

Hipolipidemijski učinak arganovog ulja (*Argania spinosa* L.) u BL6 miša

Bertek, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:031268>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
ODJEL PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE
PRERADA MLIJEKA**

Hipolipidemijski učinak arganovog ulja (*Argania spinosa* L.) u BL6 miša

Završni rad

Karlovac, 2015.

Nikolina Bertek, 0314613088

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
ODJEL PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE
PRERADA MLIJEKA**

Hipolipidemijski učinak arganovog ulja (*Argania spinosa* L.) u BL6 miša

Završni rad

Mentor:

**dr.sc. Nina Popović, viši predavač
dr.sc Irena Landeka Jurčević, izv.prof.**

Karlovac, 2015.

Nikolina Bertek, 0314613088

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom dr.sc. Irena Landeka Jurčević, izv.prof. i u Laboratoriju za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod neposrednim vodstvom dr.sc. Domagoj Đikić, doc.

Veliko hvala mojoj mentorici, dr. sc. Ireni Landeka Jurčević, izv.prof. koja je učinila moje vrijeme provedeno u izradi ovog rada vrijednom uspomenom. Hvala na pruženoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela ovog rada, korisnim savjetima tijekom pisanja, korisnim raspravama kao i na uloženom trudu i vremenu kako bi ovaj rad bio izveden do kraja.

Također veliko hvala mentorici ,dr.sc Nini Popović , na pruženoj pomoći tijekom izrade teoretskog djela ovog rada , hvala na na korisnim savjetima i na odvojenom vremenu.

Zahvaljujem i dr. sc. Domagoju Đikiću, doc. na savjetima, pomoći, te usmjeravanju prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela ovog rada u Laboratoriju za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Na kraju zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi kroz studij i izradu ovog rada bili velika podrška i oslonac

Hipolipidemijski učinak arganovog ulja (*Argania spinosa* L.) u BL6 miša *Nikolina Bertek, 0314613808*

SAŽETAK: U sklopu strategije primarne i sekundarne prevencije koronarne bolesti srca od ključne je važnosti promjena načina života. Osobito je važno djelovati na hiperkolesterolemiju koja je jedan od najvažnijih čimbenika rizika za koronarnu bolest. Na koronarnu bolest može se utjecati promjenom načina prehrane, poticanjem tjelesne aktivnosti i smanjenjem prekomjerne tjelesne težine. Promjena načina prehrane treba se temeljiti na smanjenju unosa masti, posebno zasićenih masnih kiselina i kolesterola, uz relativno povećanje unosa nezasićenih masnih kiselina. Ulja, ovisno o podrijetlu i načinu pripreme, imaju različite učinke na serumske lipoproteine. Ispitivanja su pokazala da utjecaj pojedinog ulja na koncentraciju LDL i HDL-kolesterola ovisi o postotku sadržaja pojedinih masnih kiselina. Sastav masnih kiselina u arganovom ulju i brojnost antioksidansa, sugerira korištenje ovog ulja u preventivne svrhe protiv nekih patoloških stanja kao što su kardiovaskularne bolesti. U ovom radu je uspoređen utjecaj prehrane sa povećanim udjelom mononezasićenih masnih kiselina (arganovo ulje) na faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Prehrana sa povećanim udjelom mononezasićenih masnih kiselina snizila je aterogeni indeks za 57%, u odnosu na kontrolnu grupu. Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu može se zaključiti da je dodatak ispitivanog ulja u prehrani bolji nego prehrana bazirana na niskom sadržaju masnoća u prehrani zbog povoljnijeg utjecaja na profil lipida u krvi i faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

Ključne riječi: arganovo ulje, lipoproteini, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol

Hypolipidemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in BL6 mouse *Nikolina Bertek, 0314613088*

Abstract: Intervention strategies for coronary heart disease (CHD) must include attention to life-style factors and changing people's habits. Since hypercholesterolemia is one of the most important risk factors for CHD, the modification of this risk factor including dietary factors, improving exercise, attainment of ideal body weight. The dietary changes should include reduction in intake of total fat, saturated fat and cholesterol, relative increase in intake of unsaturated fats. Oil, depending on the origin and method of preparation, have different effects on serum lipoproteins. Trials have shown that the effects of a particular oil LDL and HDL-cholesterol depends on the percentage content of individual fatty acids. Virgin argan oil is of interest in cardiovascular risk prevention due to its fat composition and antioxidant compounds. The present study compared the CVD risk profile of a high-MUFA diets (argan oil). The most significant difference between the two groups was that the atherogenic index in groups given argan oil was significantly lower (for approximately 57%) than atherogenic index recorded in control group. Collectively, these findings point to the fact that a high MUFA diet may be preferable to a low-fat diet because of more favorable effects on the CVD risk profile.

Keywords: argan oil, lipoproteins, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
	2.1. Arganovo ulje	2
	2.1.1. Kemijski sastav arganovog ulja	4
	2.1.2. Uloga arganovog ulja u prehrani	7
	2.2. Masti i masne kiseline	8
	2.2.1. Vrste masnih kiselina	9
	2.2.1.1. Mononezasićene masne kiseline	10
	2.3. Kolesterol	10
	2.4. Triacilgliceridi	12
	2.5. Lipoproteini	13
	2.5.1. Metabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima	14
	2.5.2. Metabolizam lipoproteina male gustoće (LDL)	16
	2.5.3. Metabolizam lipoproteina velike gustoće (HDL)	17
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	20
	3.1. MATERIJALI	20
	3.1.1. Kemikalije	20
	3.1.2. Oprema i instrumenti	20
	3.2. METODE	20
	3.2.1. Pokusne životinje	20
	3.2.2. Priprema i mjerenje lipida u serumu	21
	3.2.2.1. Ukupni kolesterol	22
	3.2.2.2. HDL-kolesterol	22
	3.2.2.3. Trigliceridi	23
	3.2.3. Statistička obrada podataka	23
	3.2.3.2. Statističke metode koje smo koristili pri izradi tablica	23
	3.2.4. Aterogeni indeks	24
4.	REZULTATI	25
	4.1. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na prirast težine u BL6 miša	25
	4.2. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na sastav seruma u BL6 miša	26
	4.2.1. Utjecaj monoezasićenih masnih kiselina na koncentraciju kolesterola u serumu	26
	4.2.2. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju triacilglicerola u serumu	27
	4.2.3. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju HDL-kolesterola u serumu	27
	4.2.4. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju LDL-kolesterola u serumu	28
	4.2.5. Usporedba utjecaja nezasićenih masnih kiselina na omjer koncentracija LDL i HDL-kolesterola u serumu	29
	4.2.6. Usporedba utjecaja mononezasićenih masnih kiselina iz arganovog ulja na sastav serumskih komponenti u odnosu na kontrolnu grupu u BL6 miša	30
	4.2.7. Aterogeni indeks	31
5.	RASPRAVA	34
	5.1. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na težinu u BL6 miša	34
	5.2. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju HDL i LDL-kolesterola u serumu	35
	5.3. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju ukupnog kolesterola i triglicerida u serumu	36
	5.4. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na aterogeni indeks	37
6.	ZAKLJUČCI	39
7.	LITERATURA	40

1. UVOD



1. UVOD

Povišene koncentracije lipida u plazmi mogu biti posljedica prekomjerne i neadekvatne prehrane ili poremećaja metabolizma lipida. Lipidi imaju mnogobrojne funkcije, služe kao energetska "skladište" poput klasičnih masti i ulja; u sastavu su staničnih membrana svih živih bića (fosfolipidi, ceramidi, steroli, sfingolipidi) i time štite stanicu i cijeli organizam od nepovoljnih utjecaja.

Brojna istraživanja pokazuju kako učinak različitih masti i ulja na zdravlje ovisi uglavnom o njihovom sastavu masnih kiselina. U vremenu kada zbog povećanog broja osoba s povećanom tjelesnom masom i pretilih osoba raste i broj oboljelih od dijabetesa, bolesti krvožilnog sustava i drugih poremećaja, vlada uopćeno mišljenje kako su za sve krive masnoće. Pri tome se zaboravlja činjenica kako su neki sastojci masnoća kao što su esencijalne masne kiseline i vitamini topljivi u mastima nužni za normalan rast i razvoj ljudskog organizma.

Masne kiseline s malim razlikama u strukturi mogu imati vrlo različit metabolički utjecaj. Epidemiološke studije provedene posljednjih godina pokazale su da ukupan unos masnoća ima manji utjecaj na ljudsko zdravlje u odnosu na sastav masnih kiselina u mastima koje prehranom unosimo u organizam. Masne kiseline su životno važne za održavanje života, a njihov nedostatak uzrokuje poremećaj metabolizma. Istovremeno suvišna upotreba lipida može dovesti do neželjenih učinaka (Ascherichio i sur., 1996).

Lipoproteini su kompleksi lipida i posebne grupe proteina zvanih apolipoproteini. Zbog izrazito važne uloge u ljudskom organizmu, prisutna su konstantna istraživanja koja pokazuju kakvu zapravo funkciju oni imaju vezano uz ljudsku prehranu i zdravlje. Prehrana može imati značajan utjecaj na promjene u lipoproteinima. Tri čimbenika iz hrane mogu povećati razinu aterogenih frakcija lipoproteina, a to su: povećani unos kolesterola, zasićenih masnih kiselina te preveliki unos energetske bogate hrane. Sva tri navedena čimbenika su karakteristično obilježje prehrane većeg dijela suvremenog razvijenog svijeta (Forti i sur., 2006.).

U ovom radu je uspoređen utjecaj prehrane sa povećanim udjelom mononezasićenih masnih kiselina (arganovo ulje) na faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

2. TEORIJSKI DIO



2. TEORIJSKI DIO

2.1. Arganovo ulje

Arganovo ulje, koje se još naziva i marokansko ulje, zbog iznimnih svojstava te sadržaja vitamina (vitamin E), minerala, zasićenih (palmitinska i stearinska kiselina) te nezasićenih masnih kiselina (linolna, alfa linolenska, oleinska) i sterola s pravom se naziva „tekućim zlatom“ Maroka (Guillaume, 2011).

Arganovo ulje je jedno od najstabilnijih ulja (slika 1) (Anonymus 1, 2012). Sadrži oko 90% nezasićenih masnih kiselina te je otpornije na oksidaciju od maslinovog ulja. Arganovo ulje je malo tamnije od maslinovog ulja i ima okus na orah.



Slika 1. Arganovo ulje i plod (Anonymus 1, 2012).

Zbog spomenutih svojstava osim što snižava razinu kolesterola i jača obrambeni sustav organizma poznat je i kao jedan od najsnažnijih prirodnih sastojaka za tretiranje bora i zadržavanje mladolikog izgleda kože. Najviše se potrebljava se u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (izrada krema za lice, losiona itd.), u posljednje vrijeme se sve više koristi kao dodatak prehrani (Charrouf i Guillaume, 2011).

TEORIJSKI DIO

Drvo argana (*Argania Spinosa*) raste samo u jugozapadnom dijelu Maroka. Dobro podnosi sušu, (slika2) (Schoepke, 2008; USDA, 2008) otporno je na visoke temperature , a ako odumre, nakon 7 godina može ponovno oživjeti. Iz toga razloga ono simbolizira strpljivost i izdržljivost (Anonymus 2, 2012).



Carstvo:	Plantae
Divizija:	Magnoliophyta
Razred:	Magnoliopsida
Red:	Ericales
Porodica:	Sapotaceae
Rod:	<i>Argania</i>
Vrsta:	<i>A. spinosa</i>

Slika 2. Drvo argana (*A. Spinosa*) (Anonymus 2, 2012).

Stablo argana naraste 8 do 10 m u visinu, a može živjeti 150 do 200 godina. Stablo je trnovito sa kvrgavim deblom, listovi su mali, 2 do 4 cm dugi, ovalni sa zaobljenim vrhom. Stablo argana cvjeta u travnju, malim cvjetovima s pet žuto-zelenih latica. Plod je 2 do 4 cm dugačak te 1.5 do 3 cm širok. Plod argana je nalik na maslinu. U središtu ploda je vrlo tvrd orah koji sadržava jednu do tri male, uljem bogate sjemenke. Plodovi su zreli u lipnju i srpnju, a potrebno im je više od godinu dana kako bi sazrijeli.

Arganovo ulje nastaje tiješnjenjem arganovih oraha na tradicionalan način (slika 3) (Anonymus 3, 2011). Ručno ubrani plodovi se najprije razbijaju, zatim se sjemenke odvajaju i suše na suncu , prže kako bi ulje dobilo bogati orašasti okus i melju u pastu iz koje se gnječenjem dobija ulje. Proces dobivanja ulja je dugotrajan i težak. Za 1L arganova ulja

TEORIJSKI DIO

potrebno je oko 100 kg svježih plodova (Anonymus 4, 2012). Dolazi u prodaju kao djevičansko arganovo ulje (Guillaume, 2011).

S obzirom na visoku cijenu arganovo ulje se češće koristi samo za preljev za salatu ili kus kus. Za upotrebu u kulinarstvu arganovi orašćići se najprije razbijaju i prže dok se u kozmetičkoj industriji koristi djevičansko arganovo ulje. Za zdravlje je preporuka uzimati 2 čajne žlice arganova djevičanskog ulja jer snižava razinu kolesterola i jača imunosti sustav.



Slika 3. Tradicionalni način dobivanja djevičanskog arganovog ulja (Anonymus 3, 2011)

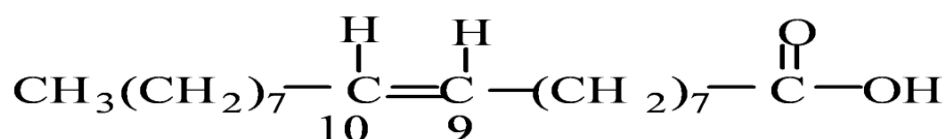
2.1.1. Kemijski sastav arganovog ulja

Arganovo ulje je smjesa kompleksnog kemijskog sastava. Najveći dio u ulju (oko 99%) čine jednostavni lipidi ili osapunjivi dio, tj. triacilgliceroli (esteri masnih kiselina i glicerola):

- Palmitinska kiselina (16:0) 12,0%
- Stearinska kiselina (18:0) 6,0%
- Oleinska kiselina (18:1 n-9) 42,8%
- Linolna kiselina (18:2 n-6) 36,8%
- α -linolenska kiselina (18:3 n-3) < 0,5%.

