

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Vesna S. Marinković**

**ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG**  
**STATUSA MLEKA MAJKI**  
**PREVREMENO ROĐENE DECE**

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2017.

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE**

**Vesna S. Marinković**

**ANALYSIS OF ANTIOXIDATIVE STATUS  
OF HUMAN MILK OF MOTHERS OF  
PRETERM INFANTS**

**Doctoral Dissertation**

Belgrade, 2017.

**MENTOR:**

Dr Miloš Ješić, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

Dr Ljiljana Šćepanović, redovni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Sonja Misirlić Denčić, docent  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Snežana Spasić, dipl. hem., viši naučni saradnik  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju-Centar za hemiju, Beograd

Datum odbrane doktorske disertacije:

*Mojim roditeljima*

*Sretenu i Ljiljani*

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena u saradnji Instituta za neonatologiju u Beogradu i Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centra za hemiju Univerziteta u Beogradu.*

*Najiskrenije se zahvaljujem mentoru Prof. dr Milošu Ješiću na podršci i savetima u toku izrade doktorske disertacije, kao i na pažljivom čitanju i korisnim sugestijama tokom pisanja.*

*Zahvalnost dugujem Prof. dr Miroslavu M. Vrvicu na beskrajnom optimizmu i podršci pri osmišljavanju i izradi ove studije. On je učitelj od koga se mnogo može naučiti.*

*Zahvaljujem se Dr Snežani Spasić na izradi EPR, enzimskih i ORAC metoda, na pažljivom čitanju, korisnim sugestijama i korekciji ove disertacije, kao i na izuzetnom entuzijazmu.*

*Takođe se zahvaljujem Dr Nikoleti Lugonji na velikoj podršci.*

*Prof. dr Ljiljani Šćepanović zahvaljujem na pažljivom čitanju i korigovanju doktorske disertacije.*

*Doc. dr Sonji Misirlić Denčić se zahvaljujem na saradnji i korisnim savetima u toku izrade doktorske disertacije.*

*Direktoru Instituta za neonatologiju Prim. dr sci med. Milici Ranković Janevski se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i velikom razumevanju.*

*Osoblju Banke mleka, Instituta za neonatologiju se zahvaljujem na saradnji i podršci tokom izrade doktorske disertacije.*

*Kompaniji Impamil se zahvaljujem na saradnji.*

*Mom bratu Srđanu želim da se zahvalim na podršci i neizmernoj veri.*

*Beograd, 27.11.2017.*

*Vesna Marinković*

# ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA MLEKA MAJKI PREVREMENO ROĐENE DECE

## REZIME

**Uvod:** Prevremeno rođena deca su posebno ugrožena zbog skromnijeg antioksidativnog potencijala u kombinaciji sa većom izloženošću oksidativnom stresu. Naime, oksidativni stres izazivaju visoke koncentracije kiseonika, fototerapija i intravenska primena lipida koji su deo nužnog terapijskog pristupa ovoj populaciji dece, kao i učestale infekcije.

Humano mleko (HM) predstavlja složeni biološki fluid koji ima antioksidaciona svojstva. Antioksidativni enzimi prisutni u HM su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px) i glutation reduktaza (GR). Neenzimski antioksidansi u HM su vitamin C, E, beta-karoten, glutation, laktoferin, koenzim Q, beta-endorfini i drugi. Ishrana humanim mlekom kod prevremeno rođene dece ima važnu ulogu u prevenciji oksidativnog stresa.

**Cilj:** Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (UAK) mleka majki prevremeno rođene dece tokom laktacije (kolostrum, prelazno i zrelo mleko). Određivanje UAK zrelog svežeg HM i poređenje sa zrelim HM koje je termički obrađeno (skladištenjem u frižideru, zamrzavanjem ili pasterizacijom), sa HM u koga je dodat obogaćivač, kao i adaptiranom mlečnom formulom za ishranu prevremeno rođene dece. Upoređen je i antioksidativni status zrelog obogaćenog mleka i adaptirane mlečne formule za ishranu prevremeno rođene dece.

**Materijal i metode istraživanja:** Ova kohortna studija je obuhvatila 30 majki prevremeno rođene dece (porodaj pre 37. gestacijske nedelje), kod kojih je uspostavljena laktacija, prema redosledu prijema u Institut za neonatologiju u Beogradu, u periodu od 01.12.2014. do 31.05.2016. Uzorci HM su od svake majke uzimani tri puta. Naime UAK je određivan u svežem HM uzorkovanom u prva 3 dana nakon porođaja (kolostrum), zatim od 5-14. dana nakon porođaja i u zreлом HM uzorkovanom nakon 21. dana od porođaja. Kriterijum za isključivanje iz studije je bio prekidanje laktacije, potreba za primenom terapije koja je kontraindikovana za vreme laktacije, kao

i pušenje duvana. Određivanje UAK HM je rađeno primenom različitih neenzimskih: spektrofotometrijskih (sposobnost hvatanja DPPH radikala, određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom, metoda bazirana na reakciji antioksidanasa sa Fe (III)-kompleksom, inhibicija lipidne peroksidacije) elektrohemijskih (ciklična i pulsna voltometrija), fluorimetrijskih metoda (metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta apsorpcije kiseoničnih radikala-ORAC), kao i elektron paramagnetnom rezonantnom spektroskopijom. Takođe, određena je i vrednost koncentracije vitamina C i vrednost pH u svim uzorcima mleka. Spektrofotometrijskim metodama određena je aktivnost SOD, GSH-Px, GR, i katalaze kao enzimskih pokazatelja antioksidativnog statusa. Vrednosti UAK svežeg zrelog HM su poređeni sa vrednostima UAK HM koje je bilo izloženo različitim termičkim uticajima i postupcima obrade (skladištenje u frižideru, zamrzavanje, pasterizacija). Analiziran je i upoređen UAK svežeg zrelog HM i zrelog HM u koje je dodat obogaćivač (Impamil, Mil Fortifier, Srbija). Takođe je upoređen UAK svežeg zrelog HM sa adaptiranom mlečnom formulom za ishranu prevremeno rođenog deteta (Impamil, Mil PRE, Srbija), kao i obogaćenog HM (Mil Fortifier) sa adaptiranom mlečnom formulom (Impamil, Mil PRE, Srbija).

U statističkoj analizi su korišćeni programi Excel i SPSS (Windows verzija 21.0).

Različiti uzorci mleka upoređivani su u skladu sa rezultatima Fridmanove dvosmerne analize varijanse sa rangovima, jednofaktorske analize varijanse, analizom varijanse sa ponovljenim merenjima, testom ekvivalentnih parova, t-testom i hi kvadrat testom.

**Rezultati:** Ovo istraživanje je obuhvatilo analizu UAK HM 30 majki koje su se prevremeno porodile i to u  $31,27 \pm 2,21$  gestacijskoj nedelji (GN). U svim ispitivanim uzorcima HM (različite zrelosti i postupka skladištenja i termičke obrade) nije detektovana aktivnost katalaze, takođe se vrednost pH nije menjala.

- Ispitivanje HM tokom laktacije:

Ispitivanje UAK HM tokom laktacije neenzimskim metodama: primenom metode ciklične voltetrije (CV), metodom određivanja kapaciteta apsorbanace kiseoničnog radikala (ORAC) i određivanjem koncentracije vitamina C, između kolostruma i zrelog mleka je pokazalo visoko statistički značajnu razliku ( $p < 0,001$ ). Aktivnost SOD i GR pokazuju visoko statistički značajnu razliku između kolostruma u odnosu na prelazno i zrelo mleko ( $p < 0,001$ ). Primenjenom metodom ispitivanje kolostruma i svežeg zrelog

HM elektron-paramagnetnom rezonantnom (EPR) spektroskopijom je pokazalo značajnu sposobnost hvatanja  $\cdot\text{OH}$  radikala.

- Čuvanje mleka u frižideru na  $+4^{\circ}\text{C}$  tokom 48 h;

Sve spektrofotometrijske metode, pokazale su značajno veći UAK u uzorku svežeg zrelog mleka u odnosu na mleko čuvano u frižideru tokom 48 h ( $p < 0,001$ ), osim inhibicije lipidne peroksidacije (ILP). Od primenjenih elektrohemijskih metoda, UAK određen diferencijalnom pulsnom voltametrijom (DPV) bio je značajno manji u uzorku pohranjenom u frižideru 48 h u odnosu na sveže mleko ( $p < 0,01$ ). S druge strane primena fluorimetrijskog metoda ORAC, određivanja UAK ima veću vrednost u uzorku mleka pohranjenom u frižideru ( $p = 0,002$ ).

Koncentracija vitamina C je značajno veća u uzorku svežeg mleka u odnosu na mleko čuvano u frižideru ( $p < 0,001$ ). Aktivnost SOD, GSH-Px su značajno više u uzorku svežeg mleka u odnosu na HM pohranjeno u frižideru ( $p < 0,01$ ). Ispitivanje UAK na osnovu antioksidativne aktivnosti GR nije pokazalo značajnu razliku između uzorka svežeg mleka i mleka čuvanog u frižideru.

- Proces zamrzavanja 7 i 30 dana HM:

U našoj studiji primenom spektrofotometrijskih metoda, samo je metod hvatanja slobodnih radikala (DPPH) pokazao značajan uticaj dužine zamrzavanja na smanjenje UAK ispitivanih uzoraka mleka ( $p < 0,001$ ). Primena elektrohemijske metode DPV je pokazala značajno smanjenje UAK nakon 7 dana zamrzavanja ( $p = 0,046$ ), dok fluorimetrijska metoda ORAC nije registrovala uticaj zamrzavanja na UAK.

Koncentracija vitamina C značajno se smanjuje nakon zamrzavanja tokom 7 i 30 dana u odnosu na uzorak svežeg mleka ( $p < 0,001$ ). U ispitivanim uzorcima mleka SOD ima najveću aktivnost u uzorku svežeg mleka u odnosu na zamrznute uzorke mleka ( $p < 0,001$ ). Aktivnost GSH-Px se menja nakon procesa zamrzavanja i značajno je veća u svežem mleku u odnosu na uzorak mleka zamrznut trideset dana ( $p < 0,001$ ). Aktivnost GSH-Px se nije značajno promenila nakon 7 dana zamrzavanja. Aktivnost GR je značajno veća u uzorku svežeg mleka, u odnosu na uzorak zamrznut tokom 30 dana ( $p = 0,041$ ).

- Pasterizacija HM:

Neenzimski UAK određen spektrofotometrijskim metodama, osim DPPH ( $p = 0,001$ ) nije se značajno promenio nakon pasterizacije mleka. Elektrohemijske i fluorimetrijske



metode određivanja UAK nisu pokazale značajnu razliku između ispitivanih uzoraka mleka. Pasterizacija smanjuje aktivnost SOD ( $p=0,001$ ) i GSH-Px i GR, kao i koncentraciju vitamina C ( $p<0,001$ ).

- Zamrzavanje 7 i 30 dana pa pasterizacija HM:

Sve spektrofotometrijske metode su pokazale značajnu razliku UAK zrelog mleka i mleka zamrznutog sedam dana pa pasterizovanog, osim ILP ( $p=0,076$ ). Poređenjem UAK na osnovu spektrofotometrijskih metoda hvatanja DPHH, metodom određivanja sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteovim reagensom i metodom baziranom na reakciji antioksidanasa sa Fe (III)-kompleksom (FRAP) pokazano je da zrelo mleko ima visoko statistički značajno veću vrednost UAK u odnosu na mleko zamrznuto 7 dana pa pasterizovano ( $p<0,001$ ). Poređenjem srednjih vrednosti UAK određenih metodom CV ( $p=0,021$ ) dobijena je statistički značajna razlika između ispitivanih uzoraka HM. Metod DPV u zreлом i mleku zamrznutom sedam dana pa pasterizovanom, pokazao je visoko statistički značajnu razliku u uzorku svežeg mleka u odnosu na mleko zamrznuto sedam dana pa pasterizovano ( $p<0,001$ ). Zamrzavanje mleka tokom sedam dana, a zatim pasterizacija nije pokazala razliku određivanjem UAK metodom ORAC. Koncentracija vitamina C značajno je veća u uzorku svežeg mleka u odnosu na zamrznuto sedam dana pa pasterizovano. Uporedno određivanje enzimske aktivnosti SOD, GSH-Px, GR je pokazalo da je njihova aktivnost najveća u uzorku svežeg mleka, a nakon zamrzavanja sedam dana i pasterizacije se smanjuje ( $p<0,001$ ). Poređenjem uzorka svežeg zrelog mleka i mleka zamrznutog tokom trideset dana pa pasterizovanog primenom spektrofotometrijskih metoda DPPH ( $p=0,001$ ) i određivanjem sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom ( $p=0,034$ ) je pokazano da je UAK statistički značajno veći u svežem mleku.. Elektrohemijske i fluorimetrijske metode nisu pokazale značajnu promenu UAK. Koncentracija vitamina C se značajno smanjuje sa dužinom zamrzavanja ( $p<0,001$ ).

- Sveže zrelo HM u odnosu na mlečnu formulu:

Ispitivanje UAK primenom svih spektrofotometrijskih i elektrohemijskih ( $p<0,001$ ) kao i fluorimetrijskih ( $p=0,035$ ) metoda pokazalo je veću vrednost UAK u svežem zreлом mleku u odnosu na adaptiranu formulu. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti enzima u mleku SOD, GSH-Px, GR, kao i vitamina C je u ispitivanim uzorcima mleka

u našoj studiji je pokazalo značajno veću aktivnost u uzorku svežeg zrelog mleka u odnosu na adaptiranu formulu ( $p < 0,001$ ).

- Sveže zrelo u odnosu na zrelo obogaćeno:

Spektrofotometrijske, fluorimetrijske, osim metode ORAC su pokazale veću antioksidativnu aktivnost obogaćenog HM koje je prethodno bilo zamrznuto do 6 meseci u odnosu na uzorak svežeg HM ( $p < 0,001$ ). Određivanje antioksidativnih enzima SOD, GSH-Px, GR je pokazalo značajno više vrednosti u obogaćenom mleku, u odnosu na sveže zrelo HM ( $p < 0,001$ ).

- Zrelo obogaćeno HM u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu:

Ispitivanjem UAK spektrofotometrijskim, fluorimetrijskim, elektrohemijskim metodama je utvrđena veća vrednost UAK obogaćenog HM u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu ( $p < 0,001$ ). Antioksidativna aktivnost enzima SOD, GSH-Px, GR, je takođe pokazala značajno veću aktivnost u zreloom obogaćenom HM ( $p < 0,001$ ).

**Zaključci:** Tokom laktacije (kolostrum, prelazno i zrelo mleko), dolazi do promena antioksidativnih svojstava humanog mleka. Proces termičke obrade i/ili skladištenja zrelog mleka majki prevremeno rođene dece dovode do smanjenja UAK. Zrelo mleko i mlečna formula za prevremeno rođenu decu imaju različita antioksidativna svojstva uz određenu prednost zrelog mleka. Zrelo zamrznuto, a zatim obogaćeno mleko ima bolja antioksidativna svojstva od svežeg zrelog mleka, a posebno od mlečne formule za prevremeno rođenu decu. Obogaćivanje HM vitaminom C nakon postupaka termičke obrade i/ili skladištenja bilo bi opravdano, jer se ovim postupcima značajno smanjuje koncentracija vitamina C. Sve ovo sugerise da je za ishranu prevremeno rođenog deteta optimalno kada god je moguće koristiti sveže obogaćeno HM. Potrebna je standardizacija metodološkog pristupa merenju UAK, što bi doprinelo preciznijim rezultatima i zaključcima u ovoj oblasti.

*Ključne reči: humano mleko, prevremeno rođeno dete, ukupni antioksidativni kapacitet, termička obrada humanog mleka, adaptirana mlečna formula, obogaćivač humanog mleka*

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Pedijatrija- Neonatologija

# ANALYSIS OF ANTIOXIDATIVE STATUS OF HUMAN MILK IN MOTHERS OF PRETERM INFANTS

## SUMMARY

**Introduction:** Preterm infants are especially exposed to oxidative stress because of poorer antioxidative defense mechanism. Oxidative stress is induced by frequent infections, as well as by high oxygen concentrations, phototherapy and intravenous lipid infusions, all of which are part of necessary therapy in this population of children.

Human milk (HM) represents a complex biological fluid with antioxidative properties. Antioxidative enzymes of HM are superoxide-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GSH-Px), glutathione-reductase (GR). Non enzyme antioxidants in HM are vitamin C, vitamin E, beta-carotene, glutathione, lactoferrin, coenzyme Q, beta-endorphins, and others. Human milk nutrition in preterm infants has an important role in prevention of oxidative stress.

**Goal:** Determination of total antioxidant capacity (TAC) of milk of mothers of preterm infants during lactation period (colostrums, early milk, mature milk). TAC of mature fresh milk is determined and compared with milk exposed to thermal processing (refrigeration, freezing or pasteurization), with fortified HM, and preterm milk formula. Antioxidative status of mature fortified milk and preterm milk formula was also compared.

**Material and methods:** This cohort study included 30 mothers of preterm infants (delivery before 37 weeks of gestation), with lactation according to admission in Institute for neonatology, during the period from December 1st 2014. to May 31<sup>st</sup> 2016. Sample of HM were collected from each mother three times. The TAC was determined in fresh HM collected in the first 3 days after delivery (colostrum), then between days 5 and 14 after the delivery, and in mature HM after 21 days from the delivery. Criteria for exclusion were cessation of lactation, need for therapy contraindicated during breast feeding and smoking. Determination of TAC in HM was performed by different non-enzyme: spectrophotometric (ability of catching DPPH radicals, determination of total phenol content with Folin-Ciocalteu reagent, method based on antioxidant reaction with Fe (III)-complex, inhibition of lipid peroxidation), electrochemical (cyclic and pulse

voltammetry), fluorimetric methods (method of determining antioxidative capacity of absorbing oxygen radicals – ORAC), and electron paramagnetic resonant spectroscopy. Also, concentration of vitamin C and pH value was determined in all milk samples. Activity of SOD, GSH-Px, GR and catalase as enzyme parameters of antioxidative status was determined with spectrophotometric methods. Value of TAC in fresh mature milk was compared with the values of TAC in HM that was exposed to different thermic and processing influences (refrigeration, freezing, pasteurization). TAC of fresh mature HM and fortified HM (Impamil, Mil Fortifier, Serbia) was analyzed and compared. Also, TAC of fresh mature preterm HM was compared with TAC of preterm milk formula (Impamil, Mil PRE, Serbia) as well as TAC of preterm milk formula (Impamil, Mil PRE, Serbia).

Programs Excel and SPSS (Windows 21.0 version) were used in statistical analysis.

Different milk samples were compared according to results of Friedman's two-way variance analysis with ranges, single-factor variance analysis, variance analysis with repeated measurements, equivalence test, t-test and hi-square test.

**Results:** This study involved analysis of TAC in HM of 30 mothers that gave birth prematurely, in  $31,27 \pm 2,21$  gestational weeks. In all analyzed samples of HM (different maturity and type of storing and thermic processing) catalase activity was not detected, pH value remained unchanged.

- Analysis of HM during lactation

Determination of TAC of HM with non enzyme methods: method of cyclic voltammetry (CV), method of determination of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and determination of vitamin C concentration in colostrum and mature milk showed statistically significant difference ( $p < 0,001$ ). SOD and GR activity in colostrum is statistically significant difference when colostrum was compared to early and mature milk ( $p < 0,001$ ). Analysis of colostrum and fresh HM with electroparamagnetic resonant (EPR) spectroscopy showed significant capacity of –OH radicals capture.

- Storing milk in refrigerator on  $+4$  °C during 48 hours

All spectrophotometric methods showed significantly higher TAC in fresh mature milk sample compared to milk stored in refrigerator during 48 hours ( $p < 0.001$ ), with an exception of lipid peroxidation inhibition (LPI). When all electrochemical methods

applied were compared, TAC determined with differential pulse voltammetry (DPV) was significantly smaller in sample stored in refrigerator for 48 hours compared to fresh milk ( $p < 0.01$ ). On the other hand, application of fluorimetric method, ORAC determination of TAC, has higher value in refrigerated sample ( $p = 0.002$ ).

Concentration of vitamin C is significantly higher in fresh milk sample compared to refrigerated sample ( $p < 0.001$ ). SOD and GSH-Px activity were significantly higher in fresh milk sample. Determination of TAC based on antioxidative activity of GR did not show significant difference between fresh and refrigerated milk.

- Process of HM freezing for 7 and 30 days

Among the all spectrophotometric methods used in our study, only the capture of free radicals method (DPPH) showed significant influence of freezing duration on decrease of TAC in examined samples ( $p < 0.001$ ). Application of electrochemical method DPV showed significant decrease of TAC after 7 days of freezing ( $p = 0.046$ ), while fluorimetric method ORAC did not register influence of freezing on TAC. Vitamin C concentration significantly decreased after 7 day and 30 day freezing period compared to fresh milk sample ( $p < 0.001$ ). In examined milk samples, SOD activity was the highest in fresh milk sample compared to freezed milk samples ( $p < 0.001$ ). GSH-Px activity alters during freezing process, and is significantly higher in mature milk sample compared with milk sample freezed during 30 days ( $p < 0.001$ ). GSH-Px activity was not significantly altered after 7 day freezing period. GR activity was significantly higher in fresh milk sample compared to milk sample freezed for 30 days ( $p = 0.041$ ).

- HM pasteurization

Non enzyme TAC determined with spectrophotometric methods, except DPPH ( $p = 0.001$ ), was not significantly altered after milk pasteurization despite the decreased quantity of vitamin C. Electrochemical and fluorimetric methods of TAC determination did not show significant difference between examined samples of milk. Pasteurization decreases SOD activity ( $p = 0.001$ ) as well as GSH-Px and GR activity, and vitamin C concentration ( $p < 0.001$ ).

- Freezing of HM for 7 and 30 days followed by pasteurization

All spectrophotometric methods showed significant difference in TAC of mature milk and milk freezed for 7 days and then pasteurized, with the exception of LPI ( $p = 0.076$ ). Comparison of TAC based on DPHH method, determination of total phenol content

with Folin-Ciocalteu reagent and method based on antioxidant reaction with Fe (III)-complex (FRAP) showed that mature milk has statistically significant higher value of TAC compared to milk freezed for 7 days and then pasteurized ( $p < 0.001$ ). Comparison of mean values of TAC determined by CV method shows a statistically significant difference ( $p = 0.021$ ). DPV method in mature and milk freezed for 7 days and then pasteurized, showed statistically significant difference in fresh milk sample compared to milk freezed for 7 days and then pasteurized ( $p < 0.001$ ). Analysis of freezed milk during 7 days followed by pasteurization by ORAC method did not show difference between examined samples. Vitamin C concentration was significantly higher in fresh milk sample compared to freezed then pasteurized sample. Comparative determination of enzyme activity of SOD, GSH-Px and GR showed that their activity was highest in fresh milk sample, and that it decreases after freezing and pasteurization ( $p < 0.001$ ). When comparing the mature milk sample and milk freezed for thirty days with spectrophotometric methods, only the DPPH method showed the difference between the examined samples ( $p = 0.001$ ) and determination of total phenol with Folin-Ciocalteu reagent ( $p = 0.034$ ). Electrochemical and fluorimetric methods did not show significant change in TAC. Vitamin C concentration is significantly decreased with the duration of freezing ( $p < 0.001$ ).

- Fresh mature milk compared to milk formula

Analysis of TAC with all spectrophotometric and electrochemical ( $p < 0.001$ ) as well as fluorimetric ( $p = 0.035$ ) methods showed higher TAC in milk compared to milk formula. Analysis of enzymatic antioxidative activity of SOD, GSH-Px and GR in milk, and of vitamin C concentration in examined milk samples in our study, showed significantly higher activity in fresh mature milk sample compared to preterm formula ( $p < 0.001$ ).

- Mature fortified milk compared to fresh mature milk

Spectrophotometric, fluorimetric methods, except for electrochemical ORAC method, showed higher antioxidative activity of fortified HM that was previously freezed even up to 6 months compared to fresh HM sample ( $p < 0.001$ ). Determination of antioxidative enzymes in milk, SOD, GSH-Px, GR, showed significantly higher values in fortified milk ( $p < 0.001$ ).

- Mature fortified milk compared to milk formula

Analysis of TAC with spectrophotometric, fluorimetric and electrochemical methods showed higher value of TAC in fortified HM compared to milk formula ( $p < 0.001$ ).

Antioxidative enzyme activity of SOD, GSH-Px and GR, except for vitamin C, also showed significantly higher activity in fortified HM ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions:** During lactation (colostrum, early milk and mature milk), antioxidative properties of human milk change. Thermal processing and/or storage of mature milk of mothers of preterm infants decrease TAC. Mature milk and preterm milk formula have different antioxidative properties with a certain advantage of mature milk. Mature frozen and then fortified milk has better antioxidative properties compared to fresh mature milk, especially compared to preterm milk formula. HM fortification with vitamin C after thermal processing and/or storage would be justified, because these processes significantly decrease vitamin C concentration. This suggests that whenever possible, fresh fortified HM should be used in nutrition of preterm infants. Standardization of TAC measurements is needed, which would contribute to more precise results and conclusions in this area.

