

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jelena B. Martinov

**MEHANIZMI BIOLOŠKIH EFEKATA
JEDINJENJA DOBIJENIH ALKALNOM
HIDROLIZOM JABUČNOG PEKTINA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Jelena B. Martinov

**MECHANISMS OF BIOLOGICAL
EFFECTS OF COMPOUNDS OBTAINED
BY ALKALINE HYDROLYSIS OF APPLE
PECTIN**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

MENTOR

Prof. Dr Miodrag Krstić, profesor na Katedri Interne medicine Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu

KOMENTOR

Prof. Mihajlo Spasić, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša
Stanković“

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. Dr Tomica Milosavljević**, profesor na Katedri Interne medicine
Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. **Prof. Dr Tatjana Simić**, profesor na Katedri Medicinske i kliničke biohemije
Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. **Prof. Dr Dragomir Damjanov**, profesor na Katedri Interne medicine
Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu

DATUM ODBRANE : _____

Mojim dragim roditeljima i sestri

Zahvaljujem se mentoru Prof. dr Miodragu Krstiću, redovnom profesoru, koji mi je pružio pomoć i podršku pri izradi ovog rada; komentoru Prof. dr Mihajlu Spasiću koji je predložio temu i koji je rukovodio ovim radom, na pruženoj pomoći tokom uobličavanja ove doktorske disertacije, u momentima kada je to bilo najpotrebnije.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Snežani Spasić, višem naučnom saradniku, na stručnoj pomoći tokom svih faza eksperimentalnog rada i izrade ove doktorske disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem i istraživačima Instituta za multidisciplinarna istraživanja i Instituta za Biološka istraživanja Univerziteta u Beogradu na korisnim savetima i pomoći tokom eksperimentalne faze rada.

Ovom prilikom želim da se zahvalim i mojim dragim prijateljima Goranu Janjiću i Mariji Petković na ogromnoj podršci prilikom sređivanja i uobličavanja ove teze.

Najveću zahvalnost dugujem roditeljima, sestri i svojoj novoj porodici na bezuslovnoj podršci.

Autor

Mehanizmi bioloških efekata jedinjenja dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog pektina

Rezime

Jabuka (*Malus domestica* Borkh) je od davnina poznata po svojim pozitivnim nutritivnim i lekovitim svojstvima pa je njen hemijski sastav intenzivno proučavan. Za pektin iz jabuka, kao i iz drugih izvora npr. citrusnog voća, je poznato da pozitivno utiče na gastrointestinalni trakt, dominantno putem uticaja na gastrointestinalnu mikrobiotu. Pretpostavka je da se taj uticaj uglavnom ostvaruje preko njegove polimerne strukture i slabe rastvorljivosti.

Mi smo derivatizovali pektin primenom alkalne hidrolize u prisustvu vodonik peroksida. Dobijeni proizvod okarakterisali smo FTIR spektroskopijom i pokazali da u odnosu na polazni materijal ima simetrične i asimetrične vibracije istezanja karboksilatnih grupa. Ovo indukuje mogućnost da dobijeni derivat ima specifične reakcije sa hidroksilnim radikalima koji nastaju u Fentonovoj reakciji *in vitro*, a uslovi za postojanje Fentonove reakcije *in vivo* postoje u gastrointestinalnom traktu u prisustvu Fe i vitamina C.

Ispitivanja EPR spektroskopijom pokazala su da derivat jabučnog pektina u sistemu Fentonove reakcije podstiče stvaranje ugljen-dioksid radikalskog anjona ($\cdot\text{CO}_2^-$ radikala) umesto hidroksidnog radikala. Za ovaj radikal su prethodna ispitivanja pokazala da ima duži poluživot od hidroksidnog radikala i da specifično reaguje sa određenim proteinima. To ukazuje na mogućnost da derivat pektina koji smo mi dobili u gastrointestinalnom traktu ima dodatno pozitivne efekte putem direktnog uticaja na mikrobiotu.

Stoga smo ispitali antimikrobnu aktivnost pektina i njegovih derivata i pokazali, da derivati pektina dobijeni alkalnom hidrolizom jabučnog pektina (APDO) sprečavaju rast *Saccharomyces cerevisiae* i *Candide albicans*, dok nemaju uticaj na rast *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*.

Analizirali smo takođe i efekte derivata pektina (jabuke i citrusa) i oligosaharida izvedenih iz poligalakturonske kiseline (APDO, CPDO i PGDO) na rast jednog Gram-negativnog reprezentativnog soja *Escherichia coli* ATCC 25922 i jednog Gram-pozitivnog reprezentativnog soja *Staphylococcus aureus* u prisustvu supstanci koje imitiraju uslove u gastrointestinalnom traktu koji favorizuju Fenton reakciju. Pokazano je da derivat jabučnog pektina inhibira rast *E. coli* i *S. aureus* u tim uslovima, najverovatnije putem ugljendioksid radikal inhibicije ključnih enzima antioksidacionog sistema (kod *E. coli* SOD i GSH-Px, a kod *S. aureus* GSH-Px).

Na kraju ispitali smo i uticaj derivata pektina na imuni sistem. APDO nakon 24 h nije u statistički značajnoj meri uticao na vijabilitet CLNC, dok je nakon 48 h izazvao značajno smanjenje vijabiliteta ovih ćelija, pri čemu je efekat dozno zavisian. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je zapaženo smanjenje vijabiliteta CLNC pod uticajem APDO nakon 48 h verovatno posledica antiproliferativnog delovanja ovih molekula.

Naši rezultati pokazuju da dobijeni derivat jabučnog pektina ima izraziti potencijal za primenu u regulaciji gastrointestinalne mikrobiote jer sprečava rast patogenih mikroorganizama bez značajnog uticaja na imuni sistem domaćina.

Ključne reči: pektinski derivati oligosaharida, anjonski radikal ugljen dioksida, *E. coli*, *S. aureus*

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Gastroenterohepatologija

Mechanisms of biological effects of compounds obtained by alkaline hydrolysis of apple pectin

Abstract

Apple (*Malus domestica* Borkh) has long been known for its positive nutritive and medical properties, so its chemical composition has been intensively studied. For apple pectin, as well as from other sources e.g. citrus fruit, is known that have positive effect on gastrointestinal tract, predominantly through the influence to gastrointestinal microbiota. The assumption is that this effect is mainly achieved through its polymeric structure and poor solubility.

We have derivatized pectin using alkaline hydrolysis in the presence of hydrogen peroxide. The obtained product was characterized by FTIR spectroscopy and showed symmetric and asymmetric stretching vibrations of the carboxylate groups in comparing with the starting material. This induces the possibility that the resulting derivative has specific reactions with the hydroxyl radicals formed in the Fenton reaction *in vitro*, and the conditions for the existence of a Fenton reaction *in vivo* exist in the gastrointestinal tract in the presence of Fe and vitamin C.

EPR spectroscopy studies have shown that the apple pectin derivative in the Fenton reaction system induces the formation of carbon dioxide radicals anion ($\text{CO}_2^{\cdot-}$ radicals) instead of hydroxyl radicals. Preliminary studies for this radical have shown that it has a longer half-life than hydroxyl radicals and specifically reacts with certain proteins. This indicates the possibility that the pectin derivative that we get has additional positive effects in the gastrointestinal tract through the direct impact on the microbiota.

Therefore, we examined antimicrobial effect of pectin and its derivatives and showed that the pectin derivatives obtained by alkaline hydrolysis of apple pectin (APDO) inhibited the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and had no influence on the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

We also analyzed the effects of pectin derivatives (apple and citrus) and oligosaccharides derived from polygalacturonic acid (APDO, CPDO and PGDO) on the growth of one Gram-negative representative strain of *Escherichia coli* ATCC 25922 and one Gram-positive representative strain of *Staphylococcus aureus* in the presence of

substances that imitate conditions in a gastrointestinal tract that favors the Fenton reaction. It has been shown that the apple pectin derivative inhibits the growth of *E. coli* and *S. aureus* in these conditions, most likely through inhibiting key enzymes of the antioxidant system with carbon dioxide radical (*E. coli* SOD and GSH-Px, *S. aureus* GSH-Px).

At the end we also examined the effect of pectin derivatives on the immune system. After 24 h, APDO did not significantly affect the CLNC viability, and after 48h caused a significant decrease in the viability of these cells, with the effect being dose dependent. Based on these results, it can be concluded that the observed decrease in CLNC viability, after 48h, under the influence of APDO is probably a consequence of the antiproliferative action of these molecules.

Our results show that the obtained apple pectin derivative has a pronounced potential for application in regulation of gastrointestinal microbiota because it prevents the growth of pathogenic microorganisms without significant influence on the host's immune system.

Keywords: apple pectin derivatives, carbon dioxide radical anion, *E. coli*, *S. aureus*

Scientific field: Medicine

Specialized scientific field: Gastroenterohepatology

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. PEKTIN	1
1.1.1. Istorijat pektina.....	1
1.1.2. Biologija pektina.....	2
1.1.2.1. Struktura ćelijskog zida biljaka.....	2
1.1.3. Hemijska struktura pektina.....	3
1.1.3.1. Modeli pektina.....	6
1.1.4. Svojstva pektina.....	6
1.1.5. Izvori pektina i njegova ekstrakcija.....	8
1.1.5.1. Izvori pektina u hrani.....	8
1.1.5.2. Komercijalni izvori pektina.....	8
1.1.5.3. Ekstrakcija komercijalnog pektina.....	8
1.1.6. Modifikacija pektina.....	10
1.1.6.1. Supstitucija.....	10
1.1.6.2. Elongacija.....	13
1.1.6.3. Depolimerizacija.....	14
1.1.7. Upotreba pektina.....	16
1.1.7.1. Upotreba pektina u industriji.....	16
1.1.7.2. Fiziološki efekti pektina na ljudski organizam.....	16
1.1.8. Jabučni pektin i njegovi zdravstveni benefiti.....	34
1.2. SLOBODNI RADIKALI	38
1.2.1. Slobodni radikali kiseonika.....	38
1.2.2. Lipidna peroksidacija.....	41
1.2.3. Antioksidacioni zaštitni sistem (AOS).....	42
1.2.3.1. Enzimske komponente AOS-a.....	44
1.3. FENTONOVA REAKCIJA	49
1.3.1. Reaktanti u Fentonovoj reakciji.....	50
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	52
3. MATERIJAL I METODOLOGIJA	53
3.1 Hidroliza jabučnog i citrusnog pektina i poligalakturonske kiseline	53
3.1.1. Spektroskopija u infracrvenoj oblasti sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	53

3.2.	Reaktivnost na hidroksidni radikal generisan Fentonovom reakcijom testirana EPR-om.....	55
3.3.	Određivanje antimikrobne aktivnosti pektina i derivata pektina (APDO) metodom difuzije u agaru.....	58
3.4.	Efekti dobijenih oligosaharida iz pektina jabuke i citrusa (u prisustvu Fenton potencirajućih supstanci) na broj bakterija u kulturama <i>E.coli</i> i <i>S.aureus</i>.....	60
3.5.	Određivanje promena na sistemima zaštite bakterija od oksidacionih oštećenja.....	61
3.5.1.	Odredjivanje aktivnosti antioksidacionih enzima u <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	61
3.5.1.1.	Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	61
3.5.1.2.	Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px)	62
3.5.1.3.	Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)	62
3.5.1.4.	Određivanje aktivnosti bakar/cink sadržavajuće superoksid dismutaze (CuZnSOD).....	63
3.6.	Testovi efekata derivata pektina na imuni sistem.....	64
3.6.1.	Medijum za gajenje ćelija.....	65
3.6.2.	Eksperimentalne životinje.....	65
3.6.3.	Izolovanje ćelija peritonealnog eksudata.....	65
3.6.4.	Izolovanje ćelija cervikalnih limfnih čvorova.....	66
3.6.5.	Brojanje ćelija.....	66
3.6.6.	Uspostavljanje kulture makrofaga.....	66
3.6.7.	Uspostavljanje kultura ćelija cervikalnih limfnih čvorova....	67
4.	REZULTATI.....	68
4.1.	Analiza dobijenih pektinskih derivata spektroskopijom u infracrvenoj oblasti sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	68
4.2.	Rezultati EPR analize radikala u Fentonovom sistemu.....	70
4.3.	Odredjivanje antimikrobne aktivnosti pektina i njegovih derivata (APDO).....	72
4.4.	Efekti dobijenih oligosaharida iz pektina jabuke i citrusa (u prisustvu Fenton potencirajućih supstanci) na broj bakterija u kulturama <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>.....	75
4.5.	Određivanje promena na sistemima zaštite bakterija od oksidacionih oštećenja preko određivanja aktivnosti antioksidacionih enzima u <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>.....	77

4.6.	Testovi efekata derivata pektina na imuni sistem.....	78
4.6.1.	Uticaj APDO na vijabilitet makrofaga	78
4.6.2.	Uticaj APDO na vijabilitet ćelija cervikalnih limfnih čvorova (CLNC).....	79
4.6.2.1.	Priroda smanjenja vijabiliteta ćelija cervikalnih limfnih čvorova pod uticajem APDO.....	80
5.	DISKUSIJA	82
6.	ZAKLJUČCI	96
7.	LITERATURA	98

SPISAK SKRAĆENICA

APDO- Derivati pektina jabuke (**A**pple **P**ectin **D**erived **O**ligosaccharides)

AOS- Antioksidativni sistem

Asc- Askorbat (Vitamin C)

CPDO- Derivati pektina citrusa (**C**itrus **P**ectin **D**erived **O**ligosaccharides)

CFU- Ukupan broj viabilnih mikroorganizama (**C**olony **F**orming **U**nits)

CAT- Katalaza

CLNC- Čelije cervikalnih limfnih čvorova (**C**ervical **L**ymph **N**ode **C**ells)

$\cdot\text{CO}_2^-$ - Anjonski radikal ugljen dioksida

DEPMPO- 5-dietoksifosforil-5-metil-L-pitolin-N-oksidi

DMSO - Dimetilsulfoksid rastvor

DE- Stepen esterifikacije (Degree of esterification)

EPR - Elektron Paramagnetna Rezonanca

FTIR- Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (**F**ourier **T**ransform
Infrared **S**pectroscopy)

Gal A- Galakturonska kiselina (Galacturonic acid)

GIT- Gastrointestinalni trakt

GR- Glutation-reduktaza

GSH-Px- Glutation-peroksidaza

HG- Homogalakturonan

H₂O₂- Vodonik peroksid

HM- Visoko metilovani (High methylated)

LM- Nisko metilovani (Low methylated)

LPS- Lipopolisaharidi

MW- Molekularna težina (Molecular Weight)

$\cdot\text{OH}$ - Hidroksidni radikal

$\cdot\text{O}_2^-$ - Superoksidni anjonski radikal

PGDO- Derivati poligalakturonske kiseline (Polygalacturonic acid-derived oligosaccharides)

PGA- Poligalakturonska kiselina (Polygalacturonic acid)

PEC- Čelije peritonealnog eksudata (**P**eritoneal **E**xudate **C**ells)

PBS- Fosfatni pufer (**P**hosphate **B**uffer **S**aline)

RG I- Ramnogalakturonan I

RG II- Ramnogalakturonan II

ROS- Reaktivne vrste kiseonika (**R**eactive **O**xygen **S**pecies)

SCFA- Kratkolančane masne kiseline (**S**hort **C**hain **F**atty **A**cids)

SOD- Superoksid-dismutaza

SD- Standardna devijacija

1. UVOD

1.1. PEKTIN

1.1.1. Istorijat pektina

Termin pektin (izveden iz grčkog pektikos, gust, debeo, zakrčen) se odnosi na strukturno i funkcionalno najsloženiju porodicu polisaharida u prirodi (1). Ova jedinjenja su prisutna u višim biljkama u primarnom ćelijskom zidu i srednjoj lameli. Često su povezana sa drugim jedinjenjima, kao što su celuloza, hemiceluloza i lignin, vršeći strukturnu funkciju.

Veza između ljudi i pektinskih polisaharida ima dugu istoriju pre svega zbog njihove upotrebe u pripremi džemova i želea, kao načina za očuvanje hrane. Pektin se prvi put spominje u jednom Engleskom članku davne 1750. god., vezano za pripremu želea od jabuke (2). Francuski hemičar i farmaceut, Henri Braconnot je 1825. god. izolovao i opisao ovo jedinjenje (3). Proces ekstrakcije tečnog pektina zabeležen je 1908. god. u Nemačkoj a proces se brzo proširio do Sjedinjenih Američkih Država gde je 1913. god. patent dobio Douglas. Pronalazak pektina je predstavljao početak za njegovu naknadnu industrijsku upotrebu. Hermann Herbsthreit je 1930.god. otkrio potencijalnu upotrebu i primenu jabučnog pektina (4).

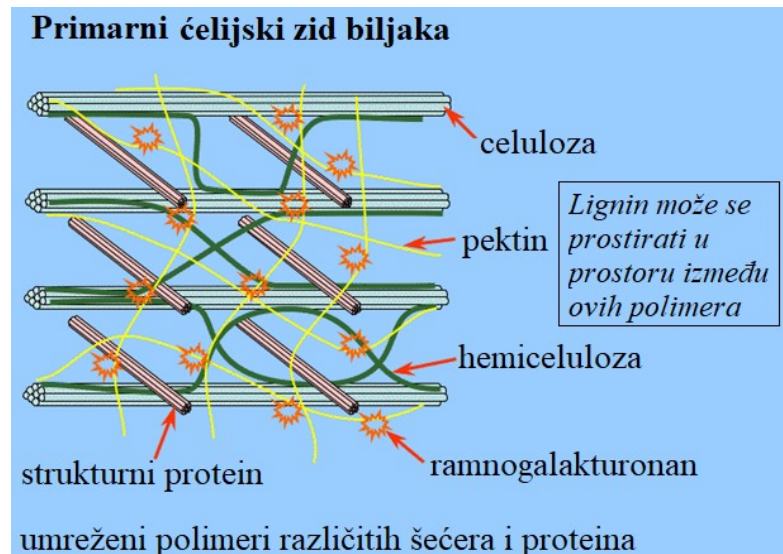
Danas postoji čitava industrija koja je posvećena ekstrakciji i preradi pektina, uglavnom iz kore pomorandže i jabuke, za njegovu upotrebu kao sredstva za želiranje u mnogim prehrambenim proizvodima i za stabilizaciju voćnih sokova, kiselih mlečnih pića i jogurta (5). Pored industrijske primene, u novije vreme brojna istraživanja ukazuju i na njegove značajne zdravstvene benefite.

1.1.2. Biologija pektina

1.1.2.1. Struktura ćelijskog zida biljaka

Za razliku od životinja koje poseduju skeletni sistem, biljke se oslanjaju na ekstracelularni matriks koji se naziva ćelijski zid. On je dinamička struktura biljke, reguliše razvoj i daje podršku biljnoj arhitekturi, mora biti dovoljno krut da izdrži ogromnu težinu, ali i prilagodljiv da omogući transformaciju i ekspanziju biljke tokom različitih faza rasta.

Podeljen je na dve glavne komponente koje se nazivaju "primarni" i "sekundarni" zid (6). Oba zida su pretežno sastavljena od različitih strukturnih polisaharida- celuloze, hemiceluloze i pektina (7) (Slika 1.1).



Slika 1.1. Primarni ćelijski zid biljaka.

Celuloza je nerazgranati i nemodifikovani β -1,4-glukan. Pojedini homopolimeri mogu međusobno reagovati i formirati strukture višeg reda tzv. mikrofibrile i fibrile koje prvenstveno kristališu zbog gustih i za vodu nepropusnih unutarmolekulskih i međumolekulskih vodoničnih veza. Celuloza se sintetiše na plazma membrani iz nukleotidnih šećernih supstrata i komponenta je i primarnog i sekundarnog zida (6,8).

Hemiceluloza se razlikuje u sastavu od celuloze, ali je strukturno slična jer je povezana β -1,4-vezama. Glavne klase hemiceluloze uključuju ksilane, manane i glukane, koji su homopolimeri ksiloze, manoze i glukoze. Postoje i varijacije u strukturi, na primer, glukomanani imaju osnovni lanac sastavljen od nasumično raspoređene glukoze i manoze koje su povezane β -1,4-vezama (7). Ovi strukturni šećeri mogu biti "dekorisani" sa raznim šećerima i acetatnim grupama koje čine ne-kristalnu prirodu ovih polimera. Poput celuloze, hemiceluloza je prisutna u primarnom i sekundarnom zidu. Ona se sintetise u Goldžijevom aparatu iz odgovarajućih nukleotidnih šećernih supstrata (8).

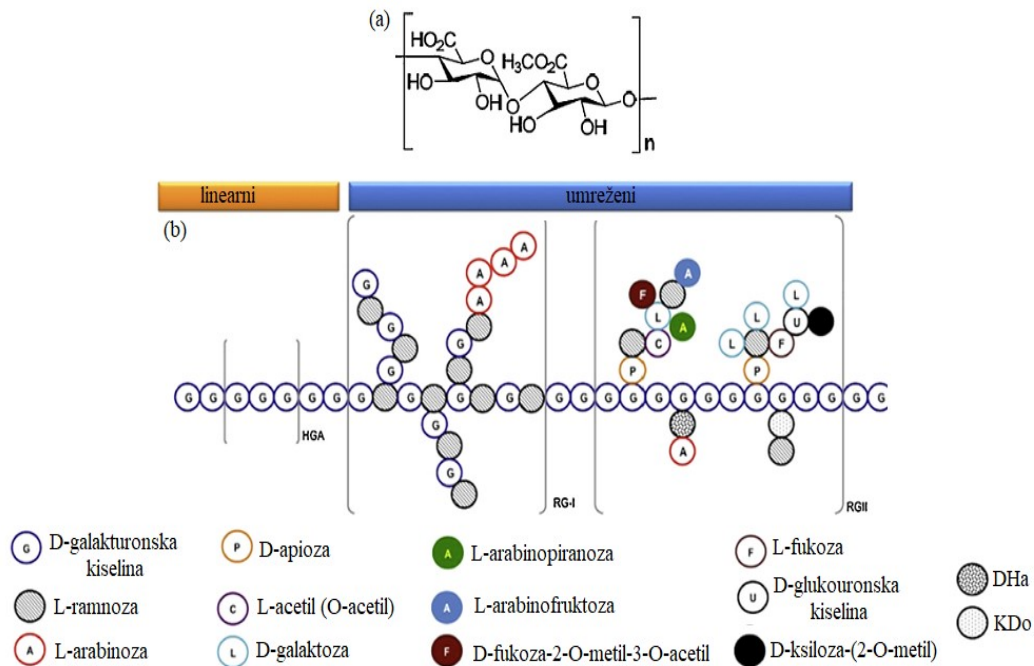
Pektin je važan strukturni polisaharid ćelijskog zida. Uglavnom se nalazi u primarnom ćelijskom zidu i srednjoj lameli kopnenih biljaka gde igra važnu ulogu u ćelijskom rastu, razvoju, morfogenezi, signalizaciji, širenju ćelije, poroznosti zida, doprinosi mehaničkoj čvrstini i odbrambenim mehanizmima biljaka, rastu prašnika, hidrataciji semena i razvoju voća (9). Pored toga, nalazi se u ćelijskim zidovima nekih slatkovodnih i morskih algi (10). On je najsloženiji ugljeni hidrat koji se nalazi u prirodi a zbog raznolikosti stereohemijskih glikozidnih veza koje povezuju razne zajedničke i retke ugljeno-hidrantne podjedinice.

1.1.3. Hemijska struktura pektina

Strukturu pektina je vrlo teško odrediti, ne samo zato što se može promeniti tokom izolacije, skladištenja i obrade, nego i zbog toga što može biti izuzetno heterogena između biljaka i tkiva, pa čak i unutar jednog ćelijskog zida (11).

Uglavnom se sastoji od linearnih lanaca homogalakturonana (HG), ramnogalakturonana I (RG I) i ramnogalakturonana II (RG II) koji variraju po veličini, grananju i funkciji (10, 12). Smatra se da su HG, RG-I i RG-II unutar ćelijskog zida biljke međusobno povezani u mrežu (12) (Slika 1.2).

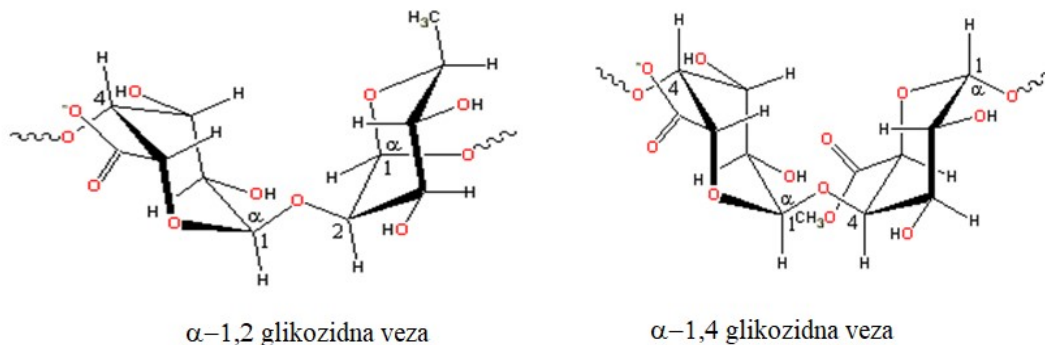
Razjašnjavanje svakog pektinskog domena ostaje težak zadatak jer je "nativna" pektinska struktura poremećena hemijskim i enzimskim tretmanima potrebnim za izolovanje iz primarnog ćelijskog zida.



Slika 1.2. Hemijska struktura pektina- HG, RG I i RG II (Noreen A et al. International Journal of Biological Macromolecules 2017).

Homogalakturonan (HG)

HG čini više od 60% ukupnog pektina i predstavlja njegov osnovni lanac. Najčešće se sastoji od 70-120 molekula galakturonske kiseline (Gal A; takođe se naziva i poligalakturonska kiselina i pektat) koje su povezane u linearni lanac α -1,4 glikozidnim vezama (1,12) (Slika 1.3). Sintetiše se pomoću α -1,4-galakturonoziltransferaza, kao što je GAUT 1 (13). HG može biti esterifikovan bilo metil grupama (na poziciji C6-O) i/ili acetil grupama (na poziciji C2-O ili C3-O) (17). Stepen i obrazac esterifikacije varira od biljnih vrsta odakle je pektin ekstrahovan kao i od stepena sazrevanja voća. Sve ovo ukazuje da je stepen hemijskih modifikacija pektina povezan sa razvojnom i tkivno-specifičnom fitofiziologijom (14). Susjedni regioni HG (> 10 ostataka) koji nemaju ove hemijske modifikacije su sposobni da formiraju Ca^{2+} sone mostove između negativno naelektrisanih uronatnih grupa, formirajući definisanu strukturu višeg reda, koja se naziva "model kutije za jaja" ("egg-box model") (15, 16). Ovaj model doprinosi gustom pakovanju HG u pektinski gel.



Slika 1.3. Glikozidne veze u strukturama pektina.

Ramnogalakturonan I (RG I)

RG-I je jedinstven među pektinskim polisaharidima, jer mu je osnovni lanac sastavljen od ponavljajućih disaharida Gal A i α -L-ramnoze (Rha) [4]- α -D-GalA-(1,2)- α -L-Rha-(1,_n) (Slika 1.2). Predstavlja ~20-30% ukupnog pektina (1, 17). Veza GalA (O4) sa Rha (O2) doprinosi stvaranju trodimenzionalne strukture RG-I u vidu zakrivljene spirale, koja je upečatljivo različita od linearne strukture HG. Slično HG-u, ostaci GalA osnovnog lanca mogu biti hiperacetilovani na poziciji O-2 i O-3, a 25-80% Rha ostataka se grana na O-4 poziciji (10). Grane uključuju linearne ili razgranate obrasce definisanih polisaharida: α 1,5 arabinana i β 1,3 ili β 1,4 galaktana. Bočni lanci RG I opet mogu sadržati dalje grananje na određenim položajima (O-2 i O-3 za arabinane i O-3 i O-6 za galaktane) sa sledećim šećerima: arabinoza, arabinan, galaktan, arabinogalaktan (10, 12, 18). Sekundarne zamene linearnih ili razgranatih polisaharida iz osnovnog lanca GalA-Rha povećavaju njegovu složenost i dovode do široke raznolikosti mogućih struktura RG-I. Zahvaljujući ovim obimnim "dekoracijama", RG-I se obično naziva "dlakavi region" pektina ("hairy-region") (Slika 1.2).

Ramnogalakturonan II (RG II)

Najkomplikovaniji domen pektina je RG-II koji čini ~ 10% (1). Sastoji se od osnovnog lanca HG (~ 7-9 α 1,4-povezanih GalA) i četiri (A-D) dobro definisana bočna lanca (16) (Slika 1.2). Bočni lanci A (oktasaharid) i B (nesaharid) su povezani sa osnovnim lancem HG na O-2 poziciji. Bočni lanci C i D su disaharidi i povezani su sa osnovnim lancem HG na O-3 poziciji. Ova četiri definisana i dobro konzervisana bočna lanca doprinose kompleksnosti RG-II molekula predstavljanjem 12 različitih vrsta monosaharida, uključujući sledeće retke šećere: 2-O-metilksiloza, 2-O-metilfruktoza, acerna kiselina, 2-keto-3-deoksi-D-liksoheptulosarična kiselina (Dha) i 2-keto-3-deoksi-D-mano-oktulozonske kiseline (Kdo) (19, 20). Pored obilja različitih podjedinica ugljenih hidrata, RG-II sadrži 21 različitih veza. I pored ove strukturalne raznovrsnosti (šećera i veza), RG-II je visoko konzervisan između biljnih vrsta. Ove konzervirane osobine strukture RG-II igraju kritičnu funkciju u rastu i razvoju biljaka, jer su manje modifikacije strukture RG-II pokazale skoro fatalne efekte na rast biljaka (20).

1.1.3.1. Modeli pektina

Način na koji su različiti pektinski domeni povezani jedni sa drugima da bi formirali pektinski makromolekul ostaje do danas nejasan. Predložena su II tipa modela pektina: **I model** -pektinski lanac se sastoji od naizmenično raspoređenih HG i RG I domena. **II model** -lanac pektina se sastoji samo od RG I, HG domen je povezan sa njim kao bočni lanac (17). Što se tiče komercijalnog pektina, u sastav je uključen HG i jezgro RG-I.

1.1.4. Svojstva pektina

Većina pektina je razgranta i ima brojna negativna naelektrisanja. Što je više naelektrisanja na pektinskom molekulu, veća je ekspanzija lanca pektinskog polimera. Pektin može reagovati sa pozitivno naelektrisanim polimerima i formirati nerastvorljive komplekse (21).

Glavna svojstva pektina su:

- 1) sadržaj galakturonske kiseline i neutralnih šećera
- 2) stepen esterifikacije (DE “degree of esterification”)
- 3) stepen metilacije (DM “degree of methylation”)
- 4) stepen blokiranja (DB “degree of blockiness”)
- 5) molekulska težina (MW “molecular weight”).

Dva pektina sa istim hemijskim svojstvima se mogu značajno razlikovati po fizičkim svojstvima, što upravo ukazuje da je distribucija metil estara u molekulu pektina mnogo važnija nego ukupan broj estarskih grupa.

Stepen esterifikacije (DE) pektina predstavlja odnos između esterifikovanih ostataka galakturonske kiseline i ukupno prisutne galakturonske kiseline u pektinu. Predstavlja jednu od najvažnijih karakteristika pektina jer on određuje njegovu sposobnost geliranja, stoga i fiziološke osobine. Viši stepen esterifikacije prouzrokuje mnogo brže geliranje u odnosu na pektin sa niskim stepenom esterifikacije. Prema DE, pektini se mogu klasifikovati u dve glavne grupe:

- 1) visoko metilovani pektin (HM -“high methylated”) i
- 2) nisko metilovani pektin (LM -“low methylated”).

U HM pektinu ~60-75% karboksilnih grupa je u vidu metil estara. Ne-esterifikovani GalA ostaci mogu biti slobodni ili u obliku soli sa jonima natrijuma, kalijuma, kalcijuma ili amonijum jona. LM pektin ima ~20-40% metil esterifikovanih grupa. Obično se dobija blago alkalnim ili kiselim tretmanom iz HM pektina (5, 12, 21).

Stepen metilacije (DM) opisuje u kom stepenu karboksilne grupe u pektinima postoje kao metil estri u odnosu na sve esterifikovane grupe (22, 23).

Način da se karakteriše razlika u distribuciji supstituisanih grupa u pektinu, npr. metoksi i amidnih grupa, je uspostavljanje njegovog **stepena blokiranja (DB)**(22, 23).

Stepen polimerizacije pektina je raznolik i **molekulska težina (MW)** je takođe varijabilna što zavisi od njegovog porekla i metode ekstrakcije. Na primer MW pektina

dobijenog iz šećerne repe je od 20.000 do 25.000 daltona (Da), dok je MW pektina iz jabuke, kruške i šljive u rasponu od 25.000 do 35.000 Da, a citrusnog pektina je još veća od 40.000 do 50.000 Da (24).

1.1.5. Izvori pektina i njegova ekstrakcija

1.1.5.1. Izvori pektina u hrani

Voće, kao što su avokado, citrusi (narandža, mandarina i limun) i jabuka, predstavljaju dobre izvore pektina. Povrće -kelj, artičoke, šargarepa, brokoli, bundeva, patlidžan, francuski pasulj ili kupus kao i mahunarke i orasi su takođe uobičajeni komponente redovne ishrane sa visokim sadržajem pektina (25). Nivo pektina u biljkama je različit i npr. za jabuke iznosi 1-1,5%, kajsije 1%, višnje 0,4% , pomorandže 0,5-3,5%, šargarepa 1.4% i kora citrusa 30% (26).

1.1.5.2. Komercijalni izvor pektina

Pektini se koriste u prehrambenoj industriji u cilju obezbeđenja teksture i stabilizacije hrane i zbog svojih gelirajućih sposobnosti. Međutim, malo je biljaka koje se mogu koristiti kao komercijalni izvor pektina. Glavni izvori pektina u prehrambenoj industriji su kaša od jabuke i kora citrusa (27), oba dobijena iz ostatka tokom prerade ovog voća. Kaša od jabuke može sadržati od 10 do 15% pektina (suva baza), dok kora citrusa sadrži od 20 do 30% (26).

Komercijalni pektini imaju raznolik sastav, šablon acilacije, stepen esterifikacije, supstitucije neutralnih šećera, a ova varijabilnost može uticati na optimalno stanje ekstrakcije.

1.1.5.3. Ekstrakcija komercijalnog pektina

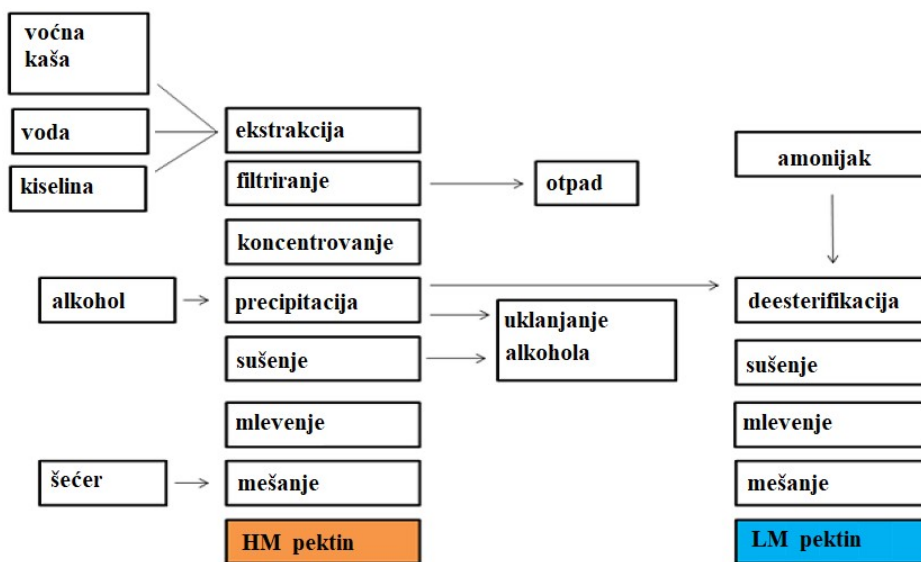
Izbor izvora komercijalnog pektina je diktiran prinosom, vremenom, cenom ekstrakcije, traženim osobinama i kolika je dostupnost svežeg materijala (28-32). Sam

izbor metode ekstrakcije može diktirati i osobine dobijenih pektina, pre svega njihovu molekulsku masu. Tako su studije pokazale da se na sobnim temperaturama dobijaju pektini veće molekulske mase ali u nižem prinosu dok se na temperaturama iznad 80° C ekstrahuju oni manje molekulske mase ali u većem prinosu (33).

