Kvalitativna i kvantitativna analiza hidroksiestera masnih kiselina u hrani biljnoga podrijetla

Liberati Pršo, Ana-Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:717101

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ana-Marija Liberati Pršo

KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA HIDROKSIESTERA MASNIH KISELINA U HRANI BILJNOGA PODRIJETLA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Ana-Marija Liberati Pršo

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF FATTY ACID HYDROXY FATTY ACIDS IN PLANT FOODS

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2020

Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ana-Marija Liberati Pršo

KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA HIDROKSIESTERA MASNIH KISELINA U HRANI BILJNOGA PODRIJETLA

DOKTORSKI RAD

Mentori: dr. sc. Mario Cindrić, viši znanstveni suradnik

prof. dr. sc. Irena Colić-Barić

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Ana-Marija Liberati Pršo

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF FATTY ACID HYDROXY FATTY ACIDS IN PLANT FOODS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: PhD. Mario Cindrić, Senior Research Associate

PhD. Irena Colić-Barić, Full professor

Zagreb, 2020

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij nutricionizma

UDK: 543.51:544.431.143:612.349.8:664.33(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA HIDROKSIESTERA MASNIH KISELINA U HRANI BILJNOGA PODRIJETLA

Ana -Marija Liberati Pršo, dr. med.

Odjel za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, KB Sveti Duh, Zagreb

Rad je izrađen na Prehrambeno – biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te Institutu Ruđer Bošković, Zavod za proteomiku i spektrometriju masa
Mentori: dr. sc. Mario Cindrić, viši znanstveni suradnik, prof. dr. sc. Irena Colić-Barić, red. prof.

Kratki sažetak
Pretilost, upala, inzulinska rezistencija, hiperglikemija, dislipidemija i hipertenzija značajni su čimbenici rizika za kardiovaskularni morbiditet i mortalitet. Nedavno otkriven razred hidroksiestera masnih kiselina (engl. Fatty acid esters of hydroxy fatty acids, FAHFA) djeluje protuupalno, inzulin-senzitizirajuće i hipoglikemizantno, a razina im je snižena u inzulin-rezistentnih pojedinaca. Cilj istraživanja je detaljno kvalificirati i kvantificirati FAHFA u hrani biljnog porijekla, budući da je do sada istražen njihov djelomičan sastav samo u jabuci, brokuli, jajetu, piletini i govedini. Analizirano je 20 namirnica iz svakodnevne prehrane te jelovnika za metaboličku optimizaciju. U analizi je primijenjena nova tehnika: ionizacija u negativnom načinu rada spektrometra masa na nanoLC-ESI-MS hifeniranom sustavu uz primjenu postkolumnog modifikatora. Obuhvaćeno je 16 FAHFA, izmjerene su nanogramske količine uz značajnu varijabilnost među namirnicama. Najviše koncentracije nađene su u zobi. U hrani s metaboličkim benefitima SAHSA (engl. Stearic acid hydroxystearic acid) je bila najzastupljenija FAHFA, dok PAHSA (engl. Palmitic acid hydroxystearic acid), jedine prethodno istraživane u antihiperglikemijskom i inzulin-senzitizirajućem smislu, u nekim vrstama hrane uopće nema. Ovo je istraživanje, uz razvoj novih analitičkih metoda, dovelo do novih spoznaja o FAHFA sastavu hrane te ukazalo na važnost otkrivanja istog u što većem broju namirnica. Cilj je u budućnosti hranu bogatiju FAHFA inkorporirati u jelovnike za metaboličku optimizaciju te pronaći adekvatne nosače FAHFA, kako bi se ciljne namirnice mogle njima obogaćivati.

Broj stranica: 129+ XVII
Broj tablica: 38
Broj slika: 58
Broj literaturnih navoda: 135
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: metabolički sindrom, inzulinska rezistencija, FAHFA, spektrometrija masa
Datum obrane: 24. ožujka 2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Prof.dr. sc. Vladimir Mrša
2. Prof.dr. sc. Irena Landeka
3. Doc.dr. sc. Dario Rahelić
4. Prof.dr.sc. Ivana Rumbak – zamjenski član

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23.; u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **PhD thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study in Nutrition

UDK: 543.51:544.431.143:612.349.8:664.33(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Nutrition

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF FATTY ACID HYDROXY FATTY ACIDS IN PLANT FOODS

Ana-Marija Liberati Pršo, dr. med.

Department of endocrinology, diabetes and metabolic diseases, Clinical hospital Sveti Duh, Zagreb

Thesis performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb and Institute Rudjer Boskovic, Centre for proteomics and mass spectrometry, Zagreb, Croatia
Supervisors: PhD. Mario Cindrić, Associate professor, PhD. Irena Colić-Barić, Full Professor

Short abstract
Obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia, hyperglycemia and hypertension are risk factors for cardiovascular morbidity and mortality. Recently discovered fatty acids (Fatty acid esters of hydroxy fatty acids, FAHFA) provide antiinflammatory, insulin-sensitizing and glucose-lowering effect, and show a decreased level in insulin-resistant individuals. Aim of this study was a detailed qualitative and quantitative analysis of FAHFA in plant foods, as to date only partial analyses in apple, broccoli, egg, chicken and beef are performed. In this study, 20 plant foods from everyday meals and diet plans for metabolic normalization were analysed. Analysis included a new technique: negative ionization mode of nanoLC-ESI-mass spectrometry system and postcolumn modifier addition. 16 FAHFA were analysed (hydroxyesters of palmitic, oleic, palmitoleic and stearic acids). Nanogram levels were detected, showing a significant interfood variability. Highest concentrations were found in oat. In foods with metabolic benefits, SAHSA (stearic acid hydroxystearic acid) was the most abundant FAHFA, whereas PAHSA (palmitic acid hydroxystearic acid), the only FAHFA previously investigated in anti-hyperglycemic and insulin-sensitizing manner, showed no presence in some foods. This study, along with development of new analytic methods, provided new knowledge about FAHFA composition of foods and emphasized the importance of further research in extended number of foods. Future aims are to enable incorporation of FAHFA-rich foods into diet plans targeting metabolic control, and to find adequate FAHFA carriers that could enable food enrichment.

Number of pages: 129 + XVII
Number of tables: 38
Number of figures: 58
Number of references: 135
Original in: Croatian

Key words: metabolic syndrome, insulin resistance, FAHFA, mass spectrometry
Date of the thesis defence: March 24th 2020.

Reviewers:
1. Prof.dr. sc. Vladimir Mrša
2. Prof.dr. sc. Irena Landeka
3. Doc.dr. sc. Dario Rahelić
4. Prof.dr.sc. Ivana Rumbak – deputy member

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23; National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb; University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14

Tema doktorskog rada pod nazivom „Kvalitativna i kvantitativna analiza hidroksiestera masnih kiselina u hrani biljnoga podrijetla“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanja mentora, prihvaćena je na 5. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta akademske godine 2018/2019. u Zagrebu održanoj dana 28. veljače 2019. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 11. lipnja 2019. godine na 11. sjednici u 350. akademskoj godini (2018/2019).

Zahvale

Zahvaljujem se prvenstveno mojoj majci, a potom i suprugu na bezuvjetnoj ljubavi i podršci, strpljenju, benevolenciji, odricanjima i danonoćnoj pomoći. Hvala im na poštovanju koju su iskazali prema meni i mojim snovima. A iznad svake hvale, velika im isprika na mjesecima psihofizičkog odsustva te nesudjelovanju u obiteljskoj svakodnevici i obavezama.

Zahvaljujem se mentoru dr. sc. Mariju Cindriću na prenesenom znanju i vještinama, strpljenju i razumijevanju te spremnosti na interdisciplinarne izazove. Hvala i na brojnim konstruktivnim diskusijama koje su me približile analitičkom pogledu na znanost.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ireni Colić-Barić na odvojenom vremenu usprkos fizičkoj odsutnosti tijekom studijske godine te obvezama tijekom iste. Hvala i na „vjetru u leđa“, kojeg bi mi poslala uvijek u pravom trenutku te na povjerenju koje je imala usprkos mojim periodičnim posustajanjima i padovima.

Zahvaljujem se istraživačkom timu Instituta Ruđer Bošković, koji je podupirao eksperimentalni dio mojeg istraživanja.

Zahvaljujem se članovima Povjerenstva na kritičkom čitanju rukopisa i korisnim savjetima.

Za Maura, Bruna i Adriana

„...Nema ljepšeg zadatka nego što je omogućiti nekom razvitak, proširiti mu poglede na svijet, pomoći čovjeku u njegovoj težnji za usponom..."

Ivo Andrić „Znakovi pored puta“

Kvalitativna i kvantitativna analiza hidroksiestera masnih kiselina u hrani biljnoga podrijetla

Sažetak

Znanstveni interes za pandemijske razmjere metaboličkog sindroma i dijabetesa neprestano raste. Metabolički sindrom podrazumijeva pretilost, upalu, inzulinsku rezistenciju, hiperglikemiju, dislipidemiju i hipertenziju, čije međusobno preklapanje povisuje kardiovaskularni morbiditet i mortalitet. Budući da su kardiovaskularni incidenti vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, važno je pronaći što više strategija za korekciju osnovnih metaboličkih disbalansa, te prevenciju težih oblika bolesti i kroničnih komplikacija. U prevenciji metaboličkog sindroma ključnu ulogu imaju pravilna prehrana i redovita tjelovježba. Odabir vrste, količine i pripreme hrane izuzetno su važni za optimalan unos nutrijenata. Jelovnici za oboljele od metaboličkih poremećaja poput metaboličkog sindroma i dijabetesa trebaju sadržavati namirnice niskog glikemijskog indeksa što bogatije vlaknima, antioksidansima, mineralima, vitaminima i nezasićenim mastima, kako bi se ostvarilo što snažnije antioksidativno, protuupalno, hipoglikemizantno i inzulin-senzitizirajuće djelovanje.

Do sada su otkriveni brojni protuupalni mehanizmi te njihovi protagonisti, a među najproučavanijima su dokosaheksaenska i eikosapentaenska masna kiselina te njihovi derivati. Nedavno je otkriven i novi razred lipida, FAHFA, koji suprimira upalu, potiče lučenje inkretina u tankom crijevu te pozitivno utječe na proizvodnju i djelovanje inzulina. Otkriveno je kako pojedinci sa smanjenom količinom FAHFA u masnom tkivu i serumu imaju izraženiju inzulinsku rezistenciju i pretilost. Također, pojedinci s inzulinskom rezistencijom imaju 50-75% manju koncentraciju FAHFA od pojedinaca s normalnom inzulinskom osjetljivošću. Pokazalo se kako primjena FAHFA dovodi do smanjenja inzulinske rezistencije te normalizacije glikemije.

Inicijalno je definirano 16 podvrsta FAHFA, od kojih je PAHSA bila najizraženija, a navedeni učinci pripisani su ponajviše izomerima 5 i 9. Prilikom oralne primjene FAHFA u svrhu ispitivanja njihovog učinka na glikemiju te inzulinsku osjetljivost i rezistenciju korišteni su sintetizirani izomeri, odnosno nisu korištene namirnice sa prethodno kvalificiranim i kvantificiranim FAHFA sadržajem. Do sada je analizirano, uz animalna i humana tkiva i serume, svega pet namirnica (jabuka, brokula, piletina, govedina, jaje).

Pronađeno je nekoliko razreda FAHFA, a njihov omjer i količina opisani su samo za jednu podvrstu, PAHSA.

Svrha ovog istraživanja je detaljno analizirati kvalitativni i kvantitativni sastav FAHFA u hrani biljnog porijekla koja je dio kako svakodnevne prehrane, tako i specijaliziranih jelovnika. Odabrano je 20 namirnica: jabuka, klementina, limun, jagoda, borovnica, mango, kivi, avokado, ananas, banana, luk, češnjak, cherry rajčica, mrkva, peršin, paprika, rotkvica, cjelovita zob, krupne zobene pahuljice i sitne instantizirane zobene pahuljice. U svrhu postizanja maksimalne analitičke osjetljivosti korišten je inovativni pristup (nikada ranije primijenjen u lipidomici) koji je uključivao mikro i nano-tekućinsku kromatografiju uz poslije-kolumni modifikator etil metanoat, te masenu spektrometriju negativnog iona. Takav pristup omogućio je detekciju ekstremno niskih (10^{-9} g) razina FAHFA.

Analizirano je 16 FAHFA razreda (hidroksiesteri palmitinske, oleinske, palmitoleinske i stearinske kiseline): POHPO, POHPA, PAHPO, PAHPA, POHOA, OAHPO, PAHOA, OAHPA, POHSA, PAHSA, SAHPA, OAHOA, OAHSA, SAHOA, SAHSA i SAHPO. Uz značajne razlike među namirnicama, koncentracija FAHFA izmjerena je u mikro- i nanogramima, s najvećom koncentracijom u cjelovitoj zobi, klementini, češnjaku i ananasu. Najzastupljenijom FAHFA se pokazala SAHSA (u 19 od 20 namirnica), a najmanje zastupljena je SAHPO (u 3 od 20 namirnica). PAHSA, kao jedina FAHFA sa do sada ispitivanim hipoglikemizantnim i inzulin senzitizirajućim djelovanjem, u nekim namirnicama uopće nije pronađena (rotkvica, avokado, mango, limun, cherry rajčica, kivi). Namirnica s najvećim brojem FAHFA razreda jest klementina (15 od 16 analiziranih razreda), dok najmanji broj FAHFA razreda imaju sitne instantizirane zobene pahuljice (3 od 16). Kvantitativna analiza pokazuje da cjelovita zob ima najveću ukupnu količinu FAHFA ($3.20 \pm 0.03 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice), a najniže koncentracije ukupnih FAHFA pronađene su u sitnim instantiziranim zobenim pahuljicama ($0.77 \pm 0.08 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice). FAHFA s najvećom varijabilnosti među namirnicama su SAHSA, SAHOA i PAHPA, dok su one s najmanjom varijabilnosti OAHSA i SAHPO. PAHSA, kao jedina do sada analizirana FAHFA u hrani, pokazuje prosječnu zastupljenost (13 od 20 analiziranih namirnica) te prosječnu koncentraciju ($3.78 - 41.5 \times 10^{-9}$ g/g svježe namirnice).

Ovo je istraživanje, uz razvoj novih analitičkih metoda, dovelo do novih spoznaja o FAHFA sastavu hrane biljnog podrijetla, pokazavši kako se namirnice međusobno uvelike razlikuju po FAHFA sastavu. Također, na primjeru zobi pokazano je kako procesiranje hrane

(uključujući termičku obradu) dovodi do gubitka FAHFA i promjene sastava (udjela FAHFA razreda).

Neke od analiziranih namirnica najbogatijih FAHFA prilično su zanemarene u prehrani, pa je dodatna vrijednost ovog istraživanja to što ukazuje na važnost otkrivanja FAHFA u što većem broju namirnica, kako bi se u budućnosti namirnice bogatije FAHFA mogle češće uvrstiti u jelovnike namijenjene prevenciji i liječenju metaboličkog sindroma, pretilosti i (pre)dijabetesa.

Ključne riječi: metabolički sindrom, inzulinska rezistencija, funkcionalna hrana, FAHFA, spektrometrija masa

Qualitative and quantitative analysis of fatty acid hydroxy fatty acids in plant foods

Abstract

Pandemic proportions of metabolic syndrome and diabetes keeps raising scientific attention. Metabolic syndrome includes obesity, inflammation, insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia, and hypertension; their overlap raises cardiovascular morbidity and mortality. Since cardiovascular incidents are the world's leading cause of mortality, it is important to find as many strategies as possible to correct the underlying metabolic imbalancesand prevent severe forms of illness and chronic complications. Crucial prevention of metabolic syndrome consists of diet modification and adequate physical activity. It is important to carefully select the type, quantity and preparation of food to ensure optimal nutrient intake. Specialized diet plans for metabolic disorders like diabetes and metabolic syndrome need to contain as much ingredients of a low glycemic index and rich in fiber, antioxidants, minerals, vitamins, and unsaturated fatty acids as possible, to ensure the highest antioxidant, anti-inflammatory, glucose-lowering and insulin-sensitizing effect.

Numerous anti-inflammatory mechanisms and their protagonists have been discovered, among which are so far the most studied docosahexaenoic and eicosapentaenoic fatty acids, and their derivatives. Recently a new class of lipids, FAHFA, was discovered, and proved to be an anti-inflammatory mediator, with a positive effect on intestinal incretine excretion and the insulin production and action aswell. It has been found that individuals with reduced FAHFA levels in adipose tissue and serum have more pronounced insulin resistance and obesity. Also, individuals with insulin resistance have a 50-75% lower FAHFA concentration than individuals with normal insulin sensitivity. FAHFA administration showed insulin-sensitizing and glucose-lowering effect.

16 subspecies of FAHFA were initially discovered, of which PAHSA was the most abundant and the above effects are attributed primarily to isomers 5 and 9. During oral administration of FAHFA, in order to reveal their effects on glycemia and insulin sensitivity, only synthetic isomers and none of foods with pre-qualified and quantified FAHFA content were used. To date, in addition to the animal and human sera and tissues, only five foods (apple, broccoli, chicken, beef, egg) were analyzed. Few classes of FAHFA have been found, whereof only PAHSA was isomerically qualified and relatively quantified.

The aim of this study was to analyze in detail the qualitative) and the quantitative composition of FAHFA in plant foods that are a part of both common diets and specialized. 20 foods were chosen: apple, clementine, lemon, strawberry, blueberry, mango, kiwi, avocado, pineapple, banana, onion, garlic, cherry tomato, carrot, parsley root, pepper, radish, whole grain oat, coarse oat flakes and fine oat flakes. In order to achieve a maximum analitical sensitivity, an innovative approach was used (never used in lipidomics before); it included micro and nano-liquid chromatography with post-column ethyl methanoate modifier and mass spectrometry of a negative ion. This specific approach has enabled the detection of extremely low (10^{-9}g) levels of FAHFA.

Analysis od 16 FAHFA classes (hydroxyesters of palmitic, oleic, palmitoleic and stearic acid: POHPO, POHPA, PAHPO, PAHPA, POHOA, OAHPO, PAHOA, OAHPA, POHSA, PAHSA, SAHPA, OAHOA, OAHSA, SAHOA, SAHSA and SAHPO) was performed. Showing significant interfood variability and highest levels in oat, clementine, garlic and pineapple, FAHFA concentrations were measured in micrograms and nanograms.

SAHSA was the most abundant FAHFA (present in 19 of 20 analyzed foods), and the least abundant was SAHPO (3 of 20 foods). The PAHSA class, as the only pre-investigated in the antihyperglycemic and insulin-sensitizing sense, showed no presence in some foods (radish, avocado, mango, lemon, cherry tomato, kiwi). Food with the highest number of FAHFA classes detected was clementine (15 of 16 classes), and food with the lowest number of FAHFA were fine, rolled oat flakes (3 of 16 classes).

Quantitative analyses show that the whole grain oat contains the highest overall concentrations of FAHFAs ($3.20 \pm 0.03 \times 10^{-7}$ g/g fresh weight), while the lowest overall FAHFA concentrations were found in thermaly pre-treated oat ($0.77 \pm 0.08 \times 10^{-7}$ g/g fresh weight). FAHFA with the highest inter-food concentrations are SAHSA, SAHOA and PAHPA, and those with the lowest inter-food concentrations are OAHSA and SAHPO. PAHSA, as the only FAHFA previously studied in food, showed average abundancy (in 13 of 20 analyzed foods), and mid-range concentrations ($3.78 - 41.5 \times 10^{-9}$ g/g fresh weight).

This research, applying new analytical methods, has led to new insights into FAHFA composition of certain plant foods, showing that foods vary greatly in FAHFA composition. Furthermore, this investigation showed that food processing leads to FAHFA loss (as showed within the oat products). Some foods richest in FAHFA are largely ignored in nutrition, so the added value of this research is that it points to the importance of discovering FAHFA in as many foods as possible, so that in the future the foods richer in FAHFA can be more often

incorporated into menus intended for the prevention and treatment of metabolic syndrome, obesity and (pre)diabetes.

Key words: metabolic syndrome, insulin resistance, functional food, FAHFA, mass spectrometry

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO I LITERATURNI PREGLED 5
   2.1. Pretilost, metabolički sindrom i šećerna bolest tip 2 6
      2.1.1. Epidemiologija, patofiziologija i posljedice pretilosti, metaboličkog sindroma i šećerne bolesti tip 2 6
      2.1.2. Prevencija pretilosti, metaboličkog sindroma i šećerne bolesti tip 2 te uloga FAHFA 11
   2.2. Kemijska struktura FAHFA 14
   2.3. Biološka pojavnost FAHFA 19
      2.3.1. FAHFA kao endogeni lipid u sisavaca 20
      2.3.2. FAHFA kao egzogeni lipid 23
   2.4. Putevi enzimske razgradnje FAHFA u tkivima 28
   2.5. Metabolička i protuupalna uloga FAHFA in vivo i in vitro 28
      2.5.1. Protuupalni učinak FAHFA 30
      2.5.2. Hipoglikemizantni i inzulin-senzitizirajući učinci FAHFA 30
   2.6. Kvalitativna i kvantitativna analiza FAHFA 31
      2.6.1. Tekućinska kromatografija 32
      2.6.2. Spektrometrija masa 33
   2.7. Lipidomika 35
      2.7.1. Priprema uzoraka za lipidomičke analize 37
      2.7.2. Analiza lipida MS spregnutom s kromatografijom 39
3. MATERIJALI I METODE 40
   3.1. Namirnice, kemikalije, pribor i instrumenti 41
      3.1.1. Namirnice 41
      3.1.2. Kemikalije 42
      3.1.3. Pribor 43
      3.1.4. Instrumenti i uređaji 43
      3.1.5. Programi za upravljanje instrumentima ili obradu podataka 44
   3.2. Priprema uzoraka za analizu 44
      3.2.1. Ekstrakcija lipida iz uzorka svježe hrane 44
      3.2.2. Ekstrakcija FAHFA Čvrstom Fazom 45
      3.2.3. Tekuća kromatografija i razdvajanje FAHFA 46
   3.3. Analiza FAHFA spektrometrijom masa 46

3.4. Statistička analiza 49
4. REZULTATI I RASPRAVA 51
4.1. Kvalitativna analiza FAHFA 54
4.2. Kvantitativna analiza FAHFA 55
4.3. Statistička obrada podataka 60
4.3.1. Faktorska analiza za promatrane kiseline 60
4.3.2. Spearmanov koeficijent korelacije 61
4.3.3. Faktorska analiza za promatrane namirnice 64
5. ZAKLJUČCI 68
6. LITERATURA 71
ŽIVOTOPIS 85
DODACI i

1. UVOD

Među kroničnim bolestima današnjice, s obzirom na svoje pandemijske razmjere i ozbiljne posljedice, posebice se ističu šećerna bolest tipa 2 (ŠBT2) i metabolički sindrom. U patofiziologiji ŠBT2 i metaboličkog sindroma leže pretilost, inzulinska rezistencija i kronična upala, pri čemu su aktivirani mnogobrojni imuno-metabolički mehanizmi. Do sada su otkriveni brojni medijatori (proupalni i protuupalni), koji određuju tijek metaboličkih bolesti, a velik znanstveni interes usmjeren je na otkrivanje supstanci koje bi na njih utjecale, odnosno imale povoljan imunometabolički učinak te time potencijalno smanjile upalu i razvoj kroničnih komplikacija. U tom kontekstu najaktivnije su farmaceutska i prehrambena industrija kojima fundamentalna i primijenjena istraživanja iz područja kemije (poput strukturnih, spektroskopskih i biokemijskih istraživanja) te razvoj procesnih analitičkih metoda i metoda kvalitativne i kvantitativne kemijske analize, omogućavaju analizu složenih smjesa (poput hrane i biološkog materijala) i određivanje elemenata prisutnih u mikrotragovima. Pritom se prehrambena industrija i industrija suplemenata susreću sa zahtjevnom legislativom, koja nalaže precizno mjerenje i deklaraciju nutritivnog sastava hrane i pripravaka. Također, sve je stroža i složenija kontrola njihove kvalitete, sigurnosti (zdravstvene ispravnosti), stabilnosti i senzoričkih svojstava. Budući da je hrana, uz dodatke prehrani biljnog i životinjskog porijekla, izrazito kompleksan i heterogen spoj raznorodnih kemijskih supstanci, u svrhu adekvatne i detaljne analize neophodna je primjena najosjetljivijih metoda, odnosno instrumentalnih tehnika poput kromatografije i spektrometrije. Navedene metode, a posebice tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti povezana s tandemskim spektometrom masa, HPLC-MS (engl. High performance liquid chromatography – mass spectrometry), u nekoliko koraka i faza omogućuju brzo i efikasno odvajanje velikog broja molekula prisutnih u pikomolarnim koncentracijama, uz pojednostavnjenu pripremu uzoraka te mogućnost istovremenih višekratnih analiza zadanog uzorka. Razvoj i napredak takvih analitičkih metoda omogućava svakodnevna istraživanja na području nutricionizma, farmaceutike, medicine i toksikologije.

Njihova komercijalna primjena posljednjih desetljeća rezultira kako optimiziranom kvalitetom i sigurnošću hrane (uslijed uklanjanja toksičnih spojeva, kontaminanata i mikroorganizama te dodavanja poželjnih aditiva i nutrijenata), tako i otkrivanjem bioaktivnih komponenata s potencijalnim zdravstvenim benefitima (e.g. protuupalno i antioksidativno djelovanje).

Nedavno je otkriven i nov razred lipida, hidroksiesteri masnih kiselina (engl. Fatty acid hydroxyl fatty acids, FAHFA), koji je pokazao protuupalno djelovanje, pozitivan učinak na izlučivanje inkretina u crijevu, na sintezu i izlučivanje inzulina u gušterači, te na njegovo djelovanje u perifernim tkivima. Dokazano je kako pojedinci sa smanjenom količinom FAHFA imaju izraženiju inzulinsku rezistenciju i pretilost te obratno, kako pojedinci s inzulinskom rezistencijom imaju manju koncentraciju FAHFA od pojedinaca s normalnom inzulinskom osjetljivošću. Egzogenom je pak primjenom FAHFA postignut hipoglikemizantni, inzulin- senzitizirajući i protuupalni učinak. Znanstvenici koji su prvi otkrili postojanje FAHFA, definirali su 16 podvrsta, od kojih je PAHSA bila najzastupljenija, a navedeni učinci pripisani su ponajviše izomerima 5 i 9. Različiti FAHFA izomeri međusobno se razlikuju pozicijom grananja esterske veze sa hidroksi masne kiseline; izomeri 5 i 9-PAHSA nastaju kondenzacijom karboksilne skupine palmitinske kiseline na 5- ili 9-hidroksioktadekanoičnu (-hidroksistearinsku) kiselinu.

U svrhu otkrivanja što više vrsta FAHFA i njihovih učinaka, osim analize seruma i tkiva, učinjena je i analiza nekoliko namirnica (jabuka, brokula, piletina, govedina, jaje). No usprkos sve većem broju otkrivenih FAHFA razreda, analiza hrane (u smislu kvalifikacije i kvantifikacije) do danas je ostala ograničena samo na PAHSA razred, čiji su omjeri i količina poznati samo za gore navedene namirnice. Također, prilikom primjene egzogenih FAHFA korišteni su samo sintetizirani izomeri, odnosno nije korištena hrana s poznatim FAHFA sadržajem. Time izostaje i mogućnost ispitivanja protuupalnih i metaboličkih učinka nutritivnih, nativnih FAHFA.

Obzirom na pandemiju pretilosti, metaboličkog sindroma, predijabetesa i dijabetesa, važno je pronaći što više strategija za korekciju metaboličkih disbalansa, te sprečavanje kroničnih komplikacija i visokog mortaliteta. Sve se više istraživanja bavi otkrivanjem protuupalnih nutrijenata, koji bi bilo u nativnom obliku, bilo kao fortifikacija svakodnevnih namirnica, uspostavljali imunometaboličku ravnotežu.

U otkrivanju i analizi makromolekula (npr. proteina, DNA, RNA, kompleksnih šećera itd.), lipida te ostalih nutrijenata, posljednjih dvadesetak godina spektrometrija masa nametnula se kao nezaobilazna tehnika. Postupak identifikacije u današnje je vrijeme olakšan

zahvaljujući metodi koja je dovoljno osjetljiva za izvođenje na pikomolarnoj količini uzorka, dovoljno brza da se u razumnom vremenu očita čim veći broj molekulskih sastavnica te dostatno točna da su dobivene informacije pouzdane i reproducibilne. Posebnu pozornost privlači mogućnost identifikacije novih molekula čija struktura i funkcija do sada nisu poznate, a koje su sastavnica
kako ljudskog organizma, tako i hrane koju još neotkriveni spojevi možda čine funkcionalnom i metabolički korisnom.

Cilj ovog istraživanja jest istražiti detaljan sastav i količinu 16 podvrsta FAHFA u 20 namirnica biljnog porijekla, koje od ranije imaju dokazane zdravstvene benefite, te razlučiti namirnice bogate vs siromašne FAHFA.

U svrhu detaljnijeg određivanja vrsti i količine hidroksiestera masnih kiselina, odnosno kvalifikacije i kvantifikacije sadržaja FAHFA u hrani, ciljevi su i razvoj i unapređenje analitičkih metoda, odnosno tehnika rada na nanoLC-ESI hifeniranom sustavu u spoju sa spektrometrijom masa. Osnovna razlika novorazvijene tehnike nad postojećim tehnikama detekcije i identifikacije lipida jest uključivanje nano-LC i poslije-kolumnog modifikatora etil metanoata, nakon čega slijedi analiza spektrometrijom masa negativnih iona. Takav pristup omogućio je maksimalnu osjetljivost i snizio razinu detekcije analiziranih molekula.

Jedan od budućih ciljeva je i pronaći adekvatne nosače FAHFA, kako bi se lako dostupne namirnice mogle obogaćivati navedenom skupinom nutrijenata. Saznanja će poslužiti stratifikaciji hrane i prema FAHFA sastavu, što bi u budućnosti moglo biti važno za formiranje ciljanih jelovnika (namirnice bogatije FAHFA mogle bi se češće inkorporirati u jelovnike s ciljem metaboličke optimizacije). Pronalaskom adekvatnih nosača za FAHFA, iste bi se putem hrane ili suplemenata mogle uključiti u dijetetske smjernice za prevenciju i liječenje metaboličkih bolesti poput metaboličkog sindroma, dijabetesa i šećerne bolesti tipa 2.

2. OPĆI DIO I LITERATURNI PREGLED

2.1. Pretilost, metabolički sindrom i šećerna bolest tip 2

2.1.1. Epidemiologija, patofiziologija i posljedice pretilosti, metaboličkog sindroma i šećerne bolesti tip 2

Opći zdravstveni aspekti vezani uz prehrambene navike i dnevne rutine većine populacije u zapadnoj civilizaciji, dovode do povećanja oboljenja i zdravstvenih rizika vezanih uz pretilost, metabolički sindrom, predijabetes i šećernu bolest. Navedeni zdravstveni rizici i metabolička patogena stanja pokazuju trend nezaustavljivog rasta sa sve većim posljedičnim mortalitetom koji utječe na kvalitetu života i očekivani prosječni životni vijek. Pandemijski razmjeri navedenih poremećaja i oboljenja zahvaćaju sve širu populaciju, a svakako su povezani sa stupnjem razvoja pojedinog društva i osvješćivanju vrijednosti pravilne prehrane.

Pretilost se više ne smatra samo estetskim nedostatkom, već multifaktorijalnom bolešću. Današnja saznanja o njezinoj etiologiji i patofiziologiji zadiru u molekularne, genetske, epigenetske i nutrigenomske mehanizme. Uzevši u obzir sve stupnjeve prekomjerne tjelesne mase (indeks tjelesne mase 25-29.9 kg/m^2 prekomjerna tjelesna masa, 30.0-34.9 kg/m^2 prvi stupanj pretilosti, 35.0-39.9 kg/m^2 drugi stupanj pretilosti, > 40.0 kg/m2 treći stupanj pretilosti ili morbidna pretilost), epidemiološki podatci govore kako je zahvaćeno gotovo 40% svjetske populacije (1,2,3). Sa 21,5% pretilih osoba, Hrvatska je zemlja s najvećom prevalencijom pretilosti u EU, a ako se u obzir uzme i prekomjerna tjelesna masa, tada je Hrvatska je sa 58,2% na 2. mjestu prevalencije među zemljama EU (4). Osnova nastanka pretilosti jest preobilan energetski unos koji premašuje potrošnju, odnosno kronično stanje pozitivnog energetskog balansa, uslijed čega dolazi do generiranja i skladištenja suvišne tjelesne masti. Kad se prekomjernim unosom hrane stvori patološka podloga, nastavno se nadovezuju biološki (genetska predispozicija, poremećaj moždano-gastrointestinalne osovine, endokrinopatije, prenatalni poremećaji) i bihevioralni (uporaba lijekova, manjak sna, nedostatak tjelesne aktivnosti i prestanak pušenja) čimbenici, koji doprinose daljnjem razvoju pretilosti (5,6). S obzirom na multifaktorijalnu etiologiju te patogenezu, koja uključuje sustavnu upalu, glukotoksičnost i lipotoksičnost, pretilost je povezana s nastankom velikog broja kroničnih bolesti: metaboličkim sindromom (7,8), dijabetesom tip 2 (8,9), inzulinskom rezistencijom (8,9), arterijskom hipertenzijom (8,10), dislipidemijom (8,11), bolestima dišnog sustava (12), upalnim bolestima osteomuskularnog

sustava poput reumatoidnog i psorijatičnog artritisa i osteoartritisa (13,14,15) te karcinomima dojke i probavnog sustava (8,16).

Termin „metabolički sindrom“ prvi se puta spominje 1975. godine kada su znanstvenici primijetili da se kardiovaskularne bolesti javljaju češće ukoliko postoji kombinacija pretilosti, hipertenzije, aterogene dislipidemije i narušenog metabolizma glukoze koja za gotovo dva puta uvećava rizik od smrtnosti (17).

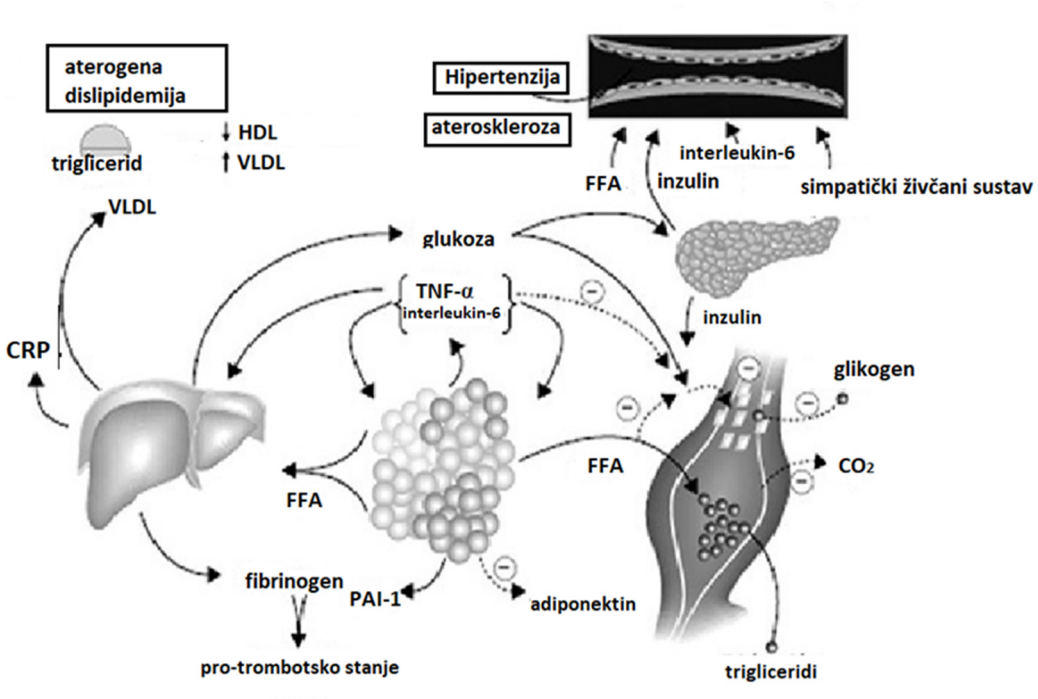
Kontekst metaboličkog sindroma kao zajedničke pojavnosti nekoliko metaboličkih disbalansa (centralne pretilosti, inzulinske rezistencije, hipertenzije i dislipidemije) se od tada nije značajnije mijenjao, te se i danas koristi kako bi se identificirali pojedinci sa skupom rizičnih čimbenika koji zajedno predstavljaju višestruko povećan rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti (17,18,19). Većina studija se slaže oko činjenice da je metabolički sindrom u svijetu poprimio epidemijske razmjere, da mu učestalost raste s godinama života te da posljedično dovodi do visoke kardiovaskularne smrtnosti. I dok se prevalencija metaboličkog sindroma u mlađoj poplaciji (18-30 godina) procjenjuje na 5-7% (20), u odrasloj populaciji ona je značajno viša, sa 20% u Azijskim zemljama te čak 50% u SAD (21,22). U Hrvatskoj je prevalencija metaboličkog sindroma izrazito visoka i procjenjuje se na 32%, odnosno 35,7% žena te 27,2% muškaraca (23). Etiologija metaboličkog sindroma izrazito je kompleksna i uključuje međudjelovanje mnogobrojnih rizičnih faktora, od kojih je važno izdvojiti pretilost, genetsku predispoziciju, starenje, sedentarni način života i pogrešnu prehranu (24,25). Premda se već desetljećima traga za mehanizmima koji dovode do nastanka metaboličkog sindroma, i dalje njegova patofiziologija nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, nekoliko teorija je za sada široko prihvaćeno (25) te se vodećim uzrocima metaboličkog sindroma danas smatraju inzulinska rezistencija (26-29), kronična upala niskog stupnja tj. metainflamacija (30) i oksidativni stres (31). Metabolički sindrom kao skup metaboličkih disbalansa (pretilosti, inzulinske rezistencije, hiperglikemije, dislipidemije i hipertenzije), u kombinaciji s genetskom predispozicijom predstavlja faktor rizika za razvoj šećerne bolesti tip 2 (ŠBT2), vaskularne upale i ateroskleroze, kardiovaskularnih incidenata (srčani i moždani udar, srčano zatajenje, periferna arterijska bolest), steatohepatitisa, bolesti respiratornog i osteomuskularnog sustava te nekih vrsta karcinoma (18,19).

