

Aktivnost antioksidativnih enzima u serumu Sprague-Dawley štakora nakon visokoslane prehrane i oralne primjene nadomjestka karnozina

Milić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:888752>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Andrea Milić

AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH
ENZIMA U SERUMU SPRAGUE -
DAWLEY ŠTAKORA NAKON
VISOKOSLANE PREHRANE I ORALNE
PRIMJENE NADOMJESTKA
KARNOZINA

Završni rad

Osijek, 2024.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Andrea Milić

**AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH
ENZIMA U SERUMU SPRAGUE -
DAWLEY ŠTAKORA NAKON
VISOKOSLANE PREHRANE I ORALNE
PRIMJENE NADOMJESTKA
KARNOZINA**

Završni rad

Osijek, 2024.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević

Ovaj rad ima 25 listova i 5 slika

.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Slobodni radikali	1
1.2 Antioksidansi	2
1.3 Enzimatski antioksidansi	3
1.3.1 Katalaza	3
1.3.2 Superoksid – dismutaza	4
1.3.3 Glutation peroksidaza	5
1.4 Karnozin	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ RADA	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1 Ustroj studije	10
4.2 Eksperimentalni životinjski modeli	10
4.3 Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom	10
4.4 Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	11
4.4.1 Određivanje aktivnosti katalaze	11
4.4.2 Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze	12
4.4.3 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	12
4.5 Statistička obrada	13
6. RASPRAVA	17
7. ZAKLJUČAK	19
8. SAŽETAK	20
9. SUMMARY	21
10. LITERATURA	22
11. ŽIVOTOPIS	25

Popis kratica

ATP – Adenozin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

BSA – Govedi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

CAR – Karnozin (engl. *carnosine*)

CAT – Katalaza (engl. *catalase*)

CTRL – Kontrolna skupina (engl. *control group*)

DNK / DNA – Deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EC-SOD – Izvanstanična superoksid dismutaza (engl. *extracellular superoxide dismutase*)

GPx – Glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

GSH – Reducirani glutation (engl. *reduced glutathione*)

GSSG – Oksidirani glutation disulfid (engl. *oxidized glutathione disulfide*)

HSD – Visokoslana prehrana (engl. *high salt diet*)

NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

RNS – Reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS – Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SOD – Superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

1.UVOD

Prehrana sa viskom unosom soli negativno djeluje na kardiovaskularni sistem. Osim što ima učinak na krvni tlak, prehrana sa visokim unosom soli dovodi do razvoja oksidativnog stresa (1,2). Oksidativni stres nastaje kada tijelo ne uspijeva održati ravnotežu između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i sustava koji ih neutraliziraju (3,4).

Vaskularni endotel je ključan za djelovanje čimbenika rizika povezanih s kardiovaskularnim bolestima. Oksidativni stres igra bitnu ulogu u aktivaciji endotela, što dovodi do razvoja ateroskleroze i hipertenzije, a to uzrokuje daljnje strukturne i funkcionalne promjene na kardiovaskularnom sustavu (1,2).

Antioksidansi mogu smanjiti oksidacijska oštećenja izravno putem reakcije sa slobodnim radikalima ili neizravno inhibicijom aktivnosti i ekspresije enzima koji stvaraju slobodne radikale te pojačavanjem aktivnosti i ekspresije intracelularnih antioksidativnih enzima (3). Mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima u serumu je pokazatelj razine oksidativnog stresa u organizmu.

Antioksidansi se mogu endogeno stvarati u organizmu, ili egzogeno unosi hranom i suplementima. U ovom istraživanju koristit će se karnozin kao egzogeni antioksidans. Karnozin je dipeptid građen od beta alanina i L-histidina, te je prirodni antioksidans koji je najprije otkriven u skeletnim mišićima. Karnozin ima protuupalnu i antioksidativnu aktivnost te sudjeluje u uklanjanju kisikovih radikala iz organizma (4,5).

1.1 Slobodni radikali

Slobodni radikal je molekula s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci (3). Slobodni radikali uključuju hidroksil ($\bullet\text{OH}$), superoksid ($\text{O}_2\bullet$), dušikov monoksid ($\bullet\text{NO}$), dušikov dioksid ($\bullet\text{NO}_2$), peroksilni radikal ($\text{RO}_2\bullet$) i lipidni peroksilni radikal ($\text{LO}_2\bullet$).

Slobodni radikali se proizvode ili iz normalnog metabolizma stanica *in situ* ili iz vanjskih izvora (zagađenje, dim cigareta, zračenje, lijekovi) (1). Radikali su manje stabilni od neradikalnih vrsta, te je njihova reaktivnost općenito jača. Kada stanice koriste kisik za stvaranje energije, slobodni radikali stvaraju se kao posljedica proizvodnje ATP-a (adenozin trifosfata, engl. *adenosine triphosphate*) u mitohondrijima. Slobodni radikali su najčešće slobodne kisikove vrste (ROS, engl. *reactive oxygen species*) ili slobodne dušikove vrste (RNS,

engl. *reactive nitrogen Species*). U umjerenim koncentracijama, ROS i RNS imaju korisne učinke na stanične odgovore i imunološku funkciju (4). U visokim koncentracijama stvaraju oksidativni stres, štetan proces koji može oštetiti stanične strukture i druge strukture kao što su proteini, lipidi, lipoproteini i deoksiribonukleinska kiselina (DNK).

Na primjer, hidroksilni radikali u suvišku mogu oštetiti stanične membrane i lipoproteine procesom koji se naziva lipidna peroksidacija.

Oštećenje proteina slobodnim radikalima može dovesti do strukturnih promjena i gubitka aktivnosti enzima. Oksidativno oštećenje DNK dovodi do stvaranja različitih oksidativnih lezija koje mogu uzrokovati mutacije (1,3).

1.2 Antioksidansi

Uloga antioksidansa je neutralizirati višak slobodnih radikala, zaštititi stanice od njihovih toksičnih učinaka i pridonijeti prevenciji bolesti (1,3). Endogeni antioksidansi u stanicama dijele se na enzimске antioksidanse i neenzimске antioksidanse.

Glavni antioksidativni enzimi su: superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza.

Neenzimski antioksidansi se dijele na metaboličke antioksidanse i nutritivne antioksidanse. Metabolički antioksidansi koji spadaju u endogene antioksidanse, nastaju metabolizmom u tijelu (lipoidna kiselina, glutation, L-arginin, melatonin, mokraćna kiselina, bilirubin).