Industrijska proizvodnja pektina obično podrazumeva ekstrakciju (obično pri niskom pH i visokoj temperaturi), separaciju (koristeći alkoholnu precipitaciju, filtraciju i/ili centrifugiranje) i modifikaciju ili optimizaciju (podešavanje stepena metilacije, acetilacije, amidacije i grananja) (Slika 1.4).

Najčešće korišćene metode za ekstrakciju pektina su putem direktnog ključanja (“direct boiling”) i ekstrakcija mikrotalasnim grejanjem (“microwave heating extraction”). Procesu ekstrakcije pektina prethodi obrada sirovine u vidu blanširanja, pranja ili sušenja u cilju inaktivacije enzima, litičke pektinaze (razlaže dugačke pektine u manje lance) i pektinske esteraze (modifikuje stepen esterifikacije).

Ekstrakcija mikrotalasnim grejanjem je efikasnija metoda zbog većeg prinosa dobijenog pektina. Najčešći rastvarači koji se koriste su etanol, 0,05 M etilen diamid tetra sirćetna kiselina (EDTA) i 1M natrijum hidroksid. Samo 15 minuta je dovoljno da produkuje istu količinu pektina koja se dobije procesom direktnog ključanja koji traje najmanje 3h (34).



Slika 1.4. Industrijska procedura za proizvodnju pektina (May CD. Carbohydr Polym 1990).

Različite ekstrakcione/proizvođačke metode pektina doprinose nastanku produkata sa različitim reološkim svojstvima i hidratacionim ponašanjem (što odražava korisnost pektina kao aditiva za hranu) (35).

1.1.6. Modifikacija pektina

Proučavanje modifikacije pektina je poslednjih godina od velikog interesa. Veliki broj hidroksilnih i karboksilnih grupa raspoređenih duž osnovne strukture pektina, kao i određena količina neutralnih šećera prisutnih u bočnim nizovima pektina, omogućavaju da se dobije širok spektar derivata. Osobine derivata se mogu značajno razlikovati od osobina samog pektina, te mogu imati i drugačiju primenu i efekte u odnosu na polazni materijal.

Različite metode se koriste za modifikaciju pektina i uključuju: supstituciju (alkilacija, amidacija, kvaternizacija, tiolacija, sulfacija i oksidacija, itd.), elongaciju lanca (unakrsno povezivanje i grafting) i depolimerizaciju (hemijska, fizička i enzimski degradacija). Dobijanjem pektinskih derivata, svojstva kao što su rastvorljivost i hidrofobnost, fizičko-hemijske i biološke karakteristike mogu biti modifikovane i derivat može imati neko drugo funkcionalno svojstvo u odnosu na polazni pektin.

1.1.6.1. Supstitucija

Alkilacija karboksilnih grupa -alkilacija karboksilnih grupa u alkil estarske grupe (-COOR) je uspešno korišćena u cilju povećanja hidrofobnosti pektina (36, 37). Kada se jedan ugljenik alkiluje u karboksilatnu grupu (-COO⁻) to se naziva metoksilacija. U pektinskom lancu C6 GalA je najčešće prirodno metoksilovan a to je jedna od značajnih strukturnih karakteristika pektina. Već je ranije objašnjeno da DM utiče na rastvorljivost, sposobnost formiranja gela, uslove potrebne za gelaciju, temperaturu geliranja i svojstva gela; i da se prema DM pektin klasifikuje na HM i LM pektin (38). HM pektin se koristi u industriji za proizvodnju džemova kao gelirajući agens voćnih proizvoda i za konzerviranje voća. LM pektin se obično koristi u pripremanju gelova sa smanjenim nivoom rastvorenih čvrstih supstanci i od velikog su

interesa zbog njihove niske kalorijske vrednosti. Mnogobrojni postupci metoksilacije su dostupni. Najčešće se koristi metoksilacija pektina sa metanolom u prisustvu sumporne ili hlorovodonične kiseline (39). Alkiliranje više ugljenika nego karboksilatnih grupa takođe poboljšava hidrofobnost pektina (37, 40).

Nasuprot metoksilaciji, **demetoksilacija pektina** je reakcija kojom se uklanjaju metil estri sa esterifikovanih ostataka GalA i konvertuju C6 ugljenik u karboksilnu kiselinu. Demetoksilacija je važna i veoma često korišćena reakcija kojom se modifikuju svojstva pektina vezana za fiziološke procese tokom razvoja biljaka (rast, sazrevanje voća itd.) ili u fizičko-hemijskim tretmanima. Na industrijskom nivou dobijeni pektini su HM, dok se LM pektini obično proizvode iz HM pektina kontrolisanom kiselom demetoksilacijom, alkalnom demetoksilacijom ili demetoksilacionom reakcijom PME. U demetoksilaciji pektina veoma važno pitanje je kakav je obrazac metoksilacije. On utiče na svojstva pektina.

Alkilacija hidroksilnih grupa –acetilacija je najvažnija alkilacija hidroksilnih grupa pektina. Ona ima neke potencijalne aplikacije kao što su upotreba kao stabilizatora i emulgatora. Ovako modifikovani pektin je obećavajući u modifikovanju obrazaca ispuštanja ibuprofena, slabo kiselog leka, kroz GIT, usled redukcije polariteta i rastvorljivosti pektina (41).

Amidacija -najjednostavniji ali najviše korišćeni amidovani pektini su oni koji sadrže primarne amidne grupe $-CO-NH_2$ -. To su važni pektinski derivati komercijalno dostupni u tehnologiji hrane sa dobrim gelirajućim sposobnostima i smanjenom senzitivnošću prema Ca^{2+} jonima i pH. Gelovi od amidovanih pektina su termo-reverzibilni. Njihove odlične gelirajuće sposobnosti im daju mogućnost da se pripreme u vidu hidrogel perli koje se mogu koristiti kao dostavljači specifičnih lekova do kolona- indometacin ili sulfametoksazol; i da se koriste da “zarobe” insulin da bi se oralno administrovao (42, 43).

Kvaternizacija -kvaternizacija je efikasan način za dobijanje novih funkcionalnih karakteristika polisaharida (44). To je metod koji može preokrenuti

jonske hidrokoloide u njihove katjonske derivate. Kvaternizovani pektin (pripremljen reakcijom pektina i CHPTAC -3-hloro-2-hidroksipropiltrimetilamonijum hlorid) ima izvanrednu mogućnost apsorpcije i zadržavanja vlage i naznačeni antimikrobni efekat (45). On se može koristiti u farmaciji, pakovanju, konzerviranju i u kozmetičkoj industriji. Pored pektina, pektin -NH₂ pripremljen modifikovanjem karboksilnih grupa GalA sa etilenamidom, može biti dalje kvaternizovan sa CHPTAC i formirati derivat koji je efikasan DNK nosač i obećavajući ne-virusni nosač za ciljanu gensku dostavu do kancerskih ćelija (46).

Tiolacija -prirodni polisaharidi pripadaju “prvoj generaciji” mukoadhezivnih polimera koji mogu nekovalentno interreagovati sa mukusnim slojem, ali ovo mukoadhezivno svojstvo je slabo (47). Njihova adhezivnost se može poboljšati tiolacijom. Tiomeri su sposobni da formiraju kovalentne disulfidne veze sa subdomenima mukusnog sloja koji su bogati cisteinom (48). Ligandi koji sadrže tiol mogu biti uvedeni u pektinski lanac formiranjem bilo amidnih bilo estarskih veza. Sharma i Ahuja su sintetisali tiolovani pektin koji je pokazao poboljšana mukoadhezivna svojstva, dok to nije uticalo na profil oslobađanja leka (49). Majzoob i saradnici su sintetisali tiolovani pektin koji je pokazao biodegradibilni profil, povećanu adheziju *in vitro*, poboljšana kohezivna svojstva i ne tako ozbiljnu toksičnost u Caco-2 ćelijama (50). Perera i saradnici su takođe modifikovali pektin, dobijen je derivat sa promenjenim bubrenjem i dezintegracionim ponašanjem. Ova modifikacija dozvoljava i unakrsno vezivanje pektina oksidacijom tiolnih grupa što vodi do poboljšane stabilnosti sistema za dostavljanje lekova u gornjim partijama GIT-a i do neprekidnog oslobađanja lekova (51, 52).

Sulfacija -hidroksilne grupe u polimeru su zamenjene sulfatnim grupama. Dobijaju se derivati koji imaju signifikantan efekat na fiziološke funkcije polisaharida kao što su -antikoagulantna, antitrombotska, kontraceptivna, antioksidantna, anti inflamatorna, anti tumorska, antimikrobna i anti HIV aktivnost (53, 54). Za sulfataciju pektina se najčešće koristi sumporna kiselina. Jedna od najznačajnijih karakteristika sulfatnih pektina je njegoa antikoagulantna aktivnost i antitrombotski efekat. Maas i saradnici su naznačili da je zamena karboksilne grupe sa sulfatnom grupom u citrusnom

pektinu povećala antikoagulantni i antitrombotski efekat, bez uticaja na hemoragični efekat (55). Pokazano je da sulfatni pektin ima antikoagulantnu aktivnost koja je upoređena sa heparinom (visoko sulfatni glikozaminoglikan) (56).

Specifična antikoagulantna aktivnost ovih pektina zavisi od vrste biljaka, sastava monosaharida, stepena sulfatacije i njihove molekulske težine (57, 58). Mehanizam antikoagulantne aktivnosti nije još uvek poznat. Cipriani i saradnici su objavili da sulfatni pektin direktno inhibira α trombin i faktor Xa mehanizmom koji je nezavisan od antitrombina (AT) i/ili heparin kofaktora (HC II) koji se razlikuje u odnosu na heparin (58). Maas i saradnici su objavili da sulfatni pektin inhibira trombin mehanizmom zavisnim od AT i HC II kao kod heparina (55). Ovi derivati pokazuju i antimikrobni efekat prema *Bacillus cereus* i *Vibrio fischeri* (56).

Oksidacija -dobijeni derivati se koriste kao podrška u kontrolisanoj dostavi lekova. Mogu se koristiti za imobilizaciju lekova i za formiranje hidrogela sa unakrsnim linkerima (59, 60).

1.1.6.2. Elongacija lanca

Unakrsno vezivanje -pektinski gel se formira kada se deo HG unakrsno poveže i formira trodimenzionalnu mrežu u kojoj su voda i rastvori “zarobljeni” (Ca^{2+} unakrsno vezivanje za LM pektin i hidrofobne interakcije između metil grupa i vodoničnih veza za HM pektin) (61, 62). Hemijsko unakrsno vezivanje pektina sa epihlorhidrinom omogućava pripremu novih hidrofilnih derivata koji su manje rastvorljivi u vodi. Ovi derivati se mogu potencijalno koristiti u formi matriks tableta za specijalnu dostavu lekova do kolona. U kolonu se razgrađuju bakterijskim enzimima što rezultuje ogromnom oslobađanju inkorporiranog leka. Ali epihlorhidrin ima visoku toksičnosti i lako dovodi do neželjenih reakcija (63). Takei i saradnici su razvili gelirajuće hidrogelove unakrsnim vezivanjem perjodat oksidovanog citrusnog pektina. Ovaj hidrogel je korišćen da lokalizuje antikancersku dostavu leka (Doxorubicin) i ima potencijal da prevenira progresiju primarnog kancera oslobođenim Doxorubicinom i metastatskih kancera oslobađanjem oksidovanog pektina (59).

Grafting -sinteza pektinskih graft polimera je jedna od ključnih načina za modifikaciju fizičko-hemijskih svojstava pektina. Ovo se najčešće postiže modifikovanjem pektinskih molekula preko kreiranja grana (graftovi) polimera. Graft kopolimerizacija mnogih monomera na pektin se izvodi različitim metodama a derivati imaju mnogobrojne aplikacije, naročito u dostavljanju lekova (40).

1.1.6.3. Depolimerizacija

Istraživanja depolimerizacije pektina su veoma važna i uvek su bila “vruća” tema iz nekoliko razloga. Prvo, pektin je bezbedan za upotrebu i koristi se dugi niz godina u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji; jedna od najvećih poteškoća za njegovu optimalnu upotrebu je tendencija da se podvrgne dergradaciji uzrokovanoj različitim fizičko-hemijskim tretmanima. Drugo, degradacija pektina do manjih oligosaharida je neophodna za otkrivanje strukture jer je pektinski molekul dugačak i heterogen i veoma je teško analizirati ga tako u celosti (64). I na kraju, depolimerizacija pektina je važan metod za pripremu pektinskih oligosaharida. Oligosaharidi su pokazali mnogobrojne primene, kao što su -repressor lipidne akumulacije u jetri , antioksidativna, inhibitor proliferacije kancerskih ćelija, anti -metastatska, inhibitor angiogeneze, antibakterijska i primena kao prebiotika (65-69).

Hemijska depolimerizacija -se može desiti i spontano kada se pektin zagreva u neutralnim ili slabo kiselim uslovima. Već je napomenuto da je pektin najstabilniji u vodenim rastvorima na pH oko 4.0 (pH 3.5-4.5) (70, 71). Na nižem pH može se desiti uklanjanje metoksi, acetil grupa i neutralnih šećera kao i “cepanje” osnovnog lanca. Pektin se može podvrgnuti kiseloj ili baznoj depolimerizaciji. U kiselim uslovima, pektin sa niskim DM se brže hidrolizuje i reakcija je podstaknuta istovremenom hemijskom demetoksilacijom polimera pod ovakvim uslovima (71). Stepem hidrolize raste sa smanjenjem pH vrednosti, dodavanjem NaCl u sistem ili porastom temperature. U opsegu pH 5-6, HM pektin je stabilan samo na sobnoj temperaturi. Dalje povećanje

temperature ili pH vodi do raskidanja lanaca i veoma brzom gubitku viskoznosti i sposobnosti geliranja. LM pektin pokazuje bolju stabilnost u ovim uslovima.

Fizička (mehanička) degradacija Neki fizički postupci kao ultrasonifikacija, tretman visokom temperaturom, radijacija i fotoliza mogu indukovati degradaciju pektina (40).

Enzimska degradacija -ova degradacija je veoma važna jer dozvoljava regioselektivnu depolimerizaciju pod blagim uslovima. Obzirom na kompleksnu strukturu pektina postoji širok spektar endogenih i egzogenih enzima koji mogu sinergistički modifikovati i degradirati pektin. Trenutno postoje dve različite enzimske klase za koje se zna da razlažu glikozidne veze unutar pektinskih šećera a koje to rade različitim mehanizmima: *polisaharidne liaze (PL)* i *glikozidne hidrolaze (GH)*. Deesterifikacija metil i acetil estara je katalizovana trećom klasom enzima, nazvanih *ugljenohidratne esteraze (CEs)*. Specifične *CEs* pripadaju dvema različitim porodicama- *metilesterazama (CE8)* i *acetilesterazama (CE12)*.

Polisaharidne liaze (PL) fragmentiraju pektinski polimer preko reakcije β -eliminacije rezultujući formiranjem dvostrukih veza između C4 i C5 na novo nastalom ne redukujućem kraju. Mogu biti endo i egzoliazaze i zahtevaju prisustvo Ca^{2+} jona kao katalizatora.

Glikozidne hidrolaze (GH) dele α -1,4 glikozidne veze između dva susedna ostatka GalA u HG lancima putem kisele/bazne potpomognute hidrolize. Endo-hidrolaze hidrolizuju pektin nasumično što uzrokuje brzo smanjenje molarne mase pektina, dok su egzo- hidrolaze ograničene na "cepanje" GalA monomera ili dimera od ne redukujućeg kraja lanca.

Pektinske metilesteraze (PME) katalizuju demetoksilaciju HG na O6 GalA unutar biljnog ćelijskog zida, oslobađajući metanol i protone (i formiraju negativno naelektrisane karboksilne grupe). Demetoksilovani HG može formirati gel ukrštanjem sa dvovalentnim katjonima (Ca^{2+} i Mg^{2+}) i može formirati supstrat za pektinske depolimerizujuće enzime -*glikozidne hidrolaze (GH)* i *polisaharidne liaze (PL)* (72, 73).

Kada pektinska struktura nije degradabilna raspoloživim enzimima, može se primeniti kombinacija hemijskog i enzimskog pristupa. Npr. enzimaska aktivnost endo-hidrolaza se poboljšava nakon uklanjanja acetil grupa i/ili metil estara (40).

1.1.7. Upotreba pektina

Zahvaljujući svojoj strukturnoj složenosti i mogućnosti da im se struktura modifikuje fizičkim i hemijskim putem, pektini poseduju širok spektar fizičko-hemijskih osobina, koje doprinose njihovoj različitoj primeni.

1.1.7.1. Upotreba pektina u industriji

Pektin je veoma važan aditiv za hranu, zahvaljujući svojoj sposobnosti geliranja, zgušnjavanja i stabilizacije hrane. Najviše se primenjuje u prehrambenoj industriji. Zbog gelirajućeg svojstva koristi se u proizvodnji džemova, marmalada, želea, u pripremi voća za jogurte, pića i voćne đus koncentrate, voćne dezerte, mleka i gelirane mlečne proizvode i slatkiše. Koristi se kao stabilizator pulpe u određenim sokovima i kao stabilizator mlečnih proizvoda npr. jogurta. Može uticati na poboljšanje osećaja u ustima. Koristi se kao emulgator ili zgušnjivač u kozmetičkim preparatima-kremama, losionima. A još jedna zanimljiva primena je u industriji peciva kao zamena za masnoću (26, 74, 75).

Druga važna primena pektina je u industriji ulja i gasa. On predstavlja novi prirodni kinetički hidratni inhibitor. Time se može rešiti jedan veliki problem u gasnoj industriji a to je blokiranje hidrata tokom transporta u cevovodu (76).

1.1.7.2. Fiziološki efekti pektina na ljudski organizam

Poslednjih godina, značajan napredak u istraživanju pektina je doveo do razumevanja pektinske strukture i rasvetljavanja odnosa struktura/funkcija pektina na

molekulskom nivou, što je doprinelo mogućnosti dizajniranja pektina sa specifičnim funkcijama.

U ljudskoj ishrani, pektin predstavlja prebiotsko i rastvorljivo dijetetsko vlakno koje je proširilo svoju upotrebu kao nutraceutički sastojak zbog svojih hipoglikemijskih (smanjuje koncentraciju glukoze u krvi, poboljšava insulinski odgovor), hipolipidemijskih (smanjuje koncentraciju serumskog LDL holesterola), imunostimulirajućih i antikancerogenih osobina. Pektini poseduju prebiotske efekte i poboljšavanju funkciju gastrointestinalnog trakta (61, 77-80). Biomaterijali na bazi pektina imaju različite aplikacije u tkivnom inženjstvu, zarastanju rana, transferu gena, dostavljanju lekova i ciljano dejstvo na ćelije raka.

Raznovrsne funkcije prirodnih ili modifikovanih pektina čine ih dobrim kandidatima za hranu budućnosti.

Pektin kao dijetalno vlakno

Pojam **dijetalnog vlakna** uključuje široku grupu dijetalnih jedinjenja biljnog porekla koja su otporna na digestiju ljudskim gastrointestinalnim enzimima. Imaju važnu ulogu za ljudsko zdravlje i blagostanje. Po *Codex Alimentarius-u* dijetalna vlakna su definisana kao “polimeri ugljenih hidrata sa 10 ili više monomernih jedinica, koji se ne hidrolizuju endogenim enzimima u tankom crevu ljudi” (81). Ova definicija je prepoznala jedinstvena hemijska i fizička svojstva dijetalnih vlakana.

Dijetalna vlakna su klasifikovana prema njihovoj hemijskoj strukturi i fiziološkoj aktivnosti. U zavisnosti od njihove rastvorljivosti u vodi klasifikuju se kao nerastvorljiva vlakna (lignin, celuloza i neke hemiceluloze) ili rastvorljiva vlakna (pektin, guma, mucilageni i ostatak hemiceluloze). Od rastvorljivih vlakana, pektini, iz citrusnog voća i povrća, privukli su veliku pažnju poslednjih decenija. Preporučeni unos još uvek nije jasno definisan, a između ostalih faktora zavisi od starosti i porekla potrošača. Smatra se da čovek konzumira u proseku oko 5g pektina dnevno (78).

Pektini kao rastvorljiva vlakna mogu imati fiziološke efekte odmah nakon konzumacije. Kratkoročno, pektin se koristi da prevenira konstipaciju i da stabilizuje

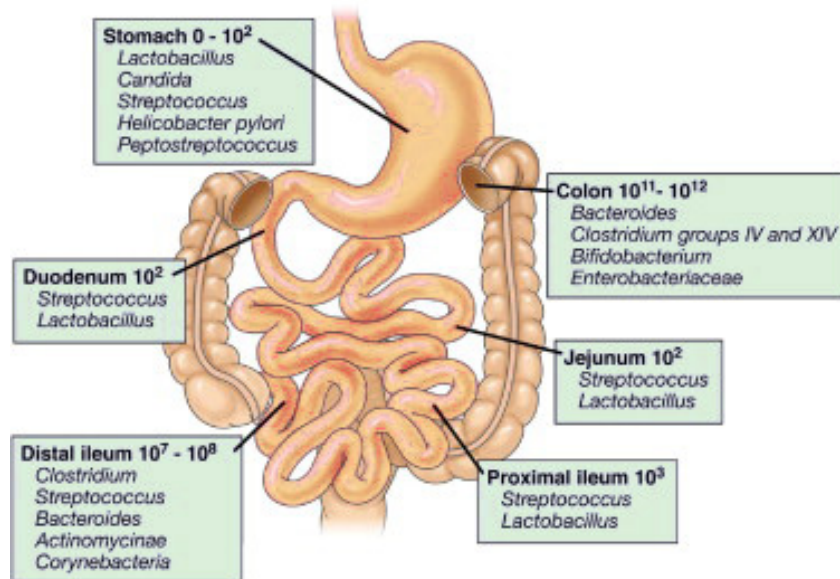
nivo unosa glukoze. Dugoročno, prolongirana konzumacija rastvorljivih dijetalnih vlakana se koristi da poveća glukoznu toleranciju i insulinsku senzitivnost i redukuje serumski nivo holesterola. Način delovanja u GIT-u je delimično objašnjen uticajem na promenu vremena varenja i apsorpcije hranljivih materija kao posledice svojstava kao što su retencija vode, povećanje viskoznosti, geliranje i specifični jonski afinitet. U dodatku, njegova fermentacija u debelom crevu produkuje kratkolančane masne kiseline (SCFA- “Short Chain Fatty Acids”) koje utiču na funkciju ćelija, naročito endokrinog sistema.

Crevna mikrobiota i pektin kao prebiotik

Crevna mikrobiota- delovi gastrointestinalnog trakta imaju veoma bogatu i složenu mikrobiološku zajednicu čije inicijalno uspostavljanje počinje po rođenju i pod uticajem je nekoliko perinatalnih faktora, kao što su način rođenja i navike hranjenja (82). Ova mikrobna kolonizacija creva je neophodna za pravilno sazrevanje imunog sistema i razvoj domaćina (83, 84).

Digestivni trakt čoveka je gusto naseljen mikrobiološkim ekosistemom tj. crevnom mikrobiotom. Gustina mikrobiote je najveća u kolonu, dostiže vrednost od aproksimativno 10^{12} mikrobnih ćelija na gram crevnog sadržaja (85) (Slika 1.5). U kolonu čoveka u Evropskoj populaciji dominantni su filotipovi *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Acinetobacteria* koji predstavljaju više od 90% svih filotipova. Daleko manje su zastupljeni *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Methanobacteriales*, *Cyanobacteria*, *Lentisphaerae* i *Spirochete* (86, 87).

Uprkos visokoj inter-individualnoj varijabilnosti, najnovije studije su identifikovale različite specifične enterotipove ljudskih mikrobiota a praćene su i promene mikrobiota u različitim bolestima (88-90). Aberantna kompozicija crevnih mikrobiota je povezana sa metaboličkim bolestima uključujući gojaznost, dijabetes tip I i II i aterosklerozu, određene kancere i autoimune bolesti (91-93). Smatra se da razlike u raznovrsnosti mikrobiota mogu biti važnije u raznim patološkim stanjima nego promene u specifičnoj bakterijskoj populaciji (94).



Slika 1.5. Šematski prikaz gastrointestinalne mikroflore.

Prebiotska uloga pektina -ishrana predstavlja značajan faktor koji utiče na sastav crevnih mikrobiota. Zahvaljujući tome moguće je da se utiče i/ili menja njihov sastav unetom hranom čiji je hemijski sastav poznat. U ovom procesu ključnu ulogu imaju prebiotici.

Prebiotici se definišu kao „nesvarljivi sastojci hrane koji u nepromenjenom obliku dospevaju u kolon gde imaju pozitivno zdravstveno dejstvo, na taj način što selektivno stimulišu rast i/ili metaboličku aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterijskih vrsta i na taj način poboljšavaju zdravlje domaćina“. Efikasni prebiotici uključuju inulin, fruktooligosaharide, galaktooligosaharide i laktulozu za koje je potvrđeno da povećavaju relativni broj bifidobakterija i laktobacila (95).

Prebiotsko vlakno se niti hidrolizuje niti apsorbuje u gornjim partijama GIT-a, i postaje selektivni supstrat za jednu ili limitirani broj korisnih bakterija kolona, čime menja mikroflore GIT-a (96). Ona predstavljaju glavni izvor energije crevnim mikrobiotama koje ih razlažu do SCFA.

Poslednjih godina je dokazano da ishrana bogata vlaknima ima veoma veliki efekat na sastav crevnih mikrobiota i njihove metabolite (97-99). Tip i količina komponenata hrane koje dospevaju do kolona imaju važan uticaj na mikrobiotsku kompoziciju i aktivnost (100). Upotreba dijetetskih suplementa sa prebiotskim vlaknima je široko istražena, ali uticaj specifičnih hranljivih sastojaka u kontekstu opšte dijetete ostaje uglavnom nepoznat. Izgleda da se različita dijetalna vlakna razlikuju po njihovim efektima na sastav i aktivnost crevnih mikrobiota.

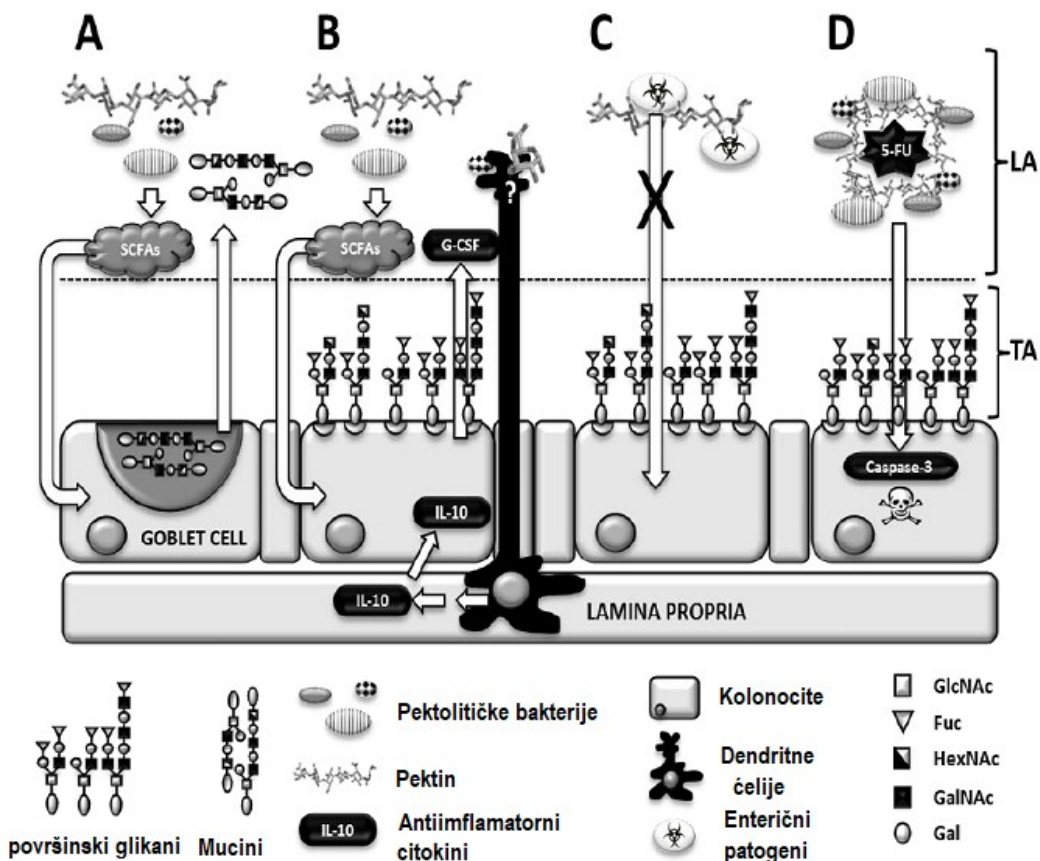
Nerastvorna frakcija dijetalnih vlakana je samo delimično fermentisana, uglavnom doprinoseći povećanju fekalnog opterećenja i smanjenju tranzitnog vremena (101). Enzimi potrebni za degradaciju kompleksnih ugljenih hidrata (pektina) su odsutni u ljudskom genomu ali su prisutni i izraženi u crevnim mikroorganizmima. Kao posledica toga, degradacija i dalja fermentacija pektina je zavisna od raznolikosti mikrobiota digestivnog trakta. Pektinski supstrati zato ne mogu biti razloženi u gornjim partijama digestivnog trakta, oni se samo delimično “obrade”, putem žvakanja i kiselom hidrolizom, do supstrata pristupačnijih za dalju obradu. Potom ovi supstrati dolaze u kolon gde ih metabolišu crevne bakterije kao što su *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Aerobacillus*, *Micrococcus* i *Enterococcus* (102). Navedene bakterije proizvode pektinolitičke i fermentativne enzime sposobne da hidrolizuju pektin do SCFA i ugljen dioksida. Ove enzimske reakcije se odigravaju u anaerobnim uslovima (103). Što se tiče enzima uključenih u metabolizam pektina od strane probiotskih bakterija, raspoložive informacije su nedovoljne za stvaranje kompletne slike. Trenutno se zna da su vanćelijske pektinaze, aldolaze, galakturonaze i esteraze povezane sa degradacijom pektina u laktobacilima i bifidobakterijama (104, 105).

Važno je napomenuti da takođe postoje indirektni efekti između komensalnih bakterija i crevne produkcije mukusa. *Bacteroides thetaiotaomicron* i *Faecalibacterium prausnitzii* utiču na proizvodnju mukusnih glikana tj. mucina iz peharastih ćelija. Acetat, koji je proizveden tokom metabolizma pektina od strane *B. thetaiotaomicron*, koristi *F. prausnitzii* za proizvodnju butirata, nus produkta SCFA za koje je pokazano da moduliraju ekspresiju gena mucina (MUC) u peharastim ćelijama (106-108). Sastav mucina takođe ima uticaj na crevnu mikrobiotu. Kolonociti imaju integralne membranske mucine na svojoj apikalnoj površini, oni stvaraju čvrsti adherentni sterilni sloj, koji je sam obložen labavo adherentnim mucinima koji formiraju gel tj. sluz (109,

110). Lagano adherentni sloj se lako kolonizuje mikrobiotama, a mucini su izvor hrane za mnoge vrste, uključujući *B. thetaiotaomicron*. Tako da pektin iz hrane i njegov metabolizam putem crevnih bakterija može direktno ili indirektno izazvati promene u strukturi zajednice mikrobiota (106).

Kratkolančane masne kiseline (SCFA)- kao najvažniji produkt fermentacije pektina od strane mikrobiota su SCFA. Ove organske kiseline vrše brojne funkcije za domaćina. Predstavljaju ključni izvor energije za intestinalnu mukožu, jetru, mišiće ili druga periferna tkiva. Ali mnogo važnije je da one imaju značajnu ulogu u ćelijskoj funkciji, imunološkom sistemu, lipidnom metabolizmu, motilitetu creva i permeabilnosti, utičući na smanjenje rizika od gastrointestinalnih i kardiovaskularnih bolesti i kancera (100, 111-116). Studije na životinjama pokazuju uticaj koncentrovanih vlakana iz jabuke, koja su bogata pektinom, u povećanju koncentracije propionske, buterne i ukupnih SCFA u fecesu (117, 118). Rezultati nekih studija na životinjama su pokazali da se nakon konzumiranja hrane koja je bogata pektinom, proizvodi acetat kao glavna SCFA (116, 119). Štaviše, utvrđen je uticaj pektina na nivo fekalnih SCFA kod starijih ljudi (120).

Balans između različitih proizvoda fermentacije u velikoj meri zavisi od dostupnih vlakana. Poznato je da vlakna koja se brzo fermentišu proizvode veće količine mlečne kiseline i acetata, dok vlakna koji se fermentišu sporije doprinose većoj proizvodnji buterne kiseline kao krajnjeg fermentacionog proizvoda (121). Buterna kiselina (butirat) ima pozitivne efekte na zdravlje intestinalne mukoze. Ona predstavlja izvor energije za kolonocite, obezbeđuje motilitet creva, sprečava invaziju mukoze enteropatogenima. Butirat takođe smanjuje inflamaciju, redukuje apoptozu i inhibiše tumorski ćelijski rast. Povećana produkcija SCFA smanjuje pH creva, time se podstiče fermentacija u kolonu, smanjuje apsorpcija karcinogena i smanjuje rizik od kolorektalnog karcinoma. Postoje izveštaji da butirat može indukovati remisiju u mišjim modelima UC tako što redukuje inflamaciju (122). Na slici 1.6 su šematski prikazani korisni efekti pektina na intestinalno zdravlje.



Slika 1.6. Korisni efekti pektina na intestinalno zdravlje (Abbott DW, Farnell B, Yamashita JW. Pectin: Structure, Modification and the Human distal Gut Microbiota 2014.)

Da zaključimo, bilo kakva kvantitativna ili kvalitativna promena u kolonu, bilo da se odnosi na mikroorganizme ili dostupne ugljene hidrate, može uticati na produkciju završnih produkata mikrobnog metabolizma i samim tim i na zdravlje. U tom kontekstu korisni efekti pektina u ljudskom organizmu bi bili rezultat specifične akcije SCFA koje su proizvedene mikrobnom fermentacijom ovih supstrata, kao i od sposobnosti ovih jedinjenja da modifikuju crevne mikrobiote.

Imunomodulacija

Pektinski polisaharidi pokazuju širok spektar imunomodulatornih aktivnosti koji su posredovani strukturom osnovnog lanca i razgranatih regiona. Prirodni pektini u ćelijskom zidu biljaka imaju potencijal da stimulišu i suprimiraju imuni sistem. Utvrđeno je da pektinski makromolekuli sadrže fragmente koji mogu sniziti ili povećati aktivnost leukocita. Biotransformacija pektinskih makromolekula prolaskom kroz digestivni trakt može uticati na dejstvo pektina na imunološku reaktivnost (123).

Pektini imaju zaštitni, antiinflamatorni efekat kod inflamatornih bolesti creva (IBD); međutim tačni mehanizmi ostaju nepoznati. Koristeći IL-10^{-/-} miševе (mišiji model za IBD) tretman pektinom je doprineo smanjenoj ekspresiji proinflamatornog TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) i smanjenoj aktivnosti GATA-3 transkripcionog faktora koji je značajan u Th₂ imunološkom odgovoru (124). Pokazano je da pektin smanjuje inflamatorni odgovor kolona, moderiranjem proizvodnje potencijalno štetnih proinflamatornih citokina i imunoglobulina, kao što je dozno zavisna inhibicija proinflamatornog citokina IL- β i povećana sekrecija antiinflamatornih citokina IL-1ra i IL-10 (125). Sugerisano je da bočni lanci koji sadrže β -D-(1,4)-galaktan, u fragmentima pektinskog polisaharida imaju važnu imunomodulatornu ulogu u imunokompetentnim ćelijama Peyerovih ploča i u makrofagima (126).