Šećerna bolest tip 2 pandemijskim je razmjerima i eksponencijalnim porastom posljednjih desetljeća zaslužila titulu jedne od najsmrtonosnijih kroničnih nezaraznih bolesti u

svijetu, budući da se unazad 30 godina broj oboljelih u svijetu učetverostručio (32). Prema posljednjim podatcima registrirano je 463 milijuna bolesnika, što predstavlja gotovo desetinu svjetskog stanovništva. Od ukupnog broja oboljelih u svijetu, više od 90% ima tip 2 šećerne bolesti, dok ostalih desetak posto boluje od šećerne bolesti tip 1, latentnog autoimunog dijabetesa odraslih te monogenskog dijabetesa (32). Trenutno registriranih 463 milijuna oboljelih će, prema statističkim i epidemiološkim predviđanjima, u slijedećih 25 godina narasti na više od 700 milijuna. Brojke se odnose na broj verificiranih bolesnika, s obzirom da se procjenjuje kako gotovo polovica oboljelih nije svjesna bolesti, tj. dijagnoza dijabetesa im još nije postavljena. Često zanemarivan predijabetes („pred-faza“ dijabetesa u kojoj dolazi do deterioracije homeostaze glukoze, blagog povišenja glikemije te postupnog razvoja kroničnih dijabetičkih komplikacija), također pogađa značajan udio populacije. Procjenjuje se kako uz prevalenciju od 7,5% pogađa 374 milijuna ljudi (32). Brojke za Hrvatsku također pokazuju značajan porast tijekom posljednjih desetljeća pa se danas broj oboljelih od ŠB, uz 304 000 verificiranih plus 40% neotkrivenih, procjenjuje na gotovo 500 000 (33). Valja napomenuti kako je ŠBT2 važan kardiovaskularni faktor rizika koji dovodi do visoke stope smrtnosti pa se danas ŠBT2 nalazi na 9. mjestu smrtnosti u svijetu, sa 5 milijuna umrlih u 2017.godini (34), te na 5. mjestu u Hrvatskoj (35). Kao i kod metaboličkog sindroma, etiologija ŠBT2 je kompleksna i multifaktorijalna. S obzirom da je metabolički sindrom svojevrsni preduvjet za razvoj ŠBT2, i čimbenici rizika su većim dijelom zajednički, s naglaskom na pretilost, tjelesnu neaktivnost, genetsku predispoziciju, rane razvojne (intrauterine) okolnosti te bolesti gušterače (7,25,34,36-43). Patofiziologija ŠB kreće od genetski predisponiranosti beta stance (oslabljena osjetljivost na glikemiju, oštećeni sintetski i transportni putevi inzulina, poremećaji u GLUT transporterima (engl. Glucose transporters)), koja uslijed izloženosti štetnim čimbenicima (prekomjernoj nutritivnoj opskrbi, oksidativnom stresu, inzulinskoj rezistenciji, upali, glukotoksičnosti, lipotoksičnosti i imunološkim zbivanjima) postepeno gubi svoju funkciju (7,26,27,44-46). Organi primarno uključeni u patofiziologiju ŠB su masno tkivo, jetra, gušterača, mišići, bubrezi, mozak, crijeva (49-55). ŠB, sukladno svojoj kompleksnosti, u slučaju neadekvatne regulacije i liječenja sa sobom nosi značajne zdravstvene rizike i posljedice. To su prvenstveno kardiovaskularne komplikacije, a potom i neurološke, nefrološke, oftalmološke, gastrointestinalne, osteomuskularne, infektološke, psihijatrijske i onkološke. U njihovoj podlozi leže kronična hiperglikemija i hiperinzulinemija uslijed kojih dolazi do povećane proizvodnje slobodnih radikala te smanjenog antioksidativnog potencijala, a oksidativni stres potom okida patološke stanične i

međustanične mehanizme. Tako nastaje sistemski suvišak proupalnih citokina, slobodnih radikala i produkata nadproducirane glikozilacije, što potiče razvoj kroničnih komplikacija (56). Kronične se komplikacije razvijaju sporo i asimptomatski te dovode do progresivnih i ireverzibilnih oštećenja koja mogu rezultirati i potpunim gubitkom funkcije zahvaćenih tkiva i organa.

Zajednička poveznica pretilosti, metaboličkog sindroma, šećerne bolesti tip 2 jest inzulinska rezistencija, kao ključna karika u lancu metaboličkih poremećaja, odnosno okidač patoloških metaboličkih kaskada koje dovode do razvoja bolesti, komplikacija i povećane smrtnosti. Inzulinska rezistencija se definira kao smanjena osjetljivost tkiva (dominantno skeletnih mišića, jetre i masnog tkiva) na djelovanje uobičajene razine inzulina (endogenog ili egzogenog), što rezultira smanjenom apsorpcijom i iskoristivosti glukoze u mišićima, neadekvatnom supresijom glukoneogeneze u jetri te poremećenom lipolizom (57). Sva stanja koja narušavaju ravnotežu nutrijenata te ometaju anaboličko i metaboličko djelovanje inzulina (narušavajući ulazak glukoze u stanice, sintezu proteina i glikogena te skladištenje i sintezu lipida), predisponirajuć su čimbenik za za nastanak inzulinske rezistencije. Pritom se ističu genetska predispozicija (oštećenje gena uključenih u transport i djelovanje inzulina, u regulaciju adipokina i imunoloških procesa uključenih u metainflamaciju, antioksidativne procese, metabolizam makronutrijenata te sklonost nakupljanju visceralne masti), poremećen metabolizam lipida, intrauterine disrupcije (prvestveno malnutricija, majčina tjelesna neaktivnost tijekom trudnoće, izloženost stresu i pušenje), izloženost štetnim okolišnim agensima i starenje (38,39,58-63). Starenjem se usporavaju metabolički procesi te dolazi do miocelularne steatoze, propadanja mišićne mase i opadanja antioksidativnog kapaciteta (57,64). Temelji patološke metaboličko-imunološke kaskade koja dovodi do inzulinske rezistencije leže u pretilosti, a ključni nosioci patofizioloških procesa su masno tkivo, jetra i skeletni mišići, slika 1.



Slika 1. Simplificirani prikaz patofiziologije inzulinske rezistencije: iz hipertrofičnog masnog tkiva pojačano se oslobađaju slobodne masne kiseline (FFA). U jetri FFA intenziviraju prizvodnju glukoze (glukonegeneza), tiglicerida i lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL), s posljedičnim sniženjem lipoproteina visoke gustoće (HDL) i povećanjem lipoproteina niske gustoće (LDL). U mišićima FFA inhibiraju iskorištavanje glukoze. Hiperglikemija i povećana razina FFA dovode do hiperinzulinemije koja potiče reapsorpciju natrija te dovodi do hipertenzije. Osim FFA, iz hipertrofičnog masnog tkiva (adipocita i proinflamatornih makrofaga) se pojačano luče i upalni medijatori poput TNF-α i interleukina-6. Oni uzrokuju još intenzivniju lipolizu, jetrenu glukoneogenezu, proizvodnju VLDL, jačanje mišićne inzulinske rezistencije te prekomjernu proizvodnje pro-trombotičkih faktora (fibrinogena i plazminogen aktivator inhibitora-1 (PAI-1)). U metaboličkom sindromu smanjena je i proizvodnja protuupalnog i inzulin-senzitizirajućeg cirokina adiponektina, što dodatno doprinosi inzulinskoj rezistenciji (65).

2.1.2. Prevencija pretilosti, metaboličkog sindroma i šećerne bolesti tip 2 te uloga FAHFA

Budući da su kardiovaskularni incidenti (srčani i moždani udar, srčano zatajenje, maligne aritmije) vodeći uzrok smrtnosti u svijetu i da je velik dio komplikacija metaboličkih disbalansa moguće spriječiti pravovremenim otkrivanjem i adekvatnim terapijskim pristupom, važno je pronaći što više strategija za njihovu korekciju. Značajni istraživački napori se ulažu u pronalazak što prikladnijih alata za rano otkrivanje metaboličkih disbalansa, u razvoj što sofisticiranijih farmakoloških pripravaka koji utječu na ključne sastavnice poput inflamacije, hiperglikemije, dislipidemije, hipertenzije i narušenog inzulinskog signalnog puta te u razvoj što pristupačnijih pomagala za redovitu samokontrolu glikemije. Također, sve je značajnija interdisciplinarna suradnja nutricionista, kineziologa, fizioterapeuta, genetičara i liječnika kako bi se zajedničkim pristupom omogućila sveobuhvatna skrb za metaboličkog bolesnika (66,67). Pritom se kao ključno ističe provođenje korekcije prehrambenih navika, intenziviranje redovite tjelesne aktivnosti te minimiziranje izloženosti stresu.

Redovitom tjelesnom aktivnosti postižu se višestruki benefiti, a dokazano je kako tjelovježba može odgoditi i ponekad u potpunosti prevenirati razvoj metaboličkih i kroničnih bolesti (68). Štoviše, redovita tjelesna aktivnost u vidu dugoročnih programa vježbanja, pokazala se superiornom samim farmakološkim mjerama u liječenju metaboličkih bolesti i ŠB (69). U osoba s metaboličkim sindromom kod kojih je prisutna inzulinska rezistencija, mišićna aktivnost potiče unos glukoze iz krvi u skeletne mišiće intenzivirajući translokaciju GLUT4 transportera iz citoplazme na staničnu membranu (70). Redovitom tjelovježbom, a pogotovo onom višeg intenziteta, povrh pozitivnih metaboličkih učinaka postiže se i gubitak tjelesne mase, što je dodatan čimbenik važan za postizanje metaboličke kontrole i liječenja inzulinske rezistencije (71).

Kolika je važnost prehrane, odnosno njezine modifikacije u liječenju osoba s metaboličkim sindromom i (pre)dijabetesom, govori rastući broj prehrambenih planova i smjernica, intenzivna znanstveno-istraživačka aktivnost na području nutricionizma, nutrigenomike i nutrigenetike te inkorporiranje nutricionizma u svakodnevnu kliničku praksu. Tijekom posljednjih desetljeća istraživanja su pokazala kako je za održavanje zdravlja i minimiziranje morbiditeta pored količine i omjera nutrijenata važan i njihov izvor te način

pripreme hrane. Preporuča se dnevni energetski unos od 30-35 kcal/kg za normouhranjene osobe te 20-30 kcal/kg za pretile. Od ukupnog dnevnog unosa 10-20% bi trebali biti proteini, 30% masti, te 50-65% ugljikohidrati, uz visok unos prehrambenih vlakana (20-35 grama dnevno). Unos alkoholnih pića trebalo bi ograničiti na 1-2 dnevno (žene ≤1, muškarci ≤2), a unos soli na 2400-3000 mg dnevno (72). Također, pokazalo se kako je osim makronutrijenata, važan i svakodnevni unos vitamina, minerala i fitonutrijenata. Veliki znanstveni interes zadobilo je nekoliko obrazaca prehrane (Mediteranska dijeta, Okinawa dijeta) koji kombinacijom nutrijenata postižu kako metaboličke benefite tako i protuupalno djelovanje koje je vrlo važno u kroničnim bolestima poput metaboličkog sindroma i ŠBT2 (73).

S obzirom na globalnu epidemiju pretilosti, metaboličkog sindroma i ŠB, kojima zajednička patofiziologija leži u kroničnoj upali (metainflamaciji), sve se veći broj istraživanja bavi otkrivanjem nutrijenata s protuupalnim djelovanjem. Rezultat znanstvenih istraživanja je i tzv. protuupalna dijeta koja preporuča visok svakodnevni unos voća, povrća, ribe bogate omega-3 masnim kiselinama, maslinovog ulja, biljaka s visokim sadržajem povoljnih fitonutrijenata, začina te po potrebi suplemenata s visokim sadržajem vitamina i antioksidansa (73,74), tablica 1.

Tablica 1. Usporedba dijeta, odnosno stilova prehrane (75).

Prehrana	**Standardna Američka**	**Mediteranska**	**Okinawa**	**Protu-upalna**
voće i povrće	oskudan unos povrća	visok unos voća i povrća	visok unos povrća: žuto-narančastog korjenastog i lisnatog zelenog	visok unos povrća: raznobojnog i raznorodnog za što veći unos fitonutrijenata
izvor proteina	crveno meso mliječni proizvodi	riba leguminoze orašasti plodovi	soja-što veći unos riba-vrlo mali unos meso-u potpunosti izbjegavati	pretežno biljnog porijekla: soja, leguminoze, orašasti plodovi sjemenke masna riba meso-krto, nemasno, što manje
ugljikohidrati	rafinirani šećer visoko-fruktozni kukuruzni sirup oskudno žitarice	cjelovite žitarice	male količine riže i tjestenine minimalan unos rafiniranih šećera	male količine cjelovitih žitarica obilan unos vlakana bez rafiniranih šećera
mliječni proizvodi	sa visokim udjelom masti	sa niskim udjelom masti	što manji unos	
masnoće	čvrste masti poput maslaca i vrhnja	maslinovo ulje	što manji unos	maslinovo ulje
ostale karakteristike	gazirani sokovi, zaslađena pića	umjeren unos vina	umjeren unos alkohola zeleni čaj juhe s temeljcem	puno začina: kurkuma, češnjak, đumbir protuupalne biljke
kulturološka obilježja	brza hrana prejedanje	velik društveni značaj hrane/obroka	niskokalorična hrana ritualni značaj obroka	misaoni odabir hrane, kvaliteta važnija od kvantitete

Prema postulatima protuupalne dijete, izvor gotovo 2/3 ukupnog dnevnog unosa hrane trebalo bi biti voće, povrće i leguminoze budući da (zahvaljujući visokom udjelu prehrambenih vlakana, polifenola, vitamina i minerala) uz nizak glikemijski indeks ostvaruju snažno protuupalno djelovanje. Životinjske proteine poželjno je zamijeniti onima biljnog porijekla (75). Argument tome protuupalna dijeta dijelom nalazi u činjenici da životinjski proteini odnosno njihovi izvori sadrže veći omjer protupalnih omega-6 u odnosu na protuupalne omega-3 masne kiseline koje su zastupljenije u biljnoj hrani (76) te u istraživanjima koja su pokazala kako zamjena svega 1% životinjskih proteina biljnima može smanjiti rizik od razvoja ŠBT2 i do 18% (77).

Osim što predstavlja optimalan izvor nutrijenata i prehrambenih vlakana, hrana biljnog porijekla osigurava i nizak glikemijski indeks (GI) i glikemijsko opterećenje (GO) obroka. U kontekstu inzulinske rezistecije, metaboličkog sindroma i ŠBT2 glikemijski indeks je svakako jedan od važnijih parametara koji determinira izbor hrane budući da učestala konzumacija hrane visokog GI i GO rezultira kroničnom hiperglikemijom i hiperinzulinemijom te njihovim štetnim posljedicama (75).

Osim općih mjera koje utječu na prevenciju pretilosti kao osnovnog okidača inzulinske rezistencije i ŠBT2, velik interes pobuđuju i farmakološki pripravci koji se upliću u mehanizme upale i stanične signalizacije. Među njima su se u posljednje vrijeme istaknuli blokatori IL-1β (anakinra, canakinumab, diacerein) i IL-6 (tocilizumab), inhibitori NF-κB puta (salicilati, salsalat), specifična antitijela za TNF-α (etanercept, infliximab, adalimumab), aktivatori sirtuina-1, aktivatori AMP-aktivirane protein kinaze, kromoni, FLAP inhibitori (inhibitori leukotrijena), indanoni i indanonski analozi, derivati kalkona (78-82).

Područje metainflamacije, s obzirom na kompleksnost patofizioloških mehanizama, preklapanje imunoloških, genetskih i okolišnih faktora, visok rizik za razvoj kroničnih bolesti i mortaliteta te mogućnost prevencije adekvatnim nutritivnim i farmakološkim mjerama, posljednjih desetljeća sve je aktivnije znanstveno područje.

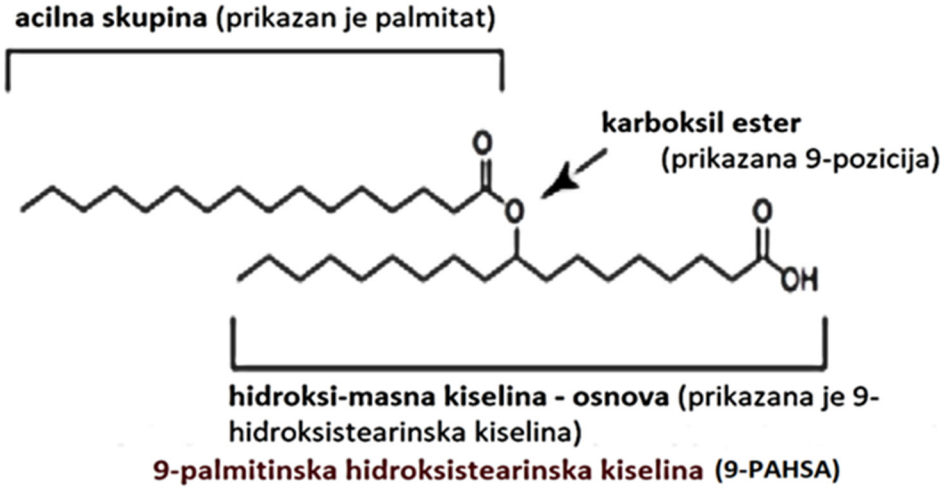
Uz gore navedena saznanja, zanimljiv doprinos području svakako je donio i nedavno otkriven nov razred lipida, hidroksiesteri masnih kiselina (FAHFA, engl. Fatty acid esters of hydroxyl fatty acids), za koji su dosadašnja istraživanja pokazala da ostvaruje protuupalno,

inzulin-senzitizirajuće i hipoglikemizantno djelovanje, predstavljajući tako novu imunometaboličku vezu između masnog tkiva i sistemskog metabolizma (83).

Naredna istraživanja ispitivala su puteve sinteze i razgradnje FAHFA, in vivo, in vitro i in situ učinke, osjetljivije metode detekcije FAHFA u biološkim uzorcima kao i sintezu analoga i njihove učinke. Rastući broj istraživanja i dalje potvrđuje dva glavna učinka: inzulin-senzitizirajuće i protuupalno. Postupno se otkrivaju i nove uloge FAHFA u patofiziološkim procesima (karcinogenezi i autoimunim bolestima) te mogućnost sinteze FAHFA analoga s pojačanim učincima, otpornih na enzimsku razgradnju i podobnih za in vivo aplikaciju.

2.2. Kemijska struktura FAHFA

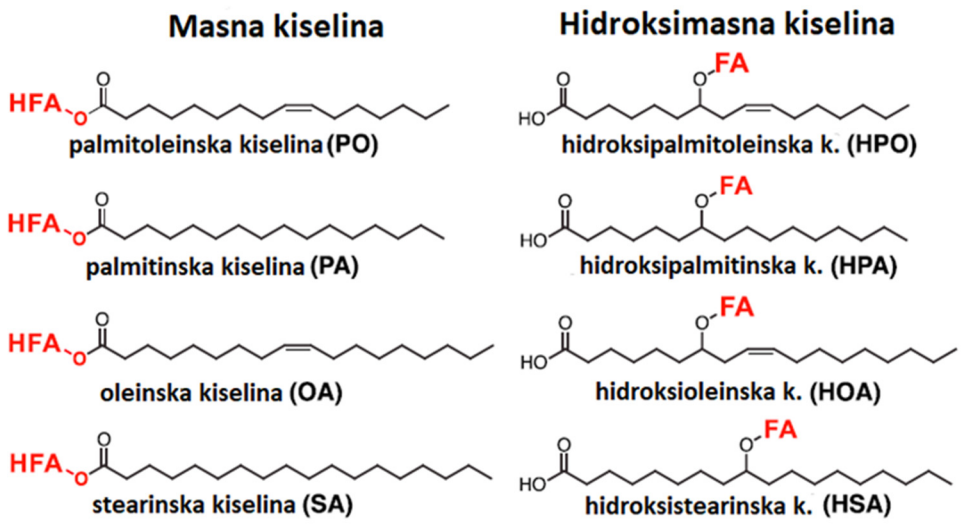
Strukturu FAHFA čini masna kiselina vezana esterskom vezom na hidroksilnu skupinu hidroksimasne kiseline (koja predstavlja stereocentar molekule). Pozicija grananja ugljika, odnosno pozicioniranje esterske veze definira regioizomer (83,84), slika 2.



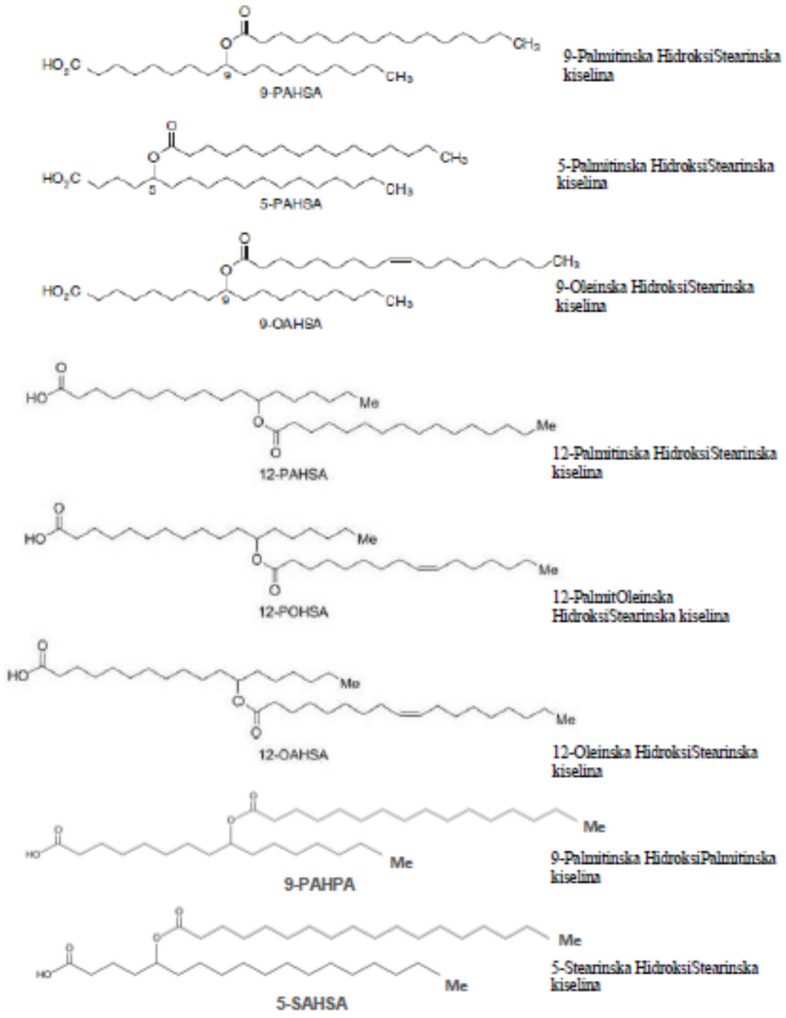
Slika 2. Struktura FAHFA, na primjeru regioizomera 9-PAHSA (83).

U prvom istraživanju, u kojem je otkriven ovaj razred masnih kiselina, definirano je 16 FAHFA razreda, u čiju su strukturu uključene četiri masne kiseline i njihove hidroksi-forme: palmitinska i hidroksipalmitinska kiselina (PA, HPA), stearinska i hidroksistearinska kiselina (SA, HSA), oleinska i hidroksioleinska kiselina (OA, HOA) te palmitoleat i hidroksipalmitoleat (PO, HPO): PalmitOleinska HidroksiPalmitOleinska kiselina (POHPO),

PalmitOleinska HidroksiPalmitinska kiselina (POHPA), Palmitinska HidroksiPalmitOleinska kiselina (PAHPO), Palmitinska HidroksiPalmitinska kiselina (PAHPA), PalmitOleinska HidroksiOleinska kiselina (POHOA), Oleinska HidroksiPalmitOleinska kiselina (OAHPO), Palmitinska HidroksiOleinska kiselina (PAHOA), Oleinska HidroksiPalmitinska kiselina (OAHPA), Palmitoleinska HidroksiStearinska kiselina (POHSA), Palmitinska HidroksiStearinska kiselina (PAHSA), Stearinska HidroksiPalmitinska kiselina (SAHPA), Oleinska HidroksiOleinska kiselina (OAHOA), Oleinska HidroksiStearinska kiselina (OAHSA), Stearinska HidroksiOleinska kiselina (SAHOA), Stearinska HidroksiStearinska kiselina (SAHSA) i Stearinska HidroksiPalmitOleinska kiselina (SAHPO) (83), slika 3, slika 4.



Slika 3. Četiri vrste masnih kiselina i njihovih hidroksiestera u prvotno otkrivenih 16 razreda FAHFA (83).

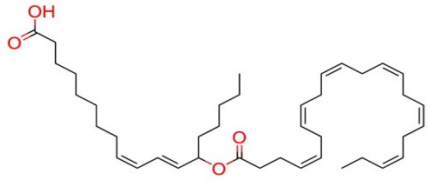


Slika 4. Strukture nekih od najranije otkrivenih FAHFA razreda (85,86, www.caymanchem.com studeni 2019.)

Kasnijim istraživanjima otkriveni su i novi FAHFA razredi i njihovi regioizomeri koji u strukturi sadrže fiziološki relevantne masne kiseline: linolnu (LA), arahidonsku (AA) i dokosaheksaensku (DHA) (87,88). Kombinacijom ovih masnih kiselina nastaje 49 FAHFA razreda, sa otprilike 160 identificiranih regioizomera, tablica 2, slika 5.

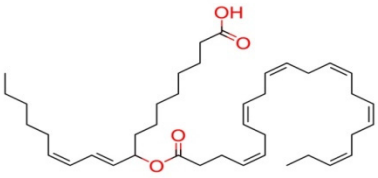
Tablica 2. Neke od sastavnica FAHFA čijom kombinacijom nastaje 49 FAHFA razreda i broj njihovih regioizomera (88).

	HPA	**HPO**	**HSA**	**HOA**	**HLA**	**HAA**	**HDHA**
PA	6	4	8	4	2	1	2
PO	6	4	8	4	2	1	2
SA	4	4	6	4	2	1	2
OA	6	4	6	4	2	1	2
LA	6	4	8	4	2	1	2
AA	6	4	5	4	2	1	2
DHA	4	2	3	4	2	1	2



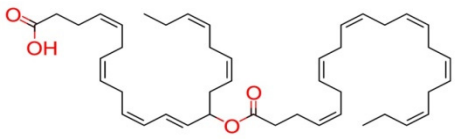
13-DHAHLA

(13-DokosaHeksaenska HidroksiLinolna k.)



9-DHAHLA

(9-Dokosa Heksaenska HidroksiLinolna k.)



14-DHAHDHA

(14-DokosaHeksaenska HidroksiDokosaHeksaenska k.)

Slika 5. Primjeri molekularnih struktura novootkrivenih razreda FAHFA koji u strukturi imaju višestruko nezasićene omega-3 masne kiseline (87).

U najrecentnijem istraživanju koje se bavilo strukturama FAHFA, 2018. godine, identificirano je 50 razreda FAHFA, s ukupno 262 regioizomera, od čega je većina razreda do tada bila potpuno nepoznata. Pritom je 48 razreda FAHFA (229 regioizomera) pronađeno u riži, a 37 razreda FAHFA (173 regioizomera) u talijinom uročnjaku, tablica 3.

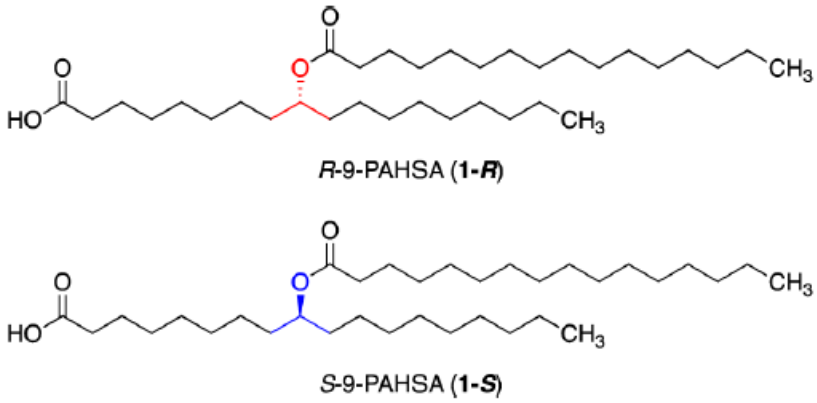
Tablica 3. FAHFA razredi identificirani u riži i talijinom uročnjaku (89).

FAHFA razred	Puni naziv	Izvor	
		riža	Talijin uročnjak
MAHMA	Miristinska HidroksiMiristinska kiselina	*	*
MOHMA	MiristOleinska HidroksiMiristinska kiselina	*	
PDAHMA	PentaDekanoična HidroksiMiristinska kiselina	*	
PDEAHMA	PentaDecEnoična HidroksiMiristinska kiselina	*	*
PAHMA	Palmitinska HidroksiMiristinska kiselina	*	*
POHMA	PalmitOleinska HidroksiMiristinska kiselina	*	*
SAHMA	Stearinska HidroksiMiristinska kiselina	*	*
MAHPA	Miristinska HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
MOHPA	MiristOleinska HidroksiPalmitinska kiselina	*	
PDAHPA	PentaDekanoična HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
PDEAHPA	PentaDecEnoična HidroksiPalmitinska kiselina		*
HDAHPA	HeptaDekanoična HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
PAHPA	Palmitinska HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
POHPA	PalmitOleinska HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
SAHPA	Stearinska HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
OAHPA	Oleinska HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
LAHPA	Linolna HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
ALAHPA	Alfa-Linolenska HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
AAHPA	Arahidonska HidroksiPalmitinska kiselina	*	*
MAHSA	Miristinska HidroksiStearinska kiselina	*	*
PAHSA	Palmitinska HidroksiStearinska kiselina	*	*
POHSA	PalmitOleinska HidroksiStearinska kiselina	*	
PDAHSA	PentaDekanoična HidroksiStearinska kiselina	*	*
HDAHSA	HeptaDekanoična HidroksiStearinska kiselina	*	
SAHSA	Stearinska HidroksiStearinska kiselina	*	*
OAHSA	Oleinska HidroksiStearinska kiselina	*	*
LAHSA	Linolna HidroksiStearinska kiselina	*	*
ALAHSA	Alfa-Linolenska HidroksiStearinska kiselina		*
AAHSA	Arahidonska HidroksiStearinska kiselina	*	*
MAHAA	Miristinska HidroksiArahidonska kiselina	*	
PAHAA	Palmitinska HidroksiArahidonska kiselina	*	*
SAHAA	Stearinska HidroksiArahidonska kiselina	*	
OAHAA	Oleinska HidroksiArahidonska kiselina	*	*
LAHAA	Linolna HidroksiArahidonska kiselina	*	
AAHAA	Alfa-Linolenska HidroksiArahidonska kiselina	*	*
PAHDDA	Palmitinska HidroksiDoDekanoična kiselina	*	
PDAHDA	PentaDekanoična HidroksiDekanoična kiselina	*	*
PAHDA	Palmitinska HidroksiDekanoična kiselina	*	*
HDAHDA	HeptaDekanoična HidroksiDekanoična kiselina	*	*
SAHDA	Stearinska HidroksiDekanoična kiselina	*	
PDAHCA	PentaDekanoična HidroksiKaprilična kiselina	*	
PAHCA	Palmitinska HidroksiKaprilična kiselina	*	*
HDAHCA	HeptaDekanoična HidroksiKaprilična kiselina	*	
SAHCA	Stearinska HidroksiKaprilična kiselina	*	
PDAHHA	PentaDekanoična HidroksiHeksanoična kiselina	*	*
PAHHA	Palmitinska HidroksiHeksanoična kiselina	*	*
HDAHHA	HeptaDekanoična HidroksiHeksanoična kiselina	*	*
SAHHA	Stearinska HidroksiHeksanoična kiselina	*	*
NAHHA	Nonadekanoična HidroksiHeksanoična kiselina	*	*
AAHHA	Arahidonska HidroksiHeksanoična kiselina	*	*

Svaki razred FAHFA ima nekoliko regioizomera (definiranih pozicijama esterskih veza) koji se međusobno razlikuju i prema metaboličkoj regulaciji i prema biološkim učincima. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da su od sastavnica FAHFA najzastupljenije oleinska (OA, C18:1 n-9) i palmitinska kiselina (PA, C16:0 n-9) te palmitoleat (PO, C16:1 n-7). Kao hidroksi-podjedinice se najčešće susreću zasićene C18 i C16 kiseline, odnosno

hidroksistearinska (HSA) i hidroksipalmitinska (HPA) kiselina (90). Općenito su, u do sada ispitivanim biološkim uzorcima, najzastupljeniji FAHFA razredi PAHSA i OAHSA (83,87,91).

Najnovija su istraživanja pokazala kako svaki regioizomer ima svoje stereoizomere, od kojih je uvijek jedan dominantan. Na primjeru PAHSA (prvotno nađene u masnom tkivu transgeničnih miševa) pokazalo se kako je predominantan izomer R-9-PAHSA (92), slika 6.



Slika 6. FAHFA stereoizomeri, na primjeru 9-PAHSA (92).

2.3. Biološka pojavnost FAHFA

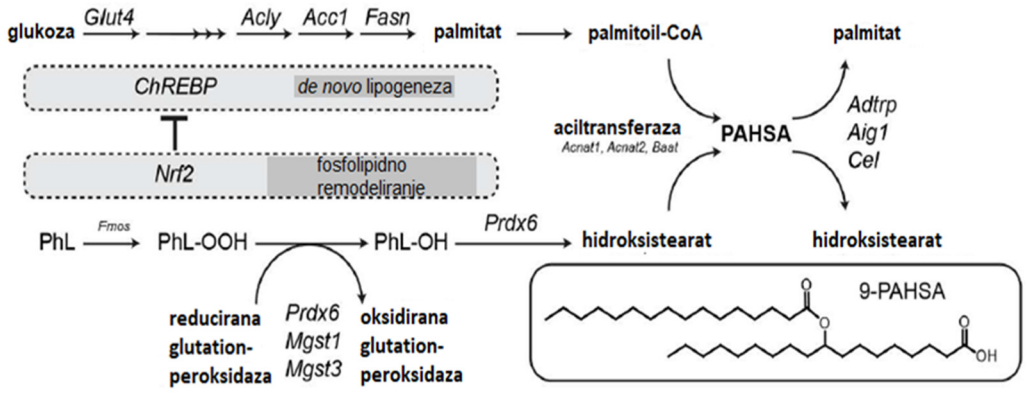
FAHFA su otkrivene lipidomičkim analizama masnog tkiva dobivenog iz miševa soja AGOX (83), a to su transgenični miševi koji pojačano sintetiziraju i ispoljavaju GLUT4 transporter u adipocitima s posljedično povećanom de novo lipogenezom i stvaranjem metabolički povoljnih lipokina. Zahvaljujući tome, usprkos činjenici da su pretili, ti miševi imaju veću osjetljivost na inzulin, nižu bazalnu glikemiju i bolju toleranciju glukoze u odnosu na divlji soj miša (93). Uslijedila su istraživanja koja se dominantno fokusiraju na detekciju, diferencijaciju i kvantifikaciju endogenih FAHFA te otkrivanje njihovih učinaka, puteva sinteze i razgradnje, kao i faktora koji utječu na njihovu pojavnost i distribuciju. No, uz činjenicu da su FAHFA endogeni lipidi, dokazano je da se u različitim količinama i regioizomerima nalaze u i hrani te da se njihovom suplementacijom postiže antidijabetičko i protuupalno djelovanje (83,91).

2.3.1. FAHFA kao endogeni lipid u sisavaca

2.3.1.1. Biokemijski putevi sinteze endogenih FAHFA

FAHFA se u tkivima sisavaca sintetiziraju de novo, iz masnih kiselina i njihovih hidroksi-oblika kao prekursora, bilo endogenih, bilo unesenih hranom ili parenteralnim putem (83). Proces transfera masne kiseline na hidroksi-oblik druge masne kiseline uvjetovan je aktivnošću odnosno djelovanjem enzima iz skupine lipidnih aciltransferaza (94,95). Enzimski posredovana sinteza stereospecifičnošću dovodi do nastanka enantiomera FAHFA, čije su distribucija, regulacija i učinci predmet aktualnih istraživanja (92).

Ključni faktor u indukciji gena za regulaciju enzima uključenih u FAHFA sintezu jest transkripcijski faktor ChREBP (engl. Carbohydrate-responsive element-binding protein) koji biva aktiviran ulaskom jednostavnih ugljikohidrata u stanicu putem GLUT4 transportera (88,96,97). Pod utjecajem ChREBP aktiviraju se stanične liaze, karboksilaze i sintaze koje osiguravaju nastanak masne kiseline koja će aciltransferazom biti esterificirana na hidroksi-masnu kiselinu prethodno nastalu iz membranskih fosfolipida procesima oksidacije i peroksidacije, slika 7. Osim sinteze FAHFA i lipogeneze općenito, ChRBP regulira i glikolizu te pentoza-fosfatni put (98).



Acly - ATP citratna liaza; Acc1 - acetil-CoA karboksilaza; Fasn – sintetaza masnih kiselina; AIG1 – androgenima induciran gen1 protein; ADTRP – androgen-ovisan protein koji regulira TFPI; Cel – karboksil-ester lipaza; Nrf-2 – jezgreni transkripcijski faktor; ChREBP – element-vežući protein (transkripcijski faktor) aktiviran ugljikohidratima; PhL – (membranski) fosfolipidi; PhL-OOH – fosfolipidni hidroperoksid; PhL-OH – fosfolipid sa hidroksi-masnom kiselinom; Prdx6 – gen koji kodira antioksidativni enzim peroksiredoksin-6; mgst1, mgst3 – geni koji kodiraju enzime mikrosomalna glutation-transferaza 1 i 3

Slika 7. Predloženi put sinteze FAHFA (na primjeru PAHSA) de novo lipogenezom (88).