Nutritivni antioksidansi koji pripadaju u egzogene antioksidanse, spojevi koji se ne mogu proizvesti u tijelu i moraju se osigurati kroz hranu ili dodatke prehrani (vitamin E, vitamin C, karotenoidi, flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline) (3).

U antioksidativnom procesu, antioksidans postaje oksidiran. Antioksidans je dovoljno stabilna molekula da donira elektron slobodnom radikalima i neutralizira ga, čime se smanjuje njegova sposobnost oštećenja. Stabilnost antioksidativnog radikala je ključna. Dobar antioksidans mora biti dovoljno stabilan da izbjegne nanošenje štete nakon doniranja svog elektrona. Ova stabilnost se često postiže sposobnošću molekule da delokalizira nespareni elektron preko veće strukture kao što su aromatski prstenovi i konjugirane dvostruke veze (3). Stoga se izvori antioksidansa moraju stalno obnavljati u tijelu.

Dva glavna mehanizma djelovanja antioksidansa su prekid lanca i prevencija nastanka. Ovi mehanizmi čine prvu liniju obrane protiv štetnih reakcija slobodnih radikala. Prekid lanca se odnosi na mehanizam u kojem primarni antioksidansi doniraju elektrone slobodnim radikalima, neutralizirajući ih i sprečavajući daljnje oštećenje stanica. S druge strane, mehanizam prevencije djeluje uklanjanjem ili deaktiviranjem reaktivnih vrsta i spojeva koji potiču stvaranje slobodnih radikala (sekundarni antioksidansi), čime se inhibira početak oksidacijskih reakcija.

Vrlo bitan antioksidativni proces je i popravak oštećenja izazvanog slobodnim radikalima i to je druga razina zaštite. Popravak je uglavnom usmjeren na oštećene biomolekule i enzime, posebice molekulu DNK.

1.3 Enzimatski antioksidansi

1.3.1 Katalaza

Katalaza je tetramerni enzim koji se sastoji od četiri polipeptidna lanca, od kojih svaki sadrži preko 500 aminokiselina (6,7). Svaka podjedinica ima hemsku skupinu koja sadrži željezo na svom aktivnom mjestu, ključnu za katalitičku aktivnost enzima.

Primarna funkcija katalaze je razgradnja vodikovog peroksida u vodu i kisik, ključna reakciju u zaštiti stanica od oksidativnog oštećenja. Brzom pretvorbom vodikovog peroksida u manje reaktivne molekule, katalaza pomaže u održavanju integriteta i funkcije stanice.

Mehanizam djelovanja katalaze je reakcija u dva stupnja. Najprije se stvara intermedijarni spoj s vodikovim peroksidom djelovanjem hem grupe katalaze, a zatim ga se razgrađuje u svrhu regeneracije uz otpuštanje vode i kisika (6):

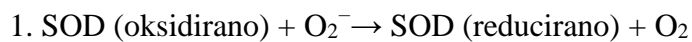
1. $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
2. $\text{Enz (Por-Fe}^{\text{III}}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cpd I (Por} + \bullet - \text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}) + \text{H}_2\text{O}$
3. $\text{Cpd I (Por} + \bullet - \text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Enz (Por-Fe}^{\text{III}}) + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
4. $\text{Cpd I (Por} + \bullet - \text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}) + \text{AH}_2 \rightarrow \text{Cpd II (Por-Fe}^{\text{IV}} - \text{OH}) + \text{AH}\bullet$
5. $\text{Cpd II (Por-Fe}^{\text{IV}} - \text{OH}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cpd III (Por-Fe}^{\text{III}} - \text{O}_2^{\bullet -}) + \text{H}_2\text{O}$

U jetri i bubrezima, katalaza pomaže u procesima detoksikacije razgrađujući vodikov peroksid koji nastaje tijekom metabolizma raznih toksina i lijekova, osiguravajući da se te reaktivne molekule ne akumuliraju do štetnih razina (6,7).

1.3.2 Superoksid – dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD, engl. *superoxide dismutase*) ključni je antioksidativni enzim koji se nalazi u gotovo svim živim stanicama izloženim kisiku (8). Njegova primarna funkcija je kataliza dismutacije superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$) u kisik (O_2) i vodikov peroksid (H_2O_2). Ova reakcija je neophodna za zaštitu stanica od oksidativnog oštećenja uzrokovanog reaktivnim kisikovim vrstama.

Reakcija superoksid-dismutaze odvija se u dva stupnja pomoću redukcije i oksidacije.



Superoksid dismutaza postoji u više izoformi, od kojih se svaka razlikuje po metalnom kofaktoru i staničnoj lokalizaciji. Tri glavne izoforme u eukariota su: Cu/Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) i EC-SOD (SOD3) (8).

Cu/Zn-SOD, također poznat kao SOD1, prvenstveno se nalazi u citoplazmi i intermembranskom prostoru mitohondrija. Sadrži ione bakra i cinka na svom aktivnom mjestu, koji igraju ključnu ulogu u katalitičkoj dismutaciji superoksidnih radikala. SOD1 je homodimer, pri čemu svaka podjedinica doprinosi ukupnoj enzimskoj aktivnosti.

Mn-SOD ili SOD2 nalazi se u matriksu mitohondrija. Sadrži mangan na svom aktivnom mjestu i djeluje kao tetramer (8). SOD2 je bitan za zaštitu mitohondrija od oksidativnog oštećenja, budući da su mitohondriji značajan izvor superoksidnih radikala zbog svoje visoke metaboličke aktivnosti i potrošnje kisika.

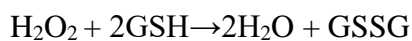
EC-SOD ili SOD3 je izvanstanični oblik superoksid dismutaze. Nalazi se u izvanstaničnom matriksu i tjelesnim tekućinama (8). SOD3 sadrži bakar i cink na svom aktivnom mjestu, slično kao SOD1, ali se razlikuje po svojoj sposobnosti vezanja na proteoglikane heparan sulfata, što pomaže u njegovom lokaliziranju u izvanstaničnom matriksu. SOD3 igra ključnu ulogu u zaštiti tkiva od izvanstaničnih superoksidnih radikala.

1.3.3 Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (GPx, engl. *glutathione peroxidase*) je antioksidativni enzim koji se nalazi u gotovo svim živim organizmima. Njegova primarna funkcija je katalizirati redukciju vodikovog peroksida (H_2O_2) i organskih hidroperoksida u vodu (H_2O) i odgovarajuće alkohole, koristeći glutation (GSH) kao supstrat (9). Ova reakcija je neophodna za zaštitu stanica od oksidativnog oštećenja i održavanje redoks ravnoteže unutar stanice.