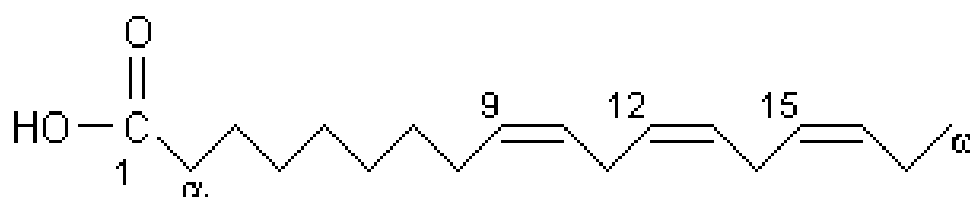
TEORIJSKI DIO

Vidljivo je da u sastavu masnih kiselina arganova ulja prevladava jednostruko nezasićena oleinska kiselina (slika 4) (Anonymus 5, 2009), skromni udjel imaju zasićene masne kiseline, palmitinska i stearinska. Navedene nezasićene masne kiseline su zbog dvostrukih veza, u odnosu na zasićene masne kiseline, sklonije procesima oksidacije i autooksidacije. Glavna uloga prethodno navedenih masnih kiselina je sudjelovanje u strukturi biomembrana, gdje utječu na njihovu fluidnost i permeabilnost, te čine prekursore prostaglandina (nakon prevođenja u više homologe).



Slika 4. Oleinska kiselina - glavni sastojak arganova ulja (Anonymus 4, 2009)

Negativna strana arganova ulja je što ne sadrži α -linolenska kiselinu (omega 3 kiselinu) (slika 5.) koja je esecijalna kiselina i bitna je u prehrani. Stoga se arganovo ulje kombinira s drugim uljima kao što su sojino ulje i ulje repice jer ta ulja imaju veći postotak α -linolenska kiseline (Drissi i sur., 2004).



Slika 5. α -linolenska kiselina (Anonymus 5, 2012)

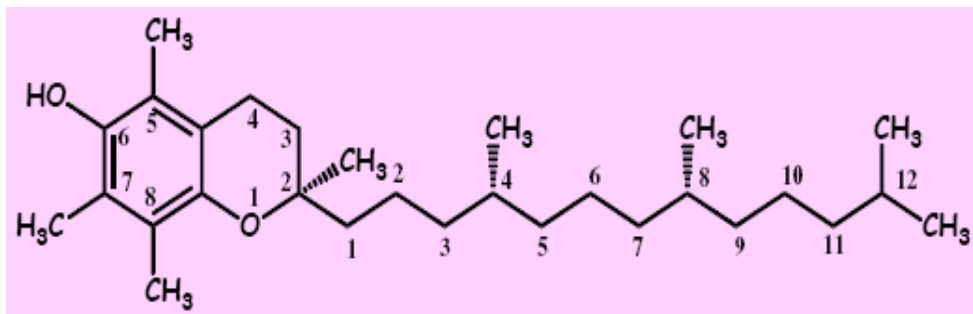
Neosapunjivi dio arganova ulja, tzv. “negliceridni dio“ čini oko 1% količine ulja (tablica 1). To su triterpenski alkoholi, steroli (kolesterol, β -sitosterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, itd.), α -tokoferol, fenolni sastojci (fenoli, polifenoli, fenolne kiseline), karotenoidi (β -karoten), ksantofili.

TEORIJSKI DIO

Tablica 1. Količina neosapunjivih sastojaka u arganovom ulju:

STEROLI	mg/100 g ulja
Schottenol	142
Spinasterol	115
Stigmasta-8,22-dien-3 β -ol	9
ostali	29
TOKOFEROLI	mg/kg ulja
α	35
β	122
γ	480
Fenolni spojevi	$\mu\text{g/kg}$ ulja
Vanilinska kiselina	67
Siriginična kiselina	37
Ferulična kiselina	3147

Arganovo ulje je vrlo bogato vitaminom E (Slika 6.). Količina tokoferola u arganovu djeveičanskom ulju je 620 mg /kg, a ako uspoređujemo količinu tokoferola u maslinovu ulju koja iznosi 320 mg/kg (Ould Mohamedou, 2011). Vitamin E predstavljaju u mastima topljivi tokoferoli koji u organizmu djeluju kao jako dobri antioksidansi. Kao antioksidans vitamin E spriječava oksidaciju nezasićenih masnih kiselina (membranskih lipida) te reagira sa slobodnim radikalima (Guillaume, 2011).



Slika 6. Struktura vitamina E (Anonymus 6, 2012)

2.1.2. Uloga arganovog ulja u prehrani

Djevičansko arganovo ulje ima pozitivan ujecaj na sprečavanje kardiovaskularnih bolesti jer je bogato fenolima i fitosterolima. Negativna strana arganova ulja je što ne sadrži α -linolenska kiselina koja je esecijalna kiselina i bitna je u prehrani. Nedostatak esencijalnih masnih kiselina može rezultirati poremećajima u koži, jetri i metabolizmu. Stoga se kombinira s uljima koja su bogata α -linolenskom kiselinom.

Poznat je pozitivni učinak arganova ulja na usporavnje procesa starenja. Stalnim nastajanjem slobodnih radikala u ljudskom organizmu dolazi do niza reakcija koje dovode do strukturnih promjena staničnih makromolekula (nukleinske kiseline, kolagen, elastin), enzima i polinezasićenih masnih kiselina iz fosfolipida staničnih membrana. Posljedica tih promjena je ubrzano starenje stanica. Za usporavanje procesa starenja važno je organizam opskrbiti značajnom količinom antioksidansa (Drissi i sur., 2004).

Arganovo ulje može spriječiti ateroskleroze i hiperkolesterolemiju. Kod pojave i razvoja kardiovaskularnih bolesti ključnu ulogu ima količina kolesterola u organizmu. Posebno je opasan 'loš' kolesterol ili LDL (eng. low density lipoprotein ili lipoprotein niske gustoće) koji se nakuplja na unutarnjim stijenkama arterija koje se tako sužavaju i dolazi do ateroskleroze. Rizik od kardiovaskularnih bolesti povezuje se s visokim vrijdnostima LDL-kolesterola i triglicerida u organizmu. Konzumiranje arganova ulja dovodi do smanjenja LDL-kolesterola dok istovremeno ne uzrokuje opadanje 'dobrog' HDL-kolesterola (eng. high density lipoprotein ili lipoprotein visoke gustoće) (Derouiche i sur., 2005). Također je dokazano da bolesnici koji boluju od dijabetesa tipa 2 su skloniji oboljenju od kardiovaskularnih bolesti i dodatkom arganovog ulja u prehrani mogu preventivno djelovati na pojavu kardiovaskularnih bolesti (Ould Mohamedou, 2011).

Uočena je zaštitna uloga arganova ulja i kod nastajanja tumora, posebno tumora prostate i debelog crijeva. Ova važna uloga rezultat je ravnoteženog sastava masnih kiselina otpornih na peroksidaciju i prisutnosti prirodnih antioksidansa vitaminskog (β -karoten, vitamin E) i nevitaminskog podrijetla (flavonoide, fenolni spojevi) za koje se čak pretpostavlja da inhibiraju djelovanje nekih kancerogenih spojeva (npr. policikličkih ugljikovodika) (Benani i sur., 2007).

Poznata je nadalje, njegova uloga u zacjeljivanju rana, regeneraciji tkiva, liječenju opekline, neurodermitisa, psorijazi i drugim kožnim bolestima, poboljšava čvrstoću kože,

TEORIJSKI DIO

prevenira pojavu strija, pomlađuje kožu, poboljšava kapacitet mozga, blagotvorno utječe na jetra i probavu, reumatske i kardiovaskularne bolesti.

Arganovo ulje u prehrani koristimo kao dodatak jelima nakon kuhanja ili prženja. Kombinacija ulja i limunova soka izvrstan je preljev za salate.

2.2. Masti i masne kiseline

Masti, osim energetske uloge, imaju i druge važne funkcije u ljudskom organizmu. Dnevna potreba organizma za mastima je 50-60 g, što predstavlja 20-30% ukupnih energetskih potreba. Pri tome bi zasićene masti smjele činiti najviše 10%, jednostruko nezasićene masti 10-15%, a višestruko nezasićene masti 6-10% od ukupnog unosa energije. Masti su sastavni dio fosolipida nalaze se u staničnim membranama svih tkiva, izgrađuju lipoproteine, te služe kao prekursori pojedinih hormona. Imaju važnu ulogu u metabolizmu liposolubilnih vitamina (A, D, E, K), te njihova prisutnost u prehrani čini pojedine namirnice probavljivijima. Također usporavaju probavu i produljuju osjećaj sitosti (Reiner, 1998).

Posljednjih godina provedene su epidemiološke studije koje su pokazale da ukupan unos masnoća ima manji utjecaj na ljudsko zdravlje u odnosu na sastav masnih kiselina kod masti koje prehranom unosimo u ljudski organizam.

Masti (lipidi) su organski spojevi koji imaju važnu ulogu u sastavu ljudskog tijela i odvijanju mnogih metaboličkih procesa. Nekoliko vrsta lipida uključeno je i u tjelesnu i krvožilnu regulaciju. U ljudskoj krvi postoje 4 vrste lipida, a to su :

1. Kolesterol predstavlja važnu vrstu lipida koji igra presudnu ulogu u:
 - sastavu stanične opne;
 - u proizvodnji nekih hormona (kortikosteroida, spolnih hormona);
 - u proizvodnji žučnih kiselina.
2. Trigliceridi su spojevi (esteri) glicerola i masnih kiselina, služe prvenstveno kao izvor energije. Visoke razine triglicerida u krvi prepoznate su kao samostalni čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.
3. Slobodne masne kiseline. Osim onih vezanih u sastavu triglicerida ili kolesterol „kompleksa“, postoje i masne kiseline koje slobodno kolaju krvlju, većinom vezane

na albumin. Općenito govoreći, postoji mnogo vrsta slobodnih masnih kiselina. Neke od njih može sintetizirati ljudsko tijelo, a neke ne u dostatnoj količini

4. Fosfolipidi u svojoj strukturi sadrže fosfor. Nalaze se u staničnim opnama. Njihova eventualna važnost u razvoju kardiovaskularnih bolesti još nije utvrđena.

2.2.1. Vrste masnih kiselina

Prema sposobnosti ljudskog tijela da sintetizira masne kiseline razlikuju se dva tipa masnih kiselina. Masne kiseline koje mogu nastati iz drugih tvari u samom organizmu i nazivaju se neesencijalnim masnim kiselinama te masne kiseline koje se ne mogu sintetizirati u ljudskom tijelu zbog nepostojećeg ili nedostatnog enzimatskog sustava. Ove masne kiseline potrebno je uzimati ili hranom ili u dodacima prehrani kako bi se zadovoljile tjelesne potrebe. Nazivaju se esencijalnim masnim kiselinama.

Prema kemijskoj strukturi masne kiseline mogu se podijeliti na:

1. Zasićene masne kiseline nepovoljno djeluju na lipidni profil. Osnovni prehrambeni izvori zasićenih masnih kiselina su namirnice životinjskog porijekla poput mesa, maslaca i mliječnih proizvoda, te palmino i kokosovo ulje. Tipični predstavnici su miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) kiselina.
2. Jednostruko nezasićene masne kiseline i višestruko nezasićene masne kiseline snižuju razinu LDL lipoproteina u značajnim razmjerima. Te su masne kiseline najviše sadržane u maslinovom ulju, u ulju sjemenki kikirikijevo ulju, te u arganovu ulju. Značajna se količina jednostruko nezasićenih masnih kiselina nalazi i u avokadu i u bademima. Omega-3-masne kiseline nalaze se u masnim ribama, poput lososa, srdele, tune, haringe, skuše, a prehrana bogata tim kiselinama djeluje povoljno kod pojedinaca nakon preboljenog infarkta miokarda. One djeluju između ostalog i na poboljšanje endotelne funkcije djelujući direktno na adhezijske molekule. Jedući 1-2 obroka masne ribe tjedno djelujemo preventivno na pojavu bolesti srca, krvnih žila, te smanjujemo mogućnost nastanka moždanog udara (Ascherio, i sur 1996.).

2.2.1.1. Mononezasićene masne kiseline

Mononezasićene ili jednostruko nezasićene masne kiseline (MUFA) nalazimo u visokim koncentracijama u maslinovom, kikirikijevom, arganovu i kanola ulju, avokadu, bademima, lješnjacima, te sezamovim i bučnim sjemenkama. Oko 50 posto MUFA-e u naš organizam dopiše putem životinjskih produkata, prvenstveno mesa. Najviše zastupljena MUFA u prehrani je oleinska kiselina, a sadži jednu dvostruku vezu na devetom ugljikovom atomu (Keys i sur., 1965).

Eksperimentalne i kliničke studije su pokazale da mononezasićene masne kiseline *cis*-konformacije dovode do umjerenog snižavanja ukupnog (za 10%), kao i LDL- kolesterola (za 14%) te triglicerida (za 13%), kao i izvjesnog porasta HDL-kolesterola (Müller i sur., 2001). Smanjuju i oksidaciju LDL čestica, djelujući kao antioksidacijsko sredstvo. Osim toga imaju i zaštitni efekt u odnosu na razvitak tromboze, kako u zdravih, tako i kod osoba s povišenom razinom kolesterola u krvi (Mann, 2002).

2.6. Kolesterol

Kolesterol je kemijski spoj steroidne strukture (slika 7) (Anonymus) koji u organizmu fiziološki nastaje u jetri, a prisutan je u svakoj živoj stanici ljudi i životinja. Zbog toga što ga organizam u potrebnim količinama može sam sintetizirati, kolesterol nije esencijalna hranjiva tvar. Mehanizmom povratne sprege, ovisno o količini unesenog kolesterola hranom, regulira se endogena sinteza kolesterola.

Kolesterol čini dio stanične membrane, sudjeluje u regulaciji permeabilnosti stanične membrane, služi za sintezu nekih hormona (kore nadbubrežne žlijezde, reproduktivnih hormona), preteča je žučnih kiselina koje služe u probavi i apsorpciji masti i vitamina kao i za sintezu vitamina D.

Način prehrane može utjecati na sintezu kolesterola u tijelu. Količine kolesterola u tijelu ne ovise samo o endogenoj sintezi i prehrambenom unosu već i o stupnju apsorpcije (apsorbira se u rasponu od 25 do 75%), transportu, katabolizmu žučnih kiselina i ekskreciji.

Kolesterola ima osobito mnogo u žumanjku jajeta, iznutricama kao što su mozak, jetra i bubrezi, rakovima, govedini i svinjetini..

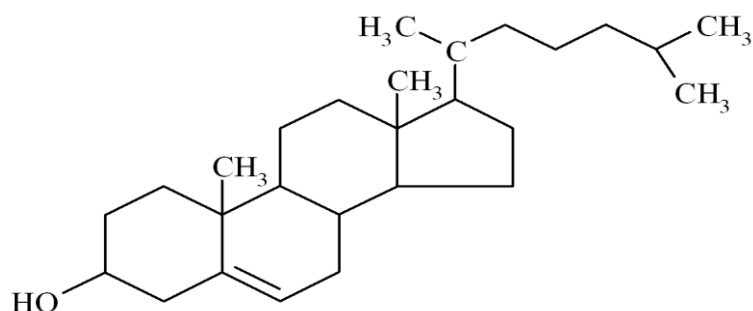
TEORIJSKI DIO

Povećani unos kolesterola hranom nedvojbeno povisuje koncentraciju kolesterola u krvi, osobito ako u hrani ima mnogo zasićenih, a malo višestruko nezasićenih masnih kiselina (Kaić-Rak i sur., 2000).

