala z BR in svetlobnim senzorjem</i> 35	
5.1.3	<i>Obdelava zbranih podatkov na primeru testiranja vzorca borovnice</i>	35
5.1	DOLOČANJE CELOKUPNE VSEBNOSTI FENOLOV S FOLIN-CIOCALTEAUJEVIM REAGENTOM	38
5.2	PRIMERJAVA ŠTEVILA HIDROKSILNIH SKUPIN V 100 G ZELENEGA JABOLKA IN NEKTARINE	41
5.3	IN VITRO MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EGCG S CAA ANALIZO	42
5.3.1	<i>Določanje CAA parametra v poskusih s tvorilcem prostih radikalov (z ABAP-om)</i>	42
5.3.1	<i>Določanje inertnega CAA parametra v poskusih brez tvorilca prostih radikalov (brez ABAP-a)</i>	43
6	DISKUSIJA IN ZAKLJUČKI	45
6.1	DOLOČANJE CELOKUPNEGA ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA (TAC) Z BR REAKCIJO	45
6.2	DOLOČANJE CELOKUPNE VSEBNOSTI FENOLOV (TPC) S FC REAGENTOM	47
6.3	PROČEVANJE VPLIVA HIDROKSILNIH SKUPIN NA ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE	47
6.4	IN VITRO MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EGCG S CAA ANALIZO	48
6.4.1	<i>Določanje CAA parametra v poskusih s tvorilcem prostih radikalov (z ABAP-om)</i>	48
6.4.1	<i>Določanje iCAA parametra v poskusih brez tvorilca prostih radikalov (brez ABAP-a)</i>	49
6.5	OVREDNOTENJE METOD IN REZULATOV	52
6.6	MOGOČE IZBOLJŠAVE V EKSPERIMENTU	53
7	VIRI	54
8	ZAHVALA	63
9	PRILOGE	64
9.1	GRAFI MERITEV CELOKUPNE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE	64
9.2	POLIFENOLNA SESTAVA VZORCA ZELENEGA JABOLKA	67
9.3	POLIFENOLNA SESTAVA VZORCA NEKTARINE	67
9.4	PODATKI ZA RAČUNANJE ŠTEVILA VSEH HIDROKSILNIH SKUPIN V 100 G ZELENEGA JABOLKA IN NEKTARINE	68

2 Uvod

Antioksidanti so snovi, ki v naravnih in umetnih sistemih vežejo proste radikale in tako zavirajo in/ali preprečujejo nastanek kroničnih bolezni, kot so rakava obolenja, srčno-žilne, nevrodegenerativne in ostale bolezni povezane s stanji povečanega oksidativnega stresa. Glede na kemijsko sestavo jih delimo v dve skupini, na flavonoide (flavoni, flavonoli, izoflavoni, antociani, flavanoli in flavanini) in ne flavonoide, npr. fenolne kisline ali stilbenoide (Weingerl, 2010). Kompleksni mehanizmi delovanja različnih antioksidantov v bioloških sistemih (*in vivo* ali *in vitro*) so slabo raziskani, medtem ko so razvite številne kemijske metode *in vitro* določanja antioksidativnega potenciala (HPLC-UV/VIS, LC-MS/MS, pretočna injekcijska analiza, kemiluminiscenca, itd.). Le-te ne predstavljajo dejanskega dogajanja v biološkem sistemu, vendar podajo kvantitavno oceno antioksidativnega delovanja. Problem številnih metod je tudi slaba korelacija med njimi (Weingerl, 2009). Novejše raziskave kažejo, da je potrebno antioksidativno delovanje raziskovati na bioloških sistemih, saj se tu zaščitno delovanje antioksidantov dogaja v različnem koncentracijskem območju, kot je bilo predvideno v kemijskih metodah (Žiberna, 2010).

V raziskovalni nalogi smo proučili *in vitro* delovanje različnih antioksidantov iz vzorcev hrane in pijače s pomočjo Briggs-Rauscherjeve oscilirajoče reakcije. Metoda temelji na spoznanju, da dodatek antioksidantov v sistem reakcije inhibira del mehanizma, ki vključuje proste radikale, ter s tem povzroči inhibicije v nihanju sistema (Cervellati, 2001).

Namen naše raziskovalne naloge je torej z uporabo Briggs-Rauscherjeve reakcije določiti relativno celokupno antioksidativno kapaciteto (TAC) v vzorcih izbranih hranil. Izsledke iz kemijske metode določevanja antioksidativnega delovanja smo preizkusili tudi na biološkem sistemu z uporabo celičnih kultur in CAA analize, kjer smo ovrednotili znotrajcelično antioksidativno delovanje.

2.1 Raziskovalno vprašanje

Kakšen je antioksidativni potencial izbranih vzorcev hrane in pijače iz domače pridelave ali lokalne trgovine, merjen v *in vitro* pogojih z Briggs-Rauscherjevo reakcijo? Kakšen je pomen hidroksilnih skupin polifenolov pri antioksidativnem delovanju? Kolikšno je znotrajcelično antioksidativno delovanje izbrane polifenolne spojine, epigalokatehin 3-galata, na različnih celičnih modelih?

2.2 Hipoteze

Ničelna hipoteza: Vzorci hrane in pijač ne vsebujejo antioksidantov in nimajo antioksidativnega učinka na sistem Briggs-Rauscherjeve (BR) reakcije in CAA analizo.

1. Hipoteza: Stanisavljev in sod. (2011) in Cervellati in sod. (2001) poročajo o vlogi prostih radikalov v jodovih kemijskih oscilatorjih, medtem ko fenolni antioksidanti, predvsem flavonoidi¹, delujejo kot lovilci prostih radikalov. Na osnovi tega domnevamo, da antioksidanti v izbranih vzorcih hrane in pijače lovijo reaktivne kisikove spojine in povzročajo motnje v Briggs-Rauscherjevem sistemu.
2. Hipoteza: Polifenoli v vzorcih hrane in pijače imajo antioksidativno kapaciteto, zaradi česar sklepamo, da je razmerje med vsebnostjo fenolov, merjeno z Folin-Ciocalteujevimi reagentom, in inhibicijskim časom v BR sistemu linearno.
3. Hipoteza: Hidroksilne skupine so aktivna mesta na molekulah polifenolov v mehanizmi lovljenja prostih radikalov (Leopoldini in sod., 2004). Domnevamo, da imajo flavonoidi z večjim številom hidroksilnih skupin večjo antioksidativno kapaciteto.
4. Hipoteza: Izbrana polifenolna spojina epigalokatehin 3-galat ima znotrajcelično antioksidativno delovanje v različnih celičnih kulturah.

2.3 Spremenljivke

Odvisna spremenljivka v Briggs-Rauscherjevem sistemu je inhibicijski čas oscilacij. Različne spojine imajo različno antioksidativno kapaciteto in s tem različno sposobnost inhibicije dela mehanizma, v katerem sodelujejo prosti radikali. Odvisna spremenljivka pri CAA analizi pa je intenziteta fluorescenčne emisije.

Neodvisna spremenljivka v BR eksperimentu je vrsta sadja, zelenjave oz. pijače, katere ekstrakt je dodan v Briggs-Rauscherjev sistem oz. kvantitativna in kvalitativna vsebnost polifenolnih spojin v

¹ Flavonoidi so najbolj številčna skupina polifenolov, ki se deli na podskupine na osnovi kemijske strukture. Izraz "flavonoidi" je pogovorno pogosto rabljen za polifenolne spojine na splošno.

vzorcu. V CAA analizi je neodvisna spremenljivka koncentracija EGCG, ki vpliva na nivo znotrajceličnega oksidativnega stresa.

Kontrolni spremenljivki v eksperimentu sta temperatura reakcijskih raztopin pri $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ in hitrost mešanja oscilirajoče raztopine (900 vrtljajev na minuto), saj obe pomembno vplivata na hitrost oscilacij (Fujieda in Ogata, 1996). Pri CAA analizi smo kontrolirali temperaturo (37 °C), število celic v mikrokiveti na mikrotitrski ploščici, koncentracijo fluorescenčnega barvila za detekcijo reaktivnih kisikovih spojin in intenziteto laserske svetlobe pri fluorescenčni spektroskopiji.

3 Pregled literature

3.1 Kisikov paradoks

Kisik je nujno potreben za življenje aerobnih organizmov, vendar pa sodeluje tudi v toksičnih reakcijah. V teh reakcijah nastopajo kisikove reaktivne zvrsti (t.j. kisikovi prosti radikali) in prehodne kovine (železo, baker), ki poškodujejo celične membrane, beljakovine, lipide in nukleinske kisline. V zdravem organizmu so te reakcije nadzorovane z obrambnimi mehanizmi, v primeru njihove okvare ali pri pospešeni proizvodnji prostih kisikovih radikalov pa nastajajo oksidativne poškodbe, iz katerih nastanejo nekatera patološka stanja, denimo staranje, karcinogeneza, artritis, poškodbe tkiv pri ishemičnih poškodbah (akutni miokardni infarkt, možganska kap), pri metabolizmu kemoterapevtikov ter ksenobiotikov. Za normalno delovanje mora torej vsaka celica vzdrževati redoks homeostazo oz. ustrezno razmerje med reaktivnimi kisikovimi zvrstmi na eni ter antioksidanti na drugi strani (Brežan, 2003).

3.2 Reaktivne kisikove zvrsti oz. prosti radikali

Prosti radikal je vsak atom ali molekula, ki ima prost, nevezan elektron v eni ali več orbitalah. Prosti radikali so ponavadi rezultat homolitične cepitve molekul pod vplivom svetlobe, toplote ali pa nastajajo v redoks reakcijah. So visoko reaktivni atomi oz. molekule (Šket, 2001).

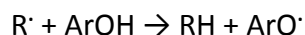
V osnovnem stanju je molekularni kisik v triplet obliki – je bi-radikal z neparjenima elektronoma v razvezni orbitali. Pod vplivom oksidativnega stresa pride do redukcije triplet kisika pod vplivom prehodnih kovin in nastanka približno 1500-krat bolj reaktivnega singlet stanja kisika – superoksid $O_2^{\cdot -}$ (Stopar, 2007). Tripletno in singletno obliko kisika s kemijskega vidika obravnavamo v poglavju Oksidativne poškodbe lipidov. Preostali visoko reaktivni obliki kisika sta še hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) in peroksidni radikal (ROO^{\cdot}). Vse te oblike kisika so lahko rezultat normalne celične presnove ali pa posledica dejavnikov okolja, kot so UV in gama žarčenje, toplotno sevanje, kajenje, onesnaženje okolja, itd. (Stanojevič, 2003). Reaktivne kisikove spojine ali radikali povzročajo različne poškodbe na nivoju celice. Presežek

radikalov lahko uniči vrsto različnih encimov (superoksid-dismutaza, katalaza in peroksidaza), kar vodi do oksidacije lipidov celičnih membran, celičnih beljakovin, DNA in encimov. Celično dihanje je s tem onemogočeno, čemur sledi apoptoza oz. destruktivnen učinek kisikovih reaktivnih zvrsti na delovanje celice (Šenk, 2006, po Antolovich in sod., 2002).

3.3 Antioksidanti

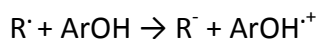
Naziv "antioksidant" se nanaša na vsako spojino, ki izpolnjuje naslednja pogoja. Prvič, že v minimalnih koncentracijah glede na substrat, ki se oksidira, mora upočasniti, prekiniti ali preprečiti avtooksidacijo substrata ali oksidacijo s pomočjo prostih radikalov. Drugič, nastali radikal mora biti stabilen, največkrat z vzpostavljanjem močnih vodikovih vezi (Rice-Evans in sod., 1995).

Predpostavljena sta dva glavna mehanizma antioksidativnega delovanja (Wright in sod., 2001). V prvem prosti radikal izloči vodik iz antioksidanta (ArOH) in sam postane radikal:



Omenjeni mehanizem se imenuje prenos vodikovega atoma. Večja, kot je stabilnost radikala ArO^{\cdot} , bolj učinkovit je antioksidant, stabilnejši radikali namreč težje zreagirajo s substratom in proces oksidacije se s tem prekine. Pogoste lastnosti stabilnih fenoksilnih radikalov so vodikove vezi, konjugacija in resonančnost.

V drugem mehanizmu (prenos elektrona) antioksidant odda elektron prostemu radikal in sam postane radikalni kation:



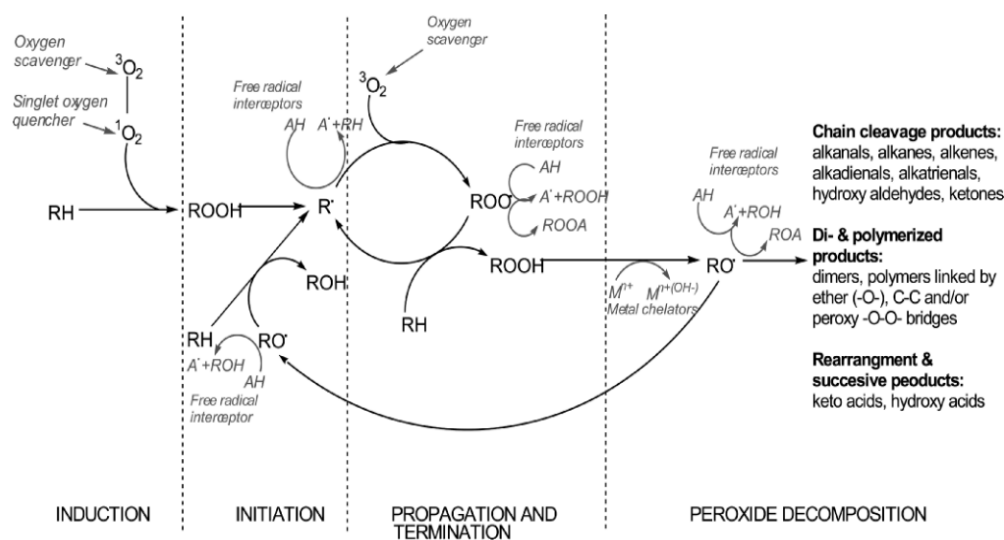
Tudi v tem primeru mora biti nastali radikalni kation stabilen, da ne zreagira z molekulami substrata (Leopoldini in sod., 2004 in Bertalančič, 2001).

3.3.1 Delitev antioksidantov

Obstaja več kriterijev razvrščanja antioksidantov. Na osnovi njihovega delovanja jih delimo na primarne antioksidante, ki posežejo direktno v mehanizem verižnih reakcij, in sekundarne antioksidante, ki preprečujejo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (Wanasundara in Shahidi, 2005). Druga delitev temelji na njihovi tvorbi. Endogeni antioksidanti se sintetizirajo znotraj celic, medtem ko eksogene antioksidante navadno zaužijemo s hrano.

3.3.1.1 Primarni antioksidanti

Primarni antioksidanti delujejo kot lovilci prostih radikalov v verižnih reakcijah. Inhibirajo lahko iniciacijo verižnih reakcij ali pa preprečujejo propagacijske reakcije v verižnem mehanizmu. Njihovo delovanje (v kombinaciji s sekundarnimi antioksidanti) je prikazano na primeru oksidacije lipidov na Shemi 1 (Wanasundara in Shahidi, 2005).



Shema 1: Vmešavanje primarnih in sekundarnih antioksidantov v mehanizem oksidacije lipidov (Wanasundara in Shahidi, 2005).

Primarni antioksidanti so na Shemi 1 prisotni kot »Free radical interceptor-ji« v fazi iniciacije in propagacije s terminacijo. Navadno delujejo po principu doniranja elektronov, pri čemer sami postajajo stabilni radikali. S kemijskega vidika je skupna lastnost teh spojin visoka privlačnost za peroksidne radikale. Primarni antioksidanti privlačijo peroksidne radikale

močnejše kot molekule lipidov in lahko zato delujejo antioksidativno (Wanasundara in Shahidi, 2005).

3.3.1.2 Sekundarni antioksidanti

V nasprotju s primarnimi, sekundarni antioksidanti ne pretvarjajo reaktivnih kisikovih zvrsti v stabilne molekule, temveč delujejo kot kelatorji (t.j. bi- ali poli-dentatni ligandi) za prooksidativne kovinske ione (glej »Peroxide decomposition« del Sheme 1) ali pa donirajo H atome že »uporabljenim« primarnim antioksidantom. Na ta način primarni antioksidanti zopet postanejo aktivni. Tako denimo delujejo EDTA, BHT, BHA, itd. (povzeto po Wanasundara in Shahidi, 2005).

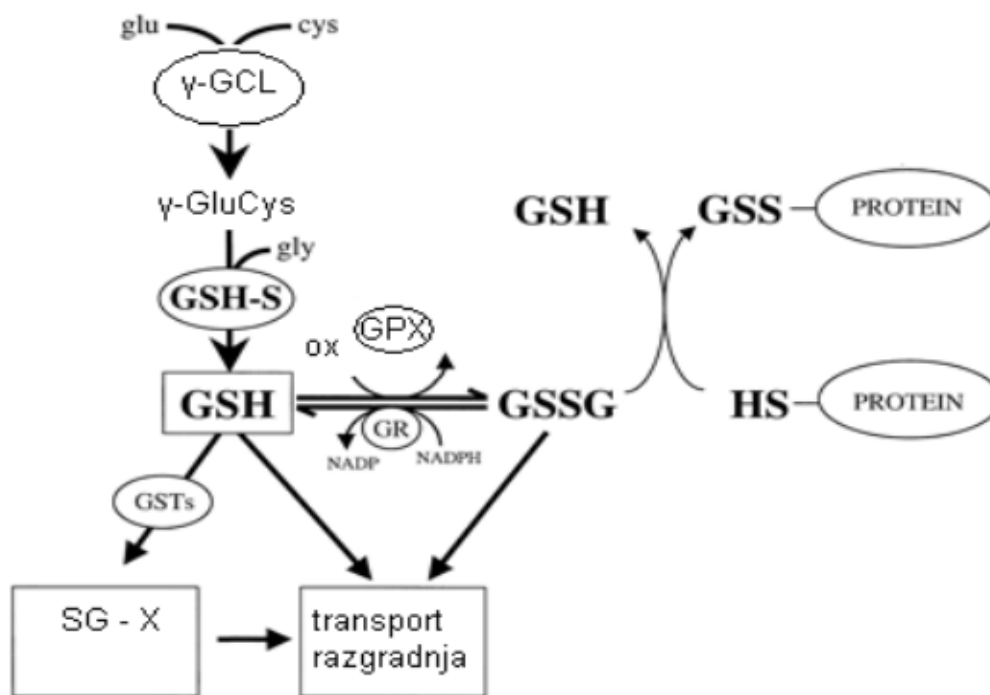
3.3.1.3 Endogeni antioksidanti

Sinteza reaktivnih kisikovih zvrsti poteka v celicah konstantno zaradi rabe kisika v celičnih presnovnih procesih. Da bi preprečilo oksidativne poškodbe, telo potrebuje konstanten vir antioksidantov in zato številni antioksidanti nastajajo endogeno, t.j. nastanejo v telesu. V nadaljevanju obravnavamo nekaj znanih endogenih antioksidantov.

3.3.1.3.1 Glutationski sistem

Tripeptid glutation (GSH) je eden najpomembnejših antioksidantov v človeškem telesu. Najvišja koncentracija glutationa se nahaja v jetrih ($\approx 5-10$ mM). V celici je večinoma prisoten v reducirani obliki (GSH > 98 %), preostali delež obsega oksidirano obliko (GSSG), konjugate in kompleksirano obliko. Njegova sinteza poteka v vsaki celici višjih evkariontov (Škulj, 2012).

Glavna encima, ki sodelujeta v glutationskem oksido-redoks sistemu, sta glutation peroksidaza (GPX) in glutation reduktaza (GSR). Encim glutation S-transferaza (GST) sodeluje v reakcijah konjugacije ksenobiotikov. Sinteza glutationa in njegove reakcije so prikazane na Shemi 2 (Škulj, 2012).



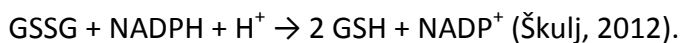
Shema 2: Sinteza glutationa in njegove reakcije (Škulj, 2012).

3.3.1.3.1.1 Glutation reduktaza (GSR)

Znani sta dve izomorfni obliki glutation reduktaze, mitohondrijska in citoplazemska. Glavna vloga GSR je vzdrževanje dovolj visoke celične koncentracije reducirane oblike glutationa (Uniprot, 2012). Reakcija redukcije oksidantov (kot je vodikov peroksid) poteka v prisotnosti glutation peroksidaze (GPX):

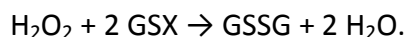


Pretvorbo oksidirane oblike glutationa (GSSG) nazaj v reducirano omogoča encim glutation reduktaza (GSR):



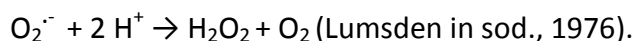
3.3.1.3.1.2 Glutation peroksidaza (GSX)

Glutation peroksidaza katalizira redukcijo vodikovega peroksida tako, da oksidira reducirano obliko glutationa (GSH). Pri tem nastaja glutation v oksidirani obliki, t.j. GSSG (Semenič, 2006):



3.3.1.3.1.3 Superoksid dismutaza (SOD)

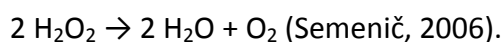
Encim superoksid dismutaza (SOD) katalizira pretvorbo superoksidnega aniona O_2^- v vodikov peroksid in kisik:



Superoksid dismutaza se pojavlja v mitohodnjijski, mangan vsebujoči obliki (MnSOD), in v citoplazemski, baker in cink vsebujoči obliki (Cu,ZnSOD) (Semenič, 2006).