Sa druge strane, iako su specifični hranljivi sastojci važni za razvoj i funkciju imunog sistema, manje je poznato o potencijalu dijetalnih vlakana da utiču na imunološku funkciju. Studije sugerišu da se konzumiranjem dijetalnih vlakana smanjuje incidenca bakterijske translokacije preko crevne barijere i da ova hrana moduliše imunitet (127). Mehanizam efekata rastvorljivih vlakana na imunološku funkciju u crevima još uvek nije utvrđen.

Detoksikacija

Konzumacija pektina može imati potencijalnu ulogu u detoksikaciji štetnih hemikalija, toksina i metala u telu čoveka. Ova svojstva čine pektin i pektinske oligosaharide (POS) atraktivnom opcijom za lečenje trovanja teškim metalima i

izlaganju bakterijskim toksinima putem smanjenja inflamacije. U helatnoj terapiji, teški metali se uklanjaju iz tela korišćenjem intravenskih hemijskih helatora, sa mnogobrojnim neželjenim efektima. Pektin ne može ući u krvni sud zbog svoje veličine; međutim, za razliku od toga deli se na frakcije manje molekulske mase koje omogućavaju apsorpciju i helaciju. On može biti koristan za kontinuiranu detoksikaciju bez neželjenih efekata kao što je iznošenje esencijalnih nutrijenata iz tela (128). Pektin je takođe od interesa u istraživanju kancera, uzimajući u obzir njegovu uključenost u detoksikaciji karcinogena (za toksine proizvedene od strane ljudskog tela koja su rezultat poremećaja metabolizma, kod izloženosti toksinima iz životne sredine, hrane i vodenih tokova) (129). Čelija ili tkivo koji su izloženi toksinima mogu proizvesti slobodne radikale, koji vremenom oštećuju funkciju organa i održavanje DNK-a.

Bezbednost hrane i enterični patogeni

Konzumiranje hrane kontaminirane patogenim bakterijama i/ili njihovim toksinima je vitalna briga za javno zdravlje. Poseban problem predstavlja činjenica da raste broj mikroorganizama rezistentnih na antibiotike. Povećanje broja sojeva enterobakterija rezistentnih na antibiotike kao i učestale pojave infekcija gastrointestinalnog trakta upućuju na stalnu potrebu istraživanja novih metoda za borbu protiv istih.

Antiinfektivna svojstva pektina su uglavnom povezana sa poboljšanjem kompozicije crevnih mikrobiota u kolonu, inhibicijom adhezije patogena na epitelne ćelije, inhibiranjem bakterijske kolonizacije i vezivanjem bakterijskih toksina (123).

U studiji Wu M i saradnika (130) oligogalakturonidi iz citrusa su pokazali antibakterijsku aktivnost i baktericidni efekat protiv selektovanih patogena hrane uključujući *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*. Stoga oni imaju potencijal da se dalje razvijaju kao antibakterijski agensi.

Pokazano je da pektin štiti tkiva domaćina od adherencije enteričnih patogena. U nediferentovanim i diferentovanim Caco-2 ćelijama kolona čoveka (heterogene epitelijalne ćelije kolorektalnog adenokarcinoma), POS inhibiraju invaziju patogenog

Campylobacter jejuni (131). Tokom infekcije, patogene bakterije se obično adhezinama vezuju za površinske glikane na ćelijama domaćinima (132). Ovi glikani su uglavnom oligosaharidi, povezani sa membranom domaćina preko proteina ili lipida formirajući glikoproteine/glikolipide. Pretpostavlja se da slobodni oligosaharidi sprečavaju vezivanje bakterija za površine epitelijalnih ćelija takmičenjem za vezujuća mesta unutar bakterijskih adhezina (133).

Do danas je upotreba slobodnih oligosaharida, kao što su POS, u cilju inhibicije bakterijske adherencije bila uspešna za brojne patogene, uključujući *H. pylori*, *E. coli* i *C. jejuni* (132, 134). Studija Douđa i saradnika (135) je pokazala da pektin ima baktericidnu aktivnost protiv *H. pylori* sa najvećim efektom kada je pH manji od 5. Delujući kao mimični receptor, dijetetski polisaharidi (npr. pektin/POS) mogu sprečiti nekoliko zaraznih bakterijskih bolesti (136). Dijetalni pektin i POS imaju dodatne funkcije vezane za bezbednost hrane, jer su pokazali da štite ćelije kolona od bakterijskih toksina kao što je *Shiga-like* toksin iz *Escherichia-e coli* O157: H7 (137).

Pektinski derivati, pripremljeni hemijskom modifikacijom polisaharida sa prirodnim masnim kiselinama su obećavajući i efektivni antimikrobni agensi protiv dva najčešća patogena hrane, *E.coli* i *S. aureus*, što može naći dalju primenu u polju pakovanja hrane (138).

Hipoholesteremijski efekat

U mnogobrojnim studijama na životinjama i nešto manje na ljudima, pokazano je da pektin kao rastvorljivo vlakno snižava ukupni i LDL holesterol. Nasuprot tome, nerastvorljiva vlakna pšenice i celuloza nemaju taj efekat. Vodi se diskusija o stepenu redukcije holesterola koje je uzrokovano rastvorljivim vlaknima. Opseg efekata na ukupni holesterol varira. Varijacije nivoa holestrola nakon konzumiranja vlakana su posledica kao prvo ispitivanja na malim uzorcima, potom različitom doziranju vlakana, različitoj osnovnoj dijeti, istovremenoj promeni u telesnoj težini, različitoj kontroli ishrane, različitim tipovima subjekata, a takođe je moguće da određena vlakna manje efektivno redukuju holesterol u odnosu na druga (139).

Neke studije su sugerisale da su korisni efekti pektina usko povezani sa njegovim strukturnim karakteristikama. Briggs i saradnici (140) su sugerisali da je pektin sa manje metoksi grupa i sa manjom molekulskom težinom (<10000 kDa) efektivniji za prevenciju kancerskih metastaza, dok je pektin sa više metoksi grupa bolji u smanjivanju nivoa holesterola. Korelacione studije odnosa struktura-funkcija ukazuju da se veća inhibitorna aktivnost može postići sa pektinima koji imaju veći sadržaj metoksi grupa, nižim sadržajem neutralnih šećera i nižom proporcijom pektina sa malom molekularnom težinom. Pektin sa visokim sadržajem neutralnih šećera ne redukuje nivo holesterola (141).

Potencijalni mehanizmi za snižavanje lipida - u literaturi je opisano nekoliko potencijalnih mehanizama snižavanja holesterola od strane pektina. Poreklo i fizičko-hemijska svojstva pektina, uključujući molekularnu težinu, stepen metilacije i viskoznost utiču na efikasnost ovih mehanizama (139, 142). Poznato je da je pektin sa većim stepenom hidrofobnih supstitucija manje solubilan i smatra se da je efektivniji u snižavanju nivoa holesterola u krvi.

Opisani su sledeći potencijalni mehanizmi:

- 1) Povećanje viskoznosti u intestinalnom traktu tj. formiranje viskoznog gela vodi ka redukovanoj apsorpciji holesterola iz žuči ili hrane (142).
- 2) Pektin inhibira apsorpciju holesterola i njegovo preuzimanje, utičući na formiranje micela i na tranzitno vreme (143).
- 3) U debelom crevu pektin se kompletno fermentiše do SCFA, gde je acetat predominantna kiselina. Acetat je ujedno i holesterolski prekursor, dok je propionat inhibitor hepatične holesterolske sinteze. Ovo ukazuje da pektin indukuje promene u acetat/propionat odnosu što signifikantno utiče na pektinski efekat u snižavanju holesterola (144).
- 4) Prepoznato je da pektin redukuje i nivo glukoze u krvi nakon obroka, što vodi ka smanjenju nivoa insulina i vodi ka smanjenoj aktivnosti HMG – CoA reduktaze (145).

Evropski Panel o dijetetskim proizvodima, nutriciji i alergijama je zaključio da konzumacija oko 6g pektina dnevno doprinosi održavanju normalnog nivoa holesterola (146).

Hipoglikemijski efekat

Pektini mogu redukovati nivo šećera u krvi, što je dokazano u mnogobrojnim studijama do sada (147, 148). Iako mehanizam ovog efekta nije poznat, postoje dokazi da nekoliko faktora može uticati na glikemijski indeks nakon oralnog opterećenja glukozom, kao npr. brzina gastričnog pražnjenja, stopa intestinalne apsorpcije, hormonalni gastrointestinalni odgovor, hepatični glukozni balans i ćelijski metabolizam glukoze.

Ispitivani su efekti različitih pektina (HM ili LM) na intestinalnu apsorpciju glukoze kod miševa. Pronađeno je da HM i LM pektini imaju uticaja na smanjenje nivoa glukoze (149). Efekat HM pektina (56%) je bio veći od LM (18%), verovatno zbog veće viskoznosti u poređenju sa LM. Glavni efekat dodavanja rastvorljivih vlakana ishrani je smanjenje postprandijalne hiperglikemije. Međutim, neke ranije studije su pokazale da dijetalna vlakna nemaju efekat na apsorpciju glukoze (150). Forester i Hoos su zapazili da ni pektin ni celuloza ne utiču na jejunalnu apsorpciju glukoze, ali da pektin smanjuje serumsku glukozu u odgovoru na oralno opterećenje. Tako da su efekti rastvorljivih vlakana na intestinalnu apsorpciju glukoze kontraverzni. Postoje mnogobrojni kontradiktorni podaci koji mogu rezultirati iz razlika u vrsti vlakana (fizičko-hemijska svojstva), eksperimentalnom periodu i tehnici, nivoima rastvorljivih vlakana i glukoze i proučavane vrste (149).

Antioksidativna uloga

Razvoj mnogih bolesti kod ljudi je udružen sa lipidnom peroksidacijom uzrokovanom slobodnim radikalima, što predstavlja mehanizam destrukcije ćelijske membrane. Indukcija lipidne peroksidacije se dešava tokom inflamatornog procesa, intoksikacije, kardiovaskularnih poremećaja, kancera, alergijskih reakcija i mnogih

drugih bolesti. Zaštita ćelija i tkiva protiv agresivnih efekata slobodnih radikala je obezbeđena endogenim antioksidativnim sistemom. Štaviše, endogeni antioksidansi ne mogu uvek prevenirati razvoj oksidativnog stresa. Iz ovog razloga, od interesa je da se pronađu neke egzogene supstance sa antioksidativnim svojstvima koje bi mogle da se koriste kao lekovi za profilaksu ili terapiju bolesti koje su udružene sa povećanim oksidativnim reakcijama slobodnim radikalima (151).

Antioksidansi su supstance koje se koriste u cilju prevazilaženja efekata slobodnih radikala na ljudsko zdravlje i poboljšanja kvaliteta hrane. Njihova efikasnost se ogleda u njihovoj sposobnosti da vezuju slobodne radikale i tako sprečavaju njihovu destruktivnu oksidativnu aktivnost. Postoje prirodni i sintetisani antioksidansi, prirodni su bezbedniji. Funkcija prirodnih antioksidanasa i dijetalnih vlakana u hrani je pridobila mnogo pažnje. Voće, povrće, zrnevlje i biljke su neki od izvora prirodnih antioksidanasa. Imaju značajnu ulogu u ljudskoj ishrani, obezbeđujući protekciju protiv ćelijskog oštećenja uzrokovano izlaganjem visokim nivoima slobodnih radikala, a takođe pomažu i digestiju. Tokoferoli, flavonoidi i fenolna kiselina su najvažnije grupe prirodnih antioksidanasa i mogu biti pronađeni u mikroorganizmima i biljkama.

Pokazano je da pektin ima sposobnost da inhibira slobodne radikale. Studije su sugerisale da su korisni efekti pektina blisko povezani sa njegovim strukturalnim karakteristikama. Sirov pektinazni hidrolizat dobijen pektinaznim "cepanjem" pokazuje signifikantnu antioksidativnu aktivnost u serumu hiperlipemičnih miševa (152). Ovo je interesantno polje za istraživanje sa potencijalnim aplikacijama u produkciji antioksidativnih pektinskih oligosaharida.

Apoptoza i antitumorski efekat pektina

Terapija kancera je usmerena ili na primarni tumor ili metastatske ćelije. Zbog razlike u odgovoru primarnih i metastatskih kancera, većina terapije nije usmerena na oba tipa. Pektin je sastojak koji se čini da je u mogućnosti da inhibira i primarni rast tumora i metastaze, u više tipova kancera kod životinja. Iako su inicijalno prepoznati kao sastojci koji mogu inhibirati metastatske lezije, skorije je pokazano da pektini mogu redukovati i rast primarnog tumora (153).

Studije sugerišu da se pektinski fragmenti male molekulske težine, bogati galaktanima, mogu vezati za domene prepoznavanja ugljenih hidrata ("carbohydrate recognition domain "CRD) na pro- metastatskom proteinu Gal 3 (galektin 3). Galektini olakšavaju ćelija-ćelija interakciju vezivanjem za molekule koji sadrže Gal na susednim kancerskim ćelijama. Kod ljudi iznos galektina raste sa progresijom kancera u želucu, kolonu i štitnoj žlezdi. Blokiranjem Gal 3 ekspresije u visoko malignom tumoru dojke, papilarnom i karcinomu ćelija jezika, dolazi do reverzije transformisanog fenotipa i supresije rasta tumora u eksperimentalnim miševima. Pokazano je da pH modifikovani citrusni pektin blokira vezivanje galektina i time inhibira ćelija-ćelija tumorsku interakciju. Potencijalni uticaj blokiranja galektinske akcije uključuje inhibiciju agregacije ćelija kancera, međusobno i sa zdravim ćelijama, i time se inhibiraju metastatske lezije (154).

Dalje, prijavljen je proapoptotski efekat modifikovanog citrusnog pektina u kombinaciji sa citotoksičnim lekovima (kao što su cisplatin, staurosporin, etoposid, bortezomib, dexametazon, doxorubicin) na apoptozu i ćelijsku proliferaciju različitih tipova kancerskih ćelija. Jedan primer je sinteza nanočestica pektina za dostavljanje antineoplastičnog leka, gde su farmakokinetičke studije na zdravim miševima potvrdile da je lek posedovao mnogo duži poluzivot nego slobodan lek u cirkulaciji. Studije sa Gal 3 u ovim nanočesticama su u toku.

Inkapsulacija pektinom

Pektin se sve više istražuje u biotehnoškom sektoru kao inkapsulaciono sredstvo za isporuku brojnih biološki aktivnih jedinjenja u intestinalni trakt, obzirom na nisku toksičnost, biokompatibilnost, biorazgradljivost i sposobnost formiranja gela (155). Bioaktivna supstanca (Tabela 1.2) koja je inkapsulirana pektinom, zaobilazi degradaciju tokom prolaza kroz gornje partije digestivnog trakta, tj. početnu fazu varenja. Pektin je kiseo šećer a ovo fizičko-hemijsko svojstvo mu obezbeđuje smanjenu rastvorljivost u okviru niskih pH vrednosti želuca. Osim toga, njegova "odmazda" ljudskim digestivnim enzima sprečava njegovu modifikaciju i apsorpciju unutar gornjih partija digestivnog trakta. Nakon tranzita do debelog creva, pektinske kapsule se lako

uklanjaju od strane pektinolitičkih članova crevnih mikrobiota. Inkapsulacija pektinom stoga štiti bioaktivne supstance, produžava apsorpciju inkapsuliranih bioaktivnih komponenti i pruža ciljanu isporuku lekova u kolon zavisno od katalisanog oslobađanja od strane crevnih mikrobiota (156).

Bioaktivna suspstanca se može inkapsulirati pektinskim polisaharidima putem raznih hemijskih, fizičkih i fizičko-hemijskih metoda. Opisane bioaktivne supstance uključuju lipide, enzime, esencijalne hranljive materije, peptide i druge lipofilne materijale (157, 158) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Bioaktivne supstance koje se mogu dostaviti do kolona putem inkapsulacije pektinom (Abbott DW, Farnell B, Yamashita JW. Pectin: Structure, Modification and the Human distal Gut Microbiota 2014).

Crevni poremećaji	Bioaktivne supstance
IBD (<i>Inflammatory bowel disease</i>)	Sulfasalazin, olsalazin, mesalazin, fludrokortizon, budesonid
Rak debelog creva	5-fluorouracil (5-FU), doksorubicin, metotreksat
Imunomodulatori	Peptidni lekovi isporučeni limfnim tkivima (hormoni rasta, insulin, interleukini, interferoni i eritropoetini)
Metabolički poremećaji	Lipofilni vitamini, žučne soli i neki steroidi
Žive ćelije	Humani PIC, humani FLSC, humane krvne ćelije pupčane vrpce, humano paratiroidno tkivo, humane ćelije eritroleukemije, humane genetski modifikovane ćelija bubrega, i različite komensalne bakterije

Inkapsulacija živih bakterija omogućava isporuku živih komensala, koji su dokazano uspešni u lečenju bubrežne insuficijencije, kardiovaskularnih bolesti i bolesti kolona (157, 159, 160). Soli cink-pektina su pokazale prednost u odnosu na soli kalcijum-

pektina u isporuci bioaktivnih supstanci do debelog creva, u efikasnosti inkapsulacije i zadržavanja supstrata kada se koriste kao formulisane pektinatne perlice (161, 162).

Inkapsulacija lekova pektinom omogućava njihovu ciljanu isporuku u kolon čime se može poboljšati sadašnji tretman u bolestima kolona kao što su iritabilni kolon, ulcerozni colitis, Kronova bolest i rak debelog creva. Obezbeđivanje veće koncentracije lekova na mestima oboljenja može povećati efikasnost leka i minimizirati sistemske neželjene efekte na ne-ciljnim područjima.

Pektini kao nosači oralnih lekova

Jedna od značajnih, novijih primena pektina je kao potencijalnih nosača oralnih lekova. Oralni unos lekova je bezbedniji i komforniji za pacijente, pri čemu pacijenti lakše prihvataju takvu vrstu terapije. Uprkos brojnim prednostima oralnog unosa leka, postoji veliki broj ograničavajućih faktora koji se odnose na nestabilnost ili smanjenu permeabilnost leka u kiselim uslovima u želucu, što uzrokuje smanjenu efikasnost leka/terapije (163, 164).

Postoji trend u svetu da se sve više koriste specifični sistemi za otpuštanje lekova na ciljanom mestu (nosači lekova). Oni imaju značajne biofarmaceutske i farmakokinetičke prednosti u odnosu na konvencionalne sisteme, koje se odnose na smanjenje efikasne doze, zaštitu leka od degradacije, poboljšanje bio-dostupnosti, smanjenje negativnih efekata, kao i optimizaciju farmakoloških efekata leka (165, 166).

Da bi se dizajnirao nosač lekova čije je ciljno mesto kolon ("kolonični sistem") ključni element koji čini taj nosač je da on bude osetljiv na fiziološke promene tako što će zaštititi lek od preranog otpuštanja i/ili razlaganja u gornjim partijama GIT-a, otpuštajući lek u proksimalnom kolonu. Kolon predstavlja bolju sredinu od gornjih partija GIT-a, sa vrednosti pH koja je bliska neutralnoj vrednosti, smanjenom proteolitičkom aktivnosti i dužim vremenom tranzita (166-168).

Za ovu svrhu, brojni pristupi su pokušani i "eksploatacija" enzimske aktivnosti mikrobiota kolona kao pokretačkog faktora koji će aktivirati otpuštanje leka predstavlja

pouzdaniju strategiju jer mikroorganizmi kolona pokazuju neznatnu interindividualnu varijabilnost u odnosu na vreme tranzita i vrednosti pH (166, 168).

Pektin kao prirodni polisaharid, našao je široku primenu kao nosač lekova u farmaceutskoj industriji, posebno kao deo sistema kojima je ciljno mesto kolon, zahvaljujući tome što podleže specifičnoj enzimskoj razgradnji u kolonu od strane mikrobiota kolona; dok je otporan na amilaznu i proteaznu digestiju u gornjim delovima GIT-a. Međutim, uprkos otpornosti na proteaze i amilaze, pektin u kiseloj sredini ostaje u formi makromolekulskih agregata, i veliki izazov za održavanje njegovih osobina u takvim sistemima leži u njegovoj visokoj hidrofilnosti, što u nekim slučajevima rezultira u neželjenom, preranom otpuštanju leka u gornjim delovima GIT-a (166, 168, 169).

Za ovu svrhu, mešanje pektina sa drugim polisaharidima i hemijske reakcije umrežavanja su ključne modifikacije kojima se mogu menjati fizičko-hemijske i mehaničke osobine pektina (166, 169-171). Istraživanja su pokazala da mešanje pektina sa retrogradnim skrobom (otporni skrob) rezultuje u nastajanju filmova koji imaju odgovarajuće mehaničke osobine i smanjenu rastvorljivost u kiseloj sredini, a takođe pokazana je i otpornost na pankreasnu enzimsku digestiju. Pored zaštitne funkcije koje ovi filmovi obezbeđuju lekovima u čvrstoj formi (kao što su tablete, kapsule, mikročestice); oni se ujedno ponašaju i kao fizička barijera koja kontroliše brzinu difuzije leka, što vodi ka dizajniranju naprednijih sistema pomoću kojih je moguće kontrolisati brzinu otpuštanja leka i/ili usmeravanje leka ka specifičnom organu ili tkivu, shodno specifičnim terapijskim potrebama (172).

Takođe, pokazano je da mešavina pektina i retrogradnog skroba (u odnosu 1:1) upotrebljena za pripremu tableta natrijum-diklofenaka, znatno smanjuje brzinu otpuštanja leka u kiseloj sredini i to za oko 50% u poređenju sa tabletama koje su pripremljene samo sa retrogradnim skrobom, što ukazuje na sposobnost pektina da kontroliše brzinu otpuštanja leka upravo zahvaljujući tome što pektin gradi gust gel omotač koji ograničava difuziju leka u rastvorni medijum (173).

Umrežavanje mešavine polimera pektin-visoko amilazni skrob (u odnosu 1:1) sa natrijum-trimetrafosfatom doprinosi smanjivanju hidrofilnosti pektina, što je jedan od njegovih glavnih nedostataka kod takvih sistema, jer usled njegove rastvorljivosti u vodi

može doći do preranog otpuštanja leka u gornjem delu GIT-a, a ciljano je bilo da lek stigne do kolona (174).

Zahvaljujući svojoj mukoadhezivnosti, pektin predstavlja obećavajući polisaharid za nosače lekova koji imaju bioadhezivne osobine (175-177).

Primena pektina u regenerativnoj medicini

Regenerativna medicina, uključujući tkivno inženjerstvo, je interdisciplinarno polje gde se primenjuju principi inženjerstva i nauke o živim organizmima sa ciljem razvoja bioloških supstituenata koji su u stanju da oporave, zamene ili poboljšaju ćelije, tkiva ili organske funkcije, oštećene različitim uzrocima kao što su trauma, kongenitalni defekti ili starenje (178). U regenerativnoj medicini materijali koji se koriste kao nosači ili podrška se kombinuju sa odgovarajućim ćelijama i bioaktivnim molekulima. Ukratko, nosači se koriste kao privremena podrška za rast i diktiranje pravca rasta ćelija u cilju formiranja nove, željene vrste tkiva. Zahvaljujući svojoj velikoj sličnosti sa ekstraceluralnim matriksom prirodni polimeri kao nosači su jedna od najprivlačnijih vrsta materijala.

Pektin pronalazi svoju primenu kao odličan biomaterijal i njegova primena u biomedicini je danas predmet rastućeg interesovanja. Najčešće primenjivane metode modifikacije radi dobijanja bioaktivnih pektina su enzimska degradacija, parcijalna oksidacija i RGD funkcionalizacija.

Pektin se upotrebljava u vidu hidrogelova i pektinskih mikrosfera. Hidrogelovi su materijali koji najviše obećavaju u oblasti razvoja odgovarajućih 3D nosača. Zahvaljujući specijalnom gel-mehanizmu, LM pektini su predloženi kao osnova za pripremu hidrogelova za transport lekova, transport gena i kao implantibilni materijali u hirurgiji sa minimalnom invazijom tkiva. Jedan od najvećih izazova u tehnologiji hidrogelova je razvoj ubrizgavajućih hidrogelova čija se prednost ogleda u visokoj prilagodljivosti različitim oblicima defekta i visokom kapacitetu za laku i efektivnu inkapsulaciju ćelija i/ili lekova (179-181).

Profesor Moreira (182) se bavio proučavanjem reoloških i biokompatibilnih svojstava hidrogelova sa osnovom pektina. Pektin-kalcijum karbonatni gelovi su napravljeni finim podešavanjem sadržaja NaHCO_3 i CaCO_3 u cilju održavanja pH vrednosti gela (time je posredno kontrolisana kinetika reakcije) i dobijanja homogenih materijala. Na taj način je postignuta i pH vrednost koja omogućava održivost ćelija. Eksperimentalni rezultati su ukazali da se jeftinim i jednostavnim metodama mogu dobiti traženi citokompatibilni materijali. U drugoj seriji eksperimenata profesora Munarina (183) ispitivane su procesi ubrizgavanja hidrogelova nastalih u prisustvu CaCO_3 . Analizatorom teksture ispitivani su uzorci ubrizgani sa različitom veličinom igle. Rezultati su pokazali da ovi pektin gelovi imaju mehaničke osobine slične mekim tkivima tj. da se 99 % imobilizovanih ćelija nakon ubrizgavanja održalo i homogeno rasejalo u hidrogelu.

Pored primene u regeneraciji tkiva, pektinske mikrosfere se koriste i za imobilizaciju lekova, proteina, faktora rasta, kao matične ili ćelije prekursora (moguće autologno) koje mogu da proizvode proteine ili faktore rasta kada se jednom ubrizgaju i oslobode na patološko ili mesto defekta (184-186). Kalcijum fosfat/pektin mikrosfere su posebno interesantne sa stanovišta regeneracije koštanog tkiva najviše zahvaljujući osobini da formiraju hibridne sisteme koji se sastoje od unutrašnjeg polisaharidnog matriksa i spoljašnjeg mineralnog omotača. Profesor Munarin je razvio biomimetričnu metodu za dobijanje kalcijum fosfat-pektin mikrosfera koje se koriste kao injektibilni nosači sa mogućnošću da favorizuju proces biomineralizacije (187).

Na kraju treba istaći da se na pektin može gledati kao na novi, raznovrsni biomaterijali čijim se poznavanjem i izborom može diktirati čitav niz osobina: degradacija, oticanje tkiva, prijanjanje ćelija, vezivanje i oslobađanje bioaktivnih molekula.

1.1.8. Jabučni pektin i njegovi zdravstveni benefiti

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) spada u voće koje se najviše konzumira širom sveta, zbog njihove dostupnosti tokom cele godine u različitim oblicima, ali i zbog opšte percepcije da su jabuke dobre za zdravlje (188).

Industrijska kaša od jabuke predstavlja “ostatak” od presovanja mase nefermentisanog soka, cidera, vina, brendija, destilata ili sirćeta. Ona je interesantan materijal koji je privukao veliku pažnju kao potencijalni izvor dijetalnog šećera, vlakana, fenolnih komponenti i pektina. Sastoji se od vode (76,3%) i rastvorljivih čvrstih supstanci (23,7%). Njen sastav uglavnom zavisi od sorte jabuke i načina prerade. Sastav vlakana varira od 11,6-44,5 % i uključuje celulozu (12-23,2%), lignin (6,4-19%), pektin (3,5-18%) i hemicelulozu (5-6,2%). Prosečna dijetalna vlakna (35,8%) i šećeri (54,4%) čine 91,2% kaše a drugi sastojci su proteini, lipidi i pepeo. Jabučni pektin koji potiče iz ekstrakcije jabučne kaše ima tamno braon boju (189).

Jabuke sadrže prosečno 2-3% vlakana. Pektin je jedno od najvažnijih solubilnih vlakana, izolovanih iz jabuke jer obezbeđuje približno 10% dnevnih potreba za njima. Smatra se da konzumacija 2 manje jabuke dnevno obezbeđuje potrebnu dozu pektina.

Epidemiološke studije su ukazale da je česta konzumacija jabuka povezana sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, određenih kancera i dijabetesa. Podaci iz interventnih studija uglavnom na životinjama, manje na ljudima, sugerišu da unos jabuka može imati pozitivan efekat na lipidni metabolizam, regulaciju telesne težine, vaskularnu funkciju i inflamaciju (190).

Unos jabuka inverzno koreliše sa mortalitetom od ishemijske srčane bolesti, srčanim udarom i ukupnim mortalitetom (188). Jabuke su takođe povezane sa smanjenim rizikom od koronarne srčane bolesti i totalnog kardiovaskularnog mortaliteta što je pokazano u “Iowa Womens Health” studiji, gde je 34489 subjekata bez kardiovaskularnih bolesti praćeno tokom 16 godina. Nasuprot ovoj studiji, prospektivna studija sa 38445 žena i 805 muškaraca, koji su praćeni tokom 5 godina, je pronašla samo nesigificantnu inverznu asocijaciju između rizika od kardiovaskularnih bolesti i konzumacija jabuka (191).

Efekti cele jabuke ili specifičnih sastojaka na lipidni metabolizam su proučavani u brojnim studijama na životinjama. Pektin se smatra glavnim sastojkom jabuke koji je odgovoran za svojstva smanjenja holesterola (192). Dokazano je da je kombinovani efekat jabučnih fenola i vlakana efikasniji u redukovanju plazmatskog nivoa holesterola i hepatičkog holesterola pre nego pojedinačno (193).

U studijama na životinjama je pokazano da jabučni pektin ima antiinflamatorni efekat, tako što utiče na proinflamatornu citokinsku ekspresiju, produkciju imunoglobulina u kolonu (194) i sistemski redukujući plazmatski TNF α (195).

Skorašnje studije su pokazale da je poremećaj crevnih mikrobiota, naročito odnosa *Bacteroidetes/Firmicutes* usko povezan sa gojaznošću i metaboličkim poremećajima (196-199). Gojazni ljudi imaju hroničnu sistemsku inflamaciju i visok nivo serumskih endotoksina-LPS (lipopolisaharidi; ključna komponenta ćelijskog zida gram-negativnih bakterija, mogu biti trigeri za sekreciju pro-inflamatornih molekula) nazvan "metabolička endotoksemija". Ona je povezana sa disfunkcijom intestinalne barijere i igra glavnu ulogu u patofiziologiji metaboličkog sindroma i progresije ateroskleroze (200-202). Crevna mikrobiota mogu modulirati sistemsku inflamaciju. Pektin i polifenoli iz jabuke podležu mikrobiološkoj biokonverzaciji, produkujući metabolite (fenolnu kiselinu i SCFA) koji mogu imati lokalne intestinalne efekte i sistemske efekte nakon apsorpcije. Oni takođe mogu korisno modulirati kompoziciju crevnih mikrobiota, tako što inhibiraju rast patogenih bakterija i stimulišu rast korisnih bakterija, ponašajući se kao potencijalni prebiotici (203-206). Pektin iz jabuke (kao i polifenoli) preko modifikacije crevnih mikrobiota mogu redukovati metaboličku endotoksemiju, poboljšavajući intestinalnu barijeru i redukujući intestinalni permeabilitet i preuzimanje LPS-a (207, 208). Pored modulacije crevne mikrobiote, jabučni pektin smanjuje dobijanje na težini i depoziciju masti, dislipidemiju, hiperglikemiju, hiperinsulinemiju, metaboličku endotoksemiju i sistemsku inflamaciju kod HFD ("high fat diet") hranjenih miševa. Jabučni pektin ima sposobnost da formira gel u crevima time redukujući intestinalnu apsorpciju masti. Svi ovi rezultati su ukazali da jabučni pektin može imati protektivnu ulogu sa prebiotskim svojstvima u prevenciji gojaznosti i udruženih metaboličkih i inflamatornih bolesti. Prospektivno jabučni pektin može biti korisno sredstvo za klinički tretman pacijenata sa metaboličkim bolestima (196).

Funkcija pektina kao antikancerskog sredstva zavisi od indukcije apoptoze u ćelijama kancera. Pored toga jabuka ima antioksidativnu aktivnost koja je povezana sa antikancerskim efektom. Mnoge studije (*in vitro* i *in vivo*) su pokazale povezanost

konzumacija jabuka sa redukovanim rizikom od karcinoma prostate, dojke, kolona i multiplog mijeloma (209-212).

Jabučni pektin može sprečiti oštećenje indukovano oksidativnim stresom, mehanizmima koji još uvek nisu jasni. Može delovati kao helatni agens za prelazne metale. Reaguje sa superoksidnim radikalom i sprečava dismutaciju u vodonik peroksid. Kao efektivni antioksidans može zaštititi biološke sisteme od oksidativnog stresa koji je poznat kao važan patofiziološki faktor za brojne bolesti uključujući hiperholesterolemiju, kancer, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i reumatoidni artritis (213).

1.2. SLOBODNI RADIKALI

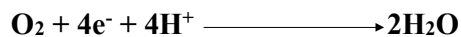
Slobodni radikali predstavljaju molekulske, jonske ili atomske vrste, koje sadrže nesparene elektrone u svojoj strukturi, odnosno nalaze se između oksidovanog i redukovanog stanja. Dobijaju se iz neradikala, koji su po svojoj prirodi slabije reaktivni, pošto u svojim orbitalama imaju paran broj elektrona, tj. imaju sparene elektrone.

U hemijskoj terminologiji je prihvaćeno da se slobodni radikali obeležavaju velikim latiničnim slovom R sa tačkom pored, koja simbolizuje nespareni elektron (R[•]). U organizmu su prisutni u niskim koncentracijama (10⁻⁵- 10⁻⁹ mol) i nastaju u nizu reakcija poput: oksidativna fosforilacija u mitohondrijama, fagocitoza, biotransformacija egzogenih i endogenih supstanci na membranama endoplazmatičnog retikuluma (u procesima auto-oksidacije i u redoks ciklusima), metabolizmu etanola, enzimskim reakcijama u kojima učestvuju oksigenaze, sintezi eikozanoida -biosintezi prostaglandina i leukotriena, oksido- redukcijama metala sa promenljivom valencom i lipidnoj peroksidaciji.

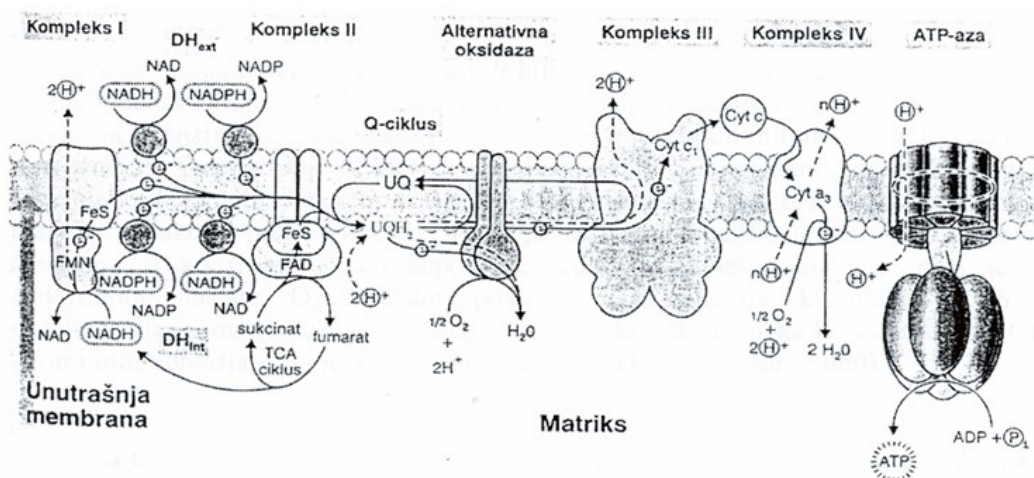
1.2.1. Slobodni radikali kiseonika

Iako je molekularni kiseonik neophodan za aerobni život, on može biti i toksičan, što je u svojim radovima zapazio još Luj Paster. Kod viših organizama, tkiva koja su najosetljivija na razaranje kiseonikom su pluća i oči, mada visok pritisak kiseonika može izazvati i akutnu toksičnost centralnog nervnog sistema.

Za vreme metaboličkih procesa, u ćelijama aerobnih organizama, najveći deo molekularnog kiseonika (O₂), u procesu respiracije u elektronskom transportnom lancu membrana mitohondrija uz katalitičko dejstvo kompleksa citohrom oksidaza, vezuje po četiri elektrona (e⁻) i četiri jona vodonika (H⁺) i redukuje se do molekula vode:



U procesu redukcije molekuskog kiseonika učestvuje složen sistem enzimskih kompleksa (Slika 1.7) organizovan u 4 supramolekulske strukture, koji se naziva elektron –transportni lanac (eng. ETC –electron transport chain).