*Key words: human milk, preterm infant, total antioxidative capacity, thermal processing of human milk, milk formula, human milk fortifier*

Research area: Medicine

Special topics: Pediatrics-Neonatology

## SADRŽAJ

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. ZNAČAJ ANTIOKSIDATIVNIH SVOJSTAVA MAJČINOG MLEKA.....	1
1.1.1. PROCES NASTAJANJA SLOBODNIH RADIKALA .....	2
1.1.2. ANTIOKSIDACIJSKI MEHANIZMI .....	4
1.1.3. ANTIOKSIDANSI U MAJČINOM MLEKU.....	5
1.1.3.1 Antioksidativni enzimi u humanom mleku.....	5
1.1.3.1.1. Superoksid dismutaza .....	5
1.1.3.1.2. Katalaza .....	6
1.1.3.1.3. Glutation peroksidaza .....	6
1.1.3.2. Neenzimski antioksidansi u humanom mleku .....	7
1.1.3.2.1. Laktoferin.....	7
1.1.3.2.2. Vitamin C.....	7
1.1.3.2.3. Vitamin E.....	8
1.1.3.2.4. Koenzim Q.....	8
1.1.3.3. Faktori koji mogu uticati na antioksidativna svojstva humanog mleka.....	9
1.1.3.4. Promene antioksidativnih svojstava humanog mleka tokom laktacije .....	9
1.1.4. NUTRITIVNE KARAKTERISTIKE HUMANOG MLEKA MAJKI PREVREMENO ROĐENE DECE.....	10
1.1.5. NUTRITIVNE POTREBE PREVREMENO ROĐENE DECE.....	12
1.1.6. BANKE HUMANOG MLEKA.....	13
1.1.7. PROCESI SKLADIŠTENJA HUMANOG MLEKA U „BANCI MLEKA“...	14
1.1.8. ADAPTIRANE MLEČNE FORMULE ZA ISHRANU PREVREMENO ROĐENE DECE.....	16



1.1.9. OBOGAĆIVAČI HUMANOG MLEKA .....	18
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>20</b>
3.1. Izbor ispitanika .....	20
3.2. Prikupljanje podataka o karakteristikama novorođenčeta na rođenju .....	20
3.3. Prikupljanje podataka o antropometrijskim karakteristikama majki i o toku trudnoće .....	20
3.4. Dobijanje uzoraka mleka tokom laktacije .....	21
3.5. Skladištenje uzoraka i njihova termička obrada .....	22
3.6. Obogaćivanje HM majki prevremeno rođene dece .....	22
3.7. Uzorak adaptirane mlečne formule za ishranu prevremeno rođenog deteta.....	24
3.8. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta humanog mleka .....	26
3.8.1. Spektrofotometrijske metode .....	27
3.8.1.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala .....	27
3.8.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin –Ciocalteu reagensom .....	27
3.8.1.3. Metoda bazirana na reakciji antioksidanasa sa Fe (III)-kompleksom (FRAP metoda) .....	28
3.8.1.4 Metoda inhibicije lipidne peroksidacije.....	29
3.8.2. Elektrohemijske metode .....	29
3.8.2.1. Ciklična voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija.....	29
3.8.3. Fluorimetrijske metode određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala (ORAC) .....	30
3.8.4. Određivanje koncentracije vitamina C.....	30
3.8.5. Vrednost pH.....	31
3.9. Određivanje antioksidativnih enzima u mleku upotrebom spektrofotometrijskih metoda.....	31
3.9.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	31

3.9.2. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze .....	32
3.9.3. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze .....	32
3.9.4. Određivanje aktivnosti katalaze .....	32
3.10. Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija .....	33
3.11. Statistička analiza podataka .....	34
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>35</b>
4.1. Antropometrijske karakteristika majki i prevremeno rođene dece .....	35
4.2. Karakteristike trudnoće i način završetka porođaja .....	36
4.3. UAK svežeg HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije .....	38
4.4. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece pohranjenog u frižideru 48 h.....	42
4.5. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece zamrznutog sedam i trideset dana .....	46
4.6. Uporedni prikaz UAK zrelog svežeg i pasterizovanog zrelog HM majki prevremeno rođene dece .....	50
4.7. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zamrznutog sedam dana, a zatim pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece .....	53
4.8. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zrelog zamrznutog trideset dana, a zatim pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece .....	57
4.9. Zbirni prikaz statističke značajnosti razlike u vrednostima UAK dobijenim različitim metodama u uzorcima zrelog HM majki prevremeno rođene dece koji su skladišteni tj. termički obrađeni na različite načine u odnosu na iste vrednosti u svežem zrelog HM.....	61
4.10. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog u odnosu na zrelo obogaćeno (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece i adaptirane mlečne formule (Mil PRE) .....	63
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>70</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>78</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>81</b>



## 1.UVOD

### 1.1. ZNAČAJ ANTIOKSIDATIVNIH SVOJSTAVA MAJČINOG MLEKA

Poslednjih decenija preživljavanje prevremeno rođene dece je u značajnom porastu, zahvaljujući ogromnom napretku perinatalne medicine i neonatologije.

Potenciranje ishrane humanim mlekom (HM) ima neprocenjivi značaj u ostvarenju ovog cilja.

Danas znamo da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi velikog broja oboljenja novorođenčadi, pa govorimo o konceptu "neonatalne bolesti slobodnih radikala" (1).

Oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi bronhopulmonalne displazije, retinopatije prematuriteta, nekrotizirajućeg enterokolitisa (NEK), intraventrikularne hemoragije i periventrikularne leukomalacije. Ukoliko je koncept "neonatalne bolesti slobodnih radikala" ispravan, onda se može tvrditi da ova stanja nisu različite bolesti, već se radi o istom oboljenju čija simptomatologija varira u odnosu na organ koji je najviše zahvaćen i oštećen (2). Ishrana HM kod prevremeno rođene dece ima važnu ulogu u prevenciji oksidativnog stresa. Potvrđeno je da HM ima antioksidativna svojstva zahvaljujući prisustvu antioksidativnih enzima i drugih bioaktivnih molekula, poput imunoloških faktora, faktora rasta i hormona. Antioksidativni enzimi prisutni u HM su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-P<sub>x</sub>), glutation reduktaza (GR). Takođe, u HM su prisutni i vitamin C, E, beta-karoten, glutation, laktoferin, koenzim Q i beta-endorfini. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdili svi sastojci HM koji imaju antioksidativni učinak (3,4).

Postoje različite metode za merenje pojedinačnih antioksidativnih aktivnosti u biološkim tečnostima.

Pokušaj određivanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta (UAK) HM, ima za cilj da označi ukupnu količinu svih antioksidanasa, uključujući enzime, vitamine i druge neenzimske antioksidanse i antioksidativne interakcije i predstavlja precizniji pokazatelj nego pojedinačna procena svakog antioksidansa (5).

U slučaju kada majka ne može da uspostavi laktaciju ili je ishrana HM kontraindikovana, ishrana se sprovodi specijalizovanim adaptiranim mlečnim formulama. Istraživanja su pokazala da su mnogi antioksidativni faktori odsutni ili nedovoljno zastupljeni u adaptiranim mlečnim formulama u odnosu na HM (6).

Formiranje "banki mleka" pri porodilištima i ustanovama specijalizovanim za lečenje prevremeno rođene dece predstavlja veoma važan oblik nutritivne podrške ovoj grupi dece (7).

Proces skladištenja HM i izlaganja termičkoj obradi (zamrzavanje i pasterizacija) u velikoj meri utiče na UAK HM (8).

Početak primene multikomponentnih (proteini, lipidi, minerali) obogaćivača HM označilo je novu epohu u ishrani prevremeno rođene dece. Njihovom primenom je omogućena ishrana HM uz njegove brojne prednosti, kao i zadovoljenje specifičnih povećanih nutritivnih potreba prevremeno rođene dece (9).

Uticaj obogaćivanja HM na UAK HM nije u potpunosti ispitan. Potreban je veći broj kontrolisanih studija da bi se izveli definitivni zaključci o uticaju primene obogaćivača HM na UAK HM (4).

### **1.1.1. PROCES NASTAJANJA SLOBODNIH RADIKALA**

U ćelijama tokom procesa oksidacije se oslobađa energija koja je potrebna za normalno funkcionisanje ljudskog organizma. U normalnim uslovima čovek udiše atmosferski vazduh koji predstavlja mešavinu različitih gasova u kojoj je kiseonik zastupljen sa 21%. Od ukupne količine udahnutog kiseonika čak 95 % podleže različitim metaboličkim procesima, a preostalih 5% se pretvara u kiseonične reaktivne vrste (10).

Slobodni radikali su atomi ili molekuli kiseonika koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u spoljnoj elektronskoj ljusci i predstavljaju vrlo reaktivne i nestabilne molekule sa visokim energetske potencijalom. Slobodni radikali se vežu za materiju sa kojom dolaze u kontakt, posebno na proteine, lipide i njima bogate strukture. Kao posledica navedenog procesa dolazi do burne lančane reakcije i brojnih oštećenja ćelijskih struktura koje na taj način podležu degenerativnim procesima i brže stare (11).

Izvori slobodnih radikala su endogeni i egzogeni. Endogeni se odnose na produkte nastale tokom metabolizma kiseonika, fagocitoze i hiperoksije.

Egzogeni izvori radikala su superoksid iz dima cigarete i zagađivači vazduha.

Povećano stvaranje slobodnih radikala je zapaženo kod velikih fizičkih ili psihičkih napora, intenzivnog izlaganja ultravioletnom zračenju ili radioaktivnom zračenju, kod nepravilne ishrane i izloženosti pasivnom pušenju. Neki lekovi i toksini uneseni u

organizam mogu dovesti do produkcije slobodnih radikala usled delovanja enzimskog sistema citohroma P450 (12).

Pojava slobodnih radikala ne označava istovremeno i pojavu bolesti. Narušavanje ravnoteže produkcije slobodnih radikala i supstanci kojima se organizam brani od oksidativnog stresa rezultira pojavom bolesti (11,12).

Poremećaj ravnoteže u produkciji slobodnih radikala i stvaranju antioksidanasa dovodi do promena u ćeliji koje nazivamo "oksidativnim stresom".

Ovaj disbalans rezultuje nagomilavanje reaktivnih kiseoničnih i mešovitih reaktivnih kiseonik-azot vrsta. Ovakvo stanje aktivira proces lipidne peroksidacije, koji uzrokuje oštećenje ćelijske membrane i dovodi do nakupljanja peroksidnih lipida koji uzrokuju oštećenje, a u nekim okolnostima može dovesti i do smrti ćelije (13). Na proteinima dolazi do hemijskih promena (na primer karbonilacije), što kao posledicu ima ubrzanje katabolizma proteina, skraćenje poluživota molekula u ćeliji i sniženje enzimske aktivnosti. Promene se mogu javiti i na nukleinskim kiselinama (14).

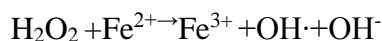
U reakcijama nepotpune redukcije kiseonika formiraju se intermedijarne forme kiseonika, tzv. reaktivne kiseonične vrste (ROS) koje prouzrokuju oštećenja u ljudskom organizmu. U ovu grupu ubrajamo slobodne radikale kiseonika superoksidni anjon ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroksil radikal ( $ROO^{\cdot}$ ), hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ), kao i reaktivne kiseonične vrste koje nisu slobodni radikali kao što su vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), „singletni“ kiseonik ( $^1O_2$ ) i peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ) (10).

Superoksid anjon radikal se kontinuirano stvara u procesima respiratornog lanca u mitohondrijama (15). Osim u mitohondrijama, ovaj radikal može nastati kao posledica aktivacije imunološkog sistema organizma, posebno nakon aktivacije leukocita pri upalnim procesima. Prema potencijalu reaktivnosti i štetnog efekta, izdvaja se hidroksil radikal koji „napada“ sve biološke molekule (lipidi, proteini, DNK). Nastajanje hidroksilnog radikala u biološkoj sredini vezano je za dve hemijske reakcije:

1. Reakcija Haber –Weiss-a, gde  $H_2O_2$  iako nije radikal u reakciji sa superoksidnim radikalom daje hidroksilni radikal.



2. Fentonove reakcije, odnosno interakcije  $H_2O_2$  sa prelaznim metalima, kao što su bakar, gvožđe, mangan koji se oslobađaju iz metaloproteina (16).



U manjem broju slučajeva kiseonični radikali mogu imati i povoljan efekat na organizam u smislu stimulacije sinteze interferona kao odgovora na odbranu organizma od virusne infekcije (17).

Prevremeno rođena deca su posebno izložena oksidativnom stresu zbog smanjene antioksidativne zaštite uz izloženost visokim koncentracijama kiseonika, infekciji, fototerapiji i intravenskoj primeni lipida, pri čemu se oslobađa velika količina slobodnog gvožđa koje ubrzava oksidaciju proteina i peroksidaciju masti učestvujući u Fentonovoj reakciji uz stvaranje toksičnih radikala (18).

### **1.1.2. ANTIOKSIDACIJSKI MEHANIZMI**

Odvijanje aerobnog metabolizma i život u sredini bogatoj kiseonikom ne bi bili mogući bez prisustva sistema zaštite od reaktivnih metabolita kiseonika.

U optimalnim fiziološkim uslovima dobra efikasnost antioksidativnog sistema u citozolu, prostorima hidrofobne faze membrana ćelije i u ekstracelularnom prostoru održava koncentraciju reaktivnih formi kiseonika na niskom nivou (19).

Antioksidansi su supstance koje su prisutne u malim koncentracijama u poređenju sa supstratom koji se oksiduje i mogu značajno da odlože ili spreče njegovu oksidaciju.

Smatra se da antioksidansi mogu imati važnu ulogu u usporavanju procesa „starenja ćelije“, smanjivanju nivoa holesterola, uz smanjenje rizika od nastanka ateroskleroze, srčanog i moždanog udara, kao i smanjenju rizika od nastanka tumora (20).

Prema mestu nastajanja antioksidansi značajni za ljudski organizam mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni nastaju u ljudskom organizmu, a egzogeni se unose putem hrane ili lekova (21).

U grupu endogenih antioksidanasa ubrajamo vitamine, koenzim Q, različite tiolne molekule (cistein, cistamin, metionin, glutation) i urate (22).

Antioksidanse prisutne u hrani, nazivamo još i egzogenim antioksidansima koji predstavljaju supstance koje svakodnevno unosimo u organizam hranom, koje značajno smanjuju štetno delovanje slobodnih radikala (23). Egzogeni antioksidansi mogu biti prirodni i sintetski. Prirodni su dobijeni iz različitih biljnih ili životinjskih izvora, a

sintetski hemijskim putem. Sintetski antioksidansi su po hemijskoj strukturi aromatski spojevi fenolne prirode.

Posebno je važna uloga prirodnih antioksidanasa poreklom iz prirodnog biljnog materijala bogatog tokoferolom, vitaminom C, karotenoidima i flavonoidima.

Voće i povrće su poznati kao bogat izvor vitamin C i karotenoida, a neke vrste sadrže cink i selen koji su kofaktori enzima i imaju antioksidativni kapacitet (24).

Antioksidansi se mogu takođe klasifikovati u 2 velike grupe, enzimski i neenzimski. U grupu enzimskih antioksidanasa spadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), i glutation reduktaza (GR), a u grupu neenzimskih antioksidanasa vitamin C, E, beta-karoten, alopurinol, melatonin, cistein, koenzim Q, glutation, mokraćna kiselina, albumin, transferin, bilirubin, biliverdin i druga jedinjenja sa redoks osobinama (25).

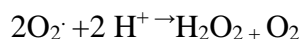
### **1.1.3. ANTIOKSIDANSI U MAJČINOM MLEKU**

#### **1.1.3.1 Antioksidativni enzimi u humanom mleku**

Humano mleko (HM) predstavlja složeni biološki fluid koji ima antioksidativna svojstva. Antioksidativni enzimi prisutni u HM su SOD, CAT, GSH-Px, GR (26).

##### **1.1.3.1.1. Superoksid dismutaza**

Superoksid dismutaza katalizuje uklanjanje superoksid radikala  $O_2^-$  tokom sledeće reakcije:



U daljem toku  $H_2O_2$  se konvertuje u  $H_2O$  delovanjem katalaze, GSH-Px i odgovarajućih redukcionih agenasa. Vodonik peroksid se mora ukloniti delovanjem enzima kao što su katalaza i peroksidaza. U ljudskom organizmu postoje tri oblika SOD: citosolna Cu/Zn-SOD, mitohondrijalna Mn SOD i ekstracelularna SOD. Dokazano je da SOD inhibira lipidnu oksidaciju na model sistemima (27).



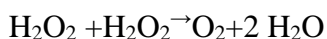
Koncentracija SOD u HM je 2-2,3 puta viša u odnosu na kravlje mleko (28). Koncentracija ovog enzima se menja tokom laktacije. U naučnim studijama je dokazano da je aktivnost SOD niža u kolostrumu, sa povećanjem aktivnosti tokom laktacije (29).

#### **1.1.3.1.2. Katalaza**

Katalaza je široko rasprostranjen enzim koji predstavlja važnu komponentu antioksidativnog sistema.

Katalaza je enzim koji ima tetrametričku strukturu i sastoji se iz 4 identične tetraedarski uređene podjedinice od 60 kDa, koje sadrže jednu feriprotoporfirin grupu molekularne mase oko 240 kDa (30).

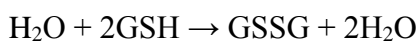
Katalizuje razgradnju vodonik peroksida do molekularnog kiseonika i vode.



Katalaza u mleku je hem protein sa molekularnom težinom od 200 kDa, i izoelektričnim pH od 5,5, sa stabilnošću na vrednosti pH 5 do 10 koja se rapidno gubi izvan ovog pH opsega (31,32).

#### **1.1.3.1.3. Glutation peroksidaza**

Glutation peroksidaza (GSH-P<sub>x</sub>) je enzim koji sadrži selen i učestvuje u zaštiti ćelije od oštećenja izazvanih lipidnom peroksidacijom. Uloga ovog enzima je da katalizuje razgradnju hidrogen peroksida koristeći redukovani glutation (GSH) pri čemu nastaje oksidovani glutation (GSSG) i voda (H<sub>2</sub>O).



Mleko sadrži nisku koncentraciju GSH-P<sub>x</sub> od koje je više od 90 % ekstraćelijskog tipa. Funkcija ovog enzima još uvek nije u potpunosti razjašnjena . Dosadašnji dokazi ukazuju da ovaj enzim vezuje 30% ukupnog selena (33). Aktivnost GSH-P<sub>x</sub> i sadržaj

selena se smanjuje tokom laktacije, dok maksimalnu vrednost dostiže mesec dana nakon porođaja (34).

### **1.1.3.2. Neenzimski antioksidansi u humanom mleku**

U HM su prisutni i vitamin A, C, E, beta-karoten, glutation, arginin, citrulin, taurin, selen, cink, laktoferin, koenzim Q i beta-endorfini (35).

U antioksidativnom procesu važnu ulogu imaju i drugi bioaktivni molekuli, poput imunoloških faktora, faktora rasta i hormona.

Laktoferin, protein koji vezuje gvožđe, može da funkcioniše kao antioksidans, kao i vitamin E, karoteonidi i koenzim Q uz jasnu ulogu „čistača radikala“ u lipidnoj fazi, dok vitamin C deluje u vodenj fazi. Lipofilni antioksidansi kao što je vitamin A, karotenoidi i vitamin E, pokazuju najveću koncentraciju u kolostrumu. U daljem toku laktacije njihova se koncentracija smanjuje, uprkos činjenici da se koncentracija lipida povećava (36).

#### **1.1.3.2.1. Laktoferin**

Pored transferina i feritin proteina, mogućnost da vezuje gvožđe i na taj način ispolji antioksidativne osobine ima i laktoferin.(37,38).

#### **1.1.3.2.2. Vitamin C**

Vitamin C predstavlja jedan od najmoćnijih neenzimskih antioksidanasa i ima vema veliki redukcionni potencijal, čiji su antioksidacijski učinci dokazani *in vivo* i *in vitro*. Prema rezultatima ogleda *in vitro*, peroksidacija lipida započinje u trenutku kada u prisustvu nekog oksidansa, sva količina raspoloživog vitamina C pređe iz redukovanog u oksidovani oblik. Vitamin C može sprečiti ne samo peroksidaciju lipida koju izazivaju hidrosil radikali, nego i drugi patofiziološki činioci oksidativnog stresa. Vitamin C učestvuje u obnovi urata, glutationa, vitamina E i beta-karotena iz njihovih odgovarajućih oksidovanih oblika.

Koncentracija vitamina C u HM se tokom laktacije smanjuje, mada postoji velika varijabilnost. Koncentracija vitamina C u kravljem mleku je značajno niža u odnosu na HM (39).

#### **1.1.3.2.3. Vitamin E**

Vitamin E omogućava veću stabilnost lipoproteinskih kompleksa, čineći ih kompaktnim i manje dostupnim za delovanje hidrolitičkih enzima. Takođe reaguje sa lipidnim peroksidnim radikalom, koga redukuje u molekularni lipidni hidroperoksid pri čemu nastaje vitamin E radikal, zbog čije stabilnosti se ne nastavlja dalja propagacija lančanih reakcija oksidacije (40).

Koncentracija vitamina E u kravljem mleku je relativno niska, za razliku od HM i kolostruma. Najveća koncentracija vitamina E nalazi se u kolostrumu i smanjuje se tokom prvih nedelja laktacije (41).

Majčino mleko sa optimalnom koncentracijom vitamina C i E ima direktan antioksidativni učinak tokom dojenja, ali i dugoročni efekat u smislu modulacije kasnijeg imunološkog odgovora, kao i u prevenciji atopijskih bolesti. Mehanizam programiranja i moduliranja imunološkog odgovora podstaknut antioksidativnim svojstvima majčinog mleka ima neprocenjivi značaj za imunološki sistem deteta (42).

#### **1.1.3.2.4. Koenzim Q**

Koenzim Q je odgovaran za normalno funkcionisanje elektronskog transportnog lanca u okviru mitohondrijalnog respiratornog sistema. Koenzim Q deluje sinergistički sa vitaminom E. Njegova koncentracija je veća u plazmi i mleku majki koje su se porodile u terminu porođaja u odnosu na prevremeno porođene žene (43). Koncentracija koenzima Q se smanjuje tokom laktacije, a najveća je u kolostrumu (44).

Beta-endorfini HM imaju antioksidativno delovanje, a koncentracija u HM zavisi od načina porođaja. U mleku majki koje su se porodile prirodnim putem nalazi se veće količine beta-endorfina u odnosu na majke koje su se porodile carskim rezom (3, 45).

Noviji radovi ukazuju na potrebu dodatnih istraživanja kako bi se utvrdili svi sastojci HM koji imaju antioksidativni učinak (46).

### **1.1.3.3. Faktori koji mogu uticati na antioksidativna svojstva humanog mleka**

Sastav HM i njegovo antioksidativno delovanje rezultat je dejstva niza faktora kao što su ishrana majke, suplementacija vitaminima i mineralima tokom trudnoće i laktacije, zdravstveno stanje majke, geografsko područje, trajanje laktacije i uticaj duvanskog dima (47).

Uticaj duvanskog dima je veći na koncentraciju antioksidanasa u majčinom mleku nego u plazmi. U mleku majki koje aktivno puše ili su izložene pasivnom pušenju nalazi se manja koncentracija antioksidanasa u poređenju sa koncentracijom u plazmi (48).

### **1.1.3.4. Promene antioksidativnih svojstava humanog mleka tokom laktacije**

Tokom laktacije dolazi do promena sastava HM i u tom smislu najveći antioksidativni kapacitet pokazuje kolostrum (49).

Količina nezasićenih masnih kiselina u kolostrumu je veća u odnosu na zrelo mleko, tako da je mogućnost lipidne peroksidacije i stvaranja slobodnih radikala u kolostrumu veća. Upravo zbog toga kolostrum predstavlja oblik HM posebno osetljiv na različite uticaje, što treba uzeti u obzir prilikom njegovog eventulanog skladištenja i pohranjivanja (50).

Tokom laktacije UAK HM se smanjuje, što ukazuje na značaj rane ishrane HM posebno u grupi prevremeno rođene dece (51).

Aktivnost SOD se postepeno povećava tokom laktacije, a najveća vrednost se registruje tokom četvrtog meseca nakon uspostavljanja laktacije (52).

Mleko majki koje su se porodile pre termina porođaja ima veći antioksidativni potencijal, u odnosu na mleko majki porođenih u terminu porođaja (53). Oštećenja izazvana oksidativnim stresom su najčešća i najteža tokom prve 2 nedelje života posebno u grupi prevremeno rođene dece, zbog čega su antioksidativna svojstva HM u tom periodu najpotrebnija (54).

Mleko majki prevremeno rođene dece obezbeđuje veću antioksidativnu zaštitu, odnosno kompenzuje smanjenu sposobnost odbrane prevremeno rođene dece od oksidativnog stresa (55).

Tokom intrauterusnog razvoja fetus je na oksidativni stres najosetljiviji od 17. do 25. nedelje gestacije jer u fetalnim eritrocitima još uvek ne funkcioniše enzimski sistem SOD, GSH-P<sub>x</sub>. Funkcija SOD se registruje od 17. nedelje, dok je aktivnost GSH-P<sub>x</sub> i GR prisutna tek od 26. nedelje (56).

Iako su do sada otkrivena brojna antioksidativna svojstva majčinog mleka, trebalo bi u budućnosti ispitati prisustvo ostalih komponenti HM, kao i njegove mehanizme endogene antioksidativne zaštite (57).

#### **1.1.4. NUTRITIVNE KARAKTERISTIKE HUMANOG MLEKA MAJKI PREVREMENO ROĐENE DECE**

Digestivni sistem prevremeno rođene dece karakteriše gastrointestinalna i metabolička nezrelost uz smanjenu apsorpciju i probavljivost nutrijenata. Ishrana HM ima veoma veliki značaj kod prevremeno rođene dece zbog bolje bioraspoloživosti nutrijenata (58).

##### **1.1.4.1. Ugljeni hidrati**

Laktoza je najvažniji i nazastupljeniji šećer u HM. Osim primarno energetske uloge, veoma je važna uloga laktoze u formiranju kiselog pH creva koji doprinosi rastu „korisnih bakterija“ i sprečavanju rasta patogenih bakterija (59). Osim laktoze u HM se nalaze i manje količine drugih šećera (glukoze, oligosaharida i glikoproteina) koji imaju specifičnu protektivnu ulogu. Oligosaharidi imaju značajnu ulogu u prevenciji sistemskih infekcija i nekrotizirajućeg enterokolitisa (NEK) (60).