Glutation peroksidaza je selenoenzim tetramerne strukture (9). Selenocisteinski ostatak na njegovom aktivnom mjestu ključan je za katalitičku aktivnost enzima.

Katalitički mehanizam glutacione peroksidaze uključuje redukciju peroksidnih supstrata korištenjem glutationa kao donora elektrona. Selenocisteinski ostatak u aktivnom mjestu GPx mijenja se između reduciranog (selenol) i oksidiranog (selenenska kiselina) stanja tijekom katalitičkog ciklusa.



GSH (glutation) se u procesu oksidira u GSSG (glutation disulfid).

Glutation peroksidaza postoji u nekoliko izoformi, od kojih svaka ima različitu tkivnu distribuciju i specifičnost za supstrat. Glavne izoforme kod sisavaca su: GPx1 (stanična glutacione peroksidaza), GPx2 (Gastrointestinalna glutacione peroksidaza), GPx3 (glutacione peroksidaza u plazmi) i GPx4 (fosfolipid hidroperoksid glutacione peroksidaza) (9).

GPx1 je najobilnija i sveprisutno izražena izoforma pronađena u citoplazmi gotovo svih tkiva sisavaca (9). Prvenstveno smanjuje vodikov peroksid i neophodan je za zaštitu stanica od oksidativnog stresa.

GPx2 se pretežno izražava u gastrointestinalnom traktu, pružajući zaštitu od progutanih peroksida (9). Dijeli strukturne sličnosti s GPx1, ali je posebno prilagođen za zaštitu gastrointestinalnog epitela od oksidativnog oštećenja.

GPx3 se prvenstveno nalazi u plazmi i odgovoran je za smanjenje hidroperoksida u izvanstaničnom okruženju (9). Pomaže u zaštiti izvanstaničnog matriksa i krvožilnog sustava od oksidativnog oštećenja.

GPx4 je jedinstven među izoformama GPx jer može reducirati hidroperoksidi lipida izravno unutar bioloških membrana (9). Ova sposobnost čini GPx4 ključnim za zaštitu staničnih membrana od oksidativnog oštećenja. GPx4 se eksprimira u različitim tkivima, uključujući testise, gdje igra ključnu ulogu u sazrijevanju sperme i muškoj plodnosti (9).

1.4 Karnozin

Karnozin (CAR, engl. *carnosine*) je endogeni dipeptid koji se sastoji od proteinogene aminokiseline, L-histidina i neproteinogene aminokiseline, β -alanina. Karnozin je najprije otkriven u skeletnim mišićima, no nalazi se u srcu, mozgu i gastrointestinalnom sustavu u visokim koncentracijama. Endogeno ga sintetizira karnozin sintaza, a razgrađuje karnozinaza. Unos mesa i ribe hranom glavni je izvor karnozina, a njegova dostupna količina ovisi o vrsti mesa ili ribe i načinu kuhanja (10-12). Prilikom konzumacije, karnozin se netaknut apsorbira kroz probavni sustav (13,14).

Karnozin ima protuupalnu i antioksidativnu aktivnost te djeluje u uklanjanju kisikovih radikala iz organizma. Fiziološke funkcije karnozina uključuju i puferizaciju, antiglikozilacijsku, metal kelirajuću te geroprotektivnu aktivnost (14-19).

Mobilnost karnozina pomaže održavanju pH homeostaze nakon intenzivne tjelesne aktivnosti (15).

Antioksidativni učinci karnozina posredovani su mehanizmima koji uključuju keliranje metalnih iona i uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta te hidroksilnih radikala (15-19). Karnozin mijenja reaktivnost superoksidnog aniona stvaranjem kompleksa prijenosa naboja sa superoksidnim radikalom i također smanjenjem učinkovitosti hidroksilnih radikala, stvarajući manje reaktivnu vrstu. Jedan od mehanizama za zaštitu organizama od oksidativnog stresa je i kelacija prijelaznih metala, sprječavajući ih da sudjeluju u štetnim procesima koji uključuju tvorbu slobodnih radikala (15).

Glikacija ili neenzimska glikozilacija je kemijska reakcija između reaktivnih vrsta koji sadrže karbonil i biomolekula koje sadrže slobodne amino skupine (15). Karnozin reagira s reaktivnim karbonilnim intermedijarnim spojevima (npr. glioksalom i metilglioksalom) kako bi inhibirao stvaranje naprednih glikiranih krajnjih proizvoda koji dovode do promjena u funkciji membrane (5,18,19).

Geroprotektivno svojstvo karnozina temelji se na njegovoj antioksidativnoj, neuroprotektivnoj i protuupalnoj aktivnosti, štiteći stanice od oštećenja koja pridonose starenju (20-22).

S obzirom na navedene funkcije, karnozin predstavlja ključnu komponentu u obrani organizma od oksidativnog stresa, glikacije i staničnog starenja, čineći ga značajnim spojem u održavanju stanične funkcije i zaštiti od degenerativnih bolesti (23-25). Osim toga, karnozin igra važnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka i funkciji srčanog mišića, dodatno pridonoseći njegovim zaštitnim svojstvima u organizmu (26-28).

2. HIPOTEZA

Oralna primjena nadomjestka karnozina promjenit će aktivnost antioksidativnih enzima u opterećenju oksidativnim stresom uzrokovanim visokoslanom prehranom.

3. CILJ RADA

Cilj ovog završnog rada je utvrditi aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, katalaze i glutation-peroksidaze) u serumu Sprague - Dawley štakora nakon visokoslane prehrane sa i bez oralnog nadomjestka karnozina.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Ustroj studije

Eksperimentalna studija na serumima pokusnih životinja (Sprague - Dawley štakori). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 641-01/24-01/04, Ur. Broj: 2158-61-46-24-90).

4.2 Eksperimentalni životinjski modeli

U ovom istraživanju korišteni su pohranjeni serumi Sprague-Dawley štakora kao eksperimentalni model. Štakori su odabrani zbog njihove česte upotrebe u istraživanjima povezanima s oksidativnim stresom i prehrambenim studijama. Štakori su nasumično bili podijeljeni u četiri skupine, od kojih je svaka imala 8 štakora:

1. Kontrolna skupina (CTRL) – Štakori koji nisu izloženi niti visokoslanoj prehrani niti nadomjestku karnozina.
2. HSD skupina (*engl. high salt diet*) – Štakori izloženi visokoslanoj prehrani (4% NaCl).
3. CTRL+CAR skupina – Štakori na standardnoj prehrani s dodatkom karnozina (150 mg/kg/dan).
4. HSD+CAR skupina – Štakori izloženi visokoslanoj prehrani uz dodatak karnozina (150 mg/kg/dan).