U plazmi su gotovo 2/3 kolesterola esterificirane masnim kiselinama tvoreći estere kolestrola. U rutinskim metodama mjeri se ukupan kolesterol i ne razlikuje se neesterificirani od esterificiranog oblika. U krvi je prisutan u više tipova kompleksa. Prvi tip, tzv. "loši" kolesterol (LDL- kolesterol) prisutan je u obliku krvnih čestica poznatim kao lipoproteini niske gustoće. Stoga je on jedan od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Drugi tip predstavlja tzv. "dobar" kolesterol koji je prisutan u obliku krvnih čestica nazvanih lipoproteini visoke gustoće i nosi naziv HDL- kolesterol

U rutinskim metodama mjeri se ukupan kolesterol i ne razlikuje se neesterificirani od esterificiranog oblika. Kolesterol je prisutan u krvi u različitim tipovima "kompleksa". Prvi tip, tzv. „loši“ kolesterol, ima veliku sposobnost podržavanja nastajanja ateroskleroze ako je njegova razina u krvi povišena. Ovaj oblik kolesterola prisutan je u obliku krvnih čestica poznatim kao lipoproteini niske gustoće ili LDL-kolesterol. Stoga je on jedan od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Drugi tip predstavlja tzv. „dobar“ kolesterol koji ima suprotan učinak. On ima sposobnost smanjenja općeg kardiovaskularnog rizika. Ovaj oblik kolesterola nosi naziv HDL-kolesterol jer je prisutan u obliku krvnih čestica nazvanih lipoproteini visoke gustoće.

Kolesterol koji ulazi u tanko crijevo ima dvostruko podrijetlo: iz žuči i iz hrane. Dnevni udio kolesterola iz žuči iznosi od 600 do 1000 mg. Količina kolesterola unesenog hranom u organizam varira od 150 do 500 mg na dan. Od 50% ukupnog kolesterola pristiglog u tanko crijevo apsorbira se, dok se ostatak izlučuje stolicom (Grundý i sur., 1990.).



Slika 7. Strukturna formula kolesterola (Anonymus 7, 2012)

TEORIJSKI DIO

Mjesto najveće sinteze kolesterola u organizmu je jetra. Sav kolesterol potječe iz acetata. Spajanjem triju molekula acetata nastaje 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA), iz kojega djelovanjem enzima HMG-CoA reduktaze nastaje mevalonska kiselina. Ta je reakcija iznimno važna zbog svoje limitirajuće uloge u biosintezi kolesterola (Huff i sur., 1997.). Daljnjim slijedom niza kemijskih reakcija iz mevalonske kiseline nastaje kolesterol. Kolesterol se u jetri razgrađuje na primarne žučne kiseline (kolna i kenodaksikolna). Žučne kiseline pomažu otapanje kolesterola u žuči, omogućujući tako njegovu ekskreciju (Grundy i sur., 1990.).

Kolesterol i žučne kiseline besprekidno cirkuliraju između tankog crijeva i jetre. Taj se proces zove enterohepatička cirkulacija. Kolesterol sintetiziran u jetri ulazi u cirkulaciju, prelazi u žučne kiseline ili se luči u žuč, a putem nje u tanko crijevo. Oko 50% kolesterola koji je na taj način dospio u tanko crijevo ponovno se apsorbira i vraća u jetru. Ostatak se izlučuje stolicom. Količina kolesterola, koji nakon resorpcije ponovno ulazi u jetru, mehanizmom povratne sprege kontrolira jetrenu sintezu kolesterola.

Žučne kiseline u jetri svoju sintezu također reguliraju metabolizmom povratne sprege. Oko 300-500 mg kolesterola se pretvara u žučne kiseline, a one se resecerniraju u žuč kako bi zatvorile ciklus enterohepatičke cirkulacije. Žučne kiseline prolaze put enterohepatičke cirkulacije oko šest puta na dan – dva puta uz svaki obrok (Brown i sur., 1986.).

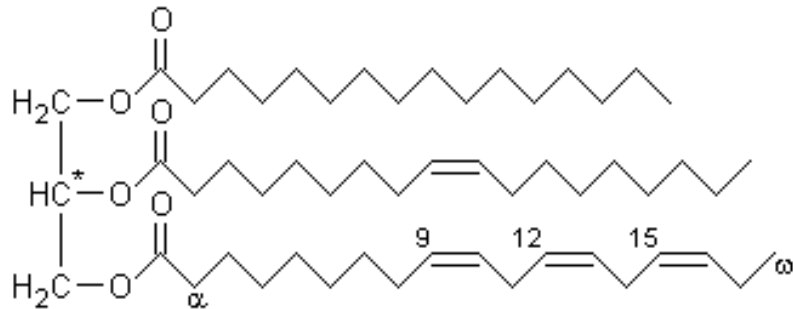
Zbog svojstva hidrofobnosti, lipidi u plazmi bivaju transportirani u sklopu velikih makromolekularnih kompleksa lipoproteina. to su čestice koje sadržavaju lipide i proteine – apolipoproteine. Hidrofobnu jezgru lipoproteina čine nepolarni lipidi – trigliceridi i esterificirani kolesterol. Hidrofilni vanjski dio, koji čine polarni lipidi – fosfolipidi i neesterificirani kolesterol, te apolipoproteini, predstavlja granicu između plazme i nepolarne lipidne jezgre. Nepolarni dijelovi apolipoproteina smještenih na površini dopiru i do jezgre čestica, pridonoseći tako stabilnosti cijele čestice. Navedena polarna površina omogućuje transport netopivih estera kolesterola i triglicerida u plazmi (Grundy i sur., 1984.).

2.7. Triacilglireridi

Trigliceridi su esteri glicerola i masnih kiselina (Anonymus 9, 2010.). Glavni su sastojak životinjskih i biljnih masti i ulja. Dobili su ime po tome što se tri masne kiseline vežu na tri hidroksidne skupine glicerola.

TEORIJSKI DIO

Masne kiseline su dugačke molekule koje na jednom kraju imaju karboksilnu skupinu (-COOH) a na drugom kraju metilnu skupinu (-CH₃) tako da svojstva triglicerida ovise o molekulama masnih kiselina pri čemu je odlučujuća duljina njihovih lanaca i broj dvostrukih veza (slika 8).



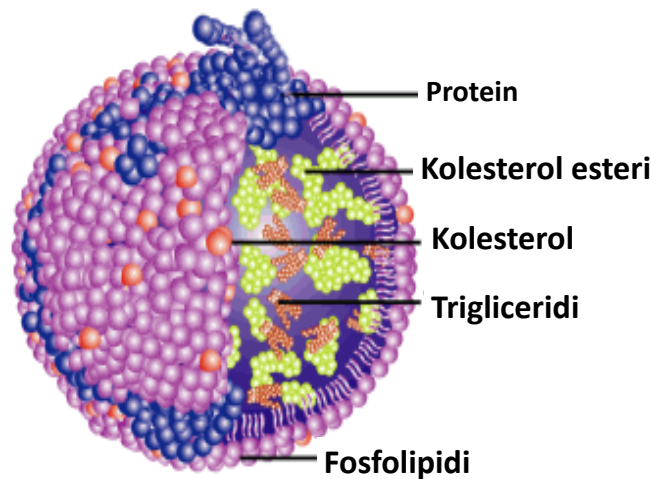
Slika 8. Primjer triglicerida: lijevi dio - glicerol, desni dio od vrha prema dnu: palmitinska kiselina, oleinska kiselina, α -linolna kiselina

Trigliceridi koji hranom dopijevaju u tanko crijevo razlažu se u masne kiseline i glicerol koji se resorbira u stanicama crijevne sluznice. Takvi trigliceridi koji se dalje transportiraju u hilomikronima nazivaju se egzogeni (vanjski), a trigliceridi nastali u jetri i masnom tkivu nazivaju se endogeni (unutarnji).

2.5. Lipoproteini

Lipidi u plazmi potječu dijelom iz hrane (egzogeni) ili su sintetizirani u organizmu (endogeni). Oni su gotovo netopivi u vodi i prenose se u tjelesnim tekućinama u obliku kompleksa s proteinima koje zovemo lipoproteini. Lipoproteini se sintetiziraju obično u jetri ili u crijevima, a nakon izlučivanja modificiraju ih razni enzimi. Lipoproteini (LP) su kompleksi lipida i jedne posebne grupe proteina, apolipoproteina (apo).

Ovisno da li sadrže jednu ili više vrsta apolipoproteina lipoproteini se dijele na jednostave i složene. Njihova izoelektrična točka je kod pH 5.5 iznad koje su negativno nabijeni. Lipoproteini (slika 9.) (Anonymus 10, 2012) su čestice koje sudjeluju u transportu kolesterola i triglicerida u plazmi.



Slika 9. Struktura lipoproteina

Glavni lipidi u lipoproteinima su kolesterol, trigliceridi i fosfolipidi. Lipoproteini su klasificirani na osnovu dijametra, molekulske mase, gustoće i odnosa lipida i apolipoproteina na: hilomikrone, lipoproteine vrlo male gustoće (VLDL), lipoproteine intermedijarne gustoće (IDL), lipoproteine male gustoće (LDL) i lipoproteine velike gustoće (HDL) (Forti i sur., 2006.). Trigliceridi i esterificirani oblici kolesterola (esteri kolesterola) su nepolarni lipidi netopljivi u vodenoj sredini (hidrofobni) i čine srž lipoproteina.

Fosfolipidi i mala količina slobodnog (neesterificiranog) kolesterola, koji su topljivi i u lipidima i u vodenoj sredini (amfipatski), pokrivaju površinu lipoproteinskih čestica, tako da se ponašaju kao međusloj između plazme i komponenata lipidne jezgre. Apolipoproteini se također nalaze u površinskom sloju lipoproteina, i imaju više uloga, esencijalnih za promet lipoproteina. Pružaju strukturnu stabilnost lipoproteinima i određuju metaboličku sudbinu ostatka čestice. Neki su kofaktori enzima koji razlažu lipide, drugi posjeduju ligande koji posreduju u vezanju lipoproteina za receptore na površini stanice, čime se osigurava ulaz lipoproteina u stanicu i njihov katabolizam. Sudjeluju u transferu lipida sa jednih na druge lipoproteine omogućavajući njihovo remodeliranje u plazmi (Lima i sur., 2007.).

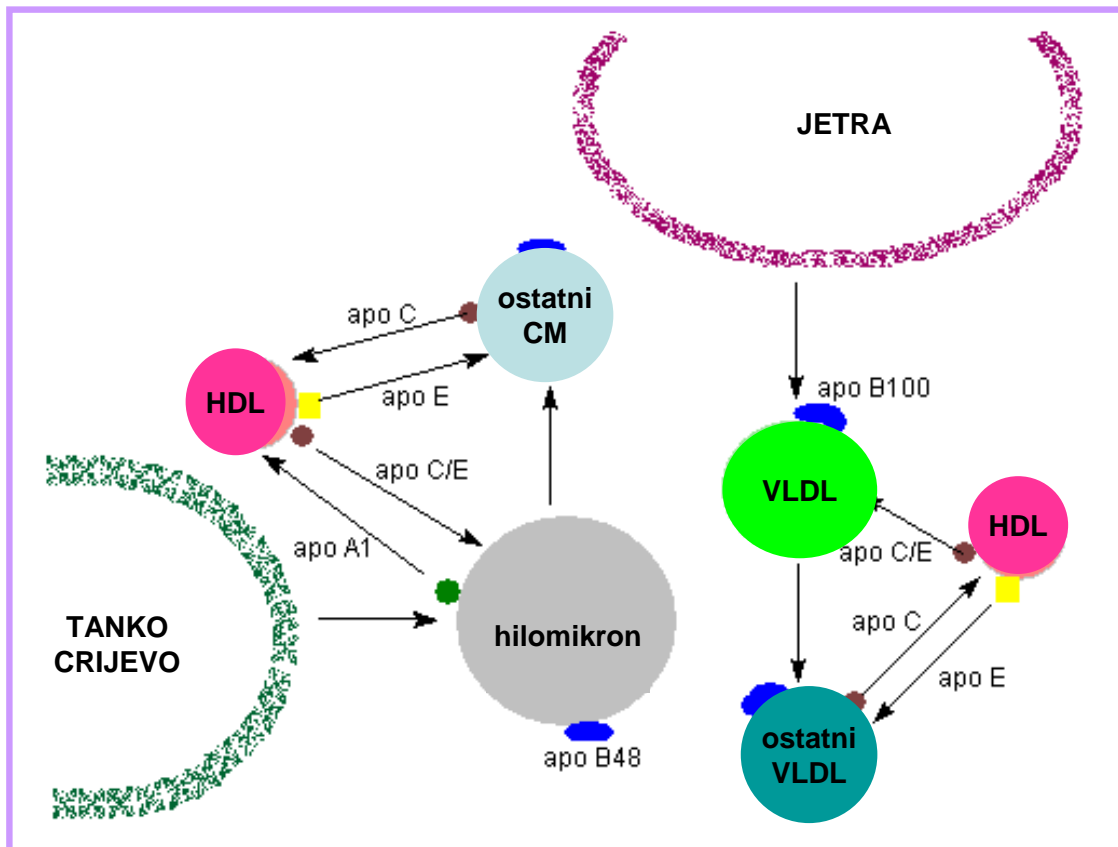
2.5.1. Metabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima

Lipidi uzeti hranom prenose se unutrašnjim putem metabolizma lipoproteina - od tankog crijeva do mišićnog, masnog tkiva i jetre. Nakon obroka, lipidi iz hrane koje čine uglavnom trigliceroli i esteri kolesterola emulgiraju se uz pomoć žučnih kiselina te se

TEORIJSKI DIO

djelovanjem pankreatične lipaze (PL) razgrađuju do monoacilglicerola i slobodnih masnih kiselina (SMK), odnosno kolesterola i slobodnih masnih kiselina. Nakon apsorpcije u intestinalne stanice, iz monoacilglicerola i dugolančanih masnih kiselina se sintetiziraju triacilgliceroli koji ulaze u sastav hilomikrona zajedno s kolesterolom. Novosintetizirani hilomikroni sadrže apolipoproteine apo A-I, A-II, A-IV i B-48. Ušavši u cirkulaciju hilomikroni primaju od HDL dovoljne količine apo C-II i apo E te tako postaju zrele čestice. Hilomikroni istovremeno predaju apo-A HDL česticama. U kapilarama skeletne muskulature i masnog tkiva zrele čestice hilomikrona VLDL vrlo brzo se uklanjaju iz cirkulacije, a metaboliziraju se uz pomoć LPL (lipoproteinske lipaze) koja razgrađuje njihovu najzastupljeniju komponentu, trigliceride. LPL je vezana uz stjenku krvnih kapilara preko negativno nabijenih lanaca proteoglikana heparan-sulfata. Kao sučimbenici za aktivnost LPL služe fosfolipidi i apo C-II. Hidroliza triglicerida se odvija kada su lipoproteini vezani za enzim na endotelu. Pri tome nastaju 2-monoacilglicerol i slobodne masne kiseline. Slobodne masne kiseline se mogu koristiti kao izvor energije za rad mišića ili se skladište u masnom tkivu i jetri. Djelovanjem LPL gubi se gotovo 90% triglicerida iz hilomikrona, dok se apo C-II u potpunosti vraća na HDL. Ostatni hilomikroni ulaze u jetru endocitozom uz pomoć apo E receptora gdje se preostali esteri kolesterola i trigliceridi hidroliziraju uz pomoć jetrene lipaze (HL).

Slične se promjene događaju na VLDL česticama. VLDL čestice nastaju u jetri te prenose triglicerol i kolesterol do perifernih tkiva pa nastaju ostatni VLDL ili IDL. Novosintetizirani VLDL sadrži apo B-100, a dovoljne količine apo C i apo E prenose se s HDL kao i kod hilomikrona. Djelovanjem LPL oslobađaju se slobodne masne kiseline, a iz VLDL čestica nastaju ostatne VLDL čestice koje se dalje hidroliziraju do IDL. Dio IDL se uklanja iz cirkulacije direktnim unosom u jetru tako što se pomoću apo E vežu na LDL-receptor. Obogaćivanje udjela kolesterol-estera LDL čestica odvija se pomoću HDL i CETP. Postoje dokazi koji upućuju na to kako su i LDL-receptor (koji prepoznaje apo B-100 i apo E) i ostatni receptor specifičan za apo E odgovorni za unos ostatnih čestica VLDL, ali i hilomikrona (Mayes, 2000).



Slika 10. Metabolizam hilomikrona i VLDL čestica (Anonymous 8, 2009)

2.5.2. Metabolizam lipoproteina male gustoće (LDL)

Lipoproteini male gustoće (LDL) sastoje se od lipidne jezgre sačinjene gotovo u potpunosti od estera kolesterola, dok njihov površinski sloj sadržava neesterificirani kolesterol i fosfolipide, te apo B-100, kao jedini apoprotein. Sadrže oko 70% cjelokupnog kolesterola prisutnog u krvi (80%-90% je u esterificiranom obliku) i smatraju se glavnim transporterom kolesterola do različitih tkiva.

Najveći dio LDL kolesterola (70%-80%) uklanja se iz krvotoka ulaskom u jetru, putem specifičnih LDL receptora u hepatocitima. Zahvaljujući LDL receptorima, LDL čestice budu prepoznate i endocitozom unesene u jetrene stanice. Tu se esteri kolesterola iz LDL čestica hidroliziraju djelovanjem lizosomske kisele lipaze (Lewis i sur., 1997).

Preostalih 20%-30% LDL čestica uklanja se iz krvotoka putem tzv. “stanica čistača” – makrofaga i glatkih mišićnih stanica. Cirkulirajuće LDL čestice prolaze kroz endotel i ulaze u intimu arterija. Taj proces može biti ubrzan ozljedom endotela, čime se gubi prirodna barijera

ulasku lipoproteina u stijenku arterija. Dio LDL-a prolazi kroz intimu te se ponovno vraća u cirkulaciju, dok dio ostaje “zarobljen” u intimi arterije djelovanem glikoaminoglikana koji pokazuju visoki afinitet za apo B-100. To se smatra prvim korakom u razvoju ateroskleroze. Time se ujedno može protumačiti visoka aterogenost svih lipidnih čestica koje sadržavaju apo B-100 (LDL, IDL, VLDL). LDL u intimi arterije podliježe procesu lipidne peroksidacije. Makrofazi u sklopu svoje fagocitne funkcije luče peroksid koji oksidira apo B-100. Time slabi strukturna stabilnost LDL-a te ona bude fagocitirana od strane makrofaga koji prepoznaju izmijenjeni apo B, a ne obični “neoksidirani LDL”. Makrofazi su stanice iznimno važne u procesu aterogeneze, jer nemaju regulacijskih mehanizama kojima bi se štitile od akumulacije kolesterola. Oni ne mogu katabolizirati sav u njima nagomilan kolesterol; postaju prepuni lipidnih kapljica i pretvaraju se u “pjenaste stanice”. Ovaj se proces događa u slučajevima kada su stanice izložene većem priljevu LDL čestica iz plazme uslijed prehrane bogate zasićenim masnim kiselinama i kolesterolom (Siddiqi, 2008.).

Količina sintetiziranog LDL-a ovisi o količini neposrednog prekursora VLDL-a sintetiziranog u jetri, te frakciji ostalih čestica VLDL-a uklonjenih putem jetrenih stanica. Koncentracija LDL-a također ovisi o veličini njegove eliminacije, bilo putem jetre, bilo u ekstrahepatička tkiva. Svi navedeni procesi odvijaju se putem LDL receptora.. To znači da su LDL receptori, zapravo glavni moderatori sinteze i eliminacije LDL čestica (Strickland i sur., 1990.).

2.5.3. Metabolizam lipoproteina velike gustoće (HDL)

HDL čestice se sintetiziraju u hepatocitima i tankom crijevu, a nastaju i u samoj cirkulaciji razgradnjom lipoproteinskih čestica bogatih triacilglicerolima. U odnosu na druge lipoproteinske čestice sadrže najviše proteina, 50% apoproteina, 20% slobodnog kolesterola i esterificiranog kolesterola, 15% fosfolipida i 5% triglicerida. ApoA-I čini oko 70-80% proteina u HDL čestici (Lewis i sur., 2005.).

Nascentna HDL čestica izolirana iz jetre diskoidnog je oblika, izgrađena iz dvostrukog sloja fosfolipida, apoAI i apoA-II i slobodnog kolesterola. Transformiraju se u zrele HDL čestice zahvaljujući aktivnosti lecitin-kolesterol-acil-transferaze (LCAT) i hepaticne lipaze (HL). LCAT je jedini poznati enzim koji vrši esterifikaciju kolesterola u krvnoj plazmi, gdje se nalazi u kompleksu sa fosfolipidima, apoD i apoA-I u VLDL. Pokazuje dvije aktivnosti,

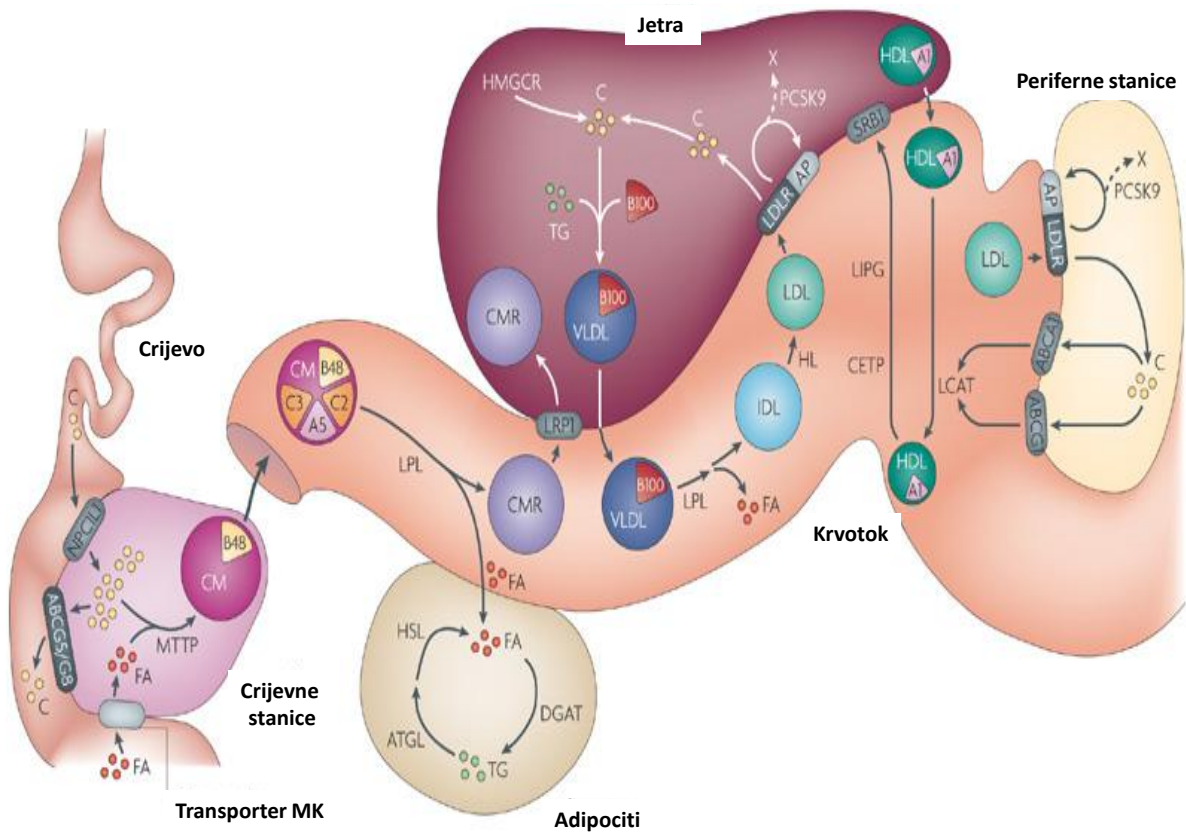
TEORIJSKI DIO

jedna je sinteza estera kolesterola iz fosfolipida i kolesterola, a druga, da u odsustvu kolesterola djeluje kao fosfolipaza A2. Nezrele diskoidne čestice prihvaćaju slobodni kolesterol sa površine staničnih membrana pri čemu su fiziološki akceptori fosfolipidi. LCAT katalizira esterifikaciju slobodnog kolesterola prenoseći na njega masnu kiselinu sa fosfolipida pri čemu se apoAI ponaša kao aktivator, a apoA-II kao inhibitor ovog enzima. Nastali neutralni steroli ulaze u hidrofobnu unutrašnjost dvostrukog sloja (Forti i sur., 2006.).

Površinski fosfolipidi nestali u toku LCAT aktivnosti zamjenjuju se drugim proteinima spontanom transferom fosfolipida. Opisane reakcije se nastavljaju formirajući nepolaru jezgru koju potiskuje dvostruki omotač sve dok ne nastane sferna čestica. Ove čestice se uklanjaju iz cirkulacije putem receptora na hepatocitima i bubrezima. Smatra se da je bubreg mjesto selektivnog preuzimanja apoA-I, a da postoji relativno mali ili nikakav katabolizam lipida u njemu, i da se HDL kolesterol ester selektivno otklanja u jetri i nadbubrežnoj žljezdi putem receptora. U jetri, ovarijima, testisima i nadbubrežnim žljezdama neke komponente HDL se uklanjaju selektivnim mehanizmom, drugačijim od receptorom posredovane endocitoze, a nazivaju se selektivnim zbog preuzimanja HDL kolesterol-estera sa minimalnim preuzimanjem HDL apoA-I. Osnovna uloga HDL čestica je u otklanjanju viška kolesterola iz perifernih stanica i njegov reverzni transport u jetru, vjerojatno posredstvom specifičnih HDL receptora, gdje se dalje metabolizira ili ponovo ugrađuje u druge lipoproteinske čestice. Otprilike oko 9 mg kolesterola po kilogramu tjelesne težine se svakodnevno sintetizira u perifernim tkivima i doprema do jetre, gdje se odvija njegov katabolizam. Poremećaj reverznog transporta kolesterola može dovesti do nagomilavanja kolesterola u zidovima krvnih žila i sudjelovati u nastanku arterioskleroze (Barter i sur. 2007).

S obzirom da omogućavaju odstranjivanje viška kolesterola iz perifernih tkiva, imaju protektivan efekt u odnosu na proces arterioskleroze. Svoje antiaterogeno djelovanje HDL kolesterol ostvaruje zaštitom LDL čestice od slobodnih radikala i posljedične oksidacije. Pokazano je da HDL stimulira produkciju prostanglandina iz stanica arterijskog endotela. Značajna uloga HDL čestice je sudjelovanje u razgradnji triacilglicerolima bogatih lipoproteinskih čestica (hilomikrona i VLDL) (Santos-Gallego i sur. 2008.). Na slici 11. (Anonymus 12, 2012) možemo vidjeti prethodno opisane metabolizme: metabolizam triacilglicerida, metabolizam lipoproteina niske gustoće (LDL), kolesterola i lipoproteina visoke gustoće (HDL).

TEORIJSKI DIO



Slika 11. Usporedba metabolizma triacilglicerida, LDL-a, HDL-a i kolesterola

3. EKSPERIMENTALNI DIO



EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- Eter (Kemika)
- Kloroform (Kemika)
- Metanol (Kemika)
- Kolesterol-oksidaza (Sigma)
- Fenol (Kemika)
- 4-aminoantipirin (Sigma)
- Peroksidaza (Sigma)
- Glicerol-1-fosfat dehidrogenaza (Sigma)
- NAD (Sigma)
- 2-(p-jodofenil)-3-p-nitrofenil-5-fenil tetrazolium klorid (INT) (Sigma)
- 4-nitrofenilfosfata (Sigma),

3.1.2. Oprema i instrumenti

U radu je korištena sljedeća oprema i instrumenti:

- Analizator Olympus 2700 (Beckman Coulter, SAD)
- Analitička vaga (Kern&Sohn, Njemačka)
- Vorteks (Techno Kartell, Italija)
- Centrifuga (Hettich, Micro 200R, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Pokusne životinje

Pokuse smo radili na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su BL6 miševi, u dobi od tri mjeseca. Po sedam životinja je bilo smješteno u kavezu, na temperaturi od 22°C, uz neograničen pristup hrani i vodi. Životinje smo hranili komercijalno dostupnom

EKSPERIMENTALNI DIO

hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Životinje smo držali u uvjetima 12 sati svijetla i 12 sati tame pri 22 °C i 60% vlažnosti. Hrana kojom smo hranili miševe je standardna hrana za miševe i štakore 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), a sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuske lješnjaka. Za tretman životinja koristili smo laneno i riblje ulje (Zvijezda, Hrvatska). Životinje su svakodnevno vagane poradi praćenja promjene tjelesne težine.

Eksperimentalne grupe su činile dvije grupe životinja. Životinje su hranjene tijekom 30 dana. Prva grupa životinja (kontrolna grupa) hranjena je svakodnevno komercijalno dostupnom hranom uz 0,2 ml fiziološke otopine. Druga je grupa životinja uz komercijalno dostupnu hranu dnevno dobivala i 0,2 ml arganovog ulja.

Životinje smo žrtvovali 30. dana pokusa te smo uzeli uzorke krvi za daljnju analizu. Životinje smo anestetizirali eterom te smo ih iskrvarili punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Uzorke krvi pohranili smo na +4 °C kako bi pospješili zgrušavanje i stvaranje seruma. Nakon zgrušavanja, uzorke krvi smo centrifugirali centrifugom Mikro 200R (Hettich, Njemačka) pri brzini od 13 000 o/min u trajanju od 15 min na +4 °C. Supernatant smo odvojili i pohranili na -80 °C za daljnju analizu biokemijskih parametara. Analizu biokemijskih parametara radili smo unutar tjedan dana od prikupljanja uzoraka.

3.2.2. Priprema i mjerenje lipida u serumu

Ukupni kolesterol, HDL-kolesterol i trigliceridi u serumu određeni su standardnim enzimskim metodama na analizatoru Olympus 2700 (Beckman Coulter, SAD) (Stein i sur., 1994.). Rezultati su očitavani automatski na samom instrumentu kao:

- Ukupni kolesterol = apsorbancija uzorka x vrijednost kalibratora / apsorbancija kalibratora
- HDL kolesterol u serumu mjeren je direktno, homogenim enzimskim postupkom, komercijalnim reagensima (Olympus Diagnostica, Irska) (Nauck i sur., 1996).
- LDL kolesterol u serumu određivan je računski, korištenjem formule po Friedwaldu (Friedwald i sur., 1972).

$$[LDL] = [K] - [HDL] - ([TG] / 5) \quad [1]$$

EKSPERIMENTALNI DIO

[LDL] – kolesterol

[K] – ukupni kolesterol

[TG] – ukupni trigliceridi

[HDL] – kolesterol

3.2.2.1. Ukupni kolesterol

Preporučena metoda za određivanje ukupnog kolesterola je: fotometrijska metoda nakon hidrolize i ekstrakcije kolesterola.

Enzimsko određivanje koncentracije kolesterola je specifično i osjetljivo. Princip reakcije je sljedeći: kolesterol-esteraza katalizira hidrolizu kolesterol estera u slobodni kolesterol i slobodnu masnu kiselinu. U prisutnosti kolesterol-oksidaze, kolesterol se oksidira u d-4-kolesten-3-on i nastaje vodikov peroksid. Fenol i 4-aminoantipirin s vodikovim peroksidom u nazočnosti peroksidaze daju crveno obojeni produkt kinonimin. Intenzitet obojenja direktno je proporcionalan koncentraciji ukupnog kolesterola u uzorku.

3.2.2.2. HDL-kolesterol

Preporučena metoda za određivanje HDL-kolesterola je: ultracentrifugiranje i precipitacija s heparinom i $MnCl_2$ te određivanje kolesterola u supernatantu.

Određivanje HDL-kolesterola (high density lipoprotein cholesterol) temelji se na razdvajanju HDL od lipoproteina koji sadržavaju apolipoprotein B (LDL i VLDL) ultracentrifugom, elektroforezom ili specifičnim taloženjem s polianionima i dvovaljanim kationima.

Koncentracija HDL-kolesterola određuje se jednom od metoda za određivanje ukupnog kolesterola. LDL - (low density lipoproteins) i VLDL - kolesterol (very low density lipoproteins) precipitiraju se dodatkom otopine dekstran sulfata i magnezijeva klorida serumu. Za reakciju su vjerojatno značajne negativno nabijene skupine na polianionu, koje reagiraju s pozitivno nabijenim skupinama lipoproteinskih molekula. Prisutni dvovaljani kationi ubrzavaju nastajanje netopivih kompleksa LDL- i VLDL-kolesterola. Netopivi kompleksi centrifugiranjem sedimentiraju zbog veće gustoće, a u supernatantu ostaje HDL-kolesterol, koji se određuje jednom od metoda određivanja ukupnog kolesterola.

3.2.2.3. Trigliceridi

Preporučena metoda za određivanje triglicerida je: fotometrijska metoda nakon ekstrakcije, saponifikacije i oksidacije glicerola.

Metode kojima se određuje koncentracija triglicerida baziraju se na mjerenju oslobođenog glicerola. Princip reakcije: nastali glicerol-1-fosfat se u prisutnosti glicerol-1-fosfat dehidrogenaze i NAD oksidira u dehidroksiaceton fosfat. Nastali reducirani koenzim, NADH, reducira boju 2-(p-jodofenil)-3-p-nitrofenil-5-fenil tetrazolium klorid (INT) u crveno obojeni formazan čija se koncentracija mjeri fotometrijski.

3.2.3. Statistička obrada podataka

3.2.3.1. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [2]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [3]$$

N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,05$.

3.2.3.2. Statističke metode koje smo koristili pri izradi tablica

Brojčani podaci iskazani su aritmetičkom sredinom kao mjerom srednje vrijednosti, te standardnom devijacijom kao mjerom rasapa. Razlike vrijednosti brojčanih pokazatelja među

EKSPERIMENTALNI DIO

skupinama uspoređene su analizom varijance (ANOVA) i Dunnett testa. Brojčane vrijednosti pokazatelja su istodobno uspoređene.

3.2.4. Aterogeni indeks

Posljednjih godina velik broj istraživača se bavi proučavanjem faktora koji imaju veliki utjecaj na razvoj kardiovaskularnih bolesti. Poznato je da je prehrana u tom smislu jedan od značajnijih faktora, te da različiti metabolički poremećaji do kojih može doći u velikoj mjeri ovise o aterogenom potencijalu namirnica. Aterogeni indeks obuhvaća ključne elemente o kojima ovisi aterogeni potencijal (ukupan unos masti, kolesterola i aterogenih masnih kiselina).

Hiperlipidemija je poremećaj u kojem se u krvi nalaze povećane količine lipida – masnoća. Širi pojam, dislipidemija, uključuje i sniženu razinu zaštitnog HDL kolesterola. Hiperlipidemija doprinosi razvoju bolesti srca i krvnih žila. Zbog promjene načina života i prehrane sve je više pretilih osoba, a dislipidemija je sve učestalija.

Lipidi nisu topljivi u vodi te se da bi bili topljivi okružuju se česticama proteina – apoproteinima tvoreći tako lipoproteinske čestice. Lipoproteini se razlikuju u svojem mogućem učinku na nastanak ateroskleroze. LDL-kolesterol posjeduje izrazito veliku aterogenost i tako je rizičan za nastanak bolesti krvnih žila. HDL-kolesterol djeluje zaštitno. Glavna uloga HDL-kolesterola je da prihvaća kolesterol i vraća ga natrag u jetru. Da bi se umanjila štetnost aterogenih lipoproteina, mora ih se odstraniti iz krvi. LDL-kolesterol se uglavnom (oko 75%) uklanja pomoću posebnih receptora, mjesta na stanicama gdje lipidi iz krvi ulaze u stanice.

Mononezasićene i polinezasićene masne kiseline *cis* konfiguracije snižavaju nivo kolesterola u krvi i imaju protektivno djelovanje u odnosu na proces aterogeneze.

Aterogeni indeks se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aterogeni indeks} = [T] - [HDL] / [HDL] \quad [4]$$

[T] – ukupni trigliceridi

[HDL] – lipoproteini niske gustoće

4. REZULTATI



REZULTATI

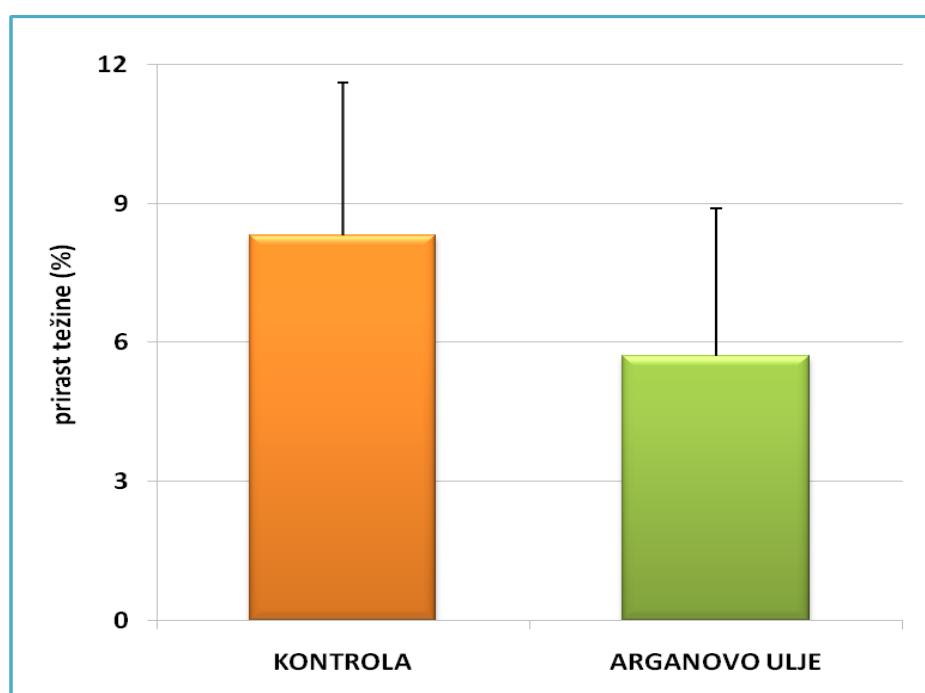
4. REZULTATI

Ova rad je imao za svrhu provjeriti kako mononezasićene masne kiseline iz arganovog ulja mogu utjecati na težinu i sastav lipoproteina u BL6 miša.

4.1. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na prirast težine u BL6 miša

Na slici 12. prikazani su prirasti težina (%) pojedinih eksperimentalnih grupa životinja. Usporedbom kontrolne grupe životinja koja je bila hranjena komercijalno dostupnom hranom sa grupom životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu primala dodatak prehrani obogaćenom visokim udjelom masnoća (arganovo ulje) prikazane su statistički značajne razlike u prirastu težine između tretirane grupe životinja i kontrolne grupe (ANOVA, $p < 0.05$).

Tijekom eksperimentalnog razdoblja nijedna od eksperimentalnih životinja nije uginula, niti pokazivala abnormalan unos hrane ili promjene u ponašanju.



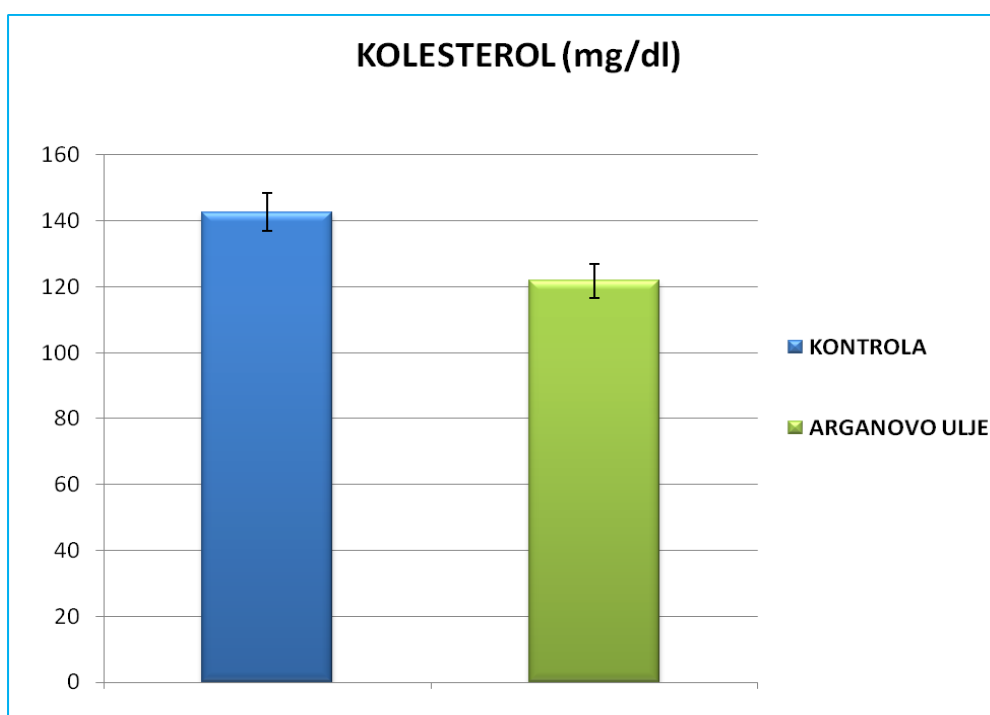
Slika 12. Utjecaj masnih kiselina iz arganovog ulja na prirast težine u BL6 miša. Prirasti težine tretirane skupine životinja statistički se značajno razlikuje od kontrolne skupine životinja (ANOVA, $p < 0.05$).

REZULTATI

4.2. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na sastav seruma u BL6 miša

U ovom radu ispitan je utjecaj arganovog ulja bogatog mononezasićenim masnim kiselinama (MUFA) na metabolizam lipida.

4.2.1. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju kolesterola u serumu



Slika 13. Utjecaj masnih kiselina iz arganovog ulja na koncentraciju kolesterola u serumu

Na slici 13. prikazan je utjecaj masnih kiselina na koncentracije ukupnog kolesterola u serumu kontrolne i tretirane skupine životinja nakon 30 dana tretmana. Kontrolna grupa životinja dobivala je samo komercijalno dostupnu hranu dok je druga grupa životinja uz komercijalno dostupnu hranu redovito dobivala arganovo ulje.

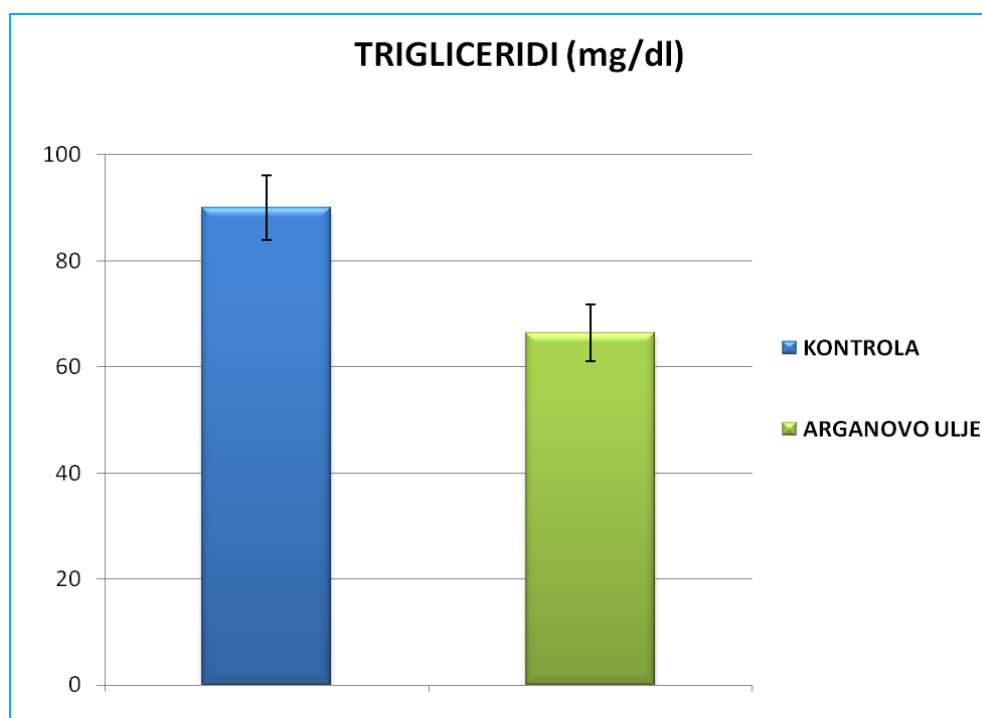
Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p < 0.05$) koncentracije ukupnog kolesterola u serumu zabilježeno je kod skupine životinja koja je tretirana arganovim uljem ($121,78 \pm 5,22 \text{ mg/dL}$) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja ($142,64 \pm 5,82 \text{ mg/dL}$).

REZULTATI

4.2.2. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju triacilglicerola u serumu

Na slici 14. prikazan je utjecaj masnih kiselina na koncentraciju triglicerida u serumu kontrolne i tretirane skupine životinja nakon 30. dana tretmana. Kontrolna grupa životinja dobivala je samo komercijalno dostupnu hranu, a druga grupa životinja je uz komercijalno dostupnu hranu redovito dobivala i arganovo ulje.

Grupa životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu kroz visoko masnu dijetu primala arganovo ulje ($66,41 \pm 5,34$ mg/dl) pokazuje statistički (ANOVA, $p < 0,05$) nižu razinu triglicerida u usporedbi s kontrolnom grupom životinja ($90,02 \pm 6,06$ mg/dl).



Slika 14. Utjecaj masnih kiselina iz arganovog ulja na koncentraciju triglicerida u serumu

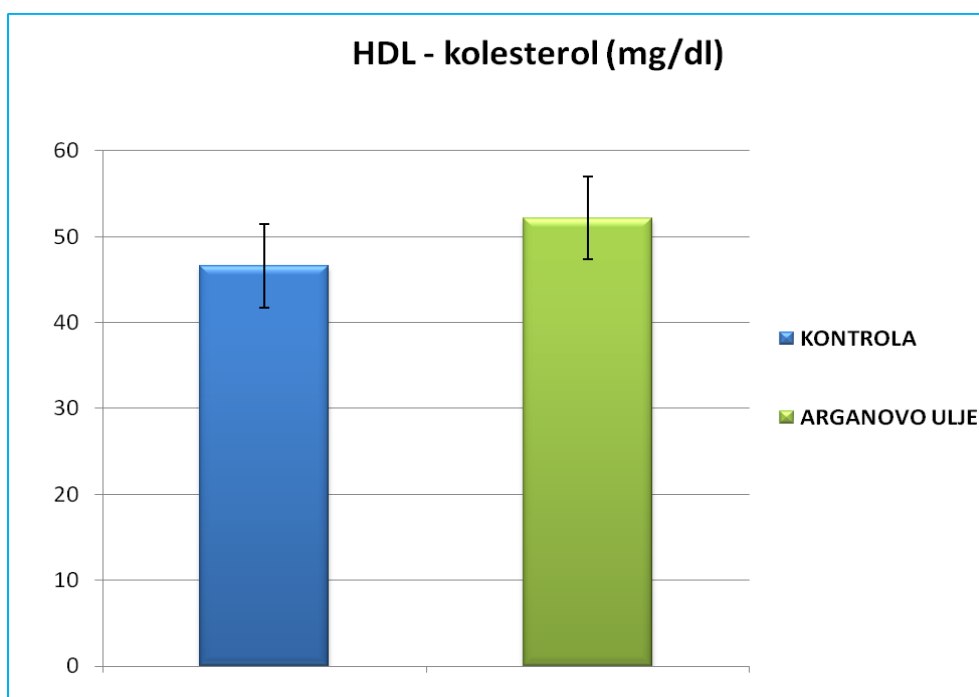
4.2.3. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju HDL-kolesterola u serumu

Na slici 15. prikazane su koncentracije HDL-kolesterola u serumu kontrolne i tretirane skupine životinja nakon 30 dana tretmana.

REZULTATI

Statistički značajno povećanje (ANOVA, $p < 0.05$) koncentracije HDL-kolesterola u serumu zabilježeno je kod grupe životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu primala arganovo ulje.

Koncentracija HDL-kolesterola u kontrolnoj grupi životinja iznosila je $46,63 \pm 4,86$ mg/dl, dok je nivo HDL-kolesterola kod grupe životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu primala i arganovo ulje iznosio $52,17 \pm 4,82$ mg/dl što je statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (ANOVA, $p < 0.05$).



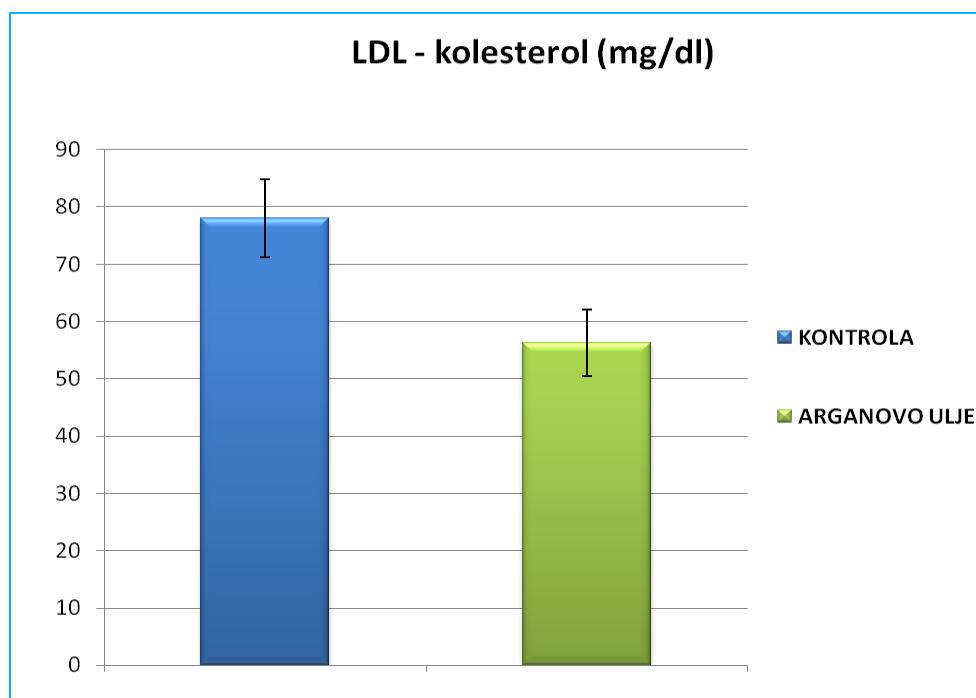
Slika 15. Utjecaj masnih kiselina iz arganovog ulja na koncentraciju HDL-kolesterola

4.2.4. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju LDL-kolesterola u serumu

Na slici 16. prikazane su dvije različite skupine životinja (BL6 miš), od kojih je jedna hranjena komercijalno dostupnom hranom dok je druga je uz komercijalno dostupnu hranu redovito dobivala arganovo ulje. Prikazan je utjecaj masnih kiselina na koncentraciju LDL-kolesterola u serumu kontrolne i tretirane skupine životinja nakon 30 dana tretmana.

REZULTATI

Koncentracija LDL-kolesterola je statistički značajno niža (ANOVA, $p < 0.05$) kod grupe životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu primala arganovo ulje ($56,33 \pm 5,82$ mg/dl) u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($78,01 \pm 6,78$ mg/dl).



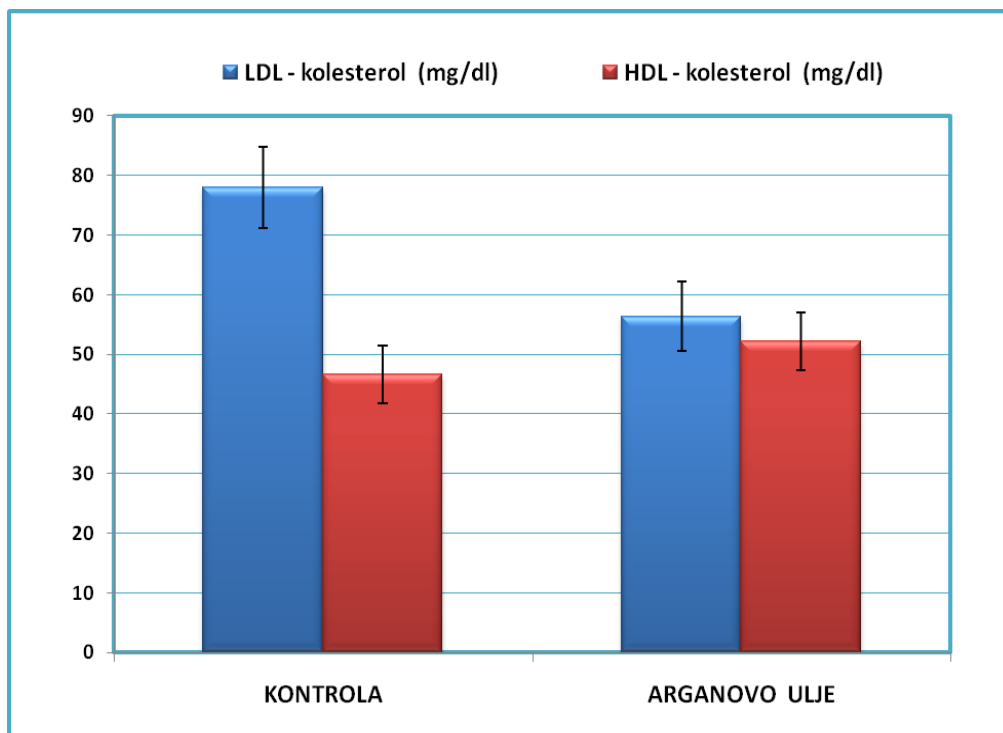
Slika 16. Utjecaj masnih kiselina iz arganovog ulja na koncentraciju LDL-kolesterola u serumu

4.2.6. Usporedba utjecaja mononezasićenih masnih kiselina na omjer koncentracija LDL i HDL-kolesterola u serumu

Na slici 17. je prikazan utjecaj masnih kiselina na omjer koncentracija LDL-kolesterola i HDL-kolesterola u serumu miševa. Prva grupa životinja je dobivala komercijalno dostupnu hranu dok je druga grupa životinja uz komercijalno dostupnu hranu dobivala arganovo ulje kroz 30 dana tretmana.

Omjer koncentracija LDL-kolesterola i HDL-kolesterola je statistički značajno niži kod grupa životinja koje su uz komercijalno dostupnu hranu dobivale arganovo ulje za $1,08 \pm 0,28$ puta (54,62 %) u odnosu na kontrolnu grupu životinja gdje omjer LDL/HDL-kolesterola iznosi ($1,67 \pm 0,32$).

REZULTATI



Slika 17. Utjecaj masnih kiselina iz arganovog ulja na omjer koncentracija LDL- i HDL-kolesterola u serumu

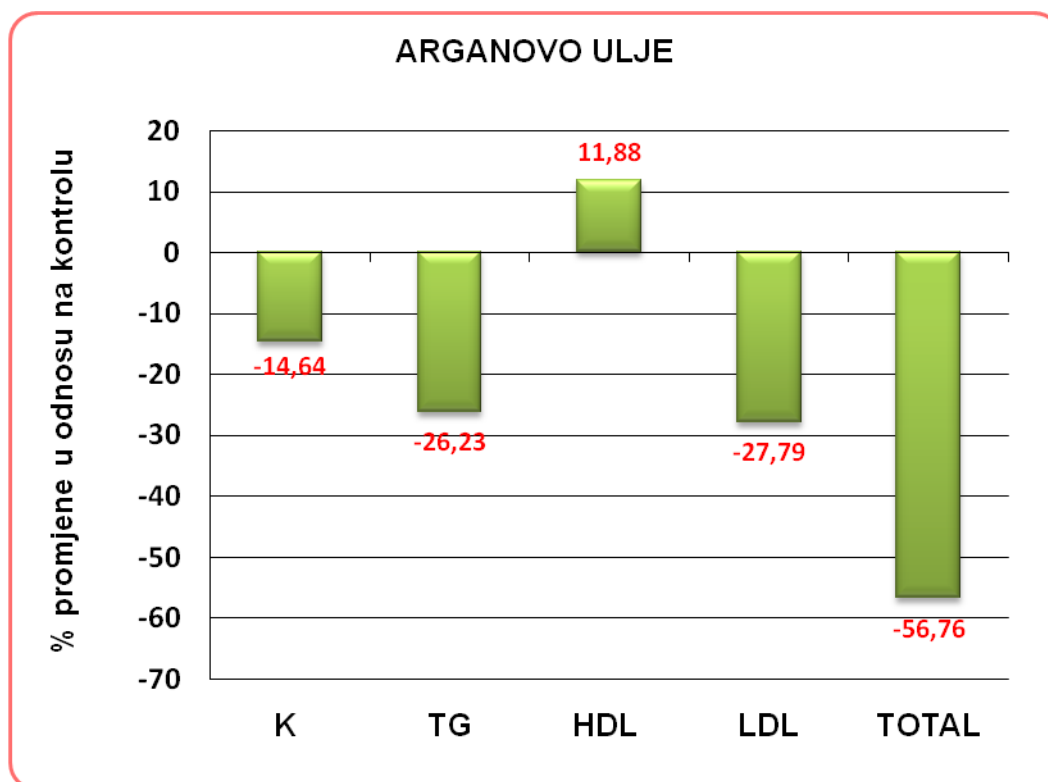
4.2.6. Usporedba utjecaja mononezasićenih masnih kiselina iz arganovog ulja na sastav serumskih komponenti u odnosu na kontrolnu grupu u BL6 miša

Na slici 18. prikazana je usporedba utjecaja masnih kiselina iz arganovog ulja na sastav serumskih komponenti u odnosu na kontrolnu grupu životinja koja je dobivala samo komercijalno dostupnu hranu.

Kod grupe životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu primala i arganovo ulje nivo ukupnog kolesterola je za $-14,62\%$ niži u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Ova grupa također pokazuje statistički značajno sniženje razine triglicerola u serumu za $-26,23\%$ u usporedbi s kontrolnom grupom. HDL-kolesterol je statistički značajno za $+11,88\%$ viši u usporedbi s kontrolnom grupom, dok je LDL-kolesterol statistički značajno niži za $-27,79\%$ u usporedbi s istom.

REZULTATI

Ukupan utjecaj (total) nezasićenih masnih kiselina iz arganovog ulja na sastav serumskih lipida u odnosu na kontrolnu grupu životinja iznosi -56,76% u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



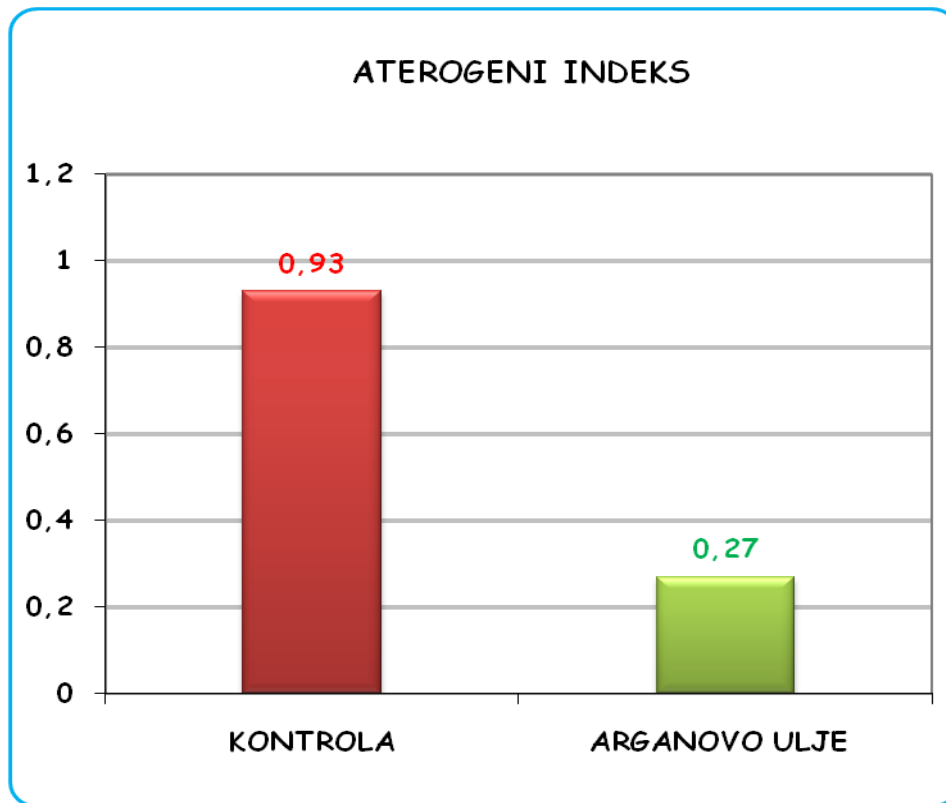
Slika 18. Utjecaj arganovog ulja na koncentraciju LDL-kolesterola, HDL-kolesterola, ukupnog kolesterola (K) i triglicerola (TG) glavnih faktora rizika od kardiovaskularnih bolesti (KVB).

4.2.7. Aterogeni indeks

Usporedbom grupe koja je uz komercijalno dostupnu hranu dobivala i dnevnu dozu ulja bogatog nezasićenim masnim kiselinama sa kontrolnom grupom koja je dobivala samo komercijalno dostupnu hranu vidljivo je da je arganovo ulje snizilo aterogeni indeks u odnosu na kontrolu grupu životinja (slika 19).

Aterogeni indeks u grupi koja je dobivala arganovo ulje je za 70,96% manji u usporedbi sa kontrolnom grupom životinja.

REZULTATI



Slika 19. Aterogeni indeks tretirane grupe životinja sa arganovim uljem u odnosu na kontrolnu grupu životinja

U tablici 2. je prikazana procjena rizika od kardiovaskularnih bolesti. Na aterogeni indeks utječe omjer ukupnog kolesterola/HDL-kolesterol, kao i omjer LDL/HDL-kolesterol.

Kako promjene u koncentraciji LDL-kolesterola za 1% smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti za 1% (Davis i sur., 1990), prosječno smanjenje LDL-kolesterola za 27,79% uz visoko masnu dijetu sa ribljim i lanenim uljem ukazuje na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti za 27,79%.

REZULTATI

Tablica 2. Utjecaj arganovog ulje na lipidni sastav seruma BL6 miša kroz 30 dana tretmana.

Parametri:	Grupe:	
	Kontrola	Arganovo ulje
K (mg/dl)	142,64±5,82	121,78±5,22
HDL (mg/dl)	46,63±4,86	52,17±4,82
TG (mg/dl)	90,02±6,06	66,41±5,34
¹ LDL (mg/dl)	78,01±6,78	56,33±5,82
² Aterogeni indeks	0,93±0,24	0,27±0,24
³ nHDL (mg/dl)	96,01±2,72	69,61±3,08
nHDL/HDL	2,06±0,32	1,33±0,29
K/HDL	3,06±0,36	2,33±0,29
LDL/HDL	1,67±0,32	1,08±0,28

¹LDL-kolesterol: $[LDL] = [K] - [HDL] - [TG/5]$

²Aterogeni indeks: $[TG] - [HDL] / [HDL]$

³nHDL= $[K] - [HDL]$

K – ukupni kolesterol

TG – trigliceridi

5. RASPRAVA



5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na težinu u BL6 miša

Općenito je prihvaćena teza da potrošnja hrane sa visokim udjelom masti izravno doprinosi visceralnoj pretilosti kod ljudi i životinja. Prehrana i njezini sastojci bitno utječu na serumske lipoproteine čiji se poremećaji smatraju jednim od glavnih čimbenika rizika za nastanak i napredovanje ateroskleroze. U zdravoj prehrani kojoj je cilj ne samo primarna već i sekundarna prevencija ateroskleroze, trebalo bi smanjiti unos masti na najviše 30% od ukupnog unosa energije. Pri tome bi zasićene masti smjele činiti najviše 10%, višestruko nezasićenih masti 6-10%, a jednostruko nezasićene 10-15% od ukupnog unosa energije. Prekomjerna tjelesna težina i debljina povezuju se sa brojnim kardiovaskularnim poremećajima kao što su koronarna bolest srca, dijabetes tipa II, hipertenzija, dislipidemija, tromboza, plućna embolija pa sve do srčanog i moždanog udara (Rao i sur., 2011).

Pretilost uzrokovana dijetom sa velikim udjelom masti je povezana s povećanim rizikom za kronične bolesti, uključujući i kardiovaskularne bolesti. Hiperlipidemija predstavlja porast vrijednosti kolesterola i/ili triglicerida u krvi, uz niske vrijednosti HDL-kolesterola, što vodi ka arteriosklerozi. Ovaj poremećaj metabolizma masti, sve češće nazivan dislipidemija, je u neprekidnom porastu (Rao i sur., 2011).

Rezultati brojnih studija navode na to da je promijenjeni lipidni profil učestali nalaz u pretilih osoba. Najučestaliji su nalazi povišenog ukupnog kolesterola, povišenih serumskih triglicerida, povišenih razina LDL i VLDL-kolesterola te smanjene razine HDL-kolesterola. Mehanizam nastanka dislipidemije povezane s debljinom nije u potpunosti objašnjen. Pretilost može rezultirati porastom sinteze visoko aterogenih čestica LDL-kolesterola te sniženjem razine zaštitnog HDL-kolesterola uslijed veće aktivnosti lipoproteinske lipaze koja povećava katabolizam HDL-a (Daniels i sur., 2001.).

U ovom radu je usporedbom prirasta težine životinja (slika 12) pokazano da kontrolna grupa životinja koja je bila hranjena komercijalno dostupnom hranom sa grupama životinja koje su uz komercijalno dostupnu hranu primala dodatak prehrani obogaćenoj visokim udjelom masnoća (arganovo ulje) pokazuje statistički značajno smanjenje prirasta težine s obzirom da je prirast težine grupe životinja koja je hranjena samo komercijalno dostupnom hranom za oko 2,6 % veći u odnosu na grupu koja je uz komercijalno dostupnu hranu dobivala i arganovo ulje.

5.2. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju HDL-kolesterola i LDL- kolesterola u serumu

Ulja, ovisno o podrijetlu i načinu pripreme, imaju različite učinke na serumske lipoproteine. Ispitivanja su pokazala da utjecaj pojedinog ulja na koncentraciju LDL i HDL-kolesterola ovisi o postotku sadržaja pojedinih masnih kiselina (Siddiqi i sur., 2008).

Mnoge prehrambene namirnice utječu na razinu LDL čestica koje su aterogene, a također i na razinu HDL čestica koje djeluju protektivno na razvoj ateroskleroze. Kolesterol cirkulira u tijelu najvećim dijelom vezan na dva prijenosnika: LDL (lipoprotein male gustoće) koji nosi kolesterol iz jetre u tkiva i organe (npr. srčane krvne žile) i HDL (lipoprotein velike gustoće) koji ga nosi natrag. Mijenjanjem odnosa između ta dva lipoproteina, tj. povećanjem količine HDL-kolesterola i smanjenjem količine LDL-kolesterola možemo zaustaviti proces starenja srca i krvnih žila. Naime, o količinskom odnosu HDL i LDL čestica ovisi koji će se od ta dva oblika vezati na receptore stanica perifernog tkiva, budući da se vežu za isti receptor po principu kompeticije. Najbolji način da se to učini je izmjena odnosa između zasićenih i nezasićenih masti te kolesterola koje unosimo hranom (Verbanac i sur., 1996).

HDL-kolesterol ima "protektivni efekt" i smanjuje rizik od ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Što je niži HDL-kolesterol, veći je rizik od ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. HDL-kolesterol često je niži u osoba s povišenim vrijednostima triglicerida, pretilih i tjelesno neaktivnih ljudi.

Brojnim istraživanjima provedenim tijekom posljednjih desetljeća nepobitno je dokazana veza između razine serumskih lipida i aterosklerotskih bolesti (Deedwania i sur., 2009). Jednako tako, dokazano je da smanjenje ukupnog, a osobito LDL-kolesterola, u primarnoj i sekundarnoj prevenciji smanjuje pobol i smrtnost od kardiovaskularnih bolesti, neovisno o početnim vrijednostima ovih parametara (Karalis, 2009).

Sastav masnih kiselina u arganovom ulju i brojnost antioksidansa, sugerira korištenje ovog ulja u preventivne svrhe protiv nekih patoloških stanja kao što su kardiovaskularne bolesti. Već dugi niz godina je poznato da prehrana bogata nezasićenim masnim kiselinama može regulirati visoki krvni tlak kao i serumski lipoproteinski profil i, posljedično, smanjiti rizik od razvoja ateroskleroze i učestalosti kardiovaskularnih bolesti (Keys i sur., 1986; Nagyova i sur., 2003; Trautwein i sur., 1999). Upravo mediteranska dijeta je zbog velikog udjela nezasićenih masnih kiselina koje potječu iz maslinovog ulja dobar primjer. Maslinovo ulje predstavlja važan izvor mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) (73% oleinske

kiseline), dok suncokretovo ulje sadrži veliki udio polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) (61,6% linolne kiseline). Zanimljivo, arganovo ulje predstavlja uravnotežena udio u MUFA i PUFA masnih kiselina (44,8% oleinske kiseline i 33,7% linolne kiseline). Linolna kiselina služi kao prekursor u biosintezi arahidonske kiseline koja ima hipokolesteremični učinak (Hegsted i sur., 1965). Arahidonska masna kiselina, posebno γ -linolenska kiselina, smanjuje koncentracije ukupnog kolesterola, VLDL, IDL i LDL-kolesterola u serumu (Fukushima i sur., 2001; Takada i sur., 1994). Biljni steroli iz arganovog ulja, također mogu biti uključeni u hipokolesteremični učinak (Khallouki i sur., 2003). Molekulska struktura sterola je vrlo slična onoj ljudskog kolesterola i na taj način, steroli smanjuju apsorpciju kolesterola natječući se s endogenim kolesterolom (Ostlund i sur., 2002). Kontrolirana klinička ispitivanja su pokazala da povećanje količine sterola u prehrani pozitivno utječe na profil lipida u serumu (Plat i Mensink, 2005). Uzimajući 2-3 g biljnog sterola dnevno smanjuje 10-15% LDL-kolesterol 10-15% (Heinemann i sur., 1993).

Berrada i sur. (2000) i Berrougui i sur. (2004) su pokazali poboljšanje lipidnog profila kod hiperlipidemije izazvane kod štakora kroničnim tretmanom arganovim uljem. U ove dvije studije, došlo je do značajnog smanjenja ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i tjelesne težine (Berrougui i sur., 2003). Ovi podaci također su potvrđeni na ljudima (Derouiche i sur., 2005). Drissi i suradnici (2004) su dokazali da su zdrave odrasle osobe koje žive u jugozapadnom Maroku, a koje su redovito konzumirale arganovo ulje, imale znatno niže razine LDL-kolesterola i lipoproteina (a) u usporedbi sa zdravim ispitanicima koji žive u istom području, ali nisu potrošači arganovog ulja. Zaštitni učinci arganovog ulja mogu se pripisati njegovom kemijskom sastavu kojeg u osnovi karakterizira prisutnost nezasićenih masnih kiselina i antioksidansa.

Grupa životinja koja je pored komercijalno dostupne hrane primala i arganovo ulje pokazuje za +11,88% viši nivo HDL-kolesterola u odnosu na kontrolnu grupu životinja, te za -27,79% niži nivo LDL-kolesterola također u odnosu na kontrolnu grupu (tablica 2., slike 15. i 16.).

5.3. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na koncentraciju ukupnog kolesterola i triglicerida u serumu

Povišene koncentracije lipida u serumu mogu biti posljedica prekomjerne i neadekvatne prehrane ili poremećaja metabolizma lipida. Prehrana može imati značajan

utjecaj na promjene u lipoproteinima. Tri čimbenika iz hrane mogu povećati razinu aterogenih frakcija lipoproteina, a to su: povećani unos kolesterola, masti te preveliki unos energetski bogate hrane. Sva tri navedena čimbenika su karakteristično obilježje prehrane većeg dijela suvremenog razvijenog svijeta.

Prehrambeni kolesterol povisuje razinu ukupnog kolesterola i LDL-a, ali u manjoj mjeri od zasićenih masnih kiselina. Zasićene masti i kolesterol uneseni prehranom imaju sinergistički učinak na povišenje razine LDL kolesterola i smanjuje veličine hilomikrona (koji su povezani s većim rizikom pojave koronarne bolesti srca) (Stamler i Shekelle, 1988).

Kolesterol je važan spoj u mnogim metaboličkim reakcijama u organizmu. Iako se oko 80% kolesterola u organizmu sintetizira endgeno povećani unos kolesterola hranom dovodi do povećanja istog u serumu (Nestel i sur., 1995.).

Zbog povećanog unosa kolesterola i masnih kiselina smanjena je aktivnost LDL receptora, te povećana produkcija VLDL čestica. Uzrok smanjenja HDL, koji je ateroprotektivan, može biti inverzan omjer između razine VLDL i HDL ili povećana razgradnja HDL čestica u samom masnom tkivu (Shepherd i sur., 1995.).

Dokazano je da je nivo kolesterola u krvi znatno više pod utjecajem alimentarnog unosa određenih masnih kiselina (za više od četiri puta), nego unosa samog kolesterola hranom.

Prethodno navedena istraživanja potvrđena su i u ovom radu. Grupa životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu primala i arganovo ulje kroz 30 dana tretmana pokazuje nivo ukupnog kolesterola za -14,62% niži u odnosu na kontrolnu grupu životinja, dok je nivo triglicerida za -26,23% niži u usporedbi s kontrolnom grupom životinja (tablica 2., slike 13. i 14.).

5.4. Utjecaj mononezasićenih masnih kiselina na aterogeni indeks

Posljednjih godina velik broj istraživača se bavi proučavanjem faktora koji imaju veliki utjecaj na razvoj kardiovaskularnih bolesti. Poznato je da je prehrana u tom smislu jedan od značajnijih faktora, te da različiti metabolički poremećaji do kojih može doći u velikoj mjeri ovise o aterogenom potencijalu namirnica. Aterogeni indeks obuhvaća ključne elemente o kojima ovisi aterogeni potencijal (ukupan unos masti, kolesterola i aterogenih masnih kiselina).

Do danas je proveden velik broj eksperimenata koji su nedvosmisleno potvrdili postojanje uske povezanosti između sadržaja masti u prehrani i koncentracije kolesterola u krvi, s jedne strane, i učestalosti obojenja srca i krvnih žila s druge strane. Dakle, masti iz prehrane utječu na pojavu kardiovaskularnih bolesti najviše posredstvom porasta nivoa kolesterola u krvi. Međutim, od velikog značaja su i neki drugi mehanizmi kojima masti utječu na pojavu ateroskleroze, kao što je utjecaj na funkciju endotelnog sloja u zidu krvnih žila, utjecaj na proces trombogeneze i koagulaciju u krvi, utjecaj na krvni tlak, aritmiju i drugo (Kris-Etherton i sur., 2001).

Lipidi nisu topljivi u vodi te se da bi bili topljivi okružuju se česticama proteina – apoproteinima tvoreći tako lipoproteinske čestice. Lipoproteini se razlikuju u svojem mogućem učinku na nastanak ateroskleroze. LDL-kolesterol posjeduje izrazito veliku aterogenost i tako je rizičan za nastanak bolesti krvnih žila. Glavna uloga HDL-kolesterola je da prihvaća kolesterol i vraća ga natrag u jetru. Da bi se umanjila štetnost aterogenih lipoproteina, mora ih se odstraniti iz krvi. LDL-kolesterol se uglavnom (oko 75%) uklanja pomoću posebnih receptora, mjesta na stanicama gdje lipidi iz krvi ulaze u stanice (Lichtenstein, 2000).

Usporedbom grupe koja je uz komercijalno dostupnu hranu dobivala i dnevne doze arganovog ulja bogatog mononezasićenim masnim kiselinama sa kontrolnom grupom koja je dobivala samo komercijalno dostupnu hranu vidljivo je da je arganovo ulje statistički značajno snizilo aterogeni indeks u odnosu na kontrolu grupu životinja.

Aterogeni indeks u grupi koja je dobivala arganovo ulje je za 70,96% manji u usporedbi sa kontrolnom grupom životinja (tablica 2. i slika 19.).

Budući da je koncentracija triacilglicerola kontrolne grupe životinja pokazala značajno višu vrijednost u odnosu na grupu životinja tretiranu arganovim uljem bogatim nezasićenim masnim kiselinama, izračunate vrijednosti aterogenog indeksa su u skladu s očekivanim.

6. ZAKLJUČCI



6. ZAKLJUČCI

- U ovom radu je usporedbom prirasta težine životinja pokazano da kontrolna grupa životinja koja je bila hranjena komercijalno dostupnom hranom sa grupama životinja koje su uz komercijalno dostupnu hranu primala dodatak prehrani obogaćenom visokim udjelom masnoća (arganovo ulje) pokazuje statistički značajno smanjenje prirasta težine s obzirom da je prirast težine grupe životinja koja je hranjena samo komercijalno dostupnom hranom za oko 2,6% veći u odnosu na grupu koja je uz komercijalno dostupnu hranu dobivala i arganovo ulje..
- Ulja, ovisno o podrijetlu i načinu pripreme, imaju različite učinke na serumske lipoproteine. Ispitivanja su pokazala da utjecaj pojedinog ulja na koncentraciju LDL i HDL-kolesterola ovisi o postotku sadržaja pojedinih masnih kiselina. Grupa životinja koja je pored komercijalno dostupne hrane primala i arganovo ulje pokazuje za +11,88% viši nivo HDL-kolesterola u odnosu na kontrolnu grupu životinja, te za -27,79% niži nivo LDL-kolesterola također u odnosu na kontrolnu grupu.
- Do danas je proveden velik broj eksperimenata koji su nedvosmisleno potvrdili postojanje uske povezanosti između sadržaja masti u prehrani i koncentracije kolesterola u krvi, s jedne strane, i učestalosti obojenja srca i krvnih žila s druge strane. Dakle, masti iz prehrane utječu na pojavu kardiovaskularnih bolesti najviše posredstvom porasta nivoa kolesterola u krvi. Grupa životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu primala i arganovo ulje kroz 30 dana tretmana pokazuje nivo ukupnog kolesterola za -14,62% niži u odnosu na kontrolnu grupu životinja, dok je nivo triglicerida za -26,23% niži u usporedbi s kontrolnom grupom životinja
- Aterogeni indeks u grupi koja je dobivala arganovo ulje je za 70,96% manji u usporedbi sa kontrolnom grupom životinja. Naime, kako promjene u koncentraciji LDL-kolesterola za 1% smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti za 1%, prosječno smanjenje LDL-kolesterola za 27,79% uz visoko masnu dijetu sa arganovim uljem ukazuje na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti za 27,79%.

7. LITERATURA



LITERATURA

7. LITERATURA

- Anonymus 1 (2012) Arganovo ulje i plod, <http://www.argansense.com/chemistry-of-argan-oil/>. Pristupljeno 17. srpnja 2012.
- Anonymus 2 (2012) Drvo argana (*A. Spinosa*), <http://www.arganoilsociety.org/the-argan-tree/>. Pristupljeno 17. srpnja, 2012.
- Anonymus 3 (2012) Tradicionalni način dobivanja djevičanskog arganovog ulja, <http://dingo.care2.com/greenliving/argan-oil.jpg>. Pristupljeno 17. srpnja, 2012.
- Anonymus 4 (2012) Oleinska kiselina, <http://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2009/06/dvostruke-veze-u-nezasicenim-masnim-kiselinama.jpg>. Pristupljeno 17. srpnja 2012.
- Anonymus 5 (2012) α -linolenska kiselina, <http://www.nature.com/nrg/journal/v10/n2/images/nrg2481-f1.jpg>. Pristupljeno 17. srpnja 2012.
- Anonymus 6 (2012) Struktura vitamina E, <http://www.vita-dose.com/benefits-of-vitamin-e.html>. Pristupljeno 17. Srpnja, 2012.
- Anonymus 7 (2012) Strukturna formula kolesterola, <http://blogs.dnalc.org/2012/04/12/bad-cholesterol/>. Pristupljeno 17. Srpnja, 2012.
- Anonymus 8 (2012) Metabolizam hilomikrona i VLDL čestica, <http://www.scientificpsychic.com/health/lipoproteins-LDL-HDL.html>. Pristupljeno 17. srpnja 2012.
- Ascherio, A., Rimm, E.B. and Giovannucci, E.L. (1996) Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: Cohort follow up study in the United States. *BMJ*. **4**, 313-84.
- Barter, P.J., Puranik, R. and Rye, K.A. (2007) New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. *Curr. Cardiol. Re.* **9**, 493-498.
- Bennani, H., Drissi, A., Giton, F. (2007) Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect.* **31**, 64-69.
- Berrada, Y., Settaf, A., Baddouri, K., Cherrah, A., Hassar, M. (2000) Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan, *Argania sideroxylon. Therapie.* **55**, 375-378.
- Berrougui, H., Ettaib, A., Herrera Gonzalez, M.D., Alvarez de Sotomayor, M., Bennani-Kabchi, N., Hmamouchi, M. (2003) Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol.* **89**, 15-18.

LITERATURA

- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1986) A receptor-mediated pathways for cholesterol homeostasis. *Science*. **232**, 34-47.
- Charrouf, Z., Guillaume D. (2011) Argan oil and other argan products; use in dermocosmetology. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **113**, 403-408.
- Daniels, S.R. (2001) Obesity in the pediatric patient: cardiovascular complications. *Progress in Ped Card.* **12**, 161-167.
- Deedwania, P., Singh, V., Davidson, M. (2009) Low high-density lipoprotein cholesterol and increased cardiovascular disease risk: An analysis of statin clinical trials. *Am J Cardiol.* **104**, 3-9.
- Derouiche, A., Cherki, M., Drissi, A., Bamou, Y., El Messal, M., Idrissi-Oudghiri, A. (2005) Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab.* **49**, 196–201.
- Derouiche, A., Cherki, M., Drissi, A. (2005) Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab.* **49**, 196-201.
- Drissi, A., Girona, J., Cherki, M., Godas, G., Derouiche, A., El Messal, M., Saile, R., Kettani, A., Solà, R., Masana, L., Adlouni, A. (2004) Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr.* **23**, 1159-1166.
- Forti, N. and Diament, J. (2006) High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. *Arq Bras Cardiol.* **87**, 671-679.
- Friedwald, W.T., Levy, R.I. and Fredrickson, D.S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**, 499.
- Fukushima, M., Ohhashi, T., Ohno, S., Saito, H., Sonoyama, K., Shimada, K. (2001) Effects of diets enriched in *n*-6 or *n*-3 fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids.* **36**, 261-266.
- Grundy, S.M. (1990) Atlas of lipid disorders, 1 izd., Gower Medical Publishing, New York
- Guillaume, D. (2011) Argan Oil. *Alternative Medicine Review.* **16**, 275-278.
- Hegsted, D.M., McGrancy, R.B., Myers, M.L., Stare, F.M. (1965) Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr.* **17**, 281-295.
- Heinemann, T., Axtmann, G., von Bergmann, K. (1993) Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest.* **23**, 827-831.

LITERATURA

- Kaić-Rak, A., Mesaroš-Kanjški, E. (2000) Uloga pravilne prehrane u prevenciji bolesti srca i krvnih žila. *MEDICUS* **1**, 43-48.
- Karalis, D.G. (2009) Intensive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels for primary prevention of coronary artery disease. *Mayo Clin Proc.* **84**, 345-352.
- Keys, A., Minotti, A., Karvonen, M.J. (1986) The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol.* **124**, 903-915.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B. (2003) Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev.* **12**, 67-75.
- Kris-Etherton, P.M., Pearson, T.A., Wan, Y. (1999) High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am J Clin Nutr.* **70**, 1009-15.
- Lewis, G.F. and Rader, D.J. (2005) New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* **96**, 1221-1232.
- Lima, L.M., Carvalho, M.G., Sousa, M.O. (2007) Apo B/apo AI ratio and cardiovascular risk prediction. *Arq Bras Cardiol.* **88**, 187-190.
- Mann, J. (2002) Cardiovascular disease. In: Mann J. Truswell AS. (eds.), *Essentials of human nutrition*, 2nd edn. UK: Oxford, University Press. 299-334.
- Mayes, P.A. (2000) *Biochemistry, U: Lipid transport and storage*, (Murray R. K., ured.), Harper's Biochemistry, New York, str. 268-284.
- Nagyova, A., Haban, P., Klvanova, J., Kadrabova, J. (2003) Effects of dietary extra virgin olive oil on serum lipid resistance to oxidation and fatty acid composition in elderly lipidemic patients. *Bratisl Lek Listy.* **104**, 218-221.
- Nestel, P.J., Grundy, S.M. (1995) Nutrition and therapeutics. *Curr. Opin Lipidology.* **1**, 1-4.
- Ostlund, R.E., Racette, S.B., Stenson, W.F. (2002) Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterol, oxysterol and squalene. *Nut Rev.* **60**, 349-359.
- Ould Mohamedou, M.M., Zouirech, K., ElMessal, M., El Kebbaj, M.S., Chraibi, A., Adlouni, A., (2011) Argan oil exerts an antiatherogenic effect by improving lipids and susceptibility of LDL to oxidation in type 2 diabetes patients. *International Journal Endocrinology.* **11**, 1-8.

LITERATURA

- Plat, J., Mensink, R.P. (2005) Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol.* **96**, 15-22.
- Rao, G.H., Thethi I., Fareed, J. (2011) Vascular disease: obesity and excess weight as modulators of risk. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* **9**, 525-534.
- Reiner Ž. (1998) Utjecaj alkohola na prijevremeni razvitak ateroskleroze. *Prevenција ateroskleroze – Mladenačka dob (ur. V. Luetić), HAZU.* 37-46.
- Santos-Gallego, C.G., Ibanez, B., Badimon, J.J. (2008) HDLcholesterol: Is it really good?: Differences between apoA-I and HDL. *Biochemical Pharmacology.* **76**, 443-452.
- Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I. (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Eng J Med.* **333**, 1301-7.
- Siddiqi, S.A. (2008) VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochem J.* **413**, 333-342.
- Stamler, J., Shekelle, R. (1988) Dietary cholesterol and human coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med.* **112**, 1032-1040.
- Strickland, D.K., Ashcom, J.D. and Williams, S. (1990) Sequence identity between alpha-2-macroglobulin receptor and low-density-lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifactorial receptor. *J Biol Chem* **265**, 17401-4.
- Takada, R., Saitoh, M., Mori, T. (1994) Dietary gamma-linolenic acid-enriched oil reduces body fat content and induces liver enzyme activities relating to fatty acid beta-oxidation in rats. *J Nutr.* **124**, 469-474.
- Trautwein, E.A., Rieckhoff, D., Kunath-Rau, A., Erbersdobler, H.F. (1999) Replacing saturated fat with PUFA-rich (sunflower oil) or MUFA-rich (rapeseed, olive and high-oleic sunflower oil) fats resulted in comparable hypocholesterolemic effects in cholesterol-fed hamsters. *Ann Nutr Metab.* **43**, 159-172.
- Verbanac, D., Montana, V., Milin, Č. (1996) Polinezasićene masne kiseline- razlog zbog kojeg Eskimi ne obolijevaju od infarkta? *Gospodarstvo i okoliš* **2**, 143- 147.