##### **1.1.4.2. Lipidi**

Lipidi predstavljaju glavni izvor energije i obezbeđuju 50% kalorijskog unosa, omogućavaju bolju apsorpciju liposolubilnih vitamina (A, D, E, K) i izvor su esencijalnih masnih kiselina. Masne kiseline srednje dugih i kratkih lanaca nalaze se u HM u malim koncentracijama, dok su polinezasićene masne kiseline dugih lanaca zastupljene u većoj količini u odnosu na druge vrste mleka. Dugolančane višestruko

nezasićene masne kiseline (LC-PUFA) imaju važnu ulogu u sintezi ćelijskih membrana, funkciji mozga i retine (61).

#### **1.1.4.3. Proteini**

Proteini imaju veću biološku vrednost i iskoristljivost u HM u odnosu na adaptirane mlečne formule. Proteine u HM čine albumin, kazein, laktalbumin, imunoglobulini i drugi glikoproteini. Kazein osim nutritivne uloge predstavlja važan izvor aminokiselina. Ishrana HM u potpunosti zadovoljava potrebe novorođenčeta za esencijalnim aminokiselinama (62).

#### **1.1.4.4. Promene u nutritivnom sastavu mleka majki prevremeno rođene dece tokom laktacije**

Nutritivni profil HM varira između obroka, dojke iz koje se uzima uzorak, kao i doba dana. Potpunom ekspresijom dojki dobija se „hind milk“, mleko bogato mastima koje osigurava veći energetske unos. Nekada se na dojci suprotno od podoja pojavljuje tzv. „kapajuće mleko“ koje u odnosu na zrelo HM dobijeno ekspresijom ima značajno niži nivo masti.

Sadržaj nutritivnih komponenti u HM nije konstantan, već varira tokom laktacije (kolostrum, prelazno, zrelo mleko) (63).

##### **1.1.4.4.1 Kolostrum**

U prvih nekoliko dana nakon porođaja količina kolostralnog mleka nije velika i iznosi u proseku oko 30 ml/dan. Kolostrum se naziva još i „rano mleko“, koje sadrži veoma visok procenat imunoloških supstanci. U odnosu na prelazno i zrelo mleko sadrži malu količinu laktoze, masti i hidrosolubilnih vitamina, uz značajnu koncentraciju proteina, liposolubilnih vitamina i minerala. Žuta prebojenost je posledica veće količine beta karotena. Humani kolostrum je bogat imunoglobulinima, posebno je visoka koncentracija sekretornog IgA (64).

#### 1.1.4.4.2. Prelazno i zrelo mleko

Prelazno mleko označava mleko tokom prve dve nedelje laktacije, a zrelim mlekom smatramo mleko koje se stvara nakon treće nedelje laktacije.

Koncentracija laktoze, lipida i kalorijska vrednost se tokom laktacije povećava (65).

Koncentracija proteina u HM majki prevremeno rođene dece može biti dovoljna za adekvatan rast tokom prve nedelje života, ali već nakon druge nedelje ona ne zadovoljava nutritivne potrebe ove dece i u daljem toku laktacije se smanjuje (66).

#### 1.1.5. NUTRITIVNE POTREBE PREVREMENO ROĐENE DECE

U tabeli br. 1 prikazane su preporuke The European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition ( ESPGHAN) o unosu makro i mikronutrijenata u grupi prevremeno rođene dece (67).

Tabela 1. Nutritivne potrebe prevremeno rođene dece

<b>Nutrijent</b>	<b>Preporuka po kg/dan</b>	<b>Preporuka na 100 kcal</b>
<b>Energija (kcal)</b>	110-135	
<b>Protein(g) TM&lt;1 kg</b>	4,0-4,5	3,6-4,1
<b>Protein(g)TM 1-1,8kg</b>	3,5-4,0	3,2-3,6
<b>Masti g(sa MCT&gt;40%)</b>	4,8-6,6	4,4-6,0
<b>Ugljeni hidrati (g)</b>	11,6-13,2	10,5-12
<b>Kalcijum (mg)</b>	120-140	110-130
<b>Fosfor (mg)</b>	60-90	55-80
<b>Gvožđe (mg)</b>	2-3	1,8-2,7
<b>Cink (mg)</b>	1,1-2,0	1,0-1,8
<b>Natrijum (mg)</b>	69-115	63-105
<b>Kalijum(mg)</b>	66-132	60-120
<b>Hlorid (mg)</b>	105-177	95-161
<b>Vitamin A (IU)</b>	400-1000	360-740
<b>Vitamin D (IU/dan)</b>	800-1000	
<b>Vitamin E(mg)</b>	2,2-11	2-10
<b>Folati (ug)</b>	35-100	32-90
<b>Volumni unos (ml)</b>	135-200	

### **1.1.6. BANKE HUMANOG MLEKA**

Banke humanog mleka predstavljaju neprofitabilne servise za prikupljanje, obradu i distribuciju donorskog mleka (68).

Formiranje banki mleka pri porodilištima i ustanovama specijalizovanim za lečenje prevremeno rođene dece predstavlja veoma važan oblik nutritivne podrške ovoj grupi dece. U globalnoj perspektivi broj banaka HM u svetu se povećava.

Mleko se nakon ekspresije može primeniti za ishranu vlastitog deteta u svežem stanju, neprerađeno i taj oblik ishrane predstavlja imperativ (69).

Ishrana HM ima veliki značaj u grupi prevremeno rođene dece zbog bolje biorasploživosti mnogih nutrijenata (70).

Donorsko HM dobijeno ekspresijom najčešće se koristi u ishrani prevremeno rođene dece kod nedostatka mleka njihovih majki, kao tzv. "trofička ishrana", odnosno započinjanje minimalnog enteralnog unosa (71). Ishrana humanim mlekom povezana je sa protektivnim efektima i nižom incidencom sepse, kao i NEK-a (72). Donorsko HM je takođe ishrana prvog izbora, ukoliko je prethodno već postavljena dijagnoza NEK-a, naročito u fazi realimentacije nakon učinjene hirurške intervencije (73). Iako je uticaj ishrane HM u grupi prevremeno rođene dece i pitanje dugoročnih efekata na neurološki razvoj predmet kontroverzi, u novim studijama je pokazan pozitivan efekat (74).

Postoji značajna povezanost ishrane HM u ranom uzrastu i smanjenom riziku od kardiovaskularnih bolesti, incidenci dijabetes melitusa tip I i tip II, gojaznosti, nižim vrednostima krvnog pritiska i boljem biohemijskom lipidnom profilu u kasnijem životnom dobu.

Takođe, HM ima važnu protektivnu ulogu u razvoju alergije (astma, atopijski dermatitis), celijačne bolesti, inflamatornih bolesti creva (Chronova bolest, ulcerozni kolitis), kao i malignih bolesti tipa leukemije i limfoma u dečijem uzrastu (75).

U uslovima kada nije moguće ostvariti ishranu novorođenčeta mlekom njihovih majki, koristi se donorsko mleko, kao hrana izbora.

Postoje dve grupe potencijalnih donora HM. U prvu grupu ubrajamo zdrave majke koje uspešno doje svoju decu i koje višak svog mleka doniraju bankama mleka.



U drugu grupu ubrajamo majke čiji je višak mleka adekvatno pohranjen, ali namenjen isključivo ishrani sopstvenog deteta. Svaka žena koja donira svoje mleko banci HM, mora biti testirana u skladu sa preciznim kriterijumima nacionalnih smernica po čijim principima funkcioniše određena banka HM (68,76).

Anamnezni podaci za donora HM podrazumevaju pitanja da li je osoba na restrikciji ishrane i da li je bila u kontaktu sa osobama koje boluju od tuberkuloze.

Iako kriterijumi za selekciju donora HM variraju od zemlje do zemlje, većina donora mora zadovoljiti sledeće kriterijume:

**Donori HM ne mogu biti osobe:**

- koje imaju pozitivnu infekciju na virus humane imunodeficijencije (HIV), citomegalovirus (CMV), hepatitis B i C, sifilis, humani limfotropni virus tip I (HTLV-1)
- žene koje su HIV seronegativne, ali su pod visokim rizikom serokonverzije (osobe za čije se seksualne partnere zna da su aktivni narkomani ili su HIV pozitivne osobe)
- koje konzumiraju drogu ili alkohol
- koje su primile transfuzije krvnih derivata tokom poslednjih 12 meseci, ili su bili primaoci organa
- koje uzimaju određene lekove koji se izlučuju mlekom (77).

### **1.1.7. PROCESI SKLADIŠTENJA HUMANOG MLEKA U „BANCI MLEKA“**

Kontejneri i ostala oprema za skladištenje HM trebalo bi da bude jednokratna ili podobna za sterilizaciju. Većina banaka mleka nabavlja kontejnere posebno dizajnirane za skladištenje HM. U uslovima kada se ishrana novorođenčeta ne može organizovati mlekom vlastite majke, koristi se donorsko mleko, kao hrana izbora.

#### **1.1.7.1 Skladištenje mleka u frižideru**

Savetuje se da se sveže donorsko, kao i pasterizovano donorsko HM može čuvati u frižideru na +4° C tokom 48 h (78) .

Studija koja je ispitivala promene u HM koje je čuvano u frižideru na +4°C za 0, 24, 48, 72 i 96 h nije pokazala značajnu promenu osmolaliteta, ukupan broj gram-negativnih bakterija, koncentraciju sIgA, laktoferina i masti. Ukupan broj gram-pozitivnih kolonija bakterija, pH, broj leukocita i ukupnih proteina se povećava, dok se koncentracija slobodnih masnih kiselina povećava sa dužinom procesa skladištenja, iako su ove promene minimalne (79).

Analiza aktivnosti enzima SOD i GSH-P<sub>x</sub> se značajno smanjuje u slučaju skladištenja HM u frižideru na +4°C u poređenju sa svežim mlekom (80).

#### **1.1.7.2. Skladištenje mleka zamrzavanjem**

Zamrzavanje mleka vrši se na -20°C i ono se čuva u specijalnim frižiderima sa kontinuiranim praćenjem i održavanjem temperature. Zamrzivači i frižideri treba da imaju ugrađen adekvatan termometar sa alarmom i spolja jasno vidljiv monitor temperature. Kućni frižideri i zamrzivači nisu pogodna oprema za rad banke mleka (81).

Zamrznuto HM na -20°C proporcionalno sa dužinom skladištenja pokazuje signifikantno smanjenje UAK u odnosu na uzorak svežeg mleka ili HM koje je skladišteno u frižideru na +4°C. Pri zamrzavanju HM dolazi do formiranja lipidnih peroksida, kao posledica prisustva slobodnih masnih kiselina zbog smanjene aktivnosti lipoprotein lipaze prisutne u HM (82).

I pored velikog naučnog interesa nisu u potpunosti razjašnjeni svi efekti zamrzavanja na složeni sastav HM (81, 82).

#### **1.1.7.3. Pasterizacija humanog mleka**

Sam metod vršenja termičke obrade HM podrazumeva specijalizovanu opremu.

Rad pasterizatora HM je automatizovan tokom celog procesa pasterizacije, uz kompjuterizaciju koja u velikoj meri olakšava njegovu upotrebu.

Termička obrada je obavezna za svaki uzorak mleka, osim ako nije namenjeno ishrani isključivo vlastitog deteta.

Pasterizacija HM na 62,5°C tokom 30 min., tzv. „holder pasterizacija“ predstavlja preporučeni metod pasterizacije HM da bi se uništili mikroorganizmi, a sačuvao najveći mogući broj jedinstvenih biofaktora (68). Primena „holder pasterizacije“ tj. „hladne pasterizacije“ dovodi do gubitka nekih od biološki aktivnih komponenti HM kao što su imunoglobulini, laktoferin, lizozim, limfociti, lipaza, alkalna fosfataza, citokini i neki od faktora rasta (83).

Ipak ključni sastojci HM kao što su oligosaharidi, vitamin A, D, E, laktoza, polinezasićene masne kiseline dugih lanaca (LC-PUFA) i epidermalni faktor rasta (EGF) ostaju sačuvani (84).

Metod primene visoke temperature kratkog trajanja, tzv. „blic“ pasterizacija koja se sprovodi na temperaturi od 72°C nema uticaja na ukupni UAK. Ovaj oblik pasterizacije još uvek nije uveden u svakodnevnu praksu zbog specifične tehnologije, koja je dizajnirana za mali volumen mleka (85).

U toku su istraživanja najnovijih oblika pasterizacije kao što je ultrazvučna pasterizacija i pasterizacija visokim pritiskom koje bi u velikoj meri doprineli očuvanju nutritivnih, antioksidativnih i imunoloških svojstava HM. Njihova primena je još uvek predmet intenzivnog proučavanja (86, 87).

#### **1.1.8. ADAPTIRANE MLEČNE FORMULE ZA ISHRANU PREVREMENO ROĐENE DECE**

Vrlo često se dešava da majka ne može uspostaviti laktaciju i tada se savetuje da se prevremeno rođeno dete hrani specijalizovanom adaptiranom mlečnom formulom.

Osnovne karakteristike ovog oblika ishrane su veća kalorijska vrednost, kao i veća koncentracija proteina, kalcijuma i fosfora. Ishrana adaptiranom mlečnom formulom istovremeno znači gubitak esencijalnih kvaliteta HM.

Osnovne nutritivne karakteristike adaptiranih mlečnih formula specijalizovanih za ishranu prevremeno rođene dece su: visoka koncentracija proteina, odnos surutka/kazein: 60/40, povećana koncentracija srednjelančanih masnih kiselina i minerala i vitamina, kao i osmolalnost <300 mOsm/l.

Energetski unos treba da bude do 135 kcal/kg/dan sa maksimalnim volumnim unosom do 200 ml/kg/dan.

Savetuje se da unos proteina iznosi do 4,1g/100 kcal.

Sadržaj laktoze treba da bude relativno redukovan i zamenjen polimerima glukoze koji smanjuju osmolalnost. Preostali deo energije čine masti koje sadrže esencijalne masne kiseline prvenstveno LC-PUFA-a. Dodatak LC-PUFA adaptiranim mlečnim formulama i njihov uticaj na vid, kognitivni razvoj i rast je veoma važan. Generalno, većina adaptiranih mlečnih formula namenjenih ishrani ove grupe dece se suplementira sa LC- PUFA.

Kao dodatak adaptiranoj formuli za ishranu prevremeno rođene dece pominju se i sastojci HM kao što su nukleotidi, probiotici, prebiotici, glutamin, ali je njihova uloga još uvek predmet istraživanja (88).

Kada govorimo o sastavu adaptiranih mlečnih formula, postizanje nutritivnog sastava najbližnjeg sastavu HM i dalje ostaje ideal kome težimo.

Studije su pokazale da je aktivnost SOD, CAT, GSH-P<sub>x</sub>, GR značajno veća u HM, u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu (89). Adaptiranim mlečnim formulama dodaju se određene količine egzogenih antioksidanasa, ali se nikada ne može postići prisustvo prirodnih antioksidanasa kao što je laktoferin i urat.

Uprkos tome iznenađujuće je da ne postoji značajna razlika između UAK HM i adaptirane mlečne formule, što se može objasniti činjenicom da adaptirane mlečne formule sadrže veću količinu vitamina A, E i C u odnosu na HM. (90). Tako je jedna od studija gde je UAK određivan metodom određivanja kapaciteta apsorbanse kiseoničnog radikala (ORAC metodom) pokazala značajno višu vrednost UAK u adaptiranoj mlečnoj formuli u odnosu na uzorak svežeg mleka (91).

Jedna od studija koja je upoređivala UAK u pet različitih adaptiranih mlečnih formula je pokazala značajne razlike između njih, ali je UAK svežeg kolostruma bio signifikantno veći (92).

Razlike između podataka koje postoje za određivanje UAK u adaptiranim mlečnim formulama se može objasniti primenom različitih metoda određivanja koje se zasnivaju na različitim mehanizmima. Osim toga adaptirane mlečne formule su često obogaćene vitaminima A, E, C, dok HM sadrži druga jedinjenja sa jedinstvenim antioksidativnim svojstvima.

Potrebna su dodatna ispitivanja koja bi u velikoj meri doprinela razvoju još optimalnijeg sastava adaptiranih mlečnih formula (93).

### 1.1.9. OBOGAĆIVAČI HUMANOG MLEKA

Prosečne vrednosti nutrijenata u HM su varijabilne i ne zadovoljavaju povećane nutritivne potrebe prevremeno rođene dece. Ishrana prevremeno rođene dece ekskluzivno HM u dužem vremenskom periodu je povezana sa slabijim rastom i napredovanjem, kao i razvojem nutritivnog deficita u odnosu na grupu hranjenu obogaćenim HM ili adaptiranom mlečnom formulom za prevremeno rođenu decu (94). Ovaj fenomen se naziva postnatalni zastoj rasta (PNZR), za razliku od intrauterusnog zastoja rasta (IUZR).

Primenom multikomponentnih (proteini, lipidi, minerali) obogaćivača HM, omogućena je ishrana HM uz njegove brojne pozitivne efekte, ali uz zadovoljenje specifičnih nutritivnih potreba prevremeno rođene dece u skladu sa preporukama ESPGHAN-a (67). Obogaćivanje HM se savetuje kod dece čija je telesna masa (TM) <1800 g (95).

U grupi prevremeno rođene dece čija je TM <1500 g obogaćivanje HM je obavezno (96). Započinjanje obogaćivanja HM se savetuje pri postizanju enteralnog volumena od 80-100 ml/dan. Većina studija je jedinstvena u stavu da se obogaćivanje HM primenjuje do 40. postkonceptijske nedelje, ako je TM <2500 g (97). Obogaćivanje HM se za sada u Srbiji sprovodi samo u bolničkim uslovima.

Standardni metod obogaćivanja preterminskog HM primenom multikomponentnog obogaćivača predstavlja „zlatni standard“ u ishrani prevremeno rođene dece i deo je svakodnevnog rada „banke mleka“. Metode individualizovanog „ciljanog“ obogaćivanja HM se još uvek usavršavaju, a baziraju se na primeni analize nutrijenata u HM pomoću analizatora HM (MIRIS<sup>®</sup>) čiji se rad zasniva na spektralnoj laser tehnologiji (98).

Primenom obogaćivača HM su zadovoljene specifične nutritivne potrebe prevremeno rođene dece i omogućen je njihov bolji rast i razvoj. Istovremeno, odgovarajući rast i razvoj utiče na strukturu morbiditeta i ishod bolesti (99,100).

Potreban je veći broj kontrolisanih studija da bi se izveli definitivni zaključci o uticaju primene obogaćivača HM na UAK HM (101).

## **2. Ciljevi istraživanja**

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Odrediti UAK kolostruma, prelaznog mleka i zrelog mleka majki prevremeno rođene dece.
- Ispitati uticaj metoda pohranjivanja (odlaganje u frižider, zamrzavanje zrelog HM 7 i 30 dana, pasterizacija; zamrzavanje 7 i 30 dana pa zatim pasterizacija) zrelog HM majki prevremeno rođene dece na UAK.
- Uporediti UAK zrelog HM i zrelog obogaćenog HM majki prevremeno rođene dece.
- Uporediti UAK zrelog HM majki prevremeno rođene dece i adaptirane mlečne formule za ishranu prevremeno rođene dece.
- Uporediti UAK zrelog obogaćenog HM majki prevremeno rođene dece i adaptirane mlečne formule za ishranu prevremeno rođene dece.
- Utvrditi koja je metoda pohranjivanja HM majki prevremeno rođene dece najpogodnija u pogledu očuvanja antioksidativnih svojstava HM.
- Odrediti vrstu mlečne ishrane (zrelo mleko, obogaćeno zrelo HM ili adaptirana mlečna formula za ishranu prevremeno rođenog deteta) koja obezbeđuje najbolju antioksidativnu zaštitu.

### **3. Materijal i metode istraživanja**



### **3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1. Izbor ispitanika**

Ispitivanje je sprovedeno kao kohortna studija i obuhvatilo je 30 majki prevremeno rođene dece po redu prijema u Institut za neonatologiju, koje su se porodile pre 37. gestacijske nedelje, kod kojih je uspostavljena laktacija. Ukupno je analizirano 13 uzoraka kolostruma i 30 uzoraka prelaznog i zrelog mleka. Kod svake majke uzorak HM uziman je u tri vremenska perioda tokom laktacije (kolostrum, prelazno i zrelo mleko). Analiza je obuhvatila vremenski period od 01.12.2014. do 31.05.2016. godine. Tokom laktacije majke nisu koristile vitaminsku, niti mineralnu suplementaciju. Kriterijumi za isključivanje iz studije su bili prekidanje laktacije, potreba za primenom terapije koja je kontraindikovana za vreme laktacije i pušenje duvana.

#### **3.2. Prikupljanje podataka o karakteristikama novorođenčeta na rođenju**

Podatak o telesnoj masi na rođenju je dobijen iz medicinske dokumentacije iz porodilišta. Telesna masa na rođenju je izražena u gramima (g).

Gestaciona starost je procenjena pri prijemu u Institut za neonatologiju na osnovu datuma poslednje menstruacije majke i datuma očekivanog porođaja metodom po Nagel-u u skladu sa sa morfološkim karakteristikama novorođenčeta i izražena je u gestacijskim nedeljama (GN) (102).

#### **3.3. Prikupljanje podataka o antropometrijskim karakteristikama majki i o toku trudnoće**

Analiza je obuhvatila podatke o osnovnim antropometrijskim karakteristikama majki, i to: telesnoj masi (kg), telesnoj visini (cm) i indeksu telesne mase majke (BMI) (103).

Indeks telesne mase majke (BMI) predstavlja odnos telesne mase (TM) u kg i kvadrata telesne visine (TV) u m<sup>2</sup> i predstavlja pokazatelj uhranjenosti osobe. Izračunava se po sledećoj formuli:

$$\text{BMI} = \frac{\text{TM (kg)}}{\text{TV}^2 \text{ (m)}^2}$$

Vrednost BMI naših ispitanica izračunat je pomoću računarskog programa koji predstavlja sastavni deo fizikalnog statusa na prijemu svake majke pri javljanju u banku mleka Instituta za neonatologiju u Beogradu.

Tumačenje vrednosti BMI indeksa navedeno je u tabeli 2.

**Tabela 2. Tumačenje vrednosti indeksa telesne mase ( BMI)**

<b>Vrednost BMI</b>	<b>stanje uhranjenosti</b>
BMI<18,5	pothranjenost
BMI od 18,5-24,9	normalna uhranjenost
BMI od 25-29,9	prekomerna telesna masa ( nije gojaznost)
BMI od 30-34,9	gojaznost umerenog stepena
BMI od 35-39,9	gojaznost teškog stepena
BMI >40	ekstremna gojaznost

Ispitivanje je obuhvatilo i osnovne podatke o načinu ostvarivanja trudnoće (prirodni put, *in vitro* fertilizacija), paritet, način porođaja (prirodni put, *sectio cesarea*) i podatak o višeploidnoj trudnoći.

Svi navedeni podaci su dobijeni iz istorije bolesti koja predstavlja sastavni deo medicinske dokumentacije za svaku majku koja je hospitalizovana u Institutu za neonatologiju u Beogradu ili donosi svoje mleko u Institut.

### **3.4. Dobijanje uzoraka mleka tokom laktacije**

Uzorak HM je uziman nakon jutarnjeg izmlazanja u periodu od 08-10 h i banci HM Instituta za neonatologiju u Beogradu. Izmlazanje je vršeno pomoću pumpi za ručno izmlazanje ( Avent i Medela), kao i pumpama za električno izmlazanje (Medela). Prikupljeni su sledeći uzorci HM majki prevremeno rođene dece:

1. sveže preterminsko HM uzeto tokom laktacije u prva 3 dana nakon porođaja (kolostrum), kada je to bilo moguće.
2. prelazno mleko, uzeto u periodu od 5-14. dana nakon porođaja
3. zrelo mleko nakon 30. dana nakon porođaja

Uzorci zrelog HM majki prevremeno rođene dece je bio osnova za dalja ispitivanja.

### **3.5. Skladištenje uzoraka i njihova termička obrada**

Uzorci zrelog HM majki prevremeno rođene dece bili su čuvani u frižideru na temperaturi +4°C tokom 48 h sa ciljem ispitivanja ovih uslova skladištenja na UAK. Takođe, uzorci zrelog HM majki prevremeno rođene dece su bili zamrzavani na temperaturi -20°C tokom 7 dana i 30 dana sa ciljem ispitivanja uticaja vremenskog perioda skladištenja mleka u zamrzivaču na UAK. Dodatno, uzorci zrelog HM majki prevremeno rođene dece su bili izloženi režimu pasterizacije pri temperaturi od 62,5°C tokom 30 minuta, što predstavlja standardni oblik pasterizacije u „banci mleka“ Instituta za neonatologiju. Uzorci zrelog HM majki prevremeno rođene dece su takođe bili pohranjeni na temperaturi od -20°C nakon 7 i 30 dana, a zatim izloženi procesu pasterizacije na 62,5°C tokom 30 minuta. Dobijene vrednosti su upoređene sa UAK svežeg zrelog HM majki prevremeno rođene dece.

### **3.6. Obogaćivanje HM majki prevremeno rođene dece**

Uzorci zrelog HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto u banci mleka Instituta za neonatologiju u Beogradu do 6 meseci, a zatim odmrznuto obogaćeni su dodavanjem obogaćivača (MIL Fortifier, Impamil, Srbija) u količini 0,5 g na 10 ml HM pri temperaturi od 37°C. Ovakav način pripreme predstavlja metod standardnog obogaćivanja HM (104).

Osnovne nutritivne karakteristike obogaćivača HM MIL Fortifier (Impamil, Srbija) prikazane su u tabeli 3. i 4.