3.3.1.3.2 Katalaza

Katalazo uvrščamo med oksidoreduktaze in naprej med peroksidaze, ki potrebujejo peroksid kot substrat. Katalaza vodikov peroksid pretvarja v vodo in kisik:



3.3.1.3.3 Tioredoksinški sistem

Tioredoksinški sistem sestavljata beljakovina tioredoksin in encim tioredoksin reduktaza. V aktivnem stanju tioredoksin deluje kot učinkovit reducent, ki stabilizira reaktivne kisikove zvrsti. Pri antioksidativnem delovanju se pretvori v oksidirano obliko, tioredoksin reduktaza pa ga z NADPH darovalcem elektronov v ciklu pretvori nazaj v aktivno reducirano obliko (Bouayed in Bohn, 2010).

3.3.1.3.4 Bilirubin (BLR)

Bilirubin (BLR), končni produkt razgradnje hema, je rumenooranžno barvilo. V nizkih koncentracijah deluje kot antioksidant, v visokih koncentracijah pa je potencialno nevrotoksičen. Več kot 80 % bilirubina nastane iz hema pri katabolizmu hemoglobina, ki se

sprosti iz razpadlih eritrocitov. Preostali BLR izvira iz mioglobina, katalaz, citokromov, peroksidaz in drugih hemoproteinov oz. iz neučinkovite eritropoeze (tj. zorenja eritrocitov) (Pečovnik, 2012).

Antioksidativno delovanje bilirubina je posledica njegovega učinkovitega pretvarjanja v biliverdin in nazaj v bilirubin. V vlogi antioksidanta se bilirubin najprej oksidira v biliverdin, NADPH-odvisna biliverdin reduktaza pa biliverdin ponovno pretvori v bilirubin. Znotrajcelično antioksidativno delovanje bilirubina je odvisno od njegove koncentracije. Bilirubin je močan endogeni antioksidant, saj doseže polovico maksimalnega antioksidativno učinka (EC_{50}) pri koncentraciji le 5 nM (povzeto po Žiberna in sod., 2009).

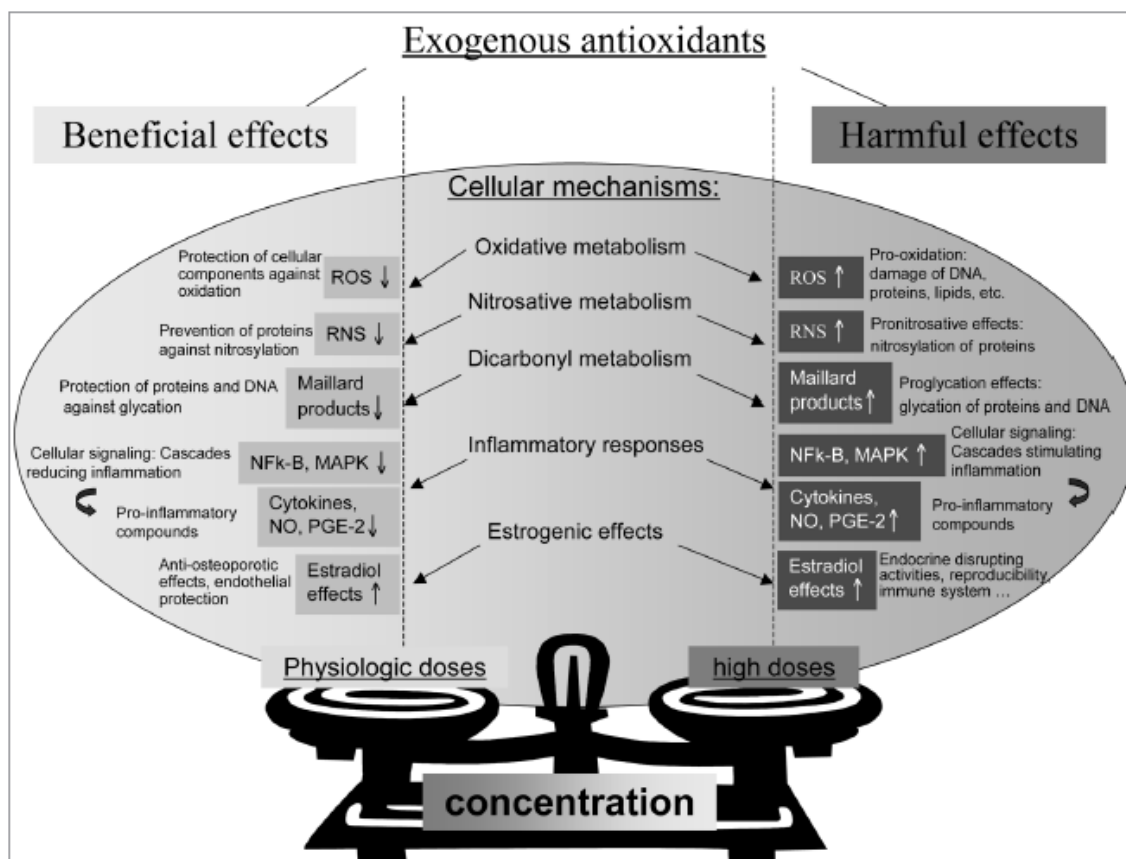
3.3.1.3.5 Alfa-lipoična kislina (ALA)

Alfa-lipoična kislina (ALA) je kofaktor mitohondrijskega kompleksa alfa ketoglutarat-dehidrogenaza (Yi in Maenda, 2005). V ciklu z reducirano obliko, tj. z dihidrolipoično kislino (DHLA) deluje ALA močno antioksidativno. Poleg lovljenja in stabilizacije prostih radikalov vpliva tudi na obnovo ostalih antioksidantov v telesu (vitamin C in E) (Wollin in Jones, 2003).

3.3.1.4 Eksogeni antioksidanti

Za vzdrževanje konstantnega razmerja med oksidanti in antioksidanti so poleg endogenih obrambnih mehanizmov oz. endogenih antioksidantov potrebni tudi eksogeni, torej tisti, ki jih zaužijemo s hrano.

Najpogostejši eksogeni antioksidanti so polifenoli (med njimi tudi katehin EGCG), vitamin C in E, karotenoidi ter cink in selen. Eksogeni antioksidanti na eni strani predstavljajo nujno dopolnilo endogenim obrambnim mehanizmom, na drugi strani pa lahko njihove visoke doze učinkujejo toksično (Bouayed in Bohn, 2010). Toksičnost visokih koncentracij je posledica prooksidativnega delovanja in lahko med drugim povzroča prooksidativne poškodbe DNA, beljakovin in maščob, vnetja in motnje v delovanju endokrinega in imunskega sistema. Mehanizmi zaščitnega delovanja nizkih koncentracij in škodljivih učinkov visokih koncentracij eksogenih antioksidantov so predstavljeni na spodnji Shemi 3 (Bouayed in Bohn, 2010)



Shema 3: Zaščitno delovanje nizkih koncentracij in škodljivi učinki visokih koncentracij eksogenih antioksidantov (Bouayed in Bohn, 2010).

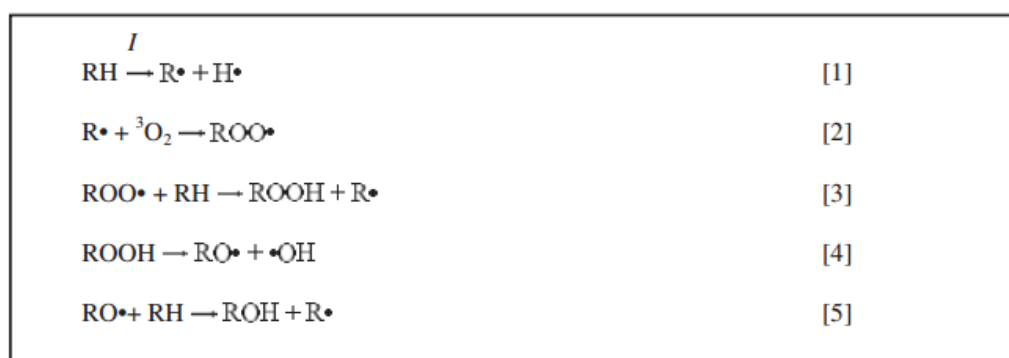
3.4 Oksidativne poškodbe lipidov

Poleg poškodb dednega materiala je glavna tarča reaktivnih kisikovih zvrsti tudi fosfolipidni dvosloj, ki obdaja tako celične organele kot tudi citoplazmo. Peroksidacija lipidov je oksidativna poškodba lipidov, pri kateri v primeru fosfolipidov reaktivne kisikove zvrsti zmanjšujejo propustnost in tekočnost celične membrane, kar vodi v celični propad (Barrera, 2012).

Oksidacija celičnih fosfolipidov je sestavni del presnove. Najbolj izpostavljene oksidaciji so nenasičene maščobne kisline, ki imajo dvojne vezi. Prosti kisikovi radikali nastajajo med oksidacijo, celični antioksidanti pa nastale radikale stabilizirajo in tako preprečujejo oksidativne poškodbe (Wanasundara in Shahidi, 2005).

Poglejmo si hipotetični scenarij oksidacije lipidov, torej tudi celičnih fosfolipidov. Oksidativna razgradnja poteče kot verižna reakcija, ki sestoji iz začetka oz. iniciacije, propagacije in

terminacije. Z iniciacijo se iz molekul substrata začnejo tvoriti prosti radikali. Molekula maščobe najprej izgubi H atom, pri čemer nastane t.i. maščobni oz. arilni radikal (R[•]) (Shema 4, reakcija 1). Ta naprej reagira s kisikom iz atmosfere in nastane peroksi radikal (ROO[•]) (Shema 4, reakcija 2). V reakcijah propagacije peroksi radikal reagira z naslednjo molekulo maščobe oz. maščobne kisline, pri čemer se tvorita molekula hidroperoksida in nov arilni radikal (Shema 4, reakcija 3). Količina arilnih radikalov se torej povečuje, z njo pa vključevanje atmosferskega kisika in hitrost reakcije. Opisano zaporedje reakcij tvori avtokataliziran, ciklično mehanizem oksidacije, ki je prikazan na Shemi 4 (povzeto po Wanasundara in Shahidi, 2005).

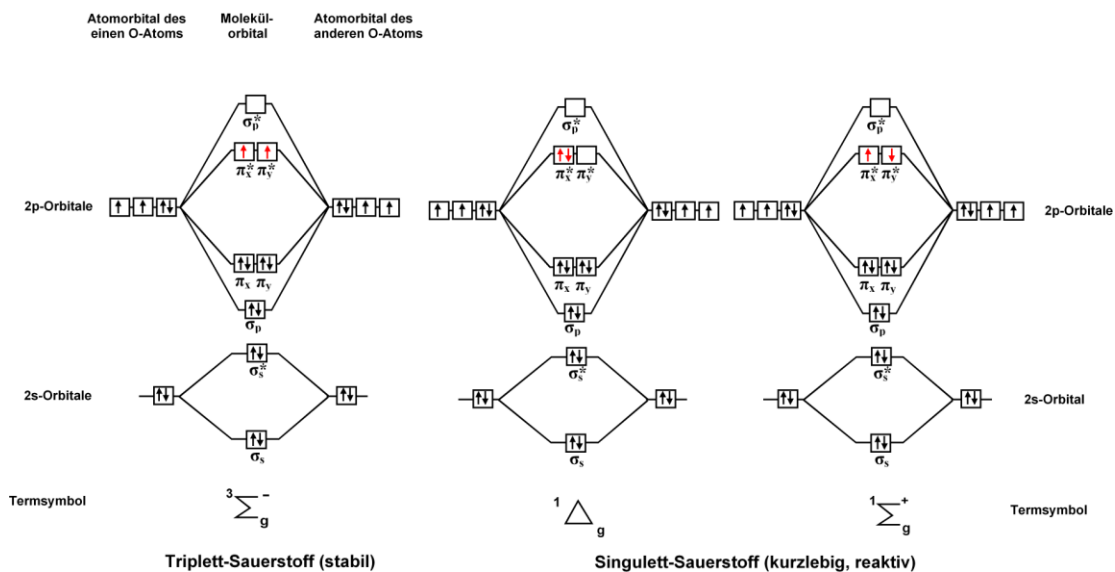


Shema 4: Predpostavljen mehanizem avtooksidacije nenasičenih maščobnih kislin (Wanasundara in Shahidi, 2005)

Slaba stabilnost hidroperoksidov lahko privede do njihove samostojne razgradnje, in sicer razpadejo na proste radikale, le-ti pa dodatno pospešijo propagacijske procese (Shema 4, reakciji 5 in 6). Verižna reakcija se nadaljuje, do terminacije pa pride le ob naključnem trku dveh prostih radikalov (Wanasundara in Shahidi, 2005).

Začetek oz. iniciacijo verižne reakcije prostih radikalov lahko povzročijo številni dejavniki, npr. atomi prehodnih kovin ali njihovi kompleksi. Atmosferski kisik se nahaja v stabilnem »triplet« stanju (spina elektronov v orbitalah z najvišjo energijo sta vzporedna), medtem ko je večina organskih molekul v stanju »singlet-a« (spina elektronov v orbitalah z najvišjo energijo sta nasprotna) (Winston, 2008). Shema molekularnih orbital, ki prikazuje orientacijo spinov v »singlet« in »triplet« kisiku, je prikazana spodaj (Shema 5). Razlika v spinih atmosferskemu kisiku preprečuje direktno oksidacijo organskih molekul. Atomi prehodnih kovin oz. njihovi kompleksi lahko v bioloških sistemih iniciirajo verižne reakcije, s svojimi kemijskimi lastnostmi namreč omogočajo prehod med triplet in singlet stanjem kisika

(povzeto po Winston, 2008). Ena bolj znanih, a še ne povsem mehanistično raziskanih, inicirajočih reakcij je Fentonova reakcija, v kateri sodeluje železo (Lloyd in sod., 1997).



Schema 5: Diagrami molekularnih orbital kisika v triplet stanju (levo) in dveh možnih singlet stanjih (v sredini in desno) (Wikipedia, 2013).

3.5 Oscilirajoče kemijske reakcije

Oscilirajoče kemijske reakcije spadajo med zahtevne in zanimive kemijske eksperimente. V nekaterih izmed njih reakcijska zmes prehaja med različnimi oksidacijskimi stanji glavnih elementov, ki v kombinaciji s primernimi barvili tvorijo različne barve reakcijskih raztopin. Ker sistem niha oz. oscilira med različnimi oksidacijskimi stanji, se tudi barva reakcijske raztopine ciklično spreminja. Druge oscilirajoče reakcije sestojijo iz mehanizmov, v katerih se ciklično izmenjujejo endotermne in burne, tj. močno eksotermne reakcije, kar lahko spremljajo tudi izbruhi pene ali drugi pojavi. To vrsto oscilirajočih reakcij je najlažje spremljati s spremljanjem temperature v reakcijski zmesi, ki ciklično pada in raste dokler se vsa pogonska energija ne porabi in sistem obstane v stanju z nižjo energijo (Shakashiri, 1985).

Osnovni pogoj za nihanje oz. oscilacije nekaterih kemijskih procesov je njihova spontanost oz. oddajanje proste Gibbsove energije, poleg tega pa morajo oscilirajoče reakcije zadovoljevati še nekatere druge termodinamične pogoje (Shakashiri, 1985):

1. Reakcija mora biti daleč od ravnotežja.

Oscilacije v kemijskih reakcijah so pogosto ponazorjene s prisposobo nitnega nihala, ki niha iz ene skrajne lege v drugo. Med nitnim nihalom in kemijskimi oscilacijami pa obstaja pomembna razlika, in sicer nitno nihalo niha skozi ravnotežno lego, oscilirajoče kemijske reakcije pa ravnotežje dosežejo šele, ko se oscilacijski režim prekine. V skladu z 2. zakonom termodinamike (Kotz in sod., 2012) se kemijska reakcija namreč ne more spontano odmakniti od ravnotežnega položaja potem, ko ga enkrat že doseže. In kakor nitno nihalo niha zaradi pretvarjanja kinetične in potencialne energije, tako so kemijske oscilacije gnane z osrednjim eksotermnim procesom, ki dovaja energijo za ostale korake v reakcijskem mehanizmu.

2. Mehanizem reakcije mora vsebovati procese avtokatalize.

Pojav avtokatalize je definiran kot kataliza reakcije, ki jo povzročijo njeni produkti. Večja koncentracija produktov torej pomeni hitrejšo reakcijo oz. naraščanje hitrosti je eksponentno.

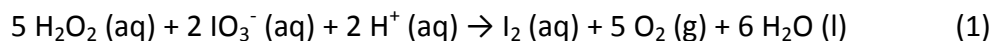
3. Sistem mora vsebovati dve stabilni stanji – biti bistabilen.

Če je v reakciji z dvema vmesnima produktoma X in Y koncentracija Y visoka in če dodamo X, se bo koncentracija intermediata Y začela zmanjševati. Obratno, če je visoka koncentracija X in dodamo Y, bo X začel padati, Y pa bo zaradi dodatka narastel. V primeru dodajanja kateregakoli intermediata bomo v nekem stanju dosegli koncentracijo, ko bo sistem preskočil iz enega stabilnega stanja v drugega (iz X v Y ali obratno). S proučevanjem koncentracijskih območij intermediatov in konstant hitrosti je mogoče predvideti oscilacije v bistabilnem kemijskem sistemu (Atkins, 2001).

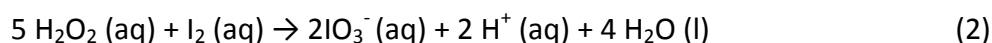
3.5.1 Oscilirajoča jodova ura – Briggs-Rauscherjeva reakcija

Briggs-Rauscherjevo reakcijo, eno vizualno najbolj impresivnih kemijskih oscilacij, sta razvila Thomas S. Briggs in Warren C. Rauscher na Galileo High School v San Franciscu (Briggs in Rauscher, 1973). Mešanica treh spojin v reakciji prehaja skozi 15 ali več ciklov brezbarvne, jantarne in modro-črne barve ter se zaključi kot modro-črna raztopina z izrazitim vonjem po jodu.

Briggs-Rauscherjeva (BR) reakcija je hibrid dveh drugih oscilirajočih reakcij: Bray-Liebhafskijeve (BL) reakcije and Belusov-Zhabotinskijeve (BZ) reakcije. Pred iznajdbo BL reakcije je Bray proučeval dvojno vlogo vodikovega peroksida, natančneje njegovo vlogo oksidanta in reducenta v kemijski mešanici H_2O_2 , KIO_3 in H_2SO_4 (Shakashiri, 1985). V njej vodikov peroksid reducira jodat v jod in se oksidira v kisik:



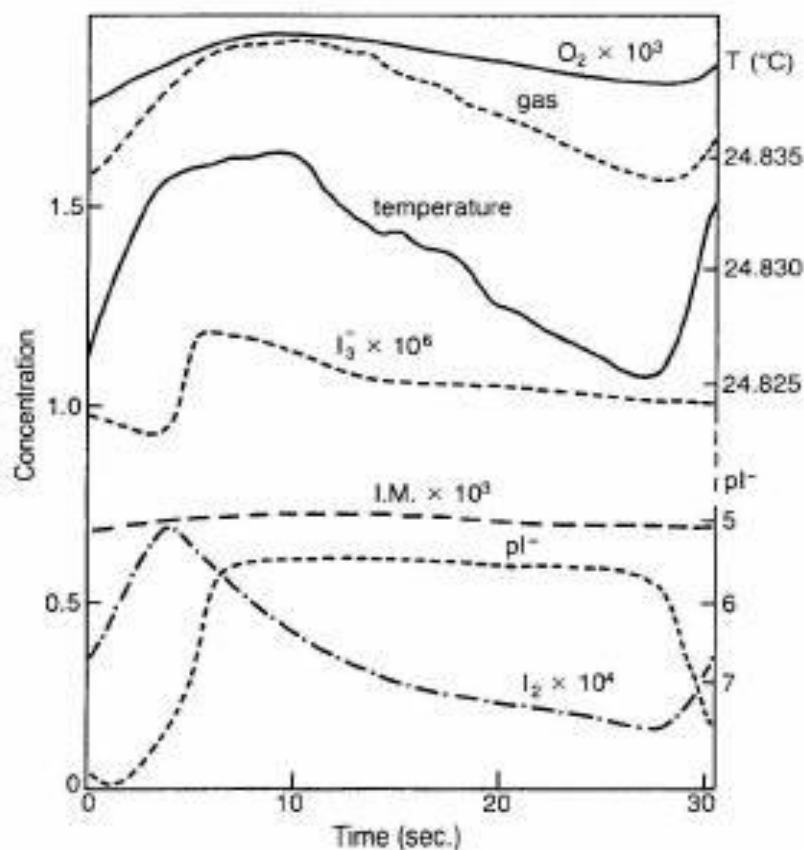
Redukcija joda v jodat:



Neto rezultat reakcij (1) in (2) je jodat-katalizirana disproporcionacija vodikovega peroksida:



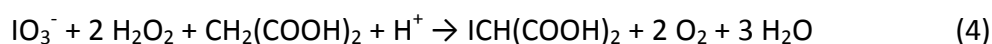
Briggs and Rauscher sta združila delovanje vodikovega peroksida in jodata iz BL reakcije z malonsko kislino in $\text{Mn}(\text{II})$ ioni iz BZ reakcije in tako demonstrirala BR reakcijo, v kateri niha sproščanje kisika in ogljikovega dioksida ter koncentracija joda in jodidnih ionov. Nihanje koncentracij je predstavljeno na spodnji Shemi 6 (Shakashiri, 1985).