Sinteza FAHFA odvija se u adipocitima, dominantno u bijelom masnom tkivu (88). Aktivnost ChREBP i lipogenih enzima uključenih u njihovu sintezu snažno korelira sa

osjetljivošću na inzulin (99,100). Smanjena ekspresija ChREBP ima značajnu ulogu u razvoju inzulinske rezistencije pa se u pojedinaca s inzulinskom rezistencijom nalaze višestruko smanjene razine FAHFA, uslijed oslabljene de novo lipogeneze (83,101). Do spoznaje o važnosti ChREBP za optimalnu de novo lipogenezu te homeostazu glukoze i inzulina dovela su istraživanja na životinjskim modelima u kojih je delecija ChREBP dovela do smanjene GLUT4 translokacije i funkcije, smanjenog ulaska glukoze u stanicu, hiperglikemije, smanjene lipogeneze i sinteze FAHFA, stanja upale (s povećanim brojem i aktivnošću proupalnih makrofaga te proupalnih citokina TNF-alfa i IL-1beta) te sistemske inzulinske rezistencije (dokazane u mišićima, jetri i masnom tkivu), kako u pretilih tako i u normouhranjenih jedinki (99-102).

2.3.1.2. Vrste endogenih FAHFA

Dosadašnja istraživanja na mišjem, štakorskom i humanom modelu pokazala su prisutnost brojnih razreda FAHFA u serumu, majčinom mlijeku, bijelom i smeđem masnom tkivu, jetri, srcu, gušterači, bubrezima, plućima i timusu (83,87,103-105).

U uzorcima seruma (u ljudi i glodavaca) su pronađeni slijedeći razredi FAHFA (83,84): POHPO, POHPA, PAHPO, PAHPA, POHOA, OAHPO, PAHOA, OAHPA, POHSA, PAHSA, SAHPA, OAHOA, OAHSA, SAHOA, SAHSA, SAHPO, DokosaHeksaenska HidroksiLinolna kiselina (izomeri 9- i 13-DHAHLA), DokosaHeksaenska HidroksiDokosaHeksaenska kiselina (DHAHDHA), Linolna HidroksiDokosaHeksaenska kiselina (LAHDHA), DokosaHeksaenska HidroksiStearinska kiselina (DHAHSA) i Oleinska HidroksiDokosaHeksaenska kiselina (OAHDHA). POHPO, POHPA, PAHPO, PAHPA, POHOA, OAHPO, PAHOA, OAHPA, POHSA, PAHSA, SAHPA, OAHOA, OAHSA, SAHOA, SAHSA i SAHPO u serumu su prisutne u nanomolnim razinama (83), dok su ostale poznate FAHFA prisutne u pikomolnim razinama, poput DHA-deriviranih dokosanoida protektina i rezolvina (84).

Najnovije istraživanje (na mišjem modelu) objavljeno u lipnju 2019.g. identificiralo je još jedan endogeni izvor FAHFA, trigliceride koji sadrže FAHFA (FAHFA-TG), u kojima FAHFA predstavljaju jednu od tri acilne skupine esterificirane na glicerolnu osnovicu. Budući da se lipolizom u adipocitima oslobađaju značajne količine neesterificiranih FAHFA, te da su

detektirane razine FAHFA-TG sto puta više od neesterificiranih oblika, zaključeno je kako su FAHFA-TG glavni izvor staničnih i tkivnih FAHFA. Pritom regioizomeri pokazuju drukčiju zastupljenost nego u do sada analiziranim tkivima, u kojima je 9-PAHSA dominantan izomer. Ovo je, naime, istraživanje pokazalo kako su u FAHFA-TG najzastupljenije 10-PAHSA i 10-OAHSA (106).

2.3.1.3. Metabolička regulacija endogenih FAHFA

Na razine endogenih FAHFA utječu fiziološke i patofiziološke okolnosti kao što su aktualna prehrana, stupanj uhranjenosti, pretilost i inzulinska rezistencija, pri čemu su izražena i njihova tkivna specifičnost te regioizomerne razlike.

Tako se, primjerice, razina PAHSA povećava u gladovanju, a spušta se odmah nakon hranjenja. Takav porast PAHSA prisutan je samo u subkutanom i perigonadalnom masnom tkivu, dok u smeđem masnom tkivu i jetri razina PAHSA ostaje nepromijenjena, a u serumu razina određenih izomera čak i opada (83).

Koliki je utjecaj aktualne prehrane na FAHFA status u organizmu, pokazala je studija iz 2016.godine koja je otkrila prisutnost DHA- i LA- FAHFA u serumu i bijelom masnom tkivu ispitanika koji su prethodno dobivali suplementaciju omega-3 PUFA. Studija provedena na pretilim osobama sa ŠBT2 te na miševima pokazala je kako uslijed peroralne primjene DHA i EPA dolazi do povećane sinteze specifičnih FAHFA razreda (DHAHLA, DHAHDHA) u masnom tkivu te njihovog otpuštanja u cirkulaciju. U pojedinaca koji nisu dobivali EPA i DHA navedene FAHFA nisu pronađene. Razina DHA-FAHFA u serumu suplementiranih pojedinaca bila je podjednaka razini DHA-deriviranih rezolvina i protektina (87).

Razine FAHFA pokazuju snažnu međuovisnost sa stupnjem inzulinske rezistencije: u inzulin-osjetljivih jedinki (AGOX miševi), u bijelom masnom tkivu razina PAHSA povišena je 16-18 puta, u smeđem masnom tkivu 3 puta, a u serumu 2 puta u odnosu na miševe sa smanjenom inzulinskom osjetljivošću. U osoba s inzulinskom rezistencijom serumska razina PAHSA snižena je za 45-55%, a razina u bijelom masnom tkivu i do 73% u odnosu na osobe

s urednom inzulinskom osjetljivošću (83). Pritom je izomer 5-PAHSA pokazao najveću podložnost regulaciji, budući da se njegova razina koja je do 80% niža u jedinki hranjenih visokomasnom prehranom (u odnosu na uobičajenu), nakon oralne primjene 5-PAHSA peterostruko povisuje, što indicira i dobru apsorpciju PAHSA unesenih oralnim putem (83).

Kako funkcija masnog tkiva utječe na FAHFA status, pokazalo je istraživanje iz 2018. godine koje je ispitivalo međuovisnost veličine adipocita, ekspresiju GLUT4, razinu PAHSA i stupanj inzulinske rezistencije. Zaključeno je da hipertrofija adipocita (kao mjera disfunkcije masnog tkiva) s niskom ekspresijom GLUT4 transportera, adiponektina i lipogenih enzima korelira s niskom sistemskom razinom PAHSA te pogoduje razvoju inzulinske rezistencije i ŠBT2 (107). Istraživanje provedeno 2016. godine na kardiovaskularnim bolesnicima sa različitim razinama glikemije (normoglikemija, predijabetes i ŠBT2) i različitim indeksima tjelesne mase pokazalo je različitu regioizomernu regulaciju: razina POHPO bila je viša u osoba sa predijabetesom u odnosu na normoglikemične, a razina PAHPA bila je značajno viša u onih sa ŠBT2 nego sa predijabetesom. Razina POHPA bila je značajno snižena u pretilih osoba u odnosu na one s normalnim indeksom tjelesne mase.

Da patofiziološka zbivanja u organizmu negativno utječu na razinu FAHFA, potvrdilo je i istraživanje iz 2017. godine koje je pokazalo kako je serumska razina 13- i 9-PAHSA te 13- i 12-SAHSA značajno snižena u bolesnica s karcinomom dojki, u odnosu na zdrave žene (104). Također, dokazano je kako hipertrofija masnog tkiva i pretilost dovode do smanjenja razine PAHSA u kolostrumu (105).

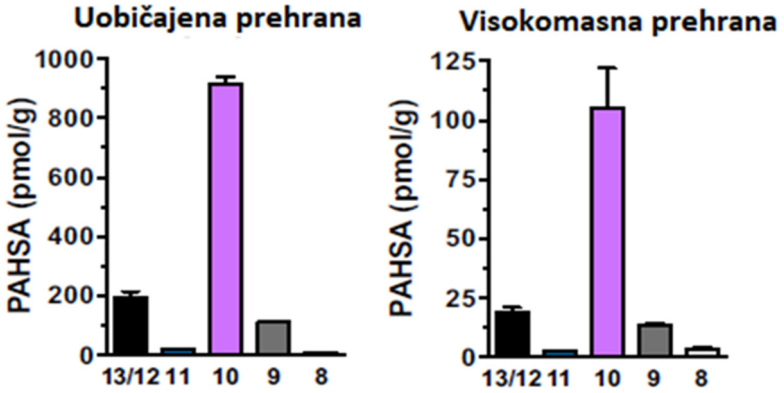
2.3.2. FAHFA kao egzogeni lipid

Premda se većina publiciranih istraživanja fokusirala na endogene FAHFA (njihovu detekciju, diferencijaciju i kvantifikaciju, učinke, puteva sinteze i razgradnje te faktore koji utječu na njihovu pojavnost i distribuciju), nekoliko radova donosi informacije i o FAHFA unesenim enteralnim ili parenteralnim putem, kroz hranu ili sintetizirane analoge (83).

2.3.2.1. FAHFA kao lipid u hrani biljnoga i životinjskoga podrijetla

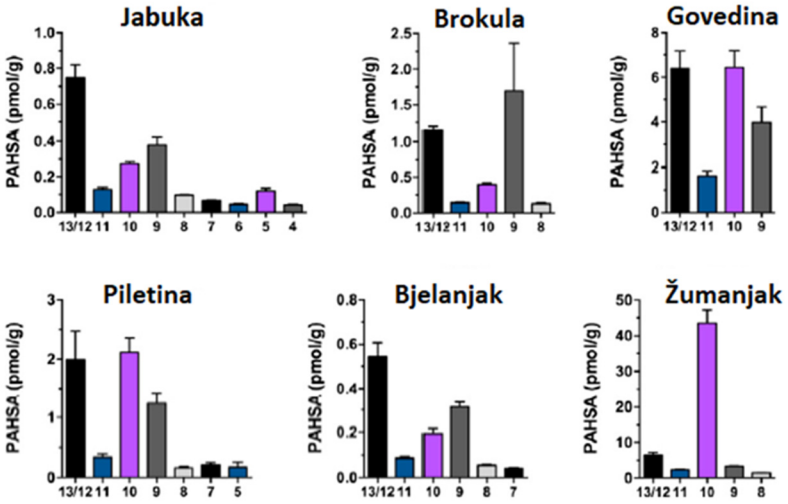
Sadržaj FAHFA, od njihovog otkrića krajem 2014. godine, u hrani je analiziran do sada u pet istraživanja (83,89,91,108,109).

Prvo istraživanje, koje je ujedno i otkrilo postojanje FAHFA kao novog lipidnog razreda, analiziralo je FAHFA sastav u hrani za laboratorijske životinje (uobičajenoj mišjoj hrani te visokomasnoj prehrani) te u pet namirnica ljudske prehrane: jabuci, brokuli, jajetu, govedini i piletini. Analiza životinjske hrane pokazala je prisutnost izomera 13/12-, 11-, 10-, 9- i 8-PAHSA, pri čemu je 10-PAHSA bila najzastupljenija. Razine detektiranih izomera bile su do deseterosktruko niže u visokomasnoj prehrani u odnosu na uobičajenu mišju hranu, slika 8, (83).



Slika 8. Kvantifikacija PAHSA izomera u hrani ispitivanih miševa hranjenih uobičajenom vs visokomasnom prehranom (83).

Namirnice iz ljudske prehrane također su pokazale različitu distribuciju i zastupljenost FAHFA izomera (ispitivan je samo PAHSA razred). Rezultati upućuju na značajno najvišu sveukupnu razinu PAHSA u žumanjku jajeta, dok je broj detektiranih PAHSA regioizomera bio najviši u jabuci, slika 9, (83).



Slika 9. Zastupljenost PAHSA u pet namirnica ljudske prehrane (83).

Nedugo potom objavljeno je istraživanje u kojem je u svrhu testiranja nove in silico FAHFA baze podataka analiziran žumanjak jajeta, kao prethodno verificiran najbogatiji poznati izvor FAHFA u namirnicama podvrgnutim analizi. Rezultati tog istraživanja otkrili su, uz poznati PAHSA razred, još šest novih razreda FAHFA, od kojih četiri razreda od ranije uopće nisu bila poznata (Oleinska Hidroksi Linolna kiselina - OAHLA, Linolna Hidroksi Oleinska kiselina - LAHOA, Linolna Hidroksi Linolna kiselina - LAHLA i Alfa-Linolenska Hidroksi Oleinska kiselina - ALAHOA), tablica 4, (91).

Tablica 4. Razredi FAHFA pronađeni u žumanjku jajeta (91).

Naziv	Kratica	RT (min)	m/z
16:0-(O-18:1)	PAHOA	5.61	535.471
18:1-(O-18:1)	OAHOA	5.61	561.485
18:1-(O-18:2)	OAHLA	5.42	559.469
18:2-(O-18:1)	LAHOA	5.08	559.469
18:2-(O-18:2)	LAHLA	4.87	557.454
18:3-(O-18:1)	ALAHOA	4.67	557.454

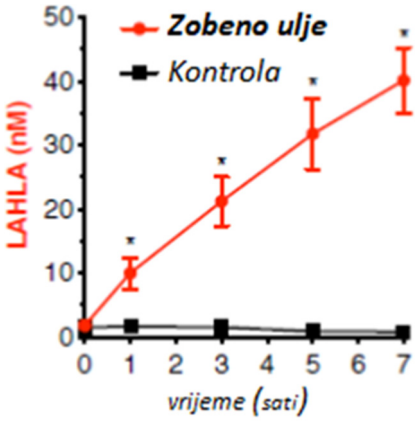
RT – retencijsko vrijeme

2018. godine je provedeno istraživanje na riži i talijinom uročnjaku, čije su analize opisale čak 50 razreda FAHFA te njihova 262 regioizomera (48 razreda sa 229 regioizomera u riži i 37 razreda sa 173 regioizomera u talijinom uročnjaku). Od opisanih razreda, većina je bila od ranije napoznata: MAHMA, MOHMA, PDAHMA, PDEAHMA, POHMA, PAHMA, SAHMA, MAHPA, MOHPA, PDAHPA, HDAHPA, ALAHPA, MAHSA, PDAHSA, HDAHSA, MAHAA, PAHDDA, PDAHDA, PAHDA, HDAHDA, SAHDA, PDAHCA, PAHCA, HDAHCA, SAHCA, PDAHHA, PAHHA, HDAHHA, SAHHA, NAHHA, AAHHA, PDEAHPA, ALAHSA, LAHPA, AAHPA, LAHSA, AAHSA, PAHAA, SAHAA, OAHAA, LAHAA i AAHAA (89).

Tijekom 2019. godine objavljena su još dva istraživanja u kojima su provedene analize FAHFA u sastavnicama ljudske prehrane (108,109).

Prvo istraživanje, na mesu i rogovima kanadskog soba i losa, pokazalo je kako su u mesu i bazama rogova zastupljeniji FAHFA razredi koji sadržavaju višestruko nezasićene masne kiseline, dok su u vrhovima rogova zastupljenije FAHFA sa zasićenim kiselinama (dominantno 9-PAHSA). Pritom je ukupna razina FAHFA značajno viša u rogovima nego u mesu. Analizom je otkriveno i nekoliko od ranije nepoznatih FAHFA razreda, poput hidroksiestera pentadekanoične, eikosatrienoične, dokosatetraenoične ili adrenične, dokosapentanoične, dokosatrienoične i eikosadienoične kiseline (108).

Autori drugog istraživanja, objavljenog krajem svibnja 2019. godine, za FAHFA analizu odabrali su ulje zobi, vodeći se ranijim spoznajama o pozitivnim metaboličkim i protuupalnim učincima zobi. Istraživanje je pokazalo kako je najzastupljeniji FAHFA razred u zobenom ulju LAHLA, s koncentracijom od približno 300 pmol/mg, te uz prisutna tri regioizomera: 15-, 13- i 9-LAHLA. Prvi slijedeći razredi su PAHSA i OAHSA, u daleko nižim koncentracijama od približno 1 pmol/mg. Istraživanje je pokazalo i kako peroralni unos zobenog ulja značajno povisuje razinu LAHLA u serumu (istraživanje je provedeno na ljudima), slika 10, (109).



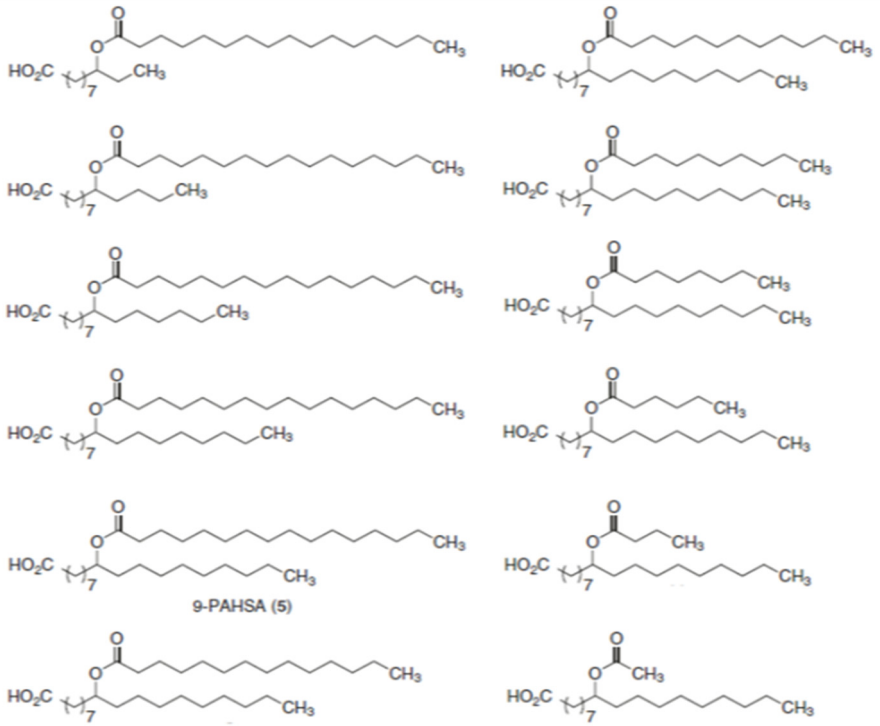
Slika 10. Reperkusija unosa zobenog ulja na razinu serumske LAHLA (109).

2.3.2.2. Kemijski sintetizirane FAHFA i njihovi analozi

Od otkrića FAHFA kao nove vrste lipida, u svrhu istraživanja njihovih bioloških učinaka, puteva sinteze i razgradnje te distribucije u organizmima, sintetizirano je nekoliko razreda i regioizomera (13-PAHSA, 12-PAHSA, 10-PAHSA, 9-PAHSA, 5-PAHSA, 13-

OAHSA, 12-OAHSA, 10-OAHSA, 9-OAHSA, 5-OAHSA, 13-SAHSA, 12-SAHSA, 10-SAHSA, 9-SAHSA, 5-SAHSA, 13-POHSA, 12-POHSA,10-POHSA, 9-POHSA, 5-POHSA, 5-OAHPA,7-OAHPA, 9-OAHPA,OAHPA, 7-OAHSA, 5-PAHPA,7-PAHPA,9-PAHPA, 13-DHAHLA, 12-DHAHOA, 9-MAHSA, 9-PDAHSA, 9-PAHMA,10-HDAHSA, 7-PDAHSA, 13-LAHLA) koji se u analizama na humanim uzorcima koriste kao standardi, a u istraživanjima na životinjama i kao egzogeni, odnosno nutritivni izvor (83,87-89,103-109).

U travnju 2019. godine objavljeno je istraživanje koje se bavilo sintezom FAHFA analoga i ispitivanjem njihovog djelovanja. Kemijski je sintetizirano je 11 analoga 9-PAHSA (slika 11.), te je ispitivano njihovo protuupalno djelovanje. Rezultati su pokazali kako intervencije na PAHSA u vidu skraćivanja dužine lanca hidroksistearinske kiseline te kemijske promjene lanca palmitinske kiseline dovode do pojačanog protuupalnog djelovanja u odnosu na 9-PAHSA (110). Istraživanje učinaka sintetiziranih analoga FAHFA za sada je limitirano samo na stanične linije.



Slika 11. Sintetizirani kemijski analozi 9-PAHSA: 9-palmitoiloksiundekanoična kiselina, 9-palmitoiloksitridekanoična kiselina, 9-palmitoiloksipentadekanoična kiselina, 9-palmitoiloksiheptadekanoična kiselina, 9-palmitoiloksistearinska kiselina, 9-tetradekanoilstearinska kiselina, 9-dodekanoiloksistearinska kiselina, 9-dekanoiloksistearinska kiselina, 9-oktanoiloksistearinska kiselina, 9-heksanoiloksistearinska kiselina, 9-butiriloksistearinska kiselina i acetoksistearinska kiselina (110).

2.4. Putevi enzimske razgradnje FAHFA u tkivima

Do sada su poznata tri enzima koja hidrolizom esterske veze između masne kiseline i hidroksimasne kiseline sudjeluju u razgradnji FAHFA u organizmu: AIG1 (engl. Androgen-induced gene 1 protein), ADTRP (engl. Androgen-dependent TFPI-regulating protein) i pankreasna CEL lipaza (engl. Carboxyester lipase, 111).

Istraživanje u kojem su ABPP metodom (engl. Activity-based protein profiling) otkriveni hidrolitički enzimi AIG1 i ADTRP, koji od svih lipidnih razreda specifično ciljaju, odnosno razgrađuju FAHFA, pokazalo je tkivnu specifičnost enzima. AIG1 je široko rasprostranjen enzim, prisutan gotovo u svim tkivima (s najvećom koncentracijom u mozgu i makrofazima), dok ADTRP pokazuje značajno restriktivniju distribuciju budući da je prisutan prvenstveno u metaboličkim organima kao što su jetra, masno tkivo, tanko crijevo i bubreg (112). Za razliku od tipičnih hidrolaza koje u svojoj strukturi sadrže katalitički serinski nukleofil, AIG1 i ADTRP su atipične hidrolaze koje sadrže treoninski nukleofil (112,113). S obzirom na važnost prisutnosti FAHFA u organizmu u kontekstu njihovog antidijabetičkog i protuupalnog djelovanja, znanstveni napori ulažu se u istraživanje faktora koji bi usporili njihovu razgradnju. Tako je pronađena vrsta selektivnih inhibitora serinskih hidrolaza kao što su AIG1 i ADTRP, tzv. NHH karbamati, no istraživanja su za sada limitirana na stanične linije (112).

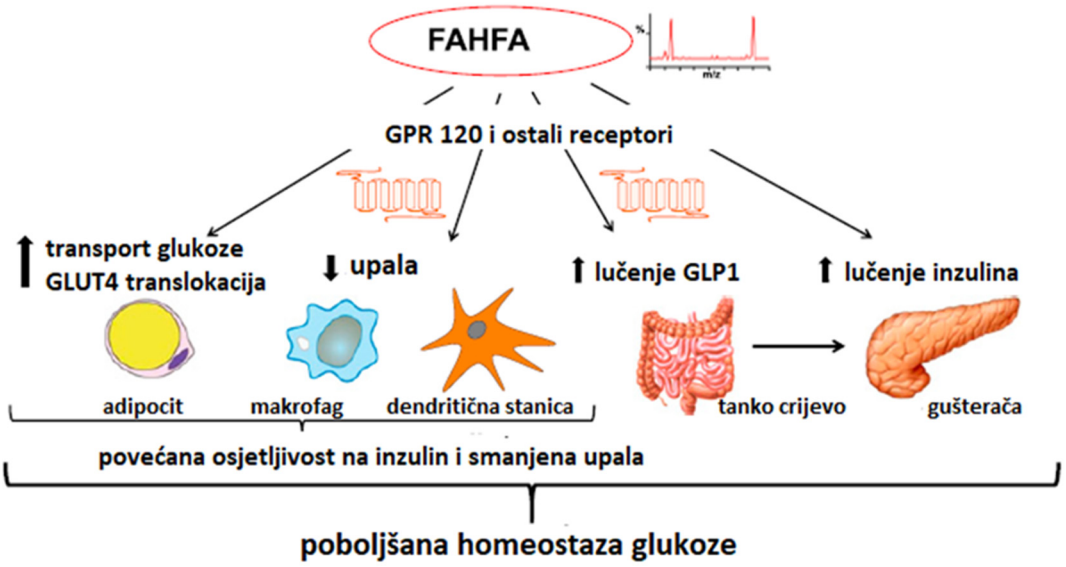
U slijedećem istraživanju otkriveno je kako i pankreasna CEL lipaza sudjeluje u razgradnji FAHFA, i to u značajno većoj mjeri nego u razgradnji ostalih vrsta lipida poput triacilglicerola, diacilglicerola, kolesteril estera, fosfolipida i lizofosfolipida. Osim što pokazuje povećan afinitet prema FAHFA, CEL pokazuje i određenu selektivnost prema izomerima te prema kiselinskom sastavu: intenzivnije razgrađuje nezasićene FAHFA te FAHFA s esterskom vezom dalje od karboksilata. Tako su, primjerice, POHSA i OAHSA podvrgnute intenzivnijoj enzimskoj razgradnji nego PAHSA i SAHSA. Isto tako se 12-PAHSA razgrađuje intenzivnije od 9-PAHSA te značajno intenzivnije od 5-PAHSA (111).

2.5. Metabolička i protuupalna uloga FAHFA in vivo i in vitro

Sve dosadašnja istraživanja koja su ispitivala in vitro, in situ i in vivo učinak FAHFA ustanovila su njihovo inzulin-senzitizirajuće, hipoglikemizantno i protuupalno djelovanje uz izražene razlike među FAHFA razredima te regioizomerne specifičnosti

(83,86,87,102,105,114-116). Jedan dio istraživanja otkrio je i njihovu ulogu u procesima karcinogeneze (104,117) te diferencijacije adipocita (107).

Postojeća saznanja o FAHFA sugeriraju kako ta vrsta lipida djeluje kao parakrini i endokrini medijator, odnosno signalni lipid, u razinama sličnim ostalim signalnim lipidima poput prostaglandina, prostaciklina, endokanabinoida i steroida (83,84). Svoje učinke FAHFA ostvaruju dominantno putem GPR40 i GPR120 receptora, djelujući kao njihov direktni aktivator (83), dovodeći u pozitivnu vezu masne kiseline s homeostazom glukoze, slika 12.



Slika 12. Imunometabolički učinci FAHFA in vivo, simplificiran prikaz (84).

Godine 2015. je GPR 120 otkriven kao receptor za dugolančane masne kiseline (e.g. n-3 PUFA) u tankom crijevu (118), a kasnija istraživanja dokazala su njegov afinitet prema FAHFA te distribuciju u masnom tkivu, gušterači (delta stanicama), makrofazima i dendritičkim stanicama, sugerirajući tako njegov značaj u regulaciji metabolizma i upale (119). GPR40 je 2003. godine opisan kao receptor za dugolončane masne kiseline, koji se nalazi u beta stanicama Langerhansovih otočića gušterače i u središnjem živčanom sustavu (120). U beta stanicama dokazano je njegovo inzulin-stimulirajuće djelovanje (121). Kasnija istraživanja opisala su njegovu distribuciju i u tankom crijevu, gdje zajedno sa GPR120 doprinosi postprandijalnom otpuštanju GLP-1 (114).

2.5.1. Protuupalni učinak FAHFA

Kronična upala jedan je od osnovnih preduvjeta za razvoj inzulinske rezistencije (30,122). Istraživanje koje je otkrilo postojanje FAHFA kao nove vrsta lipida odnosno lipokina pokazalo je njihov pozitivan in vitro i in vivo učinak na ključne protagoniste kronične upale (dendritičke stanice, makrofage i proupalne citokine), a u kontekstu protuupalnog učinka istaknuo se regioizomer 9-PAHSA (83). In vitro je 9-PAHSA, dodavanjem dendritičkim stanicama koštane srži prethodno stimuliranim proupalnim lipopolisahridom, blokirala inicijalno povećanu ekspresiju proupalnih molekula CD40, CD80, CD86 i MHCII, potrebnih za aktivaciju T-limfocita. 9-PAHSA je i u potpunosti blokirala lučenje IL-12 (učinak ovisan o dozi) te značajno smanjila lučenje IL-1β i TNF-alfa iz dendritičkih stanica (83).

Protuupalno djelovanje potom je dokazano i in vivo: miševi hranjeni regioizomerom 9-PAHSA (kroz tri dana) imali su u masnom tkivu značajno smanjenu aktivnost proupalnih makrofaga, odnosno makrofaga sa ekspresijom proupalnih citokina IL-1 beta i TNFalfa (83). U slijedećem istraživanju dokazano je, na mišjem modelu kolitisa, kako peroralna primjena PAHSA usporava tijek i smanjuje intenzitet crijevne upale. Protuupalno djelovanje PAHSA je u kroničnoj primjeni (miševi su 10 dana hranjeni 5-PAHSA, 9-PAHSA i kontrolnom prehranom) ostvarila kroz nekoliko mehanizama: reducirala je broj ukupnih i proupalnih CD11c+ makrofaga (pritom bez utjecaja na monocite, neutrofile i CD206+ protuupalne makrofage), snizila je razinu proupalnih citokina IL-1 beta, IL-6 i TNFalfa i kemokina mip-1, mcp-1 i kc, te smanjila crijevnu ekspresiju gena uključenih u aktivaciju upale: ifn-gama, tbx21, il-17, il-23 (115).

2.5.2. Hipoglikemizantni i inzulin-senzitizirajući učinci FAHFA

Budući da je u inicijalnom istraživanju (83) otkriveno kako razina FAHFA u serumu i masnom tkivu korelira sa inzulinskom osjetljivošću, odnosno kako su u inzulin-rezistentnih pojedinaca razine FAHFA znatno snižene u odnosu na inzulin-osjetljive pojedince (e.g. razina 13/12-, 10-, 9- i 5-PAHSA u subkutanoj masti inzulin-rezistentnih osoba su 60-73% niže nego u osoba s urednom inzulinskom osjetljivošću), slijedeći korak bio je ispitati direktan učinak FAHFA na glukozno-inzulinsku homeostazu.

S obzirom na prethodne rezultate koji su pokazali da je najzastuljeniji FAHFA razred u serumu i masnom tkivu ljudi i miševa PAHSA (9- i 5-PAHSA regioizomeri), u tom istraživanju ispitivani su samo njihovi učinci. Oralnom primjenom 9- i 5-PAHSA postignuto je značajno smanjenje glikemije i u testu opterećenja glukozom (OGTT) i u postprandijalnom stanju (83). 5- i 9-PAHSA djelujući putem GPR40 i GPR120 receptora u tankom crijevu potiču lučenje GLP-1 (glukagonu sličan peptid -1) koji potom stimulira beta stanice na lučenje inzulina, te povećavaju translokaciju GLUT4 receptora na membranu adipocita, olakšavajući tako ulazak glukoze u stanice. 5-PAHSA pak direktno i promptno stimulira beta stanice gušterače na lučenje inzulina (83).

Također, s obzirom na protuupalno djelovanje FAHFA, hipoglikemizantno djelovanje je moguća posljedica povećanja inzulinske osjetljivosti uslijed smanjenja metainflamacije. Godine 2017., objavljeno je istraživanje na modelu miša kojem je genetskom modifikacijom uklonjena aktivnost ChREBP, čime je maksimalno reducirana sposobnost de novo lipogeneze, atime i stvaranje FAHFA (102). U takvih miševa povećana je inzulinska rezistencija, s obzirom na ometenu translokaciju GLUT4 receptora na membranu adipocita (s posljedično reduciranim ulaskom glukoze u stanice) te povećanu lipolizu s posljedično povećanom jetrenom glukoneogenezom (59,84,123). Kronična primjena PAHSA u miševa (9-PAHSA je primjenjivana per os kroz 26 dana) rezultirala je smanjenjem inzulinske rezistencije, odnosno poboljšanim odgovorom na inzulin, jednakim fiziološkom odgovoru u jedinki s urednom funkcijom ChREBP (102).

Postojanost pozitivnog učinka FAHFA na inzulinsku osjetljivost i homeostazu glukoze pokazalo je istraživanje iz veljače 2018. godine, u kojem je (na mišjem modelu) pokazano kako je u miševa s primjenjenim 5- i 9-PAHSA, kako nakon 13 dana, tako i nakon 5 mjeseci, ostvaren bolji postprandijalni odgovor na inzulin, u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije dobivala FAHFA (114).

2.6. Kvalitativna i kvantitativna analiza FAHFA

Analiza FAHFA, kao lipidnog medijatora koji se u biološkim uzorcima nalazi u izrazito niskim razinama (koncentracijama) te tvori različite izomere, zahtijeva visoko osjetljive metode, odnosno tehnike.

Tehnika koja se pokazala najpogodnijom za odvajanje, detekciju i kvantifikaciju lipidnih medijatora jest spektrometrija masa uparena s tekućinskom kromatografijom, uz ionski elektrosprej, LC–ESI-MS/MS (engl. Liquid-chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry). Prednost MS pred ostalim analitičkim metodama jest mogućnost odvajanja i karakteriziranja ioniziranih čestica (analita) prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Koliziona disocijacija, CAD (engl. Collision-activated dissociation) služi za dobivanje informacija o strukturi analita putem fragmentiranja lipidnih iona. Monitoring višestrukih reakcija, MRM (engl. Multiple-reaction monitoring) jest način rada MS kojim se optimizira osjetljivost, maksimalizira broj metabolita za analizu te reducira vrijeme analize. Spektrometrija masa se često uparuje s tekućinskom kromatografijom, LC (engl. Liquid chromatography) kako bi se simplificirala MS analiza prethodnim odvajanjem lipidnih iona.

2.6.1. Tekućinska kromatografija

Kromatografske metode visokog kapaciteta odvajanja su važne za analizu molekula niske zastupljenosti, za odvajanje izomera te za reduciranje efekta matriksa (minimiziranja pozadinskog šuma). U lipidomici se najčešće koristi tekućinska kromatografija, LC (engl. Liquid Cromatography), koja za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju lipida u biološkom uzorku (mješavini) koristi mješavinu otapala i uzorka kao tekuću mobilnu fazu te granulirani adsorbent kao čvrstu fazu. HPLC (engl. High performance LC) je unaprijeđena varijanta tekuće kromatografije koja umjesto gravitacijskog prolaska mobilne faze kolumnom koristi visokotlačne uvjete (400 atmosfera) te time povećava brzinu analize i omogućuje korištenje kolumne manjih čestica, čime se povećava površina za interakciju sa stacionarnom fazom i posljedično postiže bolje odvajanje komponenata. Ovisno o relativnoj polarnosti otapala (mobilne faze) i čvrste faze, primjenjuje se HPLC normalne faze (za nepolarne molekule) ili HPLC obrnute faze (za polarne molekule). UHPLC (engl. Ultra-high performance LC), koja koristi čestice veličine ispod 2 μm, uz tlakove od 600-1000 atmosfera, omogućuje još veću učinkovitost od HPLC koja koristi čestice veličine 5 μm (124).

Ostale kromatografske metode su TLC (engl. Thin layer chromatography), GC (engl. Gas Chromatography), CE (engl. Capillary electrophoresis chromatography) i SFC (engl. Supercritical fluid chromatography), a mogu se koristiti spregnute sa spektrometrijom masa.

2.6.2. Spektrometrija masa

MS je analitička metoda koja omogućuje i kvalitativnu i kvantitativnu analizu molekula. Provodi se tako da se najprije ciljne molekule konvertiraju u ione s pozitivnim ili negativnim nabojem, koji potom putuju do različitih dijelova detektora ovisno o svom omjeru mase i naboja (m/z). Putovanje iona kroz magnetno i električno polje ovisno o m/z jest glavni princip odvajanja MS-om. Finalno, ionski signali s detektora se softverski pretvaraju u grafički prikazan spektar relativnih zastupljenosti.

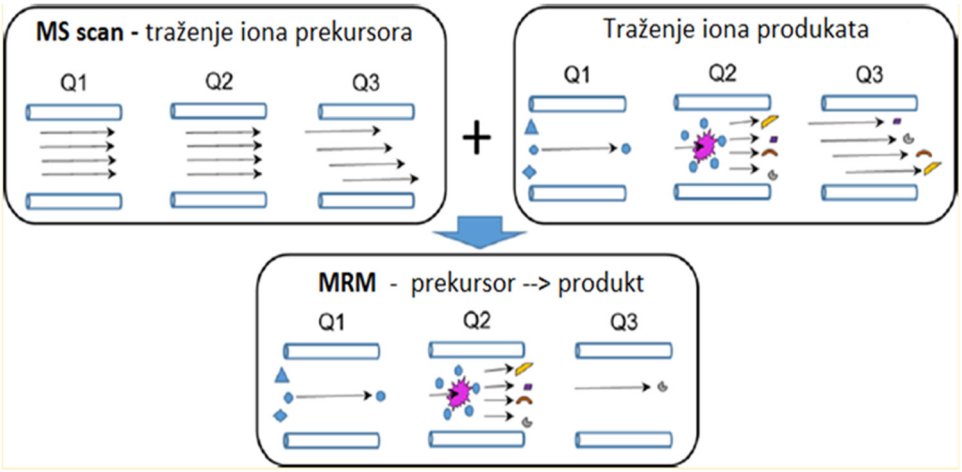
Posljednjih desetak godina MS analize se upotpunjuju elektrosprej ionizacijom, ESI (engl. Electrospray ionisation), koja uporabom električne energije pomaže prijenosu iona iz tekuće u plinovitu fazu, prije podvrgavanja MS analizi. Tim osjetljivim, robusnim i pouzdanim alatom omogućena je analiza ekstremno niskih količina uzoraka te analiza nehlapljivih i termolabilnih molekula koje je nemoguće analizirati konvencionalnim tehnikama.

Uparivanjem MS sa tekućom kromatografijom visokog performansa, HPLC, u svrhu molekularnog frakcioniranja koje prethodi MS analizi, dobivena je moćna tehnika za analizu molekula svih veličina te različite polarnosti, prisutnih u kompleksnim biološkim matricama (125).

MS se u posljednje vrijeme sve češće izvodi na kvadrupolnim masenim analizatorima. Oni se sastoje od 4 paralelne, jednako udaljene željezne cijevi (šipke), gdje su suprotni parovi šipki električno povezani. U tipičnom tandem kvadrupol sustavu nalaze se tri linearno postavljena kvadrupola. Molekula koja se analizira, ion prekursor, odabire se na prvom kvadrupolu (Q1) te potom na drugom kvadrupolu (Q2) kolidira s plinom. U tom se procesu kolizijom inducirane disocijacije molekula (analit) aktivira i podliježe fragmentaciji te se iz iona prekursora pretvara u ion produkt. Ion produkt se monitorira na trećem kvadrupolu (Q3) te mu se određuje struktura. Ukoliko se na početku analize Q1 podesi tako da odabire samo jedan određeni m/z, postiže se tzv. purifikacijski MS korak kojim se eliminiraju ostali molekularni ioni te skraćuje vrijeme analize (126).