Tabela 3. Nutritivne karakteristike obogaćivača HM MIL Fortifier, Impamil, Srbija u 5 g praha i u 100 ml HM +5 g MIL Fortifier (5g/100 ml)

Komponenta	Jedinica mere	5 g praha MIL Fortifiera	100 ml HM+5 g MIL Fortifiera
Energetska vrednost	kcal kJ	19 80	85 356
Osmolarnost	mOsm/L	/	250±10%
Proteini	g	1,04	2,5
Ugljeni hidrati	g	3,22	10,77
Masti	g	0,22	3,58
<b>Mineralne komponente</b>			
Natrijum	mg	26,5	41
Kalijum	mg	32	88
Kalcijum	mg	71,5	98
Fosfor	mg	42,4	65
Odnos kalcijuma i fosfora Ca:P			1,75:1
Hloridi	mg	18,6	
Magnezijum	mg	6,0	
Gvožđe	mg	1,67	
Cink	mg	0,87	
Bakar	mg	0,065	
Mangan	µg	6,0	
Jod	µg	6,13	
Selen	µg	2,8	
<b>Ostale mikrokomponente</b>			
Holin	mg	146	7,4
Inozitol	mg	160	36
Taurin	mg	28	5,3
L-karnitin	mg	30	2,1

Tabela 4. Sadržaj vitamina u obogaćivaču HM MIL Fortifier, Impamil, Srbija u 5 g praha i u 100 ml HM + 5 g MIL fortifier (5 g/100 ml)

Komponenta	Jedinica mere	5 g praha MIL Fortifiera	100 ml HM+5 g MIL Fortifiera
<b>Vitamini</b>			
Vitamin A	µg	330	343
Vitamin D	µg	4,25	4,3
Vitamin E	mg	1,4	2,1
Vitamin K	ug	12	12,2
Vitamin C	mg	25,7	30
Tiamin (B1)	mg	0,112	0,132
Riboflavin (B2)	mg	0,144	0,19
Niacin	mg	0,43	0,58
Vitamin (B6)	mg	0,148	0,162
Folna kiselina	µg	35+6,7	40
Pantotenska kis.	mg	0,15	0,32
Vitamin B12	µg	0,42	0,45
Biotin	µg	9,31	9,7

### 3.7. Uzorak adaptirane mlečne formule za ishranu prevremeno rođenog deteta

Korišćen je uzorak adaptirane mlečne formule namenjene ishrani prevremeno rođenog deteta (Mil PRE, Impamil, Srbija).

U tabelama 5. i 6. prikazan je nutritivni sastav, kao i količina vitamina u adaptiranoj mlečnoj formuli za ishranu prevremeno rođenog deteta Mil PRE (Impamil, Srbija).

Tabela 5. Nutritivni sastav mlečne formule za ishranu za prevremeno rođenog deteta Mil PRE (Impamil, Srbija)

Komponenta	Jedinica mere	u 100 g praha	u 100 ml pripremljenog obroka
<b>Ugljeni hidrati</b>	<b>g</b>	<b>56,3</b>	<b>9,0</b>
Laktoza	g	37,5	6,3
Maltodekstrin	g	18,8	2,7
Prirodna dijetetska vlakna	g	2,5	0,4
<b>Masti</b>	<b>g</b>	<b>23,3</b>	<b>3,73</b>
Zasićene masne kiseline	%	45	45
Nezasićene masne kiseline	%	55	55
Linolna kiselina	mg	4,4	0,7
$\alpha$ -linoleinska kiselina		375	60
<b>Proteini</b>	<b>g</b>	<b>15</b>	<b>2,4</b>
Albumini globulini	%	60	60
Kazein	%	40	40
Taurin	mg	38,7	6,2
<b>Mineralni sastojci</b>	<b>g</b>	<b>2,8</b>	<b>0,45</b>
Kalcijum	mg	751	120
Fosfor	mg	395	63
<b>Odnos kalcijuma i fosfora</b>		<b>Ca:P=1,9:1</b>	
Magnezijum	mg	42	6,7
Gvožđe	mg	5,1	0,82
Kalijum	mg	682	109
Natrijum	mg	252	40
Hloridi	mg	387	62
Fluor	mg	0,25	0,04
Cink	mg	4,4	0,70
Bakar	mg	0,5	0,08
Jod	$\mu$ g	78	12,5
Mangan	$\mu$ g	31	5
Selen	$\mu$ g	10	1,6
<b>Drugi mikronutrienti</b>			
Holin	mg	75	12
Inozitol	mg	30	3,8
L-karnitin	mg	12	1,9
<b>Energetska vrednost</b>	<b>kcal (kJ)</b>	<b>506 (2121)</b>	<b>81 (339)</b>
<b>Osmolarnost</b>	<b>mOsm/l</b>	<b>/</b>	<b>290</b>

Tabela 6. Sadržaj vitamina u adaptiranoj mlečnoj formuli za ishranu prevremeno rođenog deteta Mil PRE (Impamil, Srbija)

Komponenta	Jedinica mere	U 100 g praha	U 100 ml pripremljenog obroka
Vitamin A	IJ	1937	310
Vitamin D	IJ	340	54
Vitamin E	IJ	8	1,3
Vitamin K	µg	26	4,2
Vitamin B1	µg	565	90
Vitamin B2	µg	800	128
Niacin	mg	5,6	0,9
Vitamin B6	µg	385	62
Folna kiselina	µg	350	56
Vitamin B12	µg	1,5	0,24
Pantotenska kiselina	mg	2,5	0,4
Biotin	µg	10	1,6
Vitamin C	mg	70	11

U svim navedenim uzorcima HM majki prevremeno rođene dece kao i u uzorku adaptirane mlečne formule za ishranu prevremeno rođene dece Mil PRE (Impamil, Srbija) određena je vrednost UAK. Analize sa ciljem utvrđivanja UAK obavljene su na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i u Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju. Uzorci HM tj. adaptirane mlečne formule za ishranu prevremeno rođene dece Mil PRE (Impamil, Srbija) su do ovih centara transportovani u ručnom frižideru.

### 3.8. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta humanog mleka

Ukupni antioksidativni kapacitet (UAK) HM, predstavlja ukupnu količinu svih antioksidanasa, uključujući enzime, vitamine, druge neenzimske antioksidanse i antioksidativne interakcije i predstavlja precizniji pokazatelj nego pojedinačna procena svakog antioksidansa posebno.

Neenzimske metode korišćene za određivanje UAK u ovoj studiji su: spektrofotometrijske, elektrohemijske, fluorimetrijske i spektrometrijske (4,5).

### 3.8.1. Spektrofotometrijske metode

#### 3.8.1.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

Sposobnost hvatanja 1,2-difenil-2-pikril-hidrazin (DPPH) radikala u uzorcima mleka određena je spektrofotometrijski. U uzorak mleka od 200 µl, dodato je 1800 µl metanolnog rastvora DPPH (0,1 M). Nakon inkubacije u trajanju od 30 min. na 37 °C u mraku, dodat je 1 ml hloroforma i sprovedeno je centrifugiranje tokom 5 min. Spektralna karakterizacija nastalih obojenih kompleksa (bistar supernatant) urađena je snimanjem absorbance na 517 nm. Kao kontrola je korišćen 100 mM metanolni rastvor DPPH (1800 µl) sa 200 µl demi vode, a procenat kapaciteta hvatanja DPPH radikala je izračunat je prema jednačini:

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

Sva određivanja i u uzorcima mleka i slepim probama rađena su u triplikatu (50).

#### 3.8.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin –Ciocalteu reagensom

Ukupan sadržaj fenola je određen spektrofotometrijski sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom. Pripremljen je FC reagens dobijen razblaživanjem originalnog u odnosu 1:10. Uzorak mleka je centrifugiran, a zatim tretiran jednakim zapreminama etanola i hloroforma i ponovo centrifugiran. Uzeto je 200 µl dobijenog bistrog supernatanta u koji je dodato 1000 µl razblaženog FC reagensa. Epruveta sa uzorkom je ostavljena u mraku tokom 6 minuta, a zatim je dodato 800 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i ostavljeno da stoji 120 minuta, da se razvije plava boja. Spektralna karakterizacija nastalih obojenih kompleksa (bistar supernatant) urađena je snimanjem absorbance na 740 nm. Određivanje u uzorcima mleka i slepoj probi rađeno je u triplikatu. Ukupan sadržaj fenola (FCGAE) je izražen u odnosu na koncentraciju galne kiseline (GAE), kao µg/l ekvivalenta galne kiseline (105).



### 3.8.1.3. Metoda bazirana na reakciji antioksidanasa sa Fe (III)-kompleksom (FRAP metoda)

FRAP (feric reducing antioxidant power) metoda je neenzimska spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta. Metoda se bazira na reakciji antioksidanasa sa feri- jonom (107). U osnovi ove metode je transfer elektrona sa antioksidansa na kompleks tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) pri čemu se gvožđe redukuje do intenzivno plavog kompleksa fero-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) koji ima apsorpcioni maksimum na talasnoj dužini 593 nm (50).

Radni FRAP reagens priprema se mešanjem acetatnog pufera (300 mmol/L, pH=3,6) TPTZ reagensa (10mmol/LHCl) i  $\text{FeCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$  (20mmol/L) u odnosu 10:1:1.

Uzima se 20 $\mu$ L metanol-hloroformske frakcije humanog mleka i dodaje 1,5 mL radnog FRAP reagensa, nakon čega se smeša vorteksuje i inkubira na 25<sup>0</sup>C tokom 10 min. Potom se očitava apsorpcioni maksimum nastalog fro-TPTZ kompleksa na talasnoj dužini od 593 nm. Kao slepa proba se koristi 20  $\mu$ L metanol-hloroformske frakcije humanog mleka i 1,5 ml acetatnog pufera (50).

Za konstruisanje standardne krive korišćeni su vodeni rastvori:

1.  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (100-1000  $\mu$ M)
2. Trolox (100-1000  $\mu$ M)
3. Vitamin C (100-1000  $\mu$ M)

Prilikom izvođenja metode uvek je korišćen sveže pripremljen radni rastvor FRAP reagensa. Da bi se izbegla zamućenost tokom eksperimenta, uzorci hladnog mleka su mešani sa metanolom i hloroformom u odnosu 1:1:1. Nakon vorteksovanja i centrifugiranja na 10 000 obrtaja tokom 15 minuta u daljem radu korišćena je metanol-hloroformska frakcija. Za svaki uzorak mleka izračunata je srednja vrednost tri merenja (106,107). Dobijeni rezultati su obrađeni Microsoft Office Excel 2007 i OriginPro 8 je korišćen za konstruisanje standardnih prava dok je Microsoft Office Ecxel 2007 korišćen za statističku obradu rezultata.

### **3.8.1.4 Metoda inhibicije lipidne peroksidacije**

Malondialdehid (MDA) koji nastaje u reakciji slobodnih radikala sa nezasićenim masnim kiselinama u sastavu npr. fosfolipida ćelijske membrane, služi kao indeks za određivanje jačine lipidne peroksidacije. Detektuje se u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom koja sa MDA daje crveno obojen proizvod čija se apsorbanca meri na 535 nm.

Što je veća koncentracija MDA to je manja inhibicija lipidne peroksidacije.

Radni reagens TCA-TBA-HCl je sadržavao: 15% trihlorsirćetne kiseline (TCA), 0,375% tiobarbituratne kiseline (TBA) u 0,25M hlorovodoničnoj kiselini. Rastvor se blago zagrevao kako bi se rastvorila tiobarbiturna kiselina.

Pomešano je 1 ml uzorka mleka sa 2 ml radnog reagensa (TCA-TBA-HCl reagens). Smeša se zagrevala u ključalom vodenom kupatilu 15 min. Nastali talog se odvajao centrifugiranjem 10 min. na 10000 o/min. U rastvoru se merila apsorbanca na 535 nm. Kao slepa proba koristio se rastvor u kome je umesto uzorka mleka stavljena  $\text{dH}_2\text{O}$ . Koncentracija MDA je izračunata korišćenjem ekstencionog koeficijenta  $1,56 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol}$  MDA po litru. (108).

## **3.8.2. Elektrohemijske metode**

### **3.8.2.1. Ciklična voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija**

Ciklična voltometrija (CV) i diferencijalna pulsna voltometrija (DPV) se koriste za kvantifikaciju elektrohemijskih osobina antioksidanasa prisutnih u različitim uzorcima i sa ciljem određivanja antioksidativnog kapaciteta .

Voltamogrami ciklične i diferencijalne pulsne voltetrije snimljeni su na instrumentu CHI760B (CHInstruments, Austin, USA). Sva merenja su rađena u troelektrodnoj ćeliji/kiveti, gde je staklena elektroda (GC) upotrebljena kao radna elektroda (Model CHI 104), a dodatna Pt elektroda ( platinska žica) velike površine (Model CHI 221) i Ag/AgCl (Model CHI 111) kao pomoćna i referentna elektroda. Elektrohemijske ćelije su zapremine 5 mL. Merenja su rađena u anaerobnoj atmosferi, sa uvođenjem azota u ćeliju. Voltamogram CV je snimljen u opsegu -400 do 1000 mV, sa brzinom snimanja

100 mVs<sup>-1</sup>, DP voltamogramom od -100 do +700 mV sa brzinom 100 mVs<sup>-1</sup>. Pre svakog snimka radna GC elektroda je polirana alumina prahom (1 i 0,5 µm, Buehler, IL, USA), a zatim isprana destilovanom vodom. Sva merenja su urađena na sobnoj temperaturi od 20 °C. Ispitani su svi uzorci mleka, a za optimizaciju uslova merenja urađene su probe sa različitim koncentracijama vitamina C (1, 2 i 5 mM). Merenja su rađena u anaerobnoj atmosferi, a dobijeni rezultati izraženi kao ekvivalent vitamina C (µM vitamina C) (109).

### **3.8.3. Fluorimetrijske metode određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala (ORAC)**

Kapacitet absorpcije kiseoničnih radikala (eng. oxygen radical absorbance capacity - ORAC) često se koristi kao indikator UAK i može zameniti brojne druge analize antioksidativnosti (110,111). UAK određen ORAC metodom meri sposobnost antioksidanasa da doniraju vodonikov atom i zato je blisko povezan sa sposobnošću antioksidanasa da deluju kao prekidači lančanih reakcija. ORAC metoda je primenjena kako je opisano predhodno (Romay et al. 1996.) sa malim modifikacijama. Fluorescein (osnovni rastvor pripremljen u vodi) rastvoren je u radnom rastvoru (75 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,4) u koncentraciji od 1.7 nM. Rastvor (150 µL) je inkubiran na 37°C tokom 20 min., i potom pomešan sa uzorcima (25 µL) i inkubiran još 10 min. Posle toga analiza je inicirana dodatkom 25 µL rastvora 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihidrohlorid (9.2 mM; napravljen svež svakog dana), i fluorescencija je merena svaki minut tokom 1 h sa ekscitacijom na 485 nm i emisijom na 511 nm. ORAC vrednosti su izražavane kao ekvivalenti Trolox-a.

### **3.8.4. Određivanje koncentracije vitamina C**

Koncentracija vitamina C u uzorcima određena je refraktometrijskom metodom pomoću test tračica, na aparatu RQ Flex. Metoda se zasniva na merenju refleksije gde se meri reflektovana svetlost sa trake. Kao i kod klasične fotometrije, razlika u intenzitetu reflektovane svetlosti omogućava određivanje koncentracije vitamina C. Svaka traka je označena sa bar-kodom koji je specifičan za određivanje svake analizirane supstance. Na displeju se prikazuje trocifreni broj koji je karakterističan za svaku supstancu koju

analiziramo. Na ovaj način instrument je kodiran za određivanje određene analizirane supstance (u našem slučaju vitamina C). Nakon postavljanja tračice u aparat prikazuje se vreme koje je potrebno da se odigra reakcija na test traci (u sekundama). Nakon isteka vremena automatski se očitava vrednost u mg/L.

### **3.8.5.Vrednost pH**

Vrednost pH uzorka mleka određena na pH metru Orion star A111, proizvođača Thermo Scientific.

## **3.9. Određivanje antioksidativnih enzima u mleku upotrebom spektrofotometrijskih metoda**

### **3.9.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze**

Aktivnost SOD u uzorcima mleka određena je adrenalinskom metodom. Drugi proteini iz uzorka (različiti od SOD) su uklonjeni tretiranjem vodene faze uzoraka mleka etanolom i hloroformom, a zatim centrifugiranjem. Superoksid-anjon-radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) se generiše u reakciji oksidacije adrenalina kiseonikom na alkalnom pH. Kada se  $O_2^{\cdot-}$  generiše u rasvoru, ubrzava se stvaranje adrenohroma, pošto  $O_2^{\cdot-}$  reaguje sa adrenalinom. Do kraja reakcije, kada se utroši adrenalin, formiranje adrenohroma se usporava. Ako se duže posmatra, adrenohrom nestaje i rasvor postaje braon boje koja potiče od nerastvorenih proizvoda u rastvoru. SOD reaguje sa  $O_2^{\cdot-}$ , koji je formiran u toku oksidacije adrenalina i smanjuje brzinu adrenohroma kao i njenu količinu. Procenat inhibicije je hiperbola u odnosu na koncentraciju SOD. Ovo je suprotno od drugih enzima, gde je funkcija vezana za enzimsku aktivnost linearna funkcija enzimске koncentracije. Jedinica aktivnosti SOD se definiše kao količina enzima koja smanjuje nivo autooksidacije adrenalina za 50% na pH 10,2 i izražena je u U/ml (112).

### 3.9.2. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Glutation-peroksidaza (GSH-P<sub>x</sub>) katalizuje oksidaciju redukovanog GSH u GSSG, uz redukciju vodonik peroksida.

Aktivnost GSH-P<sub>x</sub>, određena je GSH zavisnom redukcijom t-butil-hidroperoksida. Aktivnost GSH-P<sub>x</sub> se prati posredno određivanjem nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) na 340 nm. Jedinica aktivnosti se definiše kao količina enzima koja oksiduje 1 nmol redukovanog NADPH po minuti na 37°C na pH 7,0. Enzimaska aktivnost se izražava kao jedinica aktivnosti po gramu proteina (113).

### 3.9.3. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost glutation reduktaze (GR) je očitavana praćenjem brzine oksidacije NADPH, čiji je maksimum apsorbance na 340 nm. Aktivnost enzima izražavana je u jedinicama GR aktivnosti po mg proteina (U/mg proteina, a U je definisana kao nM NADPH / min. / mg proteina).

U kvarcnu kivetu je sipano: 0,6 ml fosfatnog pufera pH 7,4, 0,1 ml 2 mM GSSG, 0,1 ml 0,5 mM EDTA, 2 ml destilovane vode, 0,1 ml uzorka, i 0,1 ml 0,1 mM NADPH. Reakcija je počinjala kada je dodan NADPH. Za slepu probu su korišćeni isti rastvori, ali bez uzorka. Spektrofotometrijski je praćena apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm prema slepoj probi, na temperaturi od 37°C, svakih 30 sekundi tokom 150 sekundi.

$$\text{GR Aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \cdot 3000}{6,22 \cdot V \cdot C_{pr}}$$

$\Delta A_{uz}$  - promena apsorbance uzorka u minuti,  $\Delta A_{bl}$  - promena apsorbance blanka u minuti, V - zapremina uzorka (ml),  $C_{pr}$  - koncentracija proteina (mg/ml), 6,22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ( $M^{-1} cm^{-1}$ ) (114)

### 3.9.4. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) je određena metodom po Claiborn-u. Pre određivanja aktivnosti CAT uzorci mleka su tretirani hloroformom (1:1 v/v), a zatim centrifugirani. Vodonik peroksid ima maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost CAT je merena

praćenjem razlaganja  $H_2O_2$ , odnosno padom apsorbance na datoj dužini. Podešavanje aparata je vršeno sa 0,05 M fosftanim puferom, bez  $H_2O_2$ . Uzorci su promućkani predstavljajući u kivetu (kvarcna od 1,5 ml; 25 °C praćen je pad apsorbance na 240 nm u roku od 3 minuta, 5 merenja na po 30 sekundi). Srednja vrednost promena apsorbanci treba da bude u opsegu 0,03-0,06.

### **3.10. Elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija**

Elektron paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija pruža jedinstven i najdirektniji uvid u biohemiju slobodnih radikala i antioksidanasa. EPR spektroskopija je nedestruktivna, spektroskopska tehnika za detekciju i identifikaciju paramagnetnih vrsta (vrsta sa nesparenim elektronima), bazirana na unutrašnjem magnetnom momentu elektrona koji raste sa njegovim spinom. Određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka mleka metodom EPR spektroskopije, zasniva se na Fentonovoj reakciji upotrebom  $H_2O_2$  (Reanal, Budimpešta, Mađarska) i  $Fe^{2+}$  ( $FeSO_4$ ; Sigma-Aldrich Taufkirchen, Nemačka) u finalnim koncentracijama od 3 i 0,6 mmol/L, respektivno, nakon dodavanja DEPMPO 5-(dietokifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksidi; Plymouth Meeting, PA (4M). Uzorci su pripremljeni dodatkom  $H_2O_2$  i  $FeSO_4$  rastvorima koji su sadržavali uzorke mleka i DEPMPO. Posle inkubacije od 2 minuta, snimljen je EPR spektar. U svim analizama upotrebljena je ultra čista MilliQ (18 M) voda.

EPR spektar snimljen je na spektrometru Varian E104-A EPR (Varian, Palo Alto, CA, USA) X-band (9,572 GHz) u sledećim uslovima: modulacija amplitude 0,2 mT, modulacija frekvencije 100 kHz; mikrotalasna snaga 20 mW; vremenska konstanta 32 ms; vreme skeniranja 4 minuta. U toku eksperimenta temperatura je održavana na 293 K. Upotrebljen je Spin-trap stimulaciju DEPMPO od proizvođača Enzo Life Sciences International (Plymouth Meeting, PA, USA). Snimanje je urađeno korišćenjem EW softvera (Scientific Software, Bloomington, IL, USA). Uzorci su snimani u 10 cm dugačkim gas-propusnim teflonskim tubama da bi se održao konstantan nivo  $O_2$  u uzorcima (debljina zida 0,025 mm i unutrašnji dijametar 0,6 mm; Zeus Industries, Raritan, NJ, USA), a potom su smešteni u kvarcne kapilare. Merenja su započeta 2 minuta nakon starta reakcije. Spektralna simulacija svakog spektra je urađena

korišćenjem WINPER SimFonia kompjuterskog programa (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Darmstadt, Germany) da bi se odredio intenzitet signala (115).

Simulacija parametara za signal koji potiče dodatka DEPMPO bili su: DEPMPO/OH: a N  $\frac{1}{4}$ 14.0G, a H  $\frac{1}{4}$ 13.0G, a H g  $\frac{1}{4}$ 2.7 G (3H), a P  $\frac{1}{4}$ 47.3 G; DEPMPO/UA (spin adduct of UAradical): a N  $\frac{1}{4}$ 14.8 G, a H  $\frac{1}{4}$ 20.7 G, a P  $\frac{1}{4}$ 47.8 G; Asc : a H  $\frac{1}{4}$ 2.3 G.

### **3.11. Statistička analiza podataka**

Za obradu dobijenih podataka korišćene su različite statističke analize:

Fridmanova dvosmerna analiza varijanse sa rangovima, jednofaktorska analiza varijanse, analiza varijanse sa ponovljenim merenjima, test ekvivalentnih parova, t-test, hi kvadrat test.

Statistička značajnost razlike koja je smatrana značajnom prilikom poređenja bila je  $p < 0,05$ .

U analizi su korišćeni programi Excel i SPSS (Windows verzija 21.0).

## **4. Rezultati**



## 4. REZULTATI

### 4.1. Antropometrijske karakteristika majki i prevremeno rođene dece

Osnovne antropometrijske karakteristike majki prevremeno rođene dece prikazane su u tabeli 7.

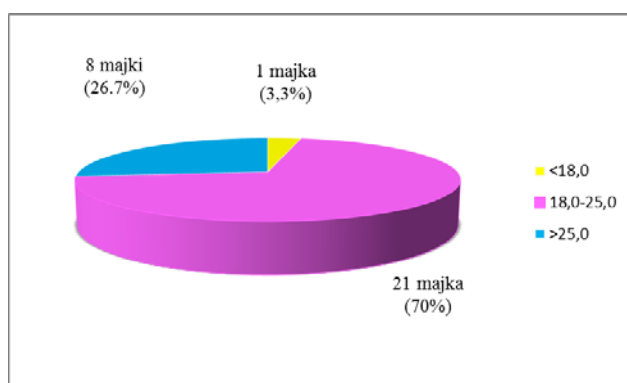
Tabela 7. Antropometrijske karakteristike majki prevremeno rođene dece

OBELEŽJE	n	RASPON	$\bar{x} \pm sd$
Telesna masa (TM:kg)	30	50,0 - 92,0	64,80 ± 9,18
Telesna visina (TV:cm)	30	150,0 - 179,0	168,40 ± 6,36
Indeks telesne mase (BMI)	30	17,0 - 29,0	22,92 ± 3,57

Njihova prosečna TM je bila  $64,80 \pm 9,18$  kg, a visina  $168,40 \pm 6,36$  cm. Srednji BMI iznosio je  $22,92 \pm 3,57$ .

Zastupljenost majki sa određenom vrednošću indeksa telesne mase (BMI) prikazana je na grafikonu 1.

Grafikon 1. Distribucija majki prevremeno rođene dece u odnosu na vrednost indeksa telesne mase (BMI)



Samo 1 majka (3,3%) je bila pothranjena BMI <18,5. Čak 21 majka (70,0%) je bila u očekivanom normalnom rasponu BMI 18,5-24,9, dok je 8 majki (26,7%) bilo prekomerne telesne mase (nije gojaznost) sa BMI u rasponu 25,0-29,9.