Slika 1.7. Redukcija molekuskog kiseonika na membranama mitohondrija.

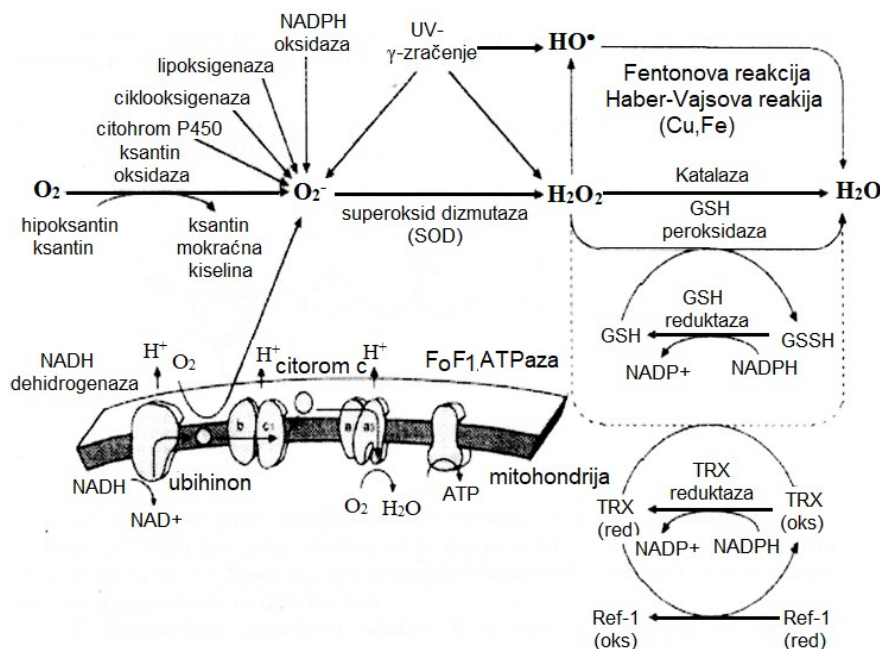
Ako se molekularni kiseonik redukuje manjim brojem elektrona, nastaju delimično redukovani i toksični međuproizvodi metabolizma kiseonika, koji se još zovu i reaktivne vrste kiseonika (ROS “reactive oxygen species”). Oko 5% molekuskog kiseonika prisutnog na citohrom-oksidadnom kompleksu se nepotpunom, jednovalentnom redukcijom, prevodi u toksični međuproizvod superoksidni anjon radikal (O₂^{•-}). Superoksidni anjon radikal pripada grupi tzv. reaktivnih vrsta kiseonika, kojih kod aerobnih organizama ima više vrsta (Tabela 1.3). U ovu grupu spadaju još i hidroksidni radikal (*OH), hidroperoksidni radikal (HO₂[•]), različiti organski radikali, kao i neki neradikalni oblici, poput vodonik peroksida (H₂O₂).

Slobodni radikali i druge reaktivne vrste kiseonika najvećim delom nastaju u mitohondrijama ćelija, ali i u peroksisomima, mikrozomima, ćelijskim membranama, membranski vezanim enzimima, inflamatornim ćelijama i fagocitima, i odgovorni su za nastanak mnogih oštećenja u ćeliji. Endogeni izvori reaktivnih vrsta kiseonika nastaju uglavnom tokom normalnog metabolizma i to primarno na mitohondrijskom respiratornom lancu, gde se višak elektrona prenosi na molekularni kiseonik, pri čemu se generiše superoksidni anjon radikal.

Tabela 1.3. Reaktivne vrste kiseonika.

Slobodni radikali kiseonika		Neradikalni reaktivni oblici kiseonika	
Oznaka	Naziv	Oznaka	Naziv
$O_2^{\cdot-}$	Superoksidni anjon radikal	H_2O_2	Vodonik peroksid
$\cdot OH$	Hidroksidni radikal	$HOCl$	Hipohlorasta kiselina
HO_2^{\cdot}	Hidroperoksidni radikal	O_3	Ozon
RO^{\cdot}	Alkoksidni radikal	1O_2	Singletni molekul kiseonika
RO_2^{\cdot}	Peroksidni radikal	$ROOH$	Organski hidroperoksid

Superoksidni anjon se redukuje pomoću superoksid-dismutaze (SOD) do vodonik peroksida, a vodonik peroksid se dalje redukuje do vode katalitičkim dejstvom katalaze (CAT), primarno locirane u peroksisomima, ili pomoću glutation peroksidaze (GSH-Px), locirane u mitohondrijama i citosolu, uz odgovarajuću potrošnju redukcionog ekvivalenta izraženog u glutationu (GSH) (Slika 1.8).



Slika 1.8. Metabolički putevi reaktivnih vrsta kiseonika i dejstvo antioksidacionog zaštitnog sistema.

Hidroksidni radikal ($\cdot\text{OH}$) je najtoksičnija vrsta ROS-a i reaguje sa skoro svim biomolekulima: alkoholima, organskim kiselinama, šećerima, amino kiselinama, fosfolipidima i nukleotidima, pri čemu nastaju odgovarajući organski radikali. Ovim je stvorena mogućnost dalje propagacije slobodno-radikalskih procesa i sledstveno tome, daljih oštećenja biomolekula. Visoka reaktivnost $\cdot\text{OH}$ i mala selektivnost čine ga veoma opasnim po integritet i funkcionalnost ćelije. Kao rezultat serije reakcija može nastati i peroksidni radikal koji dalje propagira slobodne radikalске procese, posebno one na membranama.

1.2.2. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je termin koji opisuje ugradnju molekularnog kiseonika u strukturu polinezasićenih masnih kiselina u biološkim membranama. Ovaj proces može teći na dva načina:

1. Enzimskim putem – dejstvom lipooksigenaze i ciklooksigenaze:
 - U okviru zapaljenskih procesa, dejstvom ovih enzima, generišu se oksidovane forme lipida – medijatori zapaljenskih procesa,
 - Slobodni radikali – koji se odmah uklanjaju dejstvom specifičnih sistema.
2. Neenzimskim putem:
 - Nekontrolisani “napad” reaktivnih vrsta kiseonika na polinezasićene masne kiseline iz lipidnog dvosloja membrane,
 - Kontrolisana reakcija biosinteze biološki aktivnih jedinjenja – eikozanoida (prostaglandini, leukotrijeni).

Lipidni peroksidi (LOOH), kao primarni proizvodi lipidne peroksidacije, su izuzetno potentni generatori slobodnih radikala, i oni vode propagaciji reakcije odnosno, stvaraju lančani proces uzastopne oksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Kao liposolubilna jedinjenja, oni su sposobni da difunduju kroz lipidni dvosloj plazma membrane i da se prenose i na udaljene regione u membrani. Homolitičkom

razgradnjom O-O veze u LOOH, u prisustvu Fe²⁺ -jona, nastaju hidroksidni radikali (•OH) i alkoksidni radikali (•OL) u klasičnoj Fentonovoj reakciji:



Procesi lipidne peroksidacije su izuzetno štetni s obzirom da napadaju kako polinezasićene masne kiseline tako i proteine iz plazma membrane. Na taj način se smanjuje količina membranskih lipida, pre svega diena i polinezasićenih masnih kiselina, što smanjuje fluidnost membrane i utiče na prenos signala.

Neuroni centralnog nervnog sistema (CNS-a) i ćelije glije su veoma osetljivi na dejstvo reaktivnih vrsta kiseonika, zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u lipidima mozga – sfingomijelina, cerebrozida i gangliozida. Slobodni radikali mogu izazvati i mnoga druga oštećenja kao što su oštećenja DNA, destrukcija nukleotidnih koenzima, poremećaji SH-zavisnih enzima, kovalentno vezivanje molekula što dovodi do fragmentacije i proteolize, kao i do oštećenja ćelijske membrane.

1.2.3. Antioksidacioni zaštitni sistem

Kako bi se sprečila, ograničila ili "popravila" oštećenja nastala delovanjem slobodnih radikala kiseonika (O₂^{•-}, H₂O₂, •OH, ¹O₂), tokom evolucije aerobnih organizama razvio se **antioksidacioni zaštitni sistem** (AOS, *antioxidant defence system*), koji predstavlja efikasnu odbranu i zaštitu bioloških sistema (Slika 1.9). Postoji primarna i sekundarna antioksidacionu zaštita.

Primarna antioksidaciona zaštita obuhvata enzimske i neenzimske komponente.

U **enzimske komponente** antioksidacione zaštite uključeni su enzimi superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), enzimi glutationskog redoks ciklusa:

glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-S-transferaza (GST) i glutation-reduktaza (GR), kao i neki drugi enzimi.

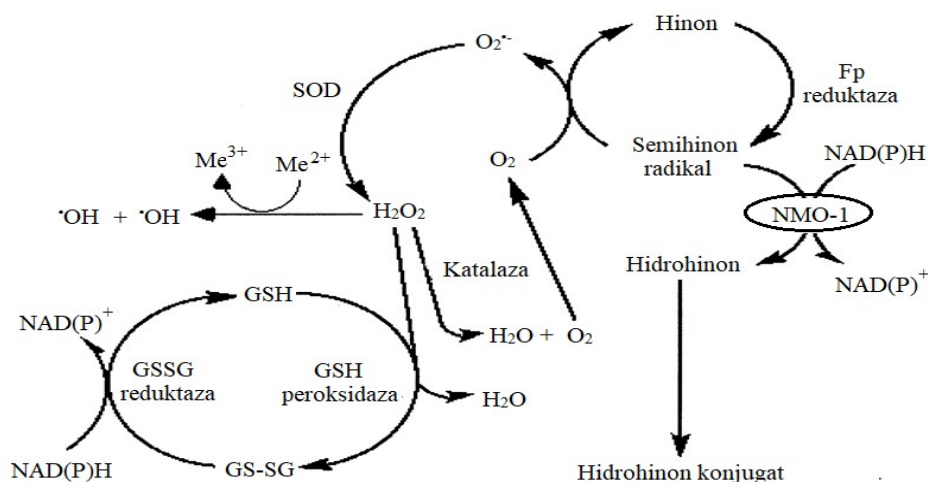
U **neenzimske komponente** su uključena niskomolekulska jedinjenja koja takođe učestvuju u uklanjanju slobodno radikalskih vrsta. Čine ih **liposolubilna jedinjenja** (vitamin E (α -tokoferol), provitamin A (β -karoten), vitamin A (retinol), i Koenzim Q (CoQ) i **hidrosolubilna jedinjenja** (vitamin C (askorbinska kiselina), mokraćna kiselina, glutation (GSH), žučni pigmenti: bilirubin i biliverdin, transportni proteini krvne plazme: albumin, transferin, feritin, i amino kiseline: cistein, histidin.

Sekundarnu antioksidacionu zaštitu čini sistem enzima koji se može kvalifikovati u 2 klase:

1. reparatori -popravljaju oštećenja nastala propustima primarnog sistema. U njih spadaju enzimi DNK reparacionog sistema, kao što su DNK glikozilaza, DNK polimeraza, DNK ligaza, endonukleaze.

2. dezintegratori -uništavaju nastala oštećenja. To su uglavnom različite proteaze koje su aktivne na oksidaciono modifikovanim proteinima: protein-specifične oksidoreduktaze, protein-ADP-ribozil-transferaza, ATP- i Ca^{2+} - nezavisna proteaza.

U normalnoj ćeliji postoji ravnoteža između produkcije slobodnih radikala i njihovog uklanjanja. Međutim, povećana produkcija slobodnih radikala ili smanjena antioksidaciona zaštita ćelija, izaziva oksidacioni stres koji može biti indukovano raznim faktorima iz spoljašnje sredine (UV-zračenje, invazija patogena i dr.)



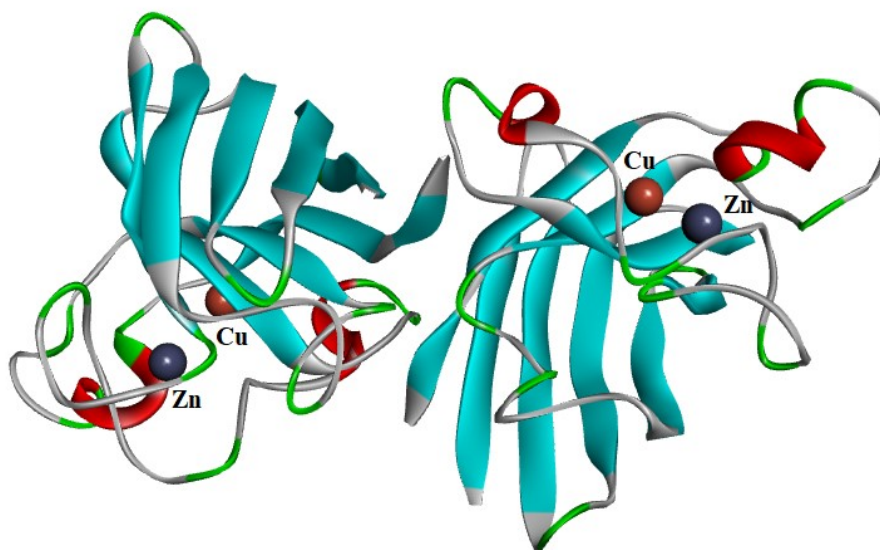
Slika 1.9. Antioksidacioni zaštitni sistem.

1.2.3.1. Enzimske komponente antioksidacionog zaštitnog sistema

Superoksid-dismutaza (SOD) je metaloprotein koji katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet -}$) u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (H_2O_2), prema sledećoj jednačini:



SOD je prisutan u svim aerobnim organizmima, nekim tolerantnim anaerobima i obligatnim anaerobima. Postoji nekoliko oblika superoksid-dismutaza i to: gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza (Fe-SOD), mangan sadržavajuća superoksid-dismutaza (Mn-SOD), bakar cink sadržavajuća superoksid-dismutaza (Cu/Zn-SOD, slika 1.10). Ekstracelularna superoksid-dismutaza (EC-SOD), koja, iako sadrži bakar i cink, ima različitu aminokiselinsku sekvencu od Cu/Zn-SOD. Iako obavljaju istu funkciju različita zastupljenost zavisi od vrste, tkiva i organela u ćeliji.

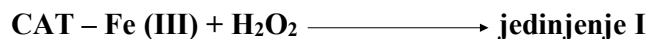


Slika 1.10. Trodimenzionalna struktura bakar, cink sadržavajuće superoksid-dismutaze.

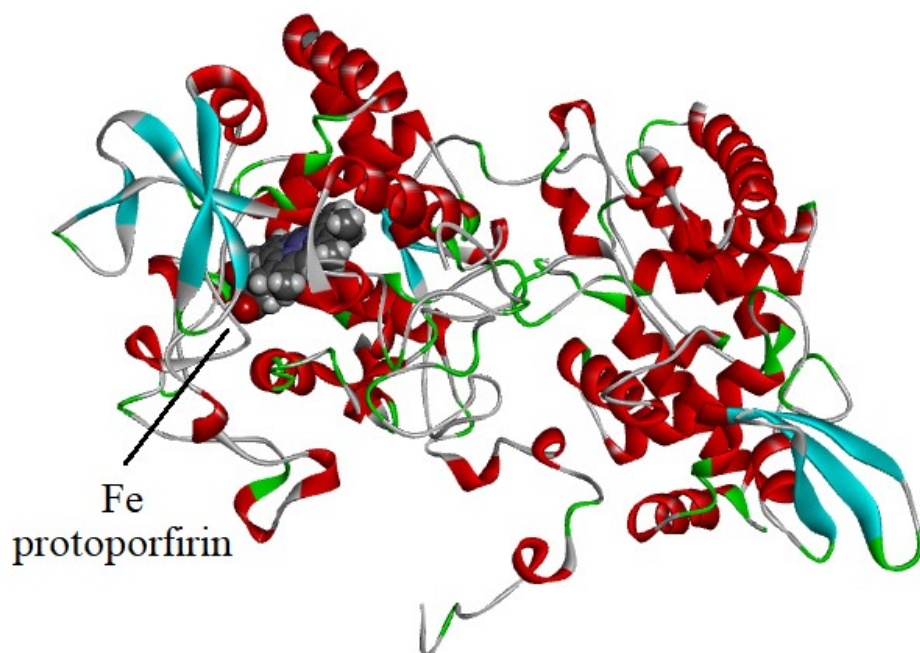
Katalaza (CAT) je enzim koji katalizuje pretvaranje vodonik peroksida (H_2O_2), koji je nastao dismutacijom superoksid anjon radikala, do vode i molekuskog kiseonika.



Reakcija je dvofazna i zahteva vezivanje dva molekula vodonik peroksida u aktivnom centru enzima:

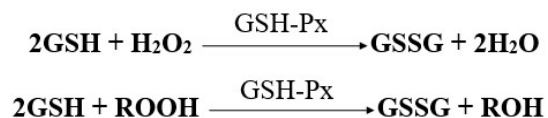


CAT je prisutna kod većine aerobnih organizama, osim kod nekih bakterija, modrozelenih i zelenih algi. Prisutna je u svim tkivima sisara (u peroksisomima), a najveću aktivnost pokazuje u jetri i eritrocitima. Sastoji se iz četiri podjedinice, od kojih svaka sadrži hem (Fe-III-protoporfirin) grupu u aktivnom centru (Slika 1.11).

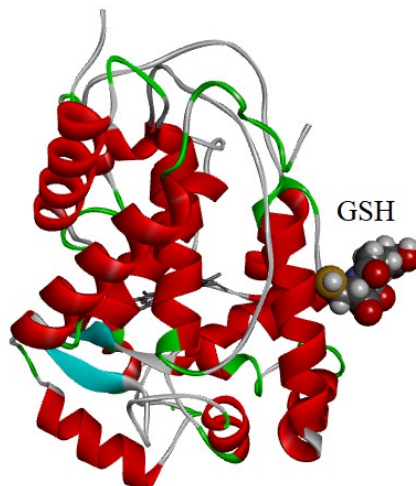


Slika 1.11. Trodimenzionalna struktura katalaze.

Glutation-peroksidaza (GSH-Px) je glavni enzim koji pri niskim koncentracijama uklanja vodonik peroksid. Katalizuje glutation (GSH)-zavisnu redukciju vodonik peroksida (H_2O_2) u vodu i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole. Ovaj enzim je dominantno prisutan u citosolu i mitohondrijama.



Postoje tri vrste GSH-Px: selen-zavisna glutation-peroksidaza (Se: GSH-Px), selen-nezavisna glutation-peroksidaza i fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH:GSH-Px). Prva vrsta, selen-zavisna glutation peroksidaza katalizuje razgradnju vodonik peroksida do vode uz učešće glutationa (GSH) kao donora elektrona (slika 1.12). Sadrži po jedan molekul selena u obliku seleno-cisteina u aktivnom centru na svakoj subjedinici, a sadrži ih ukupno četiri. Katalitički mehanizam se sastoji iz ciklične promene na seleno cisteinskim ostacima. Aktivan centar enzima je pristupačan, pošto se nalazi u plitkom udubljenju, što uzrokuje veliku brzinu enzimom katalizovane reakcije.



Slika 1.12. Trodimenzionalna struktura monomer glutation-peroksidaze.

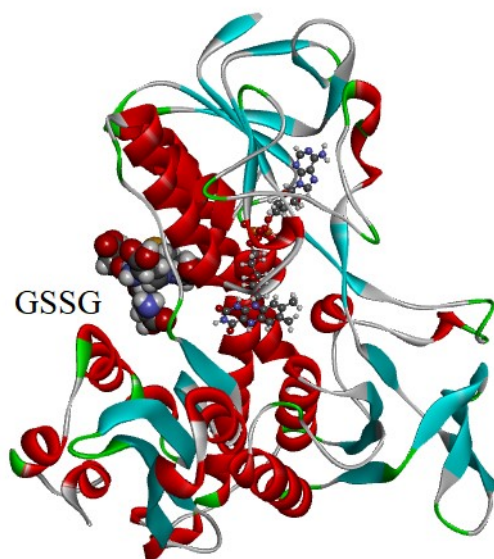
Se-zavisna i Se-nezavisna glutation-peroksidaza katalizuju i razgradnju organskih peroksida do alkohola, takođe uz učešće glutationa kao donora elektrona. Ova druga može poticati od većeg broja izoenzima glutation-S-transferaze. Treći tip ovog enzima katalizuje razgradnju fosfolipidnih hidroperoksida, i naziva se fosfolipid hidroperoksid GSH-Px (PH:GSH-Px). I ova vrsta GSH-Px sadrži seleno-cisteinski ostatak u svom aktivnom centru i svoje katalitičko dejstvo ostvaruje direktno na ćelijskim membranama. Za njenu aktivnost je nužno prisustvo optimalnih količina vitamina E u ćelijskoj membrani.

Glutation-reduktaza (GR) je enzim koji katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani glutation (GSH) uz učešće NADPH kao redukujućeg kofaktora:



Najčešće se javlja kao dimer, mada su kod nekih organizama pronađeni i tetramerni oblici ovog enzima (Slika 1.13). U ćelijama sisara GR je smeštena u citosolu i mitohondrijama. Ovaj enzim ima značajnu ulogu u zaštiti organizama od oksidacionih oštećenja. Promene aktivnosti GR često su povezane sa promenama aktivnosti GSH-Px

i SOD. Povećana aktivnost GR zapažena je u tumorskim ćelijama i ćelijama u kojima je veštačkim putem izazvan oksidacioni stres.

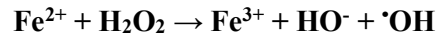


Slika 1.13. Trodimenzionalna struktura monomer glutation-reduktaze.

Aktivnošću GR-a u ćeliji, održava se stalan, visok odnos između redukovano i oksidovanog glutationa. U uslovima oksidativnog stresa, kada je nemoguće uspostavljanje optimalnog odnosa GSH/GSSG, oksidovani glutation se transportuje izvan ćelije preko Ca^{2+} zavisne ATP-aze u plazma membrani.

1.3. FENTONOVA REAKCIJA

Ova reakcija je dobila ime po britanskom hemičaru Henriju Džonu Fentonu. Reakcija opisuje generisanje $\cdot\text{OH}$ (hidroksidni radikal) iz H_2O_2 u prisustvu redoks aktivnih jona metala (najčešće Fe jona):



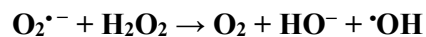
Ova reakcija se može odvijati simultano redukcijom jona metala sa vodonik peroksidom, što daje esencijalno "kruženje" jona metala i čini ga katalizatorom.



Rezultujuća zbirna reakcija opisuje katalitičko generisanje hidroksidnog i peroksidnog radikala iz vodonik peroksida u prisustvu jona metala (Cu ili Fe).



Zanimljivo, intraćelijsko "sagorevanje radikala" često rezultuje u simultanom formiranju superoksidnog radikala i vodonik peroksida. U prisustvu određenih redoks aktivnih jona metala, kao što su joni gvožđa, dve kiseonične vrste mogu reagovati jedna s drugom i formirati hidroksidne radikale:



Ova reakcija je nazvana Haber-Weiss-ova reakcija. Zajedno, Fentonova i Habber-Weiss-ova reakcija opisuju ključne procese u hemiji reaktivnih vrsta kiseonika (ROS „reactive oxygen species“). Hidroksidni i peroksidni radikal su visoko oksidovani i neštetniji su ROS u humanoj ćeliji. Njihovo formiranje objašnjava oštro povećanje toksičnosti vodonik peroksida u prisustvu jona gvožđa ili bakra, a takođe predstavlja i bazu za metal- ciljanu helatnu terapiju.

1.3.1. Reaktanti u Fentonovoj reakciji

Vodonik peroksid (H₂O₂) predstavlja najistraženiji i najbolje okarakterisani ROS uključen u redoks signale. Deluje specifično i povratno modifikuje proteine, najčešće tiolne grupe, modifikujući njihovu funkciju. Iako vodonik peroksid difunduje slobodno kroz membrane, moguće je da promene u lipidnoj i proteinskoj kompoziciji membrana i prisustvo putativnih nosača vodonik peroksida kao što su akvaporini mogu regulisati membransku propustljivost za vodonik peroksid i tako njegovu dostupnost specifičnim proteinskim metama.

Glavna metoda kojom vodonik peroksid reaguje kao redoks signal je kroz njegovu specifičnu reverzibilnu modifikaciju ključnih aminokiselina. Najčešće su modifikovani cisteinski ostaci, ali takođe i druga mesta mogu „ošetiti“ vodonik peroksid. On reaguje ili direktno na proteinski ostatak ili indirektno kroz biološke redoks parove kao što je tioredoksin ili glutation. U nekim slučajevima produkti ovih reakcija inhibiraju funkciju proteina blokirajući važne katalitičke ostatke, kao što su katalitički cisteinski ostaci na proteinu tirozin fosfataza. Modifikacija ciljanih proteina može se odraziti na njihovu funkciju ili interakciju sa drugim proteinima, i tako aktivirati ili inhibirati proteinsku funkciju ovih vezujućih partnera. U multi ćelijskim organizmima vodonik peroksid može reagovati kao signalna molekula za regulaciju normalnih ćelijskih funkcija.

Vodonik peroksid može takođe reagovati sa drugim proteinima i učestvovati u ne-tiol baziranoj redoks regulaciji. Jedan primer je histidin vezani odziv vodonik peroksida od strane PerR transkripcionog represora u bakterijama. U ovom slučaju vodonik peroksid je uključen u ireverzibilnu oksidaciju Fe²⁺- koordinativnih histidinskih ostataka de-represivnih PerR regulativnih gena, kao što je katalaza koja degradira vodonik peroksid i štiti bakterije od oksidativnog stresa. Uključenost Fe u ovaj sistem znači da je aktivnost PerR modifikovana količinom vodonik peroksida i gvožđa. Toksičnost vodonik peroksida je izražena u prisustvu Fe²⁺ jer stvara hidroksidni radikal Fentonovom reakcijom, time je PerR idealna, jer dopušta povećanu antioksidativnu ekspresiju kad su visoke koncentracije Fe i vodonik peroksida na nivou ćelije. Ova oksidacija je ireverzibilna.

Ugljenični radikal $\cdot\text{OH}$ radikal reaguje sa karbonatnim jonom (CO_3^{2-}) i produkuje karbonatni radikal ($\cdot\text{CO}_3^-$) ili radikal ugljen-dioksida ($\cdot\text{CO}_2^-$). Ovi radikali su manje reaktivni od $\cdot\text{OH}$, ali su veoma opasni pošto su im meta proteini. Ugljenični radikali se mogu stvarati oksidacijom različitih biomolekula, izazvanom $\cdot\text{OH}$ radikalom (214-223).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1) Kontrolisanom alkalnom hidrolizom uz primenu vodonik peroksida dobiti oligosaharide iz pektina jabuke i citrusa.

2) Testirati efekte dobijenih oligosaharida Elektron paramagnetnom rezonantnom (EPR) spektroskopijom na hidroksidni radikal ($\cdot\text{OH}$) generisan Fentonovom reakcijom.

3) Određivanje antimikrobne aktivnosti pektina i derivata pektina za (*Escherichia coli* (*E. coli*) i *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)).

4) Testirati efekte dobijenih oligosaharida na broj bakterija u kulturi tipičnih predstavnika Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija (*E. coli* i *S. aureus*), u prisustvu Fenton-potencirajućih supstanci (Fe i Askorbat).

5) Odrediti promene koje su izazvali primenjeni oligosaharidi na sistemu zaštite od oksidacionih oštećenja preživelih bakterija iz kultura *E.coli* i *S. aureus*.

6) Testirati efekat dobijenih derivata pektina na imuni sistem (na PEC ćelijama-ćelije peritonealnog ispirka (makrofagi) i CLNC ćelijama- ćelije limfnog čvora vrata).

3. MATERIJAL I METODOLOGIJA

3.1. Hidroliza jabučnog i citrusnog pektina i poligalakturonske kiseline

Uslovi hidrolize jabučnog i citrusnog pektina (kao i poligalakturonske kiseline) bili su sledeći: Za hidrolizu smo koristili komercijalni preparat jabučnog i citrusnog pektina i poligalakturonske kiseline (pektin ekstrahovan iz jabuke (76282), pektin ekstrahovan iz citrusnog voća (P9135) i poligalakturonska kiselina (PGA) ekstrahovana iz pomorandže (P3889) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Primenili smo metod alkalne hidrolize uz upotrebu vodonik peroksida za dobijanje u vodi rastvornog proizvoda iz jabučnog pektina (224, 225). Uslovi hidrolize jabučnog i citrusnog pektina i poligalakturonske kiseline bili su sledeći: vreme 8h; temperatura 55°C; koncentracija vodonik peroksida 4% (v/v) i koncentracija NaOH 2,0 M. Hidrolizati su bili filtrirani, neutralisani sa HCl (pH 7,0), koncentrisani do oko 20% (w/v), precipitirani sa 5 zapremina etanola i osušeni liofilizacijom dok se nije dobio beli prah rastvorljiv u vodi.

Navedenim postupkom su dobijeni derivati jabučnog pektina -APDO (Apple Pectin Derived Oligosaccharides), citrusnog pektina -CPDO (Citrus Pectin Derived Oligosaccharides) i poligalakturonske kiseline -PGDO (Polygalacturonic Acid Derived Oligosaccharides).

3.1.1. Spektroskopija u infracrvenoj oblasti sa Furijeovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija, predstavlja ne-destruktivnu analitičku metodu za identifikaciju organskih materijala. Metoda se zasniva na činjenici da su atomi u molekulu u stanju neprekidnog vibriranja. U zavisnosti od njegove složenosti i geometrije, svaki molekul je okarakterisan određenim brojem različitih načina vibracija (sa vibracionom frekvencijom koja zavisi od mase atoma i jačine veza između njih). Neke od molekulskih vibracija su karakteristične za molekul kao celinu, dok su druge odraz prisustva određenih funkcionalnih grupa u njima. Vibracione frekvencije se obično izražavaju kao talasni broj, čija je jedinica cm^{-1} . Izražena na ovaj način, frekvencija predstavlja recipročnu vrednost talasne dužine, λ . Talasne dužine

molekulskih vibracija nalaze se u infracrvenoj oblasti spektra elektromagnetnog zračenja. Molekuli koji apsorbuju u ovoj oblasti, a to je velika većina organskih molekula, mogu apsorbovanu energiju da pretvore u vibracionu energiju. Molekul može da apsorbuje samo one frekvencije zračenja koje se poklapaju sa vibracionim frekvencijama unutar samog molekula. Poređenjem intenziteta ulaznog i izlaznog zraka dobija se infracrveni apsorpcioni spektar. Apsorpcija određene frekvencije zračenja dovodi do pobuđivanja odgovarajućih vibracija molekula, odnosno karakterističnih grupa u molekulu, što je pokazatelj strukture ispitivanog uzorka. Te vibracije koje dovode do pojave traka u IC spektru se mogu opisati kao istežanje (stretching), savijanje (bending), ljuľanje (rocking), mahanje (wagging), uvijanje (twisting) (226).

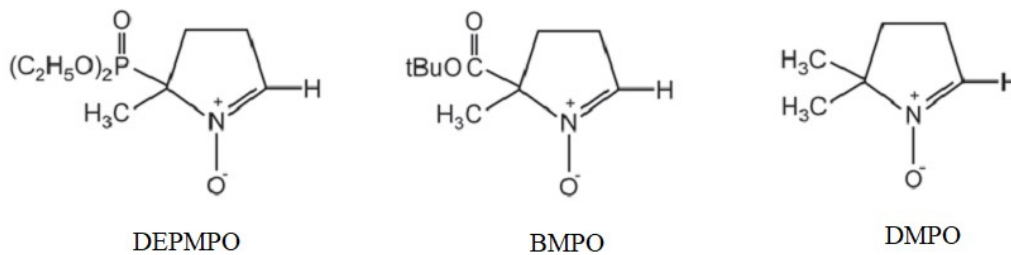
U cilju karakterizacije pektina iz jabuke i oligosaharida dobijenih hidrolizom ovog polisaharida (APDO) u kontrolisanim uslovima, urađena je standardna instrumentalna metoda strukturne analize, spektroskopija u infracrvenoj oblasti sa Furijeovom transformacijom (eng. **F**ourier **T**ransform **I**nfrared **S**pectroscopy, FTIR).

Infracrveni spektri uzoraka snimljeni su tehnikom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) na Thermo – Nicolet 6700 spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Uzorci su snimani u čvrstom stanju, korišćenjem tehnike snimanja smanjenjem totalne refleksije (eng. Attenuated Total Reflectance, ATR), na talasnim brojevima između 400 i 4000 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4,0 cm^{-1} u transmisionom modu. Dobijeni spektri su analizirani pomoću softvera Omnic 7.3.

3.2. Reaktivnost na hidroksidni radikal ($\cdot\text{OH}$) generisan Fentonovom reakcijom testirana elektron paramagnetnom rezonancijom (EPR)

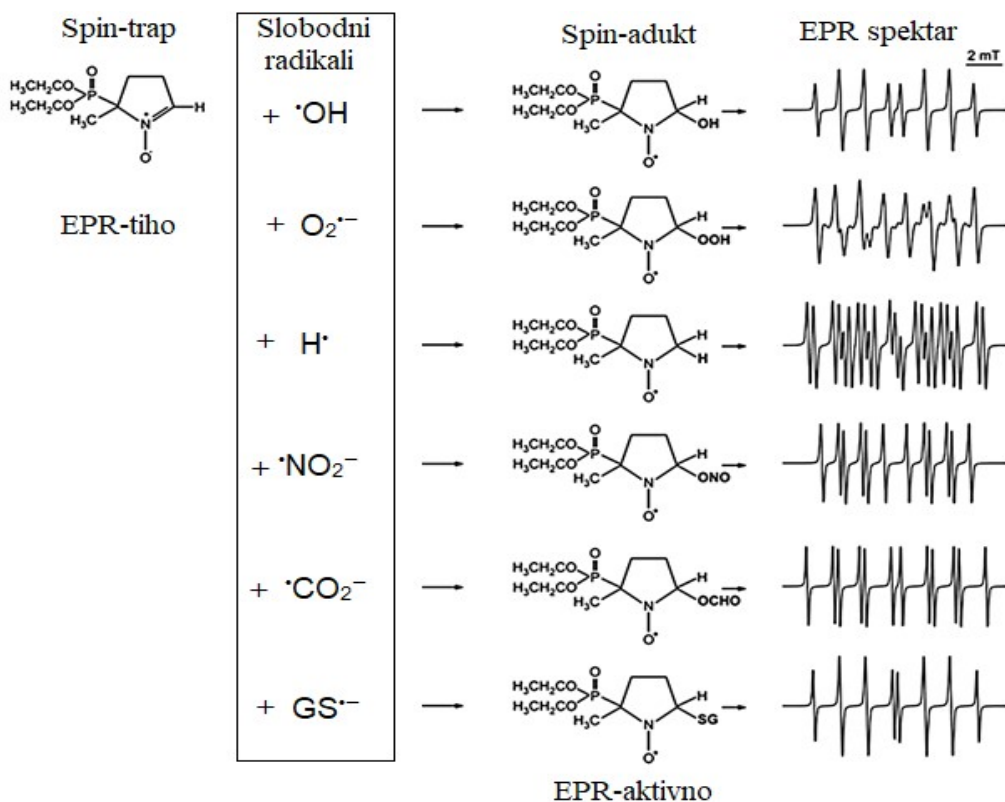
Postoji veliki broj jednostavnih metoda za određivanje ukupne ili nespecifične antioksidativne aktivnosti: metoda bazirana na reakciji antioksidanasa sa feri-jonom (FRAP), metoda bazirana na merenju antioksidativnog kapaciteta u odnosu na standard Trolox (TEAC), kapacitet apsorbanace kiseoničnih radikala i druge slične metode koje se koriste za brzo određivanje antioksidativnog efekta različitih komponenti, hrane i ekstrakata (227).

EPR spektroskopija je zlatni standard prema kojem se procenjuju sve druge metode određivanja antioksidativne aktivnosti. Spin-traping je najčešće upotrebljavana EPR tehnika u antioksidativnim istraživanjima, koja omogućava merenje antioksidativne aktivnosti na bilo kojoj selektovanoj koncentraciji ispitivane komponente u odnosu na fiziološki relevantne radikale. Osnovni princip je da se koristi sistem za stvaranje specifičnih radikala i meri relativna koncentracija radikala u prisustvu i odsustvu potencijalnog antioksidansa (Slika 3.1).