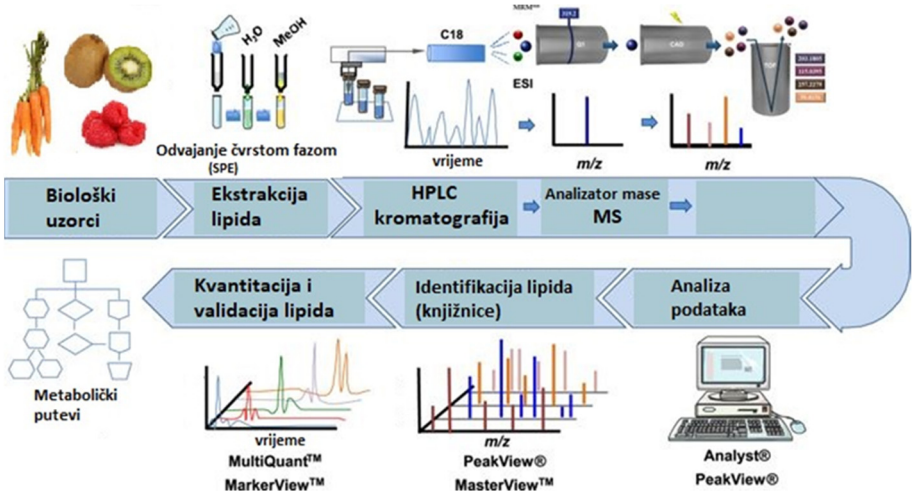
Za dobivanje podataka na tandemskim kvadrupolnim sustavima najčešće se koriste slijedeći načini: traženje iona produkata, traženje iona prekursora, neutralnih gubitaka i pretrage višestrukih reakcija (engl. Multiple reaction monitoring, MRM).

U MRM načinu, koji se najviše koristi u procedurama ESI-MS/MS kvantifikacije, i Q1 i Q3 su podešeni na određeni par prekursor i produkt iona, slika 12. Q1 pritom odabire prekursor ion koji ulazi u kolizijsku komoru, a instrument potom monitorira sve tranzicije za dani prekursor. Na taj način smanjuje se šum ostalih iona, pojačava se omjer signala i šuma te se postiže veća osjetljivost (niže razine detekcije), specifičnost i brzina.

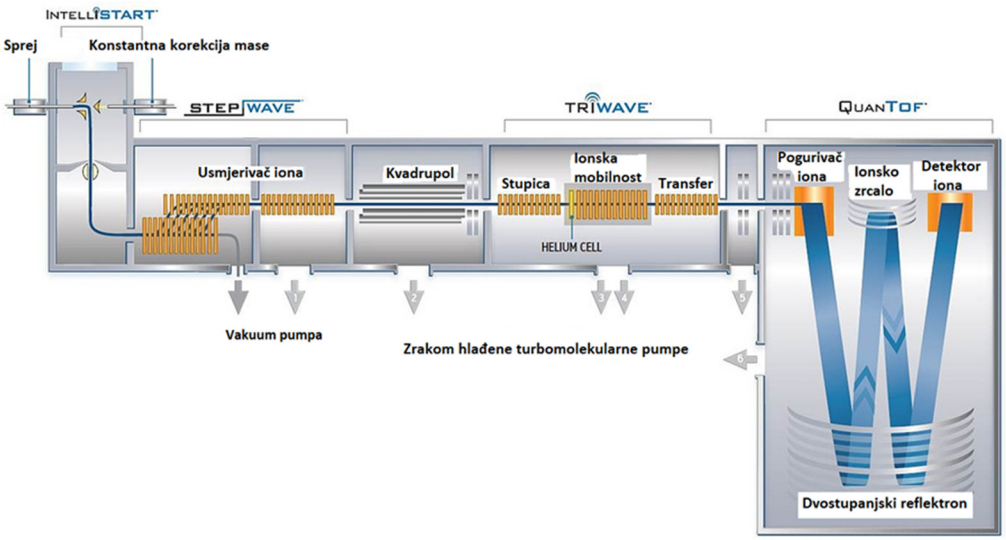


Slika 13. Shematski prikaz pretrage višestrukih reakcija (MRM) u spektrometriji masa (126).

Da bi se postigao MRM visoke rezolucije, MRMHR (engl. High-resolution MRM), mogu se koristiti hibridni sustavi poput TripleTOF5600+ i Q-TOF (engl. Quadrupole-time of flight) (127). Od 2015. godine dostupne su FAHFA in-silico MS/MS knjižnice s podatcima baziranima na QTOF spektrima u negativnom modu. Danas je poznato 4290 FAHFA struktura, dobivenih MS/MS na 40 V CID, što omogućuje lakše buduće identifikacije u biološkim uzorcima (128).



Slika 14. Shematski prikaz priprave uzoraka i kvantitativnog mjerenja iona u spektrometriji masa (127).



Slika 15. Shematski prikaz presjeka instrumenta visoke rezolucije, koji pri tome ima mogućnost MRM analiza (Synapt G2-Si).

2.7. Lipidomika

Biološki sustavi, poput ljudskog organizma, izrazito su kompleksni, a njihovo je funkcioniranje posljedica koordiniranih aktivnosti višestrukih molekularnih i staničnih funkcija, Za razumijevanje fiziologije i patofiziologije datog biološkog sustava, neophodan je globalan uvid u njegov molekularni profil koji je omogućen razvojem i primjenom tzv. visokoprotočnih tehnologija i/ili metoda poput transkriptomike, metabolomike, proteomike i

lipidomike. Sustavne analize ekspresije i aktivnosti (makro)molekula pod specifičnim (pato)fiziološkim uvjetima te njihova separacija, identifikacija i karakterizacije omogućile su znanstveni pomak od tzv. redukcionističkog ka sveobuhvatnijem pristupu izučavanja raznih stanja i zbivanja u organizmu. Takve globalne analize podrazumijevaju skupinu metoda za analizu ili karakterizaciju svih ili većine članova pripadnika određene obitelji molekula u jednom jedinom eksperimentalnom koraku.

Lipidomika je znanstvena disciplina koja koristeći načela analitičke kemije i statističke analize identificira i kvantificira biogene lipide, izučava njihovu funkciju u biološkim procesima te interpretira njihov (pato)fiziološki značaj. Lipidomikom dobivene informacije koje kvantitativno opisuju prostorne i vremenske alteracije u sastavu i sadržaju lipidnih molekula korisne su za identifikaciju novih molekula (vrsta lipida), daljnji razvoj metoda kvantifikacije te analizu metaboličkih adaptacija i promjena tkivne distribucije. Krajnji cilj lipidomike jest što detaljnije istraživanje mehanizama metabolizma lipida i njihovih promjena u patofiziološkim uvjetima, kako bi se otkrilo što više biomarkera korisnih kako u ranoj dijagnostici i liječenju bolesti, tako i u personaliziranoj medicini s naglaskom na individualiziranu prehranu odnosno nutricionističke intervencije.

Lipidomika u području nutricionizma omogućuje razumijevanje promjena u strukturi, sastavu i funkciji staničnih lipida ovisno o promjenama u prehrani. Također, otkriva funkcije signalnih molekula, senzore nutrijenata i intermedijarne spojeve metaboličkih puteva, objašnjava interakcije između nutrijenata i ljudskog metabolizma te evaluira akutni i kronični utjecaj prehrane na ljudsko zdravlje (129,130).

Posljednjih petnaestak godina lipidomika se intenzivno razvija i dobiva interdisciplinarnu primjenu prvenstveno zahvaljujući razvoju spektrometrije masa (MS) te pripadajućih metoda s rastućom osjetljivošću i specifičnošću.

Ovisno o vrsti lipida koje MS analizira, lipidomika se može podijeliti na globalnu (netargetiranu) i ciljanu (targetiranu). Globalna lipidomika identificira i kvantificira sve lipide u danom sustavu, dok se targetirana lipidomika fokusira na karakterizaciju točno određenih lipida i time omogućava rješavanje kompleksne biološke problematike.

Tri dominantna područja u lipidomici podrazumijevaju:

- MS spregnutu s kromatografskim razdvajanjem,
- direktnu infuzijsku „shotgun“ MS i vizualizacijsku MS,
- MSI (engl. Mass spectrometry imaging).

MS uparena s kromatografijom, a poglavito MS uparena s tekućinskom kromatografijom (LC-MS) objedinjuje izvrsnu učinkovitost odvajanja, visoku osjetljivost i visoku specifičnost te predstavlja vodeću metodu u lipidomici (127).

Preduvjet za izvođenje MS je adekvatan odabir i priprema uzoraka za analizu, a finaliziranje analize podrazumijeva odabir kompetentnih softvera za obradu dobivenih podataka. Za potrebe identifikacije i komparacije, dostupna je baza podataka LIPID MAPS koja sadržava tisuće molekula lipida, raspoređenih po kategorijama.

2.7.1. Priprema uzoraka za lipidomičke analize

Budući da su lipidi inkorporirani u matriks, potrebno je adekvatno ih ekstrahirati da bi se izbjegla kasnija interferencija s elementima kompleksnog matriksa. Tijekom ekstrakcije lipida potrebno je dodati interne standarde kako bi se kasnije mogla izvršiti kvantitativna analiza. Od metoda ekstrakcije u lipidomici se najčešće koriste SOSE, LLE i SPE.

SOSE (engl. Single organic solvent extraction) – dodaje se velik volumen metanola ili acetonitrila, nskon čega slijedi vorteksiranje i centrifuga kako bi se dobio koncentrirani supernatant.

LLE (engl. Liquid-liquid extraction) – najčešće primjenjivana ekstrakcijska metoda koja podrazumijeva uporabu dva organska otapala (kloroform ,metanol, metil tert-butil eter, butanol, heptan, etil acetat) u svrhu odvajanja molekula lipida iz polarnijeg matriksa.

SPE (engl. Solid phase extraction) – upotrebljava stacionarnu fazu koja selektivno zadržava specifične vrste molekula sa sličnim svojstvima, a može se upotrebljavati ili samostalno ili u kombinaciji sa SOSE i/ili LLE. Uglavnom se koristi u analizama signalnih molekula koje su u biološkim uzorcima zastupljene u niskim razinama (e.g. eikosanoidi,

steroidni hormoni, FAHFA) . Najčešće se vrši u spremnicima sa silika-normalnom fazom, C8, C18 i HLB spremnicima s reverznom fazom te spremnicima s izmjenom iona (103,131-133).

Osim navedenih, razvijaju se i druge metode koje bi omogućile bržu i efikacniju ekstrakciju, poput SPME (engl. Solid phase microextraction), SFE (engl. Supercritical fluid extraction), MAE (engl. Microwave-assisted extraction), UAE (engl. Ultrasound-assisted extraction), PFE (engl. Pressurized fluid extraction) i DLLME (engl. Dispersive liquid–liquid microextraction).

Nakon ekstrakcije, slijede ili simplifikacija kompleksnosti ekstrakta (posebice važno kod pristupa s direktnom infuzijom budući da se u toj opciji ne primjenjuje kromatografsko razdvajanje), ili derivatizacija ekstrakata kemijskim obilježavanjem funkcionalnih skupina lipida.

Nakon adekvatne pripreme uzorka, slijedi ionizacija. Najčešće korištene tehnike ionizacije u lipidomici jesu (127):

ESI (engl. Electrospray Ionization) – tehnika meke ionizacije koja koristi elektrosprej postignut primjenom jakog električnog polja na tekućinu koja prolazi kapilarama, u svrhu stvaranja finog aerosola u kojem se formiraju ioni

MALDI (engl. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) – tehnika meke ionizacije koja omogućava analizu velikih i/ili nestabilnih molekula, koja koristi energiju lasera

APCI (engl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization) – tehnika meke ionizacije koja koristi reakcije molekula i iona u plinskoj fazi, pri atmosferskom tlaku

APPI (engl. Atmospheric Pressure Photoionization) – korisna alternativa ionizacijskim tehnikama za analizu komponenata koje se slabo ioniziraju ESI-jem ili APCI-jem. Tehnika koristi vakuum ultraljubičastu lampu.

SIMS (engl. Secondary Ion Mass Spectrometry) – najosjetljivija površinska analitička tehnika koja koristi bombardiranje fokusiranim primarnim ionima te hvatanje sekundarnih iona

DESI (engl. Desorption ESI) – kombinacija ESI-ja i desorpcijske ionizacije.

2.7.2. Analiza lipida MS spregnutom s kromatografijom

Kromatografske metode visokog kapaciteta odvajanja su važne za reduciranje efekta matriksa, odvajanje izomera lipida i obogaćivanje molekula niske zastupljenosti. Najčešće se koriste TLC (engl. Thin layer chromatography), GC (engl. Gas chromatography), LC (engl. Liquid chromatography), CE (engl. Capillary electrophoresis chromatography) i SFC (engl. Supercritical fluid chromatography). LC je najuniverzalnija kromatografska metoda, lako se uparuje s MS i pogodna je za odvajanje kako hlapljivih, tako i nehlapljivih lipida. HPLC je unaprijeđena varijanta kolumne kromatografije koja umjesto gravitacijskog ukapavanja koristi visokotlačne uvjete (400 atmosfera) te time povećava brzinu analize i omogućuje korištenje kolumne manjih čestica čime se povećava površina za interakciju sa stacionarnom fazom i posljedično postiže bolje odvajanje komponenata. Ovisno o relativnoj polarnosti otapala i stacionarne faze, primjenjuje se HPLC normalne faze (za nepolarne molekule) ili HPLC obrnute faze (za polarne molekule). HPLC je radi visoke učinkovitosti, selektivnosti i vidljivosti najpopularnija metoda odvajanja u lipidomici. UHPLC, koja koristi čestice veličine ispod 2 μm, uz tlakove od 600-1000 atmosfera, omogućuje još veću učinkovitost od HPLC koja koristi čestice veličine 5 μm (125,131).

Podaci dobiveni kromatografskim metodama uparenima sa MS podrazumijevaju kromatograme (ukupno kretanje iona i ekstrahirano kretanje iona) i masene spektre. Lipidne komponente se identificiraju putem retencijskih vremena na kromatogramima te putem karakterističnih fragmentiranih iona u spektrima masa. Za apsolutnu ili relativnu MS kvantifikaciju najčešće se uzima područje najizraženijih „peak“-ova.

U profiliranju masnih kiselina, eikosanoida, steroida i masnih aldehida najčešće se LC uparuje s tandemnom spektrometrijom masa sa MRM načinom koji objedinjuje i osjetljivost i selektivnost. SRM/MRM (engl. Selected/Multiple Reaction Monitoring) tehnika služi za ciljane analize, a koristi trostruki kvadrupol i dva analizatora masa u svrhu praćenja određenog ionskog fragmenta odabranog ionskog prekursora. Specifičan par m/z vrijednosti vezanih za prekursorne i fragmentirane ione naziva se tranzicijom. MRM se koristi za paralelno dobivanje multiplih SRM tranzicija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Namirnice, kemikalije, pribor i instrumenti

3.1.1. Namirnice

Istraživanje je provedeno na dvadeset namirnica biljnog porijekla, niskog glikemijskog indeksa i opterećenja, za koje su od ranije poznata antioksidativna, protuupalna, euglikemizantna i organoprotektivna svojstva, a koje su učestale sastavnice uobičajenih jelovnika, ali i koji se propisuju osobama sa (pre)dijabetesom, tablica 5.

Ispitivane namirnice (osim procesirane zobi) bile su svježe, nezamrznute, bez dodanih nutrijenata, pohranjene na sobnoj temperaturi. Odabir namirnica djelomično je odredilo doba godine (siječanj), budući da smo nastojali pribaviti sezonske, svježe namirnice (klementina, limun, kivi, peršin). Nesezonske namirnice adekvatnom su pohranom / skladištenjem održale svježinu, bez potrebe postupaka smrzavanja (jabuke, mrkva, luk, češnjak), ili su bile svježe uzgojene u stakleničkom/plasteničkom uzgoju (jagode, borovnice, rajčica, rotkvica, paprika). Također, nismo željeli ograničiti analizu samo na namirnice lokalnog porijekla, već smo uključili i neke vrste egzotičnog voća, s obzirom na njihovu dostupnost tijekom čitave godine te na prethodno dokazane nutritivne benefite (mango, avokado, ananas, banana). Budući da je zob često korištena namirnica, sa mnogostrukim zdravstvenim benefitima, te da su na tržištu dostupni prehrambeni artikli koji sadrže zob u raznim oblicima i stupnjevima obrade, željeli smo utvrditi utječu li postupci obrade žitarica na sastav i sadržaj FAHFA pa smo analizirali cjelovitu zob, krupne zobene pahuljice te sitne, instantizirane zobene pahuljice (postupak instantizacije, odnosno pretvorbe cjelovite žitarice u grube ili fine pahuljice podrazumijeva ljuštenje žitarice, prokuhavanje na pari te valjanje kako bi se zrna pretvorila u listiće koji se lakše i brže kuhaju, a mogu se jesti i bez kuhanja; dodatnim kuhanjem na pari i intenzivnijim valjanjem dobiva se najprocesuiraniji oblik zobi: sitne ili instant zobene pahuljice (134).

Nakon kupnje namirnice su skladištene na 4 °C, uz relativnu vlagu od 95%, do trenutka pripreme uzoraka (maksimalno tri dana). Od svake namirnice analizirala su se po tri uzorka (sva tri uzorka namirnice kupljena su isti dan).

Tablica 5. Puni nazivi analiziranih namirnica te veličina uzorka uzetog za analizu

Peršin - *Petroselinum crispum* L.	**(1.01 g)**
Rotkvica - *Raphanus sativus* L.	**(1.02 g)**
Mrkva - *Daucus carota* L.	**(1.02 g)**
Klementina - *Citrus clementina*	**(1.01 g)**
Ananas - *Ananas comosus* L.	**(1.01 g)**
Zob (cijelo zrno) - *Avena sativa L.*	**(1.03 g)**
Zob (krupne pahuljice)	**(1.02 g)**
Zob (sitne instantizirane pahuljice)	**(1.03 g)**
Češnjak - *Allium sativum* L.	**(1.01 g)**
Luk - *Allium cepa* L.	**(1.01 g)**
Avokado - Persea *americana* Mill.	**(1.00 g)**
Mango - *Mangifera indica* L.	**(1.01 g)**
Limun - *Citrus limon* L.	**(1.02 g)**
Paprika - *Capsicum annuum* L.	**(1.01 g)**
Cherry rajčica - *Solanum lycopersicum* L. *var. Cerasiforme*	**(1.03 g)**
Jabuka - *Malus domestica* L.Borkh	**(1.00 g)**
Borovnica - *Vaccinium corymbosum* L.	**(1.01 g)**
Jagoda - *Fragaria ananassa* Duch.	**(1.06 g)**
Banana - *Musa acuminata* L.	**(1.04 g)**
Kivi - *Actinidia deliciosa*	**(1.02 g)**

3.1.2. Kemikalije

Acetonitril (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD);

Amonijev acetat (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Amonijev hidroksid (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Argon (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Dušik (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Etilacetat (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Etil-metanoat (Carl Roth, Karsruhe, Njemačka);

Heksan (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Kloroform (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Metanol (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);

Milli Q voda (predestilirana, pročišćena i deionizirana; otpornost kod 25 °C manja od 18 Mcm-3, ukupna masena koncentracija organskog ugljika manja od 5 μg dm-3, Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);
Natrijev klorid (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);
2-propanol, p.a. (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);
Standard 5-PAHSA u otopini metilacetata (Cayman Chemical, SAD);
Deuterirani standard 5-PAHSA (Cayman Chemical, SAD);
Trinatrijev citrat (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka).

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

3.1.3. Pribor

Nož od nehrđajućeg čelika 1.4034, model RSG, veličina oštrice 90mm (Karl Hammacher, Solingen, Njemačka);
Laboratorijska žličica od nehrđajućeg čelika, model Z511455 (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);
Staklene epruvete, model Aldrich® Essentials, kapaciteta 5ml, oblog dna (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);
Pipete Finnpipette™ F2 Variable Volume Single-Channel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD);
Epruvete za centrifugu, model Greiner, kapaciteta 15ml, koničnog dna (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);
Polipropilenske mikroepruvete, model Corning® Costar® kapaciteta 2ml, koničnog dna (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Njemačka);
Kromatografski stupci model HyperSep™ Silica, br. 60108-411 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD).

3.1.4. Instrumenti i uređaji

Hladnjak, model 20LREETSA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD);
Električni homogenizator, model Tissue Ruptor II (Qiagen, Germantown, SAD);
Tresilica model MS3 Basic (IKA, Staufen, Njemačka);
Centrifuga, model Universal 32R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka);

Vakuum koncentrator Vacufuge Plus, model 5301 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka);
UPLC, nanoAcquity (Waters, Milford, SAD);
HPLC, model XTerra MSC18 3.5 μm NanoEase (Waters, Milford, SAD);
Spektrometar masa, model Synapt G2-Si (Waters, Milford, SAD).

3.1.5. Programi za upravljanje instrumentima ili obradu podataka

Mascot V 2.1 (Matrix Science, Velika Britanija);
Mass Lynx software version 4.1. SCN902 (Waters, Milford, MA, SAD);
Data Explorer V 4.9 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD);
Bioutil peaks (Centar za proteomiku i spektrometriju masa, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska);
Chem Station V B.04.03. (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

3.2. Priprema uzoraka za analizu

3.2.1. Ekstrakcija lipida iz uzorka svježe hrane

100 grama svake namirnice najprije je izrezano nožem od nehrđajućeg čelika, na komadiće veličine 2-3 mm (osim zobenih pahuljica koje su već bile usitnjene i obrađene od strane proizvođača).

Potom je žličicom od nehrđajućeg čelika uzet po 1 gram biljnog tkiva, stavljen je u staklenu epruvetu, pipetom je dodano 500 μL citratnog pufera (u svrhu stabilizacije smjese i sprečavanja enzimske degradacije nutrijenata), te je smjesa uz pomoć mehaničkog homogenizatora Tissue Ruptor II, homogenizirana tijekom 5 minuta. Citratni pufer prethodno je priređen miješanjem 100 milimolarnog trinatrijevog citrata sa jednomolarnim natrijevim kloridom; dobiveni pH iznosio je 3.6.

Kako bi se izbjeglo pregrijavanje uzoraka tijekom procesa homogenizacije, svakih 60 sekundi se uzorak ohladio na sobnu temperaturu. Nakon 5 minuta homogenizacije (5 x 1 min), uzorku je pipetom dodano 1,5 ml metanola, 3 ml kloroforma i 1 ml citratnog pufera: methanol i kloroform korišteni su u kontekstu organskih, jednostavnih, nepolarnih otapala za lipide, a citratni pufer kao stabiliziator i prevencija od enzimske degradacije.

Smjesa je potom stavljena na šejker te vorteksirana tijekom jedne minute. Potom je, u svrhu odvajanja lipidnog ekstrakta, smjesa pipetom stavljena u epruvetu za centrifuge te centrifugirana tijekom 6 minuta na 2200 × g.

Organska faza koja sadrži lipide centrifugom je odijeljena od vodene faze te pipetom premještena u polipropilensku mikroepruvetu. Mikroepruveta je stavljena u centrifugalni vakuum koncentrator u kojemu je sadržaj sušen kroz 10 minuta, pri sobnoj temperaturi.

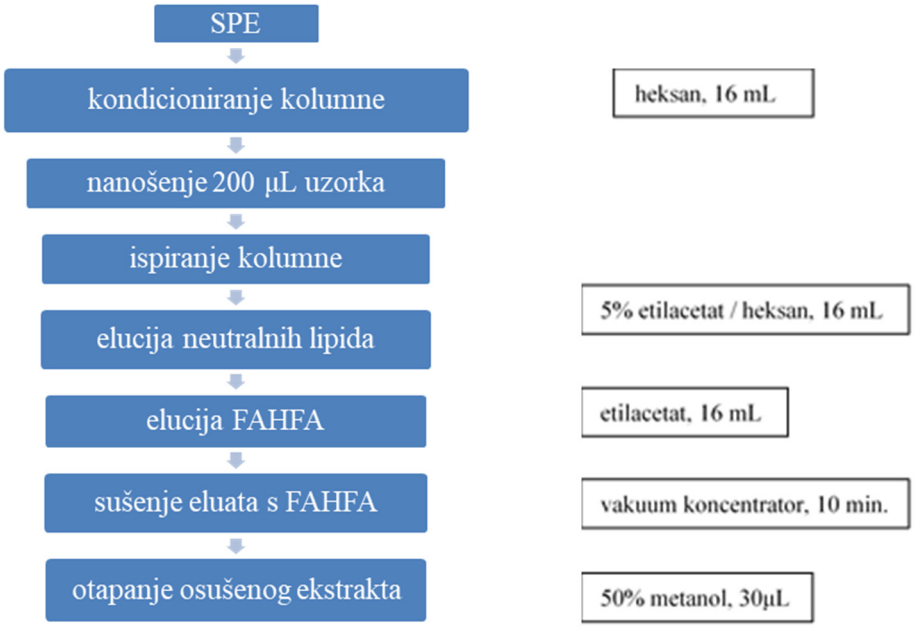
Osušeni sadržaj (ekstrakt lipida) resuspendiran je u 200 µL kloroforma, kako bi bio spreman za Ekstrakciju Čvrstom Fazom, SPE. Opisana procedura za svaku od 20 namirnica učinjena je po tri puta.

3.2.2. Ekstrakcija FAHFA Čvrstom Fazom

SPE je izvedena prema metodi opisanoj u studiji iz 2014. godine, koja je detektirala FAHFA kao do tada nepoznatu vrstu lipida (83) te studiji iz 2016. godine koja je za mjerenje FAHFA koristila tekuću kromatografiju i spektrometriju masa (103).

SPE kolona se najprije kondicionirala sa 16 mL heksana, a potom se na nju pipetom nanijelo 200 µL uzorka. Heksan je korišten kao nepolarno otapalo uz koje se postiže optimalna retencija prilikom nanošenja uzorka. Nakon toga uslijedilo je ispiranje neutralnih lipida sa 16 mL otopine 5% etilacetat/heksan, a zatim ispiranje FAHFA lipida sa 16 mL etilacetata.

Eluat s FAHFA lipidima osušen je u mikroepruvetama u vakuumskom koncentratoru pri sobnoj temperaturi. Na osušeni ekstrakt pipetom je dodano 30 µL 50%-tnog metanola prije nego je uzorak podvrgnut daljnjoj analizi na nanoUPLC-ESI (engl. Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization) sustavu. Postupak je shematski prikazan na slici 15.



Slika 16. Ekstrakcija FAHFA Čvrstom Fazom

Opisana procedura za svaku od 20 namirnica učinjena je po tri puta.

3.2.3. Tekuća kromatografija i razdvajanje FAHFA

Budući da su FAHFA izuzetno hidrofobne, njihovo odvajanje rezultira značajnim proširenjem šiljaka (signala) tijekom provođenja reverzne faze HPLC-a uz metanol i vodu kao mobilnu fazu. Kako bi se ovaj problem minimizirao, za kromatografsko razdvajanje korištena je UPLC metoda, a za mobilnu fazu je kao organski modifikator korištena mješavina acetonitrila i izopropilnog alkohola, s optimiziranim elucijskim gradijentom.

Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na Waters XTerra MSC18 3.5 µm NanoEase analitičkoj koloni (75µm × 150mm). Izokratsko ispiranje proteklo je konstantnim protokom od 0.7 µL/min, tijekom 30 minuta, uz metanol i pufer vodene faze u odnosu 93:7. Pufer vodene faze sačinjen je od 5mM amonijevog acetata i 0,01% amonijevog hidroksida.

3.3. Analiza FAHFA spektrometrijom masa

U svrhu detekcije nepoznatog FAHFA sastava izabrane hrane, implementirani su mikro- i nano- LC/ESI-MS sustavi, uz korištenje etil-metanoata kao postkolumnog modifikatora mobilne faze. Recentno istraživanje pokazalo je kako je etil-metanoat

najpotentniji od svih ispitanih (2,2-dimetilpropanal (2,2-DMP), etil-metanoat (EM), 2-fenil-2-okosoetanal i formaldenid) strukturno sličnih, hlapivih modifikatora (135). U lipidomičkim analizama ovakav je koncept pojačane ionizacije negativnih iona mikro i nano-elektroraspršenjem sada korišten po prvi puta, prema literaturi dostupnoj u trenutku izvođenja analize.

Uz uvjete istovjetne onima koji se primjenjuju u ionizaciji pozitivnih iona, uporabom modifikatora etil-metanoata postignuta je optimalna osjeljivost koja je omogućila ekstremno nisku razinu detekcije (10^{-9} g) u negativnom ionizacijskom modu. Time je ostvaren preduvjet za kvantifikaciju različitih razreda FAHFA u nanogramskim razinama.

Mjerenje FAHFA vršeno je na Waters ESI q-TOF Synapt G2-Si spektrometru masa u rezolucijskom modu, vezanom s Waters nanoAcquity UPLC sustavom, u MRM modu (engl. Multiple Reaction Monitoring) negativnih iona.

Parametri mjernih instrumenata postavljeni su uz pomoć Mass Lynx softvera, verzije 4.1, slijedećim poretkom:

- način negativne rezolucije,
- desolvatacijski tlak dušika 0,6 bar pri temperaturi od 80 °C,
- kapilarni napon 3.5 kV,
- napon konusa 10 V.

Vrijeme dobivanja spektra iznosilo je jednu sekundu.

Svaki ekstrahirani i frakcionirani uzorak rekonstituiran je u 100 µL otopine metanola i vode (1:1, v/v), a za analizu se tako otopljen uzorak aplicirao u volumenu od 0.4 µL.

Standardne otopine 5-PAHSA pripremljene su u pet različitih koncentracija: 0.002 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.02 ng/mL, 0.1 ng/mL i 0.2 ng/mL, u otopini metanola i vode (1:1, v/v) te injicirane u triplikatima.

Moguće MRM tranzicije za 5-PAHSA su bile: m/z 537.5 → 255.2, m/z 537.5→ 281.2 te m/z 537.5→ 299.3, tablica 6.

Tablica 6. Moguće MRM tranzicije za FAHFA

	Prekursor Ion	**Produkt Ion**
POHPO	505.4	253.2
		251.2
POHPA	507.4	253.2
		271.2
PAHPO	507.4	255.2
		251.2
PAHPA	509.5	255.2
		253.2
POHOA	533.5	253.2
		279.2
OAHPO	533.5	281.2
		251.2
PAHOA	535.5	255.2
		279.2
OAHPA	535.5	281.2
		253.2
POHSA	535.5	253.2
		281.2
SAHPO	535.5	283.2
		251.2
PAHSA	537.5	255.2
		281.2
		299.3
SAHPA	537.5	283.2
		253.2
OAHOA	561.5	281.2
		279.2
OAHSA	563.5	281.2
		299.3
SAHOA	563.5	283.3
		279.2
SAHSA	565.5	283.3
		281.2

Tijekom kvantitativne analize identificiranih FAHFA koristile su se deuterirane inačice FAHFA internih standarada. Kvantifikacija se provodila na instrumentu Synapt Si-2G spektrometar masa. Procijenjeni ekstrakcijski oporavak za tri koncentracijske razine kretao se u intervalu od 93-106%, za testirane koncentracije, sa preciznošću ispod 15% izraženu kao %RSD. Kolizijska energija za sve tranzicije bila je namještena na 25eV.

3.4. Statistička analiza

Podatci su prikazani deskriptivno putem apsolutnih brojeva i mjera centralne tendencije (aritmetička sredina i standardna devijacija), rasponom statističkog obilježja, te granicama interkvartilnog raspona, te grafički putem linijskih i stupčastih dijagrama sa linijom trenda.

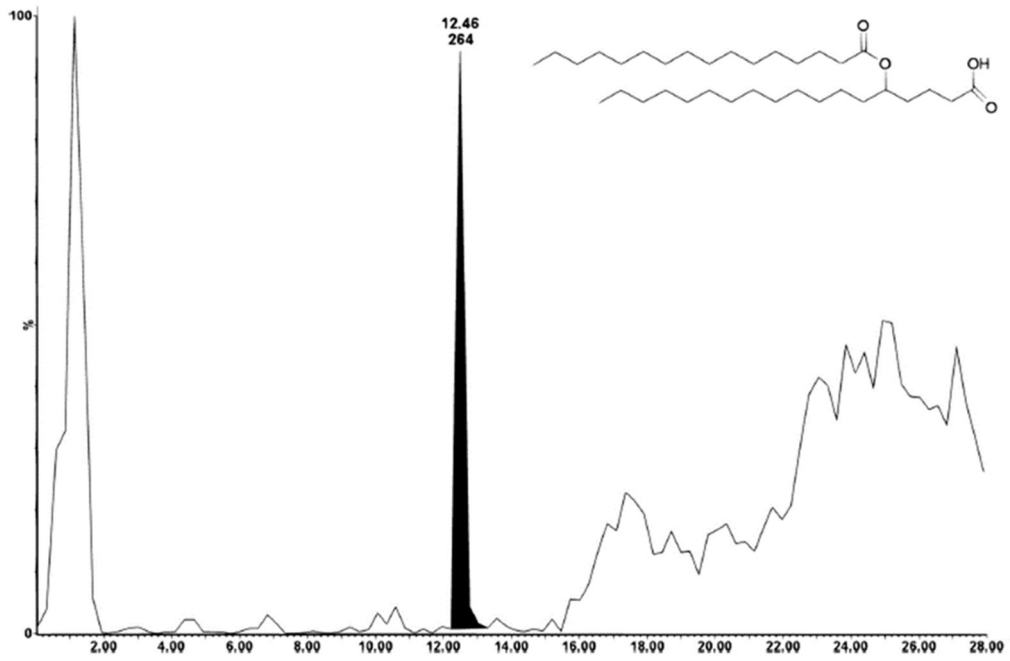
Za grupiranje skalarnih obilježja korištena je faktorska analiza glavnih komponenti (PCA), izvršena je rotacija faktorske matrice putem Varimax metode s Kaiserovom normalizacijom, a rezultati faktorske analize prikazani su kao grupirane vrijednosti navedenih namirnica i kiselina. Kako bi se bolje ispitali odnosi (pozitivan i negativan stupanj povezanosti) unutar promatranih FAHFA i namirnica, provedeno je testiranje putem Spearmanovog koeficijenta korelacije.

Za statističke analize korišten je programski paket SPSS (engl. Statistical Package for the Social Sciences), verzija 26. Za izradu dijagrama korišten je program Microsoft Office Home and Business 2019.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Krucijalni korak u prevenciji i liječenju metaboličkog sindroma, kao ključnog faktora rizika za razvoj dijabetesa i kardiovaskularnih oboljenja, jest optimiziranje prehrane i tjelesne aktivnosti. Važno je u svakodnevnu prehranu uključiti što više funkcionalne hrane koja će osigurati adekvatan unos makro- i mikronutrijenata. U svrhu ostvarivanja što intenzivnijeg protuupalnog učinka i metaboličkih benefita, namirnice pogodne za osobe oboljele od metaboličkog sindroma i dijabetesa jesu one s visokim udjelom topivih i netopivih vlakana, antioksidansa, vitamina, minerala i nezasićenih masti te one sa niskim glikemijskim indeksom. U posljednje vrijeme sve je veći naglasak na zdravstvenim benefitima vegetarijanske prehrane, odnosno na pozitivnim metaboličkim i protektivnim učincima hrane biljnoga podrijetla. Kontinuirano se otkrivaju novi razredi mikronutrijenata, od kojih mnogi pokazuju protuupalno i antikarcinogeno djelovanje te ostvaruju pozitivne učinke na homeostazu glikemije i lipida te metabolizam općenito. Jedan od mikronutrijenata koji posljednjih pet godina budi znanstveni interes jesu i hidroksiesteri masnih kiselina, FAHFA, koje pokazuju inzulin-senzitizirajuće i hipoglikemizantno djelovanje, stimuliraju de nove lipogenezu i (re)esterifikaciju masti te ostvaruju protuupalni učinak aktivacijom određenog profila makrofaga i inaktivacijom kaskadnog sustava upalnih citokina. Navedeni učinci su u dosadašnjim istraživanjima potvrđeni primjenom sintetiziranih FAHFA (i njihovih analoga), najčešće parenteralnim putem. Niti u jednom istraživanju nije ispitan FAHFA sastav hrane, kao niti djelovanje FAHFA unesenih u nativnom obliku i fiziološkim razinama (prisutnima u hrani). Ovim istraživanjem po prvi je puta učinjena analiza FAHFA u hrani biljnoga podrijetla, pri čemu je detaljna kvalitativna i kvantitativna analiza FAHFA sadržaja omogućena uporabom spektrometra masa u rezolucijskom modu, vezanom s UPLC sustavom, u MRM modu negativnih iona. Pritom je po prvi puta u lipidomičkim analizama korištena mikro- i nano- ionizacija elektrosprejem u negativnom ionu, uz uporabu etil metanoata kao postkolumnog modifikatora mobilne faze.

Uzorci odabranih namirnica biljnoga podrijetla pripremljeni su za analizu u skladu s postupnicima opisanim u literaturi dostupnoj do trenutka izvođenja ovog istraživanja (83, 106). Korištenjem ekstrakcije čvrstom fazom, uz uporabu silika-kolone te otopina heksana i etilacetata, odvojeni su neutralni lipidi od FAHFA, a FAHFA eluat je potom u metanolu pripremljen za kromatografsko odvajanje. Kromatografskim odvajanjem je najprije, uz korištenje PAHSA standarda, izoliran signal na razini detekcije od 1 pg/mL, slika 17.



Slika 17. Kromatogram 5-PAHSA u MRM modu negativnih iona
sa MRM tranzicijama m/z 537.5→255.2 i m/z 537.5→281.2 za LOD 1 pg/mL.

Visoka razina detekcije postignuta je uporabom nanoUPLC sustava, točnije korištenjem čvrste faze izuzetno malog promjera silika RP C-18 čestica (1,7 μm). Kromatografsko odvajanje podrazumijevalo je metodu reverzne faze, koja je uključivala hidrofobnu čvrstu fazu te hidrofilnu mobilnu fazu. Hidrofobna čvrsta faza dobivena je vezivanjem alkilnih lanaca (C18) na silika čestice, dok je hidrofilna mobilna faza dobivena miješanjem acetonitrila i izopropamola, uz važnu napomenu da su molekule alkilnih lanaca i silike dodatno umrežene kako bi izdržale izuzetno visoke primijenjene tlakove od 70 MPa. Molekule FAHFA otopljene u mobilnoj fazi, zbog svoje su se izrazite hidrofobnosti prolaskom kroz nanoUPLC kolonu višestruko i opetovano adsorbirale i odvajale od hidrofobne čvrste faze, omogućavajući tako inicijalno odvajanje te izlazak izrazito hidrofobnih molekula iz mobilne faze u nepokretnu i natrag, a sve prema redosljedu hidrofobnosti analita FAHFA. Izuzetno maleni promjer i veličina čestica nanoUPLC kolone omogućila je mnogostruki porast broja interakcija FAHFA sa čvrstom fazom i time bolju selektivnost te u konačnici intenzivniji signal svakog FAHFA analita. Na temelju različitih retencijskih vremena, izdvojeno je 15 signala odnosno vrsta FAHFA.

Dodavanjem etil metanoata uzorku FAHFA po izlasku s nanoUPLC kolone, neposredno prije podvrgavanja uzorka elektrosprej ionizaciji, omogućilo je optimalnu osjetljivost metode jer se dodatkom navedenog modifikatora omogućila ionizacija u negativnom načinu rada, gdje su neželjene interferencije koje dolaze iz mobilne faze svedene na minimum. Etil metanoat odabran je kao hlapivi postkolumni modifikator mobilne faze budući da se u recentnom proteomičkom istraživanju pokazao najpotentnijim pojačivačem negativnog ESI odgovora (135), a u ovome je radu po prvi puta korišten u lipidomičkim analizama. Budući da je izokratsko ispiranje vršeno uz metanol i pufer vodene faze (u odnosu 93:7), dodavanje hlapivog postkolumnog modifikatora mobilnoj fazi s izopropanolom neophodno je u svrhu smanjivanja površinske napetosti uzorka koji ulazi u proces ionizacije. Prisustvo vode (u puferu vodene faze) u uzorku povisuje njegovu površinsku napetost i time uzrokuje smetnje u procesu ionizacije. Također, izrazito malen volumen kapljice (100-200 nm) uz mikro protok od 1 μL min^{-1} pojačava osjetljivost sustava. Stoga se dodavanjem postkolumnog modifikatora etil metanoata uzorku otopljenom u isopropanolu te ispranom vodenim otapalom, postiže održavanje vode u ravnoteži neprekidnim vezanjem i otpuštanjem njenih molekula, čime se sprečava stvaranje električnih izboja u električnom polju elektrospreja, koje bi u potpunosti onemogućilo ionizaciju. Postupkom elektroraspršenja negativnih iona uz dodatak modigfikatora uslijed deprotonacije karboksilnih nastavaka FAHFA, dobiveni su jednostruko negativno nabijeni molekularni FAHFA ioni te im je pridružena određena kinetička energija s kojom ulaze u prvi kvadrupol spektrometra masa. Na ovaj način minimizirane su pozadinske smetnje uzrokovane eksplozijom molekula vode te su postignute maksimalne kinetičke energije i maksimalnan broj stvorenih iona za svaki pojedinačni FAHFA razred. Time je omogućena ekstremno niska razina detekcije (10^{-9} g) u negativnom načinu rada spektrometra masa, čime je ostvaren preduvjet za spektrometrijsku kvantifikaciju različitih razreda FAHFA u nanogramskim razinama.

Razina detekcije FAHFA na taj način kretala se oko 1 pg/mL, dok je kvantifikacija vršena pri razini od 10 pg/mL.

4.1. Kvalitativna analiza FAHFA

Kvalifikacija FAHFA sastava izvršena je u 20 namirnica biljnog podrijetla, od čega 10 iz skupine voća, 7 iz skupine povrća i tri oblika žitarice (zobi) u različitim oblicima i stupnjevima obrade. U okvir za izbor uzorka ušlo je 60 namirnica (iz skupine voća i povrća) aktualno dostupnih u svježem, nezamrznutom i neprerađenom obliku u lokalnim trgovinama i na tržnicama. Namirnice za analizu odabrane su metodom slučajnog uzorka, uz korištenje tablica slučajnih brojeva, a jedini kriteriji klasifikacije bili su biljno podrijetlo i nizak glikemijski indeks. Sve namirnice u okviru za izbor uzorka sastavnica su kako svakodnevnih jelovnika, od kojih su mnoge i sastavnica ciljanih jelovnika u osoba s metaboličkim poremećajima poput dijabetesa, debljine i dislipidemije. Zob, kao žitarica koja je česta sastavnica kako svakodnevnih tako i specijaliziranih jelovnika, namjerno je odabrana u uzorak, te je u analizu uključeno više stupnjeva njezine obrade, kako bi se mogao promotriti utjecaj procesiranja na sadržaj FAHFA.

U odabranim namirnicama učinjena je analiza 16 razreda FAHFA: POHPO, POHPA, PAHPO, PAHPA, POHOA, OAHPO, PAHOA, OAHPA, POHSA, PAHSA, SAHPA, OAHOA, OAHSA, SAHOA, SAHSA i SAHPO. Pritom su OAHPA i POHSA analizirane kao jedan entitet, budući da ih je radi zanemarivih razlika u kromatografskim retencijskim vremenima i spektrometrijskoj fragmentaciji bilo nemoguće analizirati odvojeno. Fragmentacija je vršena trostrukim kvadrupolom, pri čemu je prvi kvadrupol ciljano izdvajao molekularne ione prema unaprijed zadanim omjerima mase i naboja (*m/z*), drugi kvadrupol djelovanjem argona te prekursorne molekularne ione disocirao u produkt ione, a treći kvadrupol propuštao ciljane produkt ione, prema unaprijed zadanim tranzicijama.

Rezultati kvalitativne analize ukazuju kako su FAHFA s najvećom zastupljenosti, odnosno prisutnosti u najvećem broju namirnica, SAHOA i SAHSA (pronađene u 19 od 20 analiziranih namirnica). Potom slijede PAHPO sa prisutnošću u 17 od 20 analiziranih namirnica, PAHPA i OAHPA+POHSA sa prisutnošću u 16 od 20 analiziranih namirnica te POHPO sa prisutnošću u 15 od 20 analiziranih namirnica. Kao FAHFA s najmanjom zastupljenosti, odnosno prisutne u najmanjem broju namirnica, pokazale su se SAHPO sa prisutnošću u 3 od 20 analiziranih namirnica, SAHPA i OAHSA sa prisutnošću u 4 od 20 analiziranih namirnica te PAHOA sa prisutnošću u 6 od 20 analiziranih namirnica. Promatrano kroz namirnice (tablica 8.), analiza je pokazala kako je najveći broj FAHFA

razreda prisutan u klementini (15 od analiziranih 16 razreda), cjelovitoj zobi (13 od analiziranih 16 razreda), jagodi (13 od analiziranih 16 razreda) i češnjaku (12 od analiziranih 16 razreda). Najmanji je broj FAHFA razreda, sa samo 3 od analiziranih 16 razreda, pronađen u sitnim, instant zobenim pahuljicama.

Tablica 7. Zastupljenost FAHFA u analiziranim namirnicama biljnog podrijetla

Namirnica	**Broj FAHFA razreda**
Klementina	15
Cjelovita zob	13
Jagoda	13
Češnjak	12
Ananas	11
Avokado	10
Jabuka	9
Banana	9
Peršin (korijen)	9
Mrkva (korijen)	8
Krupne zobene pahuljice	8
Paprika	7
Cherry rajčica	7
Limun	7
Kivi	7
Borovnica	7
Rotkvica	7
Luk	7
Mango	6
Sitne instant zobene pahuljice	3

4.2. Kvantitativna analiza FAHFA

U svrhu spektrometrijske analize masenih frakcija FAHFA korišten je hibridni sustav ESI-MS-qTOF, gdje je nakon kvantitativne analize trostrukim kvadrupolom detektija vršena u analizatoru vremena leta u kojem se pod utjecajem električnog polja ubrzavaju produkt ioni te potom mjeri njihovo vrijeme pristizanja do detektora. Budući da su sve FAHFA, odnosno njihovi produkt ioni, imale jednak naboj i jednake kinetičke energije, njihova brzina dolaska do detektora ovisila je jedino o njihovoj masi. Na detektor su pristigli najprije ioni najniže mase, a posljednji su pristigli oni najviših masa.

Na taj način je ionizacija i fragmentacija iona prevedena u masu te su velikom snagom spektrometrijske rezolucije izmjerene nano- do piko-molarne razine FAHFA. Dobivenim spektrom masa, uz usporedbu s internim standardima FAHFA, zamijećena je značajna varijabilnost razreda FAHFA među analiziranim namirnicama, tablica 8.

Iz prikazanih podataka vidljivo je kako je ukupno najveća količina FAHFA prisutna u cjelovitoj zobi ($3.20 \pm 0.03 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice) i klementini ($2.51 \pm 0.02 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice). Ostale namirnice ukupno bogate FAHFA su češnjak, ananas, jagoda, mango i mrkva.

Najmanja ukupna količina FAHFA pronađena je u sitnim, instant zobenim pahuljicama ($0.17 \pm 0.08 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice). Značajna razlika u količini ukupnih FAHFA između cjelovite, sirove zobi i zobi koja je podvrgnuta procesima instantizacije vjerojatno se može pripisati pojačanom raspadu FAHFA prilikom termalne i mehaničke obrade. Ostale namirnice s niskom ukupnom količinom FAHFA su kivi, borovnica i rotkvica.

FAHFA za koju su izmjerene najveće razlike u koncentracijama među namirnicama jesu SAHSA ($4.61–9.45 \pm 0.04 \times 10^{-8}$ g/g svježe namirnice), SAHOA ($2.82–5.89 \pm 0.04 \times 10^{-8}$ g/g svježe namirnice) i PAHPA ($2.13–4.59 \pm 0.05 \times 10^{-8}$ g/g svježe namirnice). FAHFA za koju su izmjerene najmanje razlike u koncentracijama među namirnicama jesu OAHSA ($0.2–1.2 \pm 0.1 \times 10^{-8}$ g/g svježe namirnice) i SAHPO ($0.4–1.0 \pm 0.1 \times 10^{-8}$ g/g svježe namirnice).

Tablica 8. Kvantifikacija pojedinih FAHFA u 1 gramu odabranih 20 namirnica biljnog podrijetla.

	PAHSA	**SAHPA**	**OAHPA + POHSA**	**SAHPO**	**SAHOA**	**SAHSA**	**OAHOA**	**OAHSA**	**PAHPO**	**PAHPA**	**POHPO**	**POHPA**	**PAHOA**	**POHOA**	**OAHPO**	**Ukupno**
Peršin (korijen)	$7{,}22 \times 10^{-9}$	$6{,}54 \times 10^{-9}$	$1{,}75 \times 10^{-8}$	0	$1{,}70 \times 10^{-8}$	$2{,}70 \times 10^{-8}$	0	0	$4{,}47 \times 10^{-9}$	0	$3{,}60 \times 10^{-9}$	$1{,}26 \times 10^{-8}$	0	$1{,}75 \times 10^{-8}$	0	$1{,}13 \times 10^{-7}$
Rotkvica	0	0	$6{,}71 \times 10^{-9}$	0	$8{,}19 \times 10^{-9}$	$6{,}68 \times 10^{-9}$	0	0	0	$1{,}75 \times 10^{-8}$	0	$7{,}35 \times 10^{-9}$	0	$7{,}71 \times 10^{-9}$	$5{,}98 \times 10^{-9}$	$6{,}01 \times 10^{-8}$
Mrkva	$4{,}89 \times 10^{-9}$	0	$5{,}26 \times 10^{-9}$	0	$2{,}41 \times 10^{-8}$	$3{,}24 \times 10^{-8}$	0	0	$2{,}22 \times 10^{-8}$	$4{,}59 \times 10^{-8}$	$1{,}99 \times 10^{-9}$	0	$4{,}16 \times 10^{-9}$	0	0	$1{,}41 \times 10^{-7}$
Klementina	$3{,}36 \times 10^{-8}$	$1{,}37 \times 10^{-8}$	$2{,}42 \times 10^{-8}$	0	$4{,}51 \times 10^{-8}$	$7{,}35 \times 10^{-8}$	$5{,}31 \times 10^{-9}$	$2{,}67 \times 10^{-9}$	$3{,}32 \times 10^{-9}$	$7{,}52 \times 10^{-9}$	$1{,}55 \times 10^{-8}$	$3{,}13 \times 10^{-9}$	$6{,}23 \times 10^{-9}$	$5{,}16 \times 10^{-9}$	$1{,}06 \times 10^{-8}$	$2{,}50 \times 10^{-7}$
Ananas	$1{,}71 \times 10^{-8}$	0	$4{,}01 \times 10^{-8}$	0	$3{,}14 \times 10^{-8}$	$5{,}73 \times 10^{-8}$	$1{,}15 \times 10^{-8}$	0	$7{,}35 \times 10^{-9}$	$1{,}88 \times 10^{-8}$	$9{,}33 \times 10^{-9}$	$1{,}86 \times 10^{-8}$	0	0	$5{,}50 \times 10^{-9}$	$2{,}17 \times 10^{-7}$
Cjelovita zob	$4{,}10 \times 10^{-8}$	0	$1{,}84 \times 10^{-8}$	0	$1{,}22 \times 10^{-8}$	$3{,}03 \times 10^{-8}$	$2{,}83 \times 10^{-8}$	0	$6{,}88 \times 10^{-9}$	$2{,}84 \times 10^{-8}$	$8{,}05 \times 10^{-8}$	$4{,}01 \times 10^{-8}$	$1{,}22 \times 10^{-8}$	$4{,}29 \times 10^{-9}$	$1{,}71 \times 10^{-8}$	$3{,}20 \times 10^{-7}$
Češnjak	$2{,}08 \times 10^{-8}$	0	$2{,}46 \times 10^{-8}$	$1{,}03 \times 10^{-8}$	$5{,}89 \times 10^{-8}$	$9{,}45 \times 10^{-8}$	0	0	$4{,}02 \times 10^{-9}$	$6{,}57 \times 10^{-9}$	$4{,}05 \times 10^{-9}$	0	$9{,}58 \times 10^{-9}$	$3{,}60 \times 10^{-9}$	$6{,}47 \times 10^{-9}$	$2{,}43 \times 10^{-7}$
Luk	$1{,}60 \times 10^{-8}$	0	$1{,}18 \times 10^{-8}$	0	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$4{,}61 \times 10^{-8}$	0	0	0	0	0	0	$4{,}64 \times 10^{-9}$	$1{,}58 \times 10^{-9}$	$4{,}41 \times 10^{-9}$	$1{,}13 \times 10^{-7}$
Avokado	0	$4{,}54 \times 10^{-9}$	$6{,}50 \times 10^{-9}$	$3{,}92 \times 10^{-9}$	$1{,}59 \times 10^{-8}$	$2{,}58 \times 10^{-8}$	0	$2{,}53 \times 10^{-9}$	$5{,}79 \times 10^{-9}$	$8{,}94 \times 10^{-9}$	$9{,}31 \times 10^{-9}$	$3{,}14 \times 10^{-9}$	0	0	0	$8{,}64 \times 10^{-8}$
Mango	0	0	$1{,}83 \times 10^{-9}$	0	$6{,}25 \times 10^{-9}$	$6{,}65 \times 10^{-8}$	$1{,}03 \times 10^{-8}$	0	$2{,}65 \times 10^{-8}$	$4{,}05 \times 10^{-8}$	0	0	0	0	0	$1{,}52 \times 10^{-7}$
Limun	0	0	0	0	$4{,}70 \times 10^{-9}$	$4{,}62 \times 10^{-9}$	0	0	$6{,}49 \times 10^{-9}$	$6{,}80 \times 10^{-9}$	$3{,}57 \times 10^{-9}$	0	0	$2{,}65 \times 10^{-8}$	$2{,}41 \times 10^{-8}$	$7{,}68 \times 10^{-8}$
Paprika	$9{,}29 \times 10^{-9}$	0	$4{,}20 \times 10^{-9}$	0	$3{,}08 \times 10^{-8}$	$3{,}65 \times 10^{-8}$	0	0	0	0	$5{,}67 \times 10^{-9}$	$1{,}44 \times 10^{-8}$	0	0	$2{,}78 \times 10^{-9}$	$1{,}04 \times 10^{-7}$
Sitne zobene pahuljice	0	0	0	0	0	0	0	0	$5{,}17 \times 10^{-9}$	$7{,}20 \times 10^{-9}$	0	$4{,}14 \times 10^{-9}$	0	0	0	$1{,}65 \times 10^{-8}$
Krupne zobene pahuljice	$2{,}01 \times 10^{-8}$	0	$8{,}28 \times 10^{-9}$	0	$9{,}72 \times 10^{-9}$	$2{,}24 \times 10^{-8}$	0	0	$5{,}18 \times 10^{-9}$	0	$5{,}71 \times 10^{-9}$	0	0	0	$6{,}17 \times 10^{-9}$	$7{,}75 \times 10^{-8}$
Cherry rajčica	0	0	$9{,}26 \times 10^{-9}$	0	0	$1{,}71 \times 10^{-8}$	$2{,}72 \times 10^{-8}$	$1{,}21 \times 10^{-8}$	$1{,}17 \times 10^{-8}$	$9{,}29 \times 10^{-9}$	0	0	0	$2{,}98 \times 10^{-9}$	0	$8{,}97 \times 10^{-8}$
Jabuka	$5{,}60 \times 10^{-9}$	0	$3{,}71 \times 10^{-9}$	0	$6{,}04 \times 10^{-9}$	$6{,}83 \times 10^{-9}$	0	0	$1{,}03 \times 10^{-8}$	$2{,}13 \times 10^{-8}$	$1{,}55 \times 10^{-8}$	$3{,}17 \times 10^{-8}$	0	$2{,}24 \times 10^{-9}$	0	$1{,}03 \times 10^{-7}$
Borovnica	$4{,}30 \times 10^{-9}$	0	0	0	$9{,}37 \times 10^{-9}$	$1{,}29 \times 10^{-8}$	0	0	$4{,}32 \times 10^{-9}$	$5{,}67 \times 10^{-9}$	$1{,}06 \times 10^{-8}$	$5{,}16 \times 10^{-9}$	0	0	0	$5{,}23 \times 10^{-8}$
Jagoda	$1{,}04 \times 10^{-8}$	$1{,}09 \times 10^{-8}$	$1{,}80 \times 10^{-8}$	$7{,}76 \times 10^{-9}$	$5{,}63 \times 10^{-9}$	$2{,}07 \times 10^{-8}$	$7{,}98 \times 10^{-9}$	0	$1{,}80 \times 10^{-8}$	$1{,}48 \times 10^{-8}$	$2{,}18 \times 10^{-8}$	$1{,}73x \times 10^{-8}$	0	0	$5{,}18 \times 10^{-9}$	$1{,}58 \times 10^{-7}$
Banana	$3{,}79 \times 10^{-9}$	0	$1{,}16 \times 10^{-8}$	0	$7{,}01 \times 10^{-9}$	$6{,}44 \times 10^{-9}$	0	0	$1{,}36 \times 10^{-8}$	$3{,}66 \times 10^{-8}$	$1{,}41 \times 10^{-8}$	$3{,}51 \times 10^{-9}$	$6{,}56 \times 10^{-9}$	0	0	$1{,}03 \times 10^{-7}$
Kivi	0	0	0	0	$6{,}58 \times 10^{-9}$	$8{,}28 \times 10^{-9}$	$3{,}35 \times 10^{-9}$	$1{,}92 \times 10^{-9}$	$6{,}10 \times 10^{-9}$	$9{,}88 \times 10^{-9}$	$8{,}76 \times 10^{-9}$	0	0	0	0	$4{,}49 \times 10^{-8}$

PAHSA, kao jedina FAHFA koja je u prethodnim istraživanjima kvantitativno analizirana u hrani (jabuka, brokula, jaje, piletina i govedina), pokazala je prosječnu zastupljenost (prisutna je u 13 od 20 analiziranih namirnica), uz prosječne ukupne koncentracije ($3.78 \pm 0.07 \times 10^{-9}$ g/g - $4.15 \pm 0.08 \times 10^{-8}$ g/g svježe namirnice). Štoviše, u nekim namirnicama koje imaju dokazane metaboličke i zdravstvene benefite (avokado, limun, kivi, mango, cherry rajčica, rotkvica) uopće nije pronađena.

Ukoliko se promatra postotni udio analiziranih FAHFA u odabranim namirnicama, zamjećuje se da u većini namirnica najveći udio imaju SAHSA, PAHPA, POHPO, POHOA, OAHOA i POHPA (tablica 9.).

Pritom u većini namirnica najveći udio imaju SAHSA (peršin, klementina, češnjak, luk, avokado, mango, paprika, borovnica, jagoda) i PAHPA (rotkvica, mrkva, banana, kivi, krupne i sitne zobene pahuljice).

Na primjeru zobi primijećeno je kako obrada, odnosno stupanj instantizacije utječe na sastav FAHFA te kako se postotni udio i omjeri FAHFA razreda mijenjaju. Tako je u cjelovitoj zobi prisutno 13 razreda FAHFA u ukupnoj koncentraciji od $3.20 \pm 0.03 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice, u grubim pahuljicama (obrađenim samo u vidu rezanja na sitnije komadiće) broj razreda FAHFA pada na 8, uz ukupnu koncentraciju od $0.77 \pm 0.08 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice, dok su u sitnim, instant pahuljicama (podvrgnuim višestrukim mehaničkim postupcima u vidu rezanja, mljevenja, rolanja i stiskanja te termičkoj obradi) pronađena svega tri FAHFA razreda u ukupnoj koncentraciji od $0.16 \pm 0.02 \times 10^{-7}$ g/g svježe namirnice, koja je ujedno i najniža ukupna koncentracija izmjerena u svih 20 namirnica.

Tablica 9. Postotni udio FAHFA u odabranim namirnicama

	PAHSA	SAHPA	OAHPA + POHSA	SAHPO	SAHOA	SAHSA	OAHOA	OAHSA	PAHPO	PAHPA	POHPO	POHPA	PAHOA	POHOA	OAHPO	Ukupno
Peršin (korijen)	6,22%	5,70%	15,34%	0,00%	14,99%	24,01%	0,00%	0,00%	3,94%	0,00%	3,16%	11,13%	0,00%	15,51%	0,00%	100,00%
Rotkvica	0,00%	0,00%	11,33%	0,00%	13,83%	11,00%	0,00%	0,00%	0,00%	29,00%	0,00%	12,17%	0,00%	12,67%	10,00%	100,00%
Mrkva	3,49%	0,00%	3,77%	0,00%	17,16%	22,71%	0,00%	0,00%	15,81%	32,75%	1,40%	0,00%	2,92%	0,00%	0,00%	100,00%
Klementina	13,50%	5,51%	9,67%	0,00%	17,98%	29,57%	2,12%	1,06%	1,33%	3,04%	6,19%	1,24%	2,48%	2,04%	4,28%	100,00%
Ananas	7,88%	0,00%	18,07%	0,00%	14,41%	26,88%	5,33%	0,00%	3,38%	8,71%	4,31%	8,48%	0,00%	0,00%	2,55%	100,00%
Cjelovita zob	12,95%	0,00%	5,74%	0,00%	3,87%	9,49%	8,83%	0,00%	2,15%	8,77%	25,27%	12,48%	3,74%	1,31%	5,40%	100,00%
Češnjak	8,52%	0,00%	10,08%	4,18%	24,59%	38,52%	0,00%	0,00%	1,65%	2,66%	1,68%	0,00%	3,98%	1,47%	2,66%	100,00%
Luk	14,11%	0,00%	10,56%	0,00%	25,02%	40,82%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	4,17%	1,41%	3,90%	100,00%
Avokado	0,00%	5,25%	7,59%	4,67%	18,45%	29,43%	0,00%	2,97%	6,66%	10,39%	10,98%	3,62%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Mango	0,00%	0,00%	1,20%	0,00%	4,10%	43,68%	6,82%	0,00%	17,47%	26,74%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Limun	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	6,11%	5,98%	0,00%	0,00%	8,45%	8,97%	4,60%	0,00%	0,00%	34,57%	31,32%	100,00%
Paprika	9,05%	0,00%	4,06%	0,00%	29,84%	35,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,39%	13,96%	0,00%	0,00%	2,67%	100,00%
Sitne zobene pahuljice	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	31,33%	43,37%	0,00%	25,30%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Krupne zobene pahuljice	26,16%	0,00%	10,57%	0,00%	12,50%	28,99%	0,00%	0,00%	6,57%	0,00%	7,35%	0,00%	0,00%	0,00%	7,86%	100,00%
Cherry rajčica	0,00%	0,00%	10,27%	0,00%	0,00%	19,32%	30,15%	13,40%	13,07%	10,50%	0,00%	0,00%	0,00%	3,29%	0,00%	100,00%
Jabuka	5,44%	0,00%	3,54%	0,00%	5,82%	6,60%	0,00%	0,00%	10,00%	20,58%	15,14%	30,68%	0,00%	2,19%	0,00%	100,00%
Borovnica	8,21%	0,00%	0,00%	0,00%	18,05%	24,52%	0,00%	0,00%	8,17%	10,83%	20,52%	9,69%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
Jagoda	6,62%	6,88%	11,23%	4,92%	3,53%	13,12%	5,05%	0,00%	11,36%	9,27%	13,82%	10,98%	0,00%	0,00%	3,22%	100,00%
Banana	3,66%	0,00%	11,13%	0,00%	6,78%	6,19%	0,00%	0,00%	12,97%	35,81%	13,65%	3,43%	6,39%	0,00%	0,00%	100,00%
Kivi	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	14,71%	18,49%	7,53%	4,23%	13,59%	21,84%	19,61%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%

4.3. Statistička obrada podataka

Na slijedećim stranicama bit će prikazani rezultati statističke analize grupiranja FAHFA u analiziranim namirnicama, prema njihovom udjelu odnosno količini u svakoj namirnici.

Podatci su prikazani deskriptivno putem apsolutnih brojeva i mjera centralne tendencije (aritmetička sredina i standardna devijacija), rasponom statističkog obilježja, te granicama interkvartilnog raspona, a grafički putem linijskih i stupičastih dijagrama sa linijom trenda.

Za grupiranje skalarnih obilježja korištena je faktorska analiza glavnih komponenti (PCA), izvršena je rotacija faktorske matrice putem Varimax metode s Kaiserovom normalizacijom, a rezultati faktorske analize prikazani su kao grupirane vrijednosti analiziranih namirnica i FAHFA. Kako bi se bolje ispitali odnosi (pozitivan i negativan stupanj povezanosti) unutar FAHFA i namirnica, provedeno je testiranje putem Spearmanovog koeficijenta korelacije.

4.3.1. Faktorska analiza za promatrane kiseline

Na slijedećim stranicama bit će prikazani rezultati faktorske analize provedene za FAHFA. Pomoću faktorske analize ustanovit će se na koji način se FAHFA grupiraju i koji su to faktori koje se može izlučiti iz provedenog istraživanja.

Po Kaiser-Gutmannovom kriteriju (kriterij karakterističnih korijena ili eigen vrijednosti) u obzir se uzimaju samo oni faktori koji najbolje objašnjavaju promjenjivost varijabli tj. grupaciju po skupinama, odnosno samo faktori čija je vrijednost sume veća od jedan. Iz tablice D21. (Dodaci) može se iščitati da taj kriterij u ovom slučaju zadovoljava prvih šest faktora koji kumulativno objašnjavaju 85,496% ukupne varijance, dok na prvom faktoru leži najveće opterećenje i on objašnjava čak 28,356% ukupne varijance.

Osnovna kvalitativna obilježja svakog istaknutog faktora objašnjavaju se na osnovu faktorske matrice. Značenje dobivenih varijabli određuje se sukladno odnosu promatranih

čestica. Prilikom tumačenja koeficijenata faktorske analize, u obzir se uzimaju koeficijenti s apsolutnom vrijednošću većom od 0,3, a koji su istaknuti u tablicama D22. i D23. (Dodaci).

U tablici D23. prikazana je faktorska matrica koja je rotirana, odnosno provedena s Varimax s Kaiserovom normalizacijom. Na osnovu rezultata rotacije se provelo izlučivanje faktora. U provedenoj analizi svi koeficijenti imaju apsolutnu vrijednost veću od 0,565 (značajno višu od minimalno zadane vrijednosti koja iznosi 0,3). Uvidom u matricu faktorskog punjenja (tablica D23., Dodaci), uočava se kako šest navedenih faktora sadržavaju promatrane skupine FAHFA, te se u daljnjoj analizi ovih šest faktora uključilo u analizu (učini se grupiranje).

Prvi faktor sadrži kiseline: PAHSA, OAHPA + POHSA, SAHOA, SAHSA, PAHOA
Drugi faktor sadrži kiseline: POHPO, POHPA.
Treći faktor sadrži kiseline: PAHPO, PAHPA.
Četvrti faktor sadrži kiseline: POHOA, OAHPO.
Peti faktor sadrži kiseline: OAHOA, OAHSA
Šesti faktor sadrži kiseline: SAHPA, SAHPO.

Iz navedene analize nije jasna tendencija međusobnog grupiranja FAHFA niti prema duljini ugljikovog lanca, niti prema stupnju zasićenosti glavne kiseline, kao niti njezinog hidroksiestera. Činjenicu da su određeni FAHFA razredi u namirnicama češće prisutni zajedno, odnosno da se međusobno prate, je potrebno potvrditi na većem uzorku.

4.3.2. Spearmanov koeficijent korelacije

Kako bi se bolje ispitali odnosi između promatranih varijabli provede se Spearmanov koeficijent korelacije. Spearmanovom korelacijom izražava se međusobna povezanost dvije varijable. Vrijednost ovog testa kreće se u intervalu $-1 \leq r \leq +1$ pri čemu – predznak korelacije označava negativnu (obrnutu) korelaciju, dok + predznak označava pozitivnu korelaciju. Što je vrijednost Spearmanovog koeficijenta korelacije veća, kažemo da je korelacija između varijabli jača (značajnija).

Također se obično uzima u obzir i ovo:
$r>0,80$ radi se o jakoj pozitivnoj korelaciji
$0,5<r\leq0,80$ radi se o srednje jakoj pozitivnoj korelaciji
$0<r\leq0,5$ radi se o slaboj pozitivnoj korelaciji.

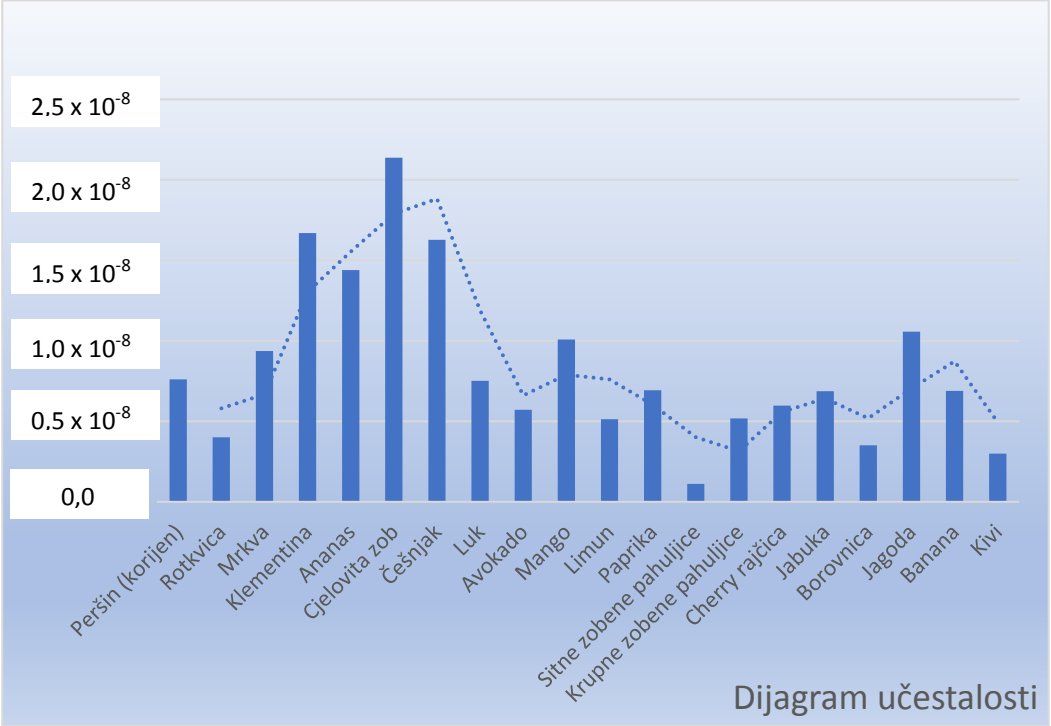
Za potrebe istraživanja komentiraju se koeficijenti korelacije veće od 0,5, $r>0,5$

U tablici D24. (Dodaci) naznačeni su značajniji koeficijenti korelacije, a iz navedene tablice može se uočiti kako je razina korelacije između većine varijabli pozitivna, dakle može se zaključiti kako se u većini promatranih slučajeva radi o korelacijama srednjeg i jakog intenziteta. Najveće korelacije zabilježene su između varijabli: SAHOA i SAHSA ($r=0,783$; $p<0,01$), PAHPO i PAHPA ($r=0,758$; $p<0,01$), te PAHSA i OAHPA + POHSA ($r=0,736$; $p<0,01$).

Iz tablice 10. može se iščitati prosječna vrijednost ukupne pojavnosti FAHFA kod navedenih namirnica, a vrijednosti su prikazane i grafički na slici 18. Iz navedenog se može iščitati kako su namirnice s najučestalijom pojavnošću, cjelovita zob, klementina, češnjak i ananas, dok su namirnice s najmanjom učestalošćusitna instant zob, kivi, borovnica i rotkvica.

Tablica 10. Prosječna vrijednost ukupne pojavnosti FAHFA kod navedenih namirnica

	N		$\bar{x}$	Sd	Min	Max	Interkvartilni raspon		
	Valjanih	Nedostaje					25	50	75
Peršin (korijen)	15	0	7,6067 x 10^{-9}	8,7910 x 10^{-9}	,0000	2,7400 x 10^{-8}	,0000	4,5000 x 10^{-9}	1,7100 x 10^{-8}
Rotkvica	15	0	4,0000 x 10^{-9}	5,1304 x 10^{-9}	,0000	1,7400 x 10^{-8}	,0000	,0000	7,3000 x 10^{-9}
Mrkva	15	0	9,3640 x 10^{-9}	1,4552 x 10^{-8}	,0000	4,6000 x 10^{-8}	,0000	1,9600 x 10^{-9}	2,2200 x 10^{-8}
Klementina	15	0	1,6685 x 10^{-8}	2,0312 x 10^{-8}	,0000	7,4000 x 10^{-8}	3,3200 x 10^{-9}	7,6000 x 10^{-9}	2,4200 x 10^{-8}
Ananas	15	0	1,4387 x 10^{-8}	1,6960 x 10^{-8}	,0000	5,8000 x 10^{-8}	,0000	9,3000 x 10^{-9}	1,8800 x 10^{-8}
Cjelovita zob	15	0	2,1367 x 10^{-8}	2,1631 x 10^{-8}	,0000	8,1000 x 10^{-8}	4,2000 x 10^{-9}	1,7300 x 10^{-8}	3,0400 x 10^{-8}
Češnjak	15	0	1,6267 x 10^{-8}	2,6502 x 10^{-8}	,0000	9,4000 x 10^{-8}	,0000	6,5000 x 10^{-9}	2,0800 x 10^{-8}
Luk	15	0	7,5127 x 10^{-9}	1,3371 x 10^{-8}	,0000	4,6000 x 10^{-8}	,0000	,0000	1,1900 x 10^{-8}
Avokado	15	0	5,7093 x 10^{-9}	7,0222 x 10^{-9}	,0000	2,5200 x 10^{-8}	,0000	4,0000 x 10^{-9}	8,9000 x 10^{-9}
Mango	15	0	1,0074 x 10^{-8}	1,9476 x 10^{-8}	,0000	6,6000 x 10^{-8}	,0000	,0000	1,0300 x 10^{-8}
Limun	15	0	5,1293 x 10^{-9}	8,6163 x 10^{-9}	,0000	2,6600 x 10^{-8}	,0000	,0000	6,5000 x 10^{-9}
Paprika	15	0	6,9260 x 10^{-9}	1,1716 x 10^{-8}	,0000	3,6400 x 10^{-8}	,0000	,0000	9,4000 x 10^{-9}
Sitne zobene pahuljice	15	0	1,1067 x 10^{-9}	2,3626 x 10^{-9}	,0000	7,2000 x 10^{-9}	,0000	,0000	,0000
Krupne zobene pahuljice	15	0	5,1733 x 10^{-9}	7,4351 x 10^{-9}	,0000	2,2500 x 10^{-8}	,0000	,0000	8,2000 x 10^{-9}
Cherry rajčica	15	0	5,9700 x 10^{-9}	8,2647 x 10^{-9}	,0000	2,7000 x 10^{-8}	,0000	,0000	1,1700 x 10^{-8}
Jabuka	15	0	6,8673 x 10^{-9}	9,3430 x 10^{-9}	,0000	3,1600 x 10^{-9}	,0000	3,6500 x 10^{-9}	1,0300 x 10^{-8}
Borovnica	15	0	3,5080 x 10^{-9}	4,5068 x 10^{-9}	,0000	1,2900 x 10^{-8}	,0000	,0000	5,7000 x 10^{-9}
Jagoda	15	0	1,0567 x 10^{-8}	7,5988 x 10^{-9}	,0000	2,1900 x 10^{-8}	5,1000 x 10^{-9}	1,0500 x 10^{-8}	1,7800 x 10^{-8}
Banana	15	0	6,8880 x 10^{-9}	9,7405 x 10^{-9}	,0000	3,7000 x 10^{-8}	,0000	3,7800 x 10^{-9}	1,1500 x 10^{-8}
Kivi	15	0	2,9920 x 10^{-9}	3,8163 x 10^{-9}	,0000	9,8000 x 10^{-9}	,0000	,0000	6,6000 x 10^{-9}



Slika 18. Dijagram učestalosti pojavnosti ukupnih FAHFA kod analiziranih namirnica

4.3.3. Faktorska analiza za promatrane namirnice

Pomoću faktorske analize provedene za promatrane namirnice ustanovljeno je se na koji način se spomenute namirnice grupiraju i koji su to faktori koje se može izlučiti iz provedenog istraživanja.

Po Kaiser-Gutmannovom kriteriju (kriterij karakterističnih korijena ili eigen vrijednosti) u obzir se uzimaju samo oni faktori koji najbolje objašnjavaju promjenjivost, odnosno čija je vrijednost veća od jedan. Iz tablice D25. (Dodaci) može se iščitati da taj kriterij u ovom slučaju zadovoljavaju prva četiri faktora koji kumulativno objašnjavaju 83,233% ukupne varijance, dok na prvom faktoru leži najveće opterećenje i on objašnjava čak 45,634% ukupne varijance.

Osnovna kvalitativna obilježja svakog istaknutog faktora objašnjavaju se na osnovu faktorske matrice. Značenje dobivenih varijabli određuje se sukladno odnosu promatranih čestica. Prilikom objašnjenja, u obzir se uzimaju koeficijenti čija je apsolutna vrijednost za određene faktore veća od 0,3, a koji su istaknuti u tablicama D26. i D27. (Dodaci).

Na tablici D26. (Dodaci) prikazana je faktorska matrica koja je rotirana, odnosno provedena je Varimax s Kaiserovom normalizacijom; rezultati rotacije matrice prikazani su u tablici D27. (Dodaci), na osnovu čega je provedeno izlučivanje faktora. U provedenoj analizi svi koeficijenti imaju apsolutnu vrijednost veću od 0,552 (značajno višu od minimalno zadane vrijednosti koja iznosi 0,3).

Pogleda li se matrica faktorskog punjenja (tablica D26., Dodaci), može se uočiti kako četiri navedena faktora sadržavaju promatrane skupine namirnica, stoga su u daljnjoj analizi ova četiri faktora uključena u analizu (učinjeno je grupiranje).

Prvi faktor sadrži namirnice: peršin (korijen), klementina, ananas, češnjak, luk, avokado, paprika, zobene pahuljice (sitne), borovnica

Drugi faktor sadrži namirnice: rotkvica, mrkva, mango, zobene pahuljice (krupne), banana, kivi

Treći faktor sadrži namirnice: zob (cjelovito zrno), jabuka, jagoda

Četvrti faktor sadrži namirnice: limun, cherry rajčica.

Grupiranje analiziranih namirnica u navedene skupine (faktore) prema FAHFA sastavu, istovremeno nije lako objašnjivo s aspekta nutritivnog, ne-FAHFA sastava. Naime, pojedine namirnice grupirane u isti faktor međusobno se uvelike razlikuju kako po količini i sastavu makronutijenata (šećera, škroba, vlakana, zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, aminokiselina), tako i po vitaminsko-mineralnom sadržaju, postotku vode te prisutnosti sterola.

U tablici D28. (Dodaci) naznačeni su značajniji koeficijenti korelacije. Iz navedene tablice može se uočiti kako je razina korelacije između većine varijabli pozitivna, dakle može se zaključiti kako se u većini promatranih slučajeva radi o korelacijama srednjeg i jakog intenziteta, a najveće korelacije zabilježene su između varijabli: jabuka i borovnica ($r=0,840$; $p<0,01$), mrkva i banana ($r=0,840$; $p<0,01$), te češnjak i luk ($r=0,799$; $p<0,01$).

Po dobivenim korelacijama, pristupi se detaljnoj analizi nutritivnog sastava namirnica koje su pokazale najintenzivnije međusobne korelacije.

Usporedivši jabuku i borovnicu, ustanovi se kako se njihov nutritivni, ne-FAHFA sastav podudara u nekoliko točaka, odnosno vrijednosti: na 100 grama jabuke i 100 grama borovnice prisutna je jednaka ukupna količina ugljikohidrata (13.8 odnosno 14.5 grama, od čega 2.4 grama vlakana i 10.4 odnosno 10.0 grama šećera), slična ukupna količina masti (0.2 odnosno 0.3 grama, od čega 27 odnosno 22 mg zasićenih i 0.1 gram nezasićenih mati), gotovo identična količina aminokiseline lizina (13 mg, uz napomenu kako je sastav ostalih aminokiselina međusobno jako nepodudaran), identična količina vitamina A (54 IU, od čega 3 mg retinola i 27 odnosno 32 mcg beta karotena), pantotenske kiseline (0.1 mg), betaina (0.1 odnosno 0.2 mg), kalcija (6 mg), magnezija (5 odnosno 6 mg), fosfora (11 odnosno 12 mg) i natrija (1 mg). Ove se dvije namirnice međusobno podudaraju i po postotku vode, pri čemu je u jabuci voda zastupljena sa 85.6%, a u borovnici sa 84.2 %. Valja napomenuti i kako u ukupnoj energetskoj vrijednosti (52 odnosno 57 kcal/100 g), gotovo jednakim udjelom sudjeluju ugljikohidrati (49.7 kcal u jabuci, odnosno 51.7 kcal u borovnici).

Usporedivši mrkvu i bananu, ustanovi se kako se njihov nutritivni, ne-FAHFA sastav također podudara u više točaka, odnosno vrijednosti: na 100 grama mrkve i 100 grama banane prisutna je jednaka količina vlakana (2.6 g), slična ukupna količina masti (0.2 odnosno 0.3 grama, uz razlike u omjerima zasićenih i nezasićenih masti), slična ukupna količina proteina (0.9 odnosno 1.1 gram), od čega se podudaraju aminokiseline triptofan (8 odnosno 9 mg), lizin (55 odnosno 50 mg), metionin (8 mg), aspartat (110 odnosno 124 mg) i prolin (32 odnosno 28 mg), identična količina riboflavina (0.1 mg) i pantotenske kiseline (0.3 mg) te slična količina folata (19 odnosno 20 mg) i kolina (8.8 odnosno 9.8 mg), identična količina željeza (0.3 mg) i cinka (0.2 mg) te slična količina kalija (320 odnosno 358 mg). Usporedivši češnjak i luk, ustanovi se kako se ove dvije namirnice po nutritivnom, ne-FAHFA sastavu, podudaraju jedino u količini vlakana: u češnjaku se na 100 grama nalazi 2.1 grama vlakana, dok za luk ta brojka iznosi 1.7 gram.

Kako bi se definirala jasnija i detaljnija pojavnost FAHFA razreda u namirnicama, kretanje njihovih koncentracija i omjera te sklonost grupiranju, potrebno je u budućim istraživanjima provesti analizu na značajno većem uzorku hrane, što u ovom istraživanju radi financijskog i vremenskog ograničenja nije bilo moguće. Nastavak istraživanja bi trebao uključivati skupine orašastih plodova, za koje je poznato da sadrže visok udio masnih kiselina, pa je za očekivati da je priustan i veći udio FAHFA. Budući da su orašasti plodovi

neizostavna komponenta jelovnika (posebice onim namijenjenih metaboličkoj optimizaciji), svakako bi bilo korisno ispitati njihov FAHFA sastav.

Također, bilo bi zanimljivo i korisno provesti analizu namirnica različitog stupnja i vremena zamrzavanja, kao i različitih načina i stupnjeva termičke obrade. U ovom istraživanju prikazano je na primjeru zobi prikazano kako termička i mehanička obrada žitarice, odnosno proces instantizacije, može utjecati na promjenu sastava i značajan gubitak ukupne količine FAHFA, što valja uzeti u obzir prilikom razmatranja FAHFA funkcionalne hrane.

U budućnosti bi se moglo ispitati i kako na FAHFA sastav i sadržaj utječe uporaba gnojiva i sredstava za poticanje i očuvanje rasta biljaka, način skladištenja hrane nakon branja te proces zriobe voća i povrća.

Budući da se analizom namirnica u ovom istraživanju SAHSA pokazala najzastupljenijom FAHFA u većini namirnica, uputno je ispitati njezine in vivo i in vitro učinke te možebitno učiniti „head-to-head“ studiju sa PAHSA kao jedinom ranije ispitivanom FAHFA.

Znanstveni doprinos ovog istraživanja, uz razvoj nove, optimizirane metode za spektrometrijsku analizu FAHFA, jest i detaljnije saznanje o FAHFA sastavu hrane biljnoga podrijetla. Kategorizacija namirnica prema sadržaju FAHFA, odnosno otkrivanje namirnica s najvišim sadržajem FAHFA, mogla bi poslužiti za buduće oplemenjivanje i obogaćivanje tih namirnica dodatnim FAHFA. Naime, s obzirom na dosadašnja saznanja o izuzetnoj nestabilnosti FAHFA nakon ekstrakcije iz nativnog okruženja (u ekstrahiranom obliku stabilne su tek na izuzetno niskim temperaturama, -80°C), važno je fokusirati se na namirnice koje su izgledno prirodni konzervans za FAHFA, odnosno koje za razliku od namirnica siromašnih FAHFA vjerojatno imaju određeni stabilitetni potencijal (npr. veće količine fruktoze, glukoze, saharoze, poliola, miješanih šećera ili masnoća te proteina) koji pogoduje zadržavanju i očuvanju veće količine FAHFA.

5. ZAKLJUČCI

Hrana biljnoga podrijetla se međusobno uvelike razlikuje po sastavu i sadržaju, odnosno koncentraciji FAHFA. 16 analiziranih FAHFA razreda u namirnicama se nalazi u nano- do pikomolarnim razinama. Najveća koncentracija ukupnih FAHFA pronađena je u cjelovitoj zobi (3.20 x 10^{-7} g/g svježe namirnice), dok je najniža koncentracija prisutna u sitnoj, instant zobi (1.65 x 10^{-8} g/g svježe namirnice).

Neki FAHFA razredi, poput SAHSA i SAHOA, su općenito najzastupljeniji u većini namirnica (19 od analiziranih 20), za razliku od nekih FAHFA razreda koji su jako slabo zastupljeni u namirnicama, poput SAHPO (3 od analiziranih 20). SAHPA i OAHSA (4 od analiziranih 20).

PAHSA, kao jedina FAHFA do sada kvantificirana u hrani (jabuka, brokula, jaje, piletina, govedina), pokazala je osrednju zastupljenost (prisutna je u 13 od analiziranih 20 namirnica, uz koncentraciji od 3,79 x 10^{-9} – 4,10 x 10^{-9} g/g svježe namirnice).

S obzirom da su FAHFA u namirnicama prisutne u piko- do nanomolarnim razinama, pitanje je koja količina hrane bogate FAHFA svakodnevno treba biti unesena u organizam da bi se ostvario biološki učinak koji je u prethodnim studijama ostvaren primjenom sintetskih FAHFA ili primjenom parenteralnim putem. Iz prošlih studija su poznati enzimi koji razgrađuju FAHFA, međutim nije ispitana bioraspoloživost FAHFA nakon oralne primjene, odnosno količina FAHFA koja se nakon FAHFA ingestije nalazi u serumu i ciljnim organima. Stoga se nameće i potreba da se analizira što veći broj namirnica, uz ispitivanje učinka FAHFA koje su najzastupljenije u hrani, poput SAHSA i SAHOA.

S ciljem što detaljnije kvalifikacije i kvantifikacije FAHFA u hrani, razvijena je analitička metoda koja je po prvi puta u lipidomici koristila primjenu etil metanoata kao postkolumnog modifikatora u MS modu negativnog iona. Takva modifikacija omogućila je visoku osjetljivost metode i detekciju pikomolarnih razina FAHFA.

Na primjeru zobi je pokazano kako različiti načini i stupnjevi obrade žitarica (vrlo vjerojatno i ostalih vrsta hrane) utječu na promjenu sastava i omjera FAHFA. Udaljavanjem od nativnog oblika hrane, odnosno višim stupnjevima procesiranja (mehaničkog i termičkog)

dolazi do sve većih gubitaka količine FAHFA, pa je tako razina FAHFA u sitnim, instant zobenim pahuljicama više nego deseterostruko manja od one u cjelovitoj, neprerađenoj zobi.

Neke od analiziranih namirnica najbogatijih FAHFA poput ananasa i klementine prilično su zanemarene u prehrani (posebice u ciljanim jelovnicima za oboljele od šećerne bolesti), pa je dodatna vrijednost ovog istraživanja to što ukazuje na važnost otkrivanja FAHFA u što većem broju namirnica, kako bi se u budućnosti upravo namirnice bogatije FAHFA (a istovremeno niskog glikemijskog indeksa) mogle češće uvrstiti u jelovnike namijenjene prevenciji i liječenju metaboličkog sindroma, pretilosti i (pre)dijabetesa.

S obzirom na niske razine FAHFA u hrani, njihovo uvrštavanje u funkcionalnu hranu i suplemente potencijalno ima terapeutsku ulogu u pristupu oboljelima od metaboličkog sindroma i ŠBT2. Pritom bi ciljano obogaćivanje hrane (koja je potencijalno dobar prirodni FAHFA konzervans) imalo prednost pred samim suplementima, s obzirom na poznate benefite konzumacije cjelovite hrane (naspram suplemenata s izoliranim nutrijentima) kao kompleksne mješavine makro- i mikronutrijenata koji međusobnom interakcijom povećavaju svoju bioraspoloživost

6. LITERATURA

1. Engin, A. (2017). The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. In Obesity and Lipotoxicity (pp. 1-17). Springer, Cham.
2. Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Abraham, J. P. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. The lancet, 384(9945):766-781.
3. Jackson-Leach, R., Montague, F., Litts, C., Lobstein, T. (2016). Obesity Atlas for the European Union: 2017. World Obesity Federation, 186-187.
4. Gallus, S., Lugo, A., Murisic, B., Bosetti, C., Boffetta, P., La Vecchia, C. (2014). Overweight and obesity in 16 European countries. European Journal of Nutrition, 54(5):679–689.
5. Chaput, J.P., Perusse, L.,Despres, J.P., Tremblay, A., Bouchard, C. (2014). Findings from the Quebec Family Study on the Etiology of Obesity: Genetics and Environmental Highlights, Current Obesity Reports, 3:54-66.
6. González, H. (2016). Etiology and Impact of Obesity. In Managing Patients with Obesity (pp. 23-29). Adis, Cham.
7. Han, T. S., Lean, M. E. (2016). A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. JRSM cardiovascular disease, 5, 2048004016633371.
8. Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M., Wyatt, S. B. (2015). Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. Current obesity reports, 4(3):363-370.
9. Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. Nature medicine, 23(7):804.
10. Hall, M. E., Wang, Z., do Carmo, J., Kamimura, D., Hall, J. E. (2018). Obesity and Metabolic Syndrome Hypertension. In Disorders of Blood Pressure Regulation (pp. 705-722). Springer, Cham.
11. Arca, M. (2015). Dyslipidemia and cardiovascular risk in obesity. In Multidisciplinary Approach to Obesity (pp. 121-130). Springer, Cham.
12. Peters, U., Suratt, B. T., Bates, J. H., Dixon, A. E. (2018). Beyond BMI: obesity and lung disease. Chest, 153(3):702-709.
13. Linauskas, A., Overvad, K., Symmons, D., Johansen, M. B., Stengaard-Pedersen, K., de Thurah, A. (2018). Body fat percentage, waist circumference and obesity as risk

factors for rheumatoid arthritis–A Danish cohort study. Arthritis care & research 71(6):777-786.

14. Francisco, V., Pérez, T., Pino, J., López, V., Franco, E., Alonso, A., Gonzalez-Gay, M,A,, Mera, A., Lago, F., Gómez, R., Gualillo, O. (2018). Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. Journal of Orthopaedic Research®, 36(2):594-604.
15. Shapses, S. A., Pop, L. C., Wang, Y. (2017). Obesity is a concern for bone health with aging. Nutrition research, 39:1-13.
16. Deng, T., Lyon, C. J., Bergin, S., Caligiuri, M. A., Hsueh, W. A. (2016). Obesity, inflammation, and cancer. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 11: 421-449.
17. Harris, M.F. (2013). The metabolic syndrome. Australian Family Physician, 42:524–527.
18. Ford, E.S. (20050). Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. Diabetes Care, 28(7):1769–78.
19. Gami, A.S., Witt, B.J., Howard, D.E., Erwin, P.J., Gami, L.A., Somers, V.K., Montori, V.M. (2007). Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. Journal of the American College of Cardiology, 49(4):403–14.
20. Nolan, P. B., Carrick-Ranson, G., Stinear, J. W., Reading, S. A., Dalleck, L. C. (2017). Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis. Preventive medicine reports, 7:211-215.
21. Ranasinghe, P., Mathangasinghe, Y., Jayawardena, R., Hills, A. P., Misra, A. (2017). Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: a systematic review. BMC public health, 17(1):101.
22. Aguilar, M., Bhuket, T., Torres, S., Liu, B., Wong, R. J. (2015). Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. Jama, 313(19):1973-1974.
23. Parini, A., Ivkovic, V., Vrdoljak, A., Baric, M. A., Bacchelli, S., Cagnati, M., Francesco, A., Cicero, A.F.G., D'Addato, S., Esposti, D., Fucek, M., Grandi, E., Kos, J., Laganovic, M., Rosticci, M., Rogic, D., Vukovic, I., Borghi, C., Jelakovic, B. (2016). [OP. 7B. 06] METABOLIC SYNDROME IN EUROPEAN RURAL

POPULATION-DATA FROM THE BRISGHELLA HEART STUDY (ITALY) AND ENAH STUDY (CROATIA). Journal of Hypertension, 34:e87.

24. O'Neill, S., O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. Obesity reviews, 16(1):1-12.
25. McCracken, E., Monaghan, M., Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. Clinics in dermatology, 36(1):14-20.
26. Han, T.S., Williams, K., Sattar, N., Hunt, K.J., Lean, M.E., Haffner, S.M. (2002). Analysis of obesity and hyperinsulinemia in the development of metabolic syndrome: San Antonio Heart Study. Obesity Research,10:923–931.
27. Samuel, V. T., Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. The Journal of clinical investigation, 126(1):12-22.
28. Ginsberg, H.N. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. Journal of Clinical Investigation, 106:453-458.
29. Kolovou, G.D., Anagnostopolou, K.K., Cokkinos, D.V. (2005). Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. Postgraduate Medical Journal, 81:358-366.
30. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nature reviews immunology, 11(2):85-97.
31. Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., Yadav, U. C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. Life sciences, 148:183-193.
32. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Shaw, J. E. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. Diabetes research and clinical practice, 157:107843.
33. Nacionalni Registar Osoba sa šećernom bolešću CRODIAB, Izvješće za 2018. godinu, Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo, 2019.
34. Zheng, Y., Ley, S. H., Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nature Reviews Endocrinology, 14(2):88.
35. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2017. godini, Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo, rujan 2018.
36. Kahn, S. E., Hull, R. L., Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature, 444(7121):840-846.

37. Brunetti, A., Chiefari, E., Foti, D., (2014). Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. World Journal of Diabetes, 5:128-140.

38. Kharroubi, A. T., Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World journal of diabetes, 6(6):850-867.

39. Tomar, A. S., Tallapragada, D. S. P., Nongmaithem, S. S., Shrestha, S., Yajnik, C. S., Chandak, G. R. (2015). Intrauterine Programming of Diabetes and Adiposity. Current Obesity Reports, 4(4):418–428.

40. Chen, N., Unnikrishnan, I.R., Anjana, R.M., Mohan, V., Pitchumoni, C.S. (2011). The complex exocrine-endocrine relationship and secondary diabetes in exocrine pancreatic disorders. Journal of Clinical Gastroenterology, 45:850-861.

41. Pezzilli, R., Calculli, L. (2014). Pancreatic steatosis: Is it related to either obesity or diabetes mellitus? World Journal of Diabetes, 5:214-219.

42. Kolb, H., Martin, S. (2017). Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. BMC medicine, 15(1):131.

43. Bankoski, A., Harris, T. B., McClain, J. J., Brychta, R. J., Caserotti, P., Chen, K. Y., Berrigan, D., Troiano, R.P., Koster, A. (2011). Sedentary activity associated with metabolic syndrome independent of physical activity. Diabetes care, 34(2):497-503.

44. Hu, G., Qiao, Q., Tuomilehto, J., Jousilahti, P., Lindström, P.M., Pyörälä, M., Pyörälä, K., Gallus, G., Garancini, M.P., Bouter, L.M., Dekker, M., Heine, J.R., Nijpels, G., Feskens, E.J.M., Kromhout, D., Pajak, A., Eliasson, M., Stegmayr, B., Lundberg, V., Wareham, N.J., Unwin, N., Ahmad, N., Alberti, K.G.M.M., Hayes, L., Yudkin, J.S., Gould, M., Haines, A., Morris, R.W., Borch-Johnsen, K., Eriksson, J. (2004). Plasma insulin and cardiovascular mortality in non-diabetic European men and women: a meta-analysis of data from eleven prospective studies. The DECODE Insulin Study Group. Diabetologia, 47:1245–56.

45. Bays, H., Mandarino, L., DeFronzo, R.A. (2004). Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89:463-478.

46. Hu, F.B. (2011). Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. Diabetes Care, 34:1249-1257.

47. Cornell, S. (2015). Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. Therapeutics and clinical risk management, 11:621-632.
48. D'Alessio, D. (2011). The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. Diabetes, Obesity and Metabolism, 1:126-132.
49. Yabe, D., Kuroe, A., Watanabe, K., Iwasaki, M., Hamasaki, A., Hamamoto, Y., Harada, N., Yamane, S., Lee, S., Murotani, K., Deacon, C. F., Holst, J.J., Hirano, T., Inagaki, N., Kurose, T., Seino, Y. (2015). Early phase glucagon and insulin secretory abnormalities, but not incretin secretion, are similarly responsible for hyperglycemia after ingestion of nutrients. Journal of Diabetes and its Complications, 29(3):413-421.
50. Huang, S., Czech, M.P. (2013). The GLUT4 glucose transporter. Cell Metabolism, 5:237-252.
51. DeFronzo, R.A., Hompesch, M., Kasichayanula, S., Liu, X., Hong, Y., Pfister, M., Morrow, L.A., Leslie, B.R., Boulton, D.W., Ching, A., LaCreta, F.P., Griffen, S.C. (2013). Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes. Diabetes Care, 36:3169-3176.
52. Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., Stumvoll, M. (2001). Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. Diabetes Care, 24:382-391.
53. Woods, S.C., Lutz, T.A., Geary, N., Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake: insulin, glucagon and amylin. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 361:1219-1235.
54. Holst, J.J., Knop, F.K., Vilsbøll, T., Krarup, T., Madsbad, S. (2011). Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. Diabetes Care, 34(2): S251–257.
55. Patterson, E., Ryan, P. M., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. Postgraduate Medical Journal, 92(1087):286-300.
56. Papatheodorou, K., Papanas, N., Banach, M., Papazoglou, D., Edmonds, M. (2016). Complications of diabetes 2016. Journal of diabetes research, 2016:ID 6989453.
57. Roden, M., Petersen, K., Shulman, G. (2017). Insulin resistance in type 2 diabetes. Textbook of Diabetes, 174-186.

58. Park, K., Steffes, M., Lee, D. H., Himes, J. H., Jacobs, D. R. (2009). Association of inflammation with worsening HOMA-insulin resistance. Diabetologia, 52(11):2337-2344.
59. Perry, R.J., Camporez, J.P., Kursawe, R., Titchenell, P.M., Zhang, D., Perry, C.J., Jurczak, M.J., Abudukadier, A., Han, M.S., Zhang, X.M., Ruan, H.B., Yang, X. (2015). Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. Cell, 160:745–758.
60. DeFronzo, R. A., Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. Diabetes care, 32(2):157-163.
61. Roden, M. (2006). Mechanisms of disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes—pathogenesis and clinical relevance. Nature Reviews Endocrinology, 2(6):335-348.
62. Brehm, A., Pfeiler, G., Pacini, G., Vierhapper, H., Roden, M. (2004). Relationship between serum lipoprotein ratios and insulin resistance in obesity. Clinical chemistry, 50(12):2316-2322.
63. Lakshmy, R. (2013). Metabolic syndrome: role of maternal undernutrition and fetal programming. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 14(3):229-240.
64. Siervo, M., Lara, J., Celis-Morales, C., Vacca, M., Oggioni, C., Battezzati, A., Leone, A., Tagliabue, A., Spadafranca, A., Bertoli, S. (2016). Age-related changes in basal substrate oxidation and visceral adiposity and their association with metabolic syndrome. European journal of nutrition, 55(4):1755-1767.
65. Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z. (2005). The metabolic syndrome. The lancet, 365(9468):1415-1428.
66. Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R.E., Shulman, G.I. (2005). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. Diabetes, 54:603-608.
67. Tiwari, P. (2015). Recent trends in therapeutic approaches for diabetes management: a comprehensive update. Journal of diabetes research, 2015:ID 340838.
68. Booth, F.W.,Roberts, C.K., Laye, M.Y. (2012). Lack of exercise is a major cause of chronic diseases Comprehensive Physiology, 2:1143-1211.

69. Snowling, N.J., Hopkins, W.G. (2006). Effects of different modes of exercise training on glucose control and risk factors for complications in type 2 diabetic patients: a meta-analysis Diabetes Care, 29:2518-2527.
70. Park, D. R., Park, K. H., Kim, B. J., Yoon, C. S., Kim, U. H. (2015). Exercise ameliorates insulin resistance via Ca2+ signals distinct from those of insulin for GLUT4 translocation in skeletal muscles. Diabetes, 64(4):1224-1234.
71. Keshel, T. E., Coker, R. H. (2015). Exercise training and insulin resistance: a current review. Journal of obesity & weight loss therapy, 5(0 5).
72. Tiwari, P. (2015). Recent trends in therapeutic approaches for diabetes management: a comprehensive update. Journal of diabetes research, 2015:ID 340838.
73. Kohastu, W. Anti-inflammatory diet. In: Rakel D, ed. Integrative Medicine. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier: 2012:795-801.
74. Sears, B. (2015). Anti-inflammatory diets. Journal of American College of Nutrition, 34(1):14-21.
75. Ricker, M. A., Haas, W. C. (2017). Anti-Inflammatory Diet in Clinical Practice: A Review. Nutrition in Clinical Practice, 32(3):318–325.
76. Hu, F.B. (2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. American Journal of Clinical Nutrition, 78:544-551.
77. Virtanen, H. E., Koskinen, T. T., Voutilainen, S., Mursu, J., Tuomainen, T. P., Kokko, P., Virtanen, J. K. (2017). Intake of different dietary proteins and risk of type 2 diabetes in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. British Journal of Nutrition, 117(6):882-893.
78. Pollack, R. M., Donath, M. Y., LeRoith, D., Leibowitz, G. (2016). Anti-inflammatory agents in the treatment of diabetes and its vascular complications. Diabetes Care, 39(2):244-252.
79. Werz, O., Gerstmeier, J., Garscha, U. (2017). Novel leukotriene biosynthesis inhibitors (2012-2016) as anti-inflammatory agents. Expert opinion on therapeutic patents, 27(5):607-620.
80. Tang, M. L., Zhong, C., Liu, Z. Y., Peng, P., Liu, X. H., Sun, X. (2016). Discovery of novel sesquistilbene indanone analogues as potent anti-inflammatory agents. European journal of medicinal chemistry, 113:63-74.
81. He, J., Ma, L., Wei, Z., Zhu, J., Peng, F., Shao, M., Lei, L., He, L., Tang, M., He, L., Wu, Y., Chen, L. (2015). Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoline

derivatives as potent anti-inflammatory agents. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 25(11):2429-2433.

82. Silva, C. F., Pinto, D. C., Silva, A. M. (2016). Chromones: A Promising Ring System for New Anti-inflammatory Drugs. ChemMedChem, 11(20):2252-2260.
83. Yore, M.M., Syed, I., Moraes-Vieira, P.M., Zhang, T., Herman, M.A., Homan, E.A, Patel, R.T., Lee, J., Chen, S., Peroni, O.D., Dhaneshwar, S., Hammarstedt, A., Smith, U., McGraw, T.E., Saghatelian, A., Kahn, B.B. (2014). Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. Cell, 159:318–332.
84. Moraes-Vieira, P. M., Saghatelian, A., Kahn, B. B. (2016). GLUT4 expression in adipocytes regulates de novo lipogenesis and levels of a novel class of lipids with antidiabetic and anti-inflammatory effects. Diabetes, 65(7):1808-1815.
85. Tan, D., Ertunc, M. E., Konduri, S., Zhang, J., Pinto, A. M., Chu, Q., Kahn, B.B., Siegel, D., Saghatelian, A. (2019). Discovery of FAHFA-containing Triacylglycerols and Their Metabolic Regulation. Journal of the American Chemical Society, 141(22):8798-8806.
86. Wang, H., Chang, T., Konduri, S., Huang, J., Saghatelian, A., Siegel, D. (2019). Synthesis of chemically edited derivatives of the endogenous regulator of inflammation 9-PAHSA. The Journal of antibiotics, 72(6):498-506.
87. Kuda, O., Brezinova, M., Rombaldova, M., Slavikova, B., Posta, M., Beier, P., Janovska, P., Velena, J., Kopecky, J.Jr, Kudova, E., Pelikanova, T., Kopecky, J. (2016). Docosahexaenoic Acid–Derived Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids (FAHFAs) With Anti-inflammatory Properties. Diabetes, 65(9):2580–2590.
88. Kuda, O., Brezinova, M., Silhavy, J., Landa, V., Zidek, V., Dodia, C., Kreuchwig, E., Vrbacky, M., Balas, L., Durand, T., Hübner, N., Fisher, A.B., Kopecky, J., Pravenec, M. (2018). Nrf2-mediated antioxidant defense and peroxiredoxin 6 are linked to biosynthesis of palmitic acid ester of 9-hydroxystearic acid. Diabetes, 67(6):1190-1199.
89. Zhu, Q.F., Yan, J.W., Zhang, T.Y., Xiao, H.M., Feng, Y.Q. (2018). Comprehensive Screening and Identification of Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids in Plant Tissues by Chemical Isotope Labeling-Assisted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 90(16):10056–10063.

90. Balas, L., Bertrand-Michel, J., Viars, F., Faugere, J., Lefort, C., Caspar-Bauguil, S., Langin, D., Durand, T. (2016). Regiocontrolled syntheses of FAHFAs and LC-MS/MS differentiation of regioisomers. Organic & Biomolecular Chemistry, 14(38):9012–9020.
91. Ma, Y., Kind, T., Vaniya, A., Gennity, I., Fahrmann, J. F., Fiehn, O. (2015). An in silico MS/MS library for automatic annotation of novel FAHFA lipids. Journal of cheminformatics, 7(1):53.
92. Nelson, A. T., Kolar, M. J., Chu, Q., Syed, I., Kahn, B. B., Saghatelian, A., Siegel, D. (2017). Stereochemistry of Endogenous Palmitic Acid Ester of 9-Hydroxystearic Acid and Relevance of Absolute Configuration to Regulation. Journal of the American Chemical Society, 139(13):4943–4947.
93. Shepherd, P. R. (1993). Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, and Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. Journal of Biological Chemistry, 268:22243-22246.
94. Hunt, M.C., Siponen, M.I., Alexson, S.E. (2012). The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism. Biochimica et Biophysica Acta, 1822:1397–1410.
95. Planey, S.L., Zacharias, D.A. (2009). Palmitoyl acyltransferases, their substrates, and novel assays to connect them. Molecular Membrane Biology, 26:14–31.
96. Baraille, F., Planchais, J., Dentin, R., Guilmeau, S., Postic, C. (2015). Integration of ChREBP-Mediated Glucose Sensing into Whole Body Metabolism. Physiology (Bethesda) 30:428–437.
97. Smith, U., Kahn, B. B. (2016). Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. Journal of internal medicine, 280(5):465-475.
98. Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. Proceedings of the National Academy of Sciences,101:7281–7286.
99. Eissing, L., Scherer, T., To¨ dter, K., Knippschild, U., Greve, J.W., Buurman, W.A., Pinnschmidt, H.O., Rensen, S.S., Wolf, A.M., Bartelt, A., Heeren, J., Buettner, C., Scheja, L., (2013). De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-b and metabolic health. Nature Communications, 4:1528.

100. Kursawe, R., Caprio, S., Giannini, C., Narayan, D., Lin, A., D'Adamo, E., Shaw, M., Pierpont, B., Cushman, S.W., and Shulman, G.I. (2013). Decreased transcription of ChREBP-a/b isoforms in abdominal subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with prediabetes or early type 2 diabetes: associations with insulin resistance and hyperglycemia. Diabetes 62, 837–844.

101. Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Scho¨ n, M.R., Abumrad, N.A., Bluher, € M., Klein, S., Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. Nature 484:333–338.

102. Vijayakumar, A., Aryal, P., Wen, J., Syed, I., Vazirani, R. P., Moraes-Vieira, P. M., Kahn, B. B. (2017). Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport. Cell Reports, 21(4):1021–1035.

103. Zhang, T., Chen, S., Syed, I., Ståhlman, M., Kolar, M. J., Homan, E. A., Chu, Q., Smith, U., Boren, J., Kahn, B.B., Saghatelian, A. (2016). A LC-MS–based workflow for measurement of branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids. Nature protocols, 11(4):747-763.

104. Zhu, Q. F., Yan, J. W., Gao, Y., Zhang, J. W., Yuan, B. F., Feng, Y. Q. (2017). Highly sensitive determination of fatty acid esters of hydroxyl fatty acids by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 1061:34-40.

105. Brezinova, M., Kuda, O., Hansikova, J., Rombaldova, M., Balas, L., Bardova, K., Kopecky, J. (2018). Levels of palmitic acid ester of hydroxystearic acid (PAHSA) are reduced in the breast milk of obese mothers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1863(2):126-131.

106. Tan, D., Ertunc, M. E., Konduri, S., Zhang, J., Pinto, A. M., Chu, Q., Kahn, B.B., Siegel, D., Saghatelian, A. (2019). Discovery of FAHFA-containing Triacylglycerols and Their Metabolic Regulation. Journal of the American Chemical Society, 141(22):8798-8806.

107. Hammarstedt, A., Syed, I., Vijayakumar, A., Eliasson, B., Gogg, S., Kahn, B. B., Smith, U. (2018). Adipose tissue dysfunction is associated with low levels of the novel Palmitic Acid Hydroxystearic Acids. Scientific reports, 8(1):15757.

108. Pham, T. H., Vidal, N. P., Manful, C. F., Fillier, T. A., Pumphrey, R. P., Doody, K. M., Thomas, R. H. (2019). Moose and Caribou as Novel Sources of Functional Lipids:

Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids, Diglycerides and Monoacetyldiglycerides. Molecules, 24(2):232-247.

109. Kolar, M. J., Konduri, S., Chang, T., Wang, H., McNerlin, C., Ohlsson, L., Saghatelian, A. (2019). Linoleic acid esters of hydroxy linoleic acids are anti-inflammatory lipids found in plants and mammals. Journal of Biological Chemistry, 294:10698-10707.

110. Wang, H., Chang, T., Konduri, S., Huang, J., Saghatelian, A., Siegel, D. (2019). Synthesis of chemically edited derivatives of the endogenous regulator of inflammation 9-PAHSA. The Journal of antibiotics, 72(6):498-506.

111. Balas, L., Feillet-Coudray, C., Durand, T. (2018). Branched Fatty Acyl Esters of Hydroxyl Fatty Acids (FAHFAs), Appealing Beneficial Endogenous Fat against Obesity and Type-2 Diabetes. Chemistry–A European Journal, 24(38):9463-9476.

112. Parsons, W.H., Kolar, M.J., Kamat, S.S., Cognetta, A.B., Hulce, J.J., Saez, E., Kahn, B.B., Saghatelian, A., Cravatt, B.F. (2016). AIG1 and ADTRP are atypical integral membrane hydrolases that degrade bioactive FAHFAs. Nature Chemical Biology, 12:367–372.

113. Liu, Y., Patricelli, M.P., Cravatt, B.F. (1999). Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96:14694–14699.

114. Syed, I., Lee, J., Moraes-Vieira, P. M., Donaldson, C. J., Sontheimer, A., Aryal, P., Mokrosinski, J. (2018). Palmitic acid hydroxystearic acids activate GPR40, which is involved in their beneficial effects on glucose homeostasis. Cell metabolism, 27(2):419-427.

115. Lee, J., Moraes-Vieira, P. M., Castoldi, A., Aryal, P., Yee, E. U., Vickers, C., Kahn, B. B. (2016). Branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFAs) protect against colitis by regulating gut innate and adaptive immune responses. Journal of Biological Chemistry, 291(42):22207-22217.

116. Bandak, B., Yi, L., Roper, M. G. (2018). Microfluidic-enabled quantitative measurements of insulin release dynamics from single islets of Langerhans in response to 5-palmitic acid hydroxy stearic acid. Lab on a Chip, 18(18):2873-2882.

117. Rodríguez, J. P., Guijas, C., Astudillo, A. M., Rubio, J. M., Balboa, M. A., Balsinde, J. (2019). Sequestration of 9-Hydroxystearic Acid in FAHFA (Fatty Acid Esters of

Hydroxy Fatty Acids) as a Protective Mechanism for Colon Carcinoma Cells to Avoid Apoptotic Cell Death. Cancers, 11(4):524-539.

118. Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto, G. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. Nature Medicine, 11:90–94.
119. Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J. (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell, 142:687–698.
120. Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., Murdock, P. R. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. Journal of Biological chemistry, 278(13):11303-11311.
121. Edfalk, S., Steneberg, P., Edlund, H. (2008). Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. Diabetes, 57:2280–2287.
122. Shoelson, S. E., Lee, J., Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. Journal of Clinical Investigation, 116:1793–1801.
123. Karnieli, E., Armoni, M. (2008). Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: From physiology to pathology. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 295:38–45.
124. Chawla, G., Ranjan, C. (2016). Principle, instrumentation, and applications of UPLC: A novel technique of liquid chromatography. Open Chemistry Journal, 3(1).
125. Cajka, T., Fiehn, O. (2014). Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 61: 192-206.
126. Betts, T. A., Palkendo, J. A. (2018). Teaching Undergraduates LC–MS/MS Theory and Operation via Multiple Reaction Monitoring (MRM) Method Development. Journal of Chemical Education, 95(6):1035-1039.
127. Yang, K., Han, X. (2016). Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. Trends in biochemical sciences, 41(11):954-969.
128. https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/fahfa-lipids-library
129. Corella, D., Ordovas, J.M. (2015). Biomarkers: background, classification and

guidelines for applications in nutritional epidemiology. Nutricion Hospitalaria 31(3): 177–188.

130. Jungnickel, H., Luch, A. (2012) A personalized life: biomarker monitoring from cradle to grave. Experimentia Supplementum 101:471–498.
131. Hu, T., Tie, C., Wang, Z., Zhang, J. L. (2017). Highly sensitive and specific derivatization strategy to profile and quantitate eicosanoids by UPLC-MS/MS, Analitica Chimica Acta, 950:108-118.
132. Wang, H. X., Wang, B., Zhou, Y., Jiang, Q. W. (2013). Rapid and sensitive analysis of phthalate metabolites, bisphenol A, and endogenous steroid hormones in human urine by mixed-mode solid-phase extraction, dansylation, and ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405:4313-4319.
133. Lopez-Bascon, M. A., Calderon-Santiago, M., Priego-Capote, F. (2016). Confirmatory and quantitative analysis of fatty acid esters of hydroxy fatty acids in serum by solid phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry, Analitica Chimica Acta, 943:82-88.
134. Tosh, S. M., Chu, Y. (2015). Systematic review of the effect of processing of whole-grain oat cereals on glycaemic response. British Journal of Nutrition, 114(08):1256–1262.
135. Nišavić, M., Hozić, A., Hameršak, Z., Radić, M., Butorac, A., Duvnjak, M., Cindrić, M. (2017). High-efficiency microflow and nanoflow negative electrospray ionization of peptides induced by gas-phase proton transfer reactions. Analytical chemistry, 89(9): 4847-4854.

ŽIVOTOPIS

Ana-Marija Liberati Pršo (rođ. Liberati-Čizmek) rođena je 5.svibnja 1982.godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i srednju školu (prirodoslovno-matematičku, V.gimnaziju). Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2000. godine, te ga završava 2007. godine. 2004. godine upisuje Doktorski studij «Nutricionizam» Prehrambeno-Biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2011.-2017. Specijalistički se usavršava, te u svibnju 2017. godine stiče zvanje specijalista interne medicine. 2018. godine započinje subspecijalističko usavršavanje iz endokrinologije, dijabetologije i bolesti metabolizma. Za vrijeme specijalističkog i subspecijalističkog usavršavanja radi kao odjelni liječnik Klinike za internu medicinu KB Sveti Duh u Zagrebu. Prethodno je, tijekom 2009. godine radila kao liječnik u ordinaciji obiteljske medicine, a tijekom 2010. godine kao liječnik u Sveučilišnoj klinici Vuk Vrhovac. Od 2009. godine djeluje kao edukator i predavač Zagrebačkog dijabetičkog društva, gdje je od 2011.-2013. bila voditelj Obiteljskog Savjetovališta za dijabetes, te u kojem je dugogodišnji član Predsjedništva. U svojstvu autorstva edukativnih stručno-popularnih članaka ostvarila je suradnju sa nekolicinom tvrtki i portala (Vitaminoteka, dijabetes.hr, zadi.hr, Pharmabiz).

U svom znanstveno-istraživačkom radu bavi se temama iz područja endokrinologije, dijabetesa i prehrane te je u navedenim područjima aktivno i pasivno sudjelovala u nekoliko kliničkih ispitivanja (Phase III, Randomized, Active Comparator, Double-blined, Multi-center Study to Compare the Efficacy, Safety and Tolerability of ITCA 650 to Sitagliptin as Add-on Therapy to Metformin in Patients with Type 2 Diabetes, 2013-2015 ; A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Study to Evaluate Cardiovascular Outcomes of TAK-875, 50mg in Addition to Standard of Care in Subjects with Type 2 Diabetes and with Cardiovascular Disease or Multiple Risk Factors for Cardiovascular Events, 2013-2014; - A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo- and Active-Controlled, Phase III Study to Evaluate the Efficacy and Safety of TAK-875 25mg and 50mg Compared to Placebo and Sitagliptin 100mg When Used in Combination with Metformin in Subjects with Type 2 Diabetes, 2013-2014; A Randomized, Parallel-Arm, Double-Blinded Study Comparing the Effect of Once-Weekly Dulaglutide with Placebo in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus on Sulfonylurea Therapy (AWARD-8: Assessment of Weekly AdministRation of LY2189265 in Diabetes-8), 2014; Optimiranje načina primjene levotiroksina, prospektivna randomizirana unakrsna klinička studija studija, 2015-2018), na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima i kongresima te u formiranju Nacionalnih smjernica za farmakološko liječenje bolesnika sa šećernom boelsti tipa 2, 2016.godine.

Autor i koautor je 8 znanstvenih radova, hrvatskih smjernica a liječenje šećerne bolesti tip 2, nekolicine kongresnih sažetaka i postera te brojnih predavanja na stručnim i znanstvenim skupovima, iz područja dijabetesa.

Članica je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za dijabetes i bolesti metabolizma, Hrvatskog endokrinološkog društva, ESPEN -a (The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism) te Predsjedništva Zagrebačkog dijabetičkog društva.
Udata je i majka troje djece.

Popis objavljenih radova:

- „Gender Differences in the Control of Cardiovascular Risk Factors in Patients with Type 2 Diabetes – A Cross-Sectional Study"; Šekerija Mario, Poljičanin Tamara, Erjavec Katja, liberati-Čizmek Ana-Marija, Prašek Manja, Metelko Željko, Internal Medicine 2011,
- „A 65-year-old female with poorly controlled type 2 diabetes mellitus – Case report", AM Liberati-Čizmek, I Kruljac, M Bakula, Netherlands Journal of medicine 2015,
- „Hrvatske smjernice za farmakološko liječenje bolesnika sa šećernom bolesti tipa 2", D.Rahelić i sur, Liječnički Vijesnik, 2016,
- Factors Affecting Gastrointestinal Absorptiom of Levothyroxine: A Review, Skelin M., Lucijanic T., Amidzic-Klaric D, Resic A., Bakula M, Liberati-Čizmek AM, Gharib H., Rahelic D., Clinical Therapeutics, Vol 39:378-403
- Prediabetes awareness among Southeastern European physicians, Kokic V, Kokic S, Krnic M, Petric S, Liberati-Cizmek AM, Simac T, Milenkovic T, Capkun V, Rahelic D, Blaslov N., Journal of Diabetes Investigation 2017
- „Which is the right therapeutic approach to biliary choledochal cyst? – Case report", M.Marušić, A.Dominković, Ž.Belošić Halle, R.Troskot Perić, I.Zoričić, D.Vukušić, AM Liberati-Čizmek, Acta Clinica Croatica 2017, 56:344-348
- Effect of timing of levothyroxine administration on the treatment of hypothyroidism: a three-period crossover randomized study, M Skelin, T Lucijanić, AM Liberati Čizmek, S Majanović Klobučar, M Lucijanić, L Jakupović, M Bakula, J Vučak Lončar, S Marušić, T Matić, Ž Romić, J Dumić, D Rahelić, Endocrine, 2018 vol 2: 432–439

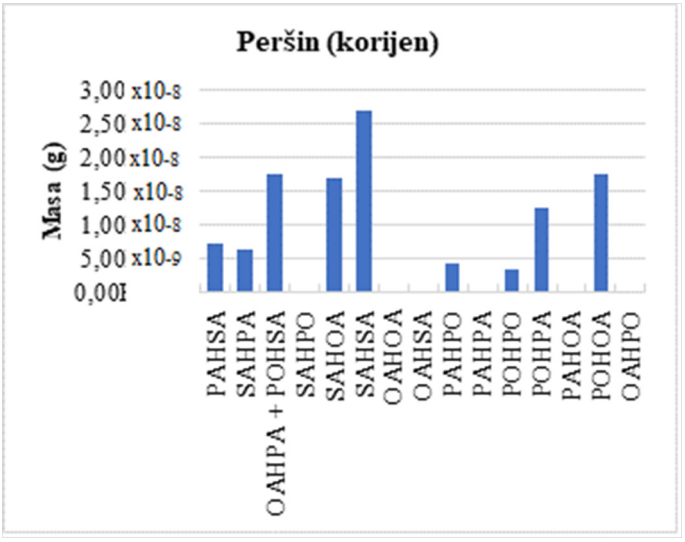
- "Analysis of Fatty Acid Esters of Hydroxyl Fatty Acid in Selected Plant Food.", AM Liberati-Čizmek, M Biluš, AL Brkić, I Colić Barić, M Bakula, A Hozić, M Cindrić, Plant Foods for Human Nutrition,2019, Vol 74:235-240.
- “Herbalife associated severe hepatotoxicity in a previously healthy woman”, D.Jurčić, M.Gabrić, R.Troskot Perić, AM Liberati Pršo, J.Mirat, A.Včev, I.Alerić, B.Abling, Acta Clinica Croatica 2019, 58:771-776

DODACI

Tablica D1-D20, Slika D1-D20. Kvantifikacija pojedinih FAHFA u 1 g analiziranih namirnica prikazana tabelarno i grafički.

Tablica D1. Peršin

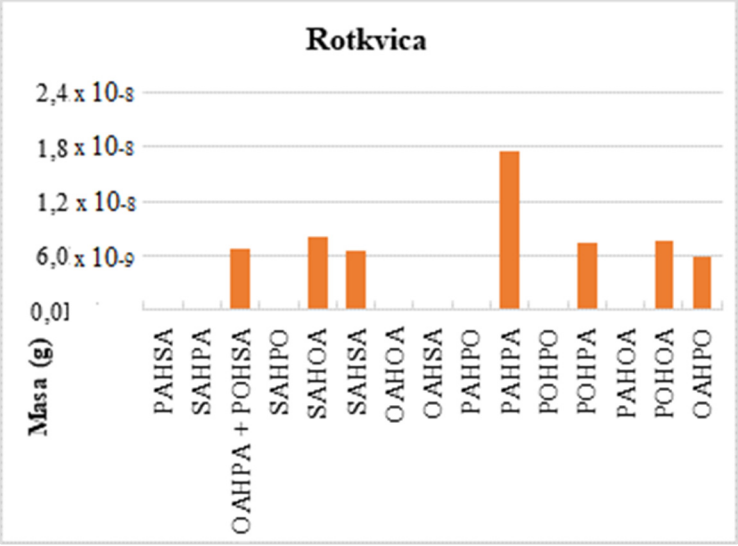
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$7{,}22 \times 10^{-9}$
SAHPA	$6{,}54 \times 10^{-9}$
OAHPA + POHSA	$1{,}75 \times 10^{-8}$
SAHPO	0
SAHOA	$1{,}70 \times 10^{-8}$
SAHSA	$2{,}70 \times 10^{-8}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$4{,}47 \times 10^{-9}$
PAHPA	0
POHPO	$3{,}60 \times 10^{-9}$
POHPA	$1{,}26 \times 10^{-8}$
PAHOA	0
POHOA	$1{,}75 \times 10^{-8}$
OAHPO	0



Slika D1. Peršin (korijen)

Tablica D2. Rotkvica

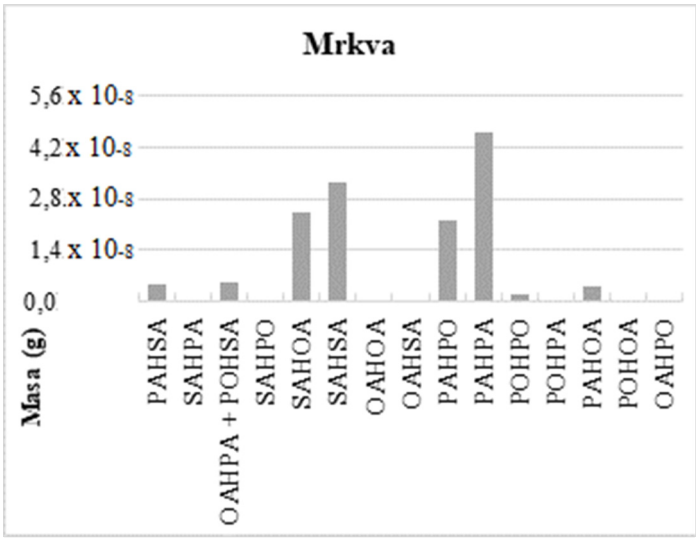
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	0
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$6{,}71 \times 10^{-9}$
SAHPO	0
SAHOA	$8{,}19 \times 10^{-9}$
SAHSA	$6{,}68 \times 10^{-9}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	0
PAHPA	$1{,}75 \times 10^{-8}$
POHPO	0
POHPA	$7{,}35 \times 10^{-9}$
PAHOA	0
POHOA	$7{,}71 \times 10^{-9}$
OAHPO	$5{,}98 \times 10^{-9}$



Slika D2. Rotkvica

Tablica D3. Mrkva

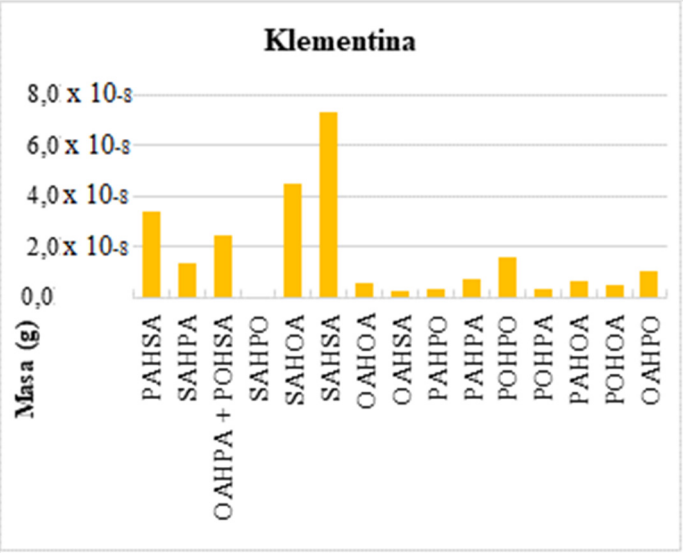
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$4{,}89 \times 10^{-9}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$5{,}26 \times 10^{-9}$
SAHPO	0
SAHOA	$2{,}41 \times 10^{-8}$
SAHSA	$3{,}24 \times 10^{-9}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$2{,}22 \times 10^{-8}$
PAHPA	$4{,}59 \times 10^{-8}$
POHPO	$1{,}99 \times 10^{-9}$
POHPA	0
PAHOA	$4{,}16 \times 10^{-9}$
POHOA	0
OAHPO	0



Slika D3. Mrkva

Tablica D4. Klementina

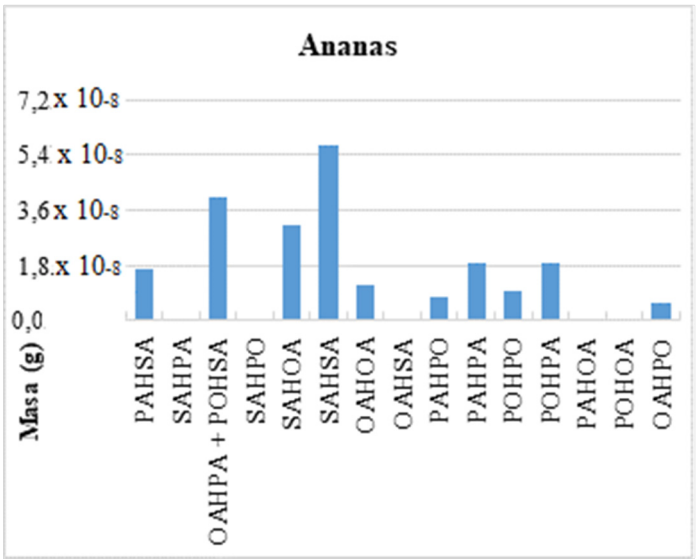
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$3{,}36 \times 10^{-8}$
SAHPA	$1{,}37 \times 10^{-8}$
OAHPA + POHSA	$2{,}42 \times 10^{-8}$
SAHPO	0
SAHOA	$4{,}51 \times 10^{-8}$
SAHSA	$7{,}35 \times 10^{-8}$
OAHOA	$5{,}31 \times 10^{-9}$
OAHSA	$2{,}67 \times 10^{-9}$
PAHPO	$3{,}32 \times 10^{-9}$
PAHPA	$7{,}52 \times 10^{-9}$
POHPO	$1{,}55 \times 10^{-8}$
POHPA	$3{,}13 \times 10^{-9}$
PAHOA	$6{,}23 \times 10^{-9}$
POHOA	$5{,}16 \times 10^{-9}$
OAHPO	$1{,}06 \times 10^{-8}$



Slika D4. Klementina

Tablica D5. Ananas

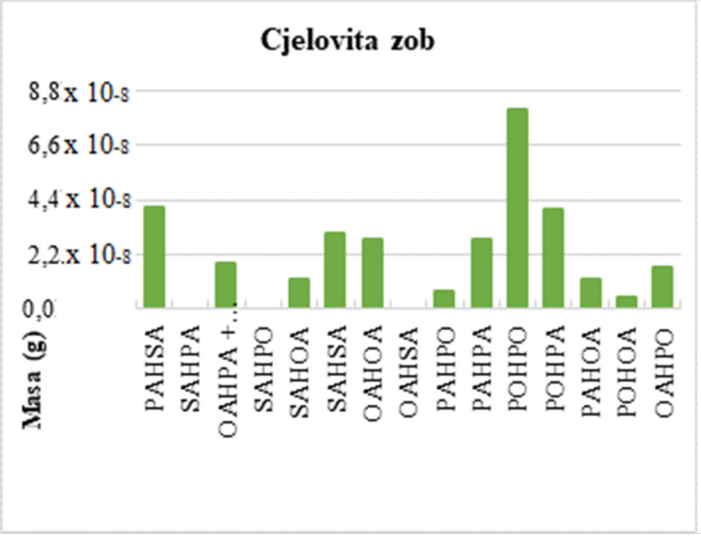
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$1{,}71 \times 10^{-8}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$4{,}01 \times 10^{-8}$
SAHPO	0
SAHOA	$3{,}14 \times 10^{-8}$
SAHSA	$5{,}73 \times 10^{-8}$
OAHOA	$1{,}15 \times 10^{-8}$
OAHSA	0
PAHPO	$7{,}35 \times 10^{-9}$
PAHPA	$1{,}88 \times 10^{-8}$
POHPO	$9{,}33 \times 10^{-9}$
POHPA	$1{,}86 \times 10^{-8}$
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	$5{,}50 \times 10^{-9}$



Slika D5. Ananas

Tablica D6. Cjelovita zob

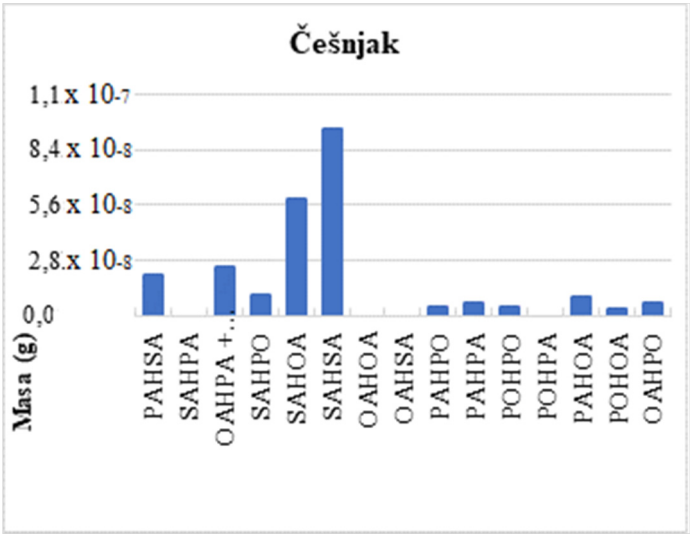
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$4{,}10 \times 10^{-8}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$1{,}84 \times 10^{-8}$
SAHPO	0
SAHOA	$1{,}22 \times 10^{-8}$
SAHSA	$3{,}03 \times 10^{-8}$
OAHOA	$2{,}83 \times 10^{-8}$
OAHSA	0
PAHPO	$6{,}88 \times 10^{-9}$
PAHPA	$2{,}84 \times 10^{-8}$
POHPO	$8{,}05 \times 10^{-8}$
POHPA	$4{,}01 \times 10^{-8}$
PAHOA	$1{,}22 \times 10^{-8}$
POHOA	$4{,}29 \times 10^{-9}$
OAHPO	$1{,}71 \times 10^{-8}$



Slika D6. Cjelovita zob

Tablica D7. Češnjak

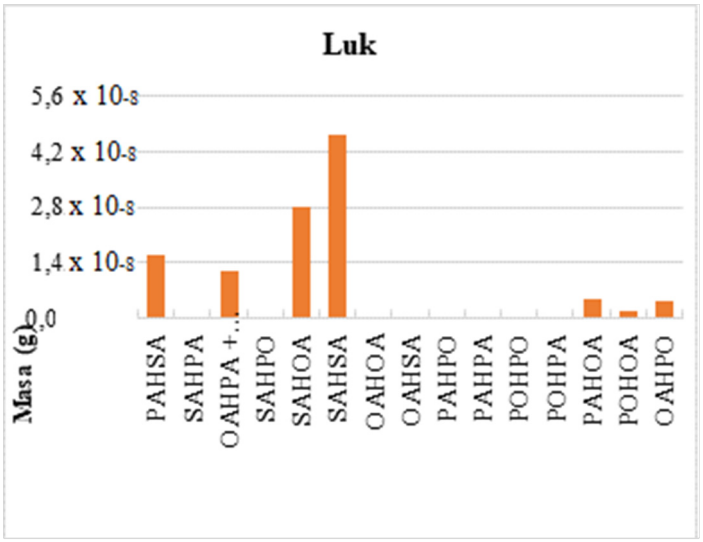
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$2{,}08 \times 10^{-8}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$2{,}46 \times 10^{-8}$
SAHPO	$1{,}03 \times 10^{-8}$
SAHOA	$5{,}89 \times 10^{-8}$
SAHSA	$9{,}45 \times 10^{-8}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$4{,}02 \times 10^{-9}$
PAHPA	$6{,}57 \times 10^{-9}$
POHPO	$4{,}05 \times 10^{-9}$
POHPA	0
PAHOA	$9{,}58 \times 10^{-9}$
POHOA	$3{,}60 \times 10^{-9}$
OAHPO	$6{,}47 \times 10^{-9}$



Slika D7. Češnjak

Tablica D8. Luk

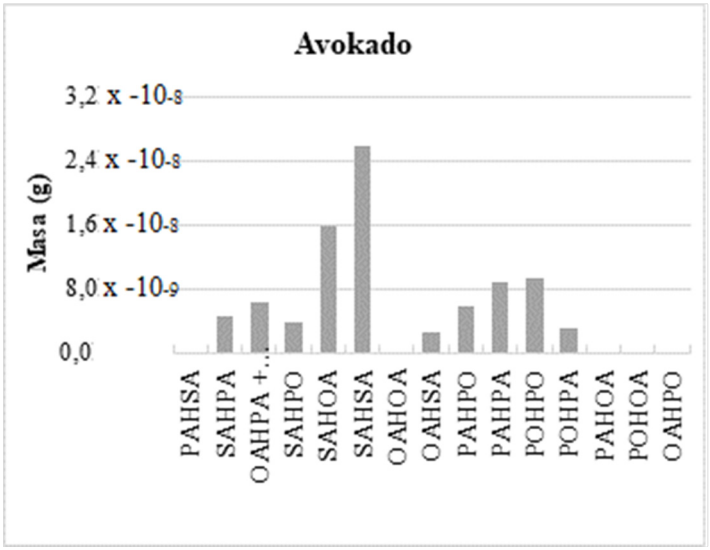
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$1{,}60 \times 10^{-8}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$1{,}18 \times 10^{-8}$
SAHPO	0
SAHOA	$2{,}82 \times 10^{-8}$
SAHSA	$4{,}61 \times 10^{-8}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	0
PAHPA	0
POHPO	0
POHPA	0
PAHOA	$4{,}64 \times 10^{-9}$
POHOA	$1{,}58 \times 10^{-9}$
OAHPO	$4{,}41 \times 10^{-9}$



Slika D8. Luk

Tablica D9. Avokado

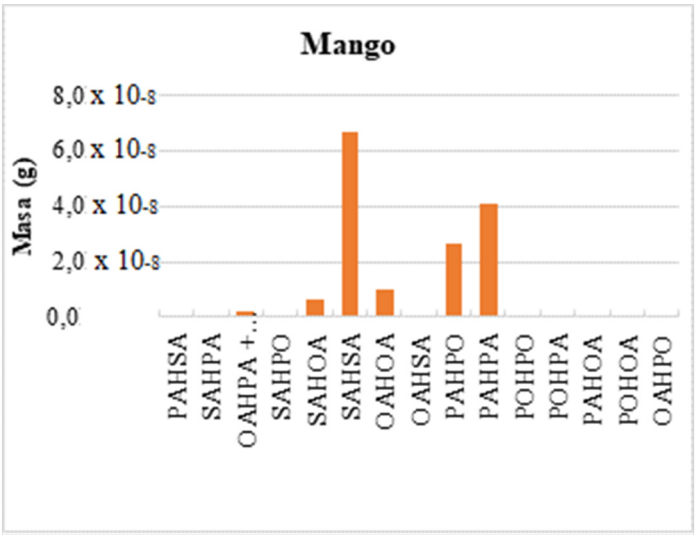
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	0
SAHPA	$4{,}54 \times 10^{-9}$
OAHPA + POHSA	$6{,}50 \times 10^{-9}$
SAHPO	$3{,}92 \times 10^{-9}$
SAHOA	$1{,}59 \times 10^{-8}$
SAHSA	2,58E-08
OAHOA	0
OAHSA	$2{,}53 \times 10^{-9}$
PAHPO	$5{,}79 \times 10^{-9}$
PAHPA	$8{,}94 \times 10^{-9}$
POHPO	$9{,}31 \times 10^{-9}$
POHPA	$3{,}14 \times 10^{-9}$
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	0



Slika D9. Avokado

Tablica D10. Mango

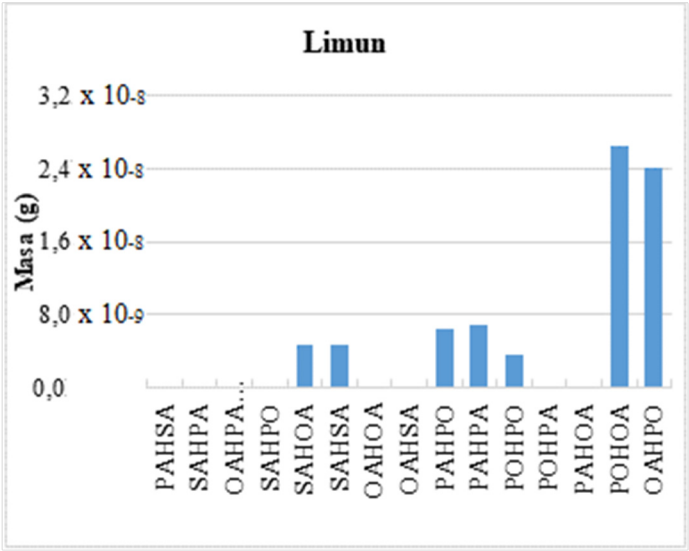
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	0
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$1{,}83 \times 10^{-8}$
SAHPO	0
SAHOA	$6{,}25 \times 10^{-9}$
SAHSA	$6{,}65 \times 10^{-8}$
OAHOA	$1{,}03 \times 10^{-9}$
OAHSA	0
PAHPO	$2{,}65 \times 10^{-8}$
PAHPA	$4{,}05 \times 10^{-8}$
POHPO	0
POHPA	0
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	0



Slika D10. Avokado

Tablica D11. Limun

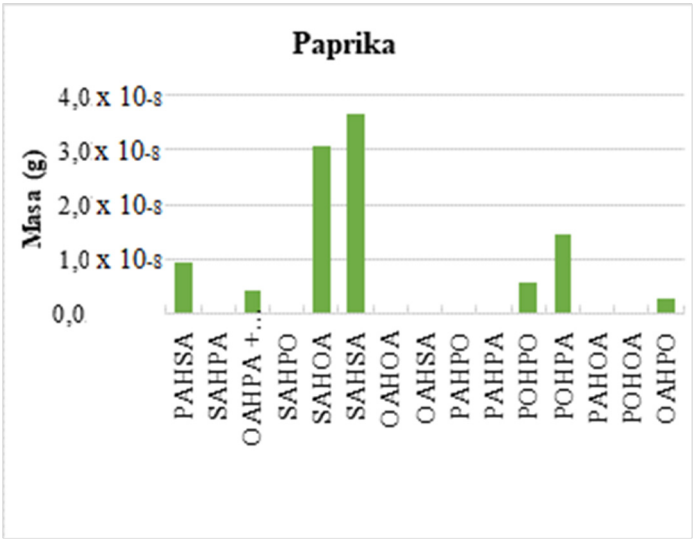
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	0
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	0
SAHPO	0
SAHOA	$4{,}70 \times 10^{-9}$
SAHSA	$4{,}62 \times 10^{-9}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$6{,}49 \times 10^{-9}$
PAHPA	$6{,}80 \times 10^{-9}$
POHPO	$3{,}57 \times 10^{-9}$
POHPA	0
PAHOA	0
POHOA	$2{,}65 \times 10^{-8}$
OAHPO	$2{,}41 \times 10^{-8}$



Slika D11. Limun

Tablica D12. Paprika

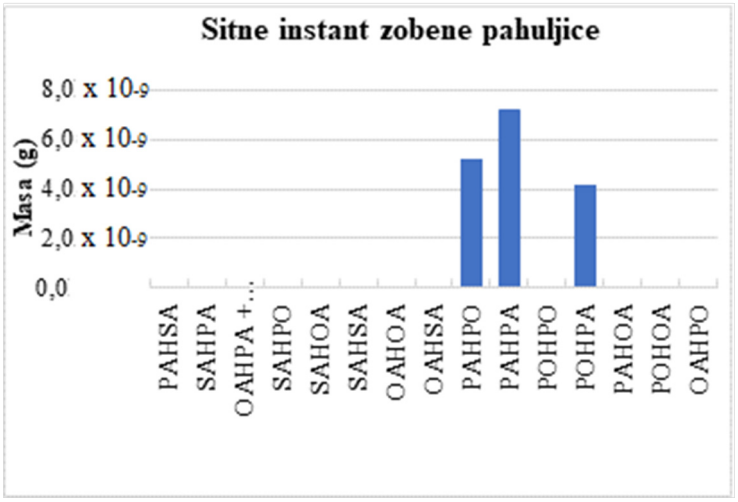
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$9{,}29 \times 10^{-8}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$4{,}20 \times 10^{-9}$
SAHPO	0
SAHOA	$3{,}08 \times 10^{-8}$
SAHSA	$3{,}65 \times 10^{-9}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	0
PAHPA	0
POHPO	$5{,}67 \times 10^{-9}$
POHPA	$1{,}44 \times 10^{-8}$
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	$2{,}78 \times 10^{-9}$



Slika D12. Paprika

Tablica D13. Sitne instant zobene pahuljice

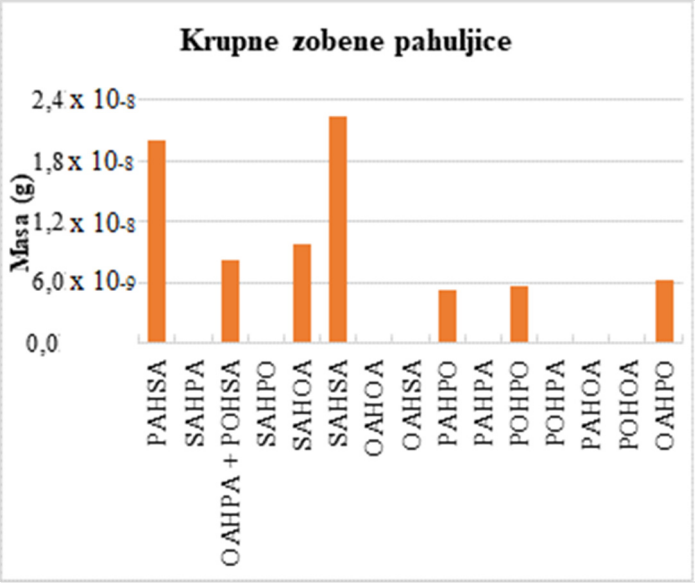
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	0
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	0
SAHPO	0
SAHOA	0
SAHSA	0
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$5{,}17 \times 10^{-9}$
PAHPA	$7{,}20 \times 10^{-9}$
POHPO	0
POHPA	$4{,}14 \times 10^{-9}$
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	0



Slika D13. Sitne instant zobene pahuljice

Tablica D14. Krupne zobene pahuljice

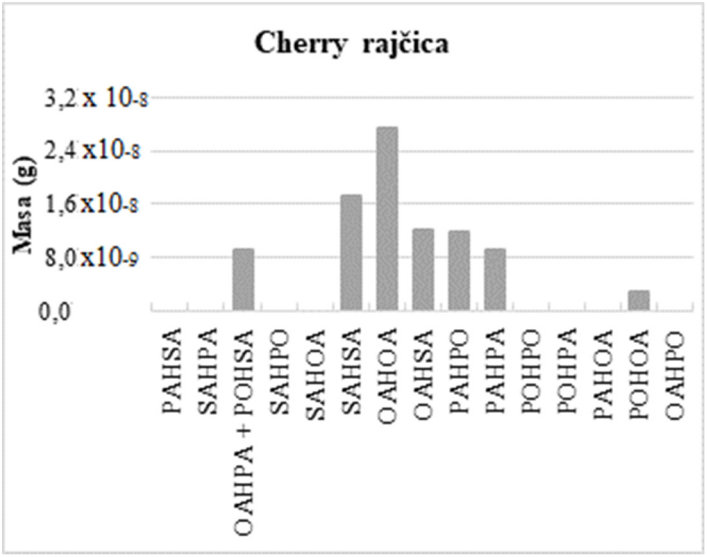
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	2,01 x 10^{-8}
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	8,28 x 10^{-9}
SAHPO	0
SAHOA	9,72 x 10^{-9}
SAHSA	2,24 x 10^{-8}
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	5,18 x 10^{-9}
PAHPA	0
POHPO	5,71 x 10^{-9}
POHPA	0
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	6,17 x 10^{-9}



Slika D14. Krupne zobene pahuljice

Tablica D15. Cherry rajčica

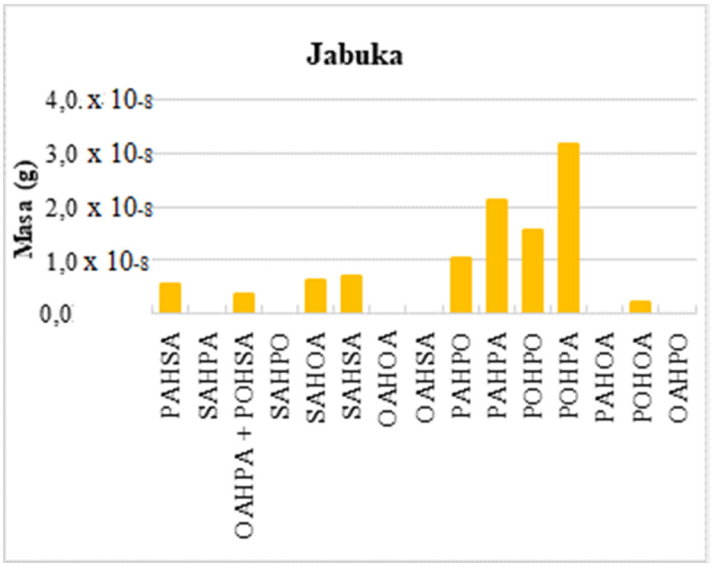
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	0
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$9{,}26 \times 10^{-9}$
SAHPO	0
SAHOA	0
SAHSA	$1{,}71 \times 10^{-8}$
OAHOA	$2{,}72 \times 10^{-8}$
OAHSA	$1{,}21 \times 10^{-8}$
PAHPO	$1{,}17 \times 10^{-8}$
PAHPA	$9{,}29 \times 10^{-9}$
POHPO	0
POHPA	0
PAHOA	0
POHOA	$2{,}98 \times 10^{-9}$
OAHPO	0



Slika D15. Cherry rajčica

Tablica D16. Jabuka

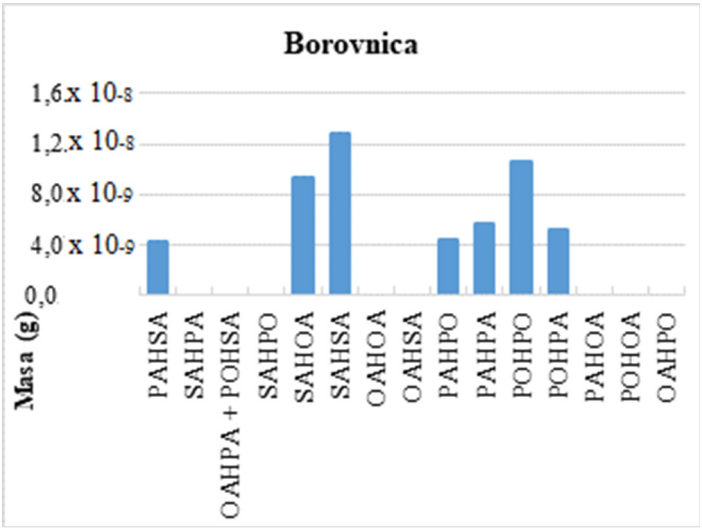
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$5{,}60 \times 10^{-9}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$3{,}71 \times 10^{-9}$
SAHPO	0
SAHOA	$6{,}04 \times 10^{-9}$
SAHSA	$6{,}83 \times 10^{-9}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$1{,}03 \times 10^{-8}$
PAHPA	$2{,}13 \times 10^{-8}$
POHPO	$1{,}55 \times 10^{-8}$
POHPA	$3{,}17 \times 10^{-8}$
PAHOA	0
POHOA	$2{,}24 \times 10^{-9}$
OAHPO	0



Slika D16. Jabuka

Tablica D17. Borovnica

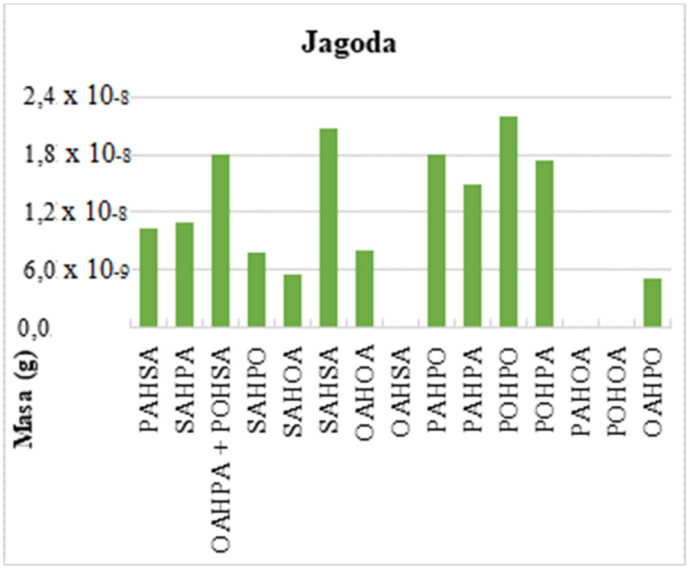
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$4{,}30 \times 10^{-9}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	0
SAHPO	0
SAHOA	$9{,}37 \times 10^{-9}$
SAHSA	$1{,}29 \times 10^{-8}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$4{,}32 \times 10^{-9}$
PAHPA	$5{,}67 \times 10^{-9}$
POHPO	$1{,}06 \times 10^{-8}$
POHPA	$5{,}16 \times 10^{-9}$
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	0



Slika D17. Borovnica

Tablica D18. Jagoda

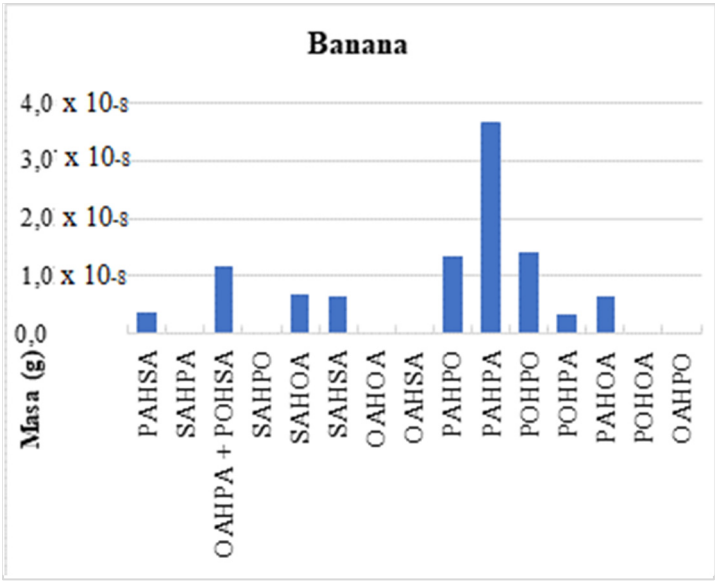
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$1{,}04 \times 10^{-8}$
SAHPA	$1{,}09 \times 10^{-8}$
OAHPA + POHSA	$1{,}80 \times 10^{-8}$
SAHPO	$7{,}76 \times 10^{-8}$
SAHOA	$5{,}63 \times 10^{-9}$
SAHSA	$2{,}07 \times 10^{-8}$
OAHOA	$7{,}98 \times 10^{-9}$
OAHSA	0
PAHPO	$1{,}80 \times 10^{-8}$
PAHPA	$1{,}48 \times 10^{-8}$
POHPO	$2{,}18 \times 10^{-8}$
POHPA	$1{,}73 \times 10^{-9}$
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	$5{,}18 \times 10^{-9}$



Slika D18. Jagoda

Tablica D19. Banana

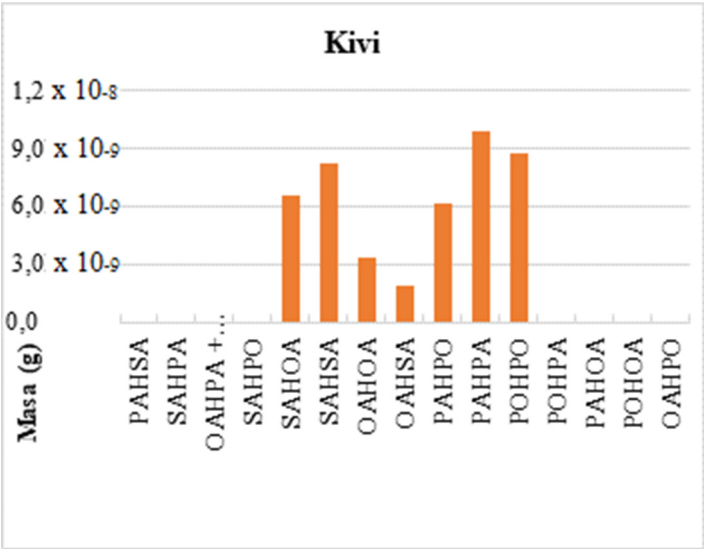
FAHFA	Masa (g)
PAHSA	$3{,}79 \times 10^{-9}$
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	$1{,}16 \times 10^{-8}$
SAHPO	0
SAHOA	$7{,}01 \times 10^{-9}$
SAHSA	$6{,}44 \times 10^{-9}$
OAHOA	0
OAHSA	0
PAHPO	$1{,}36 \times 10^{-8}$
PAHPA	$3{,}66 \times 10^{-8}$
POHPO	$1{,}41 \times 10^{-8}$
POHPA	$3{,}51 \times 10^{-9}$
PAHOA	$6{,}56 \times 10^{-9}$
POHOA	0
OAHPO	0



Slika D19. Banana

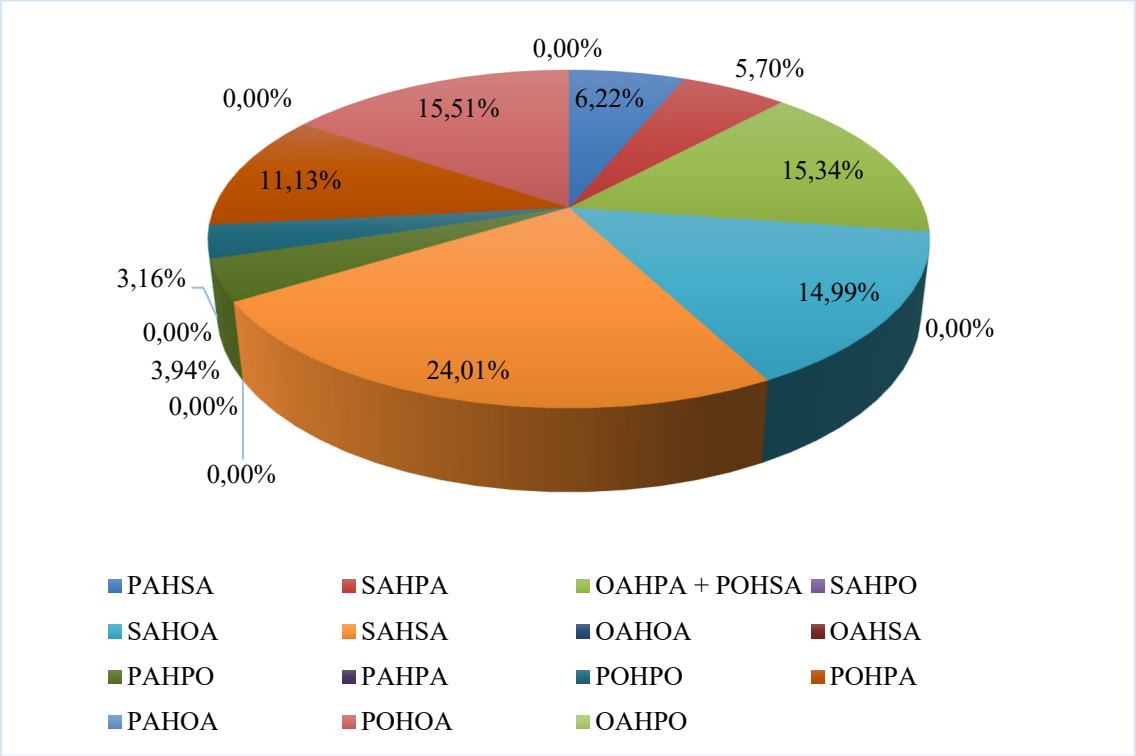
Tablica 20. Kivi

FAHFA	Masa (g)
PAHSA	0
SAHPA	0
OAHPA + POHSA	0
SAHPO	0
SAHOA	$6{,}58 \times 10^{-9}$
SAHSA	$8{,}28 \times 10^{-9}$
OAHOA	$3{,}35 \times 10^{-9}$
OAHSA	$1{,}92 \times 10^{-9}$
PAHPO	$6{,}10 \times 10^{-9}$
PAHPA	$9{,}88 \times 10^{-9}$
POHPO	$8{,}76 \times 10^{-9}$
POHPA	0
PAHOA	0
POHOA	0
OAHPO	0

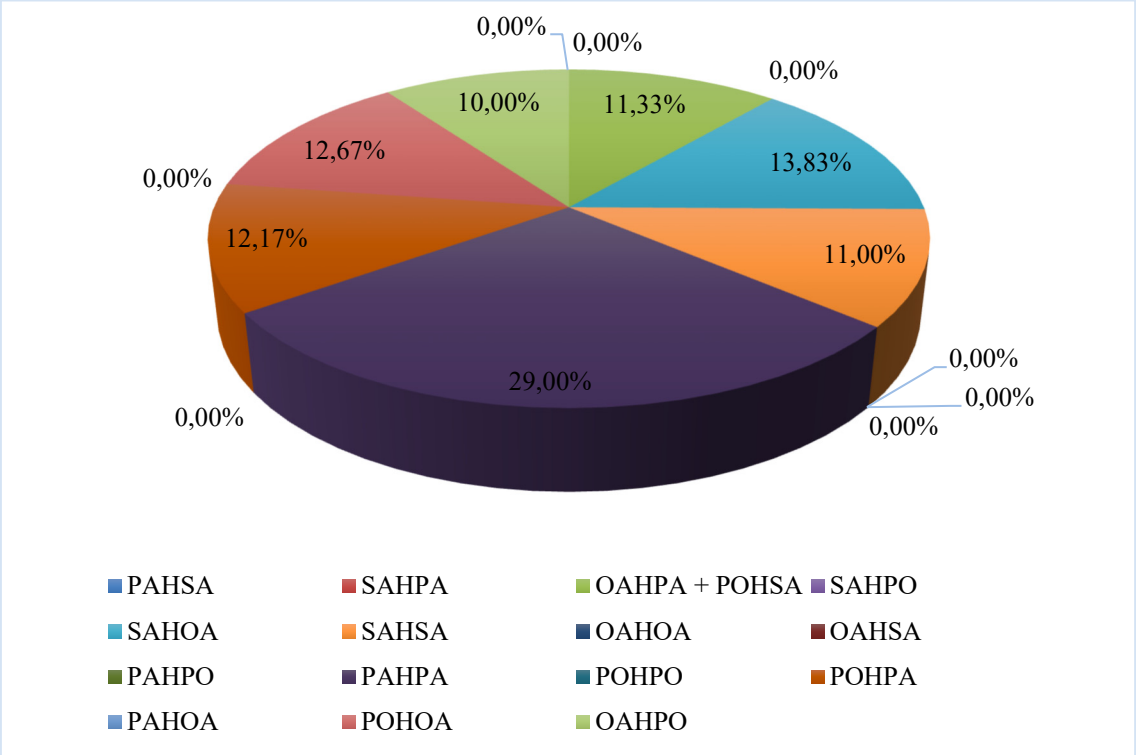


Slika D20. Kivi

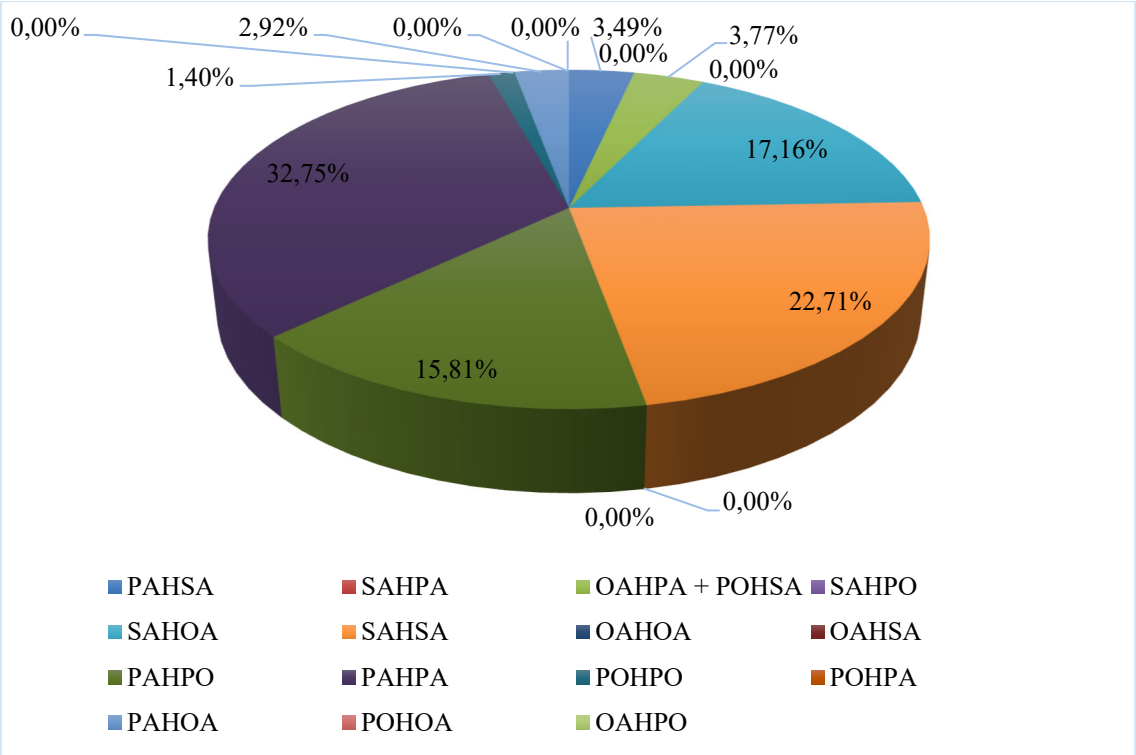
Grafički prikazani postotni udjeli određenih FAHFA razreda u svakoj analiziranoj namirnici, Slika D21-D40.



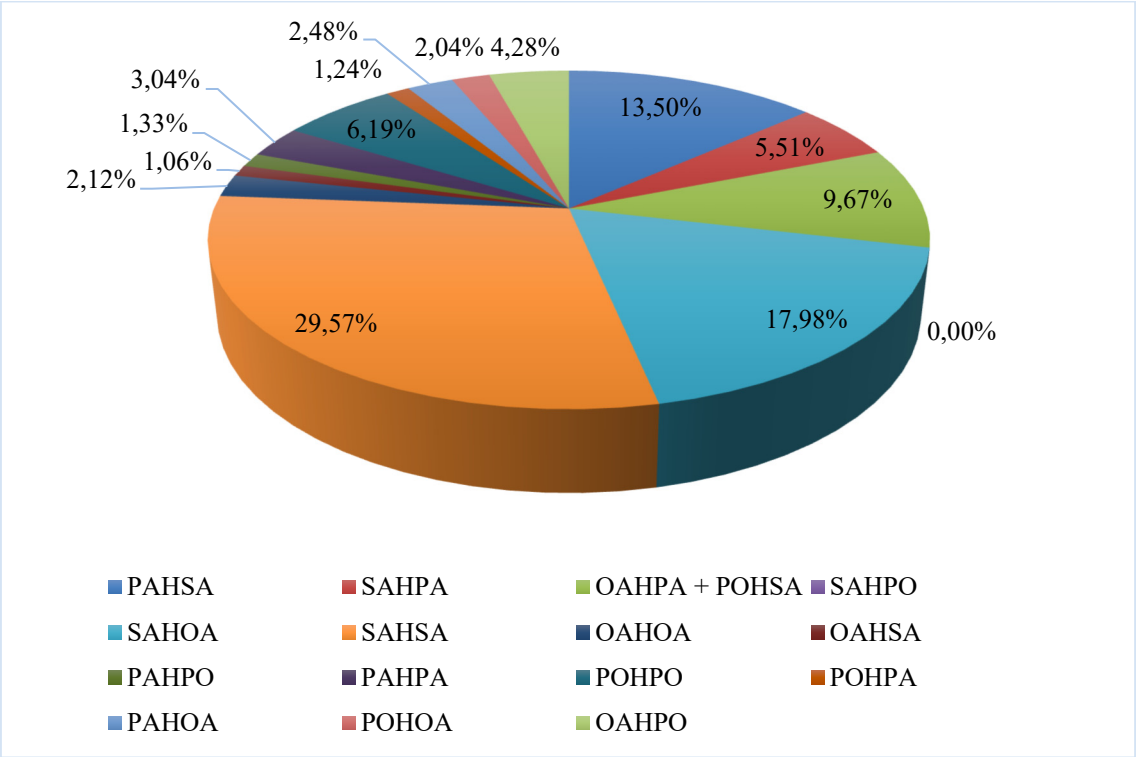
Slika D21. Peršin (korijen)



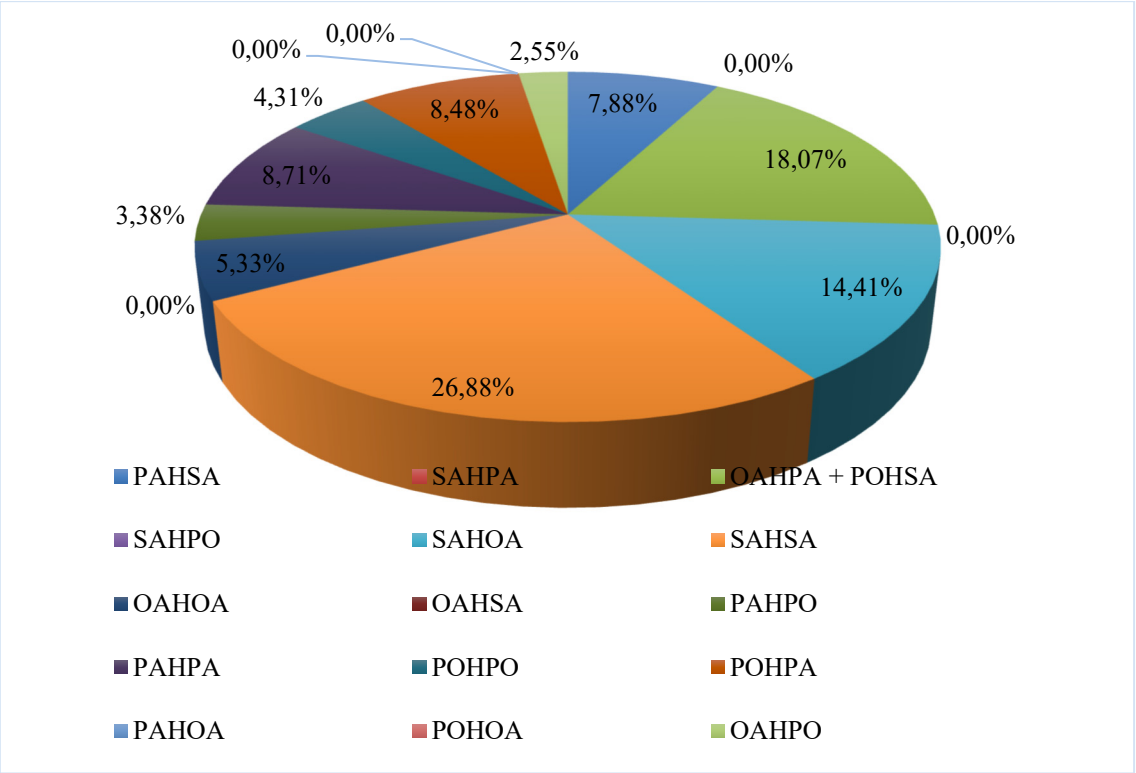
SlikaD22. Rotkvica



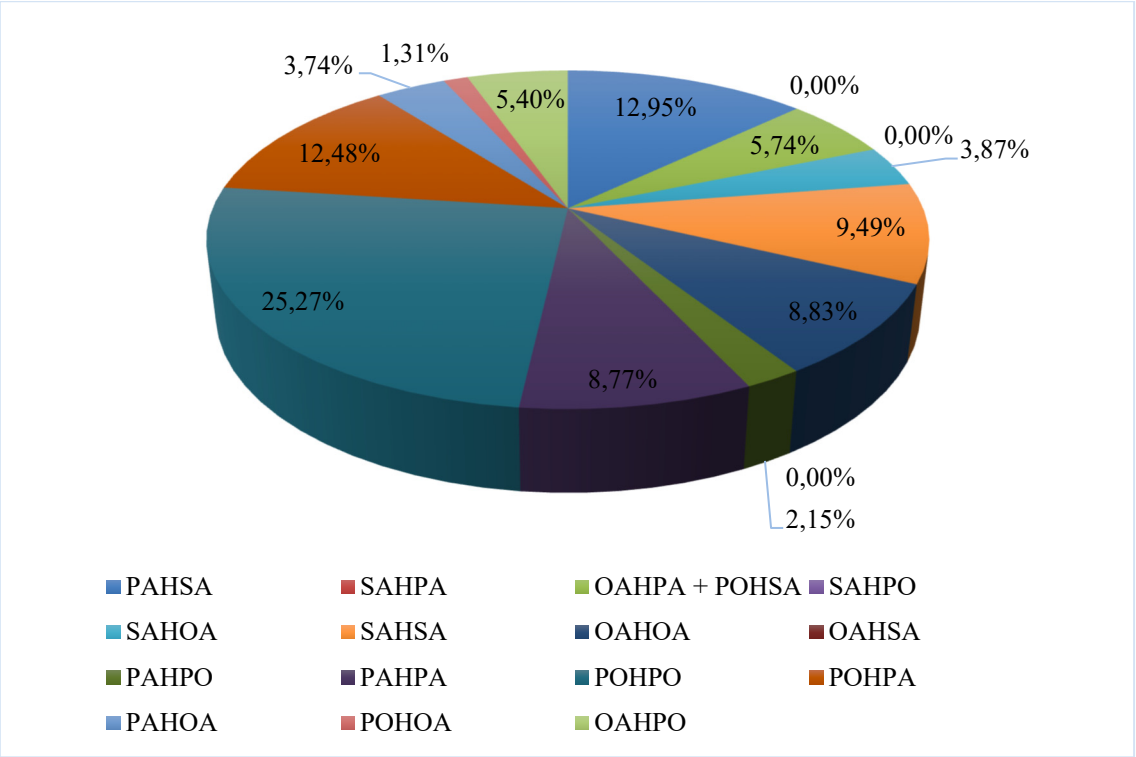
Slika D23. Mrkva



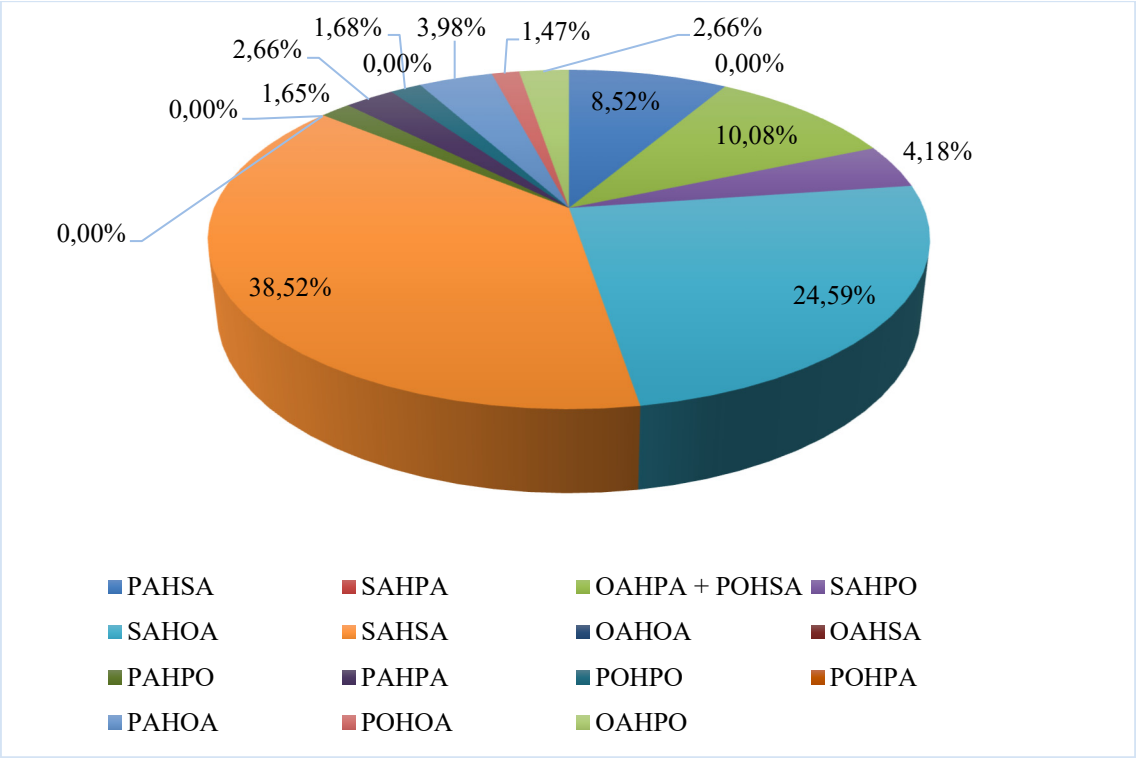
Slika D24. Klementina



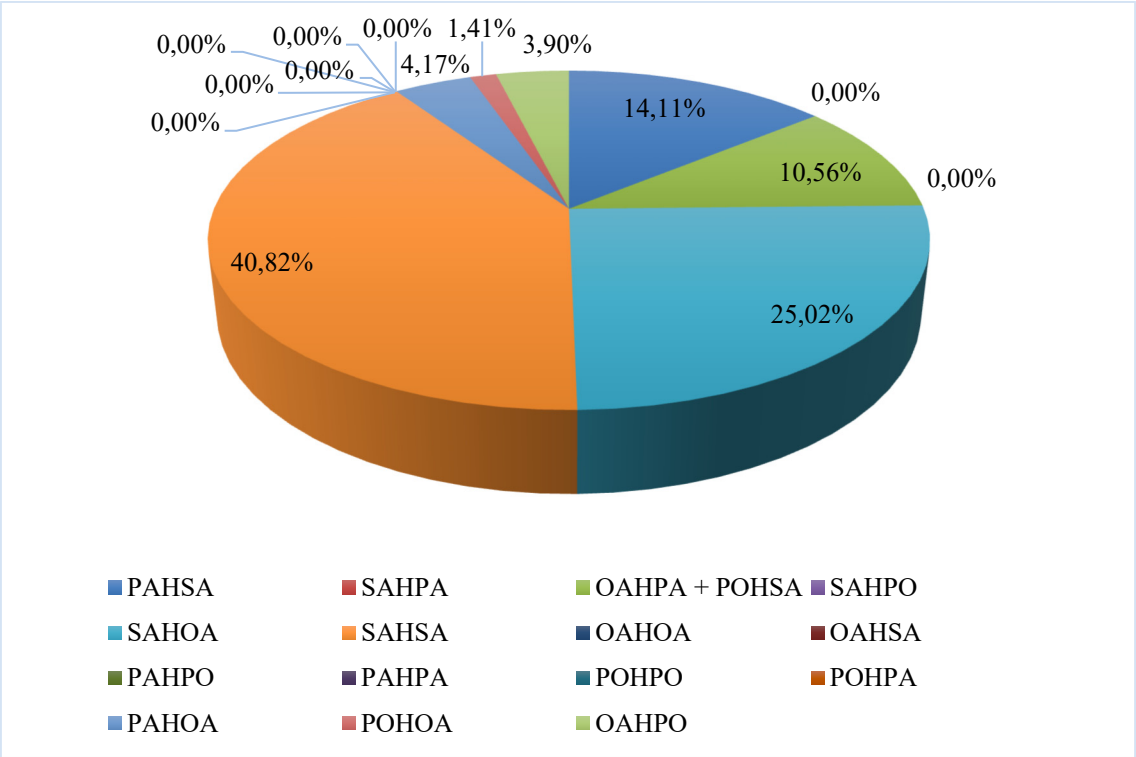
Slika D25. Ananas



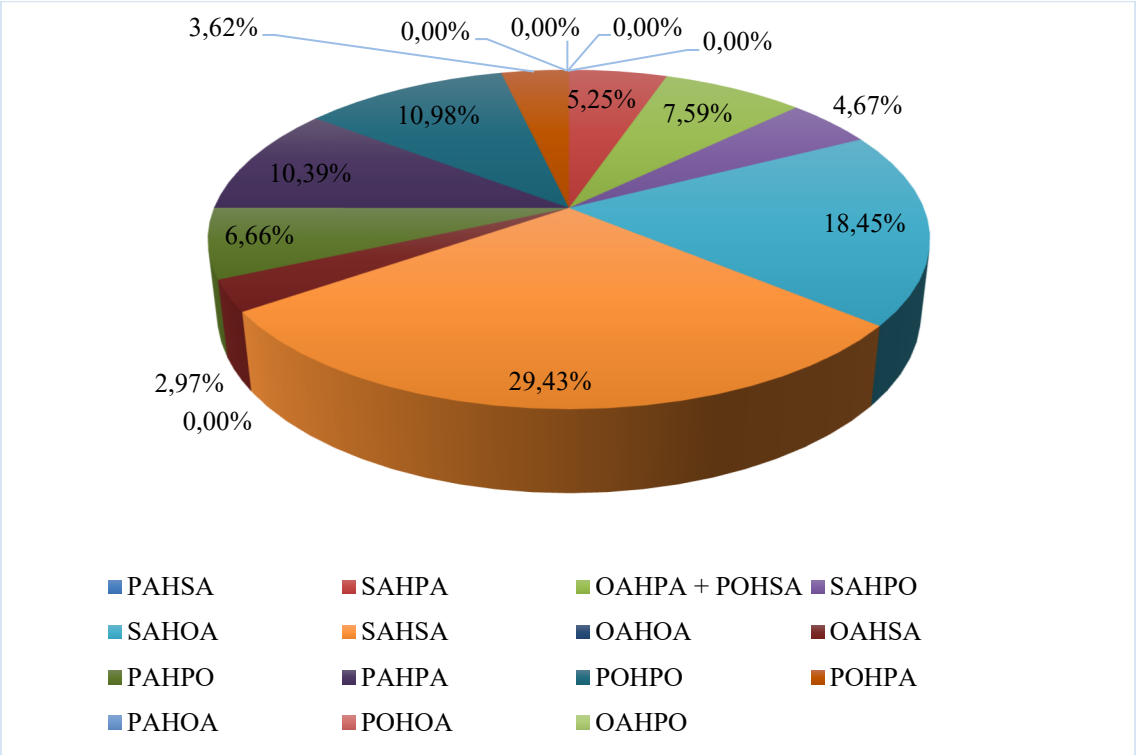
Slika D26. Cjelovita zob



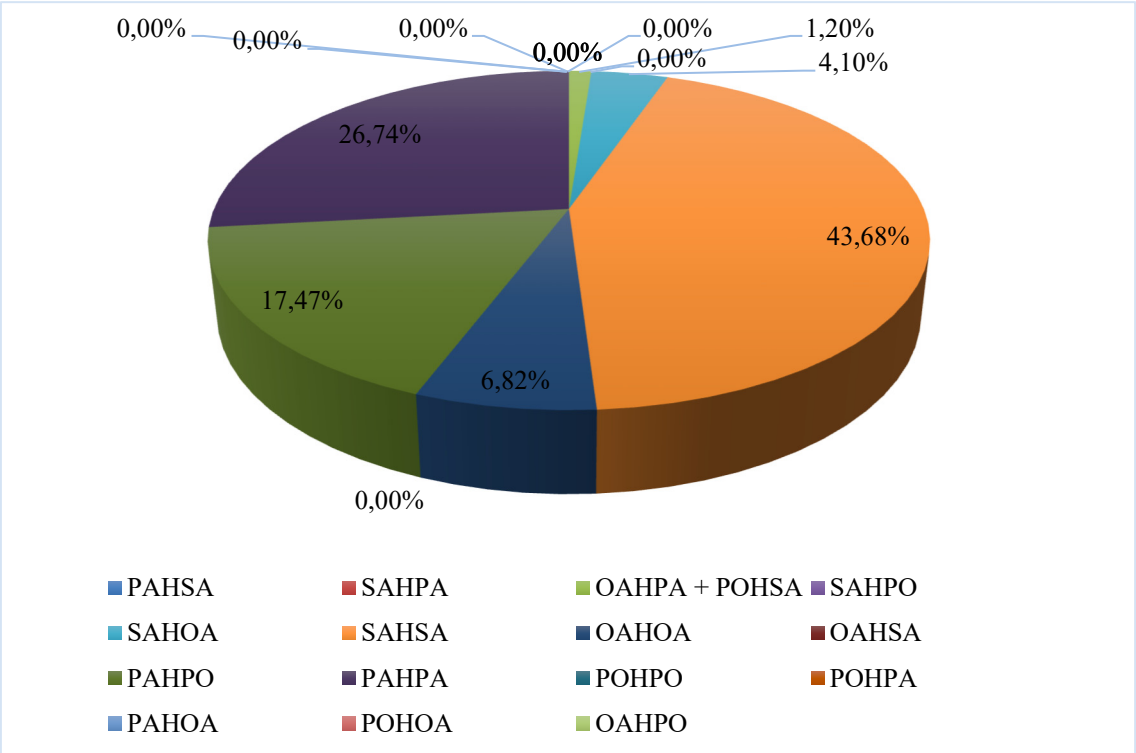
Slika D27. Češnjak



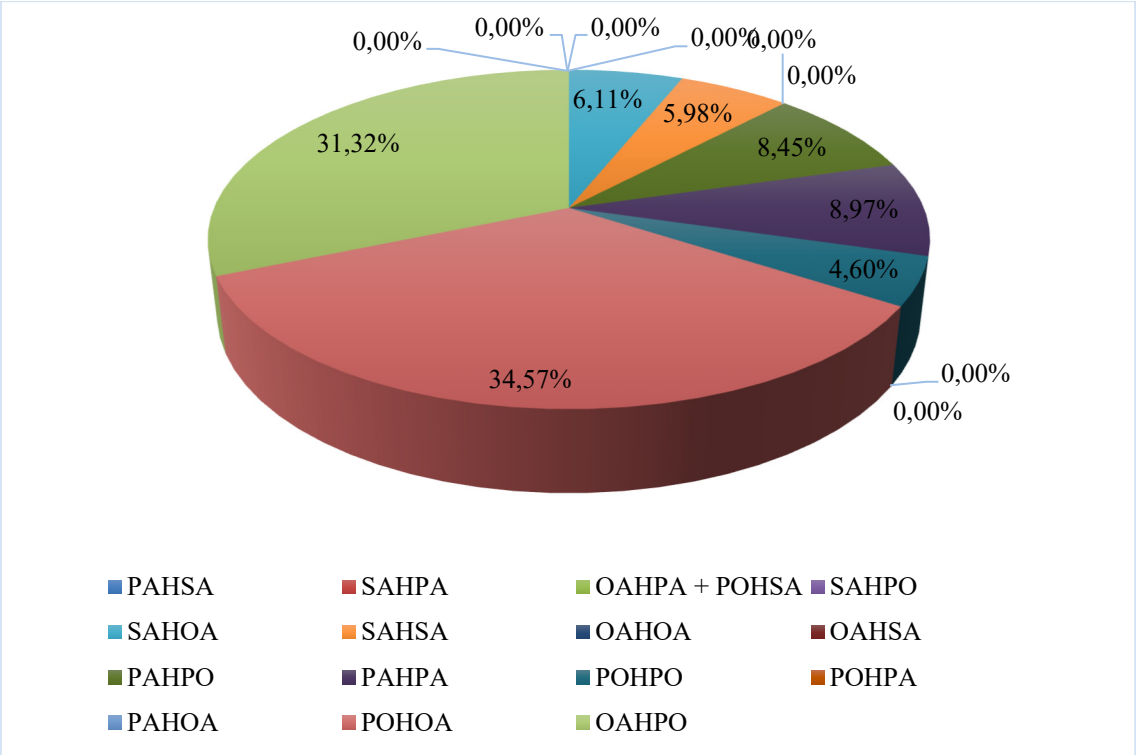
Slika D28. Luk



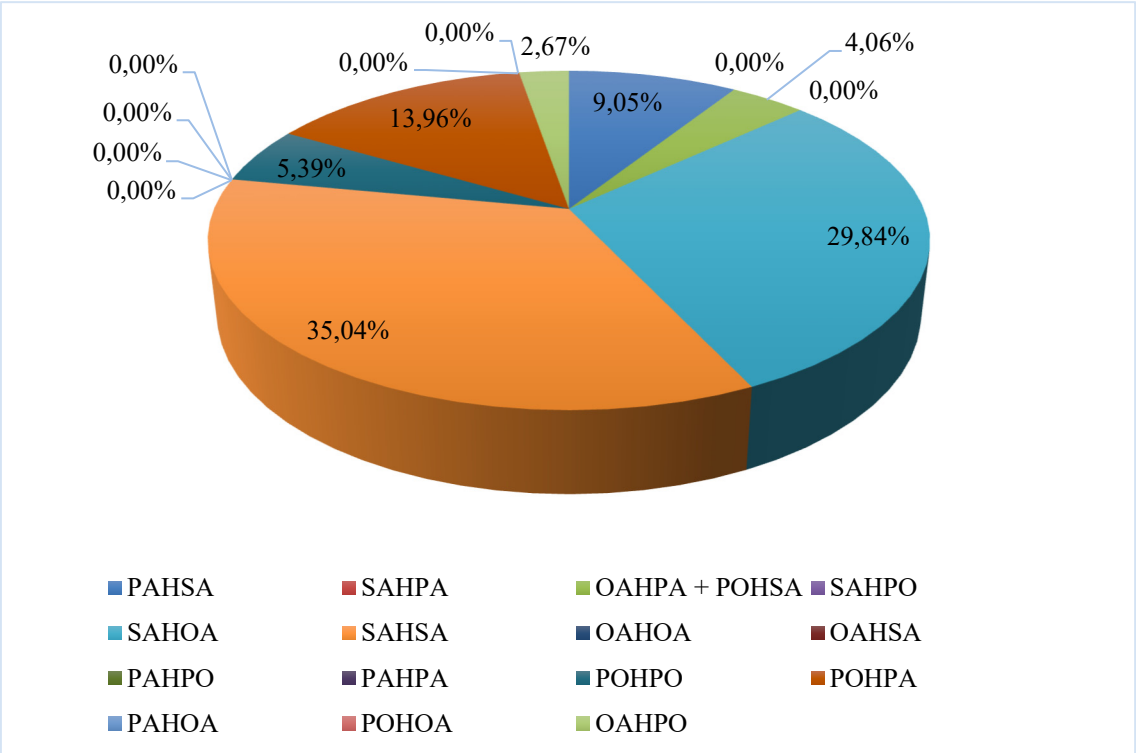
Slika D29. Avokado