Osnovne antropometrijske karakteristike prevremeno rođene dece prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Antropometrijske karakteristike prevremeno dece na rođenju

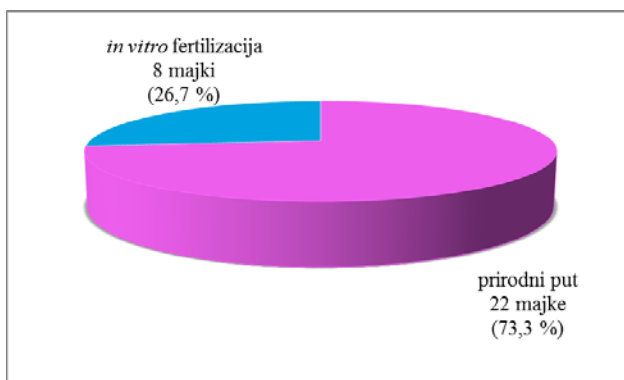
OBELEŽJE	n	RASPON	$\bar{x} \pm sd$
Gestacijska starost (nedelja)	30	27,0 - 36,0	31,27 ± 2,21
PTM (g)	30	950,0 - 2950,0	1560,00 ± 418,61

Deca su bila rođena u  $31,27 \pm 2,21$  gestacijskoj nedelji, a srednja TM na rođenju je iznosila  $1560,00 \pm 418,61$  g.

#### 4.2. Karakteristike trudnoće i način završetka porođaja

Način ostvarivanja trudnoće majki prevremeno rođene dece (*in vitro* fertilizacija, prirodni put) prikazan je na grafikonu 2.

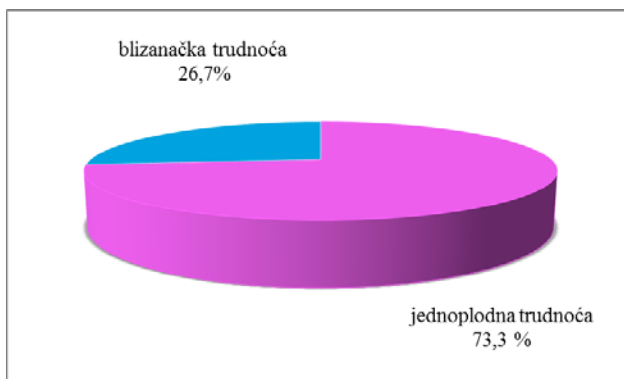
Grafikon 2. Prikaz načina začeća majki prevremeno rođene dece



Dvadeset dve majke (73,3%) začele su prirodnim putem, a osam (26,7%) *in vitro* fertilizacijom.

Analiza trudnoće majki prevremeno rođene dece koje su bile obihvaćene ovom studijom u odnosu na broj plodova prikazana je na grafikonu 3.

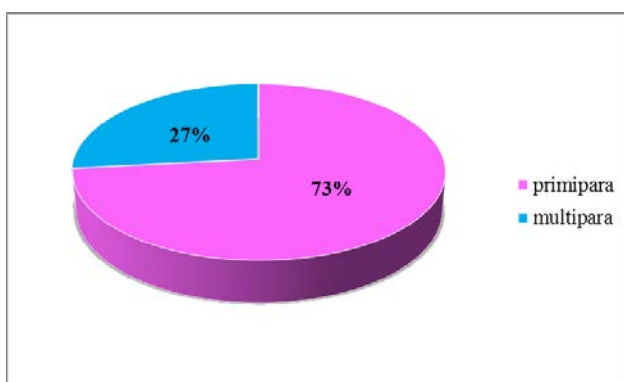
**Grafikon 3. Analiza trudnoće majki prevremeno rođene dece u odnosu na broj plodova**



Kod dvadeset dve majke (73,3 %) trudnoća je bila jednoplodna, a kod osam (26,7%) blizanačka. Sve trudnoće ostvarene *in vitro* fertilizacijom, bile su blizanačke.

Distribucija majki prevremeno rođene dece koje su bile obuhvaćene ovom studijom po paritetu prikazana je na grafikonu 4.

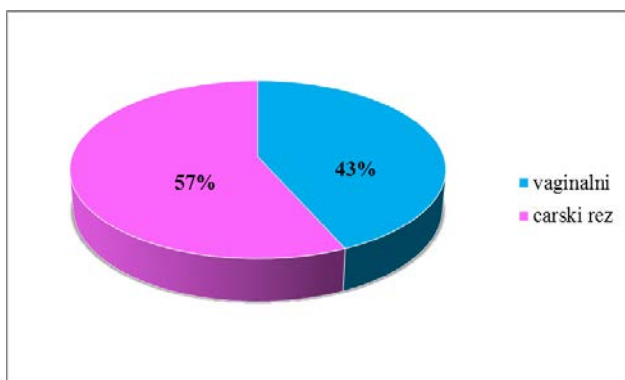
**Grafikon 4. Distribucija majki prevremeno rođene dece po broju ranijih trudnoća**



Čak 22 (73%) majke su bile prvoročke (primipara), dok su njih 8 (26,7%) bile višerotte (multipara).

Distribucija majki prevremeno rođene dece koje su bile obuhvaćene ovom studijom u odnosu na način završetka porođaja prikazan je na grafikonu 5.

**Grafikon 5. Distribucija majki prevremeno rođene dece u odnosu na završetak porođaja**



Carskim rezom porodilo se 13 majki (43,3%), a vaginalno njih 17 (56,7%). Poređenjem nije dobijena statistički značajna razlika u odabiru načina završetka porođaja kod majki obuhvaćenih ovim istraživanjem ( $\chi^2=0,533$ ,  $p=0,465$ ).

#### **4.3. UAK svežeg HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije**

Rezultati utvrđivanja UAK u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije primenom spektrofotometrijskih metoda prikazani su u tabeli 9.

Određivanje UAK spektrofotometrijskim metodama tokom laktacije prikazano je u tabeli 9.

**Tabela 9. Prikaz rezultata utvrđivanja UAK u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije primenom spektrofotometrijskih metoda**

Spektrofotometrijske metode	KOLOSTRUM	PRELAZNO MLEKO	ZRELO MLEKO	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
DPPH (% inhibicije)	70,47±13,22	69,94±17,39	73,38±14,63	0,686
FOLIN (μM MDA)	306,15±46,66	350,30±110,72	294,14±49,18	0,233
FRAP (μM FeSO <sub>4</sub> )	1373,63±166,45	1278,58±290,36	1173,50±240,14	0,164
ILP (μmolMDA/l)	3,97±1,31	4,56±0,62	4,13±1,14	0,208

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije

Dobijeni rezultati ukazuju da korišćenjem ovih spektrofotometrijskih metoda nije utvrđena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) UAK ispitivanih uzoraka HM majki prevremeno rođene dece, uzetim u različitim periodima laktacije (kolostrum, prelazno i zrelo mleko).

Rezultati utvrđivanja UAK u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije primenom elektrohemijskih metoda prikazani su u tabeli 10.

**Tabela 10. Prikaz rezultata utvrđivanja UAK u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece primenom elektrohemijskih metoda**

Elektrohemijske metode	KOLOSTRUM	PRELAZNO MLEKO	ZRELO MLEKO	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
CV (μM vitamina C)	57,15±20,34	50,46±38,28	35,08±22,51**	<b>0,002</b>
DPV (μM vitamina C)	94,62±54,01	79,46±59,39	76,00±38,08	0,092

\*\*  $p < 0,001$  (kolostrum – zrelo mleko)

CV-ciklična voltametrij; DPV-diferencijalna pulsna voltametrij

Dobijene vrednosti ukazuju da je UAK svežeg HM majki prevremeno rođene dece izmeren CV metodom najveći u kolostrumu, smanjuje se u prelaznom, a najmanji je u zreloom mleku dostižući visoku statističku značajnost razlike ( $p < 0,002$ ; kolostrum-zrelo mleko).

Dobijene vrednosti UAK metodom DPV nisu se statistički značajno razlikovale između analiziranih uzoraka svežeg mleka ( $p > 0,05$ ).

Rezultati ispitivanja UAK metodom određivanja apsorbance kiseoničnog radikala (ORAC) izražene kao ekvivalent Troloxa u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece u različitim periodima laktacije prikazani su u tabeli 11.

Tabela 11. **Rezultati utvrđivanja UAK u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece primenom fluorimetrijske (ORAC) metode**

ORAC (ekvivalent Troloxa)	KOLOSTRUM	PRELAZNO MLEKO	ZRELO MLEKO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	3,24±0,72	2,88±0,69	2,19±0,46**	<b>0,001</b>

\*\*  $p < 0,001$  (kolostrum – zrelo mleko)

ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala

Određivanje UAK metodom ORAC takođe je pokazalo najveće vrednosti u kolostrumu, uz postepeno smanjenje tokom laktacije i najmanje registrovane vrednosti u zreloom mleku. Srednje vrednosti UAK određene metodom ORAC ne razlikuju se značajno u kolostrumu i prelaznom mleku ( $p = 0,200$ ) dok između kolostruma i zrelog mleka postoji visoko statistički značajna razlika ( $p = 0,001$ ).

Koncentracija vitamina C u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece u toku laktacije prikazana je u tabeli 12.

Tabela 12. **Koncentracija vitamina C u uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije**

Vitamin C (mg/100ml)	KOLOSTRUM	PRELAZNO MLEKO	ZRELO MLEKO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	83,31±4,33	61,05±2,85 <sup>##</sup>	79,00±4,58	<b>&lt;0,001</b>

<sup>##</sup>  $p < 0,001$  (kolostrum – prelazno mleko)

Koncentracija vitamina C najveća je u kolostrumu, u uzorku prelaznog mleka pokazuje trend smanjenja, dok je u zreloj mleku u porastu.

Srednja vrednost koncentracije vitamina C je visoko statistički značajno veća u kolostrumu u odnosu na prelazno mleko ( $p < 0,001$ ) dok između kolostruma i zrelog mleka nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike ( $p = 0,080$ ).

Vrednost pH u ispitivanim uzorcima svežeg HM majki prevremeno rođene dece u toku laktacije prikazani su u tabeli 13.

Vrednosti pH u ispitivanim uzorcima mleka majki prevremeno rođene dece prikazani su u tabeli 13.

**Tabela 13. Vrednost pH u HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije**

pH	KOLOSTRUM	PRELAZNO MLEKO	ZRELO MLEKO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	7,14±0,10	7,10±0,11	7,09±0,27	0,686

Vrednosti pH između ispitivanih uzoraka svežeg HM tokom laktacije nisu se statistički značajno razlikovale ( $p > 0,05$ ).

Aktivnost enzima antioksidativne zaštite tokom laktacije u ispitivanim uzorcima svežeg HM prikazana je u tabeli 14. U ispitivanim uzorcima HM nije detektovana katalazna aktivnost.

Tabela 14. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u HM majki prevremeno rodene dece tokom laktacije

Antioksidativni enzima	KOLOSTRUM	PRELAZNO MLEKO	ZRELO MLEKO	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
SOD (U/ml)	658,96±434,70	1246,99±406,27 <sup>##</sup>	1487,00±173,44 <sup>**</sup>	<b>&lt;0,001</b>
GSH-Px (U/ml)	151,32±19,18	151,74±23,76	134,96±23,95	0,086
GR (U/ml)	17,60±5,47	12,28±1,20 <sup>##</sup>	13,91±1,71 <sup>*</sup>	<b>0,003</b>

\*\*p<0,001 (kolostrum-zrelo mleko)

##p<0,01 (kolostrum-prelazno mleko)

\*p<0,05 (kolostrum-zrelo mleko)

SOD- superoksid dismutaza; GSH-P<sub>x</sub> – glutation peroksidaza; GR-glutation reduktaza

Kolostrum pokazuje najmanju aktivnost SOD koja se tokom laktacije povećava i najveća je u zrelom mleku. Srednja vrednost SOD-a je visoko statistički značajno veća u prelaznom mleku u odnosu na kolostrum (p=0,002) kao i u zrelom mleku u odnosu na kolostrum (p<0,001).

Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti GSH-P-x u ispitivanim uzorcima mleka nije utvrđena statistička značajnost razlike (p>0,05).

Aktivnost GR bila je najveća u kolostrumu, u uzorku prelaznog mleka se smanjila, da bi blago porasla u zrelom mleku. Poređenjem srednjih vrednosti GR-a u kolostrumu, prelaznom i zrelom mleku dobijena je statistički visoko značajno veća vrednost u kolostrumu u odnosu na prelazno mleko (p=0,002) i zrelo mleko (p=0,018).

#### 4.4. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rodene dece pohranjenog u frižideru 48 h

U tabeli br.15 prikazani su rezultati određivanja UAK spektrofotometrijskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM koje je bilo 48 h u frižideru.



Tabela 15. Rezultati utvrđivanja UAK spektrofotometrijskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo pohranjeno u frižideru 48 h

Spektrofotometrijske metode	SVEŽE HM	U FRIŽIDERU 48 h	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
DPPH (% inhibicije)	75,68±12,97	48,43±12,36	<0,001
FOLIN (μM MDA)	271,06±59,34	208,43±53,76	<0,001
FRAP (μM FeSO <sub>4</sub> )	1149,56±227,59	998,02±103,36	0,004
ILP (μmolMDA/l)	4,30±0,90	4,17±0,50	0,478

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije

Rezultati merenja UAK svim spektrofotometrijskim metodama izuzev ILP pokazale su statistički visoko značajnu razliku između uzorka svežeg zrelog HM i pohranjenog 48 h u frižideru. Tri metode, metoda hvatanja DPPH, metoda određivanja sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteovim reagensom i metoda FRAP ukazale su da zrelo sveže mleko ima statistički visoko značajnu veću vrednost UAK u odnosu na zrelo HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo pohranjeno u frižideru 48 h.

Rezultati merenja UAK elektrohemijjskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM pohranjenog u frižideru 48 h prikazane su u tabeli 16.

Tabela 16. Vrednosti UAK utvrđenog elektrohemijjskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM pohranjenog u frižideru 48 h

Elektrohemijjske metode	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO MLEKO U FRIŽIDERU 48 h	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
CV (μM vitamina C)	39,87±26,31	36,13±11,55	0,449
DPV (μM vitamina C)	73,67±29,78	48,57±12,63	<0,001

CV-ciklična voltometrija; DPV-diferencijalna pulsna voltometrija

Ciklična voltometrija nije pokazala statistički značajnu razliku u vrednosti između uzorka svežeg zrelog i zrelog HM pohranjenog u frižideru 48 h. Poređenjem srednjih vrednosti UAK određenih metodom DPV u svežem zreloom i zreloom HM pohranjenom u frižideru 48h, dobijena je statistički visoko značajna razlika. Naime, primenom ove metode utvrđena vrednost UAK bila je statistički visoko značajno veća u uzorku svežeg zrelog u odnosu na zrelo HM pohranjeno u frižideru 48 h.

Rezultat određivanja UAK fluorimetrijskom ORAC metodom u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM pohranjenog u frižideru 48 h prikazane su u tabeli 17.

**Tabela 17. Vrednost UAK određene fluorimetrijskom ORAC metodom u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece pohranjenog u frižideru 48 h**

ORAC (ekvivalent Troloxa)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO MLEKO U FRIŽIDERU 48 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	2,34±0,62	2,72±0,28	<b>0,002</b>

ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala

Poređenjem srednjih vrednosti UAK dobijenih metodom ORAC za zrelo sveže i zrelo HM pohranjeno u frižideru 48 h, dobijena je statistički visoko značajna razlika. UAK dobijen ovom metodom bio je, naime statistički visoko značajno veći u zreloom HM pohranjenom u frižideru 48 h u odnosu na uzorak svežeg HM.

Koncentracija vitamina C u svežem zreloom i HM majki prevremeno rođene dece pohranjenom u frižideru prikazana je u tabeli 18.

**Tabela 18. Koncentracija vitamina C u svežem zreloom mleku i zreloom HM majki prevremeno rođene dece pohranjenom u frižideru 48 h**

Vitamin C (mg/100ml)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO MLEKO U FRIŽIDERU 48 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	81,30±4,25	62,97±3,43	<b>&lt;0,001</b>

Koncentracija vitamina C je bila statistički visoko značajno veća u uzorku svežeg zrelog u odnosu na uzorak zrelog HM pohranjenog u frižideru tokom 48 h.

Vrednost pH u svežem zreloom i zreloom HM majki prevremeno rođene dece pohranjenom u frižideru prikazana je u tabeli 19.

Tabela 19 . **Vrednost pH u svežem zreloom i zreloom HM majki prevremeno rođene dece pohranjenom u frižideru 48 h**

pH	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO MLEKO U FRIŽIDERU 48 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	7,10±0,22	7,06±0,13	0,406

Vrednost pH nije se statistički značajno razlikovala između uzorka svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece pohranjenog u frižideru 48 h.

Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom HM majki prevremeno rođene dece pohranjenom u frižideru 48 h prikazana je u tabeli 20. U ispitivanim uzorcima HM nije detektovana katalazna aktivnost.

Tabela 20. **Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom HM majki prevremeno rođene dece pohranjenom u frižideru 48 h**

<b>Anitioksidativni enzima</b>	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO MLEKO U FRIŽIDERU 48 h	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
SOD (U/ml)	1484,77±180,90	1204,20±245,86	<b>&lt;0,001</b>
GSH-Px (U/ml)	142,11±18,31	113,65±24,01	<b>&lt;0,001</b>
GR (U/ml)	13,79±1,85	14,46±2,38	0,149

SOD- superoksid dismutaza; GSH-P<sub>x</sub> - glutation peroksidaza; GR- glutation reduktaza

Aktivnosti SOD i GSH-Px su bile statistički visoko značajno veće u uzorcima svežeg zrelog u odnosu na zrelo HM pohranjeno u frižideru 48 h. Aktivnost GR nije pokazala statističku značajnost razlike između ovih grupa uzoraka.

#### 4.5. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece zamrznutog sedam i trideset dana

Rezultati dobijeni spektrofotometrijskim metodama ispitivanja u svežem zreloom i zreloom HM majki prevremeno rođene dece zamrznutom sedam i trideset dana prikazani su u tabeli 21.

Tabela 21. Prikaz rezultata ispitivanja UAK spektrofotometrijskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto sedam i trideset dana

Spektrofotometrijske metode	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
DPPH (% inhibicije)	75,68±12,97	63,83±14,65**	60,47±17,11##	<0,001
FOLIN (μM MDA)	271,06±59,34	242,25±68,23	238,01±77,04	0,073
FRAP (μM FeSO <sub>4</sub> )	1149,56±227,59	1074,81±206,57	1152,73±190,74	0,156
ILP (μmolMDA/l)	4,30±0,90	4,47±0,90	4,24±0,85	0,511

\*\* p<0,01 (zamrznuto 7 dana – zrelo mleko)

## p<0,01 (zamrznuto 30 dana – zrelo mleko)

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije

Metoda hvatanja DPPH radikala je pokazala da najveću vrednost UAK ima uzorak svežeg mleka, dok se sa dužinom zamrzavanja UAK smanjuje. UAK zrelog svežeg HM majki prevremeno rođene dece je statistički visoko značajno veći od UAK zrelog HM koje je bilo zamrznuto 7 dana (p=0,001) i 30 dana (p<0,001). Poređenjem srednjih vrednosti UAK u zreloom svežem i zreloom HM zamrznutom sedam i trideset dana pomoću metoda određivanja sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteovim reagensom, metodom FRAP i metodom ILP nije dobijena statistički značajna razlika između ovih uzoraka.

Rezultati merenja UAK pomoću elektrohemijskih metoda u uzorcima zrelog svežeg i zrelog HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto sedam i trideset dana prikazani su u tabeli 22.

Tabela 22. Vrednosti UAK dobijene elektrohemijskim metodama ispitivanja u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM zamrznutog sedam i trideset dana

Elektrohemijske metode	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
CV ( $\mu\text{M}$ vitamina C)	39,87 $\pm$ 26,31	35,87 $\pm$ 25,90	29,70 $\pm$ 13,81	0,060
DPV ( $\mu\text{M}$ vitamina C)	73,67 $\pm$ 29,78	57,50 $\pm$ 23,70 <sup>#</sup>	63,23 $\pm$ 22,65*	<b>0,046</b>

\*p<0,05 (zamrznuto 30 dana – zrelo mleko)

<sup>#</sup>p<0,05 (zamrznuto 7 dana – zrelo mleko)

CV-ciklična voltometrija; DPV-diferencijalna pulsna voltometrija

UAK određen metodom CV nije pokazalo statistički značajnu razliku između uzorka svežeg zrelog i zrelog HM zamrznutog sedam i trideset dana..

Poređenjem srednjih vrednosti UAK određenih metodom DPV u svežem zrelo mleku i zrelo HM zamrznutom sedam i trideset dana, dobijena je statistički značajna razlika. Naime UAK zrelog svežeg HM majki prevremeno rođene dece bio je statistički značajno veći od mleka zamrznutog 7 dana (p=0,013) i 30 dana (p=0,046).

Rezultati UAK dobijeni primenom fluorimetrijske ORAC metode u uzorcima zrelog svežeg i zrelog HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto sedam i trideset dana prikazani su u tabeli 23.

Tabela 23. Vrednosti UAK dobijene fluorimetrijskom ORAC metodom u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM zamrznutog sedam i trideset dana

ORAC (ekvivalent Troloxa)	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
	2,34 $\pm$ 0,62	2,51 $\pm$ 0,65	2,56 $\pm$ 0,61	

ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala

Poređenjem srednjih vrednosti UAK dobijenih ORAC metodom u svežem zrelom i zrelom HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto sedam i trideset dana nije dobijena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) između uzoraka.

Rezultati UAK izraženi kao koncentracija vitamina C u uzorcima zrelog svežeg i zrelog HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto sedam i trideset dana prikazani su u tabeli 24.

**Tabela 24. Koncentracija vitamina C u zrelom svežem i zrelom HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto sedam i trideset dana**

Vitamin C (mg/100ml)	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	81,30±4,25	62,37±5,96**	63,43±6,93##	<b>&lt;0,001</b>

\*\*  $p < 0,01$  (zamrznuto 7 dana – zrelo mleko)

##  $p < 0,01$  (zamrznuto 30 dana – zrelo mleko)

Poređenje srednjih vrednosti koncentracije vitamina C u zrelom svežem i zrelom HM zamrznutom sedam i trideset dana ukazalo je da je koncentracija vitamina C statistički visoko značajno veća u svežem zrelom mleku u odnosu na zrelo mleko zamrznuto sedam ( $p < 0,001$ ) i mleko zamrznuto trideset dana ( $p < 0,001$ ).

Vrednosti pH u zrelom svežem i zrelom HM zamrznutom sedam i trideset dana prikazane su u tabeli 25.

**Tabela 25. Vrednosti pH u zrelom svežem i zrelom HM zamrznutom sedam i trideset dana**

pH	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	7,10±0,22	7,04±0,16	7,11±0,30	0,486

Poređenje vrednosti pH između ispitivanih uzoraka mleka nije pokazalo postojanje statističke značajnosti razlike u pH vrednostima između analiziranih ( $p > 0,05$ ).

Aktivnost antioksidativnih enzima u ispitivanim uzorcima HM majki prevremeno rođene dece prikazana je u tabeli 26. U ispitivanim uzorcima HM nije detektovana katalazna aktivnost.

Tabela 26. **Aktivnost antioksidativnih enzima u uzorcima svežeg zrelog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto sedam i trideset dana**

Antioksidativni enzimi	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
SOD (U/ml)	1484,77±180,90	924,73±156,51**	933,53±234,87 <sup>##</sup>	<0,001
GSH-Px (U/ml)	142,11±18,31	147,88±22,71	107,95±25,10 <sup>##</sup>	<0,001
GR (U/ml)	13,79±1,85	14,63±1,98	15,21±1,91 <sup>##</sup>	0,041

\*\*  $p < 0,01$  (zamrznuto 7 dana – zrelo mleko)

<sup>##</sup>  $p < 0,01$  (zamrznuto 30 dana – zrelo mleko)

SOD- superoksid dismutaza; GSH-P<sub>x</sub> - glutacion peroksidaza; GR- glutacion reduktaza

Poređenjem srednjih vrednosti aktivnosti SOD u svežem zreloom i zreloom HM zamrznutom sedam i trideset dana, dobijena je statistički visoko značajna razlika. Naime, aktivnost SOD je bila statistički visoko značajno veća u svežem zreloom mleku u odnosu na zrelo mleko koje je bilo zamrznuto sedam ( $p < 0,001$ ) i trideset dana ( $p < 0,001$ ).

Poređenje srednjih vrednosti aktivnosti GSH-P<sub>x</sub> u svežem zreloom i zreloom HM zamrznutom sedam i trideset dana je ukazalo na statistički visoko značajno veću aktivnost GSH-P<sub>x</sub> u zreloom svežem mleku u odnosu na zrelo mleko zamrznuto trideset dana ( $p < 0,001$ ). Aktivnost GSH-P<sub>x</sub> nije se statistički značajno promenila nakon 7 dana zamrzavanja u odnosu na aktivnost u svežem zreloom mleku ( $p = 0,251$ ).

Aktivnost GR je bila statistički visoko značajno veća u zreloom HM majki prevremeno rođene dece koje je bilo zamrznuto trideset dana u odnosu na sveže zrelo mleko ( $p = 0,009$ ). Aktivnost GR nije se značajno promenila nakon 7 dana zamrzavanja ( $p = 0,142$ ).

#### 4.6. Uporedni prikaz UAK zrelog svežeg i pasterizovanog zrelog HM majki prevremeno rođene dece

Ispitivanje UAK zrelog svežeg mleka i zrelog pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece primenom spektrofotometrijskih metoda prikazano je u tabeli 27.