Slika 3.1. Formule i strukture spin-trap molekula. **DEPMPO** (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksida), najčešće se koristi za identifikaciju radikala. **BMPO** (5-terc-butoksikarbonil-5-metil-1-pirolin-N-oksida) najčešće se koristi za kvantitativnu analizu, zbog svoje stabilnosti. **DMPO** (5,5-dimepil-pirolin-N-oksida) najčešće upotrebljavan trap, zbog niske cene (Spasojević I. Critic Rev Clin Lab Sci 2011).

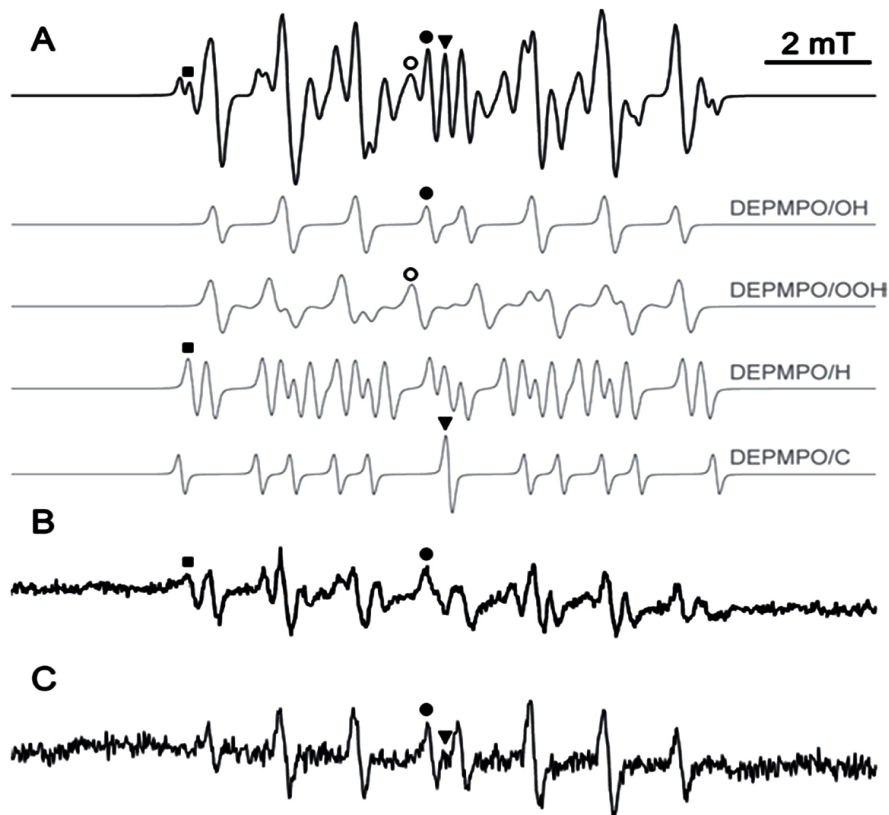
Osnovni principi spin-trapping tehnika su prikazani na slici 3.2. EPR “tiha” komponenta (spin-trap) “hvata” reaktivne intermedijerne radikale i formira stabilne paramagnetne vrste (spin-adukt).



Slika 3.2. Osnovni principi EPR spin-trapping metoda, na primeru dodatog spin-trap DEMPO i različitih fiziološki značajnih slobodnih radikala –hidroksidni radikal, superoksidni-anjon-radikal, atom vodonika, azot-dioksid-radikal, ugljendioksid-radikal i glutathion-tiil-radikal. DEPMPO/ONO adukt je intermedijer koji se oksiduje do acil-nitroksida (DEPMPO/O). Svaki adukt pokazuje različit EPR signal (Bačić i sar. Spectrochimica Acta A 2008).

EPR metoda sa Fentonovom reakcijom je najčešće upotrebljavana za proučavanje antioksidativnih aktivnosti (228, 229). EPR metodom mogu da se razlikuju tri ili više različitih reaktivnih vrsta. Signali specifičnih spin-adukta prepoznaju se po različitim spektralnim linijama i spektralnim stimulacijama. Stimulacije se koriste za

kvantifikaciju koncentracija spin-adukta (slobodnih radikala). Prisustvo aktivnog antioksidanta smanjuje intenzitet spektra (slika 3.3).



Slika 3.3. Sposobnost EPR spin-traping da razlikuje istovremeno slobodne radikale **A:** EPR spektar sastavljen od signala četiri DEPMPO adukta (tamnije) u poređenju sa pojedinačnim spektrima svakog adukta (svetlije). Svi spektri su generisani kompjuterskom simulacijom. Simboli karakterističnih spektralnih linija adukta: taman krug je OH[•] adukt (DEPMPO/OH adukt); svetao krug je O₂^{•-} adukt (DEPMPO/OOH); kvadrat je H[•] adukt (DEPMPO/H); trougao je CH₂OH[•] adukt (DEPMPO/C); **B:** EPR spektar DEPMPO spin-adukta dobijenog iz Langerhansovih ostrvaca pod fiziološkim uslovima; **C:** EPR spektar DEPMPO spin-adukta cerebrospinalne tečnosti ALS pacijenata sa dodatim vodonik peroksidom (Spasojević I. Critic Rev Clin Lab Sci 2011).

Sve hemikalije potrebne za ovaj eksperiment su nabavljene od komercijalnih dobavljača: FeSO₄ (Merck, Darmstadt, Germany); H₂O₂ (Carlo Erba Reagents,

Milano, Italy); DEPMPO (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi) spin-trap (*Enzo Life Sciences International, Plymouth Meeting, PA, USA*); DEPMPO je dvaput prečišćen i testiran na nečistoće hidroksilamina prema opisanom postupku (230). Svi eksperimenti su izvedeni u rastvoru fosfatnog pufera (pH = 7,4) koji je pripremljen primenom ultračiste MilliQ (18M Ω) vode.

Hidroksidni radikal (\cdot OH) je generisan putem Fentonove reakcije. Uzorci su pripremljeni dodavanjem FeSO₄ (0,2 mM) u rastvor koji sadrži spin-trap DEPMPO (5mM), vodonik peroksid (1 mM), sa ili bez APDO, CPDO ili PGDO (15 mg/mL). Nakon 2 min inkubacije, uzorci su uvučeni u 10-cm dugačke i za gas propustljive teflonske cevi (debljina zida 0,025 mm i unutrašnji prečnik 0,6 mm; *Zeus industries, Orangeburg, SC, USA*), koje su postavljene u kvarcnim kapilarima. EPR spektri su zabeleženi na sobnoj temperaturi pomoću *Varian E104-A EPR* spektrometra, X-band (9.51 GHz) sa EW softverom (*Scientific Software Inc., Bloomington, IL USA*) u sledećim uslovima: modulacija amplitude, 2 G; modulacija frekvencije, 100 kHz; mikrotalasna snaga, 20 mV; vreme skeniranja, 2 min. Simulacije su izvedene korišćenjem kompjuterskog programa WINEPR SimFonia (*Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Karlsruhe, Germany*) sa sledećim parametrima: adukt DEPMPO sa \cdot OH radikalom (DEPMPO/OH adukt): $a_N = 14$ G, $a_H = 13.2$ G, $a_H^\gamma = 0,3$ G (3H), $a_P = 47.3$ G; adukt DEPMPO sa anjonskim \cdot CO₂ (DEPMPO/ CO₂ adukt): $a_N = 14,5$ G, $a_H = 17.3$ G, $a_P = 51.6$ G (231).

3.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti pektina i derivata pektina (APDO) metodom difuzije u agaru

U eksperimentu su kao test mikroorganizmi korišćeni sojevi:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858
- *Candida albicans* ATCC 24433

Korišćene hranljive podloge u eksperimentu:

- Za bakterije Miler-Hinton agar (Torlak): g/L
 - Kazein hidrolizat 17,5
 - Mesni ekstrakt 3,0
 - Skrob 1,5
 - Agar 16,0
- Za kulturu *Saccharomyces cerevisiae* Sladni agar (Torlak): g/L
 - Pepton 1 Torlak 5,0
 - Sladni ekstrakt Torlak 30,0
 - Agar 15
- Agar za kulturu *Candida albicans*: g/L
 - Pepton 1 Torlak 10,0
 - Ekstrakt kvasca 5,0
 - Mesni ekstrakt 5,0
 - Glukoza 10,0
 - Natrijum-hlorid 10,0
 - Agar 25,0

Podloge su zagrevane do ključanja na vodenom kupatilu radi potpunog rastvaranja, zatim sterilisane u autoklavu 25 min, na 121 °C.

Testirani su rastvori pektina (25,50 mg/mL) i derivata pektina (25, 50, 100 mg/mL) – u smeši rastvarača dimetilsulfoksid-voda (DMSO : dH₂O 1 : 3).

Postupak: Nakon izlivanja i očvršćavanja podloga sterilnom ezom su zasejani test mikroorganizmi cik cak metodom. Na agarnim pločama „bušeni“ su bunari u koje je izlivano po 100 µL test supstance. Petri šolje su ostavljene na +4 °C (difuzija), a zatim su prebačene u termostat. Kulture su pregledane nakon 24h.

Supstanca difunduje iz formiranog rezervoara kružno pri čemu nastaje opadajući gradijent koncentracije, koji zavisi od koeficijenta difuzije, rastojanja od rezervoara kao i od ukupne količine supstance u rezervoaru. Sposobnost rasta i razmnožavanja soja zasejanog na agarnu ploču zavisi od njegove osetljivosti, tako da se oko rezervoara gradi bistra providna zona kružnog oblika u kojoj nema rasta. Veličina ove zone (zona inhibicije) je srazmerna osetljivosti ispitivanog mikroorganizma. Neosetljivi sojevi rastu neposredno pored rezervoara (zone inhibicije su male ili ih uopšte nema).

3.4. Efekti dobijenih oligosaharida iz pektina jabuke i citrusa (u prisustvu Fenton-potencirajućih supstanci) na broj bakterija u kulturama *E. coli* i *S. aureus*

Efekat dobijenih oligosaharida testiran je u koncentraciji 100 µg/mL prema kulturama *E. coli* i *S. aureus*. Bakterijski sojevi *E. coli* i *S. aureus* su gajeni na standardnoj hranljivoj podlozi (kontrola I), sa dodatim Fe³⁺ i askorbatom (kontrola II - pro-oksidativni uslovi u cilju oponašanja uslova u GIT-u) i kontrola I i II sa dobijenim oligosaharidima pektina jabuke i citrusa i poligalakturonske kiseline (APDO, CPDO, PGDO). Uzorci su inkubirani na 37°C, 5 h u aerobnim uslovima. Nakon inkubacije, uzorci su razblaženi u 0.9% NaCl (primenjena je metoda serijskog razblaženja) i zasejavani na endo-agar (Torlak, Beograd, Srbija).

Broj bakterija određen je nakon aerobne inkubacije preko noći, na 28 °C. Broj živih bakterija je određivan korišćenjem metode serijskog razblaživanja. Razblaženja su dizajnirana da bi se obezbedio inokulum u opsegu od 50-200 CFU (*Colony Forming Unit*), a broja CFU u inokulumu je određen nanošenjem na endo-agar.

3.5. Određivanje promena na sistemima zaštite bakterija od oksidacionih oštećenja

3.5.1. Određivanje aktivnosti antioksidacionih enzima u *E. coli* i *S. aureus*

Preživle bakterijske ćelije su nakon brojanja zamrznute. Nakon odleđivanja lizirane su ultrazvukom i u lizatu su određivane aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja putem spektrofotometrijskih metoda. Sva spektrofotometrijska merenja urađena su u triplikatu na uređaju Shimadzu UV-160 spektrofotometru (Shimadzu Scientific Instruments, Shimadzu Corporation, Kjoto, Japan).

3.5.1.1. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze je određena metodom po Klejbornu (232). Vodonik-peroksid ima maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost CAT se meri praćenjem razlaganja H₂O₂, odnosno padom apsorbanca na datoj talasnoj dužini. Za slepu probu koristi se fosfatni pufer, bez H₂O₂. Prati se pad apsorbanca u roku od 3 minuta (5 merenja na po 30 sekundi). Srednja vrednost promena apsorbanca treba da bude u opsegu 0,03-0,06.

$$CAT_{AKTIVNOST} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000 \times V_{rs} \times R}{43,6 \times C_{pn} \times V_{uz}} \quad (\text{V/mg})$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbanca uzorka u minutu,

ΔA_{bl} - srednja promena apsorbanca slepe probe u minutu,

V_{rs} - zapremina reakcione smeše, V_{uz} - zapremina uzorka (ml),

C_{pn} - koncentracija proteina (mg/ml), 43,6 - molarni ekstinkcioni koeficijent za H₂O₂ (M⁻¹cm⁻¹), R- razblaženje.

3.5.1.2. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze (GSH-Px)

Za određivanje aktivnosti GSH-Px koristi se modifikovana metoda Paglia i Valentine (233). Princip metode se oslanja na prirodu reakcije koju katalizuje GSH-Px - redukciju hidroperoksida redukovanim glutathionom. Enzim sadrži selenocistein u aktivnom mestu koje učestvuje direktno u dvoelektronskoj redukciji peroksida. Enzim koristi glutathion kao donor elektrona da bi regenerisao redukovanu formu selenocisteina. Nastali oksidovani glutathion se može reciklirati dejstvom GR (glutathion reduktaze) i NADPH (donor vodonika). Stoga ova metoda meri aktivnost GSH-Px indirektno, preko reakcije kuplovane sa GR. Oksidacija NADPH do NADP^+ se može pratiti kao smanjenje apsorpcije na 340 nm. Pad A_{340} je direktno proporcionalan GSH-Px aktivnosti u uzorku.

U kvarcnu kivetu se redom doda 1,5 ml destilovane vode; 0,3 ml GSH; 0,6 ml NADPH; 0,1 ml NaN_3 ; 0,1 ml EDTA; 0,3 ml fosfatnog pufera pH 7,0; 0,2 ml uzorka; 0,1 ml t-butilhidroperoksida i 0,005 ml glutathion-reduktaze. Dodatkom GR počinje reakcija. Za slepu probu koriste se isti rastvori bez uzorka i uzima se 1,6 ml destilovane vode. Meri se apsorbanca na 340 nm, pri $t=37^\circ\text{C}$, svakih 30 sekundi u toku 150 sekundi.

$$GSH-PxAkt = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 3000}{6,22 \times V \times C_{pn}} \left(\frac{nM \frac{NADPH}{min}}{mg \text{ prot}} \right)$$

ΔA_{uz} - promena apsorbance uzorka u minuti,

ΔA_{bl} - promena apsorbance slepe probe u minuti,

V - zapremina uzorka (ml), C_{pn} - koncentracija proteina dobijena (mg/ml),

6.22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($M^{-1}cm^{-1}$)

3.5.1.3. Određivanje aktivnosti glutathion reduktaze (GR)

Glutathion-reduktaza katališe redukciju oksidovanog glutathiona (GSSG) uz oksidaciju NADPH. Aktivnost glutathion-reduktaze je određena metodom Glatzle i

saradnika (234). Aktivnost GR se prati preko brzine oksidacije NADPH, odnosno merenjem smanjenja apsorbance na 340 nm. U kvarcnu kivetu se sipa 0,6 ml fosfatnog pufera pH 7,4; 0,1 ml GSSG; 0,1 ml EDTA; 2 ml destilovane vode; 0,1 ml uzorka i 0,1 ml NADPH (reakcija počinje tek kada se on doda). Za slepu probu se koriste isti rastvori samo bez uzorka. Apsorbanca se prati spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm prema slepoj probi, na temperaturi od 37 °C, svakih 30 sekundi tokom 150 sekundi.

$$GRAkt = \frac{(\Delta Auz - \Delta Abl) \times 3000}{6,22 \times V \times Cpn} \left(\frac{nM \frac{NADPH}{min}}{mg \text{ prot}} \right)$$

ΔAuz - promena apsorbance uzorka u minuti,

ΔAbl - promena apsorbance slepe probe u minuti ,

V - zapremina uzorka (ml), Cpr - koncentracija proteina (mg/ml),

6.22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($M^{-1}cm^{-1}$)

3.5.1.4. Određivanje aktivnosti bakar/cink sadržavajuće superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD)

Aktivnost SOD je određena adrenalinskom metodom (235). Pre određivanja aktivnosti SOD, drugi proteini su bili uklonjeni po metodi Tsuchihashi tretiranjem vodene faze uzoraka etanolom i hloroformom (1:1:1 v/v/v), a zatim centrifugiranjem (235).

Adrenalinska metoda je metoda "negativnog" tipa, pošto se prati smanjenje brzine autooksidacije epinefrina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od $O_2^{\cdot-}$. Superoksid, koji je supstrat za SOD, generiše se indirektno u alkalnoj sredini kao posledica reakcije kiseonika sa epinefrinom. Nastali superoksid povratno ubrzava autooksidaciju adrenalina. Prisutna SOD uklanja $O_2^{\cdot-}$ i pri tome inhibira reakciju autooksidacije. Zavisnost procenta inhibicije od SOD koncentracije ima oblik hiperbole, što je u suprotnosti sa prirodom većine enzima, kod kojih je ova zavisnost linearna. Brzina auto-

oksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dela porasta apsorbance (480 nm) koji odgovara brzini nastanka proizvoda (adrenohroma). Proces se prati spektrofotometrijski u odsustvu enzima - referentna (kontrolna) reakcija i u prisustvu uzorka, odnosno SOD. Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina, korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti (jedinica aktivnosti (U) definisana je kao količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorbance).

U 3 ml karbonatnog pufera, pH 10,2, dodaje se rastvor adrenalina (10 mM – promena A/min treba da bude 0,020-0,022). Autooksidacija adrenalina je praćena u toku 10–12 minuta na 480 nm svaki minut (stabilan plato na 50% inhibicije). Reakcija je stabilna u temperaturnom opsegu 26-30 °C. Kontrolna reakcija se radi uporedo sa merenjem auto-oksidacije uzorka. Pri merenju autooksidacije uzorka u reakcionu smešu se dodaje zapremina uzorka koja treba da proizvede 50% inhibicije od vrednosti dobijene za slepu probu, ali se može kretati u opsegu 40-60% inhibicije.

$$SOD_{AKTIVNOST} = \frac{(\Delta K - \Delta A) \times z \times r}{V \times C_{pr} \times \Delta K} \quad (V/mg)$$

ΔK - promena apsorbance kontrolne reakcije u minutu,

ΔA - promena apsorbance reakcije sa uzorkom u minutu ,

V - zapremina reakcione smeše,

C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), R – razblaženje

3.6. Testovi efekata derivata pektina na imuni sistem

Ovaj efekat je ispitivan na na PEC (ćelije peritonealnog eksudata -makrofagi) i na CLNC (ćelije cervikalnog limfnog čvora).

3.6.1. Medijum za gajenje ćelija

Za pripremu ćelijskih suspenzija i kultivisanje ćelija korišćen je medijum RPMI-1640 (Sigma, SAD), u koji su dodati 50 μ M 2-mekaptoetanol (Fluka, Nemačka), 20 μ M HEPES pufer (Flow Laboratories, Velika Britanija), 10 mM natrijum-piruvat (Sigma, SAD) 2 mM L-glutamin (US Biochemical Corp, SAD). Dodati su i antibiotici penicilin (100 UI/mL) i gentamicin (100 μ g/mL), kao i antimikotik nistatin (svi Galenika, Srbija).

Fetalni teleći serum (FCS, od engl. *Fetal Calf Serum*; PPA Laboratories, Austrija) je dodavan u medijum u koncentraciji od 5%, a prethodno je inkubiran 30 minuta na 56 °C, kako bi se inaktivisale komponente sistema komplementa.

3.6.2. Eksperimentalne životinje

Za izolovanje ćelija potrebnih za eksperiment korišćeni su pacovi ženskog pola inbrednog soja Albino Oxford (AO), starosti od 3-4 meseca. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i čuvane su pod standardnim uslovima, bez ograničenja pristupa hrani i vodi. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu.

3.6.3. Izolovanje ćelija peritonealnog eksudata

Peritonealna duplja je pogodan izvor mirujućih rezidentnih makrofaga, zbog velike procentualne zastupljenosti ovih ćelija i jednostavnosti metode izolacije. Nakon žrtvovanja pacova, ćelije peritonealnog eksudata (PEC, od engl. *Peritoneal Exudate Cells*) dobijene su ubrizgavanjem 10 ml PBS-a, držanog na ledu, u peritonealnu šupljinu pacova i prikupljanjem što više tečnosti u sterilne epruvete. Tečnost je zatim centrifugirana 3 minuta na 500 g, supernatant je odliven, a istaložene ćelije su resuspendovane u 2 ml sterilnog medijuma za kulturu ćelija.

3.6.4. Izolovanje ćelija cervikalnih limfnih čvorova

Za dobijanje ćelija cervikalnih limfnih čvorova (CLNC, od engl. *Cervical Lymph Node Cells*) korišćeno je 4-5 limfnih čvorova po pacovu uzetih iz 4 pacova. Limfni čvorovi su iz žrtvovanih pacova vađeni sterilnim instrumentima i prenošeni su u sterilne posude sa medijumom za gajenje ćelija. Tkivo je homogenizovano potiskivanjem kroz metalnu mrežicu i potom filtrirano kroz sterilnu konusnu najlonsku mrežicu. Tako dobijena ćelijska suspenzija je centrifugirana 3 min na 500g. Supernatant je odbačen, talog je resuspendovan u 2ml medijuma. Nakon toga je određen dobijeni broj ćelija.

3.6.5. Brojanje ćelija

Broj živih ćelija određivan je neposredno nakon izolacije ćelija iz odgovarajućeg tkiva, pod svetlosnim mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u, na koju je nanoseno 20 µL ćelijske suspenzije, pomešane sa 180 µL 0,1% rastvora tripan-plavog (BDSL, Velika Britanija). Boja tripan-plavo ulazi samo u ćelije sa narušenim integritetom membrane (mrtve ćelije) te su žive ćelije neobojene. Mrtve ćelije nisu brojane.

3.6.6. Uspostavljanje kulture makrofaga

Nakon prebrojavanja živih ćelija, izračunat je potreban broj ćelija za dalje eksperimente i suspenzija je adekvatno razblažena medijumom za gajenje ćelija. Ćelije su prebačene u ploču za kultivaciju ćelija sa 24 bunara (Sarstedt, Nemačka), pri čemu je u svaki bunar dodato 500 µL ćelijske suspenzije, odnosno približno $1,7 \times 10^6$ ćelija. Nakon inkubiranja ćelija u inkubatoru sa vlažnom atmosferom, na 37° C i pri koncentraciji CO₂ od 5% u trajanju od dva sata, supernatant je odbačen, a ćelije koje su adherirale na dno bunara ploče su smatrane makrofagima. Bunari su dva puta isprani sa po 1 mL sterilnog PBS-a, a potom je u svaki bunar dodat sterilni medijum za gajenje ćelija.

Ćelije su zatim stimulisane jednakim zapreminama LPS-a (Sigma-Aldrich, SAD), koncentracije 10 ng/mL i tretirane rastvorima APDO različitih koncentracija. Postavljene su i dve kontrole, od kojih je jedna sadržala samo ćelije u medijumu, dok su u drugoj kontroli ćelije stimulisane LPS-om, bez dodatka APDO. Ćelije su inkubirane 24 sata nakon čega su korišćene za dalje eksperimente.

3.6.7. Uspostavljanje kultura ćelija cervikalnih limfnih čvorova

Nakon izolovanja CLNC i određivanja ukupnog broja ćelija na opisani način, ćelijske suspenzije su razblažene sterilnim medijumom za gajenje ćelija tako da u svakom bunaru ploče sa 24 bunara bude približno 5×10^6 ćelija u zapremini od 500 μ L. Ćelije su stimulisane sa ConA (Sigma-Aldrich, SAD) koncentracije 2,5 μ g/mL i tretirane različitim koncentracijama APDO. Kontrole su postavljene na isti način kao u kulturi makrofaga. CLNC su kultivisane u po dve ploče, od kojih je jedna inkubirana 24, a druga 48 sati pre daljeg rada sa ćelijama.

Eksperimenti su izvedeni u četiri jednaka primerka, u toku dva eksperimentalna dana. Statistička značajnost je testirana korišćenjem metode analize varijanse (ANOVA), praćeno Tukey's HSD multiplim komparacionim post-hoc testom. Rezultati eksperimenata na ispitivanim bakterijskim sojevima su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD (standardna devijacija), i smatrani su da se statistički razlikuju ako je $p < 0.05$.

Rezultati reprezentativnih eksperimenata na životinjama su prikazani kao srednje vrednosti duplikata, odnosno triplikata dobijenih vrednosti \pm SD. Studentov t-test je korišćen za određivanje statističke značajnosti razlika između kontrolnih i tretiranih grupa ćelija. Kao statistički značajna smatrana je $p < 0,05$.

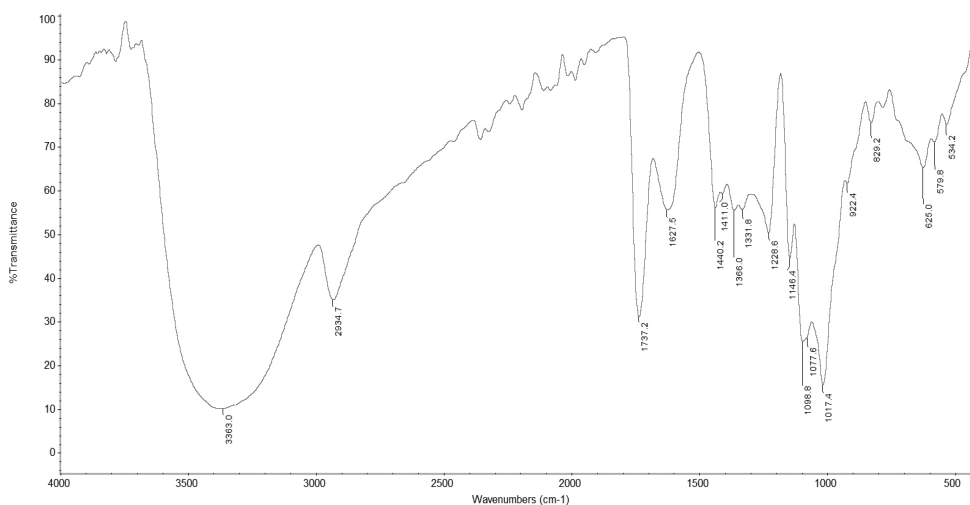
Istraživanja su sprovedena u saradnji sa istraživačima Instituta za multidisciplinarna istraživanja i Instituta za biološka istraživanja Univerziteta u Beogradu.

4. REZULTATI

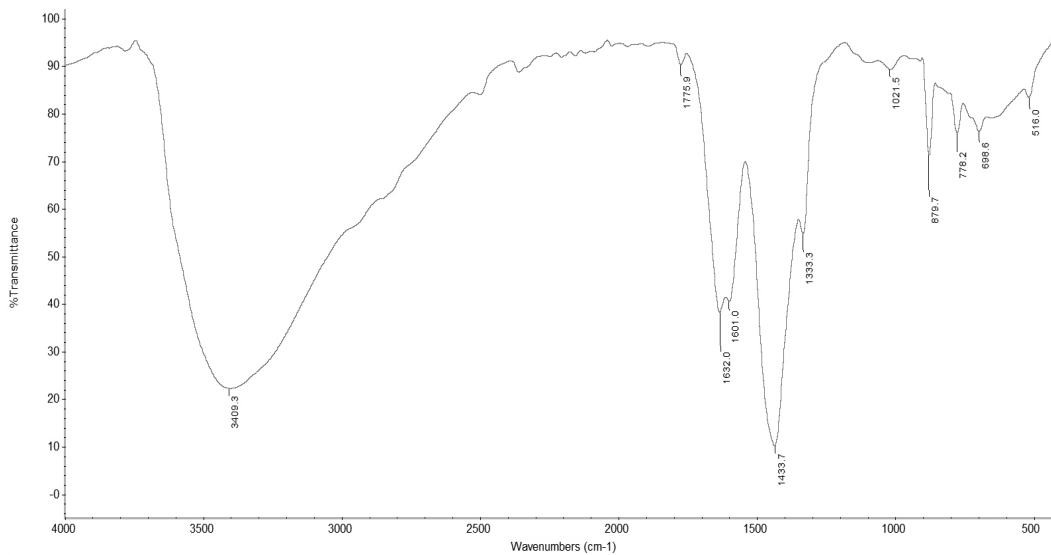
4.1. Analiza dobijenih pektinskih derivata spektroskopijom u infracrvenoj oblasti sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Promene na molekulu pektina tokom alkalne hidrolize praćene su FTIR-om i prikazane na slikama 4.1, 4.2, 4.3.

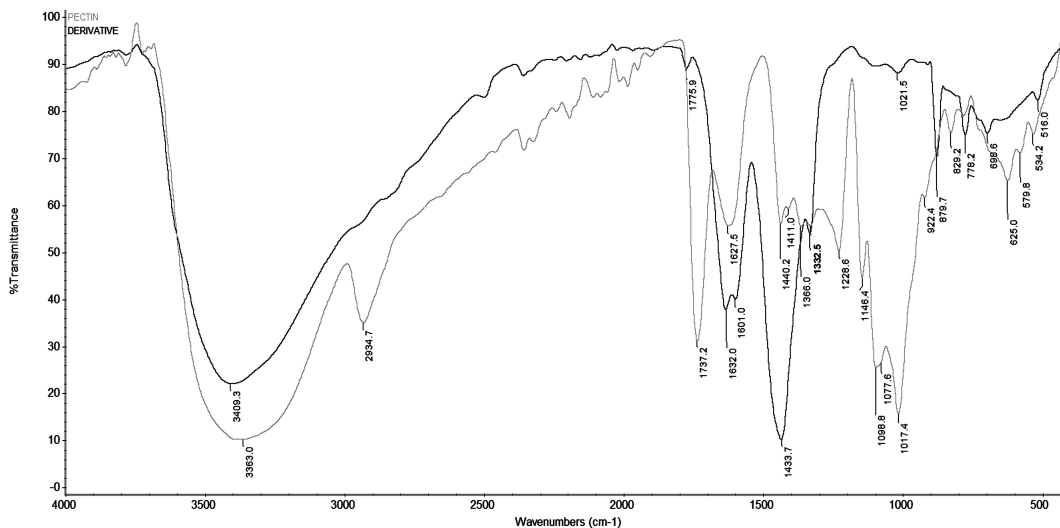
U FTIR spektrima jabučnog pektina i izvedenih oligosaharida (APDO) uočavaju se intenzivne široke apsorpcione trake koje potiču od vibracija istezanja vodonično vezanih hidroksilnih grupa ($3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$) (slika 4.1). U spektru pektina javlja se veoma intenzivna traka na 1737 cm^{-1} koja se pripisuje istezanju karbonila iz karboksilnih grupa, kao i traka na 1229 cm^{-1} koja odgovara vibracijama savijanja van ravni hidroksilnih iz karboksilnih grupa.



Slika 4.1. FTIR spektar jabučnog pektina. Uočava se intenzivna traka na 1737 cm^{-1} koja se pripisuje istezanju karbonila iz karboksilnih grupa, kao i traka na 1229 cm^{-1} koja odgovara vibracijama savijanja van ravni hidroksilnih iz karboksilnih grupa.



Slika 4.2. FTIR spektar derivata jabučnog pektina (APDO). Uočavaju se dominantne trake na 1434 cm^{-1} i 1632 cm^{-1} koje ukazuju na simetrične i asimetrične vibracije istežanja karboksilatnih grupa.



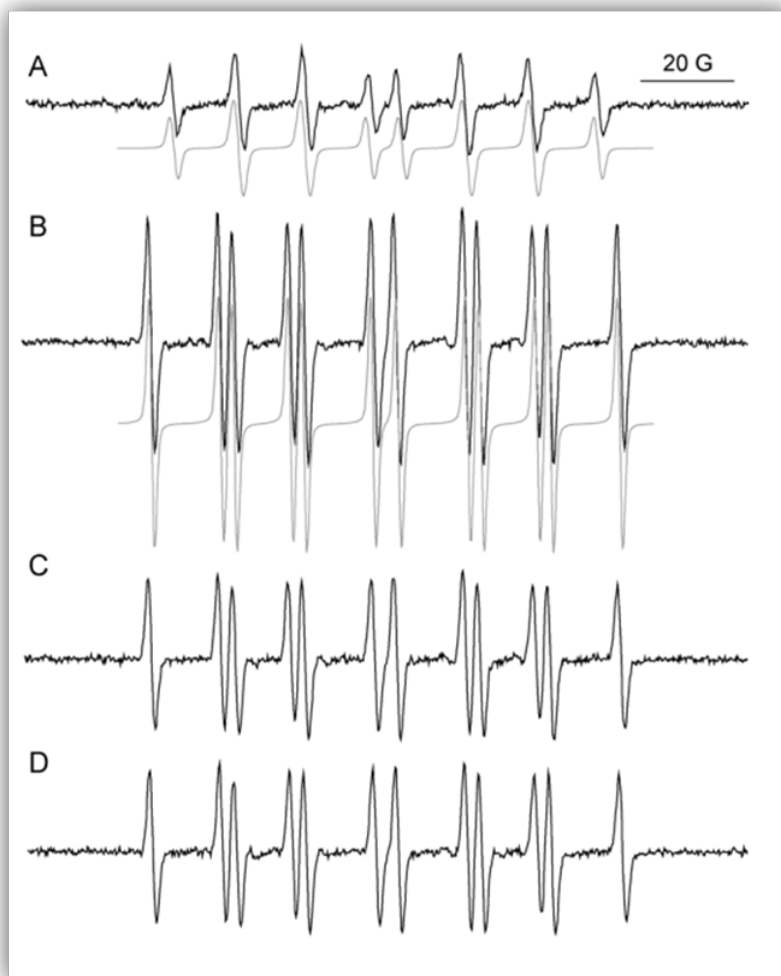
Slika 4.3. Preklapljeni FTIR spektri jabučnog pektina i APDO. Jasno se uočavaju promene indukovane alkalnom hidrolizom pektina u prisustvu vodonik peroksida.

Ove apsorpcijske trake su gotovo u potpunosti odsutne u spektru derivata pektina, gde su dominantne trake na 1434 cm^{-1} i 1632 cm^{-1} koje ukazuju na simetrične i asimetrične vibracije istezanja karboksilatnih grupa. Trake koje potiču od deformacionih vibracija vode (1628 cm^{-1}) su jasno uočljive u spektru pektina, dok se u spektru APDO preklapaju sa signalima istezanja karboksilatnih grupa.

4.2. Rezultati EPR analize radikala u Fentonovom sistemu

Reaktivni proizvodi APDO, CPDO i PGDO su analizirani u Fentonovom sistemu pomoću EPR-a. U prisustvu APDO, CPDO i PGDO formiranje DEPMPO/OH adukta u Fentonovoj reakciji je potpuno inhibirano zbog nastanka adukta sa radikalnim anjonom ugljen-dioksida ($\text{CO}_2^{\bullet-}$, takođe nazvan radikalni anjon) (slika 4.4). Drugim rečima, APDO, CPDO i PGDO proizvode $\text{CO}_2^{\bullet-}$ kada su izloženi dejstvu hidroksidnog radikala ($^{\bullet}\text{OH}$).

Slika 4.4 A predstavlja karakteristični signal DEPMPO adukta sa $^{\bullet}\text{OH}$ radikalom koji se proizvodi putem Fentonove reakcije. APDO, CPDO i PGDO daju $\text{CO}_2^{\bullet-}$ kada su izloženi $^{\bullet}\text{OH}$ radikalima proizvedenim u Fentonovoj reakciji. Proizvodnja $\text{CO}_2^{\bullet-}$ radikala, u reakciji sa APDO bila je značajno veća (za oko 60%) u poređenju sa CPDO ili PGDO. Može se zapaziti da APDO, CPDO, PGDO nisu smanjili intenzitet EPR signala nastalih adukta, već su ga povećali. Ovo se može objasniti većom stabilnošću $\text{CO}_2^{\bullet-}$ u poređenju sa $^{\bullet}\text{OH}$ radikalom, što dovodi do većeg prinosa DEPMPO/ CO_2 adukata.