Prije uzorkovanja, štakori su bili anestetizirani kombinacijom midazolama (0,5 ml/kg) i ketamin-klorida (3 ml/kg). Nakon početka djelovanja anestetika su žrtvovani dekapitacijom te je nakon toga prikupljena krv u epruvete bez antikoagulansa. Prikupljena krv je centrifugirana na 3500 rpm 10 min na 4 °C, supernatant (serum) je odvojen i pohranjen na -80 °C do mjerenja aktivnosti enzima.

4.3 Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom

Ukupna koncentracija proteina u serumu štakora određena je Bradford metodom (29). Za metodu je potreban Bradfordov reagens, standardna otopina BSA (*engl. bovine serum albumin*) za izradu standardne krivulje te spektrofotometar s mogućnošću očitavanja apsorbance pri valnoj duljini 595 nm. Bradfordov reagens priređuje se otapanjem boje Commassie brilliant blue G-250 u otopini etanola, u koju se dodaje fosforna kiselina; a pripremljena otopina je smeđe boje.

Ova metoda koristi Commassie Brilliant Blue G-250 (CBB) za obojenje otopljenih proteina. Reagens se veže za NH_3 skupine proteina, što rezultira promjenom boje iz smeđe u plavu. Absorpcijski maksimum pojavljuje se kod 595 nm.



Slika 1. Spektrofotometar(izvor: original autorice rada).

4.4 Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Aktivnost antioksidativnih enzima, superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze određivala se spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra s opcijom kinetike (UV/VIS, PerkinElmer P PIPA, Lambda 25) iz seruma Sprague-Dawley štakora. Za izračunavanje aktivnosti enzima korištene su specifične jednadžbe nakon mjerenja apsorbanci (A) i izrade odgovarajuće standardne krivulje za svaki enzim. Izračunate vrijednosti aktivnosti enzima u jedinicama enzima (U) po mililitru seruma se preračunavaju u aktivnost enzima po miligramu (mg) proteina u serumu (5).

4.4.1 Određivanje aktivnosti katalaze

Katalaza je enzim koji katalizira razgradnju vodikovog peroksida u manje reaktivne plinovite molekule kisika i vode

Aktivnost katalaze mjerena je pomoću natrij-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,0) i vodikovog peroksida (0,036 % otopina H_2O_2). Natrij-fosfatni pufer (50 mM) i vodikov peroksid (0,036 % otopina H_2O_2) čine reakcijsku smjesu.

Apsorbancija se mjerila pri valnoj duljini od 240 nm, a smanjenje apsorbancije uslijed razgradnje H_2O_2 odražava aktivnost katalaze. Rezultati su izraženi u U/mg proteina.



Slika 2. Pripremanje Natrij-fosfatnog pufera (izvor: original autorice rada)

4.4.2 Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Glutation peroksidaza je citosolni enzim koji katalizira redukciju vodikovog peroksida u vodu i kisik, te redukciju peroksidnih radikala u alkohole i kisik (7).

Aktivnost GPx mjerena je spektrofotometrijski praćenjem smanjenja apsorbancije pri 340 nm, koja je povezana s oksidacijom NADPH. Jedna jedinica enzima katalizira oksidaciju 1 μ mola reduciranog glutationa pomoću H_2O_2 u oksidirani glutation po minuti pri pH 7,0 i 25 °C. Aktivnost GPx izražena je u U/mg proteina (U/mgP).

4.4.3 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Superoksid dismutaza je enzim koji katalizira dismutaciju superoksidnog anionskog radikala u normalni molekularni kisik i vodikov peroksid (8).

Aktivnost SOD-a mjerena je inhibicijom redukcije citokroma C superoksidnim radikalima, pri valnoj duljini od 550 nm.

Jedna jedinica superoksid dismutaze (SOD) smanjuje stupanj redukcije citokroma C za 50 % u sustavu koji uključuje ksantin - oksidazu (XOD, engl. *xanthine oxidase*) i ksantin. Superoksidni radikal nastaje enzimski u reakciji koju katalizira XOD, nastali superoksidni radikal reducira citokrom C, a stupanj redukcije se pratio pri 550 nm. Superoksid dismutaza inhibira redukciju citokroma C, tako što dismutira superoksidni radikal. Aktivnost SOD izražena je u U/mg proteina.

4.5 Statistička obrada

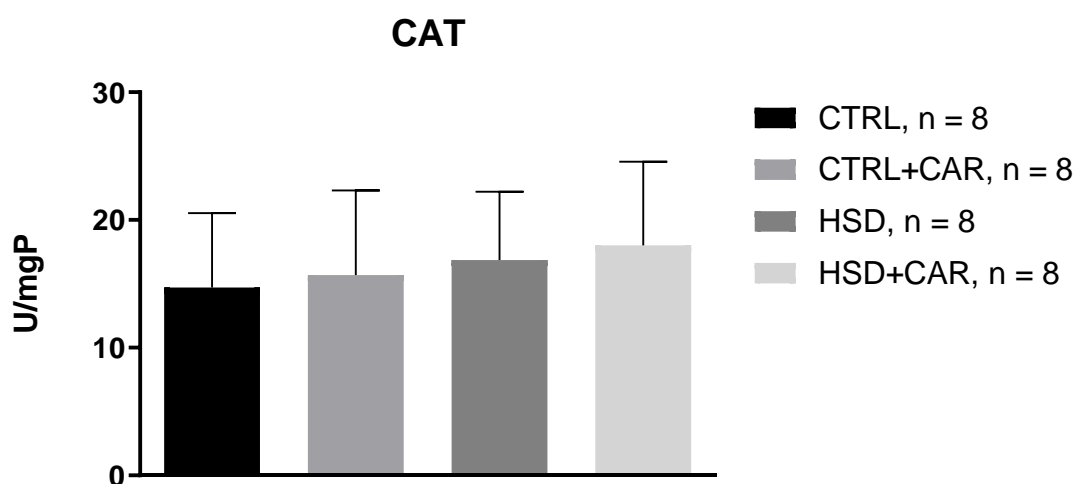
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD) kako bi se opisala varijabilnost podataka unutar svake skupine. Za statističku analizu i usporedbu aktivnosti antioksidativnih enzima među različitim eksperimentalnim skupinama korištena je jednosmjerna analiza varijance (One-Way ANOVA). Ova metoda omogućuje procjenu postojanja statistički značajnih razlika između više nezavisnih skupina.