Tabela 27. Rezultati ispitivanja UAK spektrofotometrijskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece

Spektrofotometrijske metode	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO PASTERIZOVANO	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
DPPH (% inhibicije)	75,68±12,97	66,72±12,37	<b>0,001</b>
FOLIN (μM MDA)	271,06±59,34	251,37±50,74	0,137
FRAP (μM FeSO <sub>4</sub> )	1149,56±227,59	1098,14±148,60	0,182
ILP (μmolMDA/l)	4,30±0,90	3,94±0,71	0,067

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije

Dobijene vrednosti UAK upotrebom spektrofotometrijskih metoda ukazale su da je metoda zasnovana na sposobnosti hvatanja DPPH radikala jedina kojom je pokazano da je UAK u svežem zrelog mleku statistički značajno veći u odnosu na UAK pasterizovanog zrelog HM.

Ispitivanje UAK zrelog svežeg mleka i zrelog pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece primenom elektrohemijskih metoda prikazano je u tabeli 28.



Tabela 28. **Rezultati ispitivanja UAK elektrohemijским metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog HM majki prevremeno rodene dece**

Elektrohemijske metode	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO PASTERIZOVANO	<b>p</b>
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
CV ( $\mu\text{M}$ vitamina C)	39,87 $\pm$ 26,31	42,43 $\pm$ 33,57	0,680
DPV ( $\mu\text{M}$ vitamina C)	73,67 $\pm$ 29,78	66,93 $\pm$ 30,87	0,409

CV-ciklična voltametrijа; DPV-diferencijalna pulsna voltametrijа

Elektrohemijским metodama određen UAK nije se statistički značajno razlikovao u uzorcima svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog HM majki prevremeno rodene dece ( $p > 0,05$ ).

Rezultat ispitivanja UAK fluorimetrijskom ORAC metodom u uzorcima svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog HM prikazan je u tabeli 29.

Tabela 29. **Vrednost UAK određen fluorimetrijskom ORAC metodom u uzorcima svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog HM**

ORAC (ekvivalent Troloxa)	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO PASTERIZOVANO	<b>p</b>
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
	2,34 $\pm$ 0,62	2,40 $\pm$ 0,60	

ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala

Primena ORAC metode nije ukazala na statistički značajnu promenu ( $p > 0,05$ ) UAK nakon pasterizacije zrelog HM majki prevremeno rodene dece.

Koncentracija vitamina C u ispitivnim uzorcima je prikazana u tabeli 30.

Tabela 30. **Koncentracija vitamina C u zreloom svežem i zreloom pasterizovanom HM**

Vitamin C (mg/100ml)	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	81,30±4,25	48,30±3,90	<b>&lt;0,001</b>

Koncentracije vitamina C je bila statistički visoko značajno veća u uzorku svežeg zrelog HM u odnosu na zrelo pasterizovano HM majki prevremeno rođene dece.

Vrednosti pH u uzorcima svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece prikazane su u tabeli 31.

Tabela 31. **Vrednosti pH u svežem zreloom i zreloom pasterizovanom HM**

pH	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	7,10±0,22	7,06±0,22	0,631

Vrednost pH nije se statistički značajno razlikovala između uzorka svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog mleka HM majki prevremeno rođene dece.

Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom pasterizovanom HM prikazane su u tabeli 32. U ispitivanim uzorcima HM nije detektovana katalazna aktivnost.

Tabela 32. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom pasterizovanom HM

Antioksidativni enzima	ZRELO SVEŽE MLEKO	ZRELO PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
SOD (U/ml)	1484,77±180,90	1316,03±248,42	<b>0,001</b>
GSH-Px (U/ml)	142,11±18,31	80,05±22,19	<b>&lt;0,001</b>
GR (U/ml)	13,79±1,85	10,12±3,19	<b>&lt;0,001</b>

SOD- superoksid dismutaza; GSH-Px - glutation peroksidaza; GR- glutation reduktaza

Aktivnost enzima antioksidativne zaštite SOD, GSH-Px i GR bile su statistički visoko značajno veće u svežem zreloom mleku u odnosu na zreloom pasterizovano HM.

#### 4.7. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zamrznutog sedam dana, a zatim pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece

Rezultati ispitivanja UAK primenom spektrofotometrijskih metoda u uzorcima svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog HM prikazani su u tabeli 33.

Ispitivanje UAK u ispitivanim uzorcima mleka spektrofotometrijskim metodama prikazano su u tabeli 33.

Tabela 33. Vrednosti UAK određene spektrofotometrijskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog

Spektrofotometrijske metode	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
DPPH (% inhibicije)	75,68±12,97	61,86±13,49	<b>&lt;0,001</b>
FOLIN (μM MDA)	271,06±59,34	231,65±44,89	<b>0,004</b>
FRAP (μM FeSO <sub>4</sub> )	1149,56±227,59	1023,82±191,36	<b>0,013</b>
ILP (μmolMDA/l)	4,30±0,90	3,93±0,87	0,076

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije

Sve spektrofotometrijske metode pokazale su statistički značajnu razliku u UAK svežeg zrelog mleka i zrelog mleka zamrznutog 7 dana pa pasterizovanog sa izuzetkom inhibicije lipidne peroksidacije.

Rezultati ispitivanja UAK primenom elektrohemijskih metoda u uzorcima svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog HM prikazani su u tabeli 34.

Tabela 34. Vrednosti UAK određene elektrohemijskim metodama u uzorcima svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog HM

Elektrohemijske metode	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
CV (μM vitamina C)	39,87±26,31	27,87±15,35	0,021
DPV (μM vitamina C)	73,67±29,78	42,40±21,84	<b>&lt;0,001</b>

CV-ciklična voltometrija; DPV-diferencijalna pulsna voltometrija

UAK određen CV metodom bio je statistički značajno veći ( $p=0,021$ ) u svežem zreloom u odnosu na zrelo zamrznuto 7 dana pa pasterizovano HM. Takođe DPV metodom izmeren UAK statistički je visoko značajno ( $p<0,001$ ) bio veći u uzorcima svežeg zrelog nego zrelog zamrznutog 7 dana pa pasterizovanog HM.

Rezultat određivanja UAK fluorimetrijskom ORAC metodom u uzorcima svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog HM prikazani su u tabeli 35.

**Tabela 35. Vrednosti UAK dobijenog fluorimetrijskom ORAC metodom u uzorcima svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog HM**

ORAC (ekvivalent Troloxa)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	2,34±0,62	2,23±0,70	0,483

ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala

Poređenjem srednjih vrednosti UAK dobijenih metodom ORAC za sveže zrelo i zrelo zamrznuto 7 dana, pa pasterizovano HM majki prevremeno rođene dece nije dobijena statistički značajna razlika ( $p>0,05$ ).

Koncentracija vitamina C u ispitivanim uzorcima svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog HM prikazana je u tabeli 36.

**Tabela 36. Koncentracija vitamina C u svežem zreloom i zreloom zamrznutom 7 dana, a zatim pasterizovanom HM**

Vitamin C (mg/100ml)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	81,30±4,25	44,77±4,73	<b>&lt;0,001</b>

Koncentracija vitamina C je bila statistički visoko značajno veća u uzorku svežeg zrelog mleka u odnosu na zrelo zamrznuto 7 dana pa pasterizovano HM majki prevremeno rođene dece.

Vrednosti pH u uzorku svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 7 dana, a zatim pasterizovanog HM prikazane su u tabeli 37.

**Tabela 37. Vrednost pH u svežem zreloom mleku i zreloom zamrznutom 7 dana, a zatim pasterizovanom HM**

pH	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	7,10±0,22	7,06±0,22	0,362

Vrednost pH nije se statistički značajno razlikovala između uzorka svežeg zrelog i zrelog 7 dana zamrznutog pa zatim pasterizovanog HM.

Rezultati ispitivanja UAK merenjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom zamrznutom 7 dana, a zatim pasterizovanom HM prikazani su u tabeli 38. U ispitivanim uzorcima HM nije detektovana katalazna aktivnost.

Tabela 38. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom zamrznutom 7 dana, a zatim pasterizovanom HM

Antioksidativni enzimi	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 7 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
SOD (U/ml)	1484,77±180,90	1233,77±210,14	<b>&lt;0,001</b>
GSH-Px (U/ml)	142,11±18,31	81,15±25,98	<b>&lt;0,001</b>
GR (U/ml)	13,79±1,85	9,83±3,73	<b>&lt;0,001</b>

SOD- superoksid-dismutaza; GSH-P<sub>x</sub> -glutation peroksidaza; GR-glutation-reduktaza

Aktivnosti SOD, GSH-Px i GR su bile statistički značajno veće u uzorcima svežeg zrelog u odnosu na zrelo zamrznuto 7 dana pa pasterizovano HM majki prevremeno rođene dece.

#### 4.8. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog i zrelog zamrznutog trideset dana, a zatim pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece

Rezultati određivanja UAK spektrofotometrijskim metodama u zreloom svežem i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM prikazane su u tabeli 39.

Tabela 39. Vrednosti UAK utvrđene spektrofotometrijskim metodama u svežem zreloom i zreloom zamrznutom trideset dana, a zatim pasterizovanom HM majki prevremeno rodene dece

Spektrofotometrijske metode	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA PA PASTERIZOVANO	p
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
DPPH (% inhibicije)	75,68±12,97	63,01±17,56	<b>0,001</b>
FOLIN (μM MDA)	271,06±59,34	234,43±70,74	<b>0,034</b>
FRAP (μM FeSO <sub>4</sub> )	1149,56±227,59	1205,64±165,87	0,233
ILP (μmolMDA/l)	4,30±0,90	4,29±0,93	0,984

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije.

Poređenje vrednosti UAK dobijenih spektrofotometrijskim metodama izdvojilo je dve metode i to metodu hvatanja DPPH radikala i metodu određivanja sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom kao one čiji rezultat ukazuje na statistički značajno veći UAK svežeg zrelog u odnosu na zrelo 30 dana zamrznuto, a potom pasterizovano HM.

Rezultati određivanja UAK elektrohemijjskim metodama u zreloom svežem i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM prikazani su u tabeli 40.



Tabela 40. Vrednosti UAK utvrđene elektrohemijским metodama u svežem zreloom i zreloom zamrznutom trideset dana, a zatim pasterizovanom HM majki prevremeno rođene dece

Elektrohemijske metode	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
CV ( $\mu$ M vitamina C)	39,87 $\pm$ 26,31	36,30 $\pm$ 26,64	0,510
DPV ( $\mu$ M vitamina C)	73,67 $\pm$ 29,78	59,83 $\pm$ 25,75	<0,056

CV-ciklična voltometrija; DPV-diferencijalna pulsna voltometrija

Elektrohemijским metodama određen UAK nije statistički značajno razlikovao u zreloom zamrznutom 30 dana, pa zatim pasterizovanom u odnosu na sveže zrelo HM.

Rezultati određivanja UAK fluorimetrijskom ORAC metodom u zreloom svežem i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM prikazani su u tabeli 41.

Tabela 41. Vrednosti UAK utvrđene fluorimetrijskom ORAC metodom u svežem zreloom i zreloom zamrznutom trideset dana, a zatim pasterizovanom HM majki prevremeno rođene dece

ORAC (ekvivalent Troloxa)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	2,34 $\pm$ 0,62	2,34 $\pm$ 0,69	0,974

ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala

ORAC metodom određen UAK nije se statistički značajno razlikovao u zreloom zamrznutom trideset dana, pa zatim pasterizovanom HM u odnosu na sveže zrelo HM.

Koncentracija vitamina C u zreloom svežem i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM prikazana je u tabeli 42.

Tabela 42. **Koncentracija vitamin C u zreloom svežem i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom**

Vitamin C (mg/100ml)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	81,30±4,25	44,50±5,69	<b>&lt;0,001</b>

Koncentracija vitamina C je bila statistički visoko značajno veća u uzorku svežeg zrelog mleka u odnosu na zamrznuto 30 dana pa zatim pasterizovanog.

Vrednosti pH u zreloom svežem i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM prikazane su u tabeli 43.

Tabela 43. **Vrednosti pH u zreloom svežem i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM**

pH	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	7,10±0,22	7,06±0,22	0,531

Vrednost pH nije se statistički značajno razlikovala između uzorka svežeg zrelog i zrelog zamrznutog 30 dana pa zatim pasterizovanog HM ( $p > 0,05$ ).

Rezultati ispitivanja UAK merenjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM prikazani su u tabeli 44. U ispitivanim uzorcima HM nije detektovana katalazna aktivnost.

Tabela 44. Aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom zamrznutom 30 dana, a zatim pasterizovanom HM

Antioksidativni enzimi	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO ZAMRZNUTO 30 DANA PA PASTERIZOVANO	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
SOD (U/ml)	1484,77±180,90	933,53±234,87	<b>&lt;0,001</b>
GSHPx (U/ml)	142,11±18,31	84,80±20,12	<b>&lt;0,001</b>
GR (U/ml)	13,79±1,85	8,87±2,74	<b>&lt;0,001</b>

SOD- superoksid dismutaza; GSH-P<sub>x</sub> - glutation peroksidaza; GR-glutation reduktaza

Aktivnosti svih enzima SOD, GSH-Px i GR bile su statistički visoko značajno veće u uzorku svežeg zrelog u odnosu na zrelo zamrznuto 30 dana, pa zatim pasterizovano HM majki prevremeno rođene dece.

#### 4.9. Zbirni prikaz statističke značajnosti razlike u vrednostima UAK dobijenim različitim metodama u uzorcima zrelog HM majki prevremeno rođene dece koji su skladišteni tj. termički obrađeni na različite načine u odnosu na iste vrednosti u svežem zreloom HM.

Statistička značajnost razlike UAK u uzorcima zrelog na različite načine pohranjenog i termički obrađenog HM u poređenju sa vrednostima UAK u uzorcima svežeg zrelog HM majki prevremeno rođene dece, za sve upotrebljene metode za procenu UAK u svim tipovima uzoraka prikazane su u tabeli 45.

Tabela 45. Zbirni prikaz statističke značajnosti razlike UAK u uzorcima zrelog na različite načine pohranjenog i termički obrađenog HM u poređenju sa vrednostima UAK u uzorcima svežeg zrelog HM majki prevremeno rođene dece, za sve upotrebene metode za procenu UAK u svim tipovima uzoraka

	frižider	zamrznuto 7 dana	zamrznuto 30 dana	pasterizovano	zamrznuto 7 dana pa pasterizovano	zamrznuto 30 dana pa pasterizovano
DPPH (% inhibicije)	<0,001	0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,001
FOLIN ( $\mu$ M MDA)	<0,001	0,073	0,073	0,137	0,004	0,034
FRAP ( $\mu$ M FeSO <sub>4</sub> )	0,004	0,156	0,156	0,182	0,013	0,233
ILP ( $\mu$ molMDA/l)	0,478	0,511	0,511	0,067	0,076	0,984
CV ( $\mu$ M vitamina C)	0,449	0,060	0,060	0,680	0,021	0,510
DPV ( $\mu$ M vitamina C)	<0,001	0,013	0,102	0,409	<0,001	0,056
ORAC (ekvivalentTroloxa)	0,002	0,292	0,292	0,685	0,483	0,974
Vit C (mg/100ml)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pH	0,406	0,486	0,486	0,631	0,362	0,531
SOD (U/ml)	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
GSHP-x (U/ml)	<0,001	0,251	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
GR (U/ml)	0,149	0,142	0,009	<0,001	<0,001	<0,001

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije; CV-ciklična voltometrija;DPV-diferencijalna pulsna voltometrija; ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala; Vit. C-vitamin C; SOD-superoksid-dismutaza; GSH-P<sub>x</sub> – glutation peroksidaza; GR- glutation-reduktaza

U tabeli su naglašene vrednosti UAK dobijene nekom metodom koje su pokazivale statističku značajnost razlike u odnosu na zrelo sveže HM. Tabela govori u prilog nepostojanja idealne metode za procenu UAK u uzorcima HM koji su čuvani i obrađivani različitim postupcima, pa sugerise neophodnost dodatnih istraživanja u ovoj oblasti sa ciljem utvrđivanja optimalne metode za procenu UAK.

#### 4.10. Uporedni prikaz UAK svežeg zrelog u odnosu na zrelo obogaćeno (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece i adaptirane mlečne formule (Mil PRE)

Rezultati određivanja UAK spektrofotometrijskim metodama u svežem zreloom i zreloom obogaćenom (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE) prikazani su u tabeli 46.

Tabela 46. Vrednosti UAK dobijene spektrofotometrijskim metodama u svežem zreloom i zreloom obogaćenom (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli

Spektrofotometrijske metode	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO OBOGAĆENO MLEKO (MIL Fotifier)	ADAPTIRANA FORMULA (Mil PRE)	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	p
DPPH (% inhibicije)	75,68±12.97	93,37±0.71#	90,99±0,14###	<0,001
FOLIN (µM MDA)	271,06±59.34	540,84±55.91###	192,12±0,90^	<0,001
FRAP (µM FeSO <sub>4</sub> )	1149,56±227,59	2026,63±119,71###	766,78±3,12	<0,001
ILP (µmolMDA/l)	4,30±0,90	10,21±0,91###	3,00±0,12###	<0,001

DPPH-sposobnost hvatanja DPPH radikala; FOLIN-određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom; FRAP-metoda bazirana na reakciji antioksidanata sa Fe (III)-kompleksom; ILP-inhibicija lipidne peroksidacije

# p< 0,01 zrelo mleko uz dodatak obogaćivača - sveže zrelo mleko

## p< 0,01 zrelo mleko uz dodatak obogaćivača - adaptirana mlečna formula

### p< 0,01 adaptirana mlečna formula -sveže zrelo mleko

^ p< 0,05 adaptirana mlečna formula -sveže zrelo mleko

Vrednost UAK određena metodom DPHH bila je statistički visoko značajno veća u zreloom mleku uz dodatak obogaćivača u odnosu na sveže zrelo mleko ( $p < 0,001$ ) kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli u odnosu na sveže zrelo mleko ( $p = 0,002$ ). Poređenjem srednjih vrednosti UAK metodom hvatanja DPHH radikala u zreloom HM sa dodatkom obogaćivača (MIL Fortifier) i adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE) nije dobijena statistički značajna razlika ( $p = 0,845$ ). Vrednosti UAK određene merenjem sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteovim reagensom bile su statistički visoko značajno veće u obogaćenom zreloom HM u odnosu na sveže zrelo HM ( $p < 0,001$ ) i adaptiranu mlečnu formulu (Mil PRE) ( $p < 0,001$ ). Vrednost UAK određena ovom metodom imala je statistički značajno veću vrednost u svežem zreloom mleku u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu (Mil PRE) ( $p = 0,013$ ). Poređenje srednjih vrednosti UAK određenih FRAP metodom dobijena je statistički visoko značajna razlika u korist zrelog obogaćenog HM u odnosu na sveže zrelo HM ( $p < 0,001$ ) i adaptiranu mlečnu formulu (Mil PRE) ( $p < 0,001$ ). Poređenjem srednjih vrednosti UAK dobijenih metodom inhibicije lipidne peroksidacije dobijena je statistički visoko značajna razlika u vrednostima UAK u obogaćenom zreloom HM u odnosu na sveže zrelo mleko ( $p < 0,001$ ) i adaptiranu mlečnu formulu ( $p < 0,001$ ). Vrednost UAK određena ovom metodom ima statistički visoko značajno veću vrednost u svežem zreloom u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu ( $p = 0,009$ ).

Rezultati određivanja UAK elektrohemijskim metodama u svežem zreloom i zreloom obogaćenom (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE) prikazani su u tabeli 47.

Tabela 47. Vrednosti UAK dobijene elektrohemijskim metodama u svežem zrelom i zrelom obogaćenom (Mil Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE).

Elektrohemijske metode	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO OBOGAĆENO MLEKO (MIL Fortifier)	ADAPTIRANA FORMULA (Mil PRE)	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
CV ( $\mu\text{M}$ vitamina C)	39,87 $\pm$ 26,31	176,63 $\pm$ 29,14#	20,40 $\pm$ 1,14##	<b>&lt;0,001</b>
DPV ( $\mu\text{M}$ vitamina C)	73,67 $\pm$ 29,78	189,50 $\pm$ 22,26#	53,20 $\pm$ 1,64##	<b>&lt;0,001</b>

CV-ciklična voltametrija;DPV-diferencijalna pulsna voltametrija

# p<0,01 zrelo mleko uz dodatak obogaćivača-sveže zrelo mleko

## p<0,01 zrelo mleko uz dodatak obogaćivača-adaptirana formula

Poređenje srednjih vrednosti UAK dobijenih CV metodom ukazalo je na statistički visoko značajno veću vrednost UAK u obogaćenom zrelom HM, u odnosu na sveže zrelo HM (p<0,001) i adaptiranu mlečnu formulu (p<0,001). Vrednost UAK određena ovom metodom nije se statistički značajno razlikovala između svežeg zrelog HM i adaptirane mlečne formule (p=0,298). Upoređivanje srednjih vrednosti UAK određenih DPV metodom ukazalo je na statistički visoko značajnu veći vrednost UAK u obogaćenom zrelom HM u odnosu na sveže zrelo mleko (p<0,001) i adaptiranu mlečnu formulu (p<0,001). Vrednost UAK određena ovom metodom nije se statistički značajno razlikovala između svežeg zrelog mleka i adaptirane mlečne formule (p=0,226).

Rezultati određivanja UAK fluorimetrijskom ORAC metodom u svežem zrelom i zrelom obogaćenom (Mil Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE) prikazani su u tabeli 48.

Tabela 48. Vrednosti UAK dobijene ORAC metodom u svežem zreloom i zreloom obogaćenom (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE).

ORAC (ekvivalent Troloxa)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO OBOGAĆENO MLEKO (Mil Fortifier)	ADAPTIRANA FORMULA (Mil PRE)	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	2,34±0,62	2,05±0,40	1,72±0,03 <sup>^</sup>	<b>0,035</b>

ORAC-metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta absorpcije kiseoničnih radikala

<sup>^</sup> p<0,05 adaptirana formula-sveže mleko

Poređenje srednjih vrednosti UAK određenih ORAC metodom je ukazalo na statistički značajno veći UAK u svežem zreloom HM u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu (p=0,035, dok se UAK određen ORAC metodom nije statistički značajno razlikovao između svežeg zrelog i obogaćenog zrelog HM (p=0,073), kao ni između obogaćenog zrelog HM i adaptirane mlečne formule (p=0,368).

Koncentracija vitamina C u svežem zreloom i zreloom obogaćenom (Mil Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE) prikazana je u u tabeli 49.

Tabela 49. Vrednosti koncentracije vitamina C u svežem zreloom i zreloom obogaćenom (Mil Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE)

Vitamin C (mg/100ml)	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO OBOGAĆENO MLEKO (MIL Fortifier)	ADAPTIRANA FORMULA (Mil PRE)	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	81,30±4,25	60,23±3,28 <sup>#</sup>	62,40±0,89 <sup>###</sup>	<b>&lt;0,001</b>

<sup>#</sup> p<0,01 zrelo mleko uz dodatak obogaćivača-sveže zrelo mleko

<sup>###</sup> p< 0,01 adaptirana mlečna formula -sveže zrelo mleko



Poređenje srednjih koncentracija vitamina C u analiziranim uzorcima ukazalo je na statistički visoko značajno veću koncentraciju vitamina C u zreom svežem u odnosu na zrelo obogaćeno HM ( $p < 0,001$ ) i adaptiranu mlečnu formulu ( $p < 0,001$ ). Koncentracija vitamina C nije se statistički značajno razlikovala između obogaćenog zrelog HM i adaptirane mlečne formule (Mil PRE) ( $p = 0,446$ ).

Vrednost pH u svežem zreom i zreom obogaćenom (Mil Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE) prikazana je u tabeli 50.

**Tabela 50. Vrednost pH u svežem zreom i zreom obogaćenom (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE)**

pH	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO OBOGAĆENO MLEKO (MIL Fotifier)	ADAPTIRANA FORMULA (Mil PRE)	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
	7,10±0,22	7,04±0,12	7,02±0,01	0,392

Poređenje vrednosti pH između ispitivanih uzoraka mleka nije ukazalo na postojanje statističke značajnosti razlike u vrednostima pH ( $p > 0,05$ ).

Rezultati ispitivanja UAK merenjem aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u svežem zreom i zreom obogaćenom (MIL Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE) prikazani su u tabeli 51. U ispitivanim uzorcima HM nije detektovana katalazna aktivnost.

Tabela 51. Aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u svežem zreloom i zreloom obogaćenom (Mil Fortifier) HM majki prevremeno rođene dece, kao i u adaptiranoj mlečnoj formuli (Mil PRE)

Antioksidativni enzimi	SVEŽE ZRELO MLEKO	ZRELO OBOGAĆENO MLEKO (MIL Fortifier)	ADAPTIRANA FORMULA (Mil PRE)	
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	<b>p</b>
SOD (U/ml)	1484,77±180,90	4369,97±2022,55#	320,20±7,40##	<b>&lt;0,001</b>
GSH-Px (U/ml)	142,11±18,31	83,01±34,37#	44,34±0,68##	<b>&lt;0,001</b>
GR (U/ml)	13,79±1,85	61,09±23,56#	21,99±0,61##	<b>&lt;0,001</b>

SOD-superoksid dismutaza; GSH-P<sub>x</sub> -glutation peroksidaza; GR- glutation reduktaza

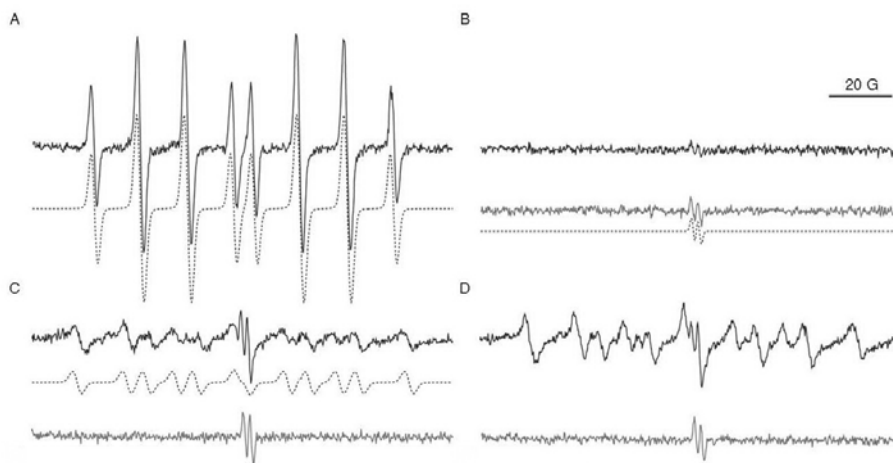
# p<0,01 zrelo mleko uz dodatak obogaćivača-sveže zrelo mleko

## p<0,01 zrelo mleko uz dodatak obogaćivača-adaptirana formula

Poređenje srednjih vrednosti aktivnosti SOD u uzorcima mleka ukazalo je na statistički visoko značajnu veću aktivnost ovog enzima u obogaćenom zreloom HM u odnosu na sveže zrelo mleko (p<0,001) i adaptiranu mlečnu formulu (p<0,001). Aktivnost SOD nije se statistički značajno razlikovala između zrelog HM i adaptirane mlečne formule (p=0,200). Poređenje srednjih vrednosti aktivnosti GSH-P<sub>x</sub> u uzorcima mleka pokazalo je da je aktivnost GSH-P<sub>x</sub> bila statistički visoko značajno veća u zreloom svežem HM u odnosu na zrelo obogaćeno HM (p<0,001) i adaptiranu mlečnu formulu (p<0,001). Aktivnost GSH-P<sub>x</sub> je bila statistički značajno veća u obogaćenom zreloom HM u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu (p=0,011). Poređenje srednjih vrednosti aktivnosti GR u ispitivanim uzorcima mleka ukazalo je da je aktivnost GR bila statistički značajno veća u obogaćenom zreloom HM u odnosu na sveže zrelo HM (p<0,001) i adaptiranu mlečnu formulu (p<0,001). Vrednost aktivnosti GR nije se statistički značajno razlikovala između zrelog svežeg HM i adaptirane mlečne formule (p=0,548).

#### 4.11. UAK HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije određen primenom elektron paramagnetne rezonantne spektroskopije

Zapis elektron paramagnetne rezonantne spektroskopije i kvantifikacija redoks aktivnosti uzoraka kolostruma, svežeg zrelog i zrelog pasterizovanog HM majki prevremeno rođene dece prikazan je na slici 1.



**Slika 1. Zapis elektron paramagnetne rezonantne spektroskopije uzorka mleka**

**A**, Kontrolni sistem generisanja OH preko Fentonove reakcije:  $\text{Fe}^{2+}$  (0,6 mM+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 mM). Tačkasta linija-predstavlja simulaciju EPR signala od DEPMPO/OH (signala intenziteta  $2685 \pm 384$  AU). **B**, Kolostrum izložen Fentonovoj reakciji. Ne postoji jasan DEPMPO signal koji bi se mogao identifikovati. Siva linija: EPR spektar dobijen je u samom sistemu u odsustvu spin-trapa. Tačkasta linija: simulacija EPR signala od askorbat radikala. Intenziteti EPR signala su gotovo tri puta manji u odnosu na kontrolni sistem Fentonove reakcije. Samo slabi signali askorbata i/ili/ DEPMPO/urat radikala su detektovani. **C**, Sveže zrelo HM izloženo Fentonovoj reakciji. Tačkasta linija-simulacija EPR signala od DEPMPO/OH. **D**, Pasterizovano zrelo HM izloženo Fentonovoj reakciji. Izlaganje zrelog pasterizovanog HM sistemu za produkciju OH radikala (Fentonova reakcija) rezultovalo je produkcijom uratnih i askorbat radikala.

Rezultati dobijeni primenom ove metode ukazuju na superiornost antioksidativne aktivnosti kolostruma. Sveže zrelo HM majki prevremeno rođene dece takođe ima značajan antioksidativni kapacitet, dok se isto ne bi moglo zaključiti za pasterizovano zrelo HM.

## **5. Diskusija**

## 5. DISKUSIJA

Majčino mleko ima jedinstvene osobine koje su od koristi zdravlju dojene dece. Majčino mleko je kompleksna tečnost koja sadrži brojne nutrijente, enzime, hormone i druge bioaktivne molekule (116). U ovom radu posebnu pažnju smo posvetili supstancama koje u majčinom mleku imaju antioksidativnu aktivnost odnosno sprečavaju oksidaciju organskih supstrata. HM sadrži enzime sa antioksidativnom aktivnosti kao i neenzimske antioksidanse. Sastav i antioksidativna svojstva HM rezultat su dejstva niza faktora kao što su gestacijska starost, stadijum laktacije, ishrana majke, suplementacija vitaminima i mineralima tokom trudnoće i laktacije, zdravstveno stanje majke, geografsko područje, uticaj duvanskog dima, kao i način završetka porođaja (117). U skladu sa metodologijom našeg rada tokom laktacije majke nisu uzimale vitaminsku, niti mineralnu suplementaciju. Kriterijum za isključivanje iz studije je bio prekidanje laktacije, potreba za primenom terapije koja je kontraindikovana za vreme laktacije, kao i pušenje duvana. Većina naših ispitanica imala je BMI u normalnom rasponu. Trudnoća je završavana u proseku u  $31,27 \pm 2,21$  GN uz srednju PTM od  $1560,99 \pm 418,61$  g. Od ukupno 30 žena koje su učestvovala u studiji dvadeset dve žene (73,3%) su začele prirodnim putem, a osam (26,7 %) *in vitro* fertilizacijom (IVF). Poređenjem učestalosti vaginalnog porođaja (43,3 %) i carskog reza (56,7%) kao načina završavanja trudnoće u našoj studiji, nije dobijena značajna razlika.

Kada se govori o HM kao zlatnom standardu ishrane novorođenčeta, savremena saznanja ukazuju da ovaj stav važi pre svega za novorođenčad rođenu u terminu porođaja. HM ima prednosti koje nemaju zamenu za prevremeno rođenu novorođenčad: zaštita i prevencija nekrotičnog enterokolitisa, zaštita i prevencija sepse i trofični efekat. Nedavno je pokazano da HM ima i matične ćelije koje su sposobne da se diferenciraju u ćelijskoj kulturi (118). Važno je da su Hassiotou and Hartmann (119) pružili prve dokaze da se matične ćelije iz mleka mogu transformisati u različita tkiva kod dojenih beba ostajući vijabilne i integrisane u tkivo domaćina. Bolji psihomotorni razvoj dece koja su hranjena HM još uvek nije sa sigurnošću dokazan. Međutim glavni „nedostatak“ HM u ishrani prevremeno rođene novorođenčadi je nedovoljna količina hranljivih sastojaka. Zato je preporučena oralna (enteralna) ishrana ove grupe novorođenčadi obogaćenim HM ili „hiperkalorijska“ adaptirana mlečna formula. Zato smo u naša

ispitivanja uključili i uticaj adaptirane mlečne formule na antioksidativni potencijal zrelog majčinog mleka majki prevremeno rođene dece.

Majčino mleko se menja tokom laktacije, a to važi i za mleko majki prevremeno rođene dece. Ispitali smo promene svežeg HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije u prva 3 dana nakon porođaja (kolostrum), zatim od 5-14. dana (prelazno mleko) i nakon 21. dana (zrelo mleko) uz međusobno poređenje. Merili smo aktivnost pojedinačnih enzimskih antioksidativnih komponenti, količinu neenzimskih antioksidanasa (vitamin C) ali smo primenili i metode koje bi trebalo da daju sliku o UAK. Budući da majčino mleko sadrži brojne antioksidanse teško je odrediti značaj svakog antioksidansa posebno u ukupnom antioksidativnom učinku majčinog mleka. Određivanje UAK, na osnovu dosadašnjih saznanja, predstavlja pokušaj da se dobije integrisani pokazatelj antioksidativnih svojstava majčinog mleka. Pojam UAK još uvek nije precizno naučno definisan budući da je endogeni antioksidativni sistem sačinjen iz enzimskih i neenzimskih komponenti koje imaju različitu kinetiku i reaktivnost sa „reaktivnim vrstama nastalim iz molekuskog kiseonika“ i sa „deratizovanim molekulima nastalim iz biomakromolekula“ (4). I na osnovu naših rezultata kolostrum je pokazao superiornost svoje antioksidativne aktivnosti u poređenju sa prelaznim i zrelim HM majki prevremeno rođene dece tokom laktacije (115). Najveće vrednosti koje se mogu interpretirati kao UAK pokazuju elektrohemijske (DPV) i fluorimetrijske metode (ORAC) u kolostrumu u poređenju sa prelaznim i zrelim HM majki prevremeno rođene dece (120). Od svih pokušaja da se UAK definiše, ORAC metoda se smatra najboljom aproksimacijom, ali je pokazano da ORAC metoda nema apsolutni značaj jer više meri antioksidacioni potencijal *in vitro* nego *in vivo* (82). Tokom naše studije spektrofotometrijske metode određivanja UAK kolostruma, prelaznog i zrelog mleka DPPH metodom, metodom određivanja sadržaja ukupnih Fenola Folin –Ciocalteovim reagensom, FRAP metodom, kao i metodom inhibicije lipidne peroksidacije nisu pokazale značajnu razliku između kolostruma, prelaznog i zrelog HM majki prevremeno rođene dece. Prema dobijenim rezultatima svi uzorci mleka imaju visoke vrednosti hvatanja slobodnih DPPH radikala. Metodom po Folin – Ciocalteu je ispitivana koncentracija ukupnih fenola u uzorcima mleka, majčino mleko ima nizak nivo fenolnih komponenti (121).

Ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u HM je pokazala da je vrednost SOD najniža u kolostrumu i tokom laktacije u prelaznom i zreom mleku se povećava. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima iz studija Kasapović i saradnika koja je takođe pokazala da je aktivnost SOD u mleku nakon treće nedelje laktacije po rođenju signifikantno viša u odnosu na kolostrum (49) za terminsko humano mleko. Određivanje GSH-Px pokazuje približne vrednosti u kolostrumu, prelaznom i zreom mleku, dok je vrednost za aktivnost GR najveća u kolostrumu. Koncentracija vitamina C najveća je u kolostrumu. Ispitivanje kolostruma i svežeg HM EPR spektroskopijom je pokazalo značajnu sposobnost hvatanja OH radikala kod oba. EPR signal intenziteti su u ispitivanim uzorcima mleka bili gotovo trostruko manji u odnosu na kontrolni sistem Fentonove reakcije. Istraživanjem smo obuhvatili i upoređivanje antioksidativnih osobina svežeg zrelog HM sa neprerađenim zreim HM koje se čuva u frižideru na temperaturi +4°C tokom 48 h. Pohranjivanje mleka u frižideru na +4°C tokom 48 h utiče na antioksidativni status mleka. Sve spektrofotometrijske metode, pokazale su značajno veće vrednosti koje se mogu interpretirati kao UAK u uzorku svežeg zrelog mleka u odnosu na mleko pohranjeno u frižideru tokom 48 h, osim inhibicije lipidne peroksidacije. Od primenjenih elektrohemijskih metoda, UAK određen DPV metodom bio je značajno manji u uzorku pohranjenom u frižideru 48 h u odnosu na sveže mleko. S druge strane primena fluorimetrijskog metoda za ORAC ima veću vrednost u uzorku mleka pohranjenom u frižideru u odnosu na sveže zrelo pretermnsko majčino mleko. Nasuprot tome sama koncentracija vitamina C je značajno veća u uzorku svežeg mleka u odnosu na pohranjeno u frižideru (122). Većina predhodnih studija nije pokazala značajnu promenu aktivnosti enzima u mleka nakon skladištenja u frižideru na +4°C nakon 48 h (4), ali naši rezultati za aktivnost SOD, GSH-Px su značajno viši u uzorku svežeg mleka u poređenju sa neprerađenim zreim HM koje se čuva u frižideru na temperaturi +4°C tokom 48 h. Poređenjem uzoraka zrelog mleka i mleka zamrznutog tokom trideset dana primenom spektrofotometrijskih metoda razliku između ispitivanih uzoraka je pokazala metoda DPPH i određivanje sadržaja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom. Elektrohemijske i fluorimetrijske metode nisu pokazale značajnu promenu UAK. Koncentracija vitamina C se značajno smanjuje sa dužinom zamrzavanja. Određivanje enzimske aktivnosti SOD i GSH-P<sub>x</sub> pokazuje da se ona značajno smanjuje u slučaju skladištenja HM u frižideru na +4°C u poređenju sa svežim

mlekom (80). Zanimljivo je da je koncentracija malondialdehida (MDA) koji predstavlja jedan od indikatora oksidativnog stresa, veća u HM skladištenom u frižideru u odnosu na zamrznuto mleko, što bi ukazivalo da je zamrzavanje bolji metod u odnosu na skladištenje u frižideru (81). Nasuprot tome jedna druga studija je pokazala da je skladištenje kolostruma u frižideru predstavlja najoptimalniji oblik čuvanja sa najmanjim uticajem na ukupni antioksidativni kapacitet (123). Zamrznuto HM na -20 °C proporcionalno sa dužinom skladištenja pokazuje signifikantno smanjenje UAK u odnosu na uzorak svežeg mleka ili HM koje je skladišteno u frižideru na +4°C (124). Novije studije koje su upoređivale UAK prelaznog i zrelog mleka su pokazale značajno smanjenje UAK zamrznutog HM na -80°C tokom 2 meseca u odnosu na kolostrum, na čiji UAK zamrzavanje nije uticalo (124).

U mnogim drugim studijama je analiziran uticaj zamrzavanja na antioksidativne enzime. Studija Silvestra i saradnika je upoređivala antioksidativnu enzimsku aktivnost zrelog HM koje je bilo skladišteno na temperaturi od -20°C i -80°C tokom 2 meseca. Studija je pokazala da se aktivnost GSH-P<sub>x</sub> signifikantno smanjuje nakon zamrzavanja na temperaturi od -20°C, tokom 15 dana, 1. i 2. meseca, u odnosu na uzorak svežeg mleka. Skladištenje HM na temperaturi od -80°C tokom 30 dana nije pokazalo značajno smanjenje aktivnosti GSH-P<sub>x</sub> u odnosu na uzorak svežeg HM (125).

Nakon 2 meseca skladištenja uočava se značajno smanjenje aktivnosti GSH-P<sub>x</sub>. Može se zaključiti da koncentracija i smanjenje aktivnosti GSH-P<sub>x</sub> zavise od dužine laktacije i skladištenja. Zamrzavanje na -80°C u odnosu na zamrzavanje na -20°C doprinosi boljem očuvanju aktivnosti GSH-P<sub>x</sub> u kraćem vremenskom periodu do 30 dana, što se objašnjava većom stabilnošću lipidne frakcije pri nižim temperaturama (125).

Većina autora je saglasna da se antioksidativna aktivnost enzima u mleku smanjuje sa dužinom skladištenja tokom zamrzavanja (4).

U ispitivanim uzorcima mleka SOD ima najveću aktivnost u uzorcima svežeg mleka u odnosu na zamrznute uzorke mleka. Aktivnost GSH-P<sub>x</sub> se menja nakon procesa zamrzavanja i značajno je veća u zreлом mleku u odnosu na uzorke mleka zamrznute trideset dana. Aktivnost GSH-P<sub>x</sub> se nije značajno promenila nakon 7 dana zamrzavanja. Aktivnost GR je značajno veća u uzorcima svežeg mleka, u odnosu na uzorke zamrznute tokom 30 dana.



Analiza je obuhvatila i određivanje koncentracije MDA u zreloom mleku tokom 30 dana skladištenja na temperaturama od  $-20^{\circ}\text{C}$  i  $-80^{\circ}\text{C}$  pri čemu nije uočena značajna razlika između uzoraka. S druge strane, nakon 2 meseca procesa zamrzavanja koncentracija MDA se značajno smanjuje. Ova pojava predstavlja pokazatelj lipidne peroksidacije, čiji produkti u zreloom mleku postaju stabilniji nakon 30 dana procesa zamrzavanja (124,125).

Dalje upoređivanje je obuhvatilo određivanje UAK svežeg zrelog pretermiskog mleka, sa HM zamrznutim na temperaturi  $-20^{\circ}\text{C}$  tokom 7 dana i zamrznutim tokom 30 dana. Zamrznuto HM na  $-20^{\circ}\text{C}$  proporcionalno sa dužinom skladištenja pokazuje signifikantno smanjenje UAK u odnosu na uzorak svežeg mleka (124).

Zamrzavanje izaziva niz fizičko-hemijskih procesa dovodeći do promene komponenti majčinog mleka. Kao posledica zamrzavanja intenzivira se lipoliza i oslobađanje masnih kiselina (128). U našoj studiji primenom spektrofotometrijskih metoda, samo je DPPH metoda pokazala značajan uticaj dužine zamrzavanja na smanjenje UAK ispitivanih uzoraka mleka. Primena elektrohemijske metode DPV je pokazala značajno smanjenje UAK nakon 7 dana zamrzavanja, dok fluorimetrijska metoda ORAC nije registrovala uticaj zamrzavanja na UAK. Koncentracija vitamina C značajno se smanjuje nakon zamrzavanja tokom 7 i 30 dana u odnosu na uzorak svežeg mleka.

Proces zamrzavanja u ispitivanim uzorcima mleka ima uticaj na smanjenje koncentracije vitamin C nakon zamrzavanja.

Posebno je ispitan UAK zrelog pretermiskog HM koje je izloženo režimu pasterizacije pri temperaturi od  $62,5^{\circ}\text{C}$  tokom 30 min, koja predstavlja standardni oblik pasterizacije u "banci mleka" Instituta za neonatologiju i upoređen je sa uzorkom svežeg zrelog mleka. Pasterizacija HM po tipu „hladne pasterizacije“ podrazumeva zagrevanje mleka do temperature od  $62,5^{\circ}\text{C}$  i održavanje te temperature tokom 30 minuta, nakon čega sledi brzo hlađenje. Brzo hlađenje HM doprinosi smanjenju gubitka termolabilnih komponenti mleka (126). Minimalna temperatura za termičku obradu iznosi  $56^{\circ}\text{C}$  tokom 30 minuta, a zasniva se na dokazima o inaktivaciji HIV virusa, budući da na temperaturama iznad te vrednosti dolazi do mogućeg gubitka većine korisnih sastojaka HM. Preporučeni metod pasterizacije je „hladna pasterizacija“ koji predstavlja preporuku većine internacionalnih vodiča za termičku obradu HM banaka mleka (68).

Ovaj metod predstavlja optimalno rešenje za ostvarivanje bakteriološke ispravnosti mleka i istovremeno očuvanja biološkog kvaliteta (127).

Studije koje su ispitivale uticaj pasterizacije na UAK majčinog mleka, su pokazale da je UAK u značajnoj meri redukovan, kao i koncentracija glutationa i GSH-Px (128).

U našoj studiji UAK određen spektrofotometrijskim metodama, osim DPPH nije se značajno promenio nakon pasterizacije mleka. Elektrohemijske i fluorimetrijske metode određivanja aktivnosti UAK nisu pokazale značajnu razliku između ispitivanih uzoraka mleka. Uticaj pasterizacije u velikoj meri je imao negativan uticaj na aktivnost SOD i GSH-Px, GR i koncentraciju vitamina C.

Uporedna analiza UAK je sprovedena i na uzorcima zrelog HM koje je zamrznuto i pohranjeno na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$  nakon sedam dana i nakon trideset dana, a zatim izloženo procesu pasterizacije na  $62,5^{\circ}\text{C}$  tokom 30 min., u odnosu na uzorke svežeg zrelog pretermiskog HM. U našoj studiji je nakon zamrzavanja tokom sedam dana, a zatim pasterizacije došlo je do smanjenja UAK ispitivanog spektrofotometrijskim metodama, osim metode inhibicije lipidne peroksidacije. Elektrohemijski metod DPV u ispitivanju UAK, takođe pokazuje trend smanjenja. Zamrzavanje mleka tokom sedam dana, a zatim pasterizacija nije pokazala razliku između ispitivanih uzoraka određivanjem UAK metodom ORAC. Koncentracija vitamina C značajno je veća u uzorku svežeg mleka u odnosu na zamrznuto sedam dana. Uporedno određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite SOD, GSH-Px, GR je pokazalo da je njihova aktivnost najveća u uzorku svežeg mleka, a nakon zamrzavanja i pasterizacije se smanjuje.

Uticaj obogaćivanja HM na UAK u potpunosti ispitan. Studija koja je obuhvatila 65 prevremeno rođene dece analizirala je izlučivanje F2-izoprostana urinom (koji predstavlja jedan od indikatora peroksidacije lipida), pri ishrani obogaćenim HM i adaptiranom mlečnom formulom. Deca na ishrani obogaćenim HM imaju manje izlučivanje F2 izoprostana urinom u odnosu na grupu hranjenu adaptiranom formulom (4)

Tokom ove studije u ispitivanim uzorcima mleka sve primenjene metode određivanja UAK spektrofotometrijske, fluorimetrijske, osim elektrohemijske metode ORAC pokazuju veću antioksidativnu aktivnost obogaćenog HM koje je prethodno bilo zamrznuto do 6 meseci u odnosu na uzorak svežeg HM. Aktivnost enzima

antioksidativne zaštite u zreloom obogaćenom HM SOD, GSH-Px, GR je bila značajno veća u zreloom obogaćenom mleku u odnosu na uzorke zrelog HM i adaptirane formule. Ova pojava se može objasniti kombinacijom inicijalno veće antioksidativne aktivnosti koja u velikoj meri pripada aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, ali se povećava dodavanjem neenzimskih antioksidanasa iz obogaćivača HM (SOD-like i GR-like aktivnost; na primer prisustvom Fe ili Cu u eseju za SOD). Koncentracija vitamina C je značajno veća u uzorku svežeg mleka u odnosu na obogaćeno, što se objašnjava dodavanjem obogaćivača u HM koje je prethodno bilo zamrznuto do 6 meseci.

Nove studije koje bi analizirale uticaj obogaćivanja HM na antioksidativna svojstva HM bi u velikoj meri doprineli poboljšanju strategije u ishrani prevremeno rođene dece (129).

Analizirani su i upoređeni UAK svežeg zrelog HM i HM koje je bilo zamrznuto u banci mleka Instituta za neonatologiju do 6 meseci, a zatim odmrznuto u koje je dodat obogaćivač HM (MIL Fortifier, Impamil, Srbija) sa adaptiranom mlečnom formulom (Mil PRE, Impamil, Srbija). Ishranom majčnim mlekom ostvaruje se bolja antioksidativna zaštita u odnosu na ishranu adaptiranim mlečnim formulama, što se objašnjava snažnijim antioksidativnim sistemom, većom aktivnošću SOD i višim sadržajem redukcionih supstanci (slobodni tioli) (130). Majčino mleko ima sposobnost direktnog hvatanja radikala pomoću tiol-grupa (131). Upravo ova pojava ukazuje da majčino mleko ima mnogo veći antioksidativni potencijal u odnosu na adaptirane mlečne formule. Majčino mleko i adaptirane mlečne formule imaju sposobnost hvatanja hidroksil-radikala pri čemu nastaje askorbil-radikal i radikali sa nesparenim elektronom na-ugljeniku. Produkcija navedenih vrsta je manja kod adaptirane mlečne formule u odnosu na majčino mleko, što se objašnjava većom količinom antioksidanasa male molekulske mase (132). Strategija razvoja adaptiranih mlečnih formula treba da se zasniva na snižavanju koncentracija nepravilno heliranog gvožđa i imitiranju sastava malih molekula antioksidanasa majčinog mleka u cilju postizanja što sličnijeg sastava majčinom mleku (133). Kao što je već pomenuto antioksidativne enzimske komponente predstavljaju osnovne nosioce antioksidativnog potencijala majčinog mleka i ne mogu se „reprodukovati“ u adaptiranim mlečnim formulama, dok je u adaptiranim mlečnim formulama dominantna uloga neenzimskih komponenti, vitamina A, C, E (6).

Ispitivanjem UAK spektrofotometrijskim, fluorimetrijskim, elektrohemijskim metodama je utvrđena veća vrednost UAK obogaćenog HM u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu, što se može objasniti prisustvom enzimskih i dodatih neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema. Aktivnost enzima SOD, GSH-Px, GR, je pokazala značajno veću aktivnost u obogaćenom HM.

Rezultat pH vrednosti mleka utiče na njegova biološka svojstva (ćelijski sastav, koncentraciju proteina i masti) (134). Nijedan oblik termičke obrade i skladištenja HM, kao ni poređenje sa obogaćenim HM i adaptiranom mlečnom formulom nije imao uticaj na pH vrednost ispitivanih uzoraka.

Naši rezultati su pokazali da je, i sa aspekta antioksidativne aktivnosti, HM sa dodatkom obogaćivača najbolje za ishranu prevremeno rođene dece. Obogaćivanje HM predstavlja standardni oblik ishrane prevremeno rođene dece, ne samo zbog varijabilnog nutritivnog sastava koji ne zadovoljava nutritivne potrebe ove grupe, već i zbog potreba za suplementacijom vitamina C čija se koncentracija smanjuje nakon različitih načina skladištenja (u frižideru, nakon pasterizacije i zamrzavanja).

Idealan način skladištenja HM, koji nema nikakav negativan uticaj na antioksidativne karakteristike HM ne postoji. Buduća stremljenja u ovoj oblasti treba da idu u smeru ka maksimalnom očuvanju antioksidativnih komponenti HM prilikom njegovog skladištenja (135).

## **6. Zaključci**

## 6. ZAKLJUČCI

1. Ovim istraživanjem je obuhvaćeno 30 majki koje su se porodile u  $31,27 \pm 2,21$  gestacijskoj nedelji, a od kojih je uzorkovano mleko za dalju analizu.
2. Tokom laktacije (kolostrum, prelazno i zrelo mleko), dolazi do značajnih promena antioksidativnih svojstava HM majki prevremeno rođene dece. Kolostrum ima veći UAK procenjen elektrohemijском CV metodom i ORAC metodom kao i veći sadržaj vitamina C u odnosu na prelazno i zrelo HM. Međutim, aktivnost SOD u njemu je statistički značajno manja nego u zreлом HM, dok su vrednost GSH-P<sub>x</sub> i GR značajno veće nego u zreлом mleku. EPR spektroskopija, takođe izdvaja kolostrum kao superioran uzorak HM u pogledu UAK u odnosu na ostale uzorke HM.
3. Pohranjivanje zrelog HM mleka majki prevremeno rođene dece u frižideru tokom 48 h, statistički značajno smanjuje neenzimski antioksidativni kapacitet pri primeni svih opisanih metoda izuzev ILP i CV. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite SOD i GSH-P<sub>x</sub> kao i koncentracija vitamina C je statistički značajno veća u svežem zreлом mleku, u odnosu na zrelo HM pohranjeno u frižideru 48h.
4. Zamrzavanje zrelog HM majki prevremeno rođene dece sedam i trideset dana, statistički značajno smanjuje UAK određen DPPH i DPV neenzimskim metodama, kao i koncentraciju vitamina C. Takođe, aktivnost svih ispitivanih enzima antioksidativne zaštite (SOD, GSH-P<sub>x</sub> i GR) se statistički značajno smanjuje zamrzavanjem zrelog HM 7 i 30 dana.
5. Pasterizacija statistički značajno smanjuje UAK zrelog HM majki prevremeno rođene dece, određen neenzimskom DPPH metodom, kao i koncentraciju vitamina C. Pasterizacija takođe uzrokuje statistički značajno smanjenje aktivnosti svih ispitivanih enzima antioksidativne zaštite (SOD, GSH-P<sub>x</sub> i GR).

6. Zamrzavanje uzoraka zrelog HM majki prevremeno rođene dece 7 i 30 dana, pa zatim pasterizacija doveli su do statistički značajnog smanjenja UAK, izmerenog neenzimskim DPPH i FOLIN metodama, kao i do smanjenja koncentracije vitamina C. Zamrzavanje pa zatim pasterizacija ovih uzoraka dovela je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti svih ispitivanih enzima antioksidativne zaštite (SOD, GSH-Px i GR).
7. Različite neenzimske kao i enzimske metode za procenu UAK HM pokazuju varijabilnost rezultata za isti uzorak, što ukazuje na neophodnost boljeg standardizovanja metodološkog pristupa merenja UAK.
8. Zrelo zamrznuto a zatim obogaćeno HM ima bolja antioksidativna svojstva od svežeg zrelog mleka na osnovu rezultata dobijenih primenom svih enzimskih i neenzimskih metoda za određivanje UAK. Međutim, koncentracija vitamina C je bila statistički značajno veća u svežem zreloom u odnosu na zamrznuto pa obogaćeno zrelo HM, što sugerise nepovoljan uticaj zamrzavanja u smislu smanjenja sadržaja vitamina C u zreloom HM. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite SOD i GR je bila statistički značajno veća u zreloom zamrznutom pa obogaćenom HM. Takođe, zrelo zamrznuto, a zatim obogaćeno HM ima bolja antioksidativna svojstva od adaptirane mlečne formule namenjene ishrani prevremeno rođene dece.
9. Adaptirana mlečna formula za ishranu prevremeno rođene dece ima veći UAK dobijen CV, DPV i ORAC neenzimskim metodama, ali statistički značajno manju koncentraciju vitamina C u odnosu na sveže zrelo HM. Aktivnost GSH-Px bila je statistički značajno veća u uzorku svežeg zrelog HM, dok se aktivnosti SOD i GR nisu statistički značajno razlikovale u svežem zreloom HM majki prevremeno rođene dece u odnosu na adaptiranu mlečnu formulu za ishranu ove populacije dece.
10. Skladištenje zrelog HM mleka majki prevremeno rođene dece u frižideru, njegovo zamrzavanje kao i termička obrada pasterizacijom, statistički visoko

značajno smanjuje koncentraciju vitamina C u odnosu na sveže zrelo HM. Ovakav rezultat sugerira neophodnost obogaćivanja zrelog HM majki prevremeno rođene dece vitaminom C posle postupaka skladištenja i/ili termičke obrade, a pre ishrane.

11. Sve metode pohranjivanja i obrade zrelog HM utiču na njegov UAK i statistički značajno ga smanjuju pa je na osnovu ovog istraživanja nemoguće izdvojiti jedan postupak skladištenja/obrade HM kao optimalan u pogledu očuvanja UAK. Obogaćeno zrelo zamrznuto HM majki prevremeno rođene dece je bolji izbor za ishranu ove populacije dece u odnosu na njima namenjenu adaptiranu mlečnu formulu i sveže zrelo HM, sa izuzetkom sadržaja vitamina C koji je najveći u svežem zrelog HM. Sve ovo sugerira da je za ishranu prevremeno rođenog deteta optimalno kada god je moguće koristiti sveže obogaćeno HM.



## **7. Literatura**

## 7. LITERATURA

1. Shoji H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:324-28.
2. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn-a 30-year perspective. *Biol Neonate* 2005;88:228-36.
3. Zanardo V, Nicolussi S, Carlo G et al. Beta endorfin concentrations in human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:160-4.
4. Cloetens L, Panee J, Akesson B. The antioxidant capacity of milk-the application of different methods in vitro and in vivo. *Cell Mol Biol* 2013;59(1):43-57.
5. Spasojević I. Free radicals and antioxidant at a glance using EPR spectroscopy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2011;48(3):114-42.
6. Lugonja N, Spasić S, Laugier O, Nikolić-Kokić A, Spasojević I, Oreščanin -Dušić Z, Vrvic M. Differences in direct pharmacologic effects and antioxidative properties of mature breast milk and infant formulas. *Nutrition* 2013;29:431-35.
7. Quigley M, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;4:CD002971.
8. Arslanoglu S, Bertino E, Tonetto P, et al. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23(Suppl 2):1-20.
9. Uauy R, Koletzko B. Defining the nutritional needs of preterm infants. *World Rev Nutr Diet* 2014; 110:4-10.

10. McCord JM: The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652-59.
11. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
12. Kim NH, Kang JH. Oxidative damage of DNA induced by the cytochrome C and hydrogen peroxide system. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:425-6.
13. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human disease origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:241-81.
14. Minelli C, Gögele M. The role of antioxidant gene polymorphisms in modifying the health effects of environmental exposures causing oxidative stress: a public health perspective. *Free Radic Biol Med* 2011;51:925-30.
15. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007;121:2381-86.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
17. De la Feunete M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 (suppl 3): S5-8.
18. Yeung MY. Influence of early postnatal nutritional management of oxidative stress and antioxidant defence in extreme preaturity. *Acta Paediatr* 2006;95:153-63.

19. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res* 2009;66:121e7.
20. Gate L, Paul J, Ba GN. Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomed Pharmacoter* 2003;53:169-180.
21. Luo ZC, Fraser WD, Julien P et al. Tracing the origins of „fetal origins“ of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses*.2006;66:38-44.
22. Stewart RJ, Askew EW, McDonald et al. Antioxidant status of young children: response to an antioxidant supplement. *J Am Diet Assoc* 2002; 102:1652-7.
23. Hollman PC, Cassidy A, Comte B, et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr* 2011;141:989S-1009S.
24. Barikmo I, Berhe N, Willett C et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* 2010;22-3.
25. Schlesier K, Harwat M, Bhom V et al. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res* 2002;36:177-134.
26. Ledo A, Arduini A, Asensi AM et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2009; 89:210-5.
27. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(3): 337-349.
28. Hill RD. Superoxide dismutase activity in bovine milk. *Aust J Dairy Technol* 1975;30:26-8.

29. Kiyosawa I, Matuyama J, Nyui S, Yoshida K. Cu, Zn and Mn-superoxide dismutase concentration in human colostrum and mature milk. *Biosci, Biotechnol Biochem* 1993;57:676-7.
30. Fox PF, McSweeney PLH. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. First edition. Blackie Academic and Professional, Thomson Science, London, 1998:265, 290, 341, 340.
31. Shahani KM, Kwan AJ, Friend BA. Role and significance of enzymes in human milk. *Am J Clin Nutr* 1980; 3:1861-8.
32. Shahani KM, Harper WJ, Jensen RG, Parry RM, Zittle CA. Enzymes in bovine milk: A review. *J Dairy Sci* 1973;56:531-43.
33. Torres A, Farré R, Lagarda MJ, Monleón J. Determination of glutathione peroxidase activity in human milk. *Nahrung* 2003; 47:430-3.
34. Kocić G, Bjelaković Lj, Cvetković T et al. Enzyme activity of human milk during the first month of lactation. *Acta Med Median* 2010; 49:20-24.
35. Lawrence RA, Lawrence RM. *Biochemistry of Human Milk*, In: *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*. Seventh Edition. Elsevier, Philadelphia, 2011:102, 103, 107.
36. Bates CJ, Prentice A. Breast milk as a source of vitamins essential minerals and trace elements. *PharmacTher* 1994;62:193-220.
37. Andersson Y, Lindquist S, Lagerqvist C et al. Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum Dev* 2000;59:95-105.
38. Nagasawa T, Kiyosawa I, Kuwahara K et al. Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J Dairy Sci* 1972;55:1651-9.

39. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition. Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 2013; 60, 49-74.
40. Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, López-Sabater MC. Ultra-High-Pressure Liquid Chromatographic method for the analysis of tocopherols in human colostrum and milk. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 4388-94.
41. Haug M, Laubach C, Burke M, Harzer G. Vitamin E in human milk from mothers of preterm and term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987; 6:605-9.
42. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2007; 37: 7-36.
43. Niklowitz P, Menke T, Giffey et al. Coenzyme Q10 in maternal plasma and milk throughout early lactation. *Biofactors* 2005; 25:67-72.
44. Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC et al. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stage of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res* 2006; 40:199-206.
45. Giribaldi M, Laura Cavallarin L, Baro C, Di Nicola P et al. Biological and Nutritional Aspects of Human Milk in Feeding of Preterm Infants. *Food Nutr Sci* 2012;3:1682-7.
46. Lindmark-Mansson H, Akesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr* 2000; 84: S103-110.
47. Savić D, Vojinović J, Zvezdanović L, Cosić V, Savić V. Importance of breast-feeding in antioxidant defence. *Srparhceloklek* 2005; 2:108-12.

48. Ermis B, Yildirim A, Ors R et al. Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and antioxidant potential levels in mothers at the postpartum seventh day. *Biol Trace Elem Res* 2005; 105:27-36.
49. Kasapović J, Pejić S, Mladenović M, Radlović N and Pajović. Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk. *Turk J Pediatr* 2005, 47:343-47.
50. Zarban A, Taheri F, Chahkandi T et al. Antioxidant and radical scavenging of human colostrum, transitional and mature milk. *J Clin Biochem Nutr* 2009, 45:150-54.
51. Friel J K, Diehl-Jones B, Cockell KA et al. Evidence of oxidative stress in relation to feeding type during early life in premature infants. *Pediatr Res* 2011, 69:160-64.
52. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition. Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 60. 49-74.
53. Turhan AH, Atici A, Muslu N. Antioxidant capacity of breast milk mothers who delivered prematurely is higher than that of mothers who delivered at term. In *J Vitam Nutr Res* 2011; 81 (6): 368-71.
54. Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM et al. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months. *Pediatrics* 2007;120: e953.
55. Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G et al., ESPGHAN Committee on Nutrition. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57: 535-42.
56. Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;13:147-53.

57. Li Yao, James F, Miyoung S et al. Antioxidant properties of breast milk in novel in vitro digestion/enterocyte model 2010; *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:670-76.
58. Schanler RJ. The use of human milk for premature infants. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:207-20.
59. Ruhaak LR, Lebrilla CB. Advances in analysis of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr*. 2012 May; 3 (3):406 S-414 S.
60. Chauhan M, Henderson G, McGuire W. Enteral feeding for very low birth weight infants: reducing the risk of necrotizing enterocolitis. *Arc Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F 162-6.
61. Simeoni U, Zyzdorczyk C, Siddeek B et al. Epigenetics and neonatal nutrition. *Early Hum Dev* 2014; 9052:523-4.
62. Menjo A, Mizuno K, Murase M et al. Bedside analysis of human milk for adjustable nutrition strategy. *Acta Pediatr* 2009;98:380-4.
63. Wojcik KY, Rechtman DJ, Lee ML et al. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J Am Diet Assoc* 2009;109:137-40.
64. Mathur NB, Dwarkadas AM, Sharma VK et al. Anti-infective factors in preterm human colostrum. *Acta Pediatr Scand* 1999;79:1039-44.
65. Bauer J, Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals of human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr* 2011;30:215-20.
66. Thureen P, Heird W. Protein and energy requirement of the preterm/low birth weight (LBW) infant. *Ped Res* 2005;57 (5): 95-9.



67. Agostini C, Buonocore G, Carnielli M et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: Comentary from the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50:1-9.
68. European Milk Bank Association. Milk sharing. A statement from European Milk Bank Association (EMB) and the Human Milk Banking Association of North America (HMBANA). January 2015. <https://www.hmbana.org/sites/default/files/EMBA%20HMBANA%20Milk20Sharing%20Statement%FINAL20%January%202015.pdf>. Accessed April 2015.
69. Corvaglia L, Fantini MP, Aceti A et al. Predictors of full enteral feeding achievement in very low birth weight infants. *PloS One* 2014; 9:e92235.
70. The SIFT Investigators Group. Early enteral feeding strategies for very preterm infants: current evidence from Cochrane reviews. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013; 98:F470-2.
71. Bombell S, McGuire W. Early trophic feeding for very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 3: CD000504.
72. Patel AL, Johnson TJ, Engstrom JL et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol* 2013. Jan 2013:1-6.
73. Meinen-Derr J, Poindexter B, Wrage L et al. For the NICHD Neonatal Research Network. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J Perinatol* 2009; 29:57-62.
74. Gibertoni D, Corvaglia L, Vandini S et al. Positive effect of human milk feeding during NICU hospitalization on 24 month neurodevelopment of very low birth weight infants: an Italian cohort study. *PloS One* 2015; 10:e0116552.

75. American Academy of Pediatrics. Breastfeeding and use of human milk. *Pediatrics* 2012; 129:e827.
76. Italian Association of Human Milk Banks, Arslanoglu S, Bertino E, Tonetto et al. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23 ( Suppl. 2): 1-20.
77. Arslanoglu S, Moro GE, Ziegler EE. Donor human milk in preterm infant feeding: evidence and recommendations. World Association of Perinatal Medicine (WAPM) Working Group on Neonatal Nutrition Recommendations. *J Perinat Med* 2010; 38:347-51.
78. Hanna N, Ahmed K, Anwar M et al. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89: F 518-F520.
79. Slutzah M, Codipilly N, Potak D et al. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 2010;156:26-8.
80. Miranda M, Muriach M, Almansa I et al. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors* 2004, 20:129-37.
81. Martysiak-Żurowska D, Wenta W. A comparasion of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk 2012. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 11, 83-9.
82. Elisia I, Kitts DD. Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 49:147-52.
83. Koenig A, Diniz EMA, Brabarosa SFC et al. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *J Hum Lact* 2005;21:439-43.

84. Bertino E, Coppa GV, Giuliani F et al. Effects of holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *Int J Immunopath Ph.* 2008;21:381-5.
85. Akinbi H, Meinen-Derr J, Auer C et al. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:347-52
86. Christen L, Lai CT, Hartmann PE. Ultrasonication and the quality of human milk: variation of power and time of exposure. *J Dairy Res* 2012;79:361-6.
87. Sousa SG, Delgadillo I, Saraiva JA. Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chem* 2014;151:79-85.
88. Koletzko B, Baker S, Cleghorn G et al. Global Standards for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 Nov;41:584-99.
89. Aycicek A, Erel O, Kocyigit et al. Breast milk provides better antioxidant power than does formula *Nutr* 2006, 22:616-19.
90. Lugonja N, Stankovic D, Spasic S, Roglić G, Manojlović D, Vrvic M. Comparative electrochemical determination of total antioxidant activity in infant formula with breast milk. *Food Anal Methods* 2014; (7):337-44.
91. Turoli D, Testolin G, Zanini et al. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr* 2004, 93: 1569-74.
92. Alberti-Fidanza A, Burini G, Parriello G. Total antioxidant capacity of colostrum, and transitional and mature human milk. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002, 11:275-79.

93. Tsukahara H. Redox modulatory factors of human breast milk. In: Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds.) Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk Ed 5, Human Health Hanbooks. ISSN 2212-375X.
94. de Halleux V, Rigo J. Variability in human milk composition:benefit of individualized fortification in very-low-birth-weigth infants. *Am J Clin Nutr* 2013;98:S529-35.
95. 101. Stolz Sjöström E, Öhlund I, Ahlsson F et al. Nutrient intkes independently affect growth in extremely preterm infants: results from a population-based study. *Acta Pediatr* 2013;102:1067-74.
96. Kuschel CA, Harding JE. Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Issue 1.
97. Reali A, Greco F, Fanaro S et al. Fortification of maternal milk for very low birth weight (VLBW) pre-term neonates. *Early Hum Dev.* 2010;86 (Suppl 1):33-6.
98. Rochow N, Fusch G, Choi A et al. Target fortification of breast milk with fat, protein and carbohydrates for preterm infants. *J Pediatr* 2013; 163:1001-7.
99. Arslanoglu S, Bertino E, Coscia A et al. Update of adjustable fortification regimen for preterm infants: a new protocol. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012;26 (3 Suppl):65-7.
100. Ledo A, Arduini A, Asensi MA et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2009, 89:210-15.
101. Sandal G, Uras N, Gokmen T et al. Assesment of oxidant/antioxidant system in newborns and their breast milks. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26, 540-43.

102. Adept. Abnormal Doppler Enteral Prescription Trial (adept). 2009. [www.npeu.ox.ac.uk/adept](http://www.npeu.ox.ac.uk/adept).
103. World Health Organization, Conclusion on WHO: Report of a WHO consultation on obesity, 1997.
104. Corvaglia L, Aceti A, Paoletti V et al. Standard fortification of preterm human milk fails to meet recommended protein intake: Bedside evaluation by Near-Infrared-Reflectance-Analysis. *Early Hum Dev* 2010;86:237-40.
105. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*1999;299:152-78.
106. M Reza, N Sadeghi, B Jannat et al. Human breast milk provides better antioxidant capacity than infant formula. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010;(9) 445-49.
107. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods enzymol.* 1999; 299: 1527.
108. Ermis, B., Yildirim, A., Ors, R., Tastekin, A., Ozkan, B., Akcay, F. Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and antioxidant potential levels in mothers at the postpartum seventh day. *Biol Trace Elem Res.* 2005 Summer;105 (1-3):27-36.

109. Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Stipcevic, T., Martinez, S. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chem.* 2010; 121:820–825.
110. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626.
111. Romay, C., Pascual, C., Lissi, E.A. (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 175–183.
112. Misra HIF. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247: 31705.
113. Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158–69.
114. Yan J, Meng X, Wancket LM, Lintner K, Nelin LD, Chen B, Francis KP, Smith CV, Rogers LK, Liu Y. Glutathione reductase facilitates host defense by sustaining phagocytic oxidative burst and promoting the development of neutrophil extracellular traps. *J Immunol.* 2012; 188: 2316-27.
115. Xu, Y., Kalyanaraman, B. Synthesis and ESR studies of a novel cyclic nitron spin trap attached to a phosphonium group—a suitable trap for mitochondria-generated ROS? *Free Radic Res.* 2007; 41: 1–7.
116. Xavier AM, Rai K, Hegde AM. Total antioxidant concentrations of breastmilk—an eye-opener to the negligent. *J Health Popul Nutr* 2011 Dec 29 (6) :605-11.

117. Li W, Hosseinian FS, Tsompo A et al. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition* 2009;25:105-14.
118. Hassiotou F, Beltran A, Chetwynd E et al. Breast milk is a novel source of stem cells with multi-lineage differentiation potential. *Stem Cells* 2012; 30:2164.
119. Hassiotou F, Heath B, Ocal O et al. Breast milk stem cell transfer from mother to neonatal organs. San Diego (USA): FASEB; 2014.
120. Ezaki S, Ito T, Suzuki K et al. Association between total antioxidant capacity in breast milk and postnatal age in days in premature infants. *J Clin Biochem Nutr* 2008;42:133-37.
121. Becker D, (Ed) *Redox potentiometry Redox Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2008.
122. Slutzah M, Codipilly CN, Potak et al. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 2010;156:26-8.
123. Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and vivo. *Free Radic Biol Med*. 2010, 49:503-15.
124. Sari FN, Akdag A, Alyamac Dizdar E et al. Antioxidant capacity of fresh and stored breast milk: is -80° C optimal temperature for freeze storage ? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012, 25: 777-82.
125. Silvestre D, Miranda M, Muriach M et al. Frozen breast milk at -20 °C and -80 °C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration.
126. Jensen RG, ed *Handbook of milk composition*. Academic press, San Diego, CA 1995.

127. Newburg DS. Glycobiology of human milk. *Biochemistry* 2013, 78, 771-85.
128. Silvestre D, Miranda M, Muriach M et al. Antioxidant capacity of human milk: Effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Pediatr* 2008, 97, 1070-74.
129. Tully dB, Jones F, Tully MR. Donor milk: what is in it, what is not ? *J Hum Lac.* 2001;17:152-5.
130. Friel JK, Martin SM, Langdon M et al. Milk from mothers of both premature and full term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res.* 2002;51:612-8.
131. Hioe J, Zipse H. Radical stability and its role in synthesis and catalysis. *Org Biomol Chem* 2010;8:3609-17.
132. Lane N. A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory. *J Theor Biol* 2003;225:531-40.
133. Lugonja N. Ispitivanje antioksidativnog potencijala hrane za bebe. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd 2014.
134. Ericson T, Gill G, Chan GM. The effects of acidification on human milk's cellular and nutritional content. *J Perinatol* 2013 May; 33 (5):371-3.
135. Viera A A, Soares F V, Pimenta H P et al. Anallysis of the influence of pasterization freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Hum Dev* 2011; 87:577-80.



## **Spisak skraćenica**

## **SPISAK SKRAĆENICA**

**BMI**- indeks telesne mase

**CMV**-citomegalovirus

**CV**-ciklična voltometrija

**CAT**-katalaza

**DEPMPO** 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide

**DPPH**-1,2-difenil-2 pikril-hidralazin

**DPHH metoda**-metod hvatanja slobodnih radikala

**DPV**-diferencijalna pulsna voltometrija

**ESPGHAN**- Evropska asocijacija za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i nutriciju

**EPR**-elektron- paramagnetna rezonanca

**EGF**-epidermalni faktor rasta

**FRAP**-metoda bazirana na reakciji antioksidanasa sa Fe (III)-kompleksom

**GSH-P<sub>x</sub>**- glutation- peroksidaza

**GR**-glutation- reduktaza

**GSH**-redukovani glutation

**GSSG**-oksidovani glutation

**GN**-gestacijska nedelja

**GAE**-galna kiselina

**HM**-humano mleko

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**-vodonik-peroksid

**HIV**-virus humane imunodeficijencije

**HTLV-1**-humani limfotroponi virus tip I

**IVF**-in vitro fertilizacija

**LC- PUFA**-dugolančane višestruko nezasićene mane kiseline

**MDA**-malondialdehid

**MIRIS<sup>®</sup>**-analizator makronutrijenata u humanom mleku

**NADPH**-nikotinamid adenin dinukleotid

**NEK**-nekrotizirajući enterokolitis

**ORAC**-metoda određivanja kapaciteta apsorbance kiseoničnog radikala

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** –superoksidni- anjon

· **OH**- hidroksil- radikal

**PTM**-porođajna telesna masa

**sIgA**-sekretorni imunoglobulin A

**SOD**- superoksid- dismutaza

**TM**-telesna masa

**TV**-telesna visina

**UAK**-ukupni antioksidativni kapacitet

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Vesna S. Marinković je rođena u Osijeku 24.05.1968. godine.

Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1994. godine. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je 2001. godine. U periodu od maja 2001. do decembra 2002. bila je zaposlena u KBC Zemun.

U Institutu za neonatologiju u Beogradu je zaposlena od decembra 2002. godine najpre na poslovima lekara u odeljenju intenzivne nege, a od 2013. godine načelnik je I odeljenja specijalizovane nege .

Odbanom rada uže specijalizacije iz neonatologije pod nazivom „Značaj obogaćivanja majčinog mleka kod prevremeno rođene dece“ na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2010. stekla je naziv specijaliste iz neonatologije.

Odlukom Ministarstva zdravlja Republike Srbije 2011. godine stekla je naziv Primarijusa.

Magistarsku tezu pod nazivom „Analiza uticaja minimalne enteralne ishrane na rast prevremeno rođene dece veoma male telesne mase“ odbranila je 2014. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu .

Angažovana je za rad na projektu primene obogaćivanja majčinog mleka u ishrani prevremeno rođene dece. Aktivno je učestvovala kao deo tima za formulaciju prvog domaćeg obogaćivača majčinog mleka.

Autor je monografije "*Specifičnost ishrane prevremeno rođene dece*" objavljene u izdanju Zadužbine Andrejević, Biblioteka Specialis 2010. godine.

Član je The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) .

Autor je i koautor 38 radova publikovanih i saopštenih na stručnim skupovima u zemlji i inostranstvu .

Govori ruski i engleski jezik .

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Vesna Marinković

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje antioksidativnog statusa mleka majki prevremeno rođene dece“

---

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 26.06.2017

Vesna Marinković

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Vesna Marinković

Broj upisa: \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada „Ispitivanje antioksidativnog statusa mleka majki prevremeno rođene dece“

Mentor: Dr Miloš Ješić , vanredni profesor

Potpisani: Vesna Marinković

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 26.06.2017.

*Vesna Marinković*

Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„ Ispitivanje antioksidativnog statusa mleka majki prevremeno rođene dece „

---

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 26.06.2017.



---