Slika 4.4. EPR spektri efekata pektinskih derivata na produkciju radikala u Fentonovom sistemu. A- karakteristični signal DEPMPO adukta sa hidroksidnim radikalom ($\cdot\text{OH}$) koji se proizvodi putem Fentonove reakcije ($\text{Fe} + \text{H}_2\text{O}_2$); Sivom linijom je označena simulacija signala DEPMPO/OH adukta; B -signal u prisustvu derivata pektina iz jabuke (Fentonov sistem + APDO); Sivom linijom je označena simulacija signala DEPMPO/ CO_2 adukta; C-signal u prisustvu derivata pektina iz citrusa (Fentonov sistem + CPDO); D-signal u prisustvu derivata poligalakturonske kiseline (Fentonov sistem + PGDO).

4.3. Odredjivanje antimikrobne aktivnosti pektina i njegovih derivata (APDO)

Posle 24 h inkubacije na 37 °C (*E. coli* i *S. aureus*), odnosno na 28 °C (*S. cerevisiae* i *C. albicans*), Petri šolje su pregledane i izmeren je prečnik zone inhibicije (slika 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).

Tabela 4.1. Mikroorganizmi koji su podvrgnuti pektinu i njegovom derivatu (APDO)

	PEKTIN		DERIVATI PEKTINA (APDO)		
	25*	50	25	50	100
<i>Escherihia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphilococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	2 cm**	3 cm
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	1,5 cm

*mg/mL

** prečnik inhibicije u cm

Iz dobijenih rezultata (tabela 4.1) se može zaključiti da pektin i APDO ne inhibiraju rast *E.coli* i *S. aureus*. Aktivnost nije pokazana ni u jednom slučaju.

Isto tako, pektin nema uticaja na gljivice i plesni, dok derivati dobijeni alkalnom hidrolizom jabučnog pektina (APDO) inhibiraju rast *S.cerevisiae* i *C.albicans* (tabela 4.1).



Slika 4.5. *Escherichia coli*. Pektin i APDO ne inhibiraju rast *E. coli* pri različitim koncentracijama.



Slika 4.6. *Staphylococcus aureus*. Pektin i APDO ne inhibiraju rast *S. aureus* pri različitim koncentracijama.



Slika 4.7. *Saccharomyces cerevisiae*. Pri koncentraciji APDO 50 i 100 mg/mL uočena je inhibicija rasta *S. cerevisiae*.

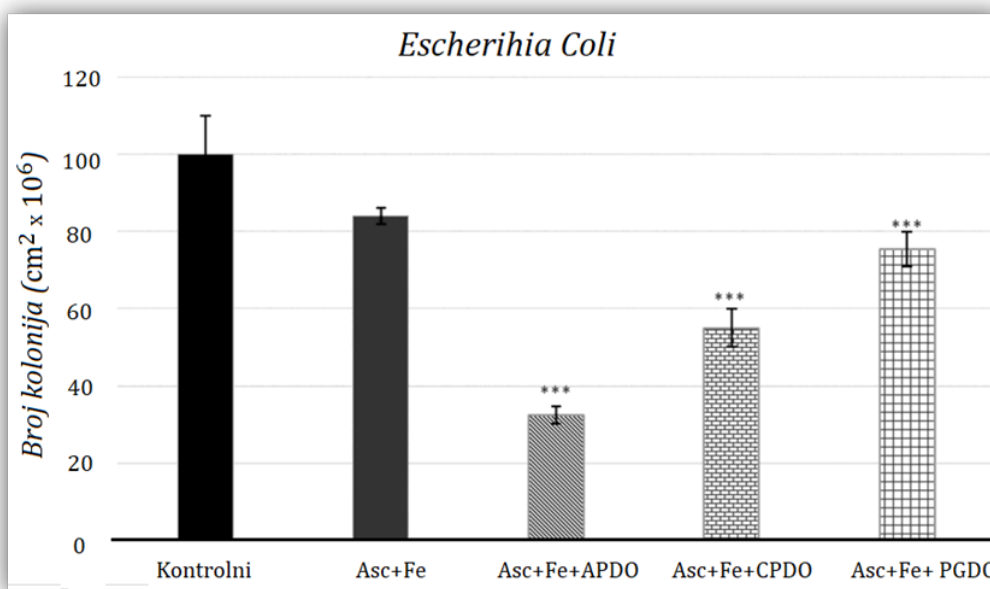


Slika 4.8. *Candida albicans*. Pri koncentraciji APDO 100 mg/mL rast *C. albicans* je usporen.

4.4. Efekti dobijenih oligosaharida iz pektina jabuke i citrusa (u prisustvu Fenton-potencirajućih supstanci) na broj bakterija u kulturama *E. coli* i *S. aureus*

Analizirali smo efekte dobijenih derivata pektina (jabuke i citrusa) i oligosaharida izvedenih iz poligalakturonske kiseline (APDO, CPDO i PGDO) u prooksidativnom sistemu (Fe^{3+} i askorbat) na rast jednog Gram-negativnog reprezentativnog soja *Escherichia coli* ATCC 25922 (slika 4.9) i jednog Gram-pozitivnog reprezentativnog soja *Staphilococcus aureus* ATCC 25923 (slika 4.10).

Efekat na *Escherichia coli*

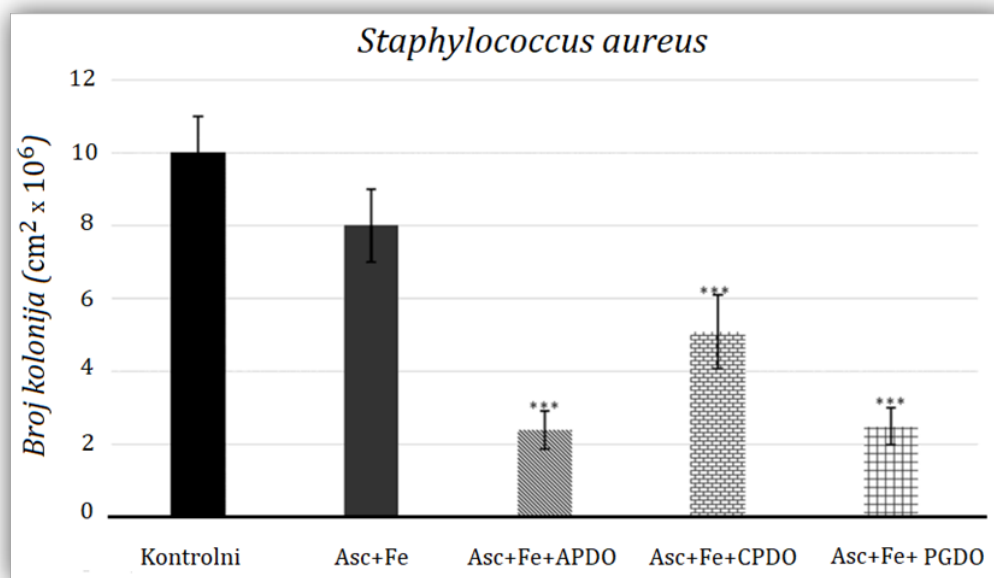


Slika 4.9. Efekat APDO, CPDO ili PGDO u prisustvu askorbata (Asc) i Fe^{3+} na rast *E.coli*. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD (standardna devijacija). Efekti oligosaharida su poređeni sa sistemom gde je prisutan samo Asc+ Fe^{3+} (***) $p < 0.001$.

Izloženost kolonije *Escherihia coli* pro-oksidativnim uslovima (Asc+ FeCl_3), dovela je do smanjenja broja živih bakterija za oko 15% ($p < 0.05$).

Dodatak APDO ($p < 0.001$) i CPDO ($p < 0.001$) je izazvao dodatno smanjenje broja *E. coli* (slika 4.9). APDO je pokazao najizraženiji efekat. Naime, broj kolonija *E. coli* se smanjio za 65% dodatkom ADPO, dok je dodatak CPDO izazvao smanjenje za 45%, posmatrano u odnosu na kontrolni uzorak.

Efekat na *Staphylococcus aureus*



Slika 4.10. Efekat APDO, CPDO ili PGDO u prisustvu askorbata (Asc) i Fe³⁺ na rast *S. aureus*. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD (standardna devijacija). Efekti oligosaharida su poređeni sa sistemom gde je prisutan samo Asc+Fe³⁺ (***) $p < 0.001$).

Rezultati su nešto drugačiji za kolonije *S. aureus* (slika 4.10). Izloženost pro-oksидativnim uslovima nije značajno promenila broj živih bakterija ($p = 0.09$). Broj kolonija se smanjio za oko 20%. Međutim, u prisustvu pektinskog oligosaharidnog derivata broj živih bakterija je značajno smanjena ($p < 0.001$). APDO i PGDO su pokazali slične bakteriostatske efekte (smanjenje broja kolonija je veće od 70%), dok je CPDO bio relativno manje efikasan (smanjenje broja kolonija je oko 50%).

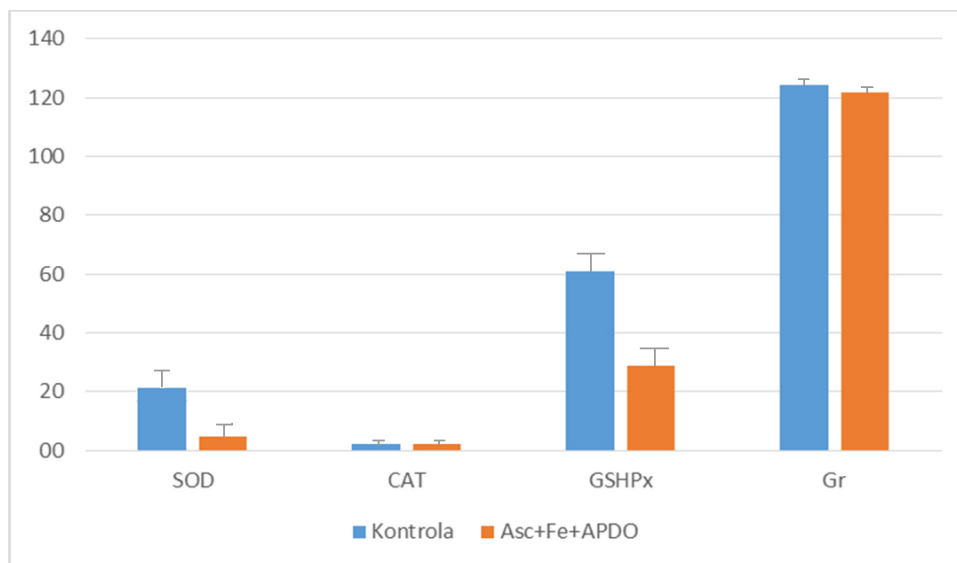
Važno je napomenuti da su efekti PGDO na kolonije *S. aureus* bili manje izraženi, u poređenju sa efektima na kolonije *E. coli*.

4.5. Određivanje promena na sistemima zaštite bakterija od oksidacionih oštećenja preko određivanja aktivnosti antioksidacionih enzima u *E. coli* i *S. aureus*.

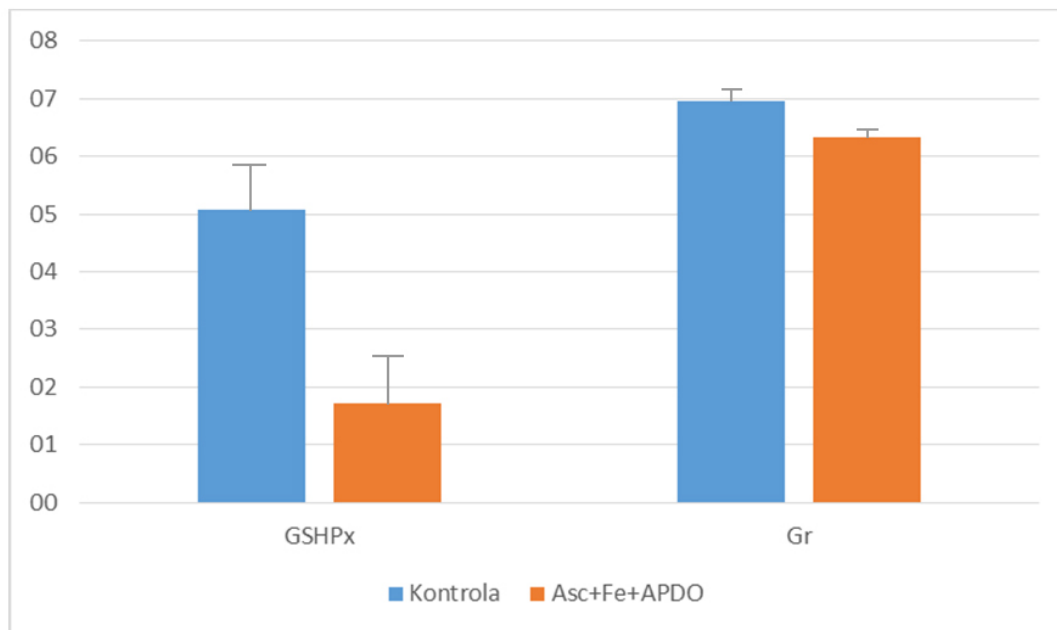
Na slici 4.11. data je aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja u *E.coli* kod kontrolne probe i nakon tretiranja Fenton reaktantima i APDO.

Na slici 4.12. data je aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja u *S. aureus* kod kontrolne probe i nakon tretiranja Fenton reaktantima i APDO.

Poređenjem rezultata na slikama 4.11. i 4.12. na kojima su prikazane aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja (SOD, CAT, GSHPx i Gr) kod *E. coli* i (GSHPx i Gr) kod *S. aureus*, uočeno je da postoji statistički značajna razlika kod GSHPx u odnosu na ostale enzime. Naime kod ovog enzima primećeno je značajno smanjenje aktivnosti, nezavisno od toga da li se radilo o kolonijama *E. coli* ili kolonijama *S. aureus*. Kod *E. coli* aktivnost SOD je značajno manja nakon tretiranja Fenton reaktantima i APDO u poređenju sa kontrolom.



Slika 4.11. Aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja SOD, CAT, GSHPx i GR kod *E.coli* -kontrola i nakon tretiranja Fenton reaktantima i APDO. Vrednosti su izražene u jedinicama na mg proteina (**U/mg proteina**), $p < 0,001$ za GSHPx.

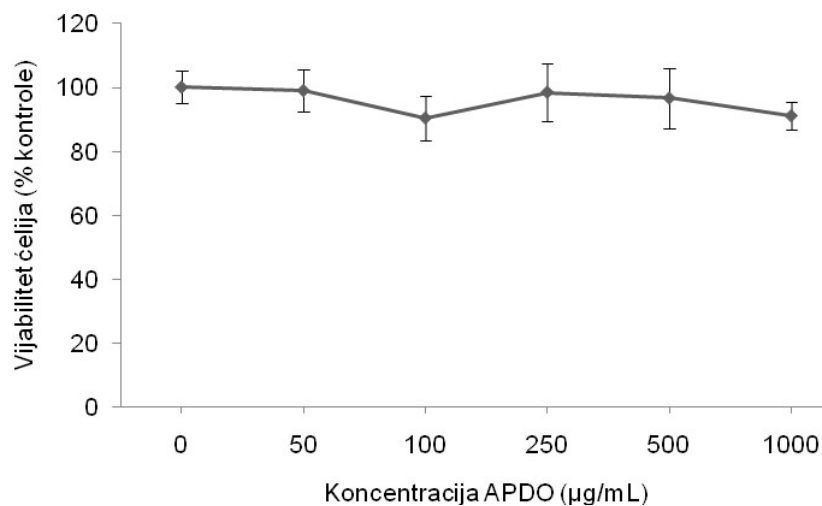


Slika 4.12. Aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja GSHPx i Gr kod *S. aureus* -kontrola i posle tretiranja Fenton reaktantima i APDO. Vrednosti su izražene u jedinicama na mg proteina (**U/mg proteina**), $p < 0,001$ za GSHPx.

4.6. Testovi efekata derivata pektina na imuni sistem

4.6.1. Uticaj APDO na vijabilitet makrofaga

Prvobitni cilj istraživanja bio je da se ispita uticaj APDO na vijabilitet makrofaga. Jedna grupa ćelija je tretirana samo LPS-om (kontrolna grupa), dok su sve ostale grupe pored LPS-a tretirane i rastućim koncentracijama APDO (50-1000 $\mu\text{g/mL}$). Zapaženo je da APDO ne izaziva smrt ćelija ni pri jednoj od primenjenih koncentracija. Prikaz dobijenih rezultata vidi se na slici 4.13.

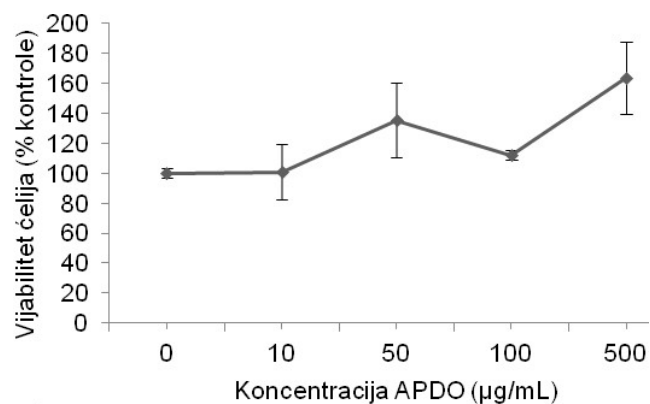


Slika 4.13. Uticaj APDO na vijabilitet makrofaga: Makrofagi pacova ($1,6 \times 10^6$ ćelija/mL) stimulisani su sa LPS-om (koncentracije 10 ng/mL) i tretirani različitim koncentracijama APDO, osim kontrolnih ćelija (označene sa 0). Vijabilitet je određen MTT testom, pri čemu je apsorbancija merena na 540 nm. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ procenta kontrole, pri čemu je vijabilitet netretiranih, kontrolnih ćelija uzet kao 100%.

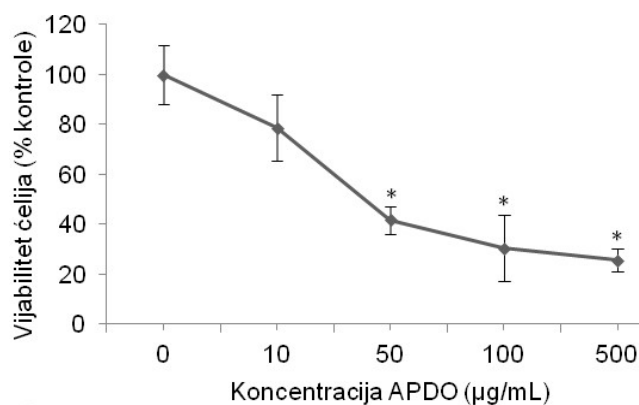
4.6.2. Uticaj APDO na vijabilitet ćelija cervikalnih limfnih čvorova (CLNC)

Uticaj APDO na vijabilitet ovih ćelija je određivan 24 i 48 h nakon tretmana.

APDO nakon 24 h (Slika 4.14a) nije u statistički značajnoj meri uticao na vijabilitet CLNC, dok je nakon 48 h (Slika 4.14.b) izazvao značajno smanjenje vijabiliteta ovih ćelija, pri čemu je efekat dozno zavisian.



a)



b)

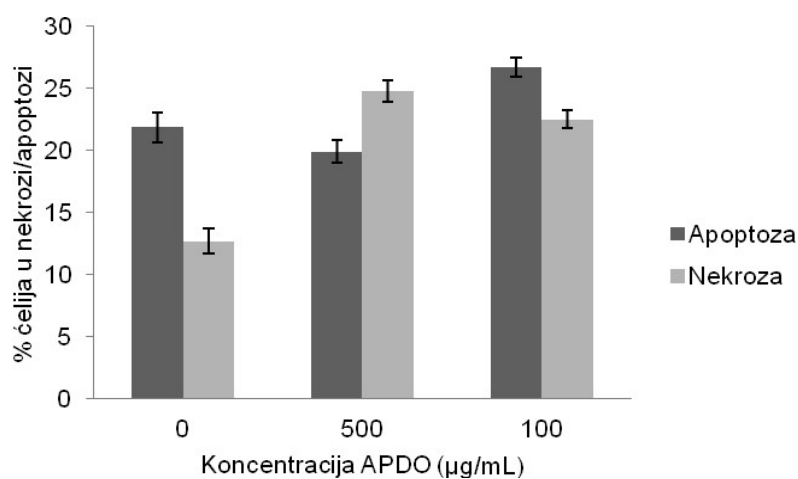
Slika 4.14. Vijabilitet ćelija cervikalnih limfnih čvorova 24 h (a) i 48 h (b) nakon tretmana sa APDO: CLNC (5×10^6 ćelija/mL) su stimulisane sa ConA ($2,5 \mu\text{g/mL}$) i tretirane rastućim koncentracijama APDO. Vijabilitet je određen MTT testom, pri čemu je apsorbancija merena na 540 nm. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$ procenta kontrole, pri čemu je vijabilitet netretiranih, kontrolnih ćelija uzet kao 100% (* $p < 0,05$ predstavlja statističku značajnost razlike tretmana u odnosu na kontrolnu grupu označenu sa 0).

4.6.2.1. Priroda smanjenja vijabiliteta ćelija cervikalnih limfnih čvorova pod uticajem APDO

Merenje procentualne zastupljenosti nekrotičnih i apoptotičnih ćelija protočnom citofluorimetrijom, nakon aneksin V-FITC/propidijum-jodid dvojnog bojenja CLNC

tretiranih različitim koncentracijama APDO, nije pokazalo statistički značajne promene u broju mrtvih CLNC u odnosu na kontrolnu probu (Slika 4.15).

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je zapaženo smanjenje vijabiliteta CLNC i SPC, pod uticajem APDO nakon 48 h, verovatno posledica antiproliferativnog delovanja ovih molekula.



Slika 4.15. Uticaj APDO na apoptozu/nekrozu ćelija cervikalnih limfnih čvorova pacova nakon 48 h: Procenat ćelija u apoptozi i nekrozi je određivan aneksin V-FITC/propidijum-jodid bojenjem CLNC, nakon kultivacije u odsustvu i prisustvu APDO (500 i 100 $\mu\text{g/mL}$) u trajanju od 48 h.

5. DISKUSIJA

Pektin je kompleksan polisaharid i jedan od glavnih komponenti ćelijskog zida kopnenih biljaka. Karakteristike pektina mogu varirati u zavisnosti od izvora biljke iz koje se ekstrahuje ali isto tako iz iste biljke ili čak istog ćelijskog zida mogu se dobiti pektini sa različitim osobinama (28).

Pektin je rastvorljiv u čistoj vodi ali se ne rastvara u alkoholu i drugim polarnim rastvaračima. Razgranatiji pektini su rastvorljiviji u odnosu na manje razgranate ili linearne pektine (grananje redukuje vodonične veze između polimera i time favorizuje rastvaranje). Pektin se ne rastvara u vodi ako uslovi favorizuju geliranje.

Stabilnost pektina u vodenim rastvorima je pod uticajem temperature i pH. Pektin je slaba kiselina, najstabilniji je u vodenim rastvorima na pH oko 4 (pH 3.5-4.5). Na neželjenim temperaturama i pH >4.5 ili pH <3 može se degradirati putem depolimerizacije i/ili deesterifikacije. U vodenim rastvorima su moguće dve vrste degenerativnih reakcija, β eliminacija koja "lomi" pektinski lanac i demetilacija koja smanjuje stepen esterifikacije. Ove reakcije se dešavaju i pri neutralnom pH (npr. u prirodnom mleku) tokom dužeg vremena u odsustvu ili prisustvu toplote (236). Nizak pH povećava procenat nejonizovanih karboksilnih grupa.

Pektini imaju relativno nisku viskoznost u vodi u poređenju sa drugim biljnim hidrokolidima. Viskoznost pektinskih rastvora raste sa porastom koncentracije. Ona je veoma važan fizički parametar za pektine u pogledu prerade hrane i fizioloških efekata na čoveka (74, 237).

Faktori koji utiču na rastvorljivost i koloidalna svojstva su DM, naelektrisanje, koncentracija, stepen grananja, kompozicija bočnih lanaca, obim polimerizacije, MW, veličina čestica polimera, kao i uslovi sredine kao što su temperatura, pH i elektroliti. Naelektrisani polisaharidi su obično lakše rastvorljivi u odnosu na neutralne lance.

Reološke karakteristike ovih rastvorljivih vlakana zajedno sa zadržavanjem vode i gelirajućim kapacitetom imaju uticaj na gastrointestinalni trakt (GIT) tj. modifikuju morfologiju, gustinu i karakteristike površine intestinalne barijere posledično prouzrokujući promene u pražnjenju želuca i mobilizaciji sadržaja (238).

HM pektin može formirati gel samo u prisustvu šećera u kiselim uslovima. LM pektin može formirati gel relativno nezavisno od sadržaja rastvorljivih čvrstih

suspcanci i pH vrednosti, u prisustvu kalcijumovih jona (Ca^{2+}) (5, 239). Sposobnost formiranja gela LM pektina raste sa smanjenjem stepena metilacije (DM), dok visok sadržaj šećera interferira sa formiranjem gela (dehidratacija šećera favorizuje vodonične veze i smanjuje unakrsno vezivanje dvovalentnim jonskim silama). Amidacija poboljšava sposobnost geliranja LM pektina. Što je više amidnih grupa prisutno, formiraju se jači gelovi. Monovalentni jon kao što je natrijum (Na^+) koji takođe može reagovati sa slobodnim karboksilnim grupama, može uticati na formiranje gela zato što smanjuje ukrštene veze Ca^{2+} i poboljšava solubilnost LM pektina u njegovom prisustvu (61, 240).

Razlike između HM i LM pektina leže ne samo u stepenu metilacije nego i u molekularnoj težini, dužini polimera i stepenu razgranatosti ili ukrštanja ("cross-linking") (241). Generalno, HM pektin ima veću molekularnu težinu, duže i više upletene lance u poređenju sa LM pektinom koji je od njega izveden. Hemijske razlike između HM i LM pektina doprinose njihovim različitim fizičko-hemijskim osobinama i funkcionalnim svojstvima u primeni u hrani i tokom digestije kod čoveka. LM gel je termo-reverzibilan i premošćen putem dvovalentnih jona kao što su Ca^{2+} i dimerizacijom lanaca poligalakturonata, formirajući strukturu nalik "kutiji za jaja" ("egg-box" structure) (242). Sposobnost LM pektina da gelira preko širokog spektra pH i rastvorljivih čvrstih sadržaja, naročito u uslovima sa niskom koncentracijom ili bez šećera ali pri visokom pH, omogućava njihovu primenu za proizvode sa niskim koncentracijama ili bez sadržaja šećera (243). LM pektinski gelovi su relativno slabi ali njihova jačina zavisi od koncentracije Ca^{2+} i molekularskih karakteristika pektina. LM pektini imaju manje razlike između temperature podešavanja i topljenja u poređenju sa HM pektinom. LM pektin pokazuje prednosti u odnosu na HM pektin u poboljšanju konzistencije voćnih džemova (61). Amidovani pektini su važni derivati pektina sa dobrim gelirajućim sposobnostima pri niskoj koncentraciji šećera. Obično se koriste da zamene LM pektine (244). Oni su termo-reverzibilni dok ne-amidni LM pektini formiraju termostabilne gelove. Viskoznost rastvora amidnih pektina može biti ili slična ili veća nego rastvora sa HM i LM pektinima. Dalja amidacija karboksilnih grupa na LM pektinu promovise gelirajući kapacitet. Tako, amidni pektin pripada kategoriji LM pektina ali poseduje prednosti u višem stepenu termoreverzibilnosti, bolje tolerancije kalcijumskih varijacija, čvršćim gelovima na nižim koncentracijama Ca^{2+} (243).

Temperatura geliranja obično raste sa povišenom amidacijom. Ali amidni pektini ne mogu formirati gelove iste jačine ili tako brzo kao LM zbog pozitivnog naelektrisanja (naboja) uvedenog duž polimernog lanca.

Pektin je hidrofilni biopolimer zbog prisustva velikog broja polarnih hidroksilnih i karboksilnih grupa u svom molekulu. Hidrataciona svojstva ili kapacitet vezivanja vode su krucijalni za potencijalne aplikacije pektina u različitim oblastima. Kada se pektin disperguje u vodi, neke od kiselih grupa se jonizuju, a voda kao polarni molekul vezuje obe grupe. Glavne hidrofilne grupe u Gal A (glavnom sastojku pektina) su hidroksilna, amidna i karboksilna grupa. Svaka od njih se razlikuje u sposobnosti vezivanja vode. HM pektin pokazuje gotovo dva puta veću sposobnost vezivanja vode od LM pektina. Zaključak je da hidrofobnost opada sa opadanjem sadržaja metil estara pektina (244). Panchev i saradnici (245) su proučavali apsorpciju vode iz hidrokoloida (kao pektinskih supstanci) i zaključili da je to kompleksan proces pod uticajem multiplih faktora. Neutralni šećeri mogu imati uticaj i na sposobnost vezivanja vode.

Pektini se koriste u prehrambenoj industriji. Međutim, malo je biljaka koje se mogu koristiti kao komercijalni izvor pektina. To je zato što sposobnost pektina da formira gel uglavnom zavisi od njegove molekulske težine (MW) i njegovog stepena esterifikacije (DE). Kapacitet geliranja pektina je drugačiji u zavisnosti od izvora ekstrakcije. Zbog toga, činjenica da biljka sadrži veliku količinu pektina nije dovoljan indikator ove biljke da je dobar izvor komercijalnog pektina (246). Glavni izvori pektina u prehrambenoj industriji su kaša od jabuke i kora citrusa (27), oba dobijena iz ostatka tokom prerade ovog voća. Za potrebe prehrambene industrije, dobijeni pektini od jabuka i citrusa imaju slične karakteristike. Citrusni pektini su svetliji, dok su pektini jabuka uglavnom tamniji. Alternativni izvori uključuju ostatke od šećerne repe tokom proizvodnje šećera, ostatke glave suncokreta (semena korišćena za jestivo ulje) i ostatke prerade manga (75).

Jabuke kao najkonzumiranije voće, predstavljaju bogat izvor pektina. Oko 71% jabuka se konzumira kao sveža jabuka, oko 20% se obrađuje u produkte sa dodatnom vrednošću od čega se 65% prerađuje u koncentrovani sok od jabuke i druge produkte koji uključuju gotov sok od jabuke, jabučni cider, vino i vermut, pire od jabuke, džem i sušene proizvode od jabuka (247). Jedan od "ostataka" pri industrijskoj preradi jabuka

je jabučna kaša koja se dobija nakon ekstrakcije soka, i predstavlja bogat izvor pektina. Obzirom da je u Srbiji značajna proizvodnja jabuka, a cena jabuka druge i treće klase kao mogućeg izvora jabučnog pektina je izuzetno niska, mi smo odlučili da uporedimo efekte derivata dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog i citrusnog pektina i otkrijemo mehanizme preko kojih tako dobijena jedinjenja ostvaruju svoje biološke efekte.

Najčešće korišćene metode za ekstrakciju pektina su putem direktnog ključanja (“direct boiling”) i ekstrakcija mikrotalasnim grejanjem (“microwave heating extraction”). Ukratko, ekstrakcija pektina se vrši na niskom pH (1.5-3) tretmanom kiselinom, i na visokoj temperaturi (70-90 °C). Kiseline koje se koriste su hlorovodonična, azotna i sumporna kiselina. Ovim postupkom je dozvoljena ekstrakcija i solidifikacija pektina iz biljaka. Kada je dobijen sirov ekstrakt, pektin se odvaja iz jabučne kaše i kore citrusa putem filtracije ili centrifugiranjem. Potom, pektin se odvaja iz prečišćenog ekstrakta putem precipitacije sa alkoholom ili soljenjem. Nakon uklanjanja u alkoholu rastvorljivih nečistoća, pektin se suši da bi se uklonila vlaga a finalni proizvod je prah sa česticama jednake veličine. Pektini dobijeni ovim načinom ekstrakcije su HM pektini, a u nekim slučajevima ako je potrebno vrši se deesterifikacija da bi se dobio LM pektin (26, 248). Pod ovom zajedničkom metodom ekstrakcije komercijalni pektini su u suštini sastavljeni od HG i sadrže samo male količine neutralnih šećera (74). Molekularna težina komercijalnih pektina je od 80-400 KDa. Da bi se industrijski proizvod nazvao pektinom u Evropskoj Uniji, on mora sadržati najmanje 65% α -D-galakturonske kiseline (61).

Pozitivni efekti pektina na zdravlje ljudi uočeni su relativno rano i do sada je opisan širok spektar njegovih korisnih efekata (kao dijetalno vlakno, potencijalni prebiotik, imunomodulacija, detoksikaciona uloga, hipoholestreolemijski i hipoglikemijski efekat, antioksidativna i antikancerogena uloga). U mnogobrojnim studijama na životinjama, a nešto manje na ljudima, pokazano je da pektin doprinosi smanjenju nivoa holesterola u jetri i serumu i povećanja u fecesu. Jabučni pektin smanjuje nivo plazmatskog holesterola kod ljudi (249). U ranijim studijama je utvrđeno da konzumacija 3 jabuke dnevno tokom 4 meseca signifikantno redukuje totalni holesterol, i povećava HDL holesterol kod 76 umereno hiperholesterolemijskih subjekata u poređenju sa kontrolnom grupom (manje od 3 jabuke dnevno) (250). Ovo

može delimično objasniti pozitivne efekte uključivanja jabučnog i citrusnog pektina u dijetu radi sprečavanja nekih danas frekventnih oboljenja (78, 139, 141).

Primenom novih tehnologija može se dobiti rastvorni fermentabilni pektin koji u dijeti proporcionalno smanjuje unos hrane, telesnu masu i sadržaj masti u telu što je povezano sa proporcionalnim povećanjem hormona sitosti, GLP-1 i PYY, i intestinalnom hipertrofijom, podržavajući ulogu rastvornih dijetnih vlakana u zdravoj regulaciji telesne mase (251). Efekti nerastvornih biopolimera na peristaltiku gastrointestinalnog trakta su dobro proučeni. Eksperimenti su pokazali produženje vremena pražnjenja želuca sa 23 na 50 min ishranom koja je bogata pektinom (252).

Tradicionalno, vlakna su klasifikovana prema njihovoj hemijskoj strukturi i fiziološkoj aktivnosti. Sadrže mnogobrojne funkcionalne grupe koje mogu učestvovati u različitim hemijskim reakcijama (253). Ove reakcije obezbeđuju svojstva dijetalnih vlakana kao što su zadržavanje vode, povećanje zapremine ("bulk volume") i viskoznost, koje variraju sa pH i jonskim okruženjem tokom tranzita kroz GIT (254, 255).

Poslednjih godina, većina epidemioloških studija je pokazala da pektinska vlakna igraju veoma važnu ulogu u sprečavanju nastanka nekih hroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes melitus tip II, gojaznost, gastrointestinalni poremećaji i određeni karcinomi (256-260). Smatra se da uloga pektina u ovim bolestima zavisi od njegovih fizičko-hemijskih svojstava, posebno njegove rastvorljivosti u vodi, viskoznosti i fermentabilnosti (261).

Utvrđeno je da pektin ima veliki uticaj na digestivno zdravlje, na sitost i kontrolu apetita, smanjuje rizik od gastrointestinalnih bolesti kao što su sindrom iritabilnih creva (IBS -,"irritable bowel syndrom"), inflamatorne bolesti creva (IBD -,"inflammatory bowel disease") i smanjuje incidencu karcinoma kolona. U kombinaciji sa kaolinom u oralnim formulacijama može imati antidijarejalni efekat. Ipak, mehanizmi koji su u osnovi ovih povezanosti nisu dobro utvrđeni. U odsustvu složenijih naučnih dokaza, spekulise se da je deo pozitivnog efekta pektina posledica njegovog uticaja na kompoziciju crevne mikrobiote i njihovu metaboličku aktivnost.

Pektin može takođe uticati na metabolizam hranljivih materija kao što je digestija proteina, i aktivnost digestivnih enzima kao što su amilaza i lipaza (262, 263).

Sve je veća primena pektina u farmaceutskoj industriji kao nosača oralnih lekova i kao sredstva za inkapsulaciju različitih bioaktivnih supstanci. Npr. mesalazin i probiotik su inkapsulirani u pektinski omotač sa ciljem da lek bude zaštićen od želudačne sredine, i da može dospeti u region kolona. Nađeno je da to može biti koristan, kolon specifičan način dostave leka za tretman ulceroznog kolitisa. Do sada su pektinom inkapsulirani različiti lekovi za tretman inflamatornih bolesti creva (IBD), za specifičnu dostavu do kolona (sulfasalazin, olsalazin, mesalazin, budezonid), karcinoma kolona (5-FU, doksorubicin, metotreksat), metaboličkih deficita (liposolubilni vitamini, žučne soli i neki steroidi) (162, 264). Pektin je našao svoju primenu i u regenerativnoj medicini.

Pektin je kompleksan polisaharid koji se sastoji od najmanje 17 različitih monosaharida međusobno povezanih sa preko 20 različitih veza. Osnovnu strukturu čine linearni lanci homogalakturonana (HG), ramnogalakturonana I (RG I) i ramnogalakturonana II (RG II), koji variraju po veličini, grananju i funkciji (10, 12). HG čini više od 60% ukupnog pektina i predstavlja njegov osnovni lanac. Najčešće se sastoji od 70-120 molekula galakturonske kiseline (Gal A; takođe se naziva i poligalakturonska kiselina i pektat) koje su povezane u linearni lanac α 1,4 glikozidnim vezama (1, 12). RG-I je jedinstven među pektinskim polisaharidima, jer mu je osnovni lanac sastavljen od ponavljajućih disaharida Gal A i α -L-ramnoze (Rha) [4] - α -D-GalA- (1,2) - α -L-Rha- (1,_n). Predstavlja ~20-30% ukupnog pektina (1, 17). Bočni lanci RG I mogu sadržati dalje grananje na određenim položajima (O-2 i O-3 za arabinane i O-3 i O-6 za galaktane) sa sledećim šećerima: arabinoza, arabinan, galaktan, arabinogalaktan (10, 12, 18). Najkomplikovaniji domen pektina je RG II koji čini oko 10% (1). Sastoji se od osnovnog lanca HG (~ 7-9 α 1,4-povezanih GalA) i četiri (A-D) dobro definisana bočna lanca (16). Kompleksna struktura omogućava da se hemijskim postupcima dobije širok spektar derivata čije se osobine mogu značajno razlikovati od osobina samog pektina, te mogu imati drugačiju primenu u odnosu na polazni materijal.

Crevna mikrobiota igra veoma važnu ulogu u ljudskom zdravlju, ne samo učestvujući u varenju, već i održavanjem imunološke i fiziološke homeostaze (88). Ona metabolišu nedigestibilne hranljive supstance, sintetišu vitamine (Vit B12 i K),

obezbeđuju barijeru protiv invazivnih patogenih mikroorganizama i ojačavaju tesne veze (“tight junctions”) intestinalnih epitelnih ćelija (89). Bifidobakterije, laktobacili i butirat produkujúće bakterije (kao što su *Faecalibacterium prausnitzii* i *Eubacterium rectale*) se smatraju bakterijama koje promovíšu zdravlje i koje su uključene u saharolitičku fermentaciju produkujúći SCFA (86, 89). Nasuprot tome, prekomerni rast drugih bakterija, kao što su *Enterobacteriaceae* i određenih grupa klostridija je povezano sa negativnim implikacijama po zdravlje.

Intestinalni trakt je izgleda primarno mesto korisnih delovanja dijetalnih pektina i njegovih derivata. Prisustvo pektina utiče na kompoziciju i aktivnost mikrobiota, time i na produkciju kratkolančanih masnih kiselina (SCFA). Stoga, postoje brojni dokazi da pektin iz hrane može funkcionisati kao prebiotik. Pektini imaju ogroman potencijal u modifikaciji intestinalnih mikrobiota, ali se ove modifikacije dešavaju na nivou pojedinačnih sojeva i vrsta i nije ih lako predvideti a priori (265). Mehanizmi efekata koje pektin ima na mikrobiotu nisu u potpunosti jasni a jedan od razloga je i složena struktura jabučnog pektina koji varira u zavisnosti od izvora (203).

Dosadašnji rezultati ukazuju na to da pektini ili oligosaharidi izvedeni iz pektina, nezavisno od izvora voća ili povrća iz kojeg su dobijeni, imaju potencijal da budu metabolisani i povećavaju populaciju potencijalno korisnih bakterija. Shinohara i saradnici su pokazali da sojevi *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Bacteroides* metabolišu pektin iz jabuke; međutim, drugi crevni izolati koji pripadaju vrsti *Escherichia coli*, *Eubacterium limosum* i *Clostridium perfringens*, ne mogu. Takođe, kada su fekalne kulture inkubirane zajedno sa jabučnim pektinom, broj *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* se značajno povećao (266, 267). Tokom poslednjih godina u nekim istraživanjima su se koristili *in vitro* modeli fermentacije da bi se dokazao uticaj pektina na bakterijski rast. Procena prebiotskih svojstava pektinskih oligosaharida (POS) iz jabuke, korišćenjem fekalnih fermentisanih kultura, je pokazala da su ovi šećeri u mogućnosti da povećaju broj *Bifidobacteria* i *Lactobacillus*-a i smanje broj *Bacteroides* i *Clostridie*. Pored toga, utvrđeno je da oligosaharidi dobijeni iz pektina kore pomorandže u mešovitim fekalnim bakterijskim kulturama povećavaju broj *Bifidobacteria*, a arabinanom bogata frakcija poreklom iz pektina šećerne repe, selektivno stimuliše rast *Bifidobacteria* u fekalnim fermentisanim kulturama čoveka

(268, 269). Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu pektina u modulisanju sastava i aktivnosti crevnih mikrobiota.

U *in vivo* studijama je pokazano da jabučna kaša povećava *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroidacea species*, *Eubacterium rectal* kao i SCFA kod pacova. Od svih komponenti jabuke, Licht i saradnici su sugerisali de je pektin odgovoran za smanjenje *Bacteroides sp.* i povećanje *Clostridium coccoides* i butirata kod pacova. Jabučni pektin takođe doprinosi održanju balansa intestinalnih mikrobiota; on je vratio u normalu odnos *Firmicutes/Bacteroidetes* kod gojazno indukovanih pacova (204). Kao dijetalno vlakno može imati snažan uticaj na intestinalnu mikrobiotu jer ima jak bakteriostatski efekat na *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (205). Do sada su uglavnom efekti jabuke na intestinalnu mikrobiotu proučavani na životinjama. Studije na ljudima su još uvek malobrojne. U malom istraživanju na 8 pacijenata, 2 jabuke dnevno tokom 2 nedelje su signifikantno povećale bifidobakterije a redukovale *Enterobacteriaceae* i lecitinaza pozitivnu Klostridiju uključujući i *Clostridium perfringens* (203). U skorašnjoj studiji sprovedenoj tokom 4 nedelje na 23 volontera, unos cele jabuke i jabučne kaše je smanjio fekalni pH, ali nije dokazana promena u kompoziciji mikrobiota (206).

Chen i saradnici (268) su primenom dinamične mikrofluidizacije pod visokim pritiskom (DHPM) iz jabučnog pektina dobili pektinske oligosaharide (POS -pectic oligosaccharides) koji su sadržali 29,56% galakturonske kiseline i 58,53% neutralnih šećera. POS su u mešovitim fekalnim bakterijskim kulturama povećali broj *Bifidobacteria* i *Lactobacilla*, i proizveli veću koncentraciju sirćetne, mlečne i propionske kiseline u odnosu na pektin iz kojeg su dobijeni. Šta više, POS su smanjili broj *Bacteroides* i *Clostridia*, dok je pektin povećao broj istih. Efekat POS na rast bakterija i produkciju SCFA uporedivi su sa efektima najviše proučavanog prebiotika, fruktooligosaharida (268). Kao i POS koji su generisani putem pektinaza intestinalnih mikrobiota i pektinski oligosaharidi koje smo mi dobili se mogu klasifikovati kao funkcionalna hrana. Dok je primarna uloga hrane da ispuni osnovne nutritivne zahteve domaćina za održavanje i rast, neke komponente hrane prevazilaze ovu ulogu tako što pružaju i dodatne pogodnosti za zdravlje organizma (270).

Modifikovani pektin se može koristiti kao potencijalno bezbedan, netoksičan pristup za prevenciju ili redukciju različitih tipova kancera, kao što su kancer prostate (271), kancer kolona (154), dojke (154), melanom (272), multipli mijelom (273) i hemangiosarkom (274). Iako je uočen pozitivan efekat pektina u terapiji karcinoma, mehanizam indukcije apoptoze od strane pektina nije još uvek poznat. Rasvetljenje mehanizama je komplikovano upravo zbog strukturne kompleksnosti ovog polisaharida, modifikacije strukture tokom ekstrakcije iz biljaka, i dodatne modifikacije strukture, koja je rezultat različitih fragmentacionih tehnika koje se koriste da bi se proizvodio specijalizovani pektin (275). Pored indukcije apoptoze, poznato je da se pektin vezuje za karcinogene u crevima kao i za supstance koje promovišu karcinogenezu, kao što su insulin i insulinu sličan faktor rasta (Insulin-like growth factor).

Opisano je nekoliko mehanizama putem kojih pektin inhibiše karcinogenezu u kolonu -tako što povećava apoptozu, usporava proliferaciju kolonocita, redukuje aktivnost β -glukuronidaza, stimuliše rast bifidobakterija i produkciju SCFA (123). Proizvodnja SCFA (pogotovo butirata) smanjuje pH kolona, koji je utvrđeno da ima zaštitni efekat protiv karcinoma debelog creva (276). SCFA mogu takođe stimulisati pro-apoptotske puteve (npr. Kaspaza-3) unutar intestinalnih ćelija (277). Indukcija apoptotskih kaskada rezultira inhibicijom rasta i "istrebljenjem" ćelija raka debelog creva, što ukazuje na to da pektinom bogata hrana može imati zaštitnu ulogu protiv karcinoma debelog creva (137).

Do sada su opisani različiti postupci kojima se može modifikovati pektin a koji uključuju depolimerizaciju (hemijsku, fizičku i enzimsku degradaciju), elongaciju lanca (unakrsno povezivanje i *grafting*) i reakcije supstitucije (alkilovanje, reakcije građenja amida, kvaternizacija, reakcije sa tiolnom grupom, sulfonovanje i oksidacije, itd) (268). Pored različitih metoda modifikacije, struktura i biološka aktivnost derivata jako zavisi od izvora pektina. Pokazalo se nedavno da strukture pektina izolovane iz različitih vrsta pokazuju veliku raznovrsnost (278). Imajući u vidu složenu strukturu pektina mi smo primenili alkalnu hidrolizu i vodonik peroksid za dobijanje derivata jabučnog pektina, pri čemu smo dobili oligosaharide rastvorljive u vodi. Ova metoda je prethodno bila korišćena na polisaharidima iz breskvine gume (224).

Proces modifikacije (polazni materijal i produkt) pratili smo FTIR-om. Naši rezultati ukazuju da je polazni materijal nisko metilovan pektin (LM) i da je to svojstvo i proizvoda što se poklapa sa literaturnim podacima da se LM pektin obično dobija blago alkalnim tretmanom iz HM pektina (5, 12, 21). Metoda derivatizacije pektina koju smo mi primenili pripada metodama hemijske depolimerizacije sa oksidacijom. U spektru pektina javlja se veoma intenzivna traka na 1737 cm^{-1} koja se pripisuje istezanju karbonila iz karboksilnih grupa, kao i traka na 1229 cm^{-1} koja odgovara vibracijama savijanja van ravni hidroksilnih i karboksilnih grupa. Ove apsorpcione trake su gotovo u potpunosti odsutne u spektru derivata pektina, gde su dominantne trake na 1434 cm^{-1} i 1632 cm^{-1} koje ukazuju na simetrične i asimetrične vibracije istezanja karboksilatnih grupa. Trake koje potiču od deformacionih vibracija vode (1628 cm^{-1}) su jasno uočljive u spektru pektina, dok se u spektru APDO preklapaju sa signalima istezanja karboksilatnih grupa. Poslednjih godina se sve više pridaje pažnja oksidaciji pektina zato što ovako dobijeni derivati imaju više reaktivnih grupa i bržu degradaciju. Do sada su se koristili uglavnom kao podrška u kontrolisanoj dostavi lekova. Mogu se koristiti za imobilizaciju lekova i za formiranje hidrogela sa unakrsnim linkerima (60, 62). Elboutachfaiti i saradnici su vršili depolimerizaciju komercijalne poligalakturonske kiseline, slobodnim radikalima bakra kao metalnog katalizatora. Slobodan $\cdot\text{OH}$ je generisan neenzimskom Fentonovom reakcijom između Cu^{2+} i H_2O_2 . Ova metoda je dokazana kao pogodna za veoma brzo dobijanje velikih količina oligogalakturonida (279).

Primenom metode elektron paramagnetne rezonancije (EPR) identifikovali smo realne radikalske vrste koje nastaju u reakciji gvozdža sa vodonik peroksidom (Fentonova reakcija). To je hidroksidni radikal okarakterisan na osnovu karakterističnih linija u EPR spektru posle interakcije sa spin probom DMPO. Utvrdili smo da prisustvo derivata pektina dobijenih iz jabuke (APDO), iz citrusa (CPDO) ili poligalakturonske kiseline (PGDO), u reakcionoj smesi Fentonove reakcije dovodi do promene u proizvodu Fentonove reakcije. Umesto hidroksidnog radikala, kao produkt se pojavljuje ugljen dioksidni radikal anjon ($\cdot\text{CO}_2^-$), takođe poznat u literaturi i kao “formate radical anion”. Za $\cdot\text{CO}_2^-$ radikal je poznato da ima duži poluživot u biološkim sistemima u odnosu na hidroksidni radikal i da specifično reaguje sa proteinskim molekulima. Iz naših rezultata je jasno da oligosaharidi iz poligalakturonske kiseline i oligosaharidi iz

jabučnog i citrusnog pektina reaguju sa hidroksidnim radikalom ($\cdot\text{OH}$) i produkuju $\cdot\text{CO}_2$. Takođe se može jasno primetiti da ove supstance ne smanjuju intenzitet EPR signala za rezultujući DMPO adukt već ih povećavaju. Ovo se može objasniti većom stabilnosti $\cdot\text{CO}_2$ radikala u poređenju sa $\cdot\text{OH}$ radikalom (280), što rezultuje u većem prinosu adukta. Oligosaharidi dobijeni alkalnom hidrolizom jabučnog pektina promovisu produkciju $\cdot\text{CO}_2$ (za otprilike 60%) u poređenju sa onim dobijenim iz PGA ili citrusa. U literaturi nalazimo da je već ranije detektovano da komercijalna PGA i pektin iz citrusa reaguju sa $\cdot\text{OH}$ i produkuju superoksidni radikal anjon ($\cdot\text{O}_2^-$) i $\cdot\text{CO}_2$ (281, 282). Takođe Zegota je pokazao da pektin i $\cdot\text{OH}$ radikal reaguju i produkuju pektin C(5) radikal, koji dalje reaguje sa O_2 time gradeći C(5) peroksidni radikal. Taj radikal je nestabilan i dalje podleže dekompoziciji (283). Strukturne promene izazvane hemijskim modifikovanjem pektina izgleda da potenciraju dekompoziciju do $\cdot\text{CO}_2$ radikala i nekih drugih EPR-ne reagujućih fragmenata, i da sprečavaju produkciju $\cdot\text{O}_2$ radikala. Za $\cdot\text{CO}_2$ radikal je poznato da specifično cilja proteine (280). Ova osobina $\cdot\text{CO}_2$ radikala može takođe, makar delimično, biti odgovorna za bakteriostatske/baktericidne efekte koje smo u daljim eksperimentima pokazali za oligosaharide produkovane iz jabučnog pektina. Ova osobina $\cdot\text{CO}_2$ može takođe makar delimično objasniti do sada uočen širok spektar bioloških efekata derivata pektina od anti-tumorskih do bakteriostatskih/baktericidnih. U literaturi je već sugerisano da su POS bolji kandidati za prebiotike od pektina (284) ali su naši rezultati prvi koji ukazuju na mogući mehanizam preko koga se ostvaruju takvi efekti pektinskih oligosaharida.

Da bi proverili tu pretpostavku, testirali smo efekte derivata pektina *in vitro* na tipičnim predstavnicima gram pozitivnih i gram negativnih bakterija u prisustvu gvožđa i vitamina C. Gvožđe i vitamin C u gastrointestinalnom traktu stvaraju uslove za Fentonovu reakciju. Direktni antibakterijski efekat pokazali su Yao i saradnici (225) pri čemu su oligosaharidi produkovani iz breskvine gume imali visoku antibakterijsku aktivnost prema *Bacillus subtilis*, *S. aureus* i *E. coli* u koncentraciji od 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bakterije su različito osetljive na indukciju Fentonove reakcije sistemom gvožđe /vitamin C. Kod *E. coli*, uobičajeni mehanizam indukcije ćelijske smrti baktericidnim antibioticima uključuje generisanje hidroksidnog radikala Fentonovom reakcijom (285). U tom radu je pokazano da vitamin C sterilise kulture, i na lekove rezistentnim i

ne rezistentnim *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Dok je *M. tuberculosis* visoko osetljiva na efekte vitamina C, druge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije nisu. Filogenetski, *E.coli* je član *Enterobacteriaceae*, i blisko je povezana sa patogenima kao što su *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia* i *Yersinia pestis*. *S. aureus* je povezan sa povećanim rizikom za razvojem različitih bolesti uključujući astmu i dijabetes. Naši rezultati ukazuju da oligosaharidi produkovani alkalnom hidrolizom jabučnog pektina imaju antibakterijska svojstva u sistemu askorbat (Asc)-gvozdje. Rezultati takođe ukazuju da produkcija $\cdot\text{CO}_2^-$ radikala, koja je ubrzana za oko 65% sa derivatima pektina od jabuke, u poređenju sa derivatima citrisnog pektina ili derivatima dobijenim od poligalakturonske kiseline, može biti odgovorna za antimikrobnu aktivnost derivata jabučnog pektina na *E.coli* i *S.aureus*. Koristili smo koncentraciju askorbata 100 μM , koja predstavlja maksimalnu koncentraciju Asc u plazmi posle oralne suplementacije.

Osnovni antioksidativni enzimski sistem čine sledeći enzimi: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px) i glutation reduktaza (GR). Jedno-elektronska redukcija superoksid-anjon-radikala ($\cdot\text{O}_2^-$) do H_2O_2 je ključni ćelijski događaj, budući da služi kao inicijalni korak u enzimskoj ROS ("reactive oxygen species") detoksifikacionoj kaskadi katalizovanoj superoksid-dismutazom (SOD), koja se završava daljom konverzijom H_2O_2 u H_2O i O_2 (u slučaju daljeg disproporcionisanja katalizovanog katalazom odnosno u H_2O) i oksidovani glutation (GSSG) (u slučaju redukcije peroksida glutation-peroksidazom, uz regeneraciju glutationa glutation reduktazom (GR)). Naši rezultati ispitivanja aktivnosti antioksidacionih enzima u *E. coli*, posle primene oligosaharida dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog pektina, ukazuju na smanjenje aktivnosti SOD i GSHPx u poređenju sa kontrolom. Poznato je da SOD podleže inaktivaciji različitim supstancama. Hodgson i Fridovich su prvi predložili mehanizam za inaktivaciju peroksidom i gubitak histidina u enzimu goveđih eritrocita u opsegu pH od 10,1 do 10,2. Ovaj mehanizam podrazumeva redukciju enzima sa peroksidom do forme enzimski vezanog oksidanta (označenog kao CuOH^{2+}) koji je odgovoran za oksidaciju histidina (286, 287). Salo i saradnici (288) su u svom radu obezbedili dokaze za peptidnu fragmentaciju, a Ookawara i saradnici (289) su pokazali da je ova fragmentacija uglavnom nasumična. Mesto-specifična fragmentacija (289) se dešava između Pro i

premošćujućeg His u humanim i goveđim enzimima. Kang i Kim su pokazali da na početku reakcije sa visokim koncentracijama peroksida peptidna fragmentacija se dešava tek nakon oslobađanja hidroksidnog radikala i posledica je peroksidazne aktivnosti enzima (290). Ovi rezultati ukazuju da se mesto specifična fragmentacija dešava sa manjom verovatnoćom u odnosu na oksidaciju histidina (289, 290). To je, verovatno, iz razloga što je udaljenost između bakra i osetljive peptidne veze veće nego između bakra i histidina. Značajna direktna fragmentacija se odvija jedino pod uslovima produženog izlaganja (20 časova) SOD-1 visokim koncentracijama H₂O₂. Naši rezultati ukazuju da gotovo da nema gubitka ukupnih proteina, što ukazuje da se ne dešava peptidna fragmentacija pod ovim uslovima tako da izgleda neki drugi oksidativni događaji dovode do gubitka aktivnosti enzima. Najverovatniji oksidacioni događaj je reakcija ugljendioksidnog radikala sa enzimom, verovatno u blizini aktivnog centra sa histidinom što dovodi do gubitka aktivnosti SOD. Sličan mehanizam se može pretpostaviti i za smanjenje aktivnosti GSH-Px. U lizatima *S. aureus* nismo mogli odrediti aktivnost SOD i CAT. Poredeći aktivnosti kontrola i tretiranih sa APDO našli smo smanjenje aktivnost GSH-Px. Možemo samo pretpostaviti da je uzrok isti kao kod *E.coli*, naime specifična reakcija ugljendioksidnog radikala sa aminokiselinama u blizini aktivnog centra GSH-Px.

Od velikog su interesa studije na životinjama i ljudima, koje ispituju efekat pektina na imuni sistem. Primarno, interes za pektine i njegov uticaj na imunitet je nastao kao posledica zapažanja da su dijetalni pektini smanjili rizik od kancera. Postoje opsežni klinički i eksperimentalni podaci koji ukazuju na anti-tumorska, anti-infektivna i anti alergijska svojstva pektina. Izgleda da pektini pokazuju strukturnu polipotentnost s obzirom na njihov efekat na imuni sistem. Generalno, obrazac imunomodulatorne aktivnosti izolovanog pektina je definisan odnosom galakturonskih lanaca i razgranatih fragmenata (RG). Pokazano je da izolovani pektin pokazuje imunosupresivnu aktivnost kada preovlađuju fragmenti galakturonana sa slobodnim karboksilnim grupama u pektinskom makromolekulu. Pektin sa >80% galakturonske kiseline smanjuje aktivnost makrofaga i inhibiše odloženi tip hipersenzitivne reakcije. Pektin sa razgranatim fragmentima pokazuje imunostimulatornu aktivnost. Stimulatorni efekat razgranatih lanaca će se manifestovati ukoliko nije sprečen inhibitornim efektom galakturonana (123). Do sada publikovani podaci o strukturi bioaktivnih pektina ukazuju da su njihove

primećene biološke aktivnosti posledica prisustva RG regiona bogatih u neutralnim šećerima u bočnim lancima, kao što su arabinan, galaktan, arabinogalaktan, i da veća molekularna masa povećava bioaktivnost pektina (291, 292). Ono što ostaje je da se utvrdi da li su imunomodulatorna svojstva pektina posledica direktnih interakcija sa domaćinom (imunim ćelijama) ili indirektni efekti koji su rezultat interakcija crevnih mikrobiota i domaćina. Naši rezultati su pokazali da APDO ne izaziva smrt makrofaga ni pri jednoj od primenjenih koncentracija APDO. Nakon 24 h nije u statistički značajnoj meri uticao na vijabilitet CLNC, dok je nakon 48 h izazvao značajno smanjenje vijabiliteta ovih ćelija, pri čemu je efekat dozno zavisian. Na osnovu ovih rezultata smo zaključili da je zapaženo smanjenje vijabiliteta CLNC pod uticajem APDO nakon 48 h verovatno posledica antiproliferativnog delovanja ovih molekula.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih i diskutovanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Alkalnom hidrolizom jabučnog, citrusnog pektina i poligalakturonske kiseline, u prisustvu vodonik peroksida, dobijeni su proizvodi APDO, CPDO i PGDO.
- Dobijeni proizvod APDO okarakterisali smo FTIR spektroskopijom i pokazali da u odnosu na polazni materijal ima simetrične i asimetrične vibracije istežanja karboksilatnih grupa. Obzirom na navedeno, moguće je da dobijeni derivat ima specifične reakcije sa hidroksidnim radikalima koji nastaju u Fentonovoj reakciji (*in vitro* i *in vivo*).
- Analizom APDO, CPDO i PGDO u Fenton sistemu pomoću EPR-a, zaključeno je da je formiranje DEPMPO/•OH adukta u Fentonovoj reakciji potpuno inhibirano zbog nastanka adukta sa radikalnim anjonom ugljen-dioksida ($\bullet \text{CO}_2^-$, takođe nazvan radikalni anjon). Drugim rečima, APDO, CPDO i PGDO proizvode $\bullet \text{CO}_2^-$ kada su izloženi dejstvu •OH radikala.
- Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti pektina i APDO utvrđeno je da oni nemaju inhibitorni efekat na *E.coli* i *S. aureus*, ali dovode do inhibicije rasta *S. cerevisiae* i *C. albicans*.
- Ispitivanjem efekata APDO, CPDO, PGDO (u prisustvu Fenton potencirajućih supstanci) na broj bakterija u kulturama *E. coli* i *S. aureus* zaključeno je :

Za *E. coli*:

- ✚ Izloženost kolonije *E.coli* pro-oksidativnim uslovima (Asc+FeCl₃) dovelo je do smanjenja broja živih bakterija za oko 15% (p<0.05).
- ✚ Dodatak APDO (p<0.001) i CPDO (p<0.001) je izazvao dodatno smanjenje broja *E. coli*. APDO je pokazao najizraženiji efekat.
- ✚ Broj kolonija *E.coli* se smanjio za 65% dodatkom ADPO, dok je dodatak CPDO izazvao smanjenje 45%, posmatrano u odnosu na kontrolni uzorak.

Za *S. aureus*:

- ✚ Izloženost kolonije *S. aureus* pro-oksidativnim uslovima nije značajno promenilo broj živih bakterija ($p = 0.09$). Broj kolonija se smanjio za oko 20%.
 - ✚ U prisustvu pektinskog oligosaharidnog derivata broj živih bakterija je značajno smanjena ($p < 0.001$).
 - ✚ APDO i PGDO su pokazali slične bakteriostatske efekte (smanjenje broja kolonija je veće od 70%), dok je CPDO bio relativno manje efikasan (smanjenje broja kolonija je oko 50%).
 - ✚ Efekti PGDO na kolonije *S. aureus* bili su manje izraženi, u poređenju sa efektima na kolonije *E. coli*.
- Ispitivanjem promena aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja (SOD, CAT, GSHPx i Gr) kod *E. coli* i *S. aureus* je uočeno da postoji značajno smanjenje aktivnosti GSHPx u odnosu na ostale enzime.
 - ✚ Aktivnost SOD je značajno manja nakon tretiranja Fenton reaktantima i APDO u poređenju sa kontrolom.
 - Ispitivanjem efekata APDO na imuni sistem (makrofagi i ćelije cervikalnih limfnih čvorova) zaključeno je:
 - ✚ APDO ne izaziva smrt makrofaga ni pri jednoj od primenjenih koncentracija APDO.
 - ✚ Nakon 24h APDO nije u statistički značajnoj meri uticao na vijabilitet CLNC, dok je nakon 48 h izazvao značajno smanjenje vijabiliteta ovih ćelija, pri čemu je efekat dozno zavisian.
 - ✚ Smanjenje vijabiliteta CLNC pod uticajem APDO nakon 48 h je verovatno posledica antiproliferativnog delovanja ovih molekula.

Dalje istraživanje u okviru ove problematike trebalo bi nastaviti kako bi se u što većoj meri objasnio značaj pektina za zdravlje čoveka, što bi moglo da dovede do prihvatanja ovog polisaharida kao prebiotika.

7.LITERATURA

1. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 2008; 11 (3): 266-277.
2. Kertesz ZI. The pectic substances. New York: Interscience publishers; 1951.
3. Braconnot H. Annales de chimie et de physique. *Annals of Chemistry and Physics*. 1825; 28(2): 173-178.
4. Canteri MHG, Moreno LR, Wosiacki G, Scheer AP. Pectin: from raw material to the final product. *Polimeros* 2012; 22 (2): 1-13.
5. Willats WGT, Knox JP, Mikkelse JD. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17: 97-104.
6. Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat Chem Biol* 2010; 6: 724-732.
7. Gilbert HJ. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiol* 2010; 153: 444-455.
8. Mohnen D, Bar-Peled M, Somerville C. Cell Wall Polysaccharide Synthesis In Biomass Recalcitrance. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd; 2009. p. 94-187.
9. Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, and Stengel DB. Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. *Annu Rev Plant Biol* 2011; 62: 567-590.
10. Atmodjo MA, Hao Z and Mohnen D. Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 2013; 64: 747-779.
11. Novosel'skaya IL, Voropaeva NL, Voropaeva LN, Rashidova SS. Trends in the science and applications of pectins. *Chem Nat Compd* 2000; 36 (1): 1-10.
12. Ridley BL, O'Neill MA, and Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry* 2001; 57: 929-967.
13. Sterling JD, Atmodjo MA, Inwood SE, Kumar Kolli VS, Quigley HF, Hahn MG, Mohnen D. Functional identification of an Arabidopsis pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5236-5241.

14. Willats WG, McCartney L, and Knox JP. In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 2001; 213: 37-44.
15. Liners F, Letesson JJ, Didembourg C, Van Cutsem P. Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium. *Plant Physiol* 1989; 91: 1419-1424.
16. Caffall KH, Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res* 2009; 344: 1879-1900.
17. Vincken JP, Schols H, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* 2003; 132: 1781-1789.
18. ØBro J, Harholt J, Scheller HV, Orfila C. Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry* 2004; 65: 1429-1438.
19. O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55: 109-139.
20. O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 2001; 294: 846-849.
21. Coenen GJ. Structural characterization of native pectins [dissertation]. The Netherlands: Wageningen University; 2007.
22. Brummer Y, Cui SW. Food carbohydrates, chemistry physical properties and applications. Understanding carbohydrate analysis. Cui SW, editor. New York: CRS press; 2005.
23. Lv Y, Yang X, Zhao Y, Ruan Y, Yang Y, Wang Z. *Food Chem* 2009; 112:742-746.
24. Datta SC. *Plant physiology*. Delhi: New Age Intl.Ltd; 1994.

25. Marlett JA, Cheung TF. Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 1997; 97(10): 1139-1148, 1151.
26. May CD. Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydr Polym* 1990; 12: 79–99.
27. Kertesz ZI. The pectic substances. 3rd ed. Rolin C. Pectin. In: Industrial gums. Whistler RL, BeMiller JN, editors. New York: Interscience Publishers; 1993.
28. Coimbra P, Ferreira P, de Sousa HC, Batista P, Rodrigues MA, Corriea IJ, et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol* 2011; 48:112-18.
29. Kurita O, Fujiwara T, Yamazaki E. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydr Polym* 2008; 74:725-30.
30. Panouille M, Thibault JF, Bonnin E. Cellulase and protease preparations can extract Pectins from various plant byproducts. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 8926-35.
31. Zykwincka A, Boiffard MH, Kontkanen H, Buchert J, Thibault JF, Bonnin E. Extraction of green labeled pectins and pectic oligosaccharides from plant byproducts. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 8926-35.
32. Singthong J, Ningsanond S, Cui SW, Douglas Goff H. Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. *Food Hydrocoll* 2005; 19: 793- 801.
33. Ni Y, Yates KM, Zarzycki R. Aloe pectins. Carrington Laboratories, Inc., Irving, Texas. US Patent. 1999.
34. Extraction of pectin by microwave heating under pressure. United States patent US 6143337. 2007.
35. Fishman ML, Chau HK, Hoagland PD, Hotchkiss AT. Microwave assisted extraction of lime pectin. *Food Hydrocoll* 2006; 20: 1170–1177.

36. Fischer A, Houzelle M, Hubert P, Axelos M, Geoffroy-Chapotot C, Carré M, Viriot M, Dellacherie E. Detection of intramolecular associations in hydrophobically modified pectin derivatives using fluorescent probes. *Langmuir* 1998; 14: 4482-4488.
37. Miralles-Houzelle M, Hubert P, Dellacherie E. Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association. *Langmuir* 2001; 17: 1384-1391.
38. Evageliou V, Richardson RK, Morris ER. Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high-methoxy pectin gels. *Carbohydr Polym* 2000; 42: 245-259.
39. Ralet MC, Dronnet V, Buchholt HC, Thibault JF. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydr Res* 2001a; 336: 117-125.
40. Tucker GA and Seymour GB. Modification and degradation of pectins/ Pectins and their manipulation. Seymour GB, Knox JP, editors. United States: CRS Press; 2002. p. 150-173.
41. Bhatia MS, Deshmukh R, Choudhari P, Bhatia NM. Chemical modification of pectins, characterization and evaluation for drug delivery. *Sci Pharm* 2010; 76: 775.
42. Munjeri O, Collett J, Fell J. Hydrogel beads based on amidated pectins for colonspecific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *J Control Release* 1997; 46: 273-278.
43. Musabayane C, Munjeri O, Bwititi P, Osim E. Orally administered, insulin loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol* 2000; 164: 1-6.
44. Geresh S, Dawadi R, Arad S. Chemical modifications of biopolymers: quaternization of the extracellular polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydr Polym* 2000; 43: 75-80.
45. Fan L, Cao M, Gao S, Wang W, Peng K, Tan C, Wen F, Tao S, Xie W.. Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of pectin. *Carbohydr Polym* 2012a ; 88: 707-712.

46. Katav T, Liu LS, Traitel T, Goldbart R, Wolfson M, Kost J. Modified pectin-based carrier for gene delivery: Cellular barriers in gene delivery course. *J Control Release* 2008; 130: 183-191.
47. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1556-1568.
48. Bernkop-Schnürch A. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1569-1582.
49. Sharma R, Ahuja M. Thiolated pectin: Synthesis, characterization and evaluation as a mucoadhesive polymer. *Carbohydr Polym* 2011; 85: 658-663.
50. Majzoob S, Atyabi F, Dorkoosh F, Kafedjiiski K, Loretz B, Bernkop-Schnürch, A. Pectin-cysteine conjugate: synthesis and *in vitro* evaluation of its potential for drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 1601-1610.
51. Perera G, Barthelmes J, Bernkop-Schnürch A. Novel pectin-4-aminothiophenole conjugate microparticles for colon-specific drug delivery. *J Control Release* 2010a; 145: 240-246.
52. Perera G, Hombach J, Bernkop-Schnürch A. Hydrophobic thiolation of pectin with 4-aminothiophenol: Synthesis and *in vitro* characterization. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2010b; 11: 174-180.
53. Martinichen-Herrero JC, Carbonero ER, Gorin PAJ, Iacomini M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. *Carbohydr Polym* 2005; 60: 7-13.
54. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Li Z. Antioxidant activity of sulphated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* 2008; 42: 127-132.
55. Maas NC, Gracher AHP, Sasaki G., Gorin PAJ, Iacomini M, Cipriani TR. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. *Carbohydr Polym* 2012; 89(4):1081-1087.

56. Bae IY, Joe YN, Rha HJ, Lee S, Yoo SH, Lee HG. Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. *Food Hydrocoll* 2009; 23: 1980-1983.
57. Vityazev F, Golovchenko V, Patova O, Drozd N, Makarov V, Shashkov A, Ovodov YS. Synthesis of sulfated pectins and their anticoagulant activity. *Biochemistry (Moscow)* 2010; 75: 759-768.
58. Cipriani TR, Gracher AHP, de Souza LM, Fonseca RJC, Belmiro CLR, Gorin PA J, Sasaki GL, Iacomini M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. *Thromb Haemost* 2008; 99: 539-54.
59. Takei T, Sato M, Ijima H, Kawakami K. In situ gellable oxidized citrus pectin for localized delivery of anticancer drugs and prevention of homotypic cancer cell aggregation. *Biomacromolecules* 2010; 11: 3525-3530.
60. Abdel-Hamid M, Khairou K, Hassan R. Kinetics and mechanism of permanganate oxidation of pectin polysaccharide in acid perchlorate media. *Eur Polym J* 2003; 39: 381-387.
61. Willats WGT, Knox J, Mikkelsen JD. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol* 2006; 17: 97-104.
62. Rao M, Silva JL. Pectins: structure, functionality, and uses. In: Stephen AM, Phillips GO, Williams PA, editors. *Food Polysaccharides and Their Applications*. Unated States: CRC Press; 2006. p. 353-411.
63. Semdé R, Moës AJ, Devleeschouwer MJ, Amighi K. Synthesis and enzymatic degradation of epichlorohydrin cross-linked pectins. *Drug Dev Ind Pharm* 2003; 29: 203-213.
64. Coenen GJ, Kabel MA, Schols HA, Voragen AGJ. CE-MSⁿ of complex pectin-derived oligomers. *Electrophoresis* 2008; 29: 2101-2111.
65. Yamaguchi F, Shimizu N, Hatanaka C. Preparation and physiological effect of low-molecular-weight pectin. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994; 58: 679-682.