U slučajevima kada podaci nisu imali normalnu distribuciju, korišteni su alternativni neparametrijski testovi, poput Kruskal-Wallis testa, dok je Holm-Sidakov test primijenjen kao post-hoc analiza za određivanje specifičnih razlika između skupina.

Statistička značajnost postavljena je na razinu $p < 0,05$, što označava da je vjerojatnost pogreške prvog tipa manja od 5%. Svi statistički izračuni izvedeni su korištenjem softvera GraphPad Prism6 (San Diego, CA, SAD). Za izračun potrebne veličine uzorka korišten je softver GPower v3.1.9.7 (Heinrich Heine University, Düsseldorf, Njemačka).

5. REZULTATI

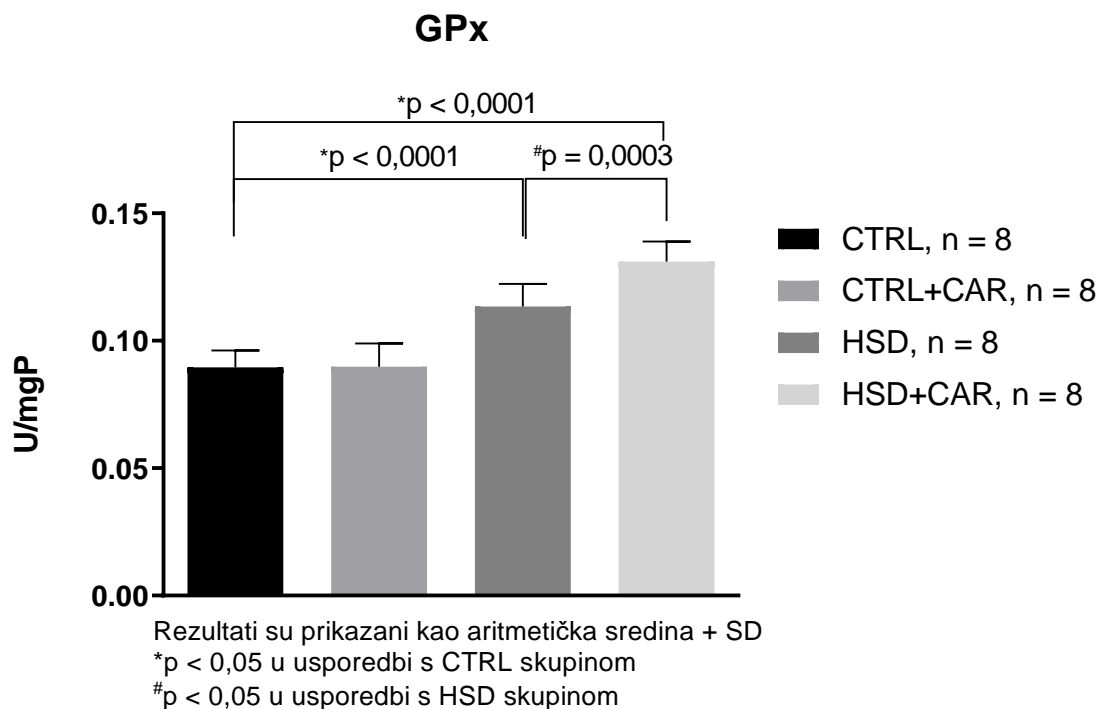
U ovom istraživanju ispitivana je aktivnost ključnih antioksidativnih enzima, katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i superoksid dismutaze (SOD), u serumu Sprague - Dawley štakora. Sprague - Dawley štakori bili su podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina (CTRL), skupina izložena visokoslanjoj prehrani (HSD), skupina kojoj je uz kontrolnu prehranu dodan nadomjestak karnozina (CTRL + CAR), te skupina izložena visokoslanjoj prehrani uz dodatak karnozina (HSD + CAR). Rezultati prikazuju varijacije u aktivnostima enzima između ovih skupina, pri čemu se primjećuju značajni utjecaji visokoslane prehrane i dodatka karnozina (CAR) na određene enzime.



Slika 3. Aktivnost (U/mgP) antioksidativnog enzima katalaze u uzorcima seruma Sprague-Dawley štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

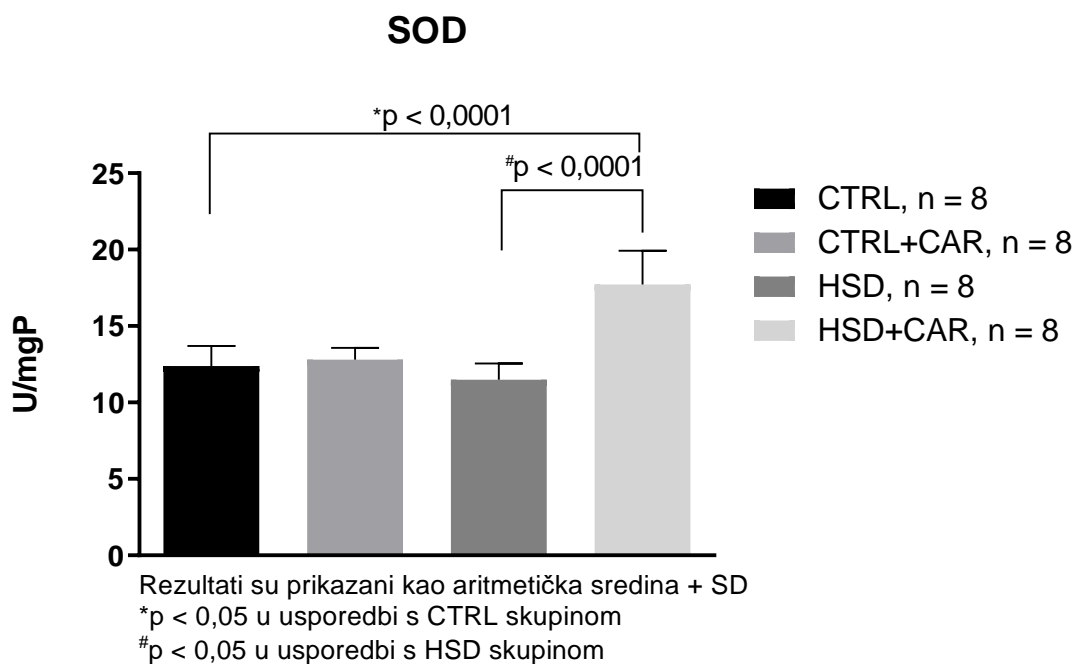
Razlike među skupinama nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Katalaza, koja katalizira razgradnju vodikovog peroksida u vodu i kisik, pokazala je blagi porast aktivnosti u skupinama koje su primale karnozin (CTRL + CAR i HSD + CAR). Najviša prosječna aktivnost katalaze zabilježena je u skupini HSD + CAR ($18,00 \pm 6,572$ U/mg). Ipak, razlike u aktivnosti između skupina nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Ovi rezultati ukazuju na to da dodavanje karnozina nije dovelo do značajnih promjena u aktivnosti katalaze. Blago povećana aktivnost u skupini HSD + CAR može sugerirati određenu ulogu karnozina u smanjenju oksidativnog stresa izazvanog visokoslanom prehranom, no ovi rezultati nisu dovoljno jaki da bi se mogli smatrati značajnima.