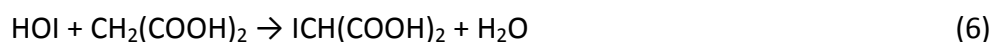
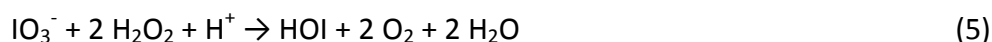
Shema 6: Nihanje koncentracije O_2 , I_3^- , jodomalonske kisline ter temperature v procesu ene oscilacije Briggs-Rauscherjeve reakcije (Shakashiri, 1985).

Ob nizki koncentraciji jodidnih ionov, molekularni jod hitro nastaja in njegova prisotnost prvotno brezbarvno raztopino spremeni v jantarno. S povečano koncentracijo joda se pospeši produkcija jodidnih ionov, med drugim tudi trijodidnih (I_3^-), ki skupaj z molekularnim jodom in škrobom tvorijo modročrn kompleks pentajodidnih ionov. Večina kisika in ogljikovega dioksida nastane med tvorbo I_2 . Koncentracija I_2 doseže vrh in začne padati, čeprav se koncentracija jodidnih ionov povečuje še naprej in ostane relativno visoka glede na molekularni jod, katerega koncentracija po dosegu vrha vztrajno upada. Ta cikel oscilacij se nekajkrat ponovi, na koncu pa raztopina obdrži modročrno barvo in sprošča jodove pare (Shakashiri, 1985).

Sprememba, ki povzorči osciliranje Briggs-Rauscherjeve reakcije je predstavljena v enačbi 4 (Muntean in sod., 2012, I):



Reakcija v enačbi 4 je podrobneje razdeljena na dva dela, predstavljena z enačbama 5 in 6:



Reakcija št. 5 lahko poteče preko dveh različnih mehanizmov: i) radikalski ali ii) običajni (neradikalski) mehanizem. Vrsta prevladujočega mehanizma je odvisna od koncentracije jodidnih ionov v raztopini. Ko je koncentracija jodidnih ionov nizka, prevladuje radikalski (i) mehanizem, ko je $[I^-]$ visoka pa neradikalski (Furrow in sod., 2010). Reakcija 6 ima vlogo povezovanja obeh mehanizmov, in sicer tako, da porablja HIO počasneje kot je ta ustvarjen z neradikalskim (ii) mehanizmom. Molekule HIO, ki ne reagirajo po enačbi št. 6, se s pomočjo vodikovega peroksida reducirajo v jodidni ion. Ko torej HIO z radikalskim mehanizmom nastaja v prebitku, se sproti pretvarja v jodidne ione, ti pa ustavijo radikalski in sprožijo neradikalski(ii) mehanizem. Enačba 6 nato porabi HIO tako hitro, da iz HIO je morejo več nastajati I^- ioni, kar ponovno vklopi radikalski (i) proces. Proces v enačbah 5 in 6 pripomoreta drug k zagonu drugega, tako da BR reakcija med obema procesoma (Shakashiri, 1985).

Za natančnejšo razlago moramo radikalskemu (i) in neradikalskemu (ii) procesu posvetiti nekaj več pozornosti. V kolikor reakcijski sistem vsebuje zadostno koncentracijo jodidnih

ionov, se reakcija usmeri na neradikalški mehanizem (ii). V njem jodidni ioni počasi reagirajo z jodatnimi ioni, kar predstavlja enačba 7:



Ustvarjena jodasta kislina (HIO_2) se naprej reducira v hipojodovo kislino HIO , ki tako ostane edini produkt reakcij 7 in 8. Redukcijo jodaste kisline predstavlja reakcija št. 8:

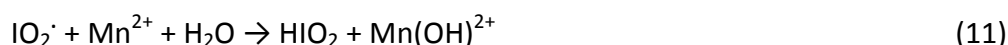


Vodikov peroksid nato reducira hipojodovo kislino v reakciji št. 9:



Neto sprememba, ki jo predstavlja enačba 5, je tako dobljena s stehiometričnim seštevkom: (enačba 7) + (enačba 8) + 2 (enačba 9). Ker je v primeru nizke koncentracije joda reakcija 5 počasnejša od reakcije 6, reakcija 9 ne more proizvesti zadostne količine I^- in zato začne koncentracija jodidnih ionov upadati (Shakashiri, 1985 in Stanisavljev in sod. 2011 (2)).

Ko koncentracija jodida v sistemu pade, se vklopi radikalški (i) mehanizem reakcije 5. Sestavljen je iz petih reakcij, ki si sledijo od reakcije 10 do reakcije 14:

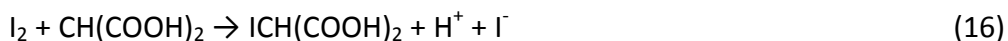


Navedenih pet enačb (10-14) se v sistemu pojavi v stehiometričnem razmerju 2 (enačba 10) + 4 (enačba 11) + 4 (enačba 12) + 2 (enačba 13) + (enačba 14) in skupaj tvorijo enačbo št. 5. Pomembna lastnost korakov 10-14 je ta, da sta enačbi 10 in 11 avtokatalitični, ustvarita namreč 2 HIO na 1 porabljeno HIO . Posledično se hitrost teh korakov z njihovim obratovanjem povečuje in povzroči hitro rast koncentracije HIO , ki nastaja z disproporcijacijo jodaste kisline v enačbi 14. Kljub temu pa omenjen proces ne porabi vsega jodata naenkrat, zadnji korak je namreč katalitska reakcija drugega reda in s tem

zaporedje reakcij doseže ustaljen ritem. Vloga mangana v procesih 11 in 12 je katalitska – v enačbi 11 se oksidira, v 12 pa reducira (Shakashiri, 1985 in Cervelati in sod., 2010).

V radikalskem (i) mehanizmu nastala hipojodova kislina reagira z malonsko kislino v enačbi št. 6, a radikalsko nastajanje HIO je hitrejše od porabe HIO v reakciji 6 in prebitni HIO reagira z vodikovim peroksidom do jodidnih ionov, kar je predstavljeno v enačbi 9. Povišana koncentracija jodida sedaj ustavi radikalski (i) mehanizem in preklopi nazaj na neradikalskega (ii) iz reakcije 7.

Dramatični barvni učinki BR reakcije so posledica reakcije 6, katere mehanizem je predstavljen z reakcijama 15 in 16:



Reakcijska zmes dobi jantarno barvo zaradi molekularnega joda, ki nastaja v procesu 15 takrat, ko radikalski (i) mehanizem vzdržuje koncentracijo hipojodaste kisline višje od koncentracije jodida. Prebitna hipojodasta kislina je nato z enačbo 9 pretvorjena v jodid, ki ob interakciji z molekularnim škrobom povzroči črnomodro barvo raztopine (kompleks s škrobom). Ob visoki koncentraciji jodida reakcija 5 preklopi na počasni neradikalski (ii) mehanizem, ki jodid porablja hitreje kot se ta tvori in zato črnomodra barva zbledi. Ko sistem preklopi nazaj na radikalski (i) mehanizem, se celoten cikel ene oscilacije ponovi (povzeto po Shakashiri, 1985 in Field in Schneider, 1989).

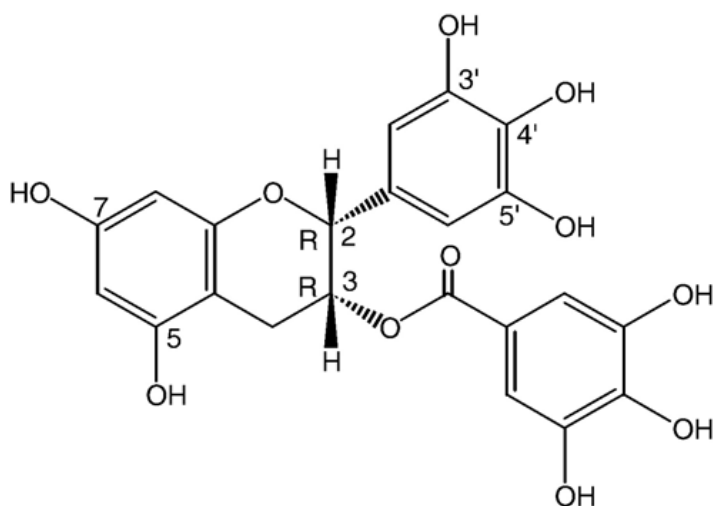
3.1 Določanje celokupne vsebnosti fenolov (TPC) s Folin-Ciocalteuevim fenolnim reagentom

Kvantitativno določanje celokupne vsebnosti fenolov (TPC angl. total phenolic content) s Folin-Ciocalteuevim (FC) reagentom temelji na fenolni redukciji FC reagenta (mešanice tungstenovih in molibdenovih oksidov) (Bornšek Može, 2012). Produkti redukcije so modre barve z maksimalno absorpcijo odvisno od kvalitativne in kvantitativne vsebnosti fenolnih spojin v vzorcu, na absorpcijo pa pomembno vpliva tudi pH raztopin, ki je ponavadi kontroliran z dodatkom Na_2CO_3 (Cicco in sod., 2009 in Singleton in Rossi, 1965).

Kljub rutinski in razširjeni rabi metode obstajajo številne variacije v postopku, ki se največkrat razlikujejo v začetni in končni koncentraciji natrijevega karbonata in zaporedja ter časovnih intervalov dodajanja reagentov. Prav tako se v različnih izvedbah pogosto razlikujeta valovna dolžina za določanje absorpcije (navadno v območju v območju 700-760 nm) in končni volumen (Cicco in sod., 2009).

3.2 Epigalokatehin – 3-galat (EGCG)

Na Shemi 7 je prikazana struktura spojine (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG, ki je glavni flavonoid med polifenolnimi spojinami zelenega čaja. Zeleni čaj vsebuje tudi druge polifenolne spojine, kot so (-)-epikatehin-3-galat, (-)-epigalokatehin, (-)-epikatehin in (+)-katehin. EGCG predstavlja več kot 50 % celokupne mase katehinov v zelenem čaju, mnoge raziskave pa potrjujejo njegovo pomembno zaščitno delovanje proti številnim bolezenskim stanjem (Nagle in sod., 2006).



Shema 7: Struktura (-)-epigalokatehin-3-galata (Toimil in Orallo, 2007).

EGCG vpliva na izražanje C-reaktivnega proteina (CRP) v živalskih eksperimentalnih modelih ateroskleroze. Pojav ateroskleroze spremlja kompleksen mehanizem, v katerem imajo pomembno vlogo prosti radikali. Povišan nivo vnetnega parametra CRP kaže na prisotnost oziroma napredovanje ateroskleroze. Intravenozno dodajanje EGCG podganam z

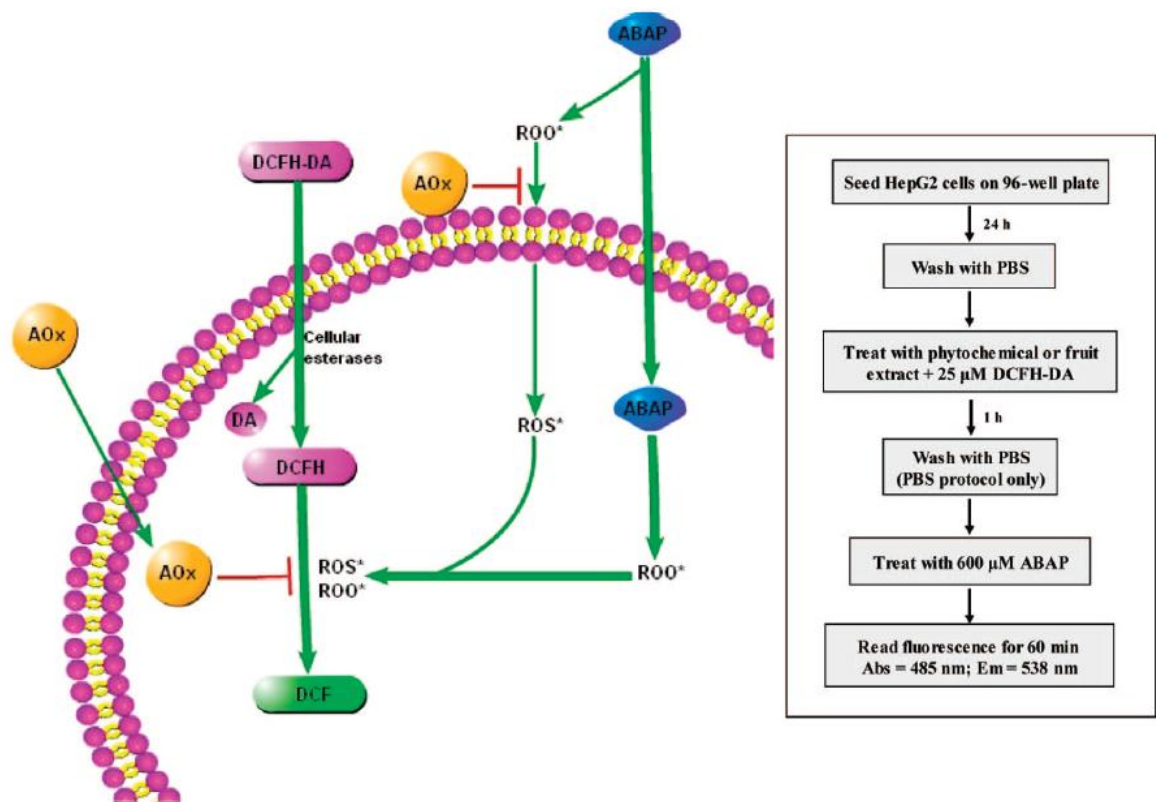
napredovano obliko ateroskleroze je zmanjšalo koncentracijo serumske CRP in ustavilo napredovanje ateroskleroze, kar so pripisali antioksidativnemu delovanju EGCG (Ramesh, 2010).

EGCG deluje tudi proti rakavim obolenjem (Spinella in sod., 2012). Na celičnih linijah ovarijskega karcinoma je EGCG inhibiral delovanje endotelinskega A receptorja, katerega povečana aktivnost vodi k nastanku ovarijskih tumorjev. Preko aktivacije kompleksa kaspaz lahko vzpodbudi tudi začetek apoptoze rakavih celic. Protirakavo oz. kemopreventivno delovanje so prav tako potrdili na modelu kožnega karcinoma (Katiyar in sod., 2000).

Uporabnost EGCG v medicinske namene so poleg že omenjenih raziskav potrdile tudi številne druge epidemiološke študije (Wang s sod., 2011 in Wolfram, 2007). Ključnega pomena za kemopreventivno delovanje je njegova biološka uporabnost in prehod čez epitelij tankega črevesja, saj EGCG tako po zaužitju zelenega čaja vstopi v krvni obtok. V primeru nizke absorpcije in biološke uporabnosti bi njegovi učinki bili možni le z intravenozno aplikacijo.

3.3 CAA analiza

CAA analiza oz. angl. »cellular antioxidant activity assay« je metoda za testiranje antioksidativnega potenciala na celičnih linijah. Primer eksperimentalnega protokola je shematično prikazan na primeru celične kulture HepG2 (jetrni karcinom) na spodnji Shemi 8.

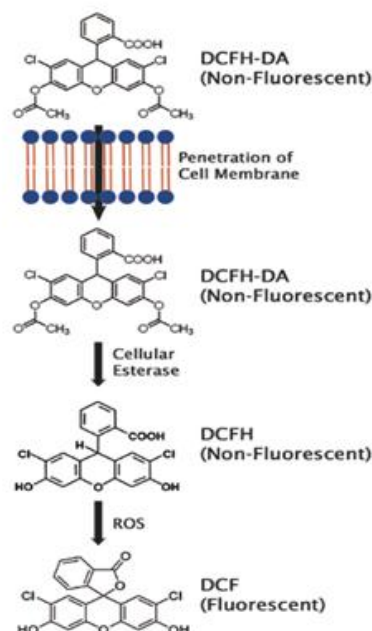


Shema 8: Protokol CAA analize na primeru HepG2 celične culture (Wolfe in Liu, 2007).

Celice v celični kulturi najprej speremo s fosfatnim pufrom (PBS – phosphate saline buffer) in jih inkubiramo v celičnem mediju s preučevanim antioksidantom (AOx na Shemi 8) in 2,7-diklorofluorescin diacetatom (DCFH-DA), ki služi kot znotrajcelična proba za reaktivne kisikove zvrsti. Med inkubacijo pri 37 °C obe molekuli prehajata skozi celično membrano, pri čemer esterase na celični membrani cepijo estrske vezi v molekuli DCFH-DA in tvorijo bolj polarni DCFH, ki ostane ujet v citoplazmi. Oksidativni stres oz. reaktivne kisikove zvrsti oksidirajo DCFH v flourescenčni DCF, kot je prikazano na Shemi 9.

Po inkubaciji z antioksidantom in DCFH-DA celične kulture temeljito spreremo s PBS, tako da odstranimo molekule antioksidanta na celični membrani in molekule DCFH-DA, ki so ostale zunaj celic. Sledi dodajanje raztopine 2,2-azobis-2-amidinopropandihidroksiklorida (ABAP), ki preide v

Shema 9: Procesiranje DCFH-DA v DCFH in naprej v DCF (Cell Biolabs, 2012).



citoplazmo celic in deluje kot tvorec oksidativnega stresa, natančneje hidroksilnih radikalov. V prisotnosti oksidativnega stresa se molekula DCFH pretvori v fluorescenčni DCF, katerega signal uporabljamo za določanje antioksidativne sposobnosti testirane molekule. Močnejši antioksidant stabilizira več prostih radikalov, ki jih ustvari ABAP, in posledično se tvori manj DCF, kar na fluorescenčni spektroskopiji zaznamo kot šibkejši signal. V naših raziskavah smo s CAA analizo testirali antioksidativno sposobnost EGCG na celicah človeškega nevroblastoma, jetrnega karcinoma in žilnega endotelija. Da bi preverili potencialno prooksidativno delovanje celic, smo naredili tudi poskuse brez tvorca kisikovih radikalov (ABAP). Natančen protokol CAA analize je opisan v poglavju Metode in materiali.

4 Metode in materiali

V raziskovalni nalogi smo določevali *in vitro* antioksidativne aktivnosti izbranih hranil s pomočjo Briggs-Rauscherjeve reakcije, Folin-Ciocalteaujevega reagenta in CAA analize.

Testirali smo inhibicijski efekt hranil z vsebnostjo antioksidantov na radikalski del mehanizma Briggs-Rauscherjeve reakcije. V ta namen smo po B verziji opisa metode (Shakashiri, 1985) pripravili tri raztopine, katerih mešanje v primernih volumenskih razmerjih privede do osciliranja reakcijske raztopine. V drugi črno-modri fazi smo v reakcijsko raztopino dodali pripravljen vzorec posameznega hranila in s pomočjo svetlobnega senzorja spremljali inhibicijo oscilacij. Celokupno antioksidativno kapaciteto (TAC) smo izrazili kot čas inhibicije BR sistema v odvisnosti od hranila.

Da bi preverili korelacijo med celokupno antioksidativno kapaciteto (TAC) in celokupno vsebnostjo polifenolov (TPC), smo z vzorci hranil izvedli še testiranje s Folin-Ciocalteau-jevim (FC) reagentom, ki s spektrofotometrično analizo odraža celokupno vsebnost polifenolov (TPC), in rezultate podali v ekvivalentih galne kisline na gram hranila (GAE/FW).

Z BR reakcijo in FC reagentom smo za vzorca nektarina in zeleno jabolko izmerili enake rezultate. Če se ujemata njuna TAC in TPC, smo preverili ali se ujema tudi število aktivnih mest, t.j. hidroksilnih skupin na polifenolih, ki imenjena vzorca sestavljajo. Čiste polifenolne spojine in njihova masna razmerja smo pridobili iz podatkovne base Poyphenol explorer (Neveu in sod. 2010). Prešteli smo število hidroksilnih skupin na vsakem izmed polifenolov v omenjenih vzorcih, število pa nato prilagodili na masno razmerje polifenolov v vzorcih. Število hidroksilnih skupin v obeh vzorcih smo nato primerjali in sklepali o vlogi hidroksilnih skupin na antioksidativno aktivnost polifenolov.

Za testiranje antioksidativne aktivnosti EGCG s CAA analizo smo najprej pripravili standardno 0,01 molarno raztopino EGCG, ki smo jo z redčenjem v primernem razmerju uporabili na vseh šestih mikrotitrskih ploščicah. Po 24 urah od sajenja celic smo rastni medij odstranili z aspiracijo ter na mikrotitrsko ploščo nanесли raztopine DCFH-DA in EGCG (glej shemo 4). Po polurni inkubaciji pri 37 °C smo celice temeljito sprali s PBS pufrom, jim po protokolu dodali

ABAP v HBBS mediju ter ploščico vstavili v čitalec mikrotitrskih plošč. Natančnejši protokol in sestava raztopin sta predstavljena pod naslovom Merjenje znotrajceličnega antioksidativnega delovanja EGCG s CAA analizo.

4.1 Merjenje celokupne antioksidativne kapacitete (TAC) z Briggs-Rauscherjevo reakcijo

4.1.1 Priprava vzorcev antioksidantov

Za pripravo vzorcev antioksidantov smo na domačem vrtu in v lokalni trgovini pridobili vzorce naslednjih živil: črno grozdje, belo grozdje, kivi, nektarina, zeleno jabolko, hruška, češnja, česen, korenček, rdeča paprika, brusnična marmelada s 50% sadnim deležem, domača jagodna in češpljeva marmelada, drobnjak, malina, marelica, kava espresso, zeleni čaj, rabarbara in borovnica, torej skupno 20 živil.

Vsak izmed vzorcev je bil pripravljen po naslednjem protokolu: manjšo količino vzorca smo obdelali v terilnici in celične sokove iztisnili iz celic. Nato smo 2 g produkta iz terilnice razredčili v 100 mL destilirane vode, dobro premešali, vzorec prefiltrirali ter ga v neprodušno zaprti epruveti hranili v hladilniku. Koncentracije vzorcev smo predhodno optimizirali v Briggs-Rauscherjevem sistemu in prišli do ugotovitve, da 1 g živila na 100 mL destilirane vode ne poruši ravnotežij v BR sistemu in daje ustrezen rezultat, ki ga lahko uporabimo za interpretacijo. Vzorci so bili hranjeni v hladilniku pri $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ in uporabljeni za končno merjenje takoj naslednji dan po pripravi.

4.1.2 Priprava raztopin za zagon Briggs-Rauscherjeve reakcije

Spodnje raztopine smo pripravili po B protokolu Shakashirija (1985).

- 1. raztopina:** z redčenjem smo iz koncentriranega 30% vodikovega peroksida pripravili 1 L 3% raztopine vodikovega peroksida.

2. **raztopina:** 29 g kalijevega jodata smo dodali 400 mL destilirane vode in 8,6 mL 6 M H_2SO_4 . Raztopino smo nato razredčili do 500 mL in z mešanjem na magnetnem mešalniku raztopili dodani kalijev jodat.
3. **raztopina:** 10,4 g malonske kisline in 2,2 g manganovega (II) sulfata monohidrata smo raztopili v 400 mL destilirane vode. V ločeni čaši smo zavreli 50 mL destilirane vode ter ji dodali raztopino škroba, pripravljeno iz 0,2 gramov topnega škroba v 5 mL destilirane vode. Prekuhano raztopino škroba smo nato prelili v prvotno čašo z malonsko kislino ter manganovim (II) sulfatom in raztopino razredčili do 500 mL.

4.1.3 Priprava merilnega aparata

Da bi izmerili čas oscilacij v Briggs-Rauscherjevem sistemu in inhibicije, ki nastanejo ob dodatku antioksidanta, smo uporabili svetlobni senzor, čeprav je procedura pa Carvelattiju in sod., (2001) prirejena za spremljanje oscilacij s pomočjo jodidne ionoselektivne elektrode ali platinove elektrode. Za modifikacijo smo se odločili, ker v šolskem laboratoriju nimamo na voljo primernih elektrod, namesto z njimi pa lahko nihanje koncentracije jodidnih, jodatnih ionov in joda spremljamo posredno, saj nihanje koncentracij omenjenih snovi spreminja barvo škrobove raztopine. Zaradi različnih barv je oscilacije mogoče spremljati tudi z merjenjem svetlobnega toka, črna barva namreč absorbira več svetlobe kakor jantarna, ta pa več ko bela in posledično se količina svetlobe, ki doseže svetlobni senzor, spreminja. To upravičuje uporabo luksmetra namesto elektrod v poskusih Cervelattija in sod. (2001).

Za pripravo merilne aparature smo uporabili 150 mL časo, ki smo jo od strani izolirali s temno penasto izolacijo, da bi zmanjšali motnje na svetlobnem senzorju zaradi našega gibanja ob čaši. Na eni strani čaše smo v izolacijo naredili luknjo premera 1 cm, v katero smo usmerili LED diodo, na nasprotni strani pa smo v prav takšno luknjo namestili luksmeter Vernier Light Sensor z merilnim območjem 0-600 lux, katerega napaka znaša $\pm 0,2$ lux (Vernier, 2012). Vseskozi merjenje oscilacij in njenih inhibicij smo s krajšim hlajenjem v hladilniku ali kratkimi izpostavitvami soncu vzdrževali konstantne temperature vseh treh pripravljenih raztopin znotraj območja $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, saj temperatura, poleg koncentracije malonske kisline in frekvence mešanja, signifikantno vpliva na oscilacije (Fujieda in Oghata, 1996). Frekvenca magnetnega mešala je bila vseskozi meritve nastavljena na 900 vrtljajev na minuto.

Z vsakim merjenjem smo svetlobo iz LED diode skozi luknjo v izolaciji čaše naprej usmerili na svetlobni senzor na nasprotni strani čaše ter vanjo dodali 25 ml druge in 25 ml tretje raztopine. Sledil je zagon zbiranja podatkov s pomočjo Vernierjevega vmesnika in prenosnika, opremljenega s programom Vernier Logger Pro 3.6.0. Z večino vzorcev smo z meritvami zaključili v času 7 minut z vzorčenjem dvakrat na sekundo. V primeru močnejših antioksidantov smo čas merjenja ustrezno podaljšali, pri čemer so vse ostale nastavitve ostale nespremenjene. Po nekaj sekundah od začetka merjenja smo v zmešani raztopini 2 in 3 na magnetnem mešalu dodali še 50 mL raztopine 1, kar je povzročilo zagon Briggs-Rauscherjevega oscilatorja. Ko se je raztopina v čaši drugič obravala modro-črno smo ji dodali 4 mL vzorca testiranega antioksidanta ter sistem pustili delovati. Ko se je eksperiment z modro-črno barvo raztopine zaradi kompleksa I^- , I_2 ter škroba zaključil, smo čašo odstranili z magnetnega mešalnika ter njeno vsebino izlili v šolski zbiralnik anorganskih odpadkov in enak postopek ponovili z vsakim izmed 20 vzorcev, pred tem pa smo posneli tudi nihanje svetlobe v slepem vzorcu, v katerega nismo dodali antioksidanta.

4.2 Določanje celotne vsebnosti fenolov (TPC) s Folin-Ciocalteaujevo metodo

Spektrofotometrično določanje TPC smo izvedli na osnovi metode Singletona in Rossija (1965) in variante, ki jo v svojem delu uporablja Javanmardi s sod. (2003). Pripravili smo raztopine galne kisline v etanolu, in sicer v naslednjih koncentracijah: 0.00, 1.00, 0.80, 0.64, 0.51, 0.41 and 0.33 mg/mL. K 50 μ L vsake raztopine smo dodali 2 mL razredčenega (1:10) Folin-Ciocalteaujevega reagenta in 2 mL 7.5 % raztopine Na_2CO_3 . Vse raztopine smo 15 min inkubirali pri $45\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ in nato z Vernierjevim Spektrofotometrom² določili absorpcijo pri 725 nm. Z rezultati smo določili kalibracijsko krivuljo in enak postopek ponovili z vzorci hrane in pijače. Vsebnost fenolov smo izrazili v ekvivalentih galne kisline na gram sadne mase (GAE/FW).

² Merilno območje Vernier Spectrophotometra: 380-950 nm, resolucija: 2 nm (Vernier 2012 (2), 1).

4.3 Vpliv hidroksilnih skupin na celokupni antioksidativni potencial (TAC)

Vpliv hidroksilnih skupin na TAC smo testirali z vzorcema zelenega jabolka in nektarine, saj sta imela v merjenjih inhibicijskega časa z BR reakcijo in fenolne vsebnosti s FC reagentom povsem enake rezultate. Ker šolski laboratorij ni opremljen za HPLC alkalize smo čiste polifenole v obeh vzorcih identificirali s pomočjo podatkovne baze Polyphenol-Explorer Database (Neveu in sod., 2010). Izvedli smo strukturno analizo prisotnih polifenolov in izračunali število hidroksilnih skupin na 100 g mase sadja ter rezultata med seboj primerjali.

4.4 Merjenje znotrajceličnega antioksidativnega delovanja EGCG s CAA analizo

4.4.1 Celične kulture za CAA analizo

Humane celične kulture jetrnih celic (jetrni karcinom; HepG2 celična linija), žilnega endotelija (EA.hy926 celična linija) in živčnih celic (nevroblastom; SH-SY5Y celična linija) izhajajo iz American Type Culture Collection (Rockville, USA). Vse celice so bile gojene v sterilnih posodah za gojenje celičnih kultur (75 cm²) v ustreznem celičnem mediju DMEM z 10 % fetalnim govejim serumom, (FBS), 1 mM raztopino L-glutamina, 1 mM zmesjo antibiotikov penicilina ter streptomicina in 1 mM raztopino natrijevega piruvata. Sledila je inkubacija pri 37 °C v nasičeni atmosferi 95 % zraka in 5 % ogljikovega dioksida. Celice so bile 24 ur pred začetkom CAA analize presajene v mikrokivete na mikrotiterski ploščici (angl. 96-well plate) v koncentraciji 10,000 celic/ mikrokiveto. V tem času so se celice namnožile in ustvarile enojni sloj (stanje 90% konfluentnosti).

4.4.2 Kemikalije in material za CAA analizo

2,7-diklorofluorescin diacetate (DCFH-DA), 2,2-azobis-2-amidinopropandihidroksiklorid (ABAP), (-)-cis-3,3',4',5,5',7-Hexahydroxy-flavane-3-gallate (EGCG) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany); fosfatni pufer s soljo (PBS) (Polyphenols Laboratories AS, Sandes, Norway); mikrotitrne (angl. 96-well) plošče (Corning Inc., Lowell, USA); fluorescenčni čitalec

mikrotitrskih plošč (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA); laminarna komora in inkubator (Jouan SA, St. Herblain, France).

4.4.3 CAA metoda

Na vsaki celični liniji smo izvedli dva eksperimenta, enega z ABAP-om (tvorilcem prostih radikalov) in drugega brez ABAP-a (inertni CAA), torej skupno šest eksperimentov. Pred začetkom poskusa smo v mikrokivetah z vakuumsko aspiracijo odstranili celični medij. Za posamezno ploščico smo pripravili svežo raztopino flourescirajočega DCFH-DA, in sicer smo v 10 mL DMEM medija dodali 100 μ L L-glutanima in 25 μ L 20mM DCFH-DA, s čimer smo dobili 50 μ M raztopino DCFH-DA. Po protokolu na shemi 4 smo nato v mikrokivete pipetirali raztopine EGCG, katerih koncentracije smo pripravljali z redčenjem iz standardne 0,01 M raztopine EGCG. V 100 μ L tako zmešanih razpotin (50 μ M DCFH-DA, 1 mM L-glutamin in EGCG v koncentracijskem območju od 10^{-3} do 10^{-10} M) smo celice inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 °C.

Za vsako koncentracijo EGCG smo na vsaki mikrotitrski ploščici izvedli 6 ponovitev; vsaka ploščica je vsebovala tudi 6 kontrolnih (brez EGCG) in 6 »blank« poskusov (brez EGCG in brez ABAP-a). S kontrolnimi poskusi smo testirali delovanje ABAP-a v odsotnosti antioksidantov, z »blank« poskusi (odsotnost EGCG in ABAP-a) pa vpliv oksidacije DHCF spojine zaradi endogene tvorbe oksidativnega stresa, ki je normalno prisotno zaradi osnovnih presnovnih poti v celici. Razporeditev koncentracij EGCG ter kontrolnih in blank poskusov na posamezni mikrotitrski plošči je prikazana na Shemi 10 na naslednji strani.

	Blank	10 ⁻³ EGCG	10 ⁻⁴ EGCG	10 ⁻⁵ EGCG	10 ⁻⁶ EGCG	10 ⁻⁷ EGCG	10 ⁻⁸ EGCG	10 ⁻⁹ EGCG	10 ⁻¹⁰ EGCG	Control	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Shema 10: Razporeditev koncentracij EGCG ter kontrolnih in blank poskusov na posamezni mikrotitrski plošči.

Po 30 minutni inkubaciji pri 37 °C smo z aspiriranjem odstranili celični medij, z dvojnimi spiranjem s PBS pa tudi morebitne ostanke EGCG in DCFH-DA zunaj celic. Nato smo celicam dodali 100 µL HBBS, angl. Hank's Buffer Stock, (185 mg/L CaCl₂ x 2 H₂O; 60 mg/L KH₂PO₄; 350 mg/L NaHCO₃; 8000mg/L NaCl; 47,88 mg/L Na₂HPO₄; 100 mg/L MgCl₂ x 6 H₂O; 1000 mg/L glucose; 100 mg/L MgSO₄ x 7 H₂O; 400 mg/L KCl; pH pufru je bil z 0,1 % HCl naravnano na 7,4) s 5 mM vsebnostjo ABAP-a oz. brez nje (inertCAA). Mikroploščo smo takoj po dodatku HBBS-a z oz. brez ABAP-a vstavili v fluorescenčni čitalec mikroplošč, ki je signal DCF (vbušenje z 485 nm, emisija merjena pri 535 nm) beležil v 5-minutnih intervalih, in sicer 60 minut.

CAA vrednosti za vsako meritev smo izračunali s programom Microsoft Excel, uporabili pa smo formulo:

$$CAA = 100 - \left(\frac{\int SA}{\int CA} \right) \cdot 100 \text{ (Wolfe in Liu, 2007),}$$

pri čemer $\int SA$ predstavlja integrirano površino pod flourescenčno krivuljo vzorcev EGCG, od katere smo predhodno odšteli vrednost flourescence v »blank« poskusih. $\int CA$ predstavlja

integrirano površino pod krivuljo kontrolnih poskusov. Zbrane podatke za vse tri celične kulture smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism 6 in jih predstavili na skupnem grafu, ki prikazuje CAA % v odvisnosti od koncentracije EGCG.

V poskusih brez dodatka tvorilca prostih radikalov (brez ABAP-a) smo določili vrednosti za inertni CAA parameter po formuli:

$$iCAA = 100 - \left(\frac{\int SA}{\int CA} \right) \cdot 100$$

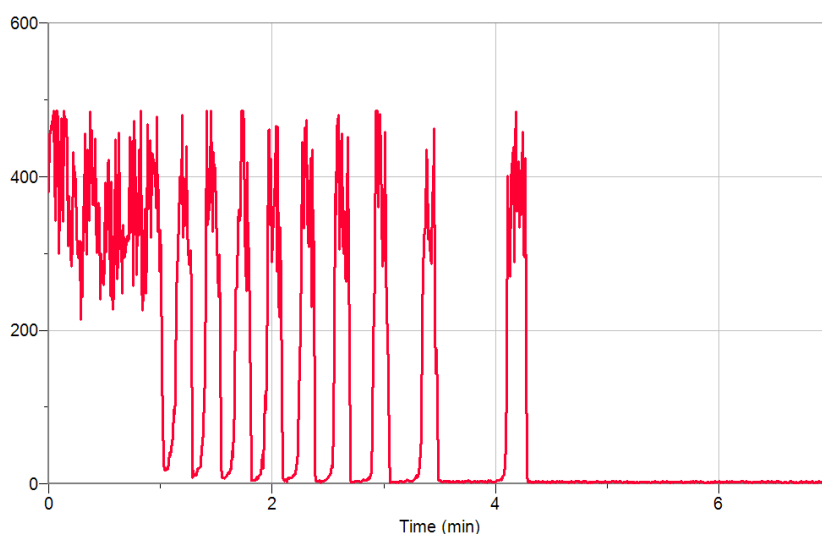
Pri čemer $\int SA$ predstavlja integrirano površino pod flourescenčno krivuljo vzorcev EGCG, od katere smo predhodno odšteli vrednost flourescence v »blank« poskusih, $\int CA$ pa predstavlja integrirano površino pod krivuljo kontrolnih poskusov. Zbrane podatke smo obdelali za vsako izmed treh celičnih linij in jih predstavili na skupnem grafu, ki prikazuje parameter iCAA, tj. inertni CAA, v odvisnosti od koncentracije EGCG.

5 Rezultati

5.1 Rezultati merjenja inhibicij v Briggs-Rauscherjevem sistemu

5.1.1 Slepa proba brez dodatka antioksidanta

V primeru slepe probe v Briggs-Rauscherjev reaktor nismo dodali antioksidanta, temveč smo mehanizem pustili prosto nihati. Spremembe v svetlobnem toku skozi raztopino slepe probe so prikazane na spodnjem Grafu 1, iz katerega je mogoče razbrati nihanje v svetlobnem toku skozi raztopino zaradi spreminjanja njene barve. Na začetku eksperimenta je imela raztopina jantarno bravo vse dokler se mehanizem BR reakcije ni začel izvajati in ob modro-črni barvi je prišlo do močnega padca v svetlobnem toku skozi raztopino. Sledile so oscilacije sistema, pri čemer na spodnjem grafu eni oscilaciji ustreza čas od ene temne faze oz. močnega padca svetlobe do naslednjega. Iz slepe probe lahko razberemo 9 oscilacij in očitno je, da je čas zadnjih oscilacij nekoliko daljši, saj se sistem že pomika proti končnemu stanju. Motnje na grafu slepe probe so, tako kot na naslednjih grafih, posledica vmešavanja magnetnega mešala ali ustvarjenega vrtinca v raztopini v merjenje svetlobe. Od pomembnih padcev in vzponov svetlobne intenzitete na grafu jih ločimo po zelo kratkem času spremembe svetlobe (predstavljene kot ravna črta), in po velikosti spremembe v svetlobni intenziteti. Le-ta je namreč relativno majhna glede na tisto, povzročeno s spremembo barve.



Graf 1: Oscilacije v slepi probi Briggs-Rauscherjevega sistema – antioksidant ni bil dodan.

Grafi testiranja preostalih vzorcev so priloženi v prilogi, testiranje vzorca borovnice pa služi kot demonstracija obdelave podatkov.

5.1.2 Skupna opažanja pri določanju celokupnega antioksidativnega potenciala z BR in svetlobnim senzorjem

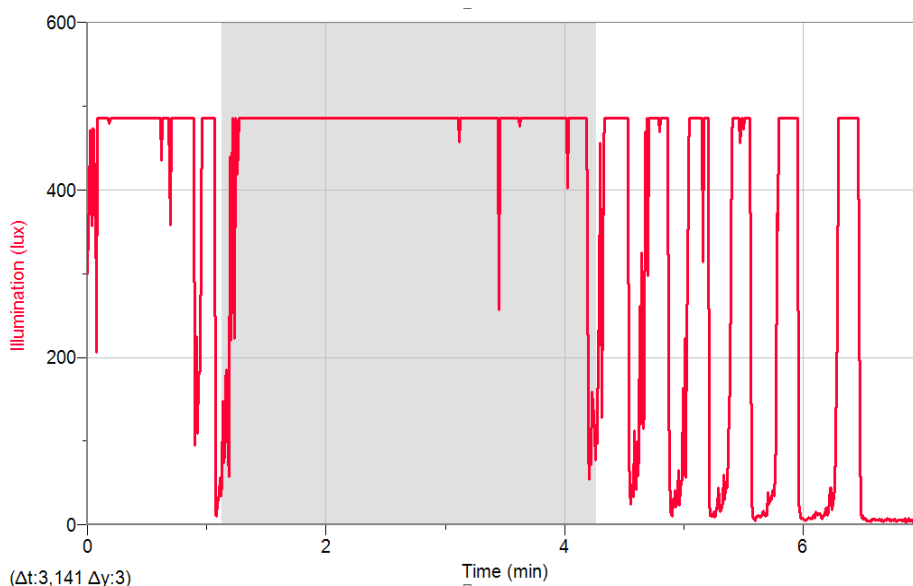
Med izvajanjem ponovitev smo zabeležili naslednja kvalitativnih opažanja:

1. Reakcijska zmes se takoj po dodatku vodikovega peroksida rahlo segreje.
2. Pri mešanju reakcijske zmesi nastaja pena, njena količina pa z različnimi vzorci ni enaka. Pri daljših meritvah je pene več, kar poleg vrtinca, ki ga ustvarja v kombinaciji z magnetnim mešalom, moti svetlobni sensor.
3. Katerakoli koncentracija vzorca, višja od 1 g vzorca na 100 mL vode, poskrbi bodisi za tako dolgo inhibicijo, da je ni mogoče izmeriti, bodisi zmoti in prekine mehanizem reakcije ter povzroči takojšnje prenehanje oscilacij.
4. Nekatere koncentracije vzorcev nižje od 1 g vzorca na 100 mL vode v Briggs-Rauscherjevem reaktorju povzročijo inhibicijo, ki se jo da normalno izmeriti, medtem ko je inhibicija nekaterih vzorcev pri 1 g vzorca na 100 mL še dobro vidna, pri nižjih koncentracijah (testirano z 1 g vzorca na 120 mL vode) pa inhibicije ni več mogoče zaznati.

5.1.3 Obdelava zbranih podatkov na primeru testiranja vzorca borovnice

Za določitev antioksidativnega potenciala vzorcev preko Briggs-Rauscherjevega reaktoja je ključna inhibicija oscilacij, ki jo dodatek vzorca povzroči. Zaradi tega smo pri vseh meritvah s pomočjo Vernier Logger Pro 3.6.0. programa določili časovni interval med drugo in tretjo oscilacijo, upoštevajoč temno modro fazo, saj je ta na vseh grafih najbolj očitna.

Obdelava podatkov je v primeru vzorca borovnic prikazana na spodnji Sliki 1, kjer je čas inhibicije v minutah kot Δt zapisan v spodnjem levem kotu slike in ustreza 3,141 min oz. 188 s. Odmerjen je od druge do tretje temne faze.



Slika 1: Obdelava zbranih podatkov v programu Vernier Logger Pro 3.6.0., prikazana na primeru vzorca borovnice.

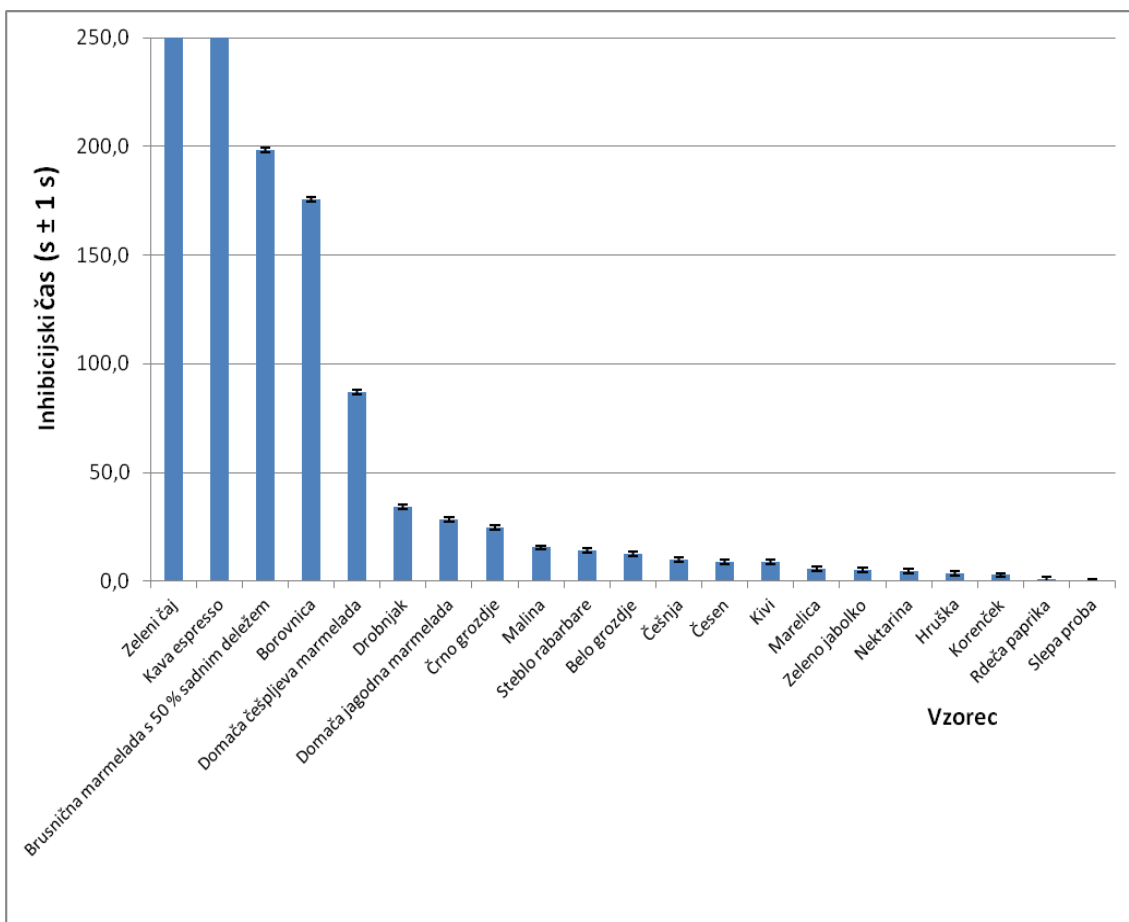
Od odčitane časovne vrednosti med drugo in tretjo temno fazo smo odšteli enakovredno vrednost slepe probe (12 s) in dobili vrednosti, predstavljene v spodnji Tabeli 1.

Tabela 1: Izračunane vrednosti inhibicij, povzročenih z 20 različnimi vzorci hrane v Briggs-Rauscherjevem sistemu.

Vzorec	Inhibicijski čas (s \pm 1 s)
Kava espresso	22800
Zeleni čaj	21600
Brusnična marmelada s 50 % sadnim deležem	199
Borovnica	176
Domača češpljeva marmelada	87

Drobnijak	34
Domača jagodna marmelada	29
Črno grozdje	25
Malina	16
Steblo rabarbare	14
Belo grozdje	13
Češnja	10
Česen	9
Kivi	9
Marelica	6
Zeleno jabolko	5
Nektarina	5
Hruška	4
Korenček	3
Rdeča paprika	1

Podatke iz Tabele 1 smo uporabili za grafično predstavitev rezultatov na spodnjem Grafu 2.



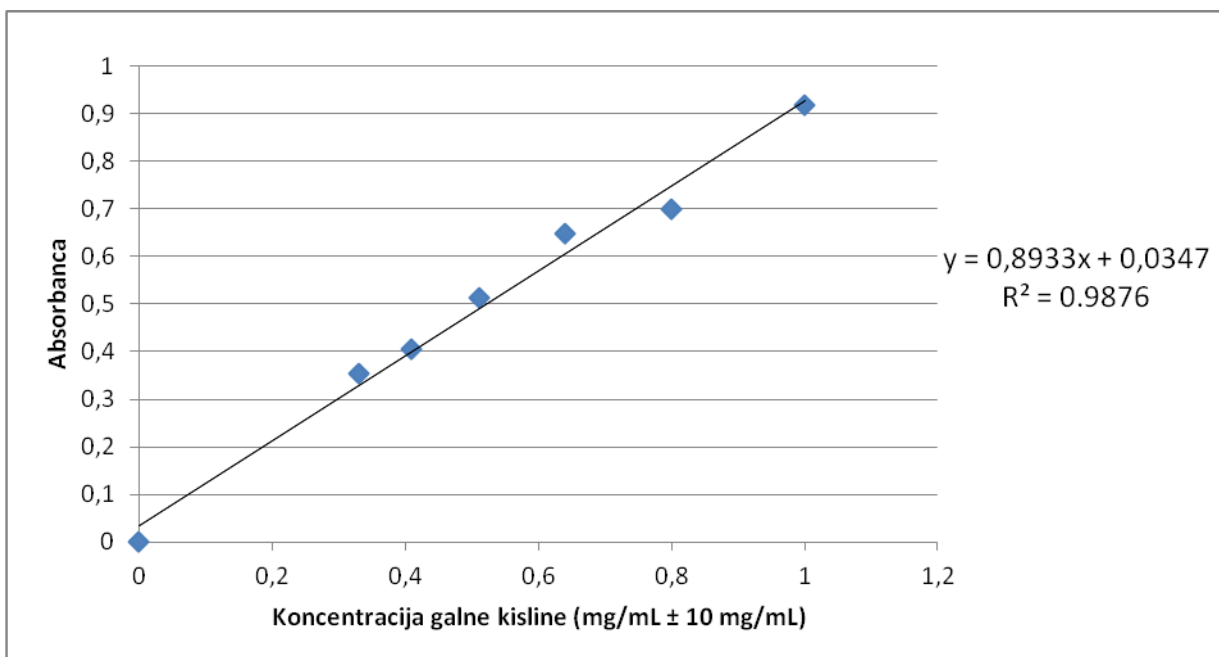
Graf 2: Antioksidativni potenciali 20 vzorcev merjeni s časovno inhibicijo oscilacij v Briggs-Rauscherjevem sistemu.

Iz Grafa 2 lahko razberemo ogromen antioksidativni potencial zelenega čaja in espresso kave v primerjavi z ostalimi vzorci. Časovna inhibicija obeh omenjenih vzorcev je bila tolikšna, da je v 6 urah in 32 minutah za zeleni čaj oz. v 30 minutah za espresso kavo nismo uspeli dokončno določiti. Ekstremnima vzorcema sledi brusnična marmelada s 50 % sadnim vzorcem, borovnica, sledi večja razlika med vzorci, nato pa si z manjšimi razlikami sledijo domača češpljeva marmelada, črno grozdje, malina, steblo rabarbare, belo grozdje, češnja, česen, kivi in marelica. V primerjavi s slepo proba je inhibicija marelice, zelenega jabolka, nektarine, hruške, korenčka in rdeče paprike skoraj nična.

5.1 Določanje celokupne vsebnosti fenolov s Folin-Ciocalteaujevim reagentom

Standardne raztopine galne kisline v etanolu smo testirali spektrofotometrično s FC reagentom in s programom Microsoft Excel določili kalibracijske krivulje. S pomočjo

statističnih funkcij smo določili tudi R^2 vrednost in premico z najboljšim potekom. Rezultati sopredstavljeni na spodnjem Grafu 3.



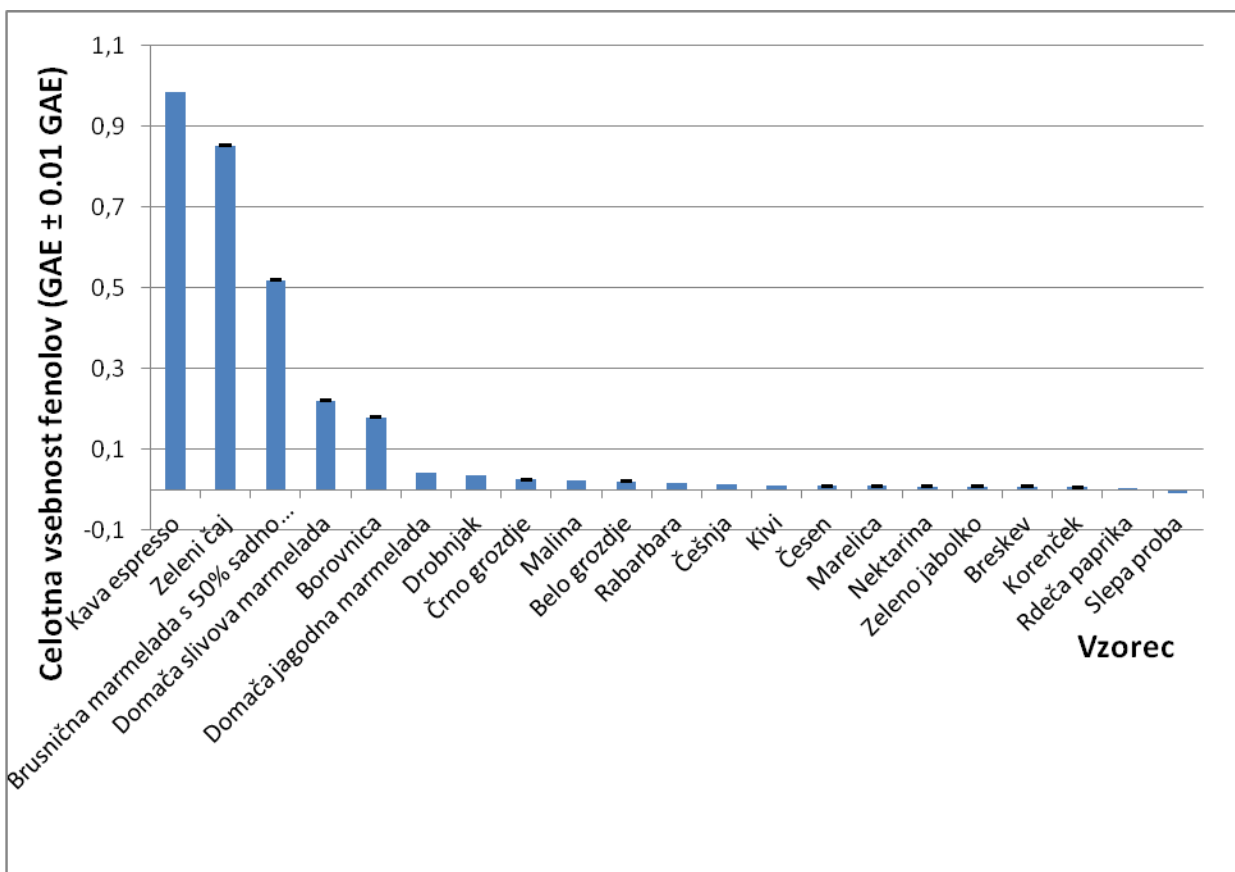
Graf 3: Kalibracijska krivulja galne kisline določena s 7 etanolnimi raztopinami.

Enak postopek smo uporabili za 20 vzorcev hrane in pijače. Izmerjeno absorbanco smo primerjali s kalibracijsko krivuljo na Grafu 4 in določili njihovo celotno fenolno vsebnost, izraženo kot ekvivalenti galne kisline na gram živila. Tabela 2 predstavlja rezultate.

Table 1: Celotna fenolna vsebnost 20 vzorcev hrane in pijače, izražena kot GAE/FW.

Vzorec	Celokupna vsebnost fenolov (\pm 0.01 GAE/FW)	Vzorec	Celokupna vsebnost fenolov (\pm 0.01 GAE/FW)
Kava espresso	0.985	Češnja	0.013
Zeleni čaj	0.853	Kivi	0.010

Brusnična marmelada s 50% sadno vsebnostjo	0.519	Česen	0.009
Domača slivova marmelada	0.221	Marelica	0.009
Borovnica	0.179	Nektarina	0.008
Domača jagodna marmelada	0.042	Zeleno jabolko	0.008
Drobnjak	0.035	Breskev	0.008
Črno grozdje	0.025	Korenček	0.006
Malina	0.022	Rdeča paprika	0.003
Belo grozdje	0,020	Slepa proba	-0.009
Rabarbara	0.016		



Graf 4: TPC dvajsetih vzorcev hrane in pijače, določena s Folin-Ciocalteujevim reagentom.

Korelacijo med TAC in TPC, merjenima z BR reakcijo in FC reagentom smo določili kot Pearsonov korelacijski koeficient (r), ki znaša 0.91.

5.2 Primerjava števila hidroksilnih skupin v 100 g zelenega jabolka in nektarine

Vzorca zelenega jabolka in nektarine sta se v inhibicijskem času in celotni vsebnosti fenolov razlikovala za manj kot eksperimentalno napako, zato predstavljata relevanten par za primerjavo čistih spojin, ki jih vsebujeta in števila hidroksilnih spojin, ki jih premoreta. Polifenolna zgradba obeh vzorcev, določena preko HPLC analiz (Neveu et al. 2010), je priložena v prilogah. Število hidroksilnih skupin v 100 g posameznega sadja smo izračunali po naslednji formuli:

$$N(OH) = \sum \frac{m(Ar)Na}{M(Ar)} \cdot N(ArOH)$$

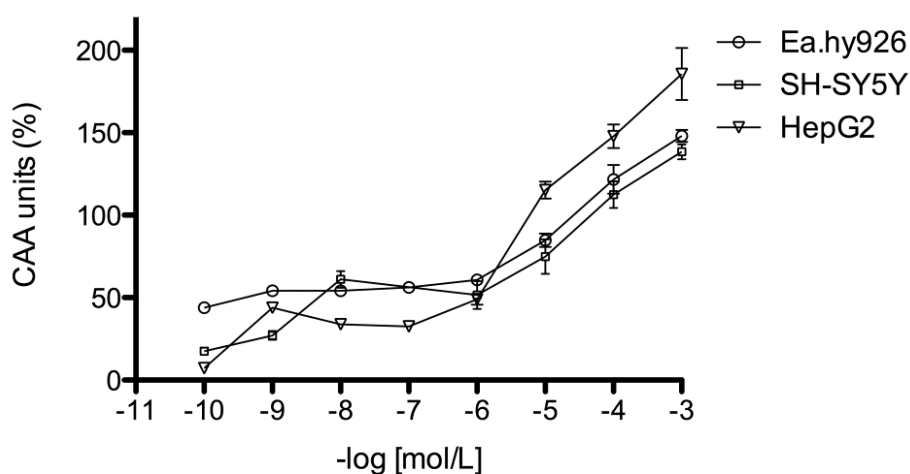
$m(Ar)$ označuje maso antioksidanta (na 100g FW), $M(Ar)$ molekulsko maso antioksidanta, Na Avogadrovo konstanto ($6.02 \cdot 10^{23}$), in $N(ArOH)$ število hidroksilnih skupin na 1 molekuli antioksidanta.

Z uporabo podatkov v Tabeli 3 in Tabeli 4 v prilogah smo za zeleno jabolko izračunali $5.59 \cdot 10^{20}$ OH/100g FW in $2.60 \cdot 10^{20}$ OH/100g FW za nektarino, kar pomeni razliko $2.99 \cdot 10^{20}$ OH/100g FW.

5.3 *In vitro* merjenje antioksidativne aktivnosti EGCG s CAA analizo

5.3.1 Določanje CAA parametra v poskusch s tvorilcem prostih radikalov (z ABAP-om)

V prvi skupini poskusov smo s CAA analizo testirali antioksidativno aktivnost EGCG v koncentracijskem razponu od 0,1 nM do 1 mM. Na posamezni celični liniji smo z vsako koncentracijo EGCG izvedli 6 ponovitev in rezultat izrazili kot povprečje \pm SEM, kjer SEM (angl. standard error of mean) predstavlja standardno napako. CAA rezultati za celične kulture žilnega endotelija (Ea.hy926), nevroblastoma (SH-SY5Y) in jetrnega karcinoma (HepG2) v odvisnosti od koncentracije EGCG so prikazani na spodnjem Grafu 5.

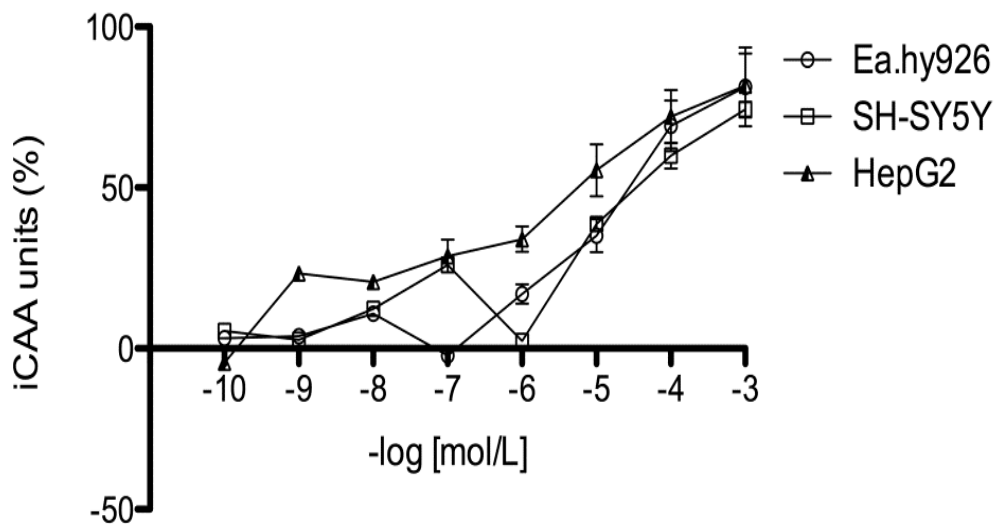


Graf 5: Inhibicija oksidacije DFCH v DFC po dodatku raztopin EGCG različnih koncentracij. Vrednosti CAA parametra so prikazane za celične kulture žilnega endotelija (Ea.hy926), nevroblastoma (SH-SY5Y) in jetrnega karcinoma (HepG2).

Na Grafu 5 je za vse tri celične kulture razviden trend naraščanja CAA parametra v smeri večjih koncentracij EGCG. Minimalno vrednost CAA smo pri vseh celičnih kulturah zabeležili pri 0,1 nM (10^{-10} M) koncentraciji EGCG, maksimalno vrednost pa pri 1 mM koncentraciji EGCG. Naraščanje CAA parametra v smeri večjih koncentracij EGCG ni enakomerno; v koncentracijskem območju 10^{-10} M do 10^{-6} M EGCG CAA narašča zelo počasi. Na celični kulturi žilnega endotelija je naraščanje v tem območju enakomerno, medtem ko je v naraščanju krivulj za kulturi jetrnega karcinoma in nevroblastoma opaziti nihanja. Pri 1 μ M koncentraciji EGCG je CAA parameter vseh celičnih kultur podoben, t.j. 50 ± 15 CAA enot. V koncentracijskem območju od 1 μ M do 1 mM EGCG CAA parameter narašča hitreje kot pri nižjih koncentracijah, pri čemer je CAA parameter konstantno najvišji pri celični kulturi jetrnega karcinoma, pod njim pa skupaj sledita kulturi nevroblastoma in žilnega endotelija (njuna razlika je manjša od absolutne napake).

5.3.1 Določanje inertnega CAA parametra v poskusih brez tvorilca prostih radikalov (brez ABAP-a)

V drugem sklopu poskusov smo na celičnih kulturah žilnega endotelija (Ea.hy926), nevroblastoma (SH-SY5Y) in jetrnega karcinoma (HepG2) izvedli CAA protokol brez dodatka tvorilca prostih radikalov (brez ABAP-a). Reaktivne kisikove zvrsti za oksidacijo DCFH v flourescenčni DCF v tem primeru niso bile tvorjene eksogeno (z ABAP-om), temveč zaradi endogenih reaktivnih kisikovih zvrsti. Rezultati inertnega CAA parametra v odvisnosti od koncentracij EGCG so za vse tri celične linije prikazani na spodnjem Grafu 6.



Graf 6: Inhibicija oksidacije DFCH v DFC po dodatku raztopin EGCG različnih koncentracij. Vrednosti inertnega CAA parametra (iCAA) so prikazane za celične culture žilnega endotelija (Ea.hy926), nevroblastoma (SH-SY5Y) in jetrnega carcinoma (HepG2).

V primerjavi z razponom vrednosti CAA parametra na Grafu 5 (pribl. 180 enot) je absolutni razpon vrednosti inertnega CAA manjši (pribl. 80 enot). Na Grafu 6 je za vse tri celične kulture razviden trend naraščanja iCAA parametra v smeri večjih koncentracij EGCG. Maksimalno vrednost iCAA smo z vsemi celičnimi kulturami zabeležili pri 1 mM koncentraciji EGCG, medtem ko so iCAA minimumi za posamezne celične linije razporejeni različno. Kultura jetrnega karcinoma ima najnižjo vrednost pri 0,1 nM EGCG, kultura žilnega endotelija pri 0,1 μ M EGCG, kultura nevroblastoma pa pri 1 μ M. Že razporeditev minimalnih vrednosti iCAA potrjuje dejstvo, da je vrednost iCAA parametrov pri nizkih koncentracijah (10^{-10} do 10^{-6} M) EGCG spremenljiva in ni linearno sorazmerna z logaritmom koncentracij EGCG. Vrednosti iCAA se hitreje in bolj enakomerno povečujejo pri višjih koncentracijah EGCG (10^{-6} do 10^{-3} M), kar smo opazili tudi pri CAA. V nasprotju s CAA pa so na grafu inertnega CAA razlike pri najvišjih koncentracijah EGCG (10^{-3} in 10^{-4} M) zanemarljive, iCAA za vse tri celične kulture namreč ležijo znotraj absolutne napake.

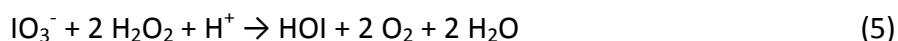
6 Diskusija in zaključki

Vrednosti celokupne antioksidativne kapacitete (angl. total antioxidant capacity oz. TAC) in celokupne vsebnosti polifenolov (angl. total polyphenol content oz. TPC) za analizirane vzorce hranil so predstavljene na Grafih 2 in 4. Rezultati na obeh grafih potrjujejo tako vsebnost polifenolov kakor tudi antioksidativno delovanje vzorcev hranil. Rezultati merjenja antioksidativne aktivnosti EGCG s CAA analizo (Grafa 5 in 6) kažejo na inhibicijo fluorescence DCF in s tem na antioksidativno delovanje. Ničelna hipoteza je s tem zavrnjena, smiselnost raziskave pa potrjena.

6.1 Določanje celokupnega antioksidativnega potenciala (TAC) z BR reakcijo

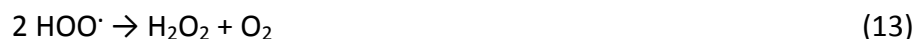
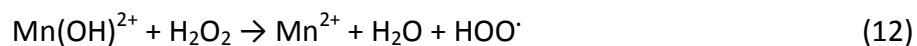
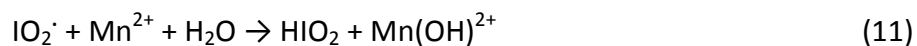
Briggs-Rauscherjev oscilirajoči sistem sestoji iz oksidacije in jodiranja organskega substrata (malonske kisline ali njenih derivatov) z jodatom v prisotnosti of H_2O_2 katalista Mn^{2+} . Glavni intermediati, katerih koncentracije nihajo, so: jod, jodidni ion in oksijodidne spojine HOI, HIO_2 and IO_2^- . Pomemben dokaz za vlogo HOO^\cdot radikalov v BR sistemu je inhibicijski efekt, ki so ga opazili pri dodajanju sojine moke v reakcijsko zmes, in ga pripisali glikozidom (Cervellati in sod., 2001). Pojav sestoji iz takojšnjega prenehanja oscilacij, s časom pa se nihanje obnovi in odvisnost inhibicijskega časa od koncentracije sojinih glikozidov je linearna v širokem razponu koncentracij (Cervellati in sod., 2000). BR sistem lahko posledično služi kot metoda za določanje celokupne antioksidativne kapacitete (angl. total antioxidant capacity – TAC).

Zadnji mehanistični model Briggs-Rauscherjeve reakcije, t.i. NFA mehanizem, je bil dopolnjen leta 2012 (Muntean in sod., 2012), model pa še vedno ni popolnoma raziskan. V raziskovalni nalogi se bomo osredotočili na del mehanizma, ki igra pomembno vlogo pri merjenju celokupne antioksidativne kapacitete. Osrednja reakcija za določanje TAC je reakcija št. 5:

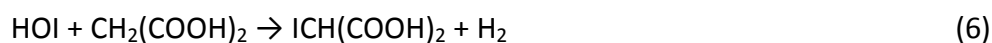


Ko je $[\text{I}^-]$ v reakcijskem sistemu nizka, poteka reakcija 5 skozi radikalski mehanizem 10-14, ki vključuje superoksidne in hidroperoksidne radikale, medtem ko se HOI tvori v presežku.





Ker HOI izklaplja radikalski mehanizem in dovoljuje nadaljevanje oscilacij, mora antioksidativni učinek polifenolov preprečiti njeno tvorbo. V odvisnosti od kemijske strukture, polifenolni antioksidanti nevtralizirajo hidroperoksidne in superoksidne radikale v reakcijah 10-13 s prenosom vodikovega atoma ali elektrona. S tem upočasnjujejo potek omenjenih reakcije in zmanjšajo količino nastale HOI. Degradacija HOI posledično ustvari premalo jodida za preusmeritev radikalskega mehanizma na neradikalskega, kar se odraža kot inhibicija oscilacij. Trajanje inhibicije je premosorazmerno času nevtraliziranja prostih radikalov. Ko se vse molekule antioksidanta zasičijo, se oscilirajoče delovanje sistema obnovi. Posledično daljši inhibicijski čas pomeni večji TAC. Reakcija 6 povezuje radikalski in neradikalski mehanizem reakcije 5 z jodinacijo malonske kisline v jodomalonsko kislino, ki ima pomemben vpliv na inhibicijski čas.



Lawson in sod., (2009) je malonsko kislino označil kot "anti inhibitorno" spojino, ki bi naj zmanjševala ali povsem preprečevala inhibicijski efekt antioksidantov. Domnevno anti-inhibitorno delovanje so kasneje dokazali kasneje dokazal Cervellati in sod. (2010), ki so odkrili *in situ* disproporcionacijo jodomalonske kisline (IMA) v ravnotežju z diiodomalonski kislino (I₂MA):



Reakcija jodinacije med IMA in antioksidantom je prepočasna za povečan anti-inhibicijski učinek. V nasprotju z njo pa je razpad I₂MA v kislem IO₃⁻-Mn²⁺-H₂O₂ okolju reakcija, ki deluje močno antiinhibitorno, saj ustvarja jodid in jod potrebna za ponovni začetek oscilacij. Mehanizem za razpad I₂MA je še vedno predmet raziskav (Cervellati in sod., 2010).

Mehanistična interpretacija inhibicij in podatki na Grafu 2 podpirajo našo 1. hipotezo, ki predpostavlja, da antioksidanti v vzorcih hrane in pijače v mehanizmu BR reakcije delujejo

inhibitorno. Izstopajoče antioksidativno delovanje smo izmerili v vzorcu kave espresso in zelenega čaja, medtem ko si vsi ostali vzorci povzročili povprečne ali šibke inhibicije. Ob tem moramo poudariti, da močan *in vitro* antioksidativni efekt ni direktno povezan s tako močnim delovanjem *in vivo*, saj sta biodostopnost in absorpcija polifenolov precej nizki (Žiberna in sod., 2012). Z merjenjem smo kvantitativno opisali celokupno antioksidativno kapaciteto izbranih hranil, vendar pa le-ta ni direktno primerljiva s preventivnim učinkom proti oksidativnemu stresu v bioloških sistemih.

6.2 Določanje celokupne vsebnosti fenolov (TPC) s FC reagentom

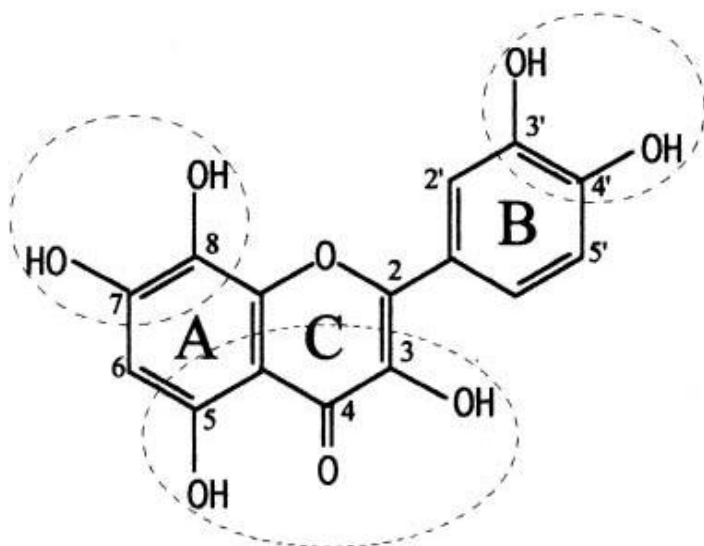
Z drugo hipotezo smo predpostavili linearno odvisnost med TPC merjenim s FC reagentom in TAC testiranim z BR reakcijo. S statistično analizo podatkov na Grafih 2 in 4 smo izračunali korelacijski koeficient 91 %, ki potrjuje 2. hipotezo in dejstvo, da so polifenoli glavne antioksidativne spojine v izbranih vzorcih živil. Velikost odstopanja (9%) od popolne linearne odvisnosti je lahko posledica prisotnosti kovinskih ionov ali ostalih delcev, sposobnih nevtralizacije prostih radikalov (Stanisavljev in sod., 2011).

6.3 Pročevanje vpliva hidroksilnih skupin na antioksidativno delovanje

V splošnem je nevtralizacijska sposobnost flavonoidov za proste radikale odvisna od njihove molekulske strukture in razporeditve hidroksilnih skupin, t.j. od dostopnosti fenolnih vodikov in od možnosti stabiliziranja nastalih fenoksilnih radikalov (Amic in sod., 2003). V tretji hipotezi smo domnevali, da večje število hidroksilnih skupin na molekulski strukturi antioksidanta povečuje TAC, strukturna analiza vzorca zelenega jabolka in nektarine pa je pokazala veliko razliko v številu OH skupin. Na osnovi tega je 3. hipoteza zavržena. Heim s sod. (2002) in Amic s sod. (2003) predpostavljata, da je TAC odvisna ne le od števila, temveč tudi od položaja OH skupin in ostalih stabilizacijskih lastnosti.

Novejše raziskave o strukturnih lastnosti polifenolnih antioksidantov so osvetlile esencialno vlogo 3',4'-dihidroksi, t.j. o-dihidroksi skupine (katehol strukture) v B obroču, ki ima sposobnost doniranja elektronov in privlačanja prostih radikalov. Pomembno vlogo pri TAC igra tudi 3-OH skupina na C obroču (Pieta, 2000 in Balasundram in sod., 2006), medtem ko

C2-C3 dvojna vez konjugirana s 4-keto skupino prav tako povečuje delokalizacijo elektronov obroča B in s tem sposobnost antioksidativnega delovanja. V odsotnosti katehol strukture v B obroču so nevtralizacijo prostih radikalov sposobne prevzeti tudi hidroksilne skupine obroča A (Arora in sod., 1998). Strukturni kriteriji za antioksidativno delovanje spojin so povzeti na spodnji Shemi 11.



Shema 11: Povzetek strukturnih kriterijev za antioksidativno delovanje flavonoidov (Amic in sod., 2003).

6.4 *In vitro* merjenje antioksidativne aktivnosti EGCG s CAA analizo

6.4.1 Določanje CAA parametra v poskusih s tvorilcem prostih radikalov (z ABAP-om)

CAA analiza spada med novejšje metode za določanje antioksidativnega delovanja. Njena glavna prednost v primerjavi s starejšimi *in vitro* metodami je uporaba celičnih kultur, kar bolje simulira kompleksnost biološkega okolja v živih organizmih (Wolfe in Liu, 2007). Antioksidativna aktivnost je tako določena znotrajcelično, kar pomeni, da metoda vključuje tudi dejavnik prehajanja antioksidantov skozi celično membrano in delovanje antioksidantov na znotrajcelične encime, npr. aktivacija antioksidativnih encimov. Možni zunajcelični ostanki molekul antioksidanta in fluorescirajočega DCFH-DA/DCF so v protokolu odstranjeni z dvojnimi spiranjem s PBS.

V prvem sklopu CAA poskusov (z ABAP-om) smo proučevali antioksidativno delovanje polifenolne spojine EGCG v koncentracijskem območju 10^{-10} do 10^{-3} M v celičnih kulturah žilnega endotelija, nevroblastoma in jetrnega karcinoma. Gre za simulacijo ishemično-reperfuzijske poškodbe tkiva oz. celic, pri kateri se v fazi reperfuzije močno poveča koncentracija reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Po infiltraciji ishemičnega tkiva (npr. po akutnem miokardinalnem infarktu), ROS tvorijo nevtrofilci (Saeed in sod., 2005). EGCG v modelu ishemično-reperfuzijske poškodbe stabilizira ROS in preprečuje reperfuzijske poškodbe.

Antioksidativno delovanje EGCG smo testirali v koncentracijskem območju od 10^{-10} M do 10^{-3} M in CAA vrednosti za celične kulture žilnega endotelija, nevroblastoma in jetrnega karcinoma predstavili na Grafu 5. Iz Grafa 5 je razvidno, da je antioksidativno delovanje EGCG prisotno in odvisno od njegove koncentracije; pri prehajanju od 10^{-10} M do 10^{-6} M se CAA parametri, ki predstavljajo antioksidativno aktivnost, povečujejo pri vseh celičnih kulturah, izrazito večje razlike med zaporednimi koncentracijami pa se pojavljajo v koncentracijskem območju od 10^{-6} do 10^{-3} M. S temi podatki lahko potrdimo četrto hipotezo, v kateri smo predpostavili, da EGCG v različnih celičnih kulturah deluje antioksidativno. Po zaužitju »povprečne« skodelice zelenega čaja s 122 mg EGCG znaša koncentracija prostega EGCG v krvnem serumu $1.25 \mu\text{M}$ (Williamson in sod., 2011), kar lahko primerjamo s koncentracijo 10^{-6} M v naših poskusih. Z Grafa 5 je razvidno, da je antioksidativno delovanje pri serumski koncentraciji EGCG prisotno, kar pomeni, da ima normalno uživanje zelenega čaja vpliv na celično redoks homeostazo na celičnem modelu ishemično-reperfuzijske poškodbe. Ob zaužitju zelenega čaja je absorpcija EGCG v tankem črevesju nizka, saj EGCG v tekočini hitro prehaja v debelo črevo, kjer ga razgradijo mikroorganizmi (Mereles in Hunstein, 2011).

6.4.1 Določanje iCAA parametra v poskusih brez tvorilca prostih radikalov (brez ABAP-a)

V drugem sklopu poskusov smo antioksidativno delovanje EGCG spremljali v CAA poskusih brez dodatka ABAP-a, torej brez tvorilca prostih radikalov. Celične kulture so bile v stanju

normalne celične fiziologije, v katero sodi tudi redoks homeostaza z endogeni antioksidativni mehanizmi na eni, in reaktivne kisikove zvrsti iz celične presnove na drugi strani ravnotežja.

Vrednosti inertnega CAA parametra na Grafu 6 naraščajo z naraščujočo koncentracijo EGCG, torej je antioksidativno delovanje tudi v tem primeru odvisno od koncentracije EGCG. Pri suprafizioloških koncentracijah EGCG se v vzorcu iCAA na Grafu 6 že nakazuje stanje zasičenosti oz. plato, v katerem je celično redoks ravnotežje pomaknjeno na stran antioksidantov. V nadaljevanju obravnavamo nekaj znotrajceličnih mehanizmov za nastanek reaktivnih kisikovih spojin in njihovo vlogi pri znotrajceličnem signaliziranju in nastanku različnih patoloških stanj, povezanih z njihovim nepravilnim delovanjem.

Mitohondrij

Mitohondrij je pomemben vir superoksidnih radikalov, ki ob oksidativni fosforilaciji ADP v ATP nastajajo na elektronski prenašalni verigi. Vloga pri nastanku superoksidnih radikalov je bila dokazana za dva beljakovinska kompleksa v elektronski prenašalni verigi, in sicer za Kompleks I (flavin monomukleotid in železov sulfid) in ubikinon (imenovan tudi koencim Q10)-Kompleks III (Chen in sod., 2005).

Ksantinska oksidaza (XO)

XO se nahaja v endoteliju številnih organov in povzroča tvorbo superoksidnih radikalov med katalizo oksidacije hipoksantina do uratov. Poškodbe tkiv povzročene zaradi aktivnosti XO so odvisne od razporeditve XO v različnih tkivih. XO se nahaja v dveh oblikah, in sicer kot XO in ksantin dehidrogenaza. V bazalnih pogojih je v vseh tkivih prisotna ksantin dehidrogenaza, XO pa nastaja z oksidacijo ali proteolitsko cepitvijo ksantin dehidrogenaze (povzeto po Catalgol in Ozer, 2010). V primeru reperfuzijskih poškodb, hepatitisa in ateroskleroze se plazemski nivo XO in njena aktivnost vezave na žilne celice zviša (Ray in Shah, 2005). V *in vivo* eksperimentih s hiperholesterolemijo XO stimulira tvorbo prostih radikalov, kar zmanjšuje aktivnost dušikovega oksida (NO) (Antonidaes in sod., 2006). Dodatni dokazi, ki podpirajo vpletenost XO v aterogenezi so: i) povišan nivo XO so potrdili pri pacientih z akutnim koronarnim sindromom, kar velja tudi za NAD(P)H; ii) pri mladih, asimptomatskih pacientih z družinsko hiperholesterolemijo se že kaže povečana aktivnost XO (Spiekermann in sod., 2003).

NADPH oksidaza

NADPH oksidaza sodeluje v elektronski prenašalni verigi celičnega dihanja. Odkrili so jo v nevtrofilcih, kjer katalizira redukcijo kisika v superoksid, pri čemer se NADPH porablja kot donor elektronov in z baktericidno aktivnostjo igra pomembno vlogo v imunskem odgovoru (Dworakowski in sod., 2006, Li in sod., 2003 in Jin in sod., 2007).

Encimski sistem NADPH oksidaza ima pomembno vlogo tudi pri tvorbi ROS v fibroblastih, gladkomišičnem sloju žil in v endotelijskih celicah. Podenote NADPH oksidaze so prisotne v vseh človeških žilah (tudi v aterosklerotičnih koronarnih arterijah), kar kaže na njihovo pomembno vlogo pri srčno-žilnih obolenjih (Channon in sod., 2002 in Park in sod., 2005).

Mieloperoksidaze (MPO)

Mieloperoksidaze uporabljajo vodikov peroksid za tvorbo močnejših oksidantov v aktiviranih fagocitih. V kombinaciji z NADPH mieloperoksidaze tvorijo hipoklorovo kislino in njene derivate, ki vodijo do endotelijskih poškodb (Bergt in sod., 2004). MPO ima pomembno vlogo tudi pri bolnikih s hiperholesterolemijo (Catalgol in Ozer, 2010).

Lipoksigenaze

Lipoksigenaze so družina železo-vsebujočih encimov, ki katalizirajo dioksidacijo polinenasičenih maščobnih kislin v lipidih s cis,cis-1,4-pentadien strukturo. S svojim delovanjem tvorijo družino biološko aktivnih maščob, kamor uvrščamo prostaglandine, tromboksane in levkotriene (vsi trije sodelujejo v vnetnih reakcijah in povečujejo propustnost žil) (Catalgol in Ozer, 2010).

Omenjeni so le nekateri znotrajcelični sistemi, v katerih ima redoks signaliziranje pomembno vlogo. Če povzamemo sklep vseh CAA poskusov, lahko zapišemo naslednje: za normalno celično delovanje je nujno potrebno redoks ravnotežje med oksidanti in kisikovimi reaktivnimi zvrstmi. V primeru ishemično-reperfuzijskih poškodb (in drugih celičnih stresorjev) pride do pospešene tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti. V tem primeru je zaščitno delovanje usmerjeno predvsem v nevtralizacijo eksogenega ROS, ki izvira iz aktiviranih nevtrofilcev, kar smo simulirali s CAA poskusi. V primeru, ko nimamo patološkega stanja eksogenega izvora ROS, pa antioksidanti delujejo zaščitno preko nevtralizacije endogene tvorbe

ROS v celicah. To upočasnjuje vse znotrajcelične poškodbe zaradi oksidativnega stresa. Za normalno celično delovanje je torej nujno potrebno ustrezno razmerje med prooksidativnim in antioksidativnim delovanjem.

6.5 Ovrednotenje metod in rezultatov

Z ozirom na Grafe 2 in 4 ter ostale grafe v poglavju zbranih rezultatov lahko trdimo, da smo z Vernierjevim svetlobnim senzorjem uspeli zbrati relevantne rezultate, ki se skladajo z literaturo. Kakor Farusi (2009), smo najvišji antioksidativni potencial izmerili pri espresso kavi in zelenem čaju, z njegovimi rezultati pa se skladajo tudi ostali vzorci, ki smo jih uporabili oboji. Kljub temu pa se v našem postopku pojavljajo tudi slabosti, večinoma povezane z motnjami merjenja svetlobnega toka skozi Briggs-Rauscherjev sistem. Prva pomembna motnja, ki je vplivala na tok svetlobe, je magnetno mešalo, ki je bilo sicer nameščeno nižje od horizontalnega toka svetlobe od LED diode do sensorja, a je kljub temu tu in tam preskočilo in se vmešalo v svetlobni tok, kar se na grafih pozna kot krajše vertikalne črte, odstopajoče od generalnega trenda v svetlobnem toku. V primeru espresso kave in zelenega čaja je bila inhibicija tako dolga, da je nismo uspeli zabeležiti, na tok svetlobe pa je pomembno vplival vrtinec pene, ki se je oblikoval zaradi mešanja. Posledično smo v primeru kave dobili inhibicijski čas z zelo nizko vrednostjo svetlobe skozi raztopino, čeprav je bila njena barva jantarna in ne modro-črna. Naslednja pomanjkljivost je ta, da med merjenjem po dolivanju raztopine 1 v sistem in dodajanju vzorca čaše z raztopino nismo pokrili, tako da so luči laboratorija in zunanja svetloba z zgornje strani vplivale na zaznavanje svetlobnega sensorja.

Med optimizacijo vzorcev smo ugotovili, da je Briggs-Rauscherjev sistem zelo občutljiv na koncentracijo dodanega vzorca, prav tako pa mora biti koncentracija vseh ostalih reagentov čim natančnejša, kar je z našo tehtnico pomenilo natančnost $\pm 0,01$ g. Ko smo z optimizacijo določali najprimernejšo koncentracijo vzorcev, smo sistem testirali po korakih z 1 g vzorca na 70 ml, 80 mL, 90 mL, itd. do 200 mL in dosegli najboljši rezultat pri 1 g vzorca na 100 mL destilirane vode. Cervelatti (2001) navaja, da se s spremembo koncentracije vzorca za 10 % inhibicijski čas spremeni kar za 50 % (korelacija je seveda pozitivna), torej bi morali koncentracije vzorcev optimizirati po veliko manjših korakih, denimo po 2,5 mL, kar pa bi zahtevalo ogromno časa in kemikalij.

V CAA poskusih je možen vir ekperimentalnih napak hitra oksidacija EGCG v stiku z zrakom, torej v našem primeru med tehtanjem EGCG za pripravo standardne EGCG raztopine. Obstaja verjetnost, da je EGCG minimalno oksidiral in s tem izgubil del celotnega antioksidativnega potenciala. Kljub temu naši rezultati ostajajo relevantni, saj smo vse EGCG koncentracije pripravljali z redčenjem iz standardne EGCG raztopine, torej je v primeru oksidacije EGCG na zraku napaka v vseh eksperimentih enaka.

6.6 Mogoče izboljšave v eksperimentu

Kljub temu, da smo v naši raziskavi dobili zadovoljive rezultate, obstajajo številni načini, s katerimi bi naše metode in posledično rezultate lahko nadalje izboljšali. Da bi se izognili neželenemu vplivu magnetnega mešala na merjenje svetlobe bi lahko reakcijo izvedli v ožji čaši, v kateri bi svetlobni senzor in vir svetlobe namestili višje in s tem zmanjšali vmešavanje magnetnega mešala v svetlobni tok. Na drugi strani je slaba stran ožje čaše višja mešalna tromba, zato bi morali praktično preveriti ali je ožja čaša smiselna izboljšava eksperimenta. Ob tem ni mogoče zmanjšati frekvence mešanja (kar bi zmanjšalo mešalno trombo), saj je to kontrolna spremenljivka in ima signifikantni vpliv na učinek mešanja po vseh višini kakor tudi na hitrost samih oscilacij. Prav tako bi lahko s pokrivanjem raztopine Briggs-Rauscherjeve reakcije minimizirali vpliv laboratorijskih luči in zunanje svetlobe.

Namesto indirektnega merjenja oscilacij v Briggs-Rauscherjevem sistemu bi lahko uporabili jodoselektivno elektrodo ali platinovo elektrodo, ki bi nam dali direktni vpogled v nihanje koncentracij joda, jodida in jodata v sistemu, prav tako pa bi lahko konkretnije komentirali spremembe električne napetosti v posameznih fazah reakcije, kar je posledica redoks reakcij v mehanizmu. Obstajajo tudi številne modifikacije Briggs-Rauscherjevega sistema, v katerem je z dodatkom različnih kemikalij oscilacije mogoče zaznavati tudi s kemiluminiscenco. Briggs-Rauscherjeva reakcija pa še zdaleč ni edina metoda za merjenje antioksidativnega potenciala, saj je za industrijsko določanje preveč komplicirana in predolga. Komerzialno najmanj zahtevno metodo v svojem delu opisujejo Costin et al. (2003). Gre za metodo, ki je, kot Briggs-Rauscherjeva reakcija, potenciometrična – antioksidativni potencial je določen s pomočjo pretočne ali sekvenčne injekcijske analize.

7 Viri

- Amic, R., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Trinajstic, N. 2003. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Antioxidants. *Croatica Chemica Acta* 76(1): 55-61.
- Antoniadou, C., Tousoulis, D., Marinou, K., Stefanadi, E., Ntarladimas, I., Latsis, G., Konniari, K., Papageorgiou, N., Siasos, G., Stefanadis, C. 2006. Effects of lipid profile on forearm hyperemic response in young subjects. *Hellenic J Cardiol* 47: str.: 152-157.
- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. 2002. Method for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, str.: 183-193.
- Atkins, P. W. 2001. *Physical chemistry*. Sixth edition. Oxford University Press, str.: 807-813.
- Barerra, G. 2012. *Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy*. ISRN Oncology. (<http://www.hindawi.com/isrn/oncology/2012/137289/>, dosegljivo 1. 2. 2013).
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman S. 2006. Phenolic Compounds in Plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191-203.
- Bergt, C., Pennathur, S., Fu, X. in sod. 2004. The mieloperoxidase product hypochorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA-1 dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: str.: 529-541.
- Bertalancic, L. 2011. The influence of solvent on determined antioxidant activity of wines and model antioxidants. University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, p.p. 4-5. (Accessed July 8th, 2012. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_bertalancic_laura.pdf.)

- Bornsek Moze, S., Ziberna, L., Polak, T., Vanzo, A., Poklar Ulrih, N., Abram, V., Tramer, F., Passamonti, S. 2012. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intercellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry* 134: 1878-1884.
- Bornsek Moze, S. 2012. Bioefficacy of anthocyanins from bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.). Doctoral dissertation. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, str.: 15.
- Bouayed, J., Bohn T. 2010. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3(4): str.: 228-237.
- Brežan, S. 2003 Kisikovi prosti radikali – toksičnost kisika in bolezni. Seminarska naloga. Ljubljana Medicinska fakulteta.
- Briggs, T. S., Rauscher, W. C. 1973. An oscillating iodine clock. *Journal of Chemical Education* 50: 496.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Parragio, M., Viggiano, M., Lattanzio, V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91: 108-110.
- Cervellati, R., Höner, K., Furrow, S. D., Neddens, C., Costa, S. 2001. The Briggs-Rauscher Reaction as a Test to Measure the Activity of Antioxidants. *Helvetica Chimica Acta* 84: 3533-3546.
- Cell Biolabs. 2012. Procesiranje DCFH-DA v DCFH in naprej v DCF. (<http://www.cellbiolabs.com/reactive-oxygen-species-ros-assay>, dostopno 17. 12. 2012).
- Cervellati, R., Perellino-Crespi, N., Furrow, S. D., Minghetti, A. 2000. Inhibitory Effects by Soy Antioxidants on the Oscillations of the Briggs-Rauscher Reaction. *Helvetica Chimica Acta* 83, 12: 3179-3190.
- Cervellati, R., Greco, E., Furrow, S. D. 2010. Experimental and mechanistic investigation of an iodomalonic acid-based Briggs-Rauscher oscillator and its perturbations by Resorcinol. *Journal of Physical Chemistry* 114: 12888-12892.

- Channon, K. M., Guzik, T. J. 2002. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* 53 (3): str.: 515-524.
- Chen, Y. R., Chen, C. L., Zhang, L., Green-Church, K. B., Zweier, J. L. 2005. Superoxide generation from mitochondrial NADH dehydrogenase induces self activation with specific protein radical formation. *Journal of Biological Chemistry* 280 (45), str.: 37339-373348.
- Costin, J. W., Barnett, N. W., Lewis, W. S., McGillivray, D. 2003. Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Analitica Chimica Acta* 499, str.: 47-56.
- Cuderman, P. 2004. Sequential injection analysis. University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology. (http://abra.fkkt.uni-lj.si/pihlar/AA2003_04/sia_princip.pdf. Dosegljivo 9. 7. 2012)
- Dworakowski, R., Anilkumar, N., Zhang, M., Shah, A. M. 2006. Redox signaling involving NADPH-oxidase derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 34: str.: 960-964.
- Farkas, O., Jakus, J., Heberger, K. 2004. Quantitative Structure – Antioxidant Activity Relationships of Flavonoid Compounds. *Molecules* 9: 1079-1088.
- Field, R. J., Schneider, F., W. 1989. Oscillating Chemical Reactions and Nonlinear Dynamics. *Journal of Chemical education* 66 (3): 195 – 204.
- Fujieda, S., Ogata, H. 1996. Calorimetry and potentiometry of chemical oscillations in Briggs-Rauscher reactions with simultaneous measurements of the produced oxygen volume. *Talanta* 43.
- Furrow, D. S., Greco, E., Cervellati, R. 2010. Experimental and Mechanistic Investigation of an Iodomalonic Acid Based Briggs-Raucher Oscillator and its Perturbations by Resorcinol. *Journal of Physical Chemistry*, 114, str.: 12888-12892.
- Javanmardi, J., Stuscnoff, C., Loce, E., Vivanco J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 83: 547–550

- S., Yi, F., Li, P. L. 2007. Contribution of lysosomal vesicles to the formation of lipid raft redox signalling platforms in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 9 (9): str.: 1417-1426.
- Katiyar, S.K., Perez, A., Mukhtar, H. 2000. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. *Clin Cancer Res*. 10: 3864–3869.
- Kluth, D., Banning, A., Paur, I., Blomhoff, R. 2007. Modulation of pregnane X receptor- and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. *Free radical biology and medicine* 42(1): 315-325.
- Kotz, J. C., Treichel, P. M., Townsend, J. R. 2012. *Chemistry and Chemical Reactivity*. Eighth edition. Brooks/Cole, Cengage Learning, str.: 861.
- Lawson, T., Fülöp, J., Wittmann, M., Nosztizcius, Z., Muntean, N., Szabo, G. 2009. Reaction routes leading to CO₂ and CO in the Briggs-Rauscher oscillator: analogies between the oscillatory BR and BZ reactions. *Journal of Physical Chemistry* 113: 14095-14101.
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. 2004. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *Journal of Physical Chemistry* 108: 4916-4922.
- Li, J. M., Shah, A. M. 2003. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetes nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: str.: 221-226.
- Lloyd, R. V., Hanna, P. M., Mason, R. P. 1997. The origin of the hydroxide radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine* 22(5).
- Lumsden J., Cammack R., Hall, D. 1976. Purification and physicochemical properties of superoxide dismutase from two photosynthetic microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 438(2), str.: 380-394.
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C., Toth, I. V., Rangel, A. O. S. 2007. Automatic flow system for sequential determination of ABTS•+ scavenging

capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products. *Analytica Chimica Acta* 592: 193-201.

- Mereles, D., Hunstein, W. 2011. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises? *International Journal of Molecular Sciences*. 12, str.: 5592-5603.
- Muntean, N., Thuy, L., Kaly-Kullai, K., Wittmann, M., Noszticzius, Z., Onel, L., Furrow, S. D. 2012. Measurement of Hypoiodous Acid Concentration by a Novel Type Iodide Selective Electrode and a New Method To Prepare HOI. Monitoring HOI Levels in the Briggs-Rauscher Reaction. *The Journal of Physical Chemistry: A-I*.
- Murphy, P A., Song, T., Buseman, G., Barua, K. 1998. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, str.: 1474-1479.
- Nagle, D. G., Ferreira, D., Zhou, Y-D. 2006. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and Biomedical perspectives. *Phytochemistry* 67, 1849-1855.
- Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. 2010. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, doi: 10.1093/database/bap024. Accessed July 8th. <http://www.phenol-explorer.eu/>.
- Park, J. Y., Ferrel, R. E., Park, J. J., Hagberg, J. M., Phares, D. A., Jones, J. M., Brown, M. D. 2005. NADPH oxidase p22phox gene variants are associated with systemic oxidative stress biomarker responses to exercise training. *J Appl Physiol* 99: str.: 1905-1911.
- Pieta P.G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- Pečovnik, B. 2012. Povezanost polimorfizmov v genih SLCO1B1 in SLCO1B3 s koncentracijami bilirubina pri bolnikih z Golbertovim sindromom. Diplomsko delo. Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani.

- Ramesh, E., Geraldine, P., Thomas, P. A. 2010. Regulatory effect of epigallocatechin gallate on the expression of C-reactive protein and other inflammatory markers in an experimental model of atherosclerosis. *Chemico-Biological Interactions* 183: 125–132.
- Ray, R., Shah, A. M. 2005. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science* 109, str.: 217-226.
- Rice-Evans, C. A, Miller, N. J., Paganga, G. 1995. Structure-Antioxidant activity Relationships of Flavonoids and Phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933-956.
- Saeed, S. A., Waqar, M. A., Zubairi, A. J., Bhurgri, K., Khan, A., Gowani, S. A. S., Waqar, S. N., Choudhary, C. I., Jalil, S., Zaidi, A. H., Ara, I. 2005. Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil. *JCPSP* 15(8): str.:507-514.
- Semenič, T. 2006. Vpliv antioksidativnih obrambnih sistemov kvasovk pri odpornosti na selen (VI). *Dilomsko delo*. Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.
- Shakashiri, B. Z. 1985. *Chemical Demonstrations. A Handbook for Teachers of Chemistry*. Volume 2. Madison, The University of Lincoln Press, str.: 232-307.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.
- Spikermann, S., Landmesser, U., Dikalov, S., Brecht, M., Gamez, G., Tatge, H., Reepschlager, N., Hornig, B., Drexler, H., Harrison, D. G. 2003. Electron spin resonance characterisation of vascular xanthine oxidase activity in patients with coronary heart disease. NAD(P)H relation to endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation* 107, str.: 1383-1389.
- Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Decandia, S., Albin, A., Nicotra, M. R., Natali, P. G., Baganto, A. 2012. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the endothelin axis and downstream signalling pathways in ovarian carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 1483-1492.

- Stanislavljev, D. R., Milenković, M. C., Mojović, M. D., Popović-Bijelić, A. D. 2011 (1). Oxygen Centered Radicals in Iodine Chemical Oscillators. *The Journal of Physical Chemistry* 115:7955-7958.
- Stanislavljev, D. R., Milenković, M. C., Mojović, M. D., Popović-Bijelić, A. D. 2011 (2). A potential source of free radicals in iodine-based oscillators. *The Journal of Physical Chemistry* 115:2247-2249.
- Stopar, D. (2007) Vpliv redoks potenciala na delovanje mikroorganizmov. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Šenk, N. (2006) Vrednotenje medu – zveza med barvo medu in antioksidativno aktivnostjo. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, (http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_senk_natasa.pdf, dosegljivo 23. 6. 2012).
- Šket, B., Dolenc, D., Bukovec, N. 2001. Kemija za gimnazije 2. Ljubljana, DZS.
- Škulj, A. 2012. Vpliv genskih sprememb v genih GSR, GSTTI in GSTMI na koncentracije težkih kovin pri nosečnicah. Diplomsko delo. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J-O., Domes, J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests *Food Chemistry* 113: 1226–1233.
- Toimil, M., Orallo, F. 2007. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in Ca²⁺-permeable non-selective cation channels and voltage-operated Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Chemico-Biological Interactions* 183: 125–132.
- Uniprot. 2012. Glutation reductase enzyme. (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00390>, dosegljivo 27. 1. 2013).
- Vernier. 2012 (1). Light Sensor Specifications. Accessed July, 9th, 2012. <http://www.vernier.com/files/manuals/lis-bta.pdf>.

- Vernier. 2012 (2). Spectrophotometer Specifications. Accessed July, 9th, 2012. <http://www.vernier.com/files/manuals/v-spec.pdf>.
- Wanasundara, P., Shaidi F. 2005. Antioxidants: Science, Technology and Applications. Bailey's industrial oil and fat products, sixth edition. Sixth volume set, str.: 431-484.
- Wang, H., Bian, S., Yang, C. S. 2011. Green tea polyphenol EGCG suppresses lung cancer cell growth through upregulating miR-210 expression caused by stabilizing HIF-1 α . Carcinogenesis, Oxfordjournals (<http://carcin.oxfordjournals.org/content/early/2011/10/13/carcin.bgr218.full.pdf>, dostopno 1. 2. 2013).
- Wikipedia. 2013. Molekularorbital-Sauerstoff, (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Molekul%C3%B4rorbital-Sauerstoff.png>, dosegljivo 1.2. 2013).
- Winston, M. 2008. Mechanisms of singlet oxygen reactions. Stolz research group. (http://stoltz.caltech.edu/seminars/2008_Winston.pdf, dosegljivo 1. 2. 2013).
- Weingerl, V., Štrlič, M., Kočar, D. 2010. Evaluation of the chemiluminometric method for determination of polyphenols in wine. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede.
- Weingerl, V., Štrlič, M., Kočar, D. 2009. Comparison of Methods for Determination of Polyphenols in Wine by HPLC-UV/VIS, LC/MS/MS and Spectrophotometry. Acta Chimica Slovenica 56, str.: 698-703.
- Williamson, G., Dionisi, F., Renouf, M. 2011. Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. Molecular nutrition and food research 55(6): str.: 864-873.
- Wolfe, K. L., Liu, R. H. 2007. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. Journal of Agricultural Food Chemistry 55: 8896-8907.

- Wolfram, S. 2007. Effects of Green Tea and EGCG on Cardiovascular and Metabolic Health. *Journal of the American College of Nutrition* 4:26, str.: 3735-3885.
- Wollin, S. D., Jones, P. J. H. 2003. Alpha Lipophilic Acid and Cardiovascular Disease. *The Journal of Nutrition* 133(11): str.: 3327-3330.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., Di Labio, G. A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidant: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of American Chemical Society* 123(6): 1173-1183.
- Yoshiki, Y., Yamanaka, T., Satake, K., Okubo, K. 1999. Chemiluminescence properties of soybean protein fraction in the hydroperoxide and hydrogen donor system. *Luminiscenc* 14(6), str.: 315-319.
- Žiberna, L., Drevenšek, G., Tramer, F., Passamonti, S. 2009. Cellular antioxidant activity of bilirubin in the human endothelial cell line EA.hy 926 is mediated by bilitranslocase. *BMC Pharmacology* 9(2): A57.
- Žiberna L, Lunder M, Moze S, Vanzo A, Tramer F, Passamonti S, et al. 2010. Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc Toxicol.* 10(4):283–94.
- Žiberna, L., Tramer, F., Može, S., Vrhovšek, U., Mattivi, F., Passamonti, S. 2012. Transport and bioactivity of cyanidin-3-glucoside into the vascular endothelium. *Free radical biology & medicine* 52: 1750-1759.

8 Zahvala

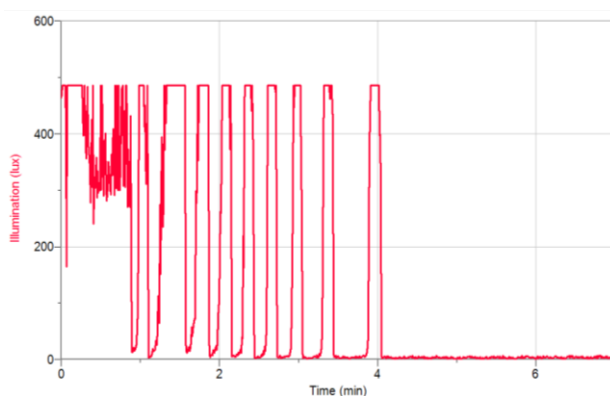
Za pomoč pri pripravi raziskovalne naloge se v največji meri zahvaljujem obema mentorjema, ki v skladu s pravili razpisa Mladi za napredek Maribora ostajata anonimna.