66. Byun MW, Kang HJ, Jo C, Kwon JH, Son JH, An BJ. Antioxidant and cancer cell proliferation inhibition effect of citrus pectin-oligosaccharide prepared by irradiation. *J Med Food* 2006; 9: 313-320.
67. Maxwell EG, Belshaw NJ, Waldron KW, Morris VJ. Pectin - An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends Food Sci Technol* 2012; 24: 64-73.
68. Xu Y, Dong Q, Qiu H, Ma CW, Ding K. A homogalacturonan from the radix of *Platycodon grandiflorum* and the anti-angiogenesis activity of poly-oligogalacturonic acids derived therefrom. *Carbohydr Res* 2011; 346: 1930-1936.
69. Olano-Martin E, Gibson G, Rastall R. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 505-511.
70. Schols HA, Voragen AGJ. The chemical structure of pectins. In: Seymour GB, Knox JP, editors. *Pectins and their Manipulation*. United States: CRC Press LLC; 2002.
71. Jolie RP, Christiaens S, De Roeck A, Fraeye I, Houben K, Buggenhout SV, Van Loey AM, Hendrickx ME. *Trends Food Sci Technol* 2012; 24: 103-118.
72. Herron SR, Benen JA, Scavetta RD, Visser J, Jurnak F. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *PNAS* 2000; 97: 8762-8769.
73. Benen JAE, Visser J. *Handbook of food enzymology*. Pectate and pectin lyases. Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS, editors. New York: Marcel Dekker Inc; 2003a, 1029-1041.
74. Voragen GJ, Pilnik W, Thibault JF, Axelos MAV, Renard CMGC. Food polysaccharides and their applications. In: Stephen AM, editor. *Pectins*. New York: Marcel Dekker Inc; 1995.
75. Rolin C. Commercial pectin preparation. In: *Pectins and their manipulation*. Blackwell: CRC Press; 2002.

76. Shurui X, Shuanshi F, Songtian F, Xuemei L, Yanhong W, Jun C. Pectin as an Extraordinary Natural Kinetic Hydrate Inhibitor. *Scientific Reports* 2016; doi: 10.1038/srep23220.
77. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, Gapstur S, Patel AV, Andrews K, Gansler T. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: Can J Clin* 2012; 62 (1): 30-67.
78. Sriamornsak P. Pectin: The role in health. *Silpakorn Univ Int J* 2001; 21, 60-77.
79. Glinksky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: One bullet, multiple targets. *Carbohydr Res* 2009; 344, 1788-1791.
80. Jenkins DJ, Newton AC, Leeds AR, Cummings JH. Effect of pectin, guar gum and wheat fiber on serum cholesterol. *Lancet* 1975; 1: 116-117.
81. CAC. Codex Alimentarius Commission. Report of the 30th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for special dietary uses. ALINORM 09/32/26 November 2008; Appendix II, p. 46.
82. Johnson C, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* 2012; 129: 950-60.
83. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336 (6086): 1268-73.
84. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota-master of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 27-38.
85. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519.
86. Robles Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr* 2013; 109: 21-26.
87. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host methabolism. *Nature* 2012; 489: 242-249.

88. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90(3): 859-904.
89. Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, Sanders ME. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev* 2011; 69: 392–403.
90. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le PD, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473 (7346): 174-80.
91. Delzenne NM, Cani PD. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Curr Diab Rep* 2011; 11: 154–159.
92. Wong JM, Esfahani A, Singh N, Vill CR, Mirrahimi A, Jenkins DJ, Kendall CW. Gut microbiota, diet and heart disease. *J AOAC Int* 2012; 95: 24-30.
93. Vulevic J, Juric A, Tzortzis G, Gibson GR. A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults. *J Nutr* 2013; 143: 324–331.
94. Mondot S, de Wouters T, Dore J, Lepage P. The human gut microbiome and its dysfunctions. *Dig Dis* 2013; 31: 278- 285.
95. Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Saulnier D, Loh G, et al. Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Sci Tech Bull Funct Foods* 2010; 7: 1–19.
96. Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *Br J Nutr* 1998; 80: 209–212.
97. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; 488 (7410): 178-84.
98. De Filippo C, Cavalieri D, Di PM, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107 (33) :14691-6.

99. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444: 1022–1023.
100. Tuohy KM, Conterno L, Gasperotti M, Viola R. Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols, and/or fiber. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 8776–8782.
101. Anderson JW, Baird P, Davis RH, Jr, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* 2009; 67 (4): 188-205.
102. Slavin, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* 2013; 5(4): 1417–1435.
103. McNeil NI. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr* 1984; 39: 338-342.
104. Karam NE, Belarbi A. Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 1995; 11(5):559-63.
105. Slovakova L, Duskova D, Marounek M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Lett App Microbiol* 2002; 35(2):126-30.
106. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* 2013; 11: 61.
107. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 319-330.
108. Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, Laboisse C, Cherbut C, Hoebler C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 1168-1174.
109. Holmen Larsson JM, Thomsson KA, Rodriguez-Pineiro AM, Karlsson H, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. III.

- Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan patterns reveal a regiospecific distribution. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 305: 357-363.
110. Johansson ME, Sjovall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 352-361.
111. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 235-243.
112. Rideout TC, Harding SV, Jones PH, Fan MZ. Guar gum and similar soluble fibers in the regulation of cholesterol metabolism: Current understandings and future research. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 1023-1033.
113. Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLoS ONE* 2012; 7: e2874.
114. Cuervo A, Arbolea S, Gueimonde M, González S. Microbiota modulation by diet in humans. Prebiotics, fibres and other compounds. *Agro Food Ind Hi Tech* 2012; 23:23-6.
115. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011; 469 (7331): 543-7.
116. Peng X, Li S, Luo J, Wu X, Liu L. Effects of dietary fibers and their mixtures on short chain fatty acids and microbiota in mice guts. *Food Funct* 2013; 4 (6): 932-8.
117. Sembries S, Dongowski G, Jacobasch G, Mehrlander K, Will F, Dietrich H. Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br J Nutr* 2003; 90 (3): 607-15.
118. Guerin-Deremaux L, Li S, Pochat M, Wils D, Mubasher M, Reifer C, et al. Effects of NUTRIOSE(R) dietary fiber supplementation on body weight, body composition, energy intake, and hunger in overweight men. *Int J Food Sci Nutr* 2011; 62 (6): 628-35.

119. Berggren A, Björck I, Nyman E. Short-chain fatty acid content and pH in caecum of rats given various sources of carbohydrates. *J Sci Food Agr* 1993; 67: 397-407.
120. Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Gonzalez S. Fiber from a regular diet is directly associated with fecal short-chain fatty acid concentrations in the elderly. *Nutr Res* 2013; 33 (10): 811-6.
121. Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol* 2007; 102 (2): 452-60.
122. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 2014; 40(1): 128-139.
123. Popov SV, Ovodov YS. Polypotency of the Immunomodulatory Effect of Pectins. *Biochemistry (Moscow)* 2013; 78(7): 823-835.
124. Ye MB, Lim BO. Dietary pectin regulates the levels of inflammatory cytokines and immunoglobulins in interleukin-10 knockout mice. *J Agric Food Chem* 2010; 58, 11281-11286.
125. Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Orlin J, Bessler H. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 579-582.
126. Gronhaug TE, Kiyohara H, Sveaass A, Diallo D, Yamada H, Paulsen BS. Beta-D-(1-4)-galactan-containing side chains in RG-I regions of pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch. contribute to expression of immunomodulating activity against intestinal Peyer's patch cells and macrophages. *Phytochemistry* 2011; 72, 2139-2147.
127. Xu DL, Lu Q, Deitch EA. Elemental diet-induced bacterial translocation associated with systemic and intestinal immune suppression. *J Parenter Enteral Nutr* 1998; 22: 37-41.
128. Niture SK, Refai L. Plant Pectin: A Potential Source for Cancer Suppression. *Am J Pharmacol Toxicol* 2013; 8: 9-19.

129. Eliaz I, Hotchkiss AT, Fishman ML, Rode D. The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements. *Phytotherapy research* 2006; 20 (10) : 859-864.
130. Ming-Chang Wu, Hui-chin Li, Po-Hua Wu, Ping-Hsiu Huang, and Yuh-Tai Wang. Assessment of Oligogalacturonide from Citrus Pectin as a Potential Antibacterial Agent against Foodborne Pathogens. *J Food Sci* 2014; 79(8): 1541-1544.
131. Ganan M, Collins M, Rastall R, Hotchkiss AT, Chau HK, Carrascosa AV, Martinez-Rodriguez AJ. Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol* 2010; 137: 181-185.
132. Gustafsson A, Hultberg A, Sjostrom R, Kacs Kovics I, Breimer ME, Boren T, Hammarstrom L, Holgersson J. Carbohydrate-dependent inhibition of *Helicobacter pylori* colonization using porcine milk. *Glycobiology* 2006; 16: 1-10.
133. Sharon N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 527-537.
134. Simon PM, Goode PL, Mobasser A, Zopf D. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun* 1997; 6: 750-757.
135. Doua Z, Sura M, Abdel-Massih RM. Pectin shows antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. *Adv Biosci Biotechnol* 2013; 4: 273-277.
136. Thomas RJ. Receptor mimicry as novel therapeutic treatment for biothreat agents. *Bioengineered Bugs* 2010; 1: 17-30.
137. Olano-Martin E, Rimbach GH, Gibson GR, Rastall RA. Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in in vitro human colonic adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 2003; 23: 341-346.
138. Calce E, Mignogna E, Bugatti V, Galdiero M, Vittoria V, De Luca S. Pectin functionalized with natural fatty acids as antimicrobial agents. *Int J Biol Macromol* 2014; 68:28-32.

139. Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 30-42.
140. Briggs S. Modified citrus pectin may halt metastasis. *Nutr Sci News* 1997; 2: 216-218.
141. Liu Y, Ahmad H, Luo Y, Gardiner DT, Gunasekera RS. Citrus pectin: Characterization and inhibitory effect on fibroblast growth factor-receptor interaction. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3051-3057.
142. Brouns F, Theuwissen E, Adam A, Bell M Berger A, Mensink RP. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66: 591-599.
143. Aprikian O, Levrat-Verny MA, Besson C, Busserolles J, Remesy C, Demigne C. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chem* 2001; 75: 445-452.
144. Kirat D. Effect of pectin feeding on monocarboxylate transporters in rat adrenal gland. *J Comp Physiol B* 2010; 180(1): 57–65.
145. Gunness P, Gidley MJ. Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Funct* 2010; 1: 149-155.
146. EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. N. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to pectins and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 786), maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 818) and increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 4692) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/ 2006. *EFSA Journal* 2010; 8: 174.
147. Giacco R, Clemente G, Riccardi G. Dietary fiber in treatment of diabetes: myth or reality? *Dig Liver Dis* 2002; 34: 140–144.
148. Ou S, Kwok K, Li Y, Fu L. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 1026-1029.
149. Kim M. High-methoxyl pectin has greater enhancing effect on glucose uptake in intestinal perfused rats. *Nutrition* 2005; 21: 372-377.

150. Schwartz SE, Levine GD. Effects of dietary fiber on intestinal glucose absorption and glucose tolerance in rats. *Gastroenterology* 1980; 79: 833-836.
151. Khasina EI, Kolenchenko EA, Sgrebneva MN, Kovalev VV, Khotimchenko YS. Antioxidant activities of a low etherified pectin from the seagrass *Zostera marina*. *Russ J Mar Biol* 2003; 29: 259-261.
152. Li P, Li S, Dong Y, Zhu R, Liu Y. Antioxidant activity of pentaoligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglyceride synthesis in mice fed with a high-fat diet. *Food Chem* 2014; 145: 335-341.
153. Jackson CL, Dreaden TM, Theobald LK, Tran NM, Beal TL, Eid M, Gao MY, Shirley RB, Stoffel MT, Kumar MV, Mohnen D. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology* 2007; 17: 805-819.
154. Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L. Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by Oral Intake of Modified Citrus Pectin. *J Natl Cancer Inst* 2002; 24: 1854-1862.
155. Ogocznyk D, Siek M, Garstecki P. Microfluidic formulation of pectin microbeads for encapsulation and controlled release of nanoparticles, *Biomicrofluidics* 2011; 5(1): 013405.
156. De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J* 2010; 20: 292-302.
157. Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Malhotra M, Kahouli I, Prakash S. Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions. *J Pharm* 2013; 2013:103527.
158. Santipanichwong R, Suphantharika M, Weiss J, McClements DJ. Core-shell biopolymer nanoparticles produced by electrostatic deposition of beet pectin onto heat-denatured beta-lactoglobulin aggregates. *J Food Sci* 2008; 73: 23-30.
159. Coussa R, Martoni C, Bhatena J, Urbanska AM, Prakash S. Oral microencapsulated live *Saccharomyces cerevisiae* cells for use in renal failure

- uremia: preparation and in vivo analysis. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010. pii: 620827. doi: 10.1155/2010/620827.
160. Urbanska AM, Paul A, Bhathena J, Prakash S. Suppression of tumorigenesis: modulation of inflammatory cytokines by oral administration of microencapsulated probiotic yogurt formulation. *Int J Inflam* 2010; 2010: 894972.
161. Kinget R, Kalala W, Vervoort L, Van Der MG. Colonic drug targeting. *J Drug Target* 1998; 6:129-149.
162. Sarasija S, Hota A. Colon specific drug delivery systems. *Indian J Pharmaceut Sci* 2000; 62: 1-8.
163. Mignani S, El Kazzouli S, Bousmina M, Majoral J-P. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 1316-1330.
164. Lam PL, Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: *in vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. *J Contr Release* 2014; 178: 25-45.
165. Maior JFAS, Reis AV, Muniz EC, Cavalcanti OA. Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. *Int J Pharm* 2008; 355 (1-2): 184-194.
166. Sinha VR, Kumria R. Microbially triggered drug delivery to the colon. *Eur J Pharm Sci* 2003; 18 (1): 3-18.
167. Chourasia MK, Jain SK. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2003; 6 (1): 33-36.
168. Liu LS, Fishman ML, Kost J, Hicks KB. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials* 2003; 24 (19): 3333-3343.
169. Friend DR. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57 (2): 247-265.
170. Khurana R, Singh K, Sapra B, Tiwary AK, Rana V. Tamarindus indica pectin blend film composition for coating tablets with enhanced adhesive force strength. *Carbohydr Polym* 2014; 102: 55-65.

171. Mocanu G, Souguir Z, Picton L, Le Cerf D. Multi-responsive carboxymethyl polysaccharide crosslinked hydrogels containing Jeffamine side-chains. *Carbohydr Polym* 2012; 89 (2): 578-585.
172. Luo Y, Zhy J, Ma Y, Zhang H. Dry coating, a novel coating technology for solid pharmaceutical dosage forms. *Int J Pharm* 2008; 358 (1): 16-22.
173. Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, Zecchi V. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur J Pharmaceut Sci* 2008; 35 (5): 435-441.
174. Prezotti FG, Meneguín AB, Evangelista RC, Cury BSF. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *Drug Dev Ind Pharm* 2012; 38 (11): 1354-1359.
175. Thirawong N, Nunthanid J, Puttipipatkachorn S, Sriamornsak P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67 (1): 132-140.
176. Thirawong N, Kennedy RA, Sriamornsak P. Viscometric study of pectin-mucin interaction and its mucoadhesive bond strength. *Carbohydr Polym* 2008; 71 (2): 170-179.
177. Li Y, Zhao H, Duan L-R, Li H, Yang Q, Tu H-H, Cao W, Wang S-W. Preparation, characterization and evaluation of bufalin liposomes coated with citrus pectin. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2014; 444: 54-62.
178. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3:1-5.
179. Tan HP, Marra KG. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials* 2010; 3: 1746-67.
180. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001; 101: 1869-79.
181. Hou QP, De Bank PA, Shakesheff KM. Injectable scaffolds for tissue regeneration. *J Mater Chem* 2004; 14: 1915-23.

182. Moreira HR, Munarin F, Gentilini R, Visai L, Granja P L, Tanzi MC, et al. Injectable pectin hydrogels produced by internal gelation: pH dependence of gelling and rheological properties. *Carbohydr Polym* 2014; 103: 339-47.
183. Munarin F, Gentilini R, Petrini P, Tanzi MC. Injectable Pectin Hydrogels as Cell Carriers for Soft Tissue Regeneration. 25th European Conference on Biomaterials; 2013 Sep 8-12; Madrid, Spain.
184. Munarin F, Petrini P, Tanzi MC, Barbosa MA, Granja PL. 2012, Biofunctionalchemically modified pectin for cell delivery. *Soft Matter* 2012; 8: 4731-9.
185. Vodna L, Bubenikova S, Bakos D. Chitosan based hydrogel microspheres as drug carriers. *Macromol Biosci* 2007; 7: 629-34.
186. Esposito E, Menegatti E, Cortesi R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *Int J Pharm* 2005; 288: 35-49.
187. Munarin F, Giuliano L, Bozzini S, Tanzi MC, Petrini P. Mineral phase deposition on pectin microspheres. *Mater Sci Eng C Mater* 2010; 30:491-6.
188. Koutsos A, Lovegrove JA. An apple a day keeps the doctor away: Inter-relationship between apple consumption, the gut microbiota and cardiometabolic disease risk reduction. In: Tuohy K, Del Rio D, editors. *Diet-microbe interactions in the gut: Effects on human health and disease*. London, UK: Academic Press, Elsevier; 2015. p. 173–194.
189. Kennedy M, List D, Lu Y, Foo LY, Newman RJ, Sims IM, Bain PJS, Hamilton B, Fenton G. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. In: Linskens G, Jackson JF, editors. *Modern methods of plant analyses: analysis of plant waste materials*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1999. p. 5-119.
190. Koutsos A, Lima M, Conterno L, Gasperotti M, Bianchi M, Fava F, Vrhovsek U, Lovegrove JA and Tuohy KM. Effects of Commercial Apple Varieties on Human Gut Microbiota Composition and Metabolic Output Using an In Vitro Colonic Model. *Nutrients* 2017; 9(6). pii: E533. doi: 10.3390/nu9060533.

191. Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1400-1408.
192. Leontowicz M, Gorinstein S, Bartnikowska E, Leontowicz H, Kulasek G, Trakhtenberg S. Sugar beet pulp and apple pomace dietary fibers improve lipid metabolism in rats fed cholesterol. *Food Chem* 2001; 72: 73-78.
193. Auclair S, Silberberg M, Gueux E, Morand C, Mazur A, Milenkovic D, Scalbert A. Apple polyphenols and fibers attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 5558–5563.
194. Ye MB, Lim BO. Dietary pectin regulates the levels of inflammatory cytokines and immunoglobulins in interleukin-10 knockout mice. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 11281-11286.
195. Sanchez D, Quinones M, Moulay L, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A. Soluble fiber-enriched diets improve inflammation and oxidative stress biomarkers in Zucker fatty rats. *Pharmacol Res* 2011; 64: 31-35.
196. Jiang T, Gao X, Wu C, Tian F, Lei Q, Bi J, Xie B, Wang HY, Chen S, Wang X. Apple-derived pectin modulates gut microbiota, improves gut barrier function, and attenuates metabolic endotoxemia in rats with diet-induced obesity. *Nutrients* 2016; 8(3): 126. doi: 10.3390/nu8030126.
197. Miele L, Valenza V, la Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877-1887.
198. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007; 50: 2374-2383.
199. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender T, Mwangi S, Srinivasan, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 2010; 328: 228-231.

200. Boroni Moreira AP, Salles Texeira TF, Ferreira AB, Gouveia Peluzio MdC, Goncalves Alfenas RdC. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr* 2012; 108: 801-809.
201. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35 (Suppl. 5): S14–20.
202. Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, Shanthirani CS, Gokulakrishnan K, Lakshmi BS, Mohan V, Balasubramanyam M. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2014; 388: 203-210.
203. Shinohara K, Ohashi Z, Kawasumi K, Terada A, Fujisawa T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* 2010; 16; 410-515.
204. Licht TR, Hansen M, Bergström A, Poulsen M, Krath BN, Markowski J, Dragsted LO, Wilcks A. Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: Role of apple pectin. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 13. doi: 10.1186/1471-2180-10-13.
205. Suzuki Y, Tanaka K, Amano T, Asakura T, Muramatsu N. Utilization by intestinal bacteria and digestibility of arabino-oligosaccharides in vitro. *J Jpn Soc Hortic Sci* 2004; 73: 574-579.
206. Ravn-Haren G, Dragsted LO, Buch-Andersen T, Jensen EN, Jensen RI, Németh-Balogh M, Paulovicsová B, Bergström A, Wilcks A, Licht TR, et al. Intake of whole apples or clear apple juice has contrasting effects on plasma lipids in healthy volunteers. *Eur J Nutr* 2013; 52(8): 1875-89. doi: 10.1007/s00394-012-0489-z.
207. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772.

208. Bergmann H, Rogoll D, Scheppach W, Melcher R, Richling E. The using type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 1211-1225.
209. Delphi L, Sepehri H. Apple pectin: A natural source for cancer suppression in 4T1 breast cancer cells in vitro and express p53 in mouse bearing 4T1 cancer tumors, *in vivo*. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 637-644.
210. Liu RH, Liu J, Chen B. Apples prevent mammary tumors in rats. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (6): 2341-2343.
211. Delphi L, Sepehri H, Khorramizadeh MR, Mansoori F. Pectic-oligosaccharides from apples induce apoptosis and cell cycle arrest in MDA-MB- 231Cells, a model of human breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16 (13): 5265-5271.
212. Wolfe K, Wu X, Liu XR. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 609-614.
213. Samout N, Bouzenna H, Dhibi S, Ncib S, ElFeki A, Hfaiedh N. Therapeutic effect of apple pectin in obese rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 83: 1233-1238.
214. Claus J, Winyard PG, editors. *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. Weinheim: WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. KgaA; 2009.
215. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS- generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.
216. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007; 26: 1-14.
217. Bienert GP, Moller AI, Kristiansen KA, Schulz AL, Moller IA, Schjoerring JK, Jahn TP. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biolog Chem* 2007; 282: 1183- 1192.
218. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng TC, Hinks JA, Tonks NK, Barford D. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 2003; 423: 769-773.

219. Van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 2003; 423: 773-777.
220. Lee JW, Soonsanga S, Helmann JD. A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (21): 8743-8748.
221. Lee JW, Helmann JD. Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* 2006; 281(33): 23567–23578.
222. Cao C, Leng Y, Kufe D. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 29667-29675.
223. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(5): 1147-1150.
224. Yao XC, Cao Y, Pan SK, Wu SJ. Preparation of peach gum polysaccharides using hydrogen peroxide. *Carbohydr Polym* 2013; 94(1): 88-90.
225. Yao XC, Cao Y, Wu SJ. Antioxidant activity and antibacterial activity of peach gum derived oligosaccharides. *Int J Biol Macromol* 2013; 62: 1-3.doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.08.022.
226. Griffiths PR, de Haseth JA, editors. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. 2nd 2d. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2007.
227. Živković J, Zeković Z, Mujić I, Gođevac D, Mojović M, Mujić A, Spasojević I. EPR Spin-Trapping and Spin-Probing Spectroscopy in Assessing Antioxidant Properties: Example on Extracts of Catkin, Leaves, and Spiny Burs of *Castanea sativa* . *Food Biophysics* 2009; 4 (2): 126-133.
228. Spasojević I. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. *Critic Rev Clin Lab Sci* 2011; 48(3): 114-142.

229. Bačić G, Spasojević I, Šećerov B, Mojović M. Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: New traps, radicals and possibilities. *Spectrochimica Acta A* 2008; 69: 1354-1366.
230. Jackson SK, Liu KJ, Liu M, Timmins GS. Detection and removal of contaminating hydroxylamines from the spin trap DEPMPO, and reevaluation of its use to indicate nitron radical cation formation and S (N)1 reactions. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 228-232.
231. Karoui H, Hogg N, Fréjaville C, Tordo P, Kalyanaraman B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. *J Biol Chem* 1996; 271: 6000-6009.
232. Tsuchihashi M. Zur kernntnis der blutkatalase. *Biochem Zeits* 1923; 140: 65-72.
233. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
234. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30: 665-667.
235. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
236. Renard CMGC, Thibault JF. Pectins in mild alkaline conditions: β -elimination and kinetics of demethylation. In: Visser J, Voragen AGJ, editors. *Pectins and Pectinases*. United Kingdom:Elsevier Ltd; 1996.
237. Gallaher D, Hassel CA, Lee KJ, Gallaher CM. Viscosity and fermentability as attributes of dietary fiber responsible for the hypocholesterolemic effect in hamsters. *J Nutr* 1993;123: 244-252.
238. Hellendoorn EW. Fermentation as the principal cause of the physiological activity of indigestible food residue. In: Spiller GA, editor. *Topics in dietary fiber research*. New York: Plenum Press; 1983. p 127-168.

239. Sharma BR, Naresh L, Dhuldhoya NC, Merchant SU, Merchant UC. *Times Food Process J* 2006; 4: 44-51.
240. Fu JT, Rao MA. Rheology and structure development during gelation of lowmethoxyl pectin gels: the effect of sucrose. *Food Hydrocoll* 2001; 15: 93-100.
241. Nguyen S, Alund SJ, Hiorth M, Kjøniksen AL, Smistad G. Studies on pectin coating of liposomes for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 88 (2): 664-673.
242. Williams PA, and Phillips GO. Introduction to food hydrocolloids. In: Phillips GO, Wiliams PA, editors. *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge, UK: Wood head Publishing Ltd; 2000. p. 1-19.
243. Matia-Merino L, Lau K, Dickinson E. Effects of low methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocoll* 2004; 18(2): 271-281.
244. Luitz R, Aserin A, Wicker L, Garti N. Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups. *Food Hydrocoll* 2009; 23: 786-794.
245. Panchev IN, Slavov A, Nikolova K, Kovacheva D. On the water -sorption properties of pectin. *Food Hydrocoll* 2010; 24: 763-769.
246. Thakur BR, Singh RK, Handa AK. Chemistry and uses of pectin -a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; 37: 47-73.
247. Rachana S, Gupta DK. Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *J Food Sci Technol* 2010; 47 (4): 365-371.
248. Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties and applications. *Adv Appl Microbiol* 1993; 39: 213-29.
249. Jenkins DJ, Reynolds D, Leeds AR, Waller AL, Cummings JH. Hypocholesterolemic action of dietary fiber unrelated to fecal bulking effect. *Am J Clin Nutr* 1979; 32: 2430-2435.

250. Gormley TR, Kevany J, Egan JP, McFarlane R. Effect of apples on serum cholesterol levels in humans. *Irish J Food Sci Technol* 1977; 1: 117–128.
251. Adam CL, Williams PA, Garden KE, Thomson LM, Ross AW (2015) Dose-Dependent Effects of a Soluble Dietary Fibre (Pectin) on Food Intake, Adiposity, Gut Hypertrophy and Gut Satiety Hormone Secretion in Rats. *PLoS One* 10(1): e0115438 doi:10.1371/journal.pone.0115438
252. Holt S, Heading RC, Carter DC, Prescott LF, Tothill P. Effect of gel fibre on gastric emptying and absorption of glucose and paracetamol. *Lancet*. 1979 Mar 24; 1(8117): 636-9.
253. Prosky L. What is fibre? Current controversies. *Trends Food Sci Technol* 2000; 10: 271–275.
254. Burton-Freeman B. Dietary fiber and energy regulation *J Nutr* 2000; 130 (2S): 272-275.
255. Slavin JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 2005; 21: 411-418.
256. McCarty MF. Nutraceutical resources for diabetes prevention -an update. *Med. Hypotheses* 2005; 64 (1): 151-8.
257. Nakao M, Ogura Y, Satake S, Ito I, Iguchi A, Takagi K, et al. Usefulness of soluble dietary fiber for the treatment of diarrhea during enteral nutrition in elderly patients. *Nutrition* 2002 Jan; 18 (1): 35-9.
258. Macfarlane S, Macfarlane GT, Cummings JH Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Therapeut* 2006; 24: 701–714.
259. Kendall CWC, Esfahani A, Jenkins DJA. The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocoll* 2010; 24: 42–48.
260. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010; 104: S1–S63.
261. Guillon F, Champ M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res Int* 2000; 33(3): 233-45.

262. Bijkerk CJ, Muris JW, Knottnerus JA, Hoes AW, de Wit NJ. Systematic review: the role of different types of fibre in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Therapeut* 2004; 19(3): 245-51.
263. Tsujita T, Sumiyoshi M, Han LK, Fujiwara T, Tsujita J, Okuda H. Inhibition of lipase activities by citrus pectin. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49 (5): 340-345.
264. Vishwakarma N, Ganeshpurkar A, Pandey V, Dubey N, Bansal D. Mesalazine-probiotics beads for acetic acid experimental colitis: formulation and characterization of a promising new therapeutic strategy for ulcerative colitis. *Drug Deliv* 2015; 22(1): 94-9. doi: 10.3109/10717544.2013.872711.
265. Chung WSF, Walker AW, Louis P, Parkhill J, Vermeiren J, Bosscher D. et al. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biology* 2016; 14: 3. doi: 10.1186/s12915-015-0224-3.
266. Shinohara K, Ohashi Y, Kawasumi K, Terada A, Fujisawa T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* 2010; 16 (5):510-5.
267. Koropatkin N, Cameron E, Martens E. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 323-35.
268. Chen J, Liang RH, Liu W, Li T, Liu CM, Wu SS, et al. Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their in vitro fermentation properties. *Carbohydr Polym* 2013;91 (1): 175-82.
269. Holck J, Lorentzen A, Vigsnaes LK, Licht TR, Mikkelsen JD, Meyer AS. Feruloylated and nonferuloylated arabino-oligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. in human fecal in vitro fermentations. *J Agric Food Chem* 2011; 59 (12): 6511-9.
270. Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 71(6 Suppl): S 1682-1687.
271. Glinskii OV. Inhibition of prostate cancer bone metastasis by synthetic TF antigen mimic/galectin-3 inhibitor lactulose-L-leucine. *Neoplasia* 2012; 14: 65-73.

272. Inohara HA. Effects of natural complex carbohydrate (Citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconj J* 1994; 11: 527-532.
273. Chauhan DL. A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 8350–8358.
274. Johnson KD. Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia* 2007; 9: 662-670.
275. Glinsky VV. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res* 2009; 344 (14): 1788–1791.
276. Fung KYC, Ooi CC, Zucker MH, Lockett T, Williams DB, Cosgrove LJ, and Topping DL. Colorectal carcinogenesis: a cellular response to sustained risk environment. *Int J Mol Sci* 2013; 14 (7): 13525-13541.
277. Vayssade M, Sengkhampan N, Verhoef R, Delaigue C, Goundiam O, Vigneron P, Voragen AG, Schols HA, Nagel MD. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytother Res* 2010; 24: 982-989.
278. Müller-Maatsch J, Bencivenni M, Caligiani A, Tedeschi T, Bruggeman G, Bosch M, et al. Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chem* 2016; 201: 37-45.
279. Elboutachfai, R, Delattre C, Michaud P, Courtois B, Courtois J. Oligogalacturonans production by free radical depolymerization of polygalacturonan. *Int J Biol Macromol* 2008; 43: 257-261.
280. Michelson AM, Maral J. Carbonate anions; effects on the oxidation of luminal, oxidative hemolysis, γ -irradiation and the reaction of activated oxygen species with enzymes containing various active centres. *Biochimie* 1983; 65: 95-104.
281. Spasojević I, Bogdanović Pristov J. The potential physiological implications of polygalacturonic acid-mediated production of superoxide. *Plant Signal Behav* 2010; 5(12): 1525-1529.

282. Bogdanović Pristov J, Jovanović SV, Mitrović A, Spasojević I. UV-irradiation provokes generation of superoxide on cell wall polygalacturonic acid. *Physiol Plant* 2013; 148: 574–581.
283. Zegota H. Some quantitative aspects of hydroxyl radical induced reactions in γ -irradiated aqueous solution of pectins. *Food Hydrocoll* 2002; 16: 353–361.
284. Olano-Martin E, Gibson GR, Rastell RA. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 2002; 93(3): 505-511.
285. Vilchèze C, Hartman TB, Weinrick WRJ. *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nat Commun* 2013; 4: 1881. doi: 10.1038/ncomms2898.
286. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* 1975; 14(24): 5299-5303.
287. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1975; 14(24): 5294-9.
288. Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJ. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem*. 1990; 265(20): 11919-11927.
289. Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, Taniguchi N. Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1992; 267(26): 18505-18510.
290. Kang JH, Kim SM. Fragmentation of human Cu, Zn-superoxide dismutase by peroxidative reaction. *Mol Cells* 1997; 7(4): 553-558.
291. Ghildyal P, Grønhaug TE, Rusten A, Skogsrud M, Rolstad B, Diallo D, Michaelen TE, Inngjerdigen M, Paulsen BS. Chemical composition and immunological activities of polysaccharides isolated from the malian medicinal plant *Syzygium guineense*. *J Pharmacognosy Phytother* 2010; 2: 76-85.

292. Lin ZB. Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. J Pharmacol Sci 2005; 99: 144-153.

BIOGRAFIJA

Jelena B. Martinov je rođena 04.07.1978 god. u Beogradu gde je završila osnovnu školu i VI Beogradsku gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1996/97. godine, a diplomirala je septembra 2003 god. sa prosečnom ocenom 9,54 (devet/pešeset četiri). Obavezni lekarski staž obavila je kao stažer Medicinskog fakulteta. Poslediplomske studije iz oblasti digestivnog sistema upisuje školske 2003/04. god. Usmeni magistarski ispit položila je u maju 2008. god. sa ocenom 10 (deset). Magistarska teza "Uloga endoskopske video kapsule u otkrivanju uzroka krvarenja iz tankog creva" (mentor Prof. dr Miodrag Krstić, komentor Prof. dr Đorđije Šaranović) je odbranjena u martu 2010. god. Od decembra 2003. god. do decembra 2006 god. je stipendista Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj *Vlade Republike Srbije* i učesnik projekta: „Morfološko-eksperimentalna i molekularno-biološka istraživanja biliopankreasnog sistema povezana sa endoskopskom dijagnostikom i tretmanom hroničnog pankreatitisa“ br 145011. Od oktobra 2006. god. nalazi se u stalnom radnom odnosu na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, KCS. U oktobru 2008. god. je započela specijalizaciju iz oblasti Interne medicine, a specijalistički ispit je položila u januaru 2013. god. sa odličnim uspehom. Od januara 2015. god. je na užoj specijalizaciji iz oblasti gastroenterologije i hepatologije. U zvanje Klin. Ass izabrana je u decembru 2015. god. Usavršavala se u brojnim školama gastroenterologije i hepatologije u zemlji i u inostranstvu. Dobitnik je stipendije Royal College of Physicians za pohađanje Evropske škole Interne medicine, 2010. god. u Brajtonu (ESIM 13). U januaru 2014. usavršavala se u Hanoveru na Klinici za gastroenterologiju, hepatologiju i endokrinologiju kod mentora Prof. Michael Manns, u sklopu "Mentorship" programa, pod pokroviteljstvom EASL-a. Imala je učešće u posterskim sesijama i kao predavač na domaćim i međunarodnim kongresima. Do sada je bila angažovana kao ko-istraživač u nekoliko međunarodnih kliničkih studija.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Martinov

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Mehanizmi bioloških efekata jedinjenja dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog pektina"

- 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, 26.04.2018.

Jelena Martinov

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelena Martinov

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada "Mehanizmi bioloških efekata jedinjenja dobijenih alkalnom hidrolizom
jabučnog pektina"

Mentor Prof. Dr Miodrag Krstić

Komentor Prof. Dr Mihajlo Spasić

Potpisani Dr Jelena Martinov


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, 26.04.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

“Mehanizmi bioloških efekata jedinjenja dobijenih alkalnom hidrolizom jabučnog pektina”

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 poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26-04. 2018.

Joleva Mastin