Slika 4. Aktivnost (U/mgP) antioksidativnog enzima glutacion peroksidaze (GPx) u uzorcima seruma Sprague-Dawley štakora, prikazana kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

Glutacion peroksidaza, koja sudjeluje u neutralizaciji vodikovog peroksida uz korištenje glutationa, pokazala je značajan porast aktivnosti u skupinama izloženim visokom unosu soli (HSD i HSD + CAR). Skupina HSD pokazala je značajno veću aktivnost GPx u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,0001$), dok je najviša aktivnost zabilježena u skupini HSD + CAR ($0,1311 \pm 0,007754$ U/mg). Ovi rezultati jasno pokazuju da visoki unos soli uzrokuje oksidativni stres koji potiče povećanu aktivnost GPx, dok dodatak karnozina dodatno pojačava taj odgovor. Karnozin bi, stoga, mogao igrati važnu ulogu u smanjenju oksidativnog oštećenja u uvjetima visokog unosa soli, povećavajući sposobnost neutralizacije peroksida.



Slika 5. Aktivnost (U/mgP) antioksidativnog enzima superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima seruma Sprague-Dawley štakora, prikazana kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD), s razlikom $P < 0,0001$ između HSD + CAR i kontrolne skupine.

Superoksid dismutaza, odgovorna za dismutaciju superoksidnih radikala u kisik i vodikov peroksid, pokazala je najizraženije razlike u aktivnostima među ispitivanim skupinama. U skupini HSD + CAR zabilježena je značajno viša aktivnost SOD ($17,72 \pm 2,208$ U/mg) u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,0001$). Skupina HSD, s druge strane, pokazala je smanjenje aktivnosti SOD u usporedbi s kontrolnom skupinom, što upućuje na to da visoki unos soli može smanjiti sposobnost organizma da učinkovito neutralizira superoksidne radikale. Međutim, dodatak karnozina značajno povećava aktivnost ovog enzima, osobito u kombinaciji s visokoslanom prehranom, što ukazuje na snažnu ulogu karnozina u zaštiti organizma od štetnih učinaka oksidativnog stresa izazvanog visokim unosom soli.

6. RASPRAVA

Prehrana bogata solju poznata je kao jedan od glavnih čimbenika koji doprinosi povećanju oksidativnog stresa u organizmu, posebno unutar vaskularnog sustava (20). Oksidativni stres nastaje kao posljedica neravnoteže u odnosu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i sposobnosti organizma da neutralizira njihove štetne učinke putem antioksidativnih mehanizama (3,16). Ova neravnoteža može dovesti do oštećenja staničnih struktura, ubrzanja starenja te povećanog rizika od kroničnih bolesti poput hipertenzije i ateroskleroze (2,10). U ovom istraživanju ispitan je utjecaj visokog unosa soli i dodatka karnozina na aktivnost ključnih antioksidativnih enzima (SOD, GPx i CAT) u serumu Sprague-Dawley štakora, pružajući nove uvide u potencijal karnozina u smanjenju oksidativnog stresa.

Visok unos soli izravno utječe na povećanu proizvodnju ROS-a u tijelu, uključujući superoksidne anione, vodikov peroksid i hidroksilne radikale, koji mogu izazvati oštećenja staničnih membrana, proteina i DNK (9). U ovom istraživanju, štakori izloženi visokoslanjoj prehrani (HSD skupina) pokazali su povećanu aktivnost antioksidativnih enzima, što potvrđuje da tijelo odgovara na oksidativni stres mobilizacijom zaštitnih mehanizama. Aktivnost GPx-a i SOD-a povećala se kako bi se neutralizirali ROS. Međutim, u HSD skupini zabilježeno je smanjenje aktivnosti SOD-a u usporedbi s kontrolnom skupinom, što ukazuje na to da dugotrajna izloženost oksidativnom stresu može dovesti do iscrpljenja obrambenih kapaciteta organizma (10). Ovi rezultati ističu štetnost visokog unosa soli za vaskularno zdravlje, čime se povećava rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti.

Rezultati su pokazali da je karnozin, poznat po svojim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima, igrao važnu ulogu u jačanju aktivnosti antioksidativnih enzima kod štakora izloženih visokoslanjoj prehrani. U skupini HSD + CAR, aktivnost GPx-a i SOD-a bila je znatno povećana u usporedbi s HSD skupinom, što ukazuje na zaštitni učinak karnozina u sprječavanju oksidativnog oštećenja izazvanog prekomjernim unosom soli (4,10). Karnozin je povećao odgovor antioksidativnih enzima, što ukazuje na smanjenje oksidativnog stresa putem poboljšane neutralizacije ROS-a, iako izravna razina ROS-a nije mjerena. Ovi rezultati potvrđuju da karnozin poboljšava prirodni antioksidativni odgovor tijela.

Iako katalaza ima ključnu ulogu u razgradnji vodikovog peroksida u vodu i kisik (6,7), u ovom istraživanju nije zabilježeno značajno povećanje njezine aktivnosti u skupinama tretiranim karnozinom. Najveća prosječna aktivnost katalaze zabilježena je u HSD + CAR skupini, no

razlike među skupinama nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Ovi rezultati ukazuju da katalaza možda ne igra primarnu ulogu u odgovoru na akutni oksidativni stres izazvan visokim unosom soli u ovom kontekstu. Dodatna istraživanja mogu pomoći u razjašnjavanju uloge katalaze kod dugotrajnijeg izlaganja oksidativnom stresu.

Superoksid dismutaza je enzim odgovoran za neutralizaciju superoksidnih radikala, a u skupini HSD + CAR zabilježena je najveća aktivnost ovog enzima u usporedbi s ostalim skupinama. Karnozin je značajno povećao aktivnost SOD-a, što upućuje na njegovu ulogu u jačanju obrambenih mehanizama tijela protiv oksidativnog stresa (17,18). Ovi rezultati potvrđuju ključnu ulogu karnozina u smanjenju oštećenja stanica izazvanih ROS-om.

Glutation peroksidaza igra ključnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog oštećenja, posebno u uvjetima povećane proizvodnje vodikovog peroksida (9). U ovom istraživanju, skupina HSD + CAR pokazala je najveću aktivnost GPx-a, što potvrđuje da karnozin može pojačati antioksidativni odgovor organizma. Ovi rezultati naglašavaju važnost GPx-a u neutralizaciji peroksida i sprječavanju daljnjeg oštećenja stanica uslijed povećanog unosa soli.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da visok unos soli značajno povećava oksidativni stres u organizmu, što je vidljivo iz povećanja aktivnosti GPx i SOD-a. Dodavanje karnozina pojačava antioksidativni odgovor tijela, osobito kroz značajno povećanje aktivnosti GPx-a i SOD-a, dok je učinak na katalazu bio manje izražen. Karnozin se pokazao kao učinkovit zaštitnik protiv oksidativnog stresa izazvanog prehranom bogatom solju, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se detaljnije istražila njegova uloga u dugotrajnijem izlaganju oksidativnom stresu.

7. ZAKLJUČAK

- 1) Ovo istraživanje potvrđuje značajan utjecaj visokog unosa soli na povećanje oksidativnog stresa i aktivnost antioksidativnih enzima u serumu štakora.
- 2) Visok unos soli rezultirao je povećanjem razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što je potaknulo pojačanu aktivnost ključnih antioksidativnih enzima, uključujući glutathion peroksidazu (GPx) i superoksid dismutazu (SOD), u pokušaju neutralizacije štetnih učinaka slobodnih radikala.
- 3) Značajno povećanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i glutathion peroksidaze (GPx) u grupi HSD+CAR potvrđuje sposobnost karnozina da pojača antioksidativni odgovor organizma kod povećanog oksidativnog stresa izazvanog visokim unosom soli.
- 4) Učinak karnozina na aktivnost katalaze (CAT) bio je manje izražen, što ukazuje na njezinu manju ulogu u uvjetima povećanog oksidativnog stresa nakon visokog unosa soli.
- 5) Rezultati ovog istraživanja pružaju uvid u ulogu karnozina u obrani organizma od oksidativnog stresa kod visokoslane prehrane te podcrtavaju njegovu važnost u održavanju antioksidativne ravnoteže.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog završnog rada bio je utvrditi aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, katalaze i glutation-peroksidaze) u serumu Sprague-Dawley štakora nakon visokoslane prehrane sa i bez oralnog nadomjestka karnozina.

Nacrt studije: Eksperimentalna studija na tkivima pokusnih životinja (Sprague - Dawley štakori).

Materijal i metode: Uzorci su prikupljeni na način da su zdravi Sprague - Dawley štakori oba spola nasumično podijeljeni u četiri skupine: kontrolna skupina (CTRL, nije izložena niti karnozinu niti visokoslanjoj prehrani), HSD skupina (izložena visokoslanjoj prehrani), CTRL + CAR skupina (skupina kojoj je dan nadomjestak karnozina) i HSD + CAR skupina (izložena visokoslanjoj prehrani kojoj je dan nadomjestak karnozina). Prije uzorkovanja, štakori su bili anestetizirani. Nakon početka djelovanja anestetika su žrtvovani dekapitacijom te je nakon toga prikupljena krv u epruvete bez antikoagulansa. Prikupljena krv je centrifugirana, supernatant (serum) je odvojen i pohranjen na -80°C do mjerenja aktivnosti enzima. Aktivnost antioksidativnih enzima, superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze određivala se spektrofotometrijski pomoću spektrofotometra s opcijom kinetike.

Rezultati: Dodavanje karnozina nije značajno utjecalo na aktivnost katalaze, iako je primijećeno blago povećanje u skupini s visokim sadržajem soli. S druge strane, visoki unos soli značajno povećava aktivnost glutation peroksidaze, a karnozin dodatno pojačava ovaj odgovor. Također, visoki unos soli smanjuje aktivnost superoksid dismutaze, dok karnozin značajno povećava ovu aktivnost, osobito u uvjetima visokog unosa soli.

Zaključak: Visoki unos soli značajno narušava oksidativni status, dok karnozin učinkovito pojačava antioksidativni odgovor, posebno u uvjetima visokog unosa soli, ističući svoju važnost u očuvanju antioksidativne ravnoteže.

Ključne riječi: antioksidativni enzimi, karnozin, oksidativni stres, visokoslanja prehrana

9. SUMMARY

"The Activity of Antioxidant Enzymes in the Serum of Sprague-Dawley Rats After a High-Salt Diet and Oral Administration of Carnosine Supplement"

Objective of the Study: The aim of this research is to determine the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase) in the serum of Sprague - Dawley rats following a high-salt diet with and without oral supplementation of carnosine.

Study Design: Experimental study on the tissues of test animals (Sprague - Dawley rats).

Materials and Methods: Samples were collected by randomly dividing healthy Sprague-Dawley rats of both sexes into four groups: control group (CTRL, not exposed to either carnosine or high-salt diet), HSD group (exposed to a high-salt diet), CTRL + CAR group (group given oral carnosine supplementation), and HSD + CAR group (exposed to a high-salt diet and given carnosine supplementation). Prior to sampling, rats were anesthetized. After the onset of anesthesia, they were euthanized by decapitation, and blood was collected into tubes without anticoagulants. The collected blood was centrifuged, the supernatant (serum) was separated and stored at -80°C until enzyme activity measurements. The activity of antioxidant enzymes — superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase — was measured spectrophotometrically using a spectrophotometer with kinetic options.

Results: Adding carnosine did not significantly affect catalase activity, although a slight increase was observed in the high-salt group. On the other hand, high salt intake significantly increased glutathione peroxidase activity, and carnosine further enhanced this response. Additionally, high salt intake decreased superoxide dismutase activity, while carnosine significantly increased this activity, especially under high salt intake conditions.

Conclusion: High salt intake significantly impairs the oxidative status, while carnosine effectively enhances the antioxidant response, particularly under high salt intake conditions, highlighting its importance in maintaining antioxidant balance.

Keywords: antioxidant enzymes, carnosine, oxidative stress, high salt diet

10. LITERATURA

- 1) Ćosić A, Jukić I, Stupin M, Mihalj Z, Mihaljević S, Novak R, Vuković I, Drenjančević I. Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol.* 2016;594(17):4917-31.
- 2) Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, et al. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(11):2775-82.
- 3) Pham-Huy LA, Hua H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008.
- 4) Agrawal A, Rathor R, Kumar R, Singh SN, Kumar B, Suryakumar G. Endogenous dipeptide-carnosine supplementation ameliorates hypobaric hypoxia-induced skeletal muscle loss via attenuating endoplasmic reticulum stress response and maintaining proteostasis. *IUBMB Life.* 2021.
- 5) Bingül İ, Yılmaz Z, Aydın AF, Çoban J, Dođru-Abbasođlu S, Uysal M. Antiglycation and antioxidant efficiency of carnosine in the plasma and liver of aged rats. *Geriatr Gerontol Int.* 2017.
- 6) Yuzugullu Karakus Y. Typical Catalases: Function and Structure [Internet]. *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease.* IntechOpen; 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90048>
- 7) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- 8) Flohé L, Ötting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 1984;105:93-104.
- 9) Wendel A. Glutathione peroxidase. In: Jakoby WB, editor. *Enzymatic basis of detoxication.* New York: Academic Press; 1981. p. 333-53.
- 10) Yang P, Deng F, Yuan M, Chen M, Zeng L, Ouyang Y, et al. Metabolomics reveals the defense mechanism of histidine supplementation on high-salt exposure-induced hepatic oxidative stress. *Life Sci.* 2023;314:121355.
- 11) Cesak O, Vostalova J, Vidlar A, Bastlova P, Student V. Carnosine and beta-alanine supplementation in human medicine: Narrative review and critical assessment. *Nutrients.* 2023;15(7):1770.
- 12) Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matic A, Kozina N, Mihaljević Z, et al. Carnosine small but mighty—the prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. *Antioxidants.* 2021;10(7):1037.

- 13) Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, et al. Enhanced antioxidative defense by vitamins C and E consumption prevents 7-day high-salt diet-induced microvascular endothelial function impairment in young healthy individuals. *J Clin Med.* 2020;9(3):843.
- 14) Son DO, Satsu H, Kiso Y, Shimizu M. Characterization of carnosine uptake and its physiological function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biofactors.* 2004;21(1-4):395-8.
- 15) Ghodsi R. Carnosine effect on advanced lipoxidation end-products: A brief review on tissues. *Curr Pharmacol Rep.* 2019;5(4):214-8
- 16) Rezzani R, Favero G, Ferroni M, Lonati C, Moghadasian MH. A carnosine analog with therapeutic potentials in the treatment of disorders related to oxidative stress. *PLOS ONE.* 2019;14(4)
- 17) Palin MF, Lapointe J, Gariépy C, Beaudry D, Kalbe C. Carnosine prevents oxidative damage in myoblast cells derived from porcine skeletal muscle. *J Anim Sci.* 2019;97(Supplement_3):59.
- 18) Caruso G, Benatti C, Musso N, Fresta CG, Fidilio A, Spampinato G, et al. Carnosine protects macrophages against the toxicity of A β 1-42 oligomers by decreasing oxidative stress. *Biomedicines.* 2021;9(5):477.
- 19) Aldini G, de Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, et al. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: Direct and indirect mechanisms. *Free Radic Res.* 2020;55(4):321-30.
- 20) Calabrese V, Scuto M, Salinaro AT, Dionisio G, Modafferi S, Ontario ML, et al. Hydrogen sulfide and carnosine: Modulation of oxidative stress and inflammation in kidney and brain axis. *Antioxidants.* 2020;9(12):1303.
- 21) Solana-Manrique C, Sanz FJ, Martínez-Carrión G, Paricio N. Antioxidant and neuroprotective effects of carnosine: Therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Antioxidants.* 2022;11(5):848.
- 22) Aydın AF, Küçükgergin C, Özdemirler-Erata G, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart, and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology.* 2009;11(1):103-9.
- 23) Peters V, Yard B, Schmitt CP. Carnosine and diabetic nephropathy. *Curr Med Chem.* 2020;27(11):1801-12.
- 24) Yan S, Wu S, Yin M, Chen H, Chen H. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *J Food Sci.* 2009;74(8)

- 25) Devyatov AA, Fedorova TN, Stvolinsky SL, Ryzhkov IN, Riger NA, Tutelyan VA. The study of the neuroprotective effects of carnosine in the experimental model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser B Biomed Chem.* 2019;13(1):55-9.
- 26) Creighton JV, de Souza Gonçalves L, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD, et al. Physiological roles of carnosine in myocardial function and health. *Adv Nutr.* 2022;13(5):1914-29.
- 27) Su Q, Yu XJ, Wang XM, Li HB, Li Y, Bai J, et al. Bilateral paraventricular nucleus upregulation of extracellular superoxide dismutase decreases blood pressure by regulating the NLRP3 and neurotransmitters in salt-induced hypertensive rats. *Front Pharmacol.* 2021;12:756671.
- 28) Gonçalves L, de Sales LP, Saito TR, Campos JC, Fernandes AL, Natali J, et al. Histidine dipeptides are key regulators of excitation-contraction coupling in cardiac muscle: Evidence from a novel Carns1 knockout rat model. *Redox Biol.* 2021;44:102016.
- 29) Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020 Apr 1;2020(4):102269. doi: 10.1101/pdb.prot102269. PMID: 32238597.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Andrea Milić

Datum rođenja: 30.09.2002

Mjesto rođenja: Osijek

Adresa: Ulica Hrvatskih Branitelja 16, Čeminac

E-pošta: milicandrea873@gmail.com

Obrazovanje:

2009 - 2017. Osnovna škola "Matija Gubec", Čeminac

2017 - 2021. Zdravstvena gimnazija, Medicinska škola Osijek

2021 - trenutno Prijediplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku