

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nina MIKLIČ

**DOLOČANJE ANTOOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI
URINA Z METODO ABTS**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nina MIKLIČ

**DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI URINA Z
METODO ABTS**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION OF URINE WITH
ABTS METHOD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na katedri za tehnologijo, prehrano in vino, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Marjan Simčič in za recenzenta doc. dr. Blaž Cigić.

Mentor: prof. dr. Marjan Simčič

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Nina Miklič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 577.1: 612.461: 543.637 (043) = 163.6
- KG antioksidanti / antioksidativna aktivnost / urin / kreatinin / prehrana / skladiščenje urina / temperatura skladiščenja / čas skladiščenja / ABTS
- AV MIKLIČ, Nina
- SA SIMČIČ, Marjan (mentor) / CIGIĆ, Blaž (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2012
- IN DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI URINA Z METODO ABTS
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 47 str., 4 pregl., 17 sl., 3 pril., 53 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V okviru diplomskega dela smo določali antioksidativno aktivnost urina pri zdravem posamezniku. V raziskavi je sodelovalo deset posameznikov, ki so pet dni uživale posebej pripravljene obroke, ki so bili pripravljeni po priporočilih za zmanjšanje tveganja nastanka kroničnih bolezni in bolezni srca in ožilja. Za določanje vsebnosti izločenih antioksidantov v urinu posameznikov, smo uporabili indirektno metodo ABTS. S pomočjo analiz urina lahko neinvazivno določimo parametre, ki opredelijo antioksidativni status posameznika. Pri vzorcih, ki so odvzeti v različnih obdobjih dneva, se lahko pojavi večje razlike v antioksidativni aktivnosti urina. Ugotovili smo, da je korelacija med količino antioksidantov v 24-ih urah in koncentracijo antioksidantov jutranjega urina, normalizirano na kreatinin, statistično značilna in zmereno povezana ($p = 0,001$; $r = 0,472$). Zanimalo nas je tudi, kako različne temperature (-80 °C, -20 °C in 4-8 °C) in čas skladiščenja vplivajo na normalizirano antioksidativno aktivnost urina (nAA). Vzorci urina, shranjeni pri temperaturi -80 °C imajo največjo normalizirano antioksidativno aktivnost. Do majhnih izgub antioksidantov prihaja pri -20 °C in 4-8 °C. Količina antioksidantov je pri vseh pogojih shranjevanja maksimalna še pri 60. dneh skladiščenja, nato pride do zmanjšanja aktivnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 577.1: 612.461: 543.637 (043) = 163.6
- CX antioxidants / antioxidant activity / urine / creatinine / nutrition / storage of urine / storage temperature / storage time / ABTS
- AU MIKLIČ, Nina
- AA SIMČIČ, Marjan (supervisor) / CIGIČ, Blaž (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2012
- TI ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION OF URINE WITH ABTS METHOD
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 47 p., 4 tab., 17 fig., 3 ann., 53 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In our thesis we wanted to determine the antioxidant activity of urine of a healthy individual. There were 10 female individuals who have enjoyed of specially prepared meals five days that were prepared following the recommendations for reducing the risk of chronic diseases and cardiovascular diseases. We used the indirect ABTS method to determine the quantity of eliminated antioxidants in their urine. With urine analysis we can determine the parameters that define the antioxidant status of a person in a non-invasive way. Noticeable differences in the antioxidant activity of urine can appear in samples taken in different periods of the day. We discovered that the correlation between the quantity of antioxidants in 24 hours and the concentration of morning urine antioxidants, normalized to creatinine is statistically typical and have statistically moderate relation ($p = 0,001$; $r = 0,472$). We also wanted to find out how different temperatures (-80 °C, -20 °C in 4-8 °C) and the time of storage affect the normalized antioxidant activity (nAA) in urine. Urine samples stored at -80 °C have the highest antioxidant activity normalized. There are small losses of antioxidants at the temperatures of -20 °C and 4-8 °C. The quantity of antioxidants is at its maximum at all temperatures until 60. days of storage. After that, the activity becomes lower.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|---|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VII |
| KAZALO SLIK | VIII |
| KAZALO PRILOG | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN DELA..... | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 URIN | 3 |
| 2.1.1 Transport, hranjenje in stabiliziranje urina..... | 4 |
| 2.1.2 Zbiralniki za enkratni odvzem urina | 5 |
| 2.2 SEČNA KISLINA | 6 |
| 2.2.1 Lastnosti sečne kisline..... | 6 |
| 2.3 KREATININ | 7 |
| 2.4 ANTIOKSIDANTI..... | 8 |
| 2.5 PROSTI RADIKALI | 9 |
| 2.5.1 Vpliv antioksidantov | 9 |
| 2.6 STABILNOST ANTIOKSIDANTOV | 10 |
| 2.7 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST | 11 |
| 2.7.1 Metode za določanje antioksidativne aktivnosti..... | 11 |
| 2.7.1.1 DPPH metoda | 12 |
| 2.7.1.2 ABTS metoda (2,2'-azobis[3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina])..... | 13 |
| 2.7.1.2.1 Troloks | 15 |
| 2.7.1.3 FRAP metoda..... | 16 |
| 2.7.1.4 ORAC metoda..... | 16 |
| 2.8 VPLIV SKLADIŠČENJA NA ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOST URINA .. | 16 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 17 |
| 3.1 ZBIRANJE VZORCEV URINA | 17 |
| 3.1.1 Prvi jutranji urin..... | 17 |
| 3.1.2 24 urni urin | 17 |
| 3.1.3 Določanje AA urina desetih posameznic pet zaporednih dni..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.4 Določanje AA urina v določenih časih skladiščenja..... | 18 |
| 3.2 ANALIZA VZORCEV URINA Z METODO ABTS | 19 |
| 3.2.1 Reagenti..... | 20 |
| 3.2.2 Pribor..... | 20 |
| 3.2.3 Antioksidativna aktivnost..... | 20 |
| 3.3 UREJANJE PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA | 21 |
| 4 REZULTATI | 23 |
| 4.1 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST URINA PRI DESETIH POSAMEZNICAH..... | 23 |
| 4.1.1 Povezava med količino antioksidantov 24-urnega urina in koncentracijo antioksidantov jutranjega urina, normalizirano na kreatinin | 25 |
| 4.2 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VZORCEV URINA PRI DOLOČENIH ČASIH SKLADIŠČENJA | 30 |
| 4.2.1 Normalizirana antioksidativna aktivnost (nAA) vzorcev urina v mg TE/mmol K, skladiščenih pri temperaturi: -20 °C, 4-8 °C in -80 °C | 31 |
| 4.2.1.1 Normalizirana antioksidativna aktivnost (nAA) šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi -20 °C | 31 |
| 4.2.1.2 Normalizirana antioksidativna aktivnost šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi 4-8 °C (hladilnik)..... | 32 |
| 4.2.1.3 Normalizirana antioksidativna aktivnost šestih vzorcev pri temperaturi skladiščenja -80 °C | 33 |
| 4.2.2 Spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti dveh različnih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi: -20 °C, -80 °C in 4-8 °C, izražene v % AA | 34 |
| 5 RAZPRAVA IN SKLEPI | 37 |
| 5.1 RAZPRAVA | 37 |
| 5.1.1 Variabilnost antioksidativne aktivnosti posameznih vzorcev urina znotraj posameznega dneva in primerjava antioksidativne aktivnosti urina s koncentracijo antioksidantov v jutranjem urinu | 37 |
| 5.1.2 Vpliv različne temperature (-80 °C, -20 °C in 4-8 °C) in časa skladiščenja na antioksidativno aktivnost urina | 39 |
| 5.2 SKLEPI | 41 |
| 6 POVZETEK..... | 42 |
| 7 VIRI | 43 |
| PRILOGE | |
| ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Podatki preiskovank, ki so sodelovale v poskusu..... | 17 |
| Preglednica 2: Dnevi meritev za analizo vzorcev urina v določenih časih skladiščenja... | 19 |
| Preglednica 3: Razredčitve za pripravo umeritvene krivulje..... | 21 |
| Preglednica 4: Izmerjene vrednosti sečnine, kreatinina in urata za vsak posamezen vzorec..... | 30 |

KAZALO SLIK

| | | |
|-----------|--|----|
| Slika 1: | Shema sestave urina (VŠZNJ, 2011) | 4 |
| Slika 2: | Zbiralnik urina (VŠZNJ, 2011)..... | 5 |
| Slika 3: | Struktorna formula sečna kislina (Zuo in sod., 2010) | 6 |
| Slika 4: | Struktorna formula kreatinina (Zuo in sod., 2010) | 7 |
| Slika 5: | ABTS in njegova eno-elektronska oksidacija produkta, ABTS ⁺ (Lee in Yoon, 2008) | 15 |
| Slika 6: | Struktorna formula troloksa (Cayman Chemical, 2012)..... | 15 |
| Slika 7: | Sprememba absorbance glede na standardni dodatek troloksa v ABTS | 23 |
| Slika 8: | Količina dnevno izločenih antioksidantov v urinu v mg troloks ekvivalentih (mg TE) pri desetih zdravih posameznicah | 24 |
| Slika 9: | Korelacija med količino dnevno izločenih AO in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vse posameznice) | 26 |
| Slika 10: | Povezava med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsak posamezen dan pri vseh posameznicah) | 27 |
| Slika 11: | Korelacija med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsako posameznico posebej, za vse dni)..... | 28 |
| Slika 12: | Povezava med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsako posameznico posebej, za vse dni)..... | 29 |
| Slika 13: | Normalizirana antioksidativna aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina skladiščenih pri temperaturi -20 °C glede na čas skladisčenja..... | 31 |
| Slika 14: | Normalizirana antioksidativna aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina skladiščenih pri temperaturi 4-8 °C glede na čas skladisčenja..... | 32 |
| Slika 15: | Normalizirana antioksidativna aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina skladiščenih pri temperaturi -80 °C glede na čas skladisčenja..... | 33 |
| Slika 16: | Spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti urina posameznika P1 med skladisčenjem v odvisnosti od temperature skladisčenega vzorca | 35 |
| Slika 17: | Spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti urina posameznika P3 med skladisčenjem v odvisnosti od temperature skladisčenega vzorca). | 36 |

KAZALO PRILOG

Priloga A: Jedilnik, ki so ga imele preiskovanke v poskusu

Priloga B: Izračunana vrednost Pearsonovega koeficiente korelacije (r) med količino dnevno izločenih AO in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsako posameznicu)

Priloga C: Izračunana vrednost Pearsonovega koeficiente korelacije (r) med količino dnevno izločenih AO in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsak posamezeni dan)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-------------------|--|
| A | absorbanca |
| AAPH | 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid |
| nAA | normalizirana antioksidativna aktivnost |
| ABTS | 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina |
| AO | antioksidant |
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal |
| DPPH ₂ | difenilpikrilhidrazin |
| FRAP | antioksidativna moč redukcije železa (Ferric reducing Antioxidant Power) |
| IC ₅₀ | koncentracija učinkovitosti |
| K | kreatinin |
| ORAC | učinkovitost lovljenja kisikovih radikalov (Oxygen Radical Absorbance Capacity) |
| TE | troloks ekvivalent |
| TPZT | 2,4,6-tripiridil-S-triazin |
| Troloks | 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) |

1 UVOD

Prosti radikali so zelo reaktivne molekule, ki imajo neparne elektrone. Nenehno se proizvajajo v celicah bodisi kot stranski proizvodi presnove ali na primer uhajajo iz mitohondrijev v procesu dihanja. Molekularni kisik, njegovi radikalni derivati (superoksid anion ter hidroksilni radikali) in peroksidi so vključeni v najpomembnejše reakcije prostih radikalov v aerobnih celicah. Količina prostih radikalov se poveča ob večjih obremenitvah, stresu, ali kadar zaužijemo veliko maščob (Zwart in sod., 1998). Zato so celice razvile mehanizme, ki preprečujejo tvorbo prostih radikalov in omejijo njihove škodljive učinke. Zaščitnimi encimi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) ter nizkomolekularni endogeni in eksogeni antioksidanti ščitijo organizem pred številnimi boleznimi, kot so aterioskleroza, rak, artritis, in pred pospešenim staranjem, zato se je zanimanje mehanizmov izjemno povečalo (Kreft in Škrabanja, 2000). Največ antioksidantov je v svežem sadju in sveži zelenjadi.

V urinu je najpomembnejši antioksidant in končni produkt katabolizma sečna kislina. Njena povišana koncentracija lahko vodi do različnih bolezni, kot so urični artritis, hiperurikemija, povišan krvni tlak, pljučnica, poškodba ledvic, bolezni srca in ožilja (Zuo in sod., 2010).

Kreatinin in sečna kislina sta najpomembnejši sestavini urina, telo ju odstrani zaradi toksičnosti. Koncentracija kreatinina je odvisna od mišične mase, njegovo dnevno izločanje pa je konstantno pri določeni osebi. Kreatinin je pokazatelj koncentriranosti urina (Poš, 2012).

Na stabilnost antioksidantov vplivajo predvsem temperatura, vrednost pH, svetloba in prisotnost kisika. Labilnost antioksidantov je največja pri toplem ali hladnem shranjevanju, kjer se zmanjša tudi količina naravnih antioksidantov (Williams, 1996). Znano je, da visoka temperatura negativno vpliva na stabilnost antioksidantov (Muhleib, 1999).

Idealna kemijska metoda za analizo antioksidantov je tista, s katero lahko kompleksne vzorce kvantitativno in kvalitativno čim bolj natančno analiziramo. Če bi poznali še fiziološko aktivnost sestavin, bi s primerno računalniško simulacijo lahko napovedali antioksidativno aktivnost vzorca. Za določanje antioksidativne aktivnosti urina smo uporabili indirektno spektrofotometrično metodo ABTS, ki temelji na reakciji antioksidantov z radikalom ABTS⁺.

1.1 NAMEN DELA

- Določiti antioksidativno aktivnost urina pri zdravem posamezniku.
- Določiti variabilnost antioksidativne aktivnosti posameznih vzorcev urina znotraj posameznega dneva.
- Primerjati antioksidativno aktivnost urina, izračunano kot količina izločenih antioksidantov v 24-ih urah, s koncentracijo antioksidantov jutranjega urina, normalizirano s koncentracijo kreatinina.
- Ugotoviti, kako različne temperature (-80 °C, -20 °C in 4-8 °C) in čas skladiščenja vplivajo na normalizirano antioksidativno aktivnost.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

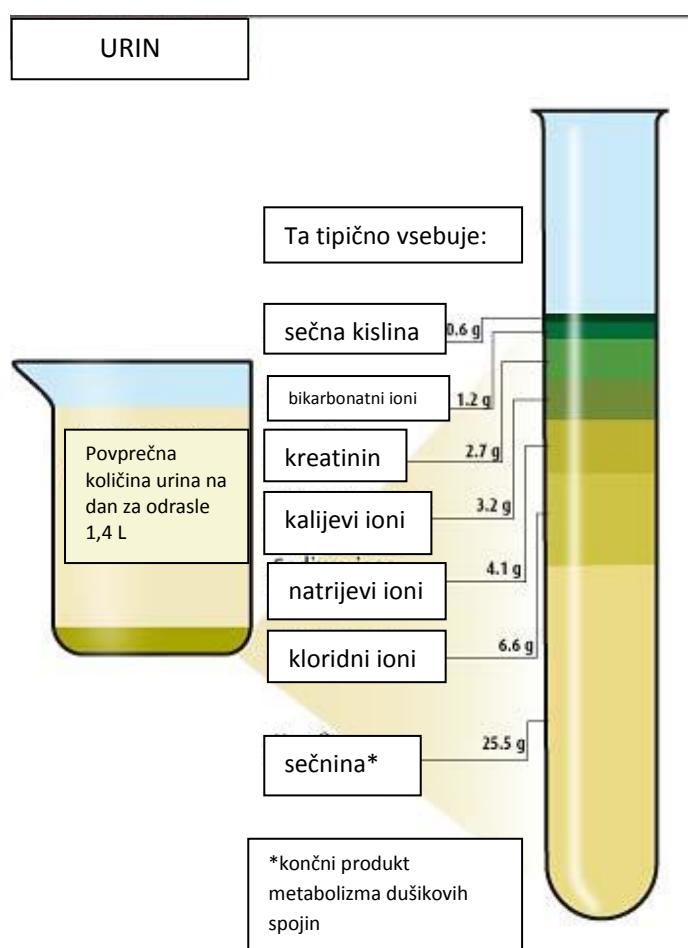
Predvidevamo, da obstaja statistično značilna povezanost med antioksidativno aktivnostjo urina, izračunano kot količina antioksidantov, izločenih v 24-ih urah, in koncentracijo antioksidantov jutranjega urina, normalizirano s koncentracijo kreatinina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 URIN

Med metabolizmom nastajajo v celicah odpadne kemijske snovi, ki jih je treba odstraniti, ker bi zastrupile celice, če bi se v njih nabirale. Te odpadne snovi prehajajo iz celic v krvni obtok in ta jih odnese v obe ledvici, da se izločijo skupaj z vodo v obliki seča (urina). Zato sta normalna tvorba in izločanje seča nujno potrebna za življenje (Smith, 1986).

Seč ali urin je tekočina, ki jo izločajo ledvice preko sečnih poti. Sestavljen je iz vode (95 %), ionov in organskih snovi, od katerih je najpomembnejša sečnina (urea), ki vsebuje dušik. Ta nastaja v jetrih ob spajanju amonijaka z ogljikovim dioksidom. V urinu so raztopljeni ogljikov dioksid, amoniak in plini. Normalno v urinu ni proteinov, glukoze in krvnih celic (Štiblar Martinčič in sod., 2008). Seč iz ledvic odteka v sečni meh (pielon), nadalje v sečevod, sečni mehur in po sečnici zapusti telo. Nastajanje seča je pomemben fiziološki proces, ki uravnava količino in sestavo telesnih tekočin ter omogoča izločanje številnih presnovkov iz telesa. Človeški seč je običajno rumenkasta tekočina. pH urina je 5,0-8,0 odvisno od zaužite hrane. Številne bolezni se odražajo na videzu, količini in sestavi seča, zato je analiza seča pomembna diagnostična metoda (Smith, 1986).



Slika 1: Shema sestave urina (VŠZNJ, 2011)

2.1.1 Transport, hranjenje in stabiliziranje urina

Odvzem, hranjenje, stabiliziranje in transport urina so najpomembnejši elementi predanalitske faze. Standardizacija postopkov je pomembna pri odpravljanju morebitnih napak in pasti v vsakdanji laboratorijski praksi, za določitev usklajenih referenčnih intervalov, mej določitve in usklajene interpretacije rezultatov (Skitek in Trampuš Bakija, 2001).

Predanalitski in biološki (*in vivo*) dejavniki, to je izločanje urina, prehranjevanje in stradanje, telesni napor in počitek, inkubacijski čas v mehurju in okuženje, vplivajo na rezultate laboratorijskih analiz. Zato je nujno spremljati in dokumentirati koncentracijo urina (relativna gostota, osmolarnost, kreatinin...), kar omogoča relativni izračun določenega analita glede na koncentriranost in klinično ovrednotenje rezultata analize.

Vzorci urina morajo biti dostavljeni v laboratorij takoj po zbiranju. Vendar to ni vedno mogoče. V primeru, da transport traja več kot 2 uri, moramo zagotoviti neokrnjenost vzorca ter ga zaščititi pred svetlobnimi vplivi in spremembami temperature. Za kvantitativno analizo urina se uporablja epruvete, ki morajo biti med centrifugiranjem, hlajenjem oziroma zamrzovanjem pokrite z ustreznim pokrovčkom (Skitek in Trampuš Bakija, 2001).

2.1.2 Zbiralniki za enkratni odvzem urina

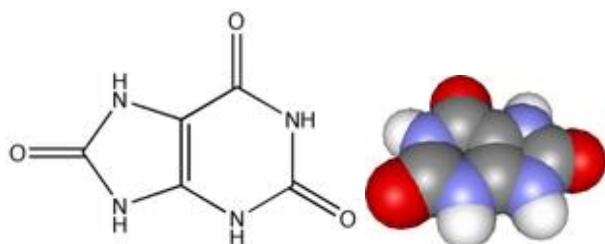
Primarni zbiralniki za rutinski odvzem urina so narejeni iz prosojnega materiala (stekla ali plastike) in namenjeni za enkratno uporabo, biti morajo kemično čisti in suhi. Imeti morajo zadostno širino, ravno dno zbiralnika in odprtino vsaj 5 cm za lažje zbiranje urina preiskovancev. Imeti morajo tesno prilegajoč se vodotesni pokrov, da se prepreči iztekanje. Zbiralnik in pokrov ne smeta vsebovati snovi, ki povzročajo analitične interference. Prav tako snov za izdelavo zbiralnikov in pokrovov ne sme absorbirati ali spreminjati urina in mora zaščititi urin pred svetlobo (Skitek in Trampuš Bakija, 2001).



Slika 2: Zbiralnik urina (VŠZNJ, 2011)

2.2 SEČNA KISLINA

Sečna kislina, ki nastaja v jetrih pri razgradnji purinov in pri razgradnji celičnih jeder, je topna v krvi in se izloči skozi ledvice. Od anorganskih snovi se izloča NaCl, ostale anorganske sestavine pa so fosforna kislina, dušikova kislina in kreatinin (Štiblar Martinčič in sod., 2008). Sečna kislina je glavni antioksidant in končni produkt katabolizma. Nenormalna koncentracija sečne kisline v krvi ali urinu je povezana z različnimi zdravstvenimi težavami, kot so urični artritis, hiperurikemija, povišan krvni tlak, pljučnica, poškodba ledvic, bolezen srca in ožilja. Sečna kislina lahko deluje kot pro-oksidant zlasti v povečanih koncentracijah in je tudi pokazatelj oksidativnega stresa. Lahko pa deluje kot antioksidant, pri čemer pa ji pripisujejo terapevtsko vlogo (Zuo in sod., 2010).



Slika 3: Strukturna formula sečne kisline (Zuo in sod., 2010)

2.2.1 Lastnosti sečne kisline

Sečna kislina je heterociklična aromatska spojina z molekulsko formulo C₅H₄N₄O₃. Je diprotična kislina z vrednostma pKa1 = 5,5 in pKa2 = 10,3. Pri visokih vrednostih pH tvori dvojno nabit uratni ion (odda oba vodikova protona), pri fiziološkem pH-ju ali v prisotnosti ogljikove kisline oziroma karbonatnih ionov pa odda le en proton, kajti njena vrednost pKa2 je večja od fiziološkega pH-ja (Shekarriz in Stoller, 2002).

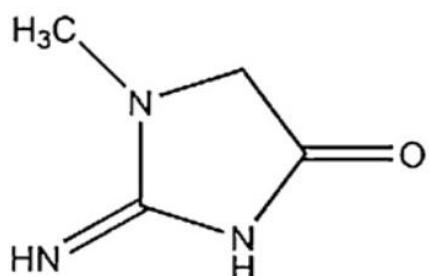
7, 9-dihidro-1H-purin-2,6,8(3H)-trion se v čisti obliki nahaja v oblikih belih, slabo topnih kristalov. Rentgenska difrakcija kristalov amonijevega hidrogenurata, ki nastaja in vivo pri putiki, je pokazala, da keto-kisik na položaju 2 obstaja v tautomerni obliki kot hidroksilna skupina in da si dušikova atoma na mestih 1 in 3 delita ionski naboj z obročem, ki je stabiliziran zaradi π -resonance. Torej, večina organskih kislin deprotonira z ionizacijo polarne vezi med kisikom in vodikom, sečna kislina pa deprotonira na dušikovem atomu, tautomerija keto/hidroksi na kisikovem atomu pa se tako izrabi za dvig vrednosti pK1. Tudi petčlenski obroč vsebuje keto-skupino (na položaju 8), ki je obdana z dvema sekundarnima amino-skupinama (na mestih 7 in 9). Deprotonizacija ene od teh amino-skupin pri visokem pH-ju bi lahko pojasnila pK2 ter diprotično obnašanje sečne kisline (Shekarriz in Stoller, 2002).

2.3 KREATININ

Kreatinin je produkt skeletnih mišic katabolizma. Je endogena snov, ki nastaja spontano z neencimsko reakcijo iz kreatina in kreatin fosfata. Količina kreatinina, ki nastane, je sorazmerna celotni mišični masi. Mišična masa tako določa vrednosti plazemske koncentracije kreatinina pri posameznikih in je odvisna od spola, starosti, rase in od vsebnosti beljakovin v prehrani. Prav zato so vrednosti kreatinina višje pri moških kot pri ženskah in nižje pri starejših osebah (Wright in sod., 2001).

Dnevno se v kreatinin pretvori 1-2 % kreatina. Plazemska raven kreatinina je dokaj konstantna in je odvisna od mišične mase in delovanja ledvic. Kreatinin se iz krvi prosto filtrira v glomerulih v Bowmanovo kapsulo in se ne reabsorbira v tubulih. Vse te lastnosti vplivajo na možnost, da se očistek kreatinina (izločeni kreatinin v 24-urnem seču) uporablja za oceno stopnje glomerulne filtracije (izločevalna sposobnost ledvic) oziroma za določitev ledvične funkcije (Burtis in Ashwood, 1994).

Izločanje kreatinina je aktivno in se povečuje sorazmerno s porastom serumskega kreatinina, dokler transportni mehanizem ni zasičen. Serumska koncentracija je slab pokazatelj ledvičnega delovanja v zgodnjih stopnjah kronične ledvične bolezni. Očistek kreatinina je sicer boljši pokazatelj glomerulne filtracije, vendar zahteva 24-urno zbiranje seča, ki pogosto ni zanesljivo (Stevens in Levey, 2004).



Slika 4: Strukturna formula kreatinina (Zuo in sod., 2010)

2.4 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je snov, ki zaščiti živilo pred oksidacijo in tako varuje biološke sisteme pred poškodbami, ki jih povzročajo prosti radikali (Krinsky, 1989). Proste radikale antioksidanti nevtralizirajo tako, da oddajo en elektron ali en vodik. S tem se sami spremenijo v manj škodljive radikale (Muhleib, 1999).

Znani so kot encimi (superoksidna dismutaza, katalaza, glutationska peroksidaza, metionin sulfoksid reduktaza, popravljalni DNA encimi), vitamini (A, E, C), betakaroten, bioflavonoidi, katehini ...). Nekatere antioksidante sintetizira telo samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (antioksidativni vitamini, kovine v sledovih) (Korošec, 2000). Priporočene dnevne količine vitaminov so danes na splošno dobro poznane, ampak se zgodi, da določenih vitaminov zaužijemo premalo. S tem so mišljeni predvsem trije antioksidanti med vitamini – betakaroten (provitamin A), vitamina C in E. Le-ti nase vežejo kisik, onesposobijo proste radikale in s tem krepijo obrambni sistem (Muhleib, 1999).

Antioksidante razvrščamo v tri skupine:

Primarni antioksidanti so prisotni v organizmu ali pa jih tvorijo mikroorganizmi, to so predvsem encimi. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. Med primarne antioksidante prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije (Raspor in sod., 2000).

Sekundarni antioksidanti nevtralizirajo novonastale proste radikale ter preprečujejo, da bi vstopali v verižne reakcije in tvorili nove proste radikale. To so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo (Raspor in sod., 2000).



Predstavniki sekundarnih antioksidantov so: fenoli, galna kislina in njeni derivati, flavonoidi (kvercetin, ramnetin, kamferol, rutin, kavna kislina, rožmarinska kislina) in nekatere druge naravne spojine (Korošec, 2000).

Tertiarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročijo prosti radikali v strukturi celice. To so največkrat encimi, ki popravljajo poškodbe DNA (Raspor in sod., 2000).

2.5 PROSTI RADIKALI

Prosti radikali so atomi, molekule, ioni ali kompleksi, ki imajo neparno število elektronov oziroma jim primanjkuje en elektron, zato želijo ta elektron poiskati in dobiti od neke druge snovi. Nastanejo pri cepitvi kovalentne vezi. Radikali so lahko nevtralni, lahko pa imajo pozitivni ali negativni naboј (Hulea, 2008).

Zelo hitro reagirajo z drugimi molekulami, spojinami in tako molekula izgubi en svoj elektron. Taka spojina sama postane prosti radikal, kar sproži verižno reakcijo. Škodljive posledice za organizem nastanejo takrat, ko ta manjkajoči elektron vzamejo molekuli v katerikoli celični strukturi. Tako lahko poškodujejo celično membrano, ki skrbi za selektivno propustnost. S tem omogočajo »upor« škodljivih snovi v celico ter izgubo življenjsko pomembnih snovi zanjo (Korošec, 2000). Prosti radikali nastajajo v telesu neprestano, ker dihamo kisik in so rezultat normalne celične presnove in posledica dejavnikov okolja.

Najpomembnejši kisikovi prosti radikali so hiperoksidni anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$), hidroperoksilni radikal ($\cdot\text{OOH}$), peroksilni radikal ($\cdot\text{OOR}$) in alkoksilni radikal ($\cdot\text{OR}$) (Kaur in Kapoor, 2001).

2.5.1 Vpliv antioksidantov

Zanimanje za antioksidante se je povečalo zaradi zaščite pred boleznimi srca in ožilja, nastankom raka in drugimi boleznimi, povezanimi z oksidativnim stresom, v povezavi z nekaterimi kemikalijami, sevanjem, vplivom alkohola, cigaretami, težkimi kovinami, prekajeni in zapečeni hrani (Kreft in Škrabanja, 2000). Če je v organizmu več prostih radikalov kot je na razpolago AO, govorimo o stanju oksidativnega stresa in tedaj pride do poškodb celice. Najbolj nevarno je, če prosti radikali poškodujejo genetski material (DNA, RNA). Tedaj lahko nastanejo celične mutacije, ki pripeljejo do trajnih poškodb, prezgodnjega staranja in smrti celice ali celo do razvoja rakastih tvorb, degenerativnih bolezni, ishemije, ateroskleroze, zmanjšane imunske odzivnosti, Alzheimerjeve in Parkinsonove bolezni, sladkorne bolezni (Halliweel in Grootveld, 1987).

Študije so pokazale, da uživanje sadja in zelenjave, ki vsebuje večje količine antioksidantov, zmanjšuje obolevanje za naštetimi boleznimi. Stalen vnos antioksidantov s hrano je pomemben, ker preprečuje oksidativni stres, ki nastane zaradi porušenega ravnotežja med prostimi radikalji in antioksidanti. Antioksidanti ga torej preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul (Vidrih in Kač, 2000).

V večini primerov industrijske predelave živil, kakor tudi med domačo pripravo obrokov, prihaja do bistvenega zmanjšanja vsebnosti in aktivnosti naravnih antioksidantov. Večina se jih zaradi nestabilnosti izgubi v procesu predelave antioksidativne lastnosti (Hribar in Simčič, 2000).

Veliko raziskav obravnava vpliv različnih topotnih procesov na oksidativno in termično razgradnjo askorbinske kisline. Raziskan je tudi vpliv svetlobe, kisika in temperature na razgradnjo tokoferolov in fenolnih spojin ter vpliv izomeracije β -karotena na aktivnost vitamina A (Hribar in Simčič, 2000).

2.6 STABILNOST ANTIOKSIDANTOV

Zunanji dejavniki (svetloba, kisik, temperatura) in notranji dejavniki (vsebnost vode, aktivnost vode, lipidna peroksidacija in alkalinost medija) so dejavniki, ki vplivajo na stabilnost antioksidantov v živilu (Miquel in sod., 2004). Antioksidanti so najbolj labilni pri toplem ali hladnem shranjevanju in se po dveh urah zmanjšajo za več kot 10 %, zmanjša se tudi količina naravnih antioksidantov (Williams, 1996).

Temperatura je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na antioksidativno aktivnost. Na splošno temperatura povzroča pospešitev začetka reakcije in s tem zmanjša aktivnost prisotnih ali dodanih antioksidantov. Vendar pa razlike v temperaturi lahko spremenijo mehanizem delovanja nekaterih antioksidantov ali pa na njih vplivajo na drugačen način. Temperatura lahko vpliva na posebne reakcije, v katerih sodelujejo antioksidanti (v glavnem so reakcije z lipidnimi radikali, v katerih spojine ne delujejo kot antioksidanti ampak kot pro-oksidanti). Zamrzovanje je pogosto uporabljeno za ohranitev značilnosti živila z minimalno izgubo hrani, kot so vitaminini in antioksidanti, v daljših obdobjih (Réblová, 2012).

Čeprav je vpliv temperature na aktivnost različnih antioksidantov sistematično raziskan, ne obstaja zadostna količina zanesljivih podrobnosti o vplivu temperature na antioksidante (Réblová, 2012).

2.7 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Struktura antioksidanta, oksidacijski pogoji in lastnosti oksidanta vplivajo na učinek antioksidanta. Zmožnost določene komponente, da zavira oksidacijske procese npr. peroksidacijo lipidov, je definirana kot antioksidativna aktivnost (AA). Fenolne spojine so največja skupina antioksidantov, zastopana v živilih. V rastlinskih oljih in maščobah so pomembni monofenoli (tokoferoli – vitamin E). Tako kot sadje in zelenjava, pa tudi kava, čaj, kakav, rdeče vino, vplivajo na zdravje ljudi, zlasti zaradi velike vsebnosti vodotopnih polifenolov, ki so glavna vrsta antioksidantov omenjenih živil (Roginsky in Lissi, 2005).

Reaktivnost polifenolov do radikalov je eden najosnovnejših mehanizmov, ki je povezan z AA. Razlika med antioksidativno kapacitivnostjo in reaktivnostjo je ta, da nam prva poda informacijo o kvantitativnem delovanju antioksidanta, druga pa karakterizira začetno dinamiko učinkovanja v povezavi s koncentracijo antioksidanta oziroma mešanico antioksidantov (Roginsky in Lissi, 2005).

Med postopki skladiščenja pride do veliko kompleksnih reakcij, ki lahko bistveno spremenijo antioksidativno aktivnost (Serrano in sod., 2009):

- naravno prisotni antioksidanti se med skladiščenjem zmanjšajo,
- antioksidativne lastnosti prisotnih antioksidantov se povečajo,
- nastanejo nove spojine z antioksidativno aktivnostjo,
- nastanejo nove spojine z pro-oksidativnimi lastnostmi.

2.7.1 Metode za določanje antioksidativne aktivnosti

Metode, ki se najpogosteje uporabljajo za določanje antioksidativne aktivnosti, se razlikujejo glede na njihovo delovanje in pogoje (Lucas-Abellán in sod., 2010).

Poznamo direktne (na osnovi kinetike peroksidacije lipidov, ORAC, določanje antioksidativnega potenciala z β -karotenom...) ter indirektnе metode (DPPH, ABTS, FRAP...) merjenja antioksidativnega potenciala (Vidrih in Kač, 2000; Roginsky in Lissi, 2005).

Direktne metode temeljijo na preučevanju vpliva dodanega antioksidanta na potek verižne oksidacije določenega substrata s prostimi radikali. Za substrate oksidacije lahko izberemo posamezne lipide, proteine, DNA ali biološki material, ki vsebuje lipide (LDL, krvna plazma...). So bolj občutljive in natančne. Pri indirektnih metodah merimo sposobnost antioksidantov za lovljenje tistih prostih radikalov, ki niso direktno povezani z oksidacijsko razgradnjo. Uporabaobarvanih prostih radikalov je primer indirektnega

določanja, kot sta npr. DPPH[•] in ABTS⁺, pri katerih določamo sposobnost antioksidanta, da odda vodikov atom in ne direktno antioksidativno aktivnost. Te metode so pogosteje in bolj primerne za analizo (Roginsky in Lissi, 2005).

2.7.1.1 DPPH metoda

Ena najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti je metoda s prostim radikalom DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil). Metoda temelji na reakciji med stabilnim DPPH[•] radikalom in donorji vodika, kamor sodijo tudi fenolne spojine (Sochor in sod., 2010). DPPH[•] je stabilen radikal, ki ima velik molarni absorbcijski koeficient v vidnem delu spektra z maksimumom pri 517 nm, kar pomeni, da lahko koncentracijo radikala DPPH[•] merimo spektrofotometrično. Ko antioksidant reagira z alkoholno raztopino DPPH[•], se tvori reducirana oblika DPPH₂, kar povzroči spremembo barve iz vijolične v rumeno (Deng in sod., 2010).

Prosti radikal DPPH[•] reagira z antioksidantom (AH) ali z radikalno vrsto (R[•]) (Milardović in sod., 2005):



Antioksidativno aktivnost z radikalom DPPH[•] lahko določamo na dva načina, dinamično ali statično. Pri dinamični metodi, po dodatku vzorca antioksidanta, merimo hitrost razpada DPPH[•]. Pri statični metodi pa določamo ravnotežno stanje, ko vsi prisotni antioksidanti reagirajo z radikalom (Brand-Wiliams, 1995).

S prvo metodo preučujemo reaktivnost antioksidantov, z drugo pa stehiometrijo med antioksidanti in DPPH[•]. Če molekula DPPH[•] reagira samo z eno molekuljo antioksidanta, potem je stehiometrično razmerje 1:1. V primeru da ima molekula antioksidanta, ki reagira z DPPH[•] radikalom odda dva elektrona (npr. askorbinska kislina in α-tokoferol), pa je teoretično razmerje med DPPH[•] in antioksidantom 2:1. Koncentracijo DPPH[•] izberemo v območju med 50 in 100 μM, zato da so absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Za standarde se najpogosteje uporablja askorbinska kislina in α-tokoferol. Delovna valovna dolžina je v literaturi podana različno, med 515 in 520 nm. Reakcijski čas metode je običajno 30 min (Molyneux, 2004).

Statično metodo lahko podamo na več načinov.

Prvi način podajanja rezultatov je tako imenovana koncentracija učinkovitosti (EC_{50} ali IC_{50}), ki je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50 % radikalnega DPPH[•]. Pomanjkljivost tega načina je, da se z večanjem antioksidativne vrednosti zmanjšuje vrednost EC_{50} , kar lahko dela probleme pri grafičnem predstavljanju (Karadag in Ozcelik, 2008).

Drugi način je, da se izračuna razmerje med številom molov DPPH[•], ki reagira z ustreznim številom molov določenega antioksidanta. Antioksidanti z večjim razmerjem DPPH[•]/antioksidant so bolj učinkoviti. Vzorci, ki jim določamo antioksidativno aktivnost so velikokrat kompleksni, kar pomeni, da ne poznamo dejanske sestave in molarne koncentracije. Takrat je smiselno podati antioksidativno učinkovitost vzorca kot razmerje med številom molov DPPH[•], ki reagirajo z antioksidanti v 1 g suhe snovi (Molyneux, 2004).

Porabljene mole DPPH[•] v vzorcu lahko enostavno izračunamo iz Beer-Lambertovega zakona.

$$\Delta A = \epsilon \cdot \Delta c \cdot l; \quad nDPPH_2 = c \cdot V_{\text{reakcijske zmesi}} \quad \dots (5)$$

ΔA - razlika absorbance referenčne raztopine, kateri je dodan samo DPPH[•] in absorbance raztopine, kjer je poleg DPPH[•] še antioksidant.

ϵ - molarni absorpcijski koeficient DPPH[•] pri 517 nm.

c - koncentracija nastalega DPPH₂.

l - dolžina poti svetlobe skozi vzorec.

Vrednost ϵ v metanolu pri 517 nm je v literaturi navedena med 11600 in 12500 L/(mol·cm) (Molyneux, 2004).

Velika prednost DPPH[•] metode je ta, da je tehnološko lahko izvedljiva in hitra ter potrebuje samo UV-spektrofotometer (Sochor in sod., 2010).

DPPH[•] se raztopi samo v organskem alkoholnem mediju in ne v vodni raztopini, ki je pomembna pri razlagi vloge hidrofilnih antioksidantov, zato je to ena izmed pomanjkljivosti te metode (Arnao in sod., 2001).

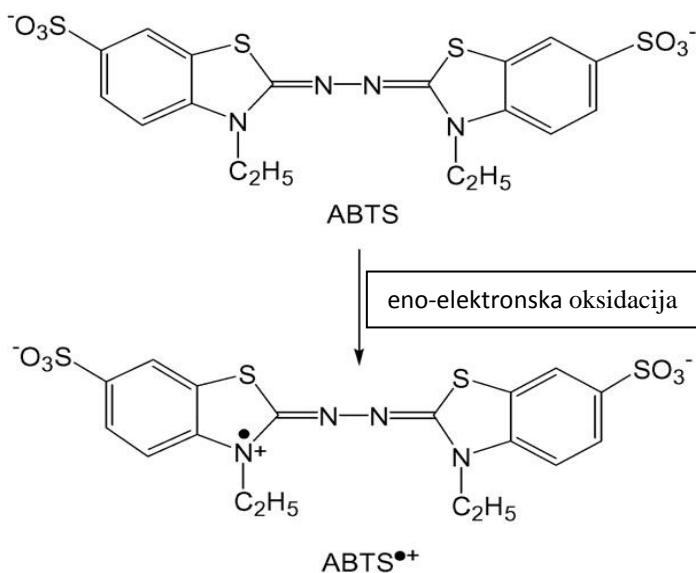
2.7.1.2 ABTS metoda (2,2'-azobis[3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina])

Prvotno je bil TEAC test, ki temelji na zmanjšanju kopičenja ABTS, povezan s peroksidazno aktivnostjo metmioglobina z antioksidanti. Velika ovira te analize so spojine,

ki lahko zavirajo aktivnost peroksidaze. Zato je bil test prilagojen tako, da so uporabili vnaprej pripravljeno ABTS (Arts in sod., 2003). Metoda z reagentom ABTS⁺ je danes med najbolj razširjenimi metodami za indirektno določanje antioksidativne aktivnosti lipofilnih in hidrofilnih antioksidantov. ABTS⁺ je stabilen v raztopinah, kjer ni antioksidantov. Tvori se pri oksidaciji med ABTS⁺ in kalijevim persulfatom in močno absorbira pri valovni dolžini med 600 in 750 nm in je modro-zelene barve, zato ga lahko enostavno spektrofotometrično določimo. Če so prisotni antioksidanti, ki so donorji vodika, se ABTS⁺ reducira, kar vodi do razbarvanja (Zulueta s sod., 2008). Zmanjšanje absorbance radikala je proporcionalno koncentraciji in aktivnosti antioksidanta v preiskovanem vzorcu (Fernández-Pachón in sod., 2006). Možna sta dva pristopa k tej metodi. Prva možnost je, da se antioksidativna aktivnost meri kot sposobnost testnih spojin za zmanjšanje barvne reakcije z ABTS⁺ radikali, ki jo izrazimo kot troloks ekvivalente TEAC (Roginsky and Lissi, 2005). Troloks je vodotopni analog vitamina E. Vzorec ima 1 TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity), če je v vzorcu koncentracija antioksidantov, ki ima enak učinek kot 1mM troloks (Abram, 2000).

Druga možnost pa je, da preučujemo vpliv dodanih antioksidantov na redukcijo predhodno pripravljenega radikala ABTS⁺. Prednost metode ABTS⁺ je, da se lahko uporablja tako v vodnem kot tudi v organskem mediju. ABTS metoda je definirana kot sposobnost antioksidantov, da polovijo radikale (Rice-Evans in Miller, 1997).

Prednost metode je, da je preprosto uporabna in jo lahko uporabljam v vsakem laboratoriju (Karadag in Ozcelik, 2008). Slabost metode pa je, da reagira z -OH skupinami v aromatski spojini ne glede na to ali te prispevajo k antioksidativni aktivnosti ali ne in tako podaja sposobnost spojin za reakcijo z ABTS⁺ (Roginskyin Lissi, 2005).



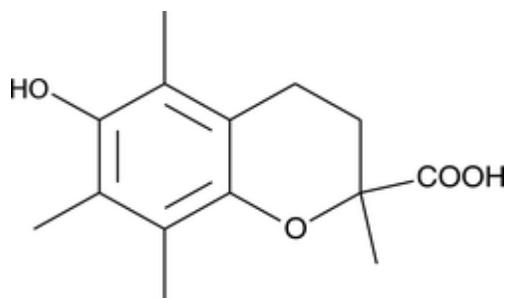
Slika 5: ABTS in njegova eno-elektronska oksidacija produkta, ABTS^{•+} (Lee in Yoon, 2008)

Brezbarvna molekula ABTS se pretvori v modro-zeleno molekulo ABTS^{•+}. Pretvorbo povzroči oksidacija enega elektrona, kot je prikazano na sliki 5.

2.7.1.2.1 Troloks

Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina) je vodotopni analog vitamina E. Je antioksidant in se uporablja v bioloških ali biokemijskih procesih za zmanjšanje oksidativnega stresa.

Strukturno je troloks brez hidrofobnega repa, zato je topen v polarnih medijih (Arts in sod., 2003).



Slika 6: Struktorna formula troloksa (Cayman Chemical, 2012)

2.7.1.3 FRAP metoda

FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidants Power) temelji na redukciji železa Fe^{3+} v Fe^{2+} v prisotnosti antioksidantov. Nastali Fe^{2+} ioni tvorijo z reagentom TPZT (2,4,6-tripiridil-S-triazin) obarvan kompleks, ki se meri spektrofotometrično pri 593 nm. FRAP metoda je uporaben test s poceni reagenti in opremo in poda hitro reakcijo (Benzie in Strain, 1996).

2.7.1.4 ORAC metoda

ORAC metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity) se pogosto uporablja za določanje antioksidativne aktivnosti fenolnih antioksidantov in različnih živil – sadja, zelenjave in pijač. Pri tej metodi določamo učinkovitost lovljenja kisikovih radikalov. Flourescentni protein β -fikoeritrin, se uporablja kot tarča, na katero delujejo peroksilni radikali, katerih izvor je AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) (Karadag in Ozcelik, 2009). Preiskovanemu oziroma standardnemu vzorcu dodamo β -fikoeritrin, ki se po dodatku AAPH oksidira in zato se zmanjša njegova flourescensa. Troloks – sintetični analog vitamina E, služi kot standard, zato se ORAC vrednosti izražajo v $\mu\text{mol troloks/g}$ (Price in sod., 2005).

2.8 VPLIV SKLADIŠČENJA NA ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOST URINA

Shranjevanje vzorcev urina pri 2-8 °C in pri -20 °C za nekaj tednov, je običajna laboratorijska praksa na področju raziskav in epidemoloških študij. Kljub številnim študijam ni dogovora o tem, kako stabilen je npr. albumin v urinu in kakšen je najboljši način shranjevanja urina (Olisekodiaka in sod., 2001). Znano je, da shranjevanje močno zmanjša količino naravnih antioksidantov (Kaur in Kapoor, 2001).

Med postopki skladiščenja prihaja do več vrst reakcij, ki lahko bistveno spremenijo antioksidativno aktivnost.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ZBIRANJE VZORCEV URINA

V raziskavi je sodelovalo 10 prostovoljk s povprečno starostjo 28 let (najmlajša prostovoljka je imela 24 let, najstarejša pa 33 let).

Preglednica 1: Podatki preiskovank, ki so sodelovale v poskusu

| preiskovanka | starost | višina | teža | kajenje |
|--------------|---------|--------|------|---------|
| A | 33 | 163 | 79,4 | Ne |
| B | 29 | 172 | 54 | Da |
| C | 31 | 165 | 53,9 | Da |
| D | 29 | 169 | 52,8 | Ne |
| E | 29 | 165 | 61,8 | Ne |
| F | 27 | 157 | 47,2 | Da |
| I | 25 | 168 | 57,9 | Ne |
| J | 25 | 168 | 53,9 | Da |
| K | 24 | 168 | 62,2 | Da |
| L | 28 | 158 | 51,3 | Ne |

3.1.1 Prvi jutranji urin

Zagotovljeno je moralo biti predvsem sodelovanje preiskovank in hiter transport vzorca v laboratorij. Če vzorec ne pride v laboratorij v štirih urah, mora biti shranjen v ustreznih pogojih. Posameznice so predhodno prejele ustrezne zbiralnike urina. Vzorec jutranjega urina so preiskovanke odvzele takoj po prespani noči.

3.1.2 24 urni urin

Preiskovanke so urin zbirale 24 ur v zbiralne posodice. Urin je bilo treba čim hitreje dostaviti v laboratorij, kjer smo natančno izmerili ter dokumentirali celotno izločeno količino urina. Ves urin iz zbiralnih posodic smo odpipetirali v večje število ependorf centrifugirk ter ga zamrznili pri -20 °C do analize.

3.1.3 Določanje AA urina desetih posameznic pet zaporednih dni

Prvi del eksperimenta je bila analiza AA urina desetih posameznic. V raziskavi je sodelovalo deset posameznic, ki so pet dni uživale posebej pripravljene obroke. Med trajanjem poskusa so posameznice zbirale celodnevni urin, ki je bil analiziran. Vsak vzorec se je zbiral posamično, tako smo pridobili 424 vzorcev, ki smo jih hranili v hladilni omari pri -20 °C.

Med poskusnimi osebami je bilo pet kadilk in pet nekadilk. Vsakemu vzorcu urina smo določili vsebnost kreatinina (mmol/L) in volumen urina (mL), ki smo ga dobili od vsake posameznice. Kreatinin smo določili po spektrofotometrični metodi v laboratoriju za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Dnevno izločeno količino AO smo izračunali tako, da smo sešteli količine urina, izločene tisti dan. Jutranji urin smo prištevali k prejšnjemu dnevnu.

3.1.4 Določanje AA urina v določenih časih skladiščenja

Drugi del eksperimenta je bila analiza vzorcev urina v določenih časovnih intervalih (preglednica 2). Imeli smo šest različnih vzorcev, ki smo jih hranili 121 dni pri 4-8 °C (hladilnik), -20 °C in pri -80 °C. Pred analitično obdelavo vzorcev, smo jih odtajali in uporabili Vortex mešalnik.

Vsak vzorec smo normalizirali s koncentracijo kreatinina (mmol/L).

Preglednica 2: Dnevi meritev za analizo vzorcev urina v določenih časih skladiščenja

| meritve | datum analize | dan skladiščenja | razredčitve |
|----------------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 | 3.10.2011 | 1 | $10/5 = 2x$ |
| 2 | 5.10.2011 | 3 | $10/3 = 3,3x$ |
| 3 | 7.10.2011 | 5 | $10/3 = 3,3x$ |
| 4 | 10.10.2011 | 8 | $10/3 = 3,3x$ |
| 5 | 12.10.2011 | 10 | $10/3 = 3,3x$ |
| 6 | 14.10.2011 | 12 | $10/3 = 3,3x$ |
| 7 | 17.10.2011 | 15 | $10/3 = 3,3x$ |
| 8 | 21.10.2011 | 19 | $10/3 = 3,3x$ |
| 9 | 24.10.2011 | 22 | $10/3 = 3,3x$ |
| 10 | 28.10.2011 | 26 | $10/3 = 3,3x$ |
| 11 | 2.11.2011 | 31 | $10/3 = 3,3x$ |
| 12 | 10.11.2011 | 39 | $10/3 = 3,3x$ |
| 13 | 17.11.2011 | 46 | $10/3 = 3,3x$ |
| 14 | 24.11.2011 | 53 | $10/3 = 3,3x$ |
| 15 | 1.12.2011 | 60 | $10/3 = 3,3x$ |
| 16 | 31.1.2012 | 121 | $10/3 = 3,3x$ |

3.2 ANALIZA VZORCEV URINA Z METODO ABTS

Za obe analizi vzorcev smo uporabili standardno spektrofotometrično metodo ABTS⁺. Merjenje absorbance vzorcev je potekalo v treh paralelkah, skladiščenje vzorcev pri različnih temperaturah, pa v petih paralelkah.

3.2.1 Reagenti

- ABTS^{•+} (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina]) Sigma Aldrich,
- metanol Merck, Nemčija,
- natrijev persulfat, Minimum 98%, Sigma Aldrich,
- fosfatni pufer (pH 7,3± 0,2) pri 25 °C, Oxoid.

3.2.2 Pribor

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija),
- tehtnica (Mettler Toledo, Švica),
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8543, ZDA),
- ultrazvočna kopel,
- plastične kivete.

3.2.3 Antioksidativna aktivnost

Antioksidativno aktivnost smo določali z 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsko kislino] (ABTS^{•+}).

Priprava raztopine ABTS^{•+}

Predhodno je potrebno pripraviti raztopino ABTS^{•+}. To smo naredili tako, da smo 10 mL 7 mM raztopini ABTS^{•+} dodali 2,45 mM kalijevega persulfata. Raztopino smo inkubirali vsaj 12 ur na sobni temperaturi v temnem prostoru. ABTS raztopino smo nato razredčili z pufom PBS (pH 7,32), da smo dobili absorbanco $0,7 \pm 0,02$ pri 734 nm.

Priprava umeritvene krivulje z reagentom ABTS^{•+}

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili troloks. Na analitski tehtnici smo zatehtali 25,09 mg standardne raztopine troloksa in ga z mešanjem raztoplili v 100 mL metanola, ki ustreza koncentraciji 1 mmol/L. Z ustreznim razredčevanjem iz ustrezne raztopine troloksa smo pripravili različne koncentracije standardnih raztopin, raztopljenih v vodi. V preglednici 2 je prikaz razredčitev za pripravo umeritvene krivulje. V vsako kiveto smo odpipetirali 10 µL pripravljenih koncentracij in vsaki dodali 1 mL ABTS, premešali, ter jim izmerili absorbanco pri 734 nm. Maksimalno absorbanco smo izmerili vzorcu, kateremu nismo dodali standarda. Od maksimalne absorbance smo odštevali ostale meritve.

Vsak vzorec smo izmerili v petih paralelkah.

Preglednica3: Razredčitve za pripravo umeritvene krivulje

| V predhodno pripravljene raztopine troloksa [mL] | koncentracija standardnih raztopin [mM] | množina troloksa [nmol] | masa troloksa [µg] |
|--|---|-------------------------|--------------------|
| 0,2 | 0,2 | 40 | 10,0 |
| 0,4 | 0,4 | 36 | 9,0 |
| 0,8 | 0,8 | 30 | 7,5 |
| 1,0 | 1,0 | 24 | 6,0 |
| 1,2 | 1,2 | 20 | 5,0 |
| 1,5 | 1,5 | 16 | 4,0 |
| 1,8 | 1,8 | 8 | 2,0 |
| 2,0 | 2,0 | 4 | 1,0 |

Izvedba

Vzorce urina, ki so bili zamrznjeni na -20 °C, smo odtajali. Nato smo jih dobro premešali, saj so bile v nekaterih vzorcih prisotne usedline. Vsak vzorec posebej smo v bučki razredčili v razmerju 1:2. V kiveto smo odpipetirali 10 µL predhodno razredčenega vzorca in dodali 1 mL reagenta ABTS, ki smo ga vsakič pripravili svežega, nato smo vsebino dobro premešali. Vodo smo dodajali, da smo vzorec razredčili, saj smo se tako izognili temu, da bi se vsebina v epruveti razbarvala. ABTS je modro-zelene barve in se v prisotnosti antioksidantov razbarva. Izmerili smo absorbanco pri 734 nm. Vsak vzorec smo določili v treh paralelkah.

3.3 UREJANJE PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA

Za urejanje podatkov smo uporabili računalniški program Excel. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS.

Jakost povezave oziroma korelacije smo določili s Pearsonovim koreacijskim koeficientom, s katerim preskušamo, kako močno sta dve statistični spremenljivki povezani (uskljeni) ali korelirani (Košmelj, 2007).

Lastnosti koeficiente korelacije (Košmelj, 2007):

- vrednosti koeficiente korelacije so na intervalu od -1 do +1,
- korelacija spremenljivke same s seboj je 1,
- statistični spremenljivki sta nekorelirani natanko tedaj, ko je koreacijski koeficient enak 0,
- če je koreacijski koeficient 1 ali -1, potem med spremenljivkama obstaja linearna funkcionalna zveza.

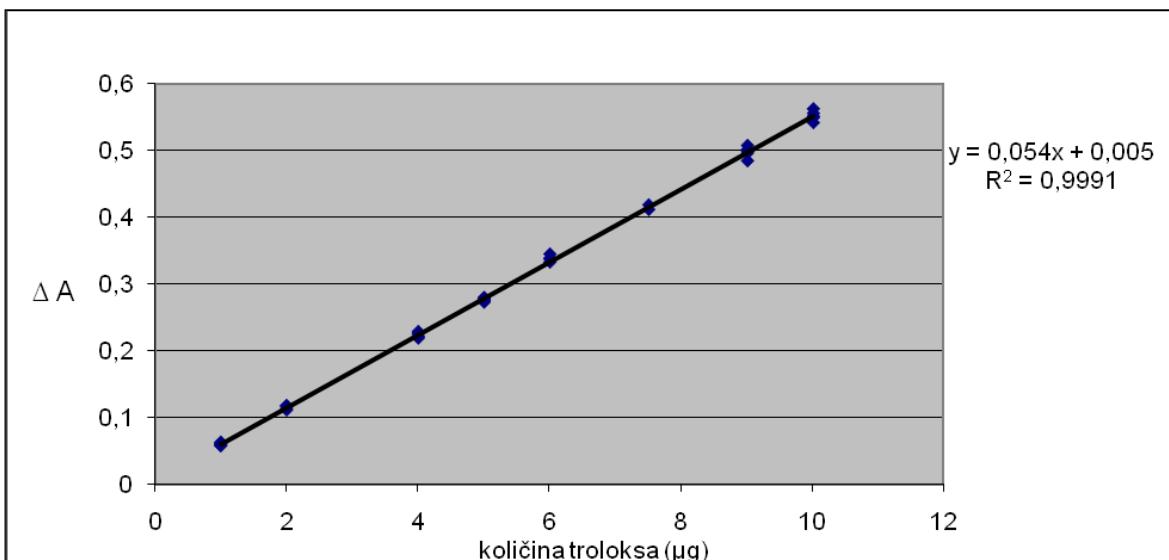
V literaturi so navedeni intervali, po katerih določimo povezanost (Košmelj, 2007):

- 0: ni povezanosti,
- 0-0,2: neznatna (pozitivna / negativna) povezanost,
- 0,2-0,4: nizka (šibka) povezanost,
- 0,4-0,7: srednja (zmerna) povezanost,
- 0,7-0,9: visoka povezanost,
- 0,9-1: zelo visoka (močna) povezanost,
- 1: popolna (funkcijska) povezanost.

4 REZULTATI

Najprej smo pripravili umeritveno krivuljo z reagentom ABTS^{•+}in troloksom.

Umeritvena krivulja ABTS^{•+}



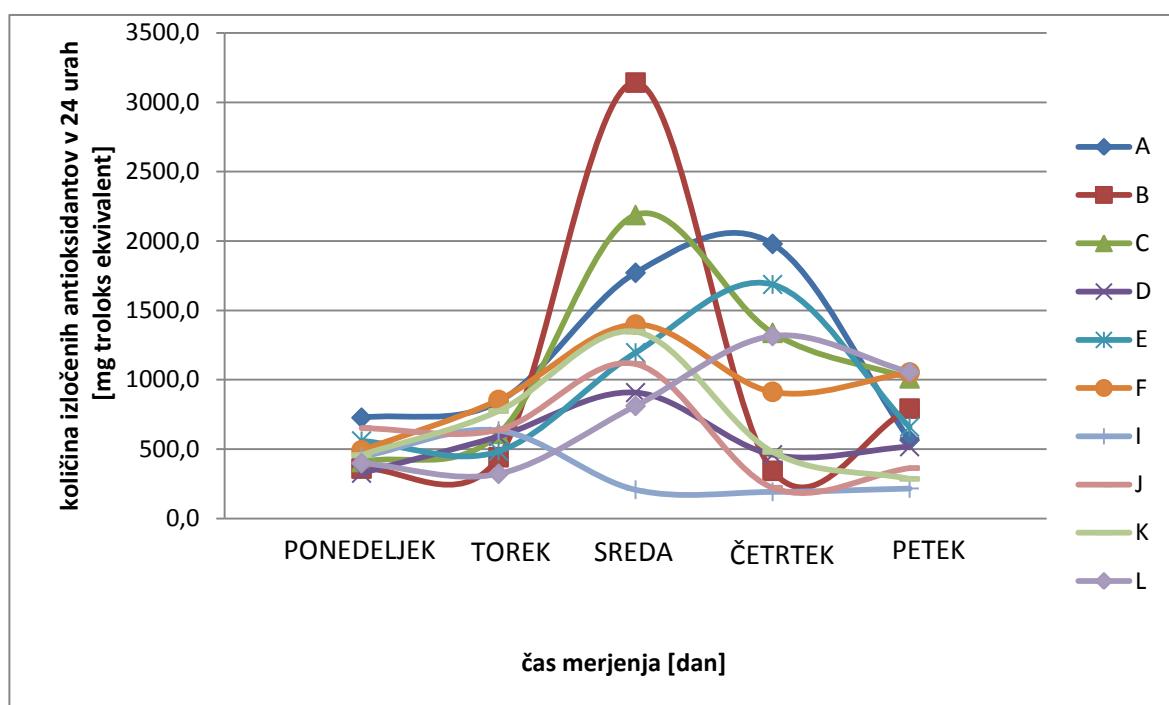
Slika 7: Sprememba absorbance glede na standardni dodatek troloksa v ABTS

Vse vzorce smo preračunali na to umeritveno krivuljo.

4.1 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST URINA PRI DESETIH POSAMEZNICAH

AA urina je različna in variira po dnevih. Pri poskusu je sodelovalo pet kadilk in pet nekadil. Kadilke so bile osebe B, C, F, J in K. Vse kadilke so v sredo z urinom izločile največ antioksidantov, čeprav smo določili velike razlike v količini izločenih antioksidantov pri posameznicah. V ponedeljek in četrtek je bila vrednost najnižja. Pri nekaterih se je zadnji dan raziskave, v petek, vsebnost spet povečala.

Osebe A, D, E, I in L so bile nekadilke. Za lažjo predstavo izločenih antioksidantov po dnevih pri različnih posameznicah smo izračunali povprečne vrednosti. Za razliko od kadilk so tri nekadilke od petih največ antioksidantov izločile v četrtek.



Slika 8: Količina dnevno izločenih antioksidantov v urinu v mg troloks ekvivalentih (mg TE) pri desetih zdravih posameznicah

Slike 8 je razvidno, da se količina izločenih AO v urinu pri zdravih posameznicah kljub uživanju enakih obrokov hrane razlikuje. Oseba I se nekoliko razlikuje od ostalih nekadilk, saj je količina AO pri njej v sredo najnižja, 207,5 mg troloks ekvivalentih (mg TE) in v torek najvišja, 634 mg TE. Pri ostalih je količina AO v urinu največja v četrtek, v petek pa se količina AO pri večini zniža.

V ponедeljek je imela oseba A največjo količino AO, 726,5 mg TE. Najmanjša vrednost je bila pri osebi D, samo 326,1 mg TE. V ponedeljek se je pri vseh osebah količina AO povprečno gibala okoli 482,3 mg TE.

V torek je bila količina AO pri osebi F 854,1 mg TE, kar je največja vrednost na ta dan. Najmanjša vrednost je bila pri osebi L, 321,8 mg TE. V torek je bila povprečna vrednost 619,3 mg TE.

V sredo je največjo količino AO izločila oseba B in je znašala kar 3141,9 mg TE. Najnižja vrednost, 207,5 mg TE, pa je bila določena pri osebi I. Povprečno je bila na ta dan količina AO 1499,2 mg TE.

V četrtek je imela oseba A največjo količina AO, 1978,9 mg TE, ista posameznica je imela najvišjo vrednost že v ponedeljek. Oseba I je v četrtek dosegla najmanjo vrednost AO in je znašala 192,4 mg TE. Povprečna količina AO za ta dan je 892,8 mg TE.

Zadnji dan je bila pri osebi L količina AO 1055,4 mg TE, kar je najvišja vrednost, ki je bila dosežena v petek. Najmanjša količina AO je bila pri osebi I, 216,3 mg TE. V petek je bila povprečno vrednost 651,5 mg TE.

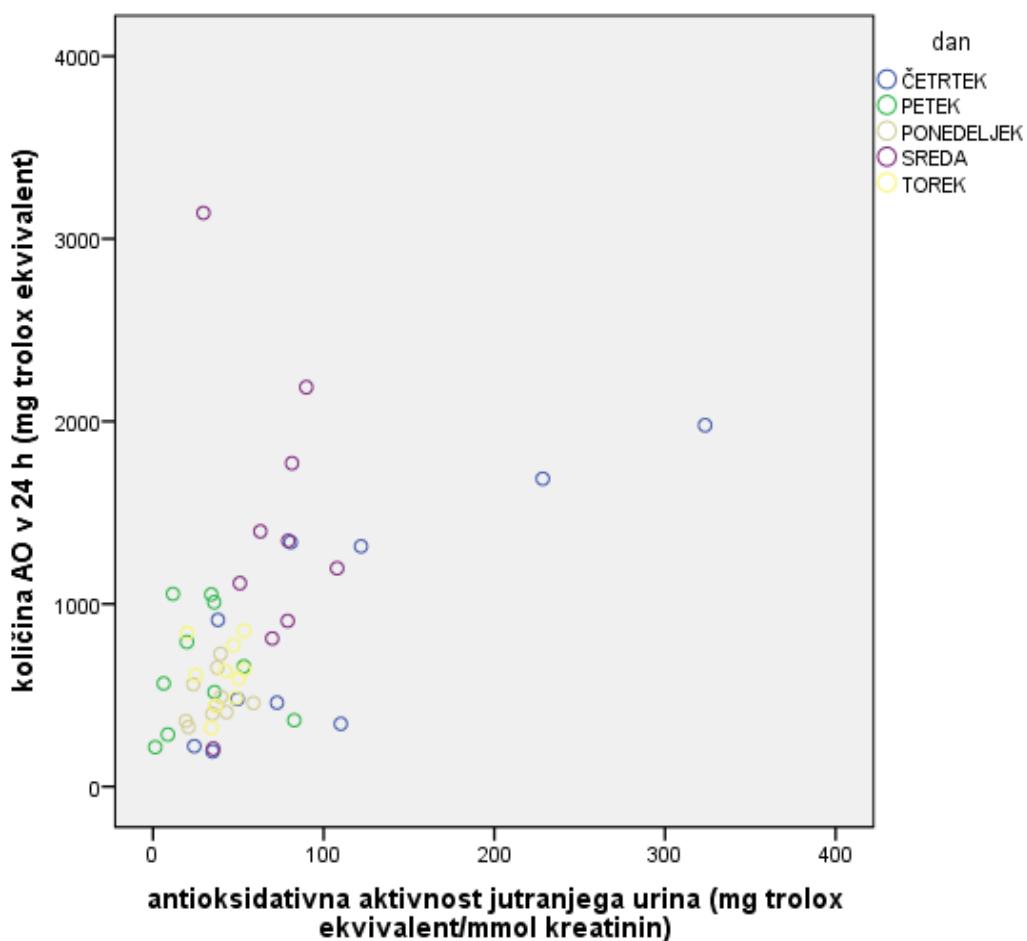
Največja količina AO je bila dosežena v sredo pri osebi B, kar 3141,9 mg TE.

Kljud temu da so nekatere preiskovanke kadilke in nekatere nekadilke, sta si povprečni količini AO v ponedeljek in petek zelo podobni. Kadilke so imele v sredo najvišjo količino AO. V ponedeljek, torek in petek se vrednosti niso veliko razlikovale.

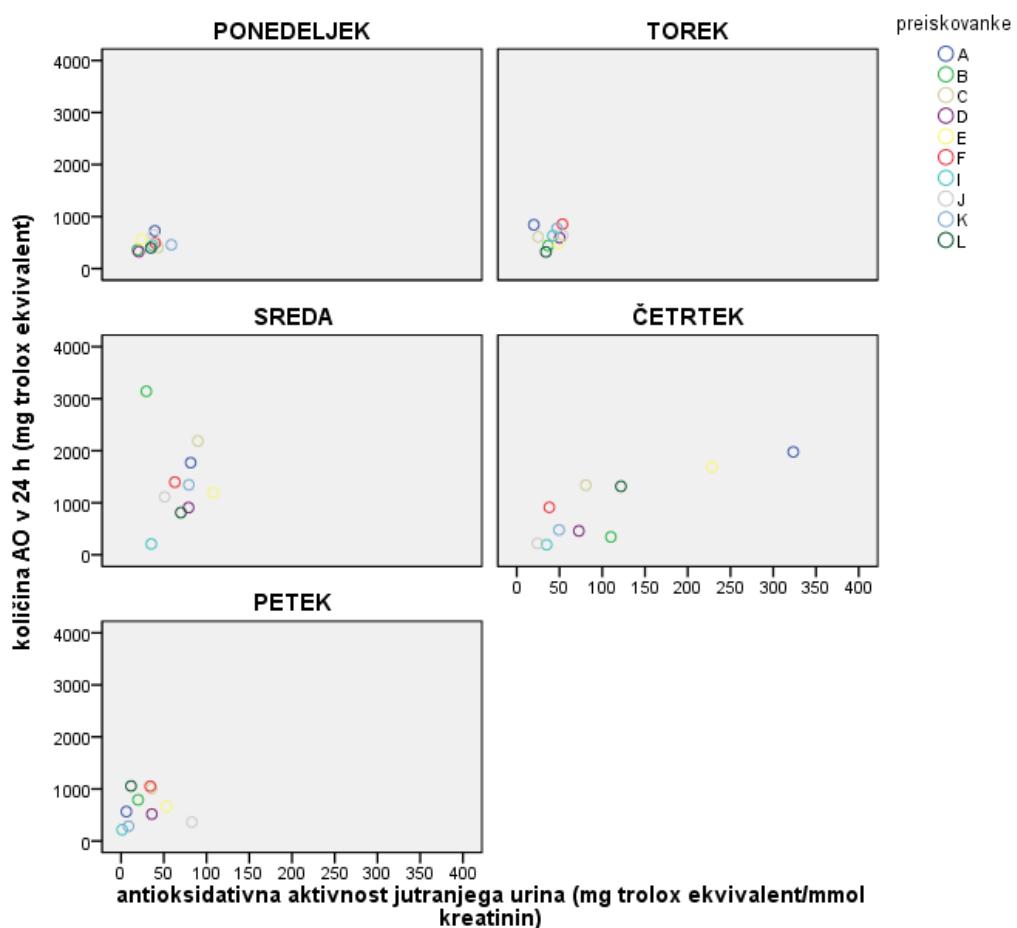
4.1.1 Povezava med količino antioksidantov 24-urnega urina in koncentracijo antioksidantov jutranjega urina, normalizirano na kreatinin

Primerjali smo posamezne količine dnevno izločenih antioksidantov v mg TE s koncentracijo antioksidantov jutranjega urina, izraženo v mg TE/mmol K, katere korelacijo smo določili s Pearsonovim koeficientom. Normalizirali smo celodnevni urin na celodnevni kreatinin.

Na sliki 9 smo prikazali zvezo med količino dnevno izločenih AO v urinu (mg troloks ekvivalent), s koncentracijo AO v jutranjem urinu, ki smo jo normalizirali na kreatinin (mg troloks ekvivalent/mmol kreatinin), za vse dni. Slika 10 prikazuje iste podatke, vendar posamično po dnevih.



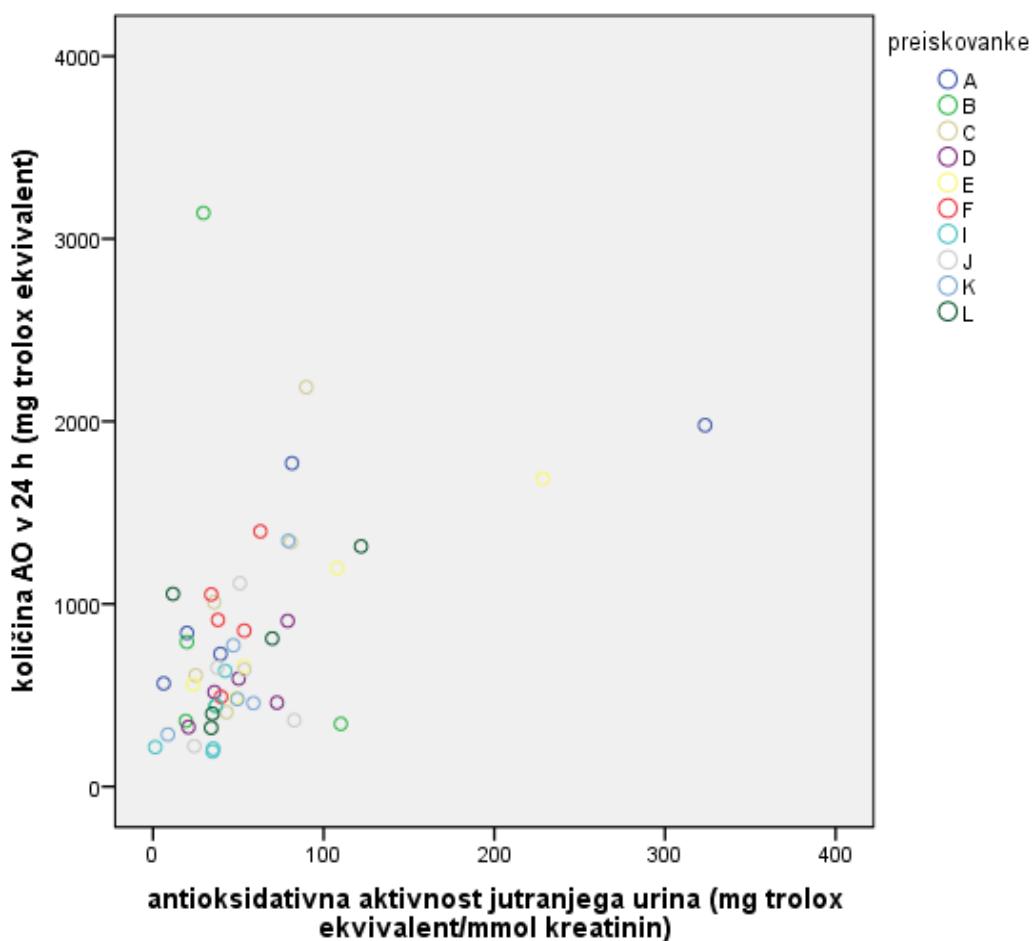
Slika 9: Korelacija med količino dnevno izločenih AO in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vse posameznice)



Slika 10: Povezava med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsak posamezen dan pri vseh posameznicah)

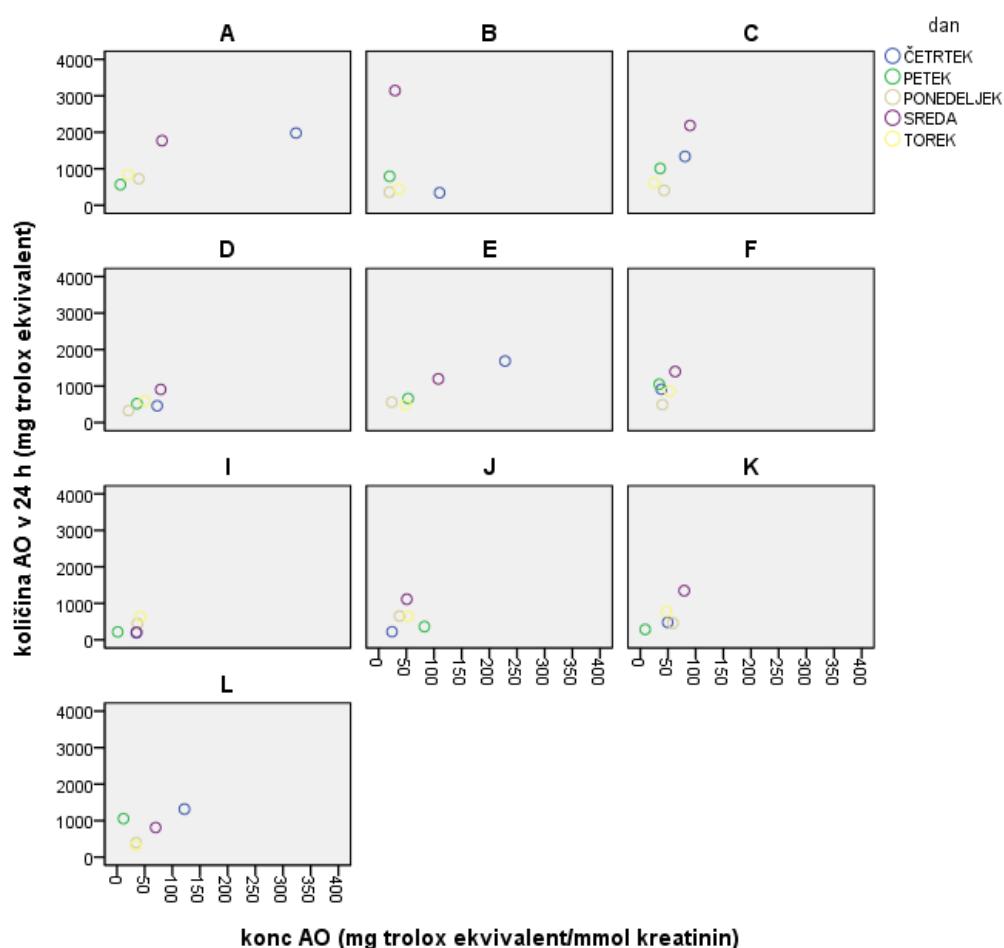
Ugotovili smo, da obstaja statistično značilna povezanost ($p = 0,01$) med količino AO, ki so bili izločeni v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, ki je bila normalizirana na kreatinin (slika 9 in slika 11). Pearsonov koeficient korelacije za to zvezo podatkov znaša 0,472, kar pomeni, da je povezanost zmerna (Košmelj, 2007).

Slika 11 prikazuje korelacijo med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, ki smo jo normalizirali na kreatinin, za vsak posamezen vzorec. Za lažjo predstavo, smo isto povezanost prikazali še za vsako posameznico posebej (slika 12).



Slika 11: Korelacija med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO, normalizirano na kreatinin (za vsako posameznico posebej, za vse dni)

Slika 10 in slika 12 prikazujeta, da obstaja statistično značilna povezanost med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, ki je bila normalizirana na kreatinin ($p = 0,001$). Statistično značilna povezanost omenjene korelacije, če gledamo vrednosti vsake posameznice, se kaže samo pri osebi E ($p < 0,05$).



Slika 12: Povezava med količino AO v 24-ih urah in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsako posameznico posebej, za vse dni)

Pri vrednostih različnih dni, je statistično značilna povezanost v četrtek ($p < 0,05$). V prilogi B so izračunani vsi Pearsonovi koeficienti korelacije za vsako posameznico. Pri osebi B je koeficient negativen in je tudi vrednost najmanjša, zato povezanosti ni. Oseba J ima koeficient 0,068, kar pomeni, da je povezanost pozitivna, vendar neznatna. Osebe L, I in F imajo vrednosti med 0,4 in 0,7, zato je povezanost srednja. Med 0,7 in 0,9 so vrednosti pri osebah A, C, D, E in K, kar pomeni, da imajo visoko povezanost. Popolni povezanosti se je najbolj približala vrednost osebe E, ki je dosegla kar 0,967. Pearsonovi koeficienti za vsak dan posebej so prikazani v prilogi C. V ponedeljek je bila povezanost nizka, saj je $r = 0,263$. Najmanjši, negativni koeficient korelacije, je v sredo ($r = -0,091$). V torek ($r = 0,062$) in petek ($r = 0,021$) je povezanost neznatna. V četrtek pa je bil Pearsonov koeficient korelacije najvišji ($r = 0,830$) in je bila povezanost visoka.

4.2 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VZORCEV URINA PRI DOLOČENIH ČASIH SKLADIŠČENJA

Najprej bomo prikazali, kako se normalizirana antioksidativna aktivnost (nAA) spreminja pri šestih vzorcih urina (P1, P2, P3, P4, T1, Z1), skladiščenih 121 dni pri temperaturah: -20 °C, 4-8 °C (temperatura hladilnika) in -80 °C (preglednica 3). Imeli smo šest posameznic, od katerih so posameznice z oznako vzorca P1, P2, P3 in P4 bile nosečnice. Rezultate smo prikazali kot normalizirano antioksidativno aktivnost, izraženo v mg troloks ekvivalentih/mmol kreatinina. Za lažje komentiranje rezultatov smo vrednosti večkrat izrazili kot povprečno vrednost.

Preglednica 4: Izmerjene vrednosti sečnine, urata in kreatinina za vsak posamezen vzorec

| vzorec | SEČNINA mmol/L | KREATININ mmol/L | URAT mmol/L |
|--------|-------------------|---------------------|----------------|
| P1 | 317 | 12 | 2,9 |
| P2 | 63 | 2,1 | 0,5 |
| P3 | 500 | 12,3 | 4,8 |
| P4 | 185 | 5,1 | 1,6 |
| T1 | 40 | 0,9 | 0,5 |
| Z1 | 166 | 5,2 | 2,3 |

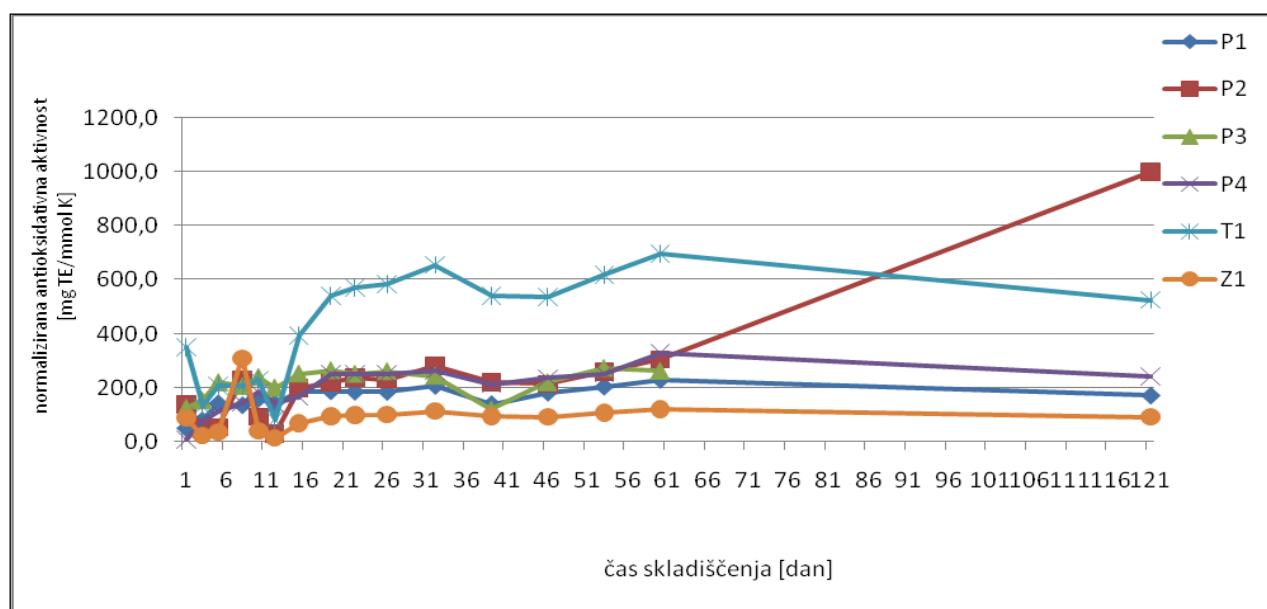
Iz preglednice 4 lahko razberemo, da ima vzorec P3 najvišjo vrednost sečnine, urata in kreatinina, najnižjo vrednost teh parametrov je imel vzorec T1.

4.2.1 Normalizirana antioksidativna aktivnost (nAA) vzorcev urina v mg TE/mmol K, skladiščenih pri temperaturi: -20 °C, 4-8 °C in -80 °C

4.2.1.1 Normalizirana antioksidativna aktivnost (nAA) šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi -20 °C

Normalizirana antioksidativna aktivnost (nAA) predstavlja antioksidativno aktivnost urina, ki je bila normalizirana na tak način, da smo upoštevali količino izmerjenega kreatinina, v posameznem vzorcu.

Slika 13 prikazuje normalizirano antioksidativno aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina, skladiščenih pri -20 °C, glede na čas skladiščenja, ki je naveden v preglednici 2.



Slika 13: Normalizirana antioksidativna aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi -20 °C glede na čas skladiščenja

Prvih 15. dni so izmerjene vrednosti zelo različne in med dnevi neenakomerno nihajo. Po 15. dnevu se meritve za posamezne vzorce se le malo razlikujejo med seboj. Najnižje vrednosti nAA, smo v tej fazi določili pri vzorcu Z1. Vrednosti se gibljejo okoli 100 mg TE/mmol K in so bile stabilne do konca poskusa. Najvišje vrednosti, ki so bile do šestkrat večje od vzorca Z1, smo določili pri preiskovanki T1 in so se v omenjenem obdobju gibale od 393mg TE/mmol K do 698 mg TE/mmol K. Pri vseh ostalih preiskovankah so se

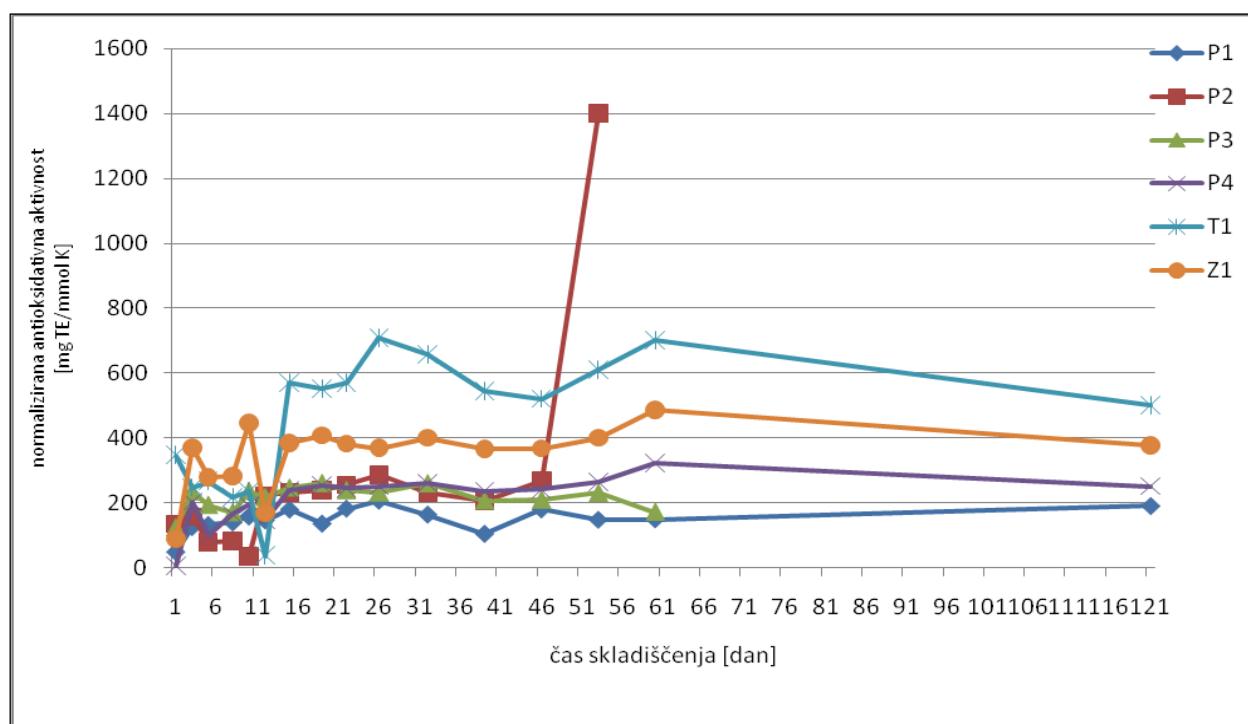
vsebnosti nAA v obdobju med 15. in 60. dnem, gibale med vrednostjo 150 mg TE/mmol K in 330 mg TE/mmol K.

Zanimivo je, da so bile vse nAA pri 60. dnevu merjenja največje, razen vzorca Z1, pri katerem je bila najvišja vrednost 8. dan merjenja. Vse vrednosti so se zmanjšale pri 121. dnevu. nAA urina sta si bili pri vzorcu P3 in P4 zelo blizu 19., 22., 26., 32. in 46. dan.

Povprečna nAA pri temperaturi -20°C je bila pri vzorcu P1 161 mg TE/mmol K, vzorcu P2 233 mg TE/mmol K, vzorcu P3 220 mg TE/mmol K, vzorcu P4 194 mg TE/mmol K, vzorcu T1 429 mg TE/mmol K in vzorcu Z1 93 mg TE/mmol K.

4.2.1.2 Normalizirana antioksidativna aktivnost šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi $4\text{-}8^{\circ}\text{C}$ (hladilnik)

Slika 14 prikazuje normalizirano antioksidativno aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi hladilnika glede na čas skladiščenja.



Slika 14: Normalizirana antioksidativna aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi $4\text{-}8^{\circ}\text{C}$ glede na čas skladiščenja

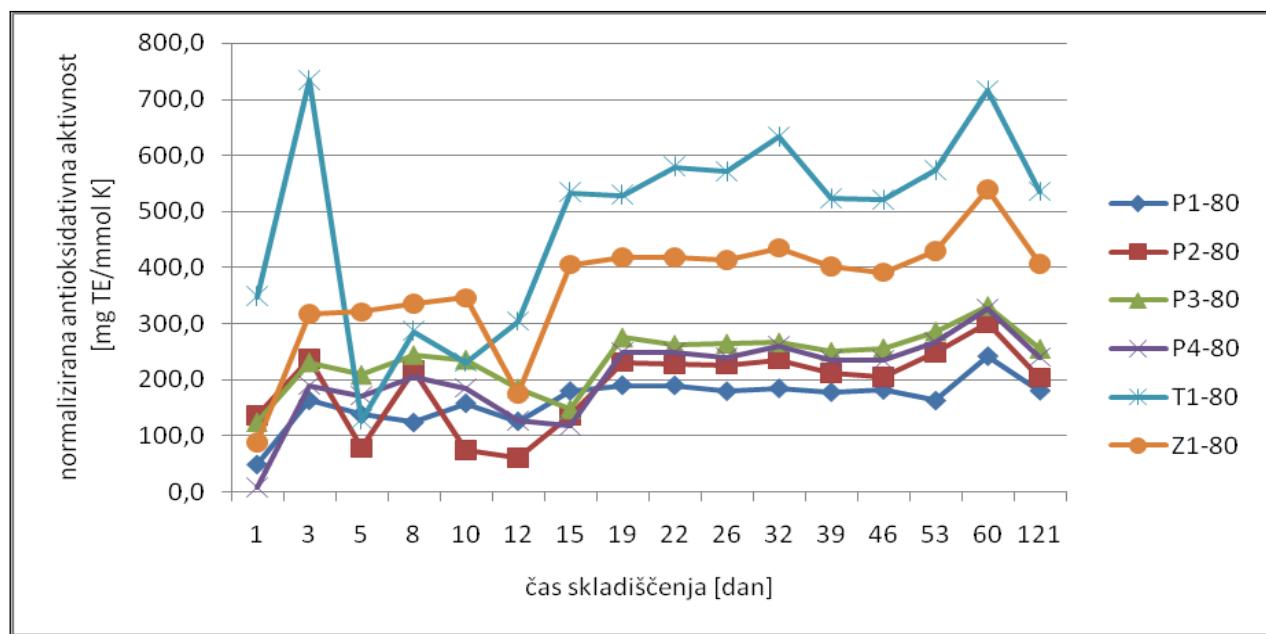
Pri skladiščenju vzorcev v hladilniku od 15. do 60. dne, ima vzorec T1 najvišjo izmerjeno vrednost, ki se giblje med 572 mg TE/mmol K in 700 mg TE/mmol K. Vzorec Z1 ima nAA v območju med 385 mg TE/mmol K in 487 mg TE/mmol K, kar je v primerjavi s skladiščenjem pri -20 °C kar štiri-krat večje. Izmerjene vrednosti nAA pri ostalih vzorcih se gibljejo med 180 mg TE/mmol K in 324 mg TE/mmol K.

Če primerjamo povprečne izmerjene nAA vzorcev urina, sta imela vzorec T1 in Z1 največjo nAA. Vzorcu T1 smo določili 456 mg TE/mmol K in vzorcu Z1 349 mg TE/mmol K. Najmanjša nAA je bila pri vzorcu P1, le 150 mg TE/mmol K.

Povprečna izmerjena nAA pri temperaturi hladilnika je bila pri vzorcu P2 274 mg TE/mmol K, pri vzorcu P3 216 mg TE/mmol K, pri vzorcu P4 213 mg TE/mmol K.

4.2.1.3 Normalizirana antioksidativna aktivnost šestih vzorcev pri temperaturi skladiščenja -80 °C

Slika 15 prikazuje normalizirano antioksidativno aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi -80 °C glede na čas skladiščenja. Pri -80 °C se nAA ne razlikujejo veliko od vrednosti, določenih pri temperaturi hladilnika in -20 °C.



Slika 15: Normalizirana antioksidativna aktivnost v mg TE/mmol K šestih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi -80 °C glede na čas skladiščenja

Vzorci, ki so bili skladiščeni pri -80 °C so imeli skoraj identične vrednosti nAA, kot vzorci skladiščeni pri temperaturi -20 °C in 4-8 °C. Najvišjo nAA smo določili pri vzorcu T1, katerih vrednosti se gibljejo okoli 533 mg TE/mmol K do 714 mg TE/mmol K. Sledi mu vzorec Z1, kjer se v stabilni fazi po 15. dnevu, izmerjene vrednosti gibljejo med 406 mg TE/mmol K in 540 mg TE/mmol K. Pri vseh ostalih vzorcih se izmerjene vrednosti gibljejo med 118 mg TE/mmol K in 325 mg TE/mmol K. Najnižjo nAA smo določili vzorcu P1 (vrednosti so med 180 mg TE/mmol K in 240 mg TE/mmol K).

Povprečna nAA pri -80 °C je bila pri vzorcu P1 164 mg TE/mmol K, pri vzorcu P2 189 mg TE/mmol K, pri vzorcu P3 239 mg TE/mmol K, pri vzorcu P4 206 mg TE/mmol K, pri vzorcu T1 496 mg TE/mmol K in pri vzorcu Z1 365 mg TE/mmol K.

Izmerjena nAA pri vzorcu P1 se kljub različnim temperaturam skladiščenja ni veliko razlikovala. Vzorec P2 je imel najmanjšo povprečno nAA pri -80 °C, 189 mg TE/mmol K. Vzorec P3 je imel največjo povprečno nAA pri -80 °C, 239 mg TE/mmol K. Glede na omenjene vrednosti nAA, sta se vrednosti pri -20 °C in temperaturi hladilnika sta se vrednosti razlikovali za 4 mg TE/mmol K. Vzorec P4 je imel pri -20 °C najnižjo vrednost, drugače so si vrednosti precej podobne. Najnižja nAA pri vzorcu T1 je bila pri -20 °C. Največji razpon rezultatov pa je bil pri vzorcu Z1, od 93 mg TE/mmol K pri temperaturi -20 °C do 365 mg TE/mmol K pri temperaturi -80 °C.

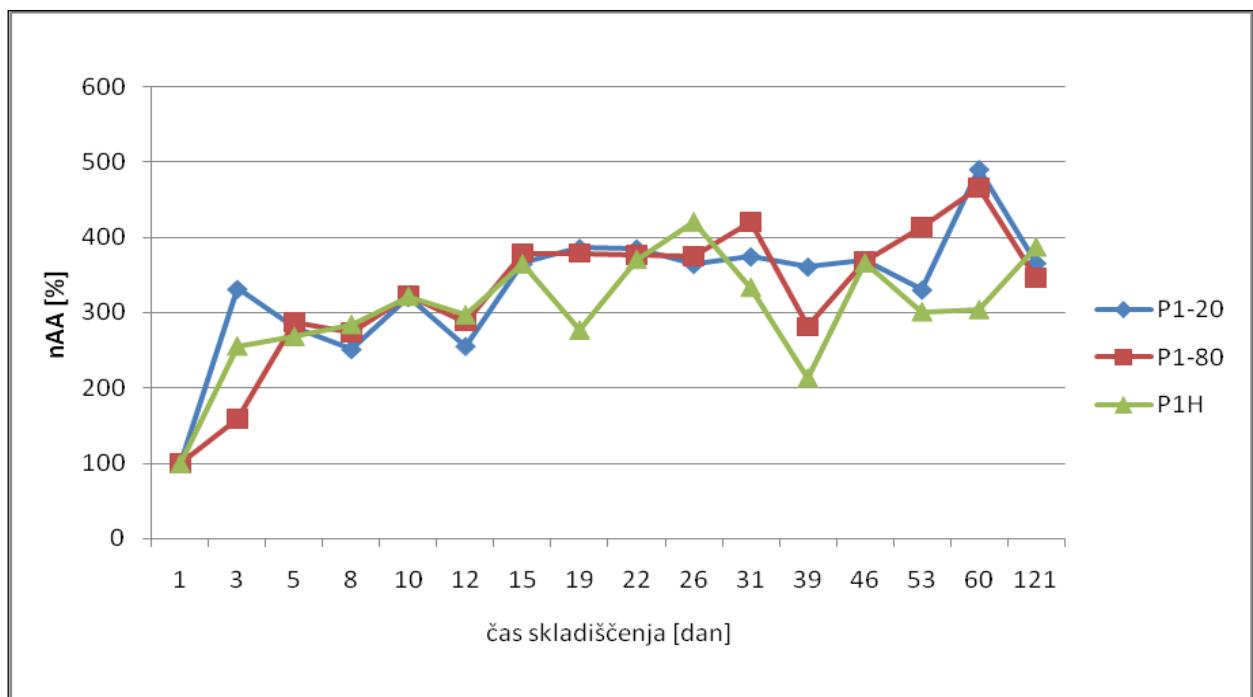
Predstavljeni rezultati kažejo, da je pri vseh temperaturah skladiščenja najvišjo nAA urina izkazoval vzorec T1. Večina vzorcev je v stabilni fazi od 15. dne merjenja naprej ohranjala vrednost nAA med 100 mg TE/mmol K do 250 mg TE/mmol K. Odstopal je le vzorec Z1, kjer smo določili primerljive vrednosti nAA pri temperaturi 4-8 °C in pri temperaturi -80 °C. Pri temperaturi -20 °C, pa je bila izmerjena nAA po 15. dneh skladiščenja znatno nižja (68-120 mg TE/mmol K).

4.2.2 Spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti dveh različnih vzorcev urina, skladiščenih pri temperaturi: -20 °C, -80 °C in 4-8 °C, izražene v % AA

Na sliki 16 in sliki 17 so prikazane spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti dveh različnih vzorcev urina (P1 in P3) v odvisnosti od temperature skladiščenja vzorca: -20 °C, -80 °C in 4-8 °C za vsako preiskovanko posebej.

Znotraj istega vzorca je prišlo do velikih nihanj v vrednosti nAA med posameznimi meritvami.

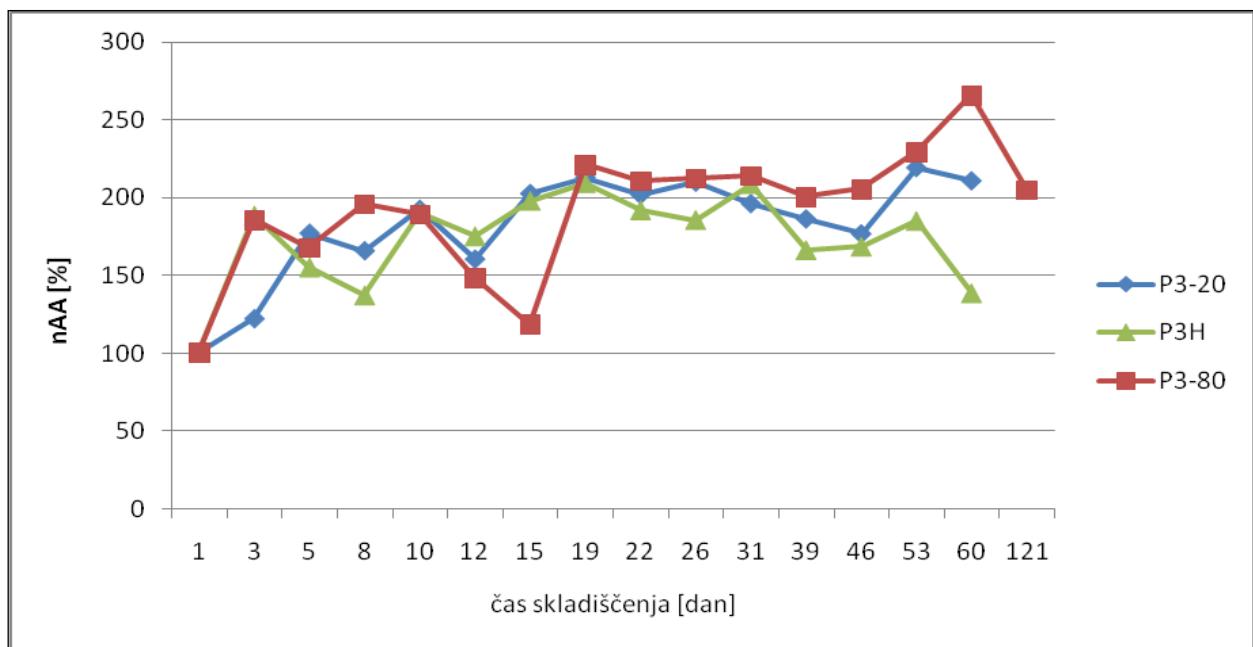
Slika 16 prikazuje spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti urina posameznika P1 med skladiščenjem v odvisnosti od temperature skladiščenega vzorca.



Slika 16: Spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti urina posameznika P1 med skladiščenjem v odvisnosti od temperature skladiščenega vzorca

Pri vzorcu P1 prihaja do razlik v izmerjenih nAA izraženih v procentih nAA določene na 1. dan. Razlik, v vsebnosti antioksidantov, ki bi jih lahko povezali s temperaturo skladiščenja nismo opazili.

Slika 17 prikazuje spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti urina posameznika P3 med skladiščenjem v odvisnosti od temperature skladiščenega vzorca.



Slika 17: Spremembe normalizirane antioksidativne aktivnosti urina posameznika P3 med skladiščenjem v odvisnosti od temperature skladiščenega vzorca

Tudi pri vzorcu P3 smo za različne dni skladiščenja določili razlike v % nAA. Največje razlike so določili 15. dan in proti koncu skladiščenja, ko smo v vzorcu hranjenem na -80°C določili večjo relativno normalizirano antioksidativno aktivnost kot pri nižjih temperaturah skladiščenja.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Diplomska naloga je potekala v dveh delih. Namen prvega dela poskusa je bil določiti variabilnost antioksidativne aktivnosti posameznih vzorcev urina znotraj posameznega dneva in primerjati antioksidativno aktivnost urina, izračunano kot količina izločenih antioksidantov v 24-ih urah, v primerjavi s koncentracijo antioksidantov v jutranjem urinu, normalizirano s koncentracijo kreatinina. Poskus je bil opravljen na desetih preiskovankah, ki so bile v povprečju stare 28 let. Namen drugega dela naloge je bil raziskati, kako različne temperature (-80 °C, -20 °C in 4-8 °C) in čas skladiščenja vplivajo na normalizirano antioksidativno aktivnost urina.

V raziskavi je sodelovalo 10 prostovoljk (preglednica 1). Na fakulteti so jim pripravili vse jedi in obroke, ki so jih preiskovanke zaužile v petih dneh izvajanja poskusa (priloga A). Sestava obroka je bila podrejena namenu preiskave (v dveh dneh poskusa so prevladovala živila, ki so vsebovala večjo količino nenasičenih maščobnih kislin). Preiskovanke so morale zaužiti obroke po vnaprej določenem meniju, vmes so lahko pile vodo. Praviloma so zaužile vso ponujeno hrano. Pridobljeni vzorci urina, ki so jih posameznice prinašale na fakulteto, so bili shranjeni in zamrznjeni v večjem številu paralelk.

5.1.1 Variabilnost antioksidativne aktivnosti posameznih vzorcev urina znotraj posameznega dneva in primerjava antioksidativne aktivnosti urina s koncentracijo antioksidantov v jutranjem urinu

Za določanje antioksidativne aktivnosti smo uporabili indirektni test, pri katerem se aktivnost meri kot sposobnost testnih spojin za redukcijo radikala ABTS⁺ (Roginsky and Lissi, 2005). Normalizirano antioksidativna aktivnost urina smo izrazili kot masne troloks ekvivalentne na milimol kreatinina. Ta količina je v tesni povezavi s troloks ekvivalenti antioksidativne aktivnosti (TEAC; angTrolox Equivalent Antioxidant Capacity). Enota 1 TEAC pomeni, da je v vzorcu koncentracija antioksidantov, ki ima enak učinek kot 1mM troloks (Abram, 2000).

Glavni viri antioksidantov v človeški prehrani so različni, to so žita, sadje, zelenjava, čokolada, olja in pijače, kot so čaj, kava, vino in sadni sokovi. Priporočeno je, da mora posameznik jesti vsaj pet obrokov in različne vrste sadja in zelenjave vsak dan, da se zmanjša tveganje za kronične bolezni, kot so rak in bolezni srca in ožilja, saj sta sadja in zelenjava dober vir antioksidantov (Muhleib, 1999). Učinek β-karotena ter vitaminov E in

C je bil dobro raziskan. Na univerzi v Glasgowu so ugotovili, da imajo β -karoten ter vitamina E in C močne antioksidativne aktivnosti in se dobro absorbirajo (Poljšak, 2005).

Večino vitaminov, ki so antioksidanti (vitamina C in E), zaužijemo in nadomeščamo s hrano, zato je tolikokrat ponavljeni slogan »uživajte pestro in uravnoteženo prehrano« na mestu. Zanimalo nas je, kako se dnevne količine izločenih AO pri posameznicah razlikujejo med seboj. Da se bodo vrednosti razlikovale, smo pričakovali, saj zaradi razlik fiziološkem stanju prihaja do razlik v resorpciji ter v izločanju antioksidantov, kljub temu da so vse uživale enako hrano.

Iz podatkov, ki so predstavljeni v sliki 8 lahko razberemo, da so razlike v izločenih AO v 24-ih urah, izraženih kot mg TE med posameznicami, v ponedeljek in torek relativno majhne. V sredo so razlike največje, saj je preiskovanka I izločila 207,5 mg TE, preiskovanka B pa je v 24-ih urah izločila več kot 3000 mg TE. Torej je razlika desetkratna. V četrtek in petek so bile razlike manjše, a še vedno večje kot v ponedeljek in torek. Glede na sestavo jedilnikov, težko razložimo omenjeno variabilnost. Do največjih odstopanj je prišlo pri preiskovanki B, ki je v torek izločila 480 mg TE, v sredo več kot 3000 mg TE in v četrtek 400 mg TE.

Pri pregledu rezultatov smo opazili, da je količina izločenih AO v 24-ih urah nekoliko povezana z dejstvom, da so nekatere preiskovanke kadilke. Komentiramo lahko samo opažanja, ki pa jih zaradi majhnega števila preiskovank in omejenega časa trajanja poskusa, ne moremo posploševati. Za natančnejše analize bi potrebovali dosti bolj obširen in sistematično sestavljen poskus.

Pri vseh kadilkah smo največ izločenih AO določili v sredo. Največja količina AO v urinu je bila izločena pri osebi B in C, najmanj pri osebi J. Pri večini kadilk so se vrednosti med seboj precej razlikovale v sredo in četrtek. Majhna razlika med količinami izločenih AO je v ponedeljek, torek in petek. Izstopata samo osebi D in I. Oseba D je nekadilka, potek izločanja AO pa je podoben kot pri kadilkah. Zelo izstopa krivulja osebe I, ki ima najmanjšo količino izločenih AO v sredo in četrtek.

Jedilniki so bili izbrani tako, da so obroki v ponedeljek, sredo in petek vsebovali več nasičenih maščobnih kislin, jedilniki v torek in četrtek pa več nenasicienih maščobnih kislin. Izmerjene razlike v količini izločenega urata (preglednica 4), ki je antioksidant, ne morejo razložiti velike variabilnosti količine izločenih AO v 24-ih urah.

Večina literature navaja podatke o vplivu kajenja na nivo antioksidantov v telesu. Poljšak in sod. (2005) so pokazali, da imajo kadilci v primerjavi z nekadilci, najbrž zaradi

pospešene presnove, manjšo koncentracijo antioksidantov v plazmi. Če vzamemo kot primer vitamin C, ki ga kadilcem velikokrat primanja, potrebujejo kadilci najmanj dvakrat toliko vitamina C na dan kot nekadilci.

Med študijem literature smo opazili, da je objavljenih nekaj raziskav, ki se nanašajo na količino antioksidantov v urinu. V neki študiji so za vsebnost skupnih fenolnih spojin v urinu kot pokazatelja vnosa fenolnih spojin uporabili metodo Folin-Ciocalteau (F-C), s katero lahko določimo vsebnost skupnih fenolnih spojin iz različnih živil (Medina-Remón in sod., 2009). Pri raziskavi literature smo naleteli na zelo omejeno število raziskav, kjer so za določene antioksidativne aktivnosti urina uporabljali metodo ABTS.

Za prikaz morebitne korelacije med AA 24-urnega urina in koncentracije AO jutranjega urina, normalizirane s kreatininom ki smo jo določili z metodo ABTS, smo uporabili računalniški program SPSS. S Pearsonovim koeficientom korelacije smo določili, da obstaja srednje močna, statistično značilna povezanost.

Svoje podatke lahko primerjamo z ugotovitvami, do katerih so prišli Medina-Remón in sod. (2009). Analizirali so skupne fenolne spojine v jutranjem urinu in nato normalizirali podatke na kreatinin. Koncentracija v urinu je pri posameznikih odvisna od spola, starosti, rase in prehrane (Wright in sod., 2001).

Zanimalo nas je, ali lahko s poznavanjem vrednosti ene spremenljivke, določimo drugo. To smo ugotovili prav s Pearsonovim koeficientom korelacije (priloga B in priloga C), kjer smo primerjali AA 24-urnega urina in koncentracije AO jutranjega urina, normalizirane s kreatininom (slika 9 do slika 12). Pri določanju AA urina pri desetih posameznicah v petih zaporednih dnevih smo ugotovili, da je bila v sredo in četrtek AA urina največja. Pri preverjanju korelacije smo prišli do ugotovitve, da je bila v sredo korelacija najnižja in negativna, v četrtek je dosegla najvišjo vrednost, ko je bila povezanost visoka.

5.1.2 Vpliv različne temperature (-80 °C, -20 °C in 4-8 °C) in časa skladiščenja na antioksidativno aktivnost urina

Temperatura je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na antioksidativno aktivnost, zato smo se odločili, da bomo pri šestih vzorcih urina opazovali, kako se nAA urina spreminja pri različnih temperaturah skladiščenja, ki je v našem poskusu trajalo 121 dni.

Shranjevanje vzorcev urina pri 2-8 °C in pri -20 °C za nekaj tednov je običajna laboratorijska praksa. Kljub številnim študijam ni dogovora o tem, kakšen je najboljši način shranjevanja urina (Olisekodiaka in sod., 2001).

Vzorci so bili skladiščeni pri temperaturi -20 °C, -80 °C in 4-8 °C.

Zanimivo je, da so bile vse nAA pri različnih temperaturah 60. dan merjenja maksimalne, v 121. dnevu pa so se vse vrednosti zmanjšale. Kljub temu da so bili vsi vzorci skladiščeni pri isti temperaturi točno določen čas, so bile razlike v nAA zelo velike. Največjo nAA je pri vseh temperaturah imel vzorec T1.

Poleg določanja nAA urina v mg TE/mmol K smo zaradi lažje predstave podali spremembe nAA (slika 16 in slika 17). V našem primeru smo med skladiščenjem izmerili večjo nAA. nAA ni bila v povezavi s temperaturo skladiščenja. Domnevamo, da je prišlo do določenih objektivnih napak pri izvedbi meritve (premalo intenzivno mešanje reagentov in vzorca v kivet, prekratek čas merjenja absorbance).

V literaturi nismo zasledili podatka kaj se dogaja z vzorci urina, skladiščenimi pri različnih temperaturah, zato svojih rezultatov ne moremo primerjati z drugimi študijami.

5.2 SKLEPI

Glede na predstavljene rezultate, lahko podamo naslednje sklepe:

- Metoda ABTS se je izkazala za primerno metodo za merjenje antioksidativne aktivnosti urina.
- Potrdili smo hipotezo, da obstaja statistično značilna povezanost posameznic med količino antioksidantov, izločenih v 24-ih urah, v primerjavi s koncentracijo antioksidantov jutranjega urina, normalizirano s koncentracijo kreatinina.
- V diplomskem delu smo ugotovili, da je pri relativno enostavnji spektrofotometrični metodi ABTS za določanje antioksidativne aktivnosti urina potrebno posvetiti posebno pozornost natančnemu praktičnemu delu pri izvedbi meritev.

Raziskava je pokazala, da je urin kompleksen matriks, ki zahteva posebno pozornost pri določanju antioksidativne aktivnosti. Da bi lahko natančneje določili vpliv temperature in časa skladiščenja na spremenjanje vsebnosti antioksidantov, bi bilo nujno potrebno omenjeni poskus ponoviti.

6 POVZETEK

Raziskava je obsegala petdnevno določanje AA urina pri desetih posameznicah in določanje njihove variabilnosti.

Z antioksidanti, ki jih je veliko predvsem v sadju in zelenjadi, so se bolj intenzivno začeli ukvarjati, ko so ugotovili povezavo z nastankom nekaterih bolezni, saj antioksidanti organizem zaščitijo pred boleznimi (Kreft in Škrabanja, 2000). Za indirektno določanje AA je danes med pogosto uporabljenimi metodami tudi metoda ABTS, ki temelji na enostavni spektrofotometrični določitvi (Zulueta in sod., 2008).

Najpomembnejši elementi so odvzem, hranjenje, stabiliziranje in transport urina. Dejavniki, kot so prehranjevanje, stradanje in telesni napor, vplivajo na rezultate laboratorijskih analiz, zato je nujno spremljati koncentracijo urina oziroma kreatinina. Pozorni moramo biti predvsem na transport vzorcev v laboratorij, saj jih moramo dostaviti čim prej oziroma moramo zagotoviti zaščito pred zunanjimi vplivi, če transport traja več kot 2 uri (Skitek in Trampuš Bakija, 2001).

Rezultati so pokazali, da obstajajo zelo velike razlike v antioksidativni aktivnosti urina pri preiskovankah tudi v primeru, da med poskusom uživajo isto hrano.

V okviru naloge nismo dokazali, da različna temperatura skladiščenja vpliva na antioksidativno aktivnost urina.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Arnao M.B., Cano A., Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198
- Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Voss H.P., Bast A. 2003. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 45–49
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 1: 70-76
- Brand – Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30
- Campos C., Guzman R., Lopez-Fernandez E., Casado A. 2009. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC–BCS assay. *Analytical Biochemistry*, 392: 37-44
- Cayman Chemical. 2012. Trolox: Cayman Chemical Item Number 10011659. Michigan, Cayman Chemical:1str.
<http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10011659>
- Deng J., Cheng W., Yang G. 2010. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125: 1430–1435
- Fernández-Pachón M.S., Villano D., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. 2006. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563: 101-108
- Halliwell B., Grootveld M. 1987. The measurement of free radicals reactions in humans. *FEBS Letters*, 213: 9-14
- Hanna N., Ahmed K., Anwar M., Petrova A., Hiatt M., Hegyi T. 2004. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Archives of Disease in Childhood*, 89:F518-F520
- Hribar J., Simčič M. 2000. Antioksidanti v sadju in vrtninah. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 151-159

Hulea S.A. 2008. An introduction to vitamins, minerals and oxidative stress. Boca Raton, Universal Publishers: 215 str.

Karadag A., Ozcelik B. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Analytical Methods, 2: 41-60

Karthik R., Krishnamurthy U., Vasudha K. 2011. Effect of storage temperatures and duration of storage on urinary albumin concentration in diabetics. Indian Journal of Medical Specialities, 2, 1:38-41

Kirschbaum B. 2001. Total urine antioxidant capacity. Clinica Chimica Acta, 305: 167-173

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika (elektronski vir). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.

http://www.bf.unilj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (maj, 2012)

Krinsky N.I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. Free Radical Biology and Medicine, 7: 617-635

Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-39

Lee C., Yoon J. 2007. UV direct photolysis of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. Journal of Photochemistry and Photobiology, 197: 232–238

Lucas-Abellán C., Mercader-Ros M.T., Zafrilla M.P. , Gabaldón J.A., Núñez-Delicado E. 2010. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. Food and Chemical Toxicology, 49: 1255–1260

Medina-Remón A., Barrionuevo-González A., Zamora-Ros R., Andres-Lacueva C., Estruch R., Martínez-González M., Diez-Espino J., Lamuela-Raventos R. 2009. RapidFolin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. Analytica Chimica Acta, 634: 54-60

Miki K., Sudo A. 1998. Effect of urine pH, storage time, and temperature on stability of catecholamines, cortisol, and creatinine. *Clinical Chemistry*, 44,8: 1759-1762

Milardović S., Ivezković D., Grabarić B.S. 2005. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68: 175-180

Mishra K., Ojha H., Kumar Chaudhury N. 2011. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130: 1036–1043

Miquela E., Alegria A., Barbera R., Farre' R., Clemente G. 2004. Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulars during storage. *International Dairy Journal*, 14: 1003-1011

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songlanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219

Muhleib F. 1999. Vitamini-za zdravje in dobro počutje. Ljubljana, DZS: 9-11

Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 94-100

Olisekodiaka M.J., Onuegbu A. J., Ebensunun O. M., Agbedana E.O., Taylor G.O. 2001. Effects of storage temperature, pH and time on urinary albumin level. *African Journal of Biomedical Research*, 14: 73-75

Pandel Mikuš R., Poljšak B. 2005. Funkcionalna hranila v zdravi prehrani. Obzornik zdravstvene nege, 39, 3: 201-207

Poš K. 2012. Primerjava avtomatiziranih analitskih metod za določanje urinskega sedimenta, Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Visokošolski strokovni študij laboratorijske biomedicine: 67 str.

Price J.A., Sanny C.G., Shevlin D. 2005. Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity(ORAC) for use in high throughput assay of totalantioxidant activity of drugs and natural products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54: 56 – 61

Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Biopresi pridobivanja antioksidantov.V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-67

Réblová Z. 2012. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech Journal of Food Science*, 30: 171–177

Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254

Serrano M., Guillen F., Martinez-Romero D., Castillo S., Valero D. 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2741-2745

Shekarriz B., Stoller M.L. 2002. Uric acid nephrolithiasis: current concept and controversies. *Journal of Urology*, 168: 1307-1314

Skitek M., Trampuš Bakija A. 2001. Priporočeni postopek za odvzem, zbiranje, hranjenje, stabiliziranje in transport urina. Ljubljana, Slovensko združenje za klinično kemijo. 20 str.

Smith T. 1986. Zdravstveni vodnik za družino. Ljubljana, DZS: 164-165

Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O., Salas P., Hubalek J., Adam V., Trnkova L., Havel L., Beklova M., Zehnalek J., Provaznik I., Kizek R. 2010. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. *Molecules*, 15: 8618-8640

Stevens L.A., Levey A.S. 2004. Clinical implications for estimating equations for glomerular filtration rate. *Annals of Internal Medicine*, 141: 959-961

Štiblar Martinčič D., Cor A., Cvetko E., Marš T., Legan M. 2008. Anatomija, histologija, fiziologija. 2. izdaja. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 151-157

Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-115

VŠZNJ. 2011. Odvzem osnovnih kužnin za mikrobiološke preiskave. Urin, Jesenice, Visoka šola za zdravstveno nego Jesenice, Portal za izobraževanje: 3 str.
<http://www.zdravstvena.info/vsznj/odvzem-osnovnih-kuznin-za-mikrobioloske-preiskave/>

Zuo Y., Yang Y., Zhu Z., He W., Aydin Z. 2010. Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 83: 1707-1710

Zulueta A., Esteve M.J., Frigola A. 2008. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114: 310-316

Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E. 1998. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 202-226

Wechtersbach L., Polak T., Poklar Ulrich N., Cigić B. 2010. Stability and transformation of products formed from dimeric dehydroascorbic acid at low pH. *Food Chemistry*, 129: 965–973

Weshahy A., El-Nokety M., Bakhete M., Rao V. 2011. Effect of storage on antioxidant activity of freeze-dried potato peels. *Food Research International*, 80: 303–307

Williams P.G. 1996. Vitamin retention in cook/chill and cook/hot-hold hospital foodservices. *Journal of the American Dietetic Association*, 96: 490-498

Wright J.G., Boddy A.V., Highley M., Fenwick J., McGill A., Calvert A.H. 2001. Estimation of glomerular filtration rate in cancer patients. *British Journal of Cancer*, 84: 452-459

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Marjanu Simčiču za vodenje in pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Za strokoven pregled diplomskega dela se zahvaljujem tudi recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću.

Hvala Kseniji Podgrajšek za pomoč pri laboratorijskem delu, za koristne nasvete in prijaznost.

Hvala tudi doc. dr. Jasni Bertoncelj za pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se uni. dipl. inž. živ. tehnol. Lini Burkan Makivić za pomoč pri urejanju literature.

Iskrena hvala mojim staršem, bratu in sestri za podporo in spodbudo, ki sem je bila deležna v času študija. Hvala tudi Matjažu za veliko potrpežljivosti in razumevanja na poti doseganja mojih ciljev. Hvala vam, ki ste mi vedno stali ob strani!

Hvala tudi prijateljici Petri za vse nasvete in pomoč.

PRILOGE

Priloga A:
Jedilnik, ki so ga imele preiskovanke v poskusu

PONEDELJEK

- ZAJTRK (maslo, marmelada, toast, mleko)
- D. MALICA (sendvič poli, sokpingo)
- KOSILO (fižolova enolončnica, kajzerica)
- P. MALICA (banana)
- VEČERJA (mlečni riž)

TOREK

- ZAJTRK (skutin namaz – paprika, peteršilj, kajzerica)
- D. MALICA (roglič, kompot)
- KOSILO (losos, rižota, cvetača v solati)
- P. MALICA (rezina z oreščki, sojino mleko)
- VEČERJA (avokadov namaz, toast)

SREDA

- ZAJTRK (viki krema, toast)
- D. MALICA (sendvič- savinjski želodec, kumare, ledeni čaj)
- KOSILO (testenine po bolonjsko, monte)
- P. MALICA (banana, skutka)
- VEČERJA (cmoki – marelica, jagoda, kompot)

ČETRTEK

- ZAJTRK (skutin namaz – drobnjak, kajzerica)
- D. MALICA (sosedovo pecivo, sojino mleko)
- KOSILO (riba, krompirjeva solata, duplo)
- P. MALICA (oreščki)
- VEČERJA (namaz iz leče, kajzerica temna, kumare)

PETEK

- ZAJTRK (marmelada, maslo, bela kajzerica)
- D. MALICA (sendvič– savinjski želodec)
- KOSILO (piščanec z bučkami, polenta, kinder maxi king)
- P. MALICA (banana)
- VEČERJA (sir, orehi, vložena zelenjava, bruskete)

Priloga B:

Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med količino dnevno izločenih AO in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsako posameznico

| Oseba (vsi dnevi) | Pearsonov koeficient korelacije |
|----------------------|------------------------------------|
| A | 0,820 |
| B | -0,269 |
| C | 0,855 |
| D | 0,718 |
| E | 0,967 |
| F | 0,550 |
| I | 0,506 |
| J | 0,068 |
| K | 0,783 |
| L | 0,570 |

Priloga C:

Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med količino dnevno izločenih AO in koncentracijo AO jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (za vsak posamezni dan)

| Dan (vse osebe) | Pearsonov koeficient korelacije |
|--------------------|------------------------------------|
| PONEDELJEK | 0,263 |
| TOREK | 0,062 |
| SREDA | -0,091 |
| ČETRTEK | 0,830 |
| PETEK | 0,021 |