Zahvaljujem se jima za omogočenje laboratorijskega dela v ustrezno upremljenih laboratorijih, pomoč pri pripravi protokolov, laboratorijskem delu, iskanju literature, dolgotrajnih postopkih optimizacije laboratorijskih metod in za usmeritve pri diskusiji rezultatov.

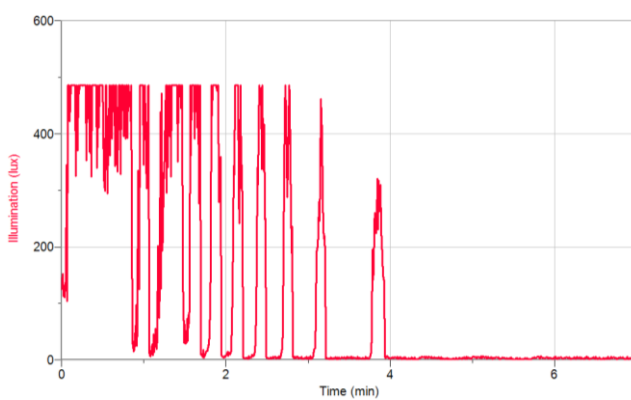
Za finančno pomoč pri nabavi kemikalij se zahvaljujem tudi šoli.

9 Priloge

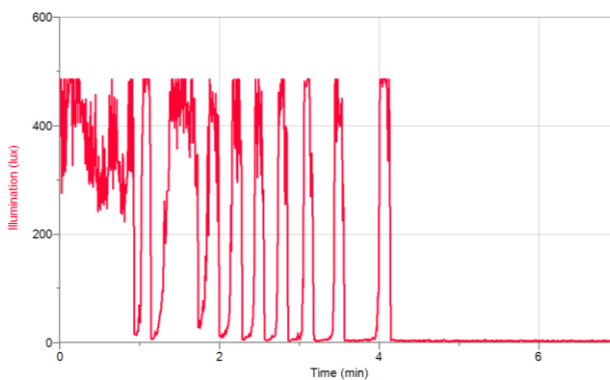
9.1 Grafi meritev celokupne antioksidativne kapacitete



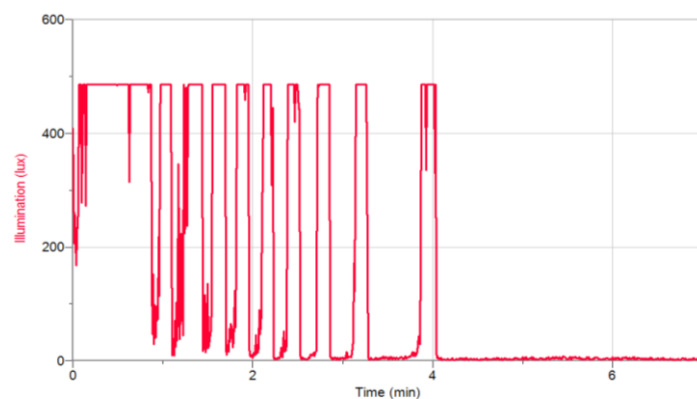
Graf 7: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca belega grozdja.



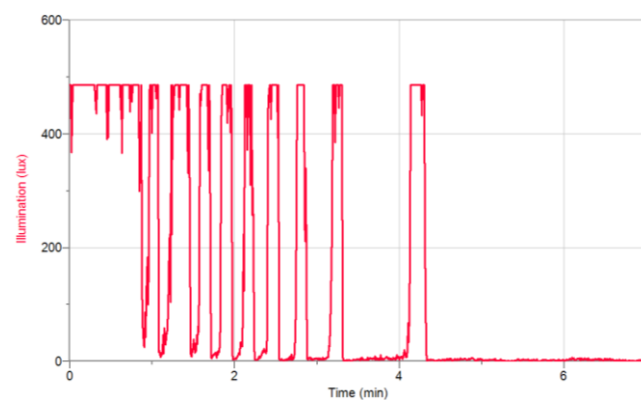
Graf 8: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca česna.



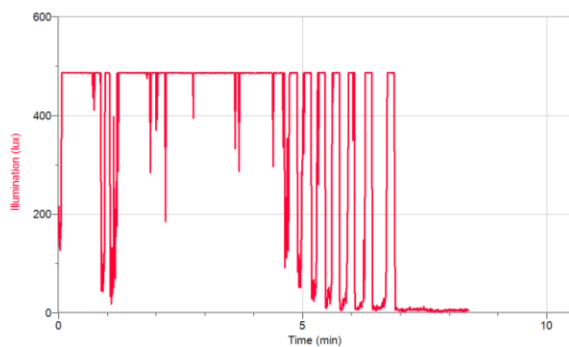
Graf 9: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca črnega grozdja.



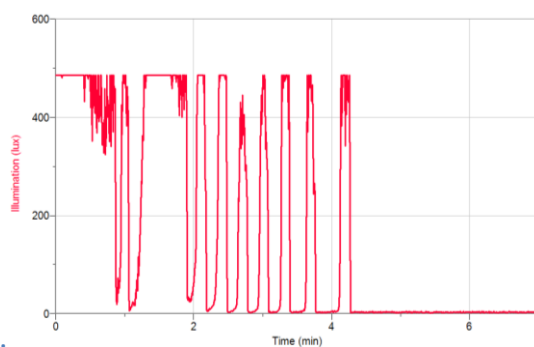
Graf 10: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca korenja.



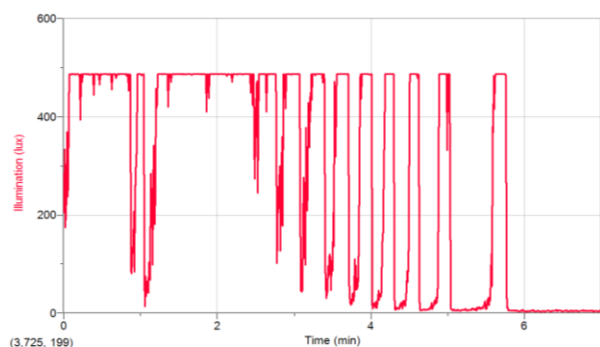
Graf 11: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca kivija.



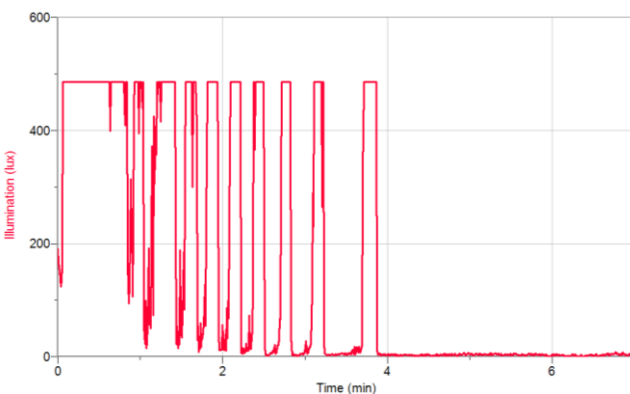
Graf 12: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca brusnične marmelade.



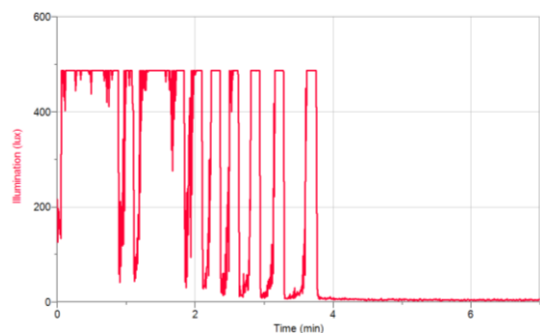
Graf 16: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca drobnjaka.



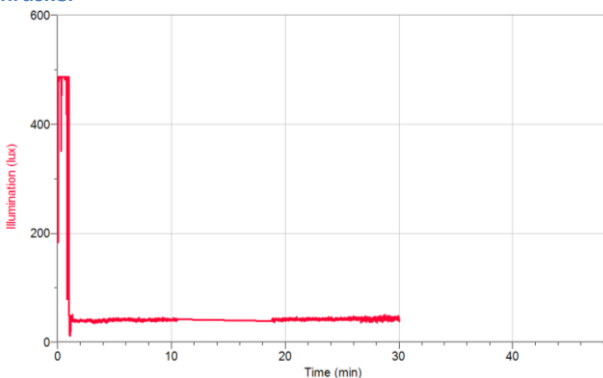
Graf 13: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca domače češpljeve marmelade.



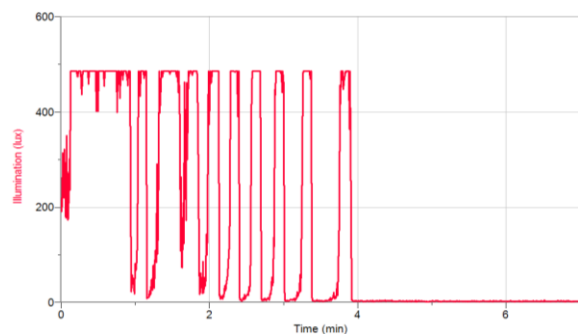
Graf 17: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca hruške.



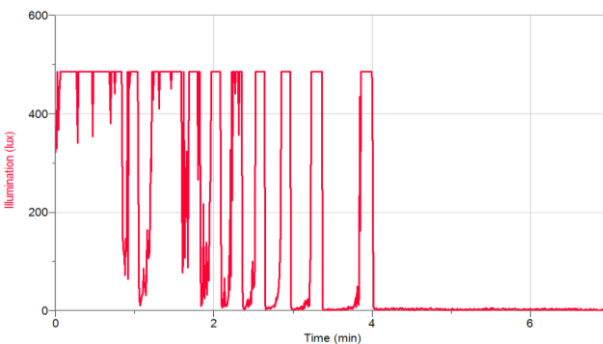
Graf 14: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca domače jagodne marmelade.



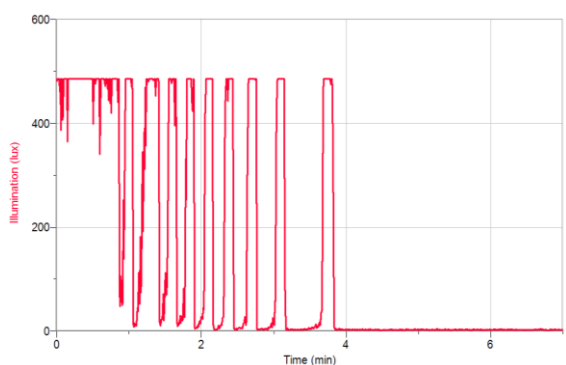
Graf 18: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca espresso kave



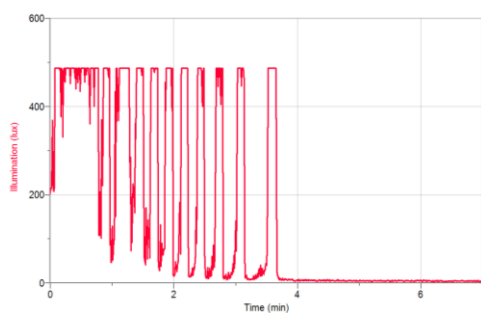
Graf 15: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca češnjke.



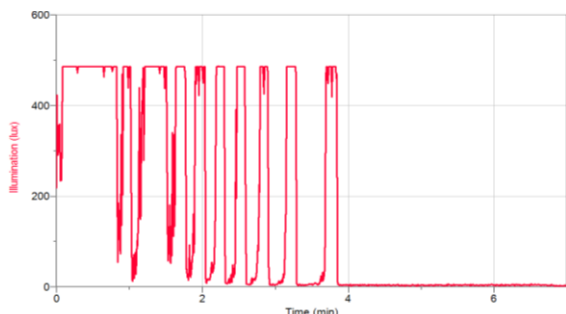
Graf 19: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca maline.



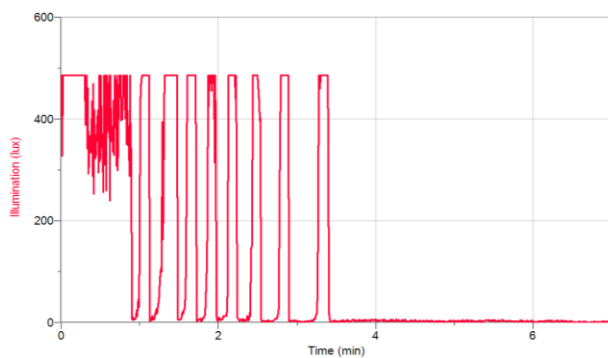
Graf 20: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca marelice.



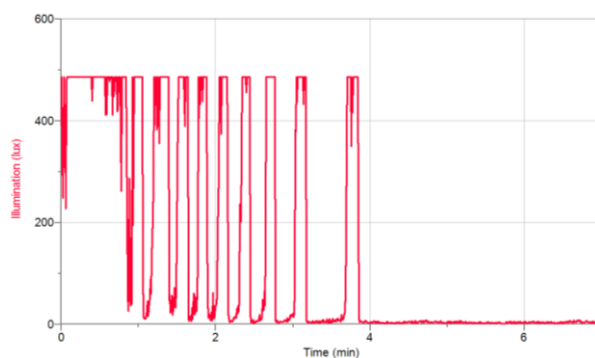
Graf 21: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca nektarine.



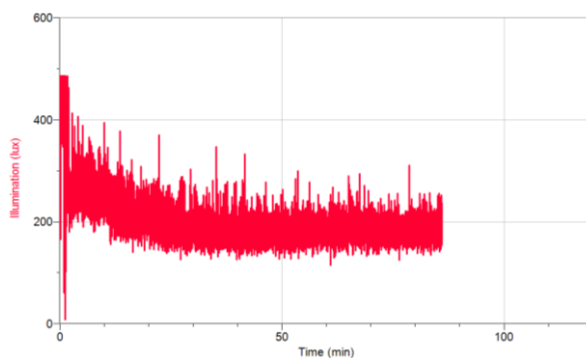
Graf 22: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca rabarbare.



Graf 237: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca rdeče paprike.



Graf 24: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca zelenega jabolka.



Graf 25: Oscilacije v BR sistemu po dodatku vzorca zelenega čaja.

9.2 Polifenolna sestava vzorca zelenega jabolka

		mean content	min	max
Fruits and fruit products - Fruits - Pomes - Apple [Dessert], whole				
Flavonoids				
Anthocyanins	Cyanidin 3-O-galactoside	0.81 mg/100 g FW	0.00	3.11
	Cyanidin 3-O-arabinoside	0.06 mg/100 g FW	0.00	0.17
	Cyanidin 3-O-xyloside	0.06 mg/100 g FW	0.00	0.21
Dihydrochalcones	Phloridzin	2.75 mg/100 g FW	0.64	9.11
	Phloretin 2'-O-xylosyl-glucoside	2.60 mg/100 g FW	0.88	7.99
	3-Hydroxyphloretin 2'-O-glucoside	0.11 mg/100 g FW	0.00	0.29
Flavanols	(+)-Catechin	1.24 mg/100 g FW	0.00	3.40
	(-)-Epicatechin	8.33 mg/100 g FW	1.80	19.16
	Procyanidin dimer B2	14.56 mg/100 g FW	0.90	38.46
Flavonols	Quercetin	0.13 mg/100 g FW	0.00	0.22
	Quercetin 3-O-galactoside	2.36 mg/100 g FW	0.96	4.80
	Quercetin 3-O-glucoside	0.64 mg/100 g FW	0.20	2.40
	Quercetin 3-O-xyloside	0.78 mg/100 g FW	0.50	2.28
	Quercetin 3-O-rhamnoside	1.33 mg/100 g FW	0.52	5.30
	Quercetin 3-O-rutinoside	0.23 mg/100 g FW	0.10	0.45
	Quercetin 3-O-arabinoside	1.40 mg/100 g FW	0.72	4.44
Phenolic acids				
Hydroxybenzoic acids	Gentisic acid	0.22 mg/100 g FW	0.13	0.29
	Syringic acid	0.90 mg/100 g FW	0.00	2.63
Hydroxycinnamic acids	p-Coumaric acid	0.29 mg/100 g FW	0.00	0.95
	5-p-Coumaroylquinic acid	1.05 mg/100 g FW	1.00	1.10
	4-p-Coumaroylquinic acid	2.25 mg/100 g FW	0.32	6.77
	Caffeic acid	0.42 mg/100 g FW	0.00	1.30
	Ferulic acid	0.06 mg/100 g FW	0.00	0.21
	4-Caffeoylquinic acid	0.54 mg/100 g FW	0.00	0.76
	5-Caffeoylquinic acid	13.25 mg/100 g FW	1.60	43.00

Slika 2: Polifenolna sestava vzorca zelenega jabolka.

9.3 Polifenolna sestava vzorca nektarine

		mean content	min	max
Fruits and fruit products - Fruits - Drupes - Nectarine, whole				
Flavonoids				
Anthocyanins	Malvidin 3,5-O-diglucoside	0.30 mg/100 g FW	0.00	1.78
Flavanols	(+)-Catechin	4.72 mg/100 g FW	1.09	11.29
	Procyanidin dimer B1	9.95 mg/100 g FW	2.80	17.17
Flavonols	Quercetin 3-O-glucoside	0.11 mg/100 g FW	0.00	0.47
	Quercetin 3-O-rutinoside	0.10 mg/100 g FW	0.00	0.56
Phenolic acids				
Hydroxycinnamic acids	3-Caffeoylquinic acid	3.96 mg/100 g FW	1.83	6.16
	5-Caffeoylquinic acid	6.08 mg/100 g FW	3.49	8.61

Slika 3: Polifenolna sestava vzorca nektarine.

9.4 Podatki za računanje števila vseh hidroksilnih skupin v 100 g zelenega jabolka in nektatine

Tabela 2: Podatki za računanje števila vseh hidroksilnih skupin v 100 g zelenega jabolka v skladu z njegovo vsebnostjo čistih antioksidantov (Neveu et al. 2010).

Čisti antioksidant	m(Ar) [g]	M(Ar) [g/mol]	N(ArOH) na 1 molekulo	Skupni N(ArOH)
Cyanidin 3-O-galactoside	0,00081	449	8	8,69E+18
Cyanidin 3-O-arabinoside	0,00006	419	7	6,03E+17
Cyanidin 3-O-xyloside	0,00006	419	7	6,03E+17
Phloridzin	0,00275	436	7	2,66E+19
Phloretin 2'-O-xylosyl-glucoside	0,0026	568	9	2,48E+19
3-Hydroxyphloretin 2'-O-glucoside	0,00011	452	8	1,17E+18
(+)-Catechin	0,00124	290	5	1,29E+19
(-)-Epicatechin	0,00833	290	5	8,65E+19
Procyanidin dimer B2	0,01456	578	10	1,52E+20
Quercetin	0,00013	302	5	1,3E+18
Quercetin 3-O-galactoside	0,00236	464	8	2,45E+19
Quercetin 3-O-glucoside	0,00064	464	8	6,64E+18
Quercetin 3-O-xyloside	0,00078	434	7	7,57E+18
Quercetin 3-O-rhamnoside	0,00133	448	8	1,43E+19
Quercetin 3-O-rutinoside	0,00023	611	11	2,49E+18

Quercetin 3-O-arabinoside	0,0014	434	7	1,36E+19
Gentisic acid	0,00022	254	3	1,56E+18
Gentisic acid	0,0009	198	2	5,47E+18
p-Coumaric acid	0,00029	164	2	2,13E+18
5-p-Coumaroylquinic acid	0,00105	338	5	9,35E+18
4-p-Coumaroylquinic acid	0,00125	338	5	1,11E+19
Caffeic acid	0,00042	180	3	4,21E+18
Ferulic acid	0,00006	194	2	3,72E+17
4-Caffeoylquinic acid	0,00054	354	6	5,51E+18
5-Caffeoylquinic acid	0,01325	354	6	1,35E+20
Vsota zeleno jabolko N(ArOH)	5,58753E+20			

Tabela 4: Podatki za računanje števila vseh hidroksilnih skupin v 100 g nektarine v skladu z njeno vsebnostjo čistih antioksidantov (Neveu et al. 2010).

Čisti antioksidant	m(Ar) [g]	M(Ar) [g/mol]	N(ArOH) na 1 molekulo	Skpni N(ArOH)
Malvidin 3,5-O-diglucoside	0,0003	656	10	2,75E+18
(+)-Catechin	0,00472	290	5	4,9E+19
Procyanidin dimer B2	0,00995	578	10	1,04E+20
Quercetin 3-O-glucoside	0,00011	464	8	1,14E+18
Quercetin 3-O-rutinoside	0,0001	611	11	1,08E+18
3-Caffeoylquinic acid	0,00396	354	6	4,04E+19

5-Caffeoylquinic acid	0,00608	354	6	6,2E+19
Vsota nektarina N(ArOH)	2,60042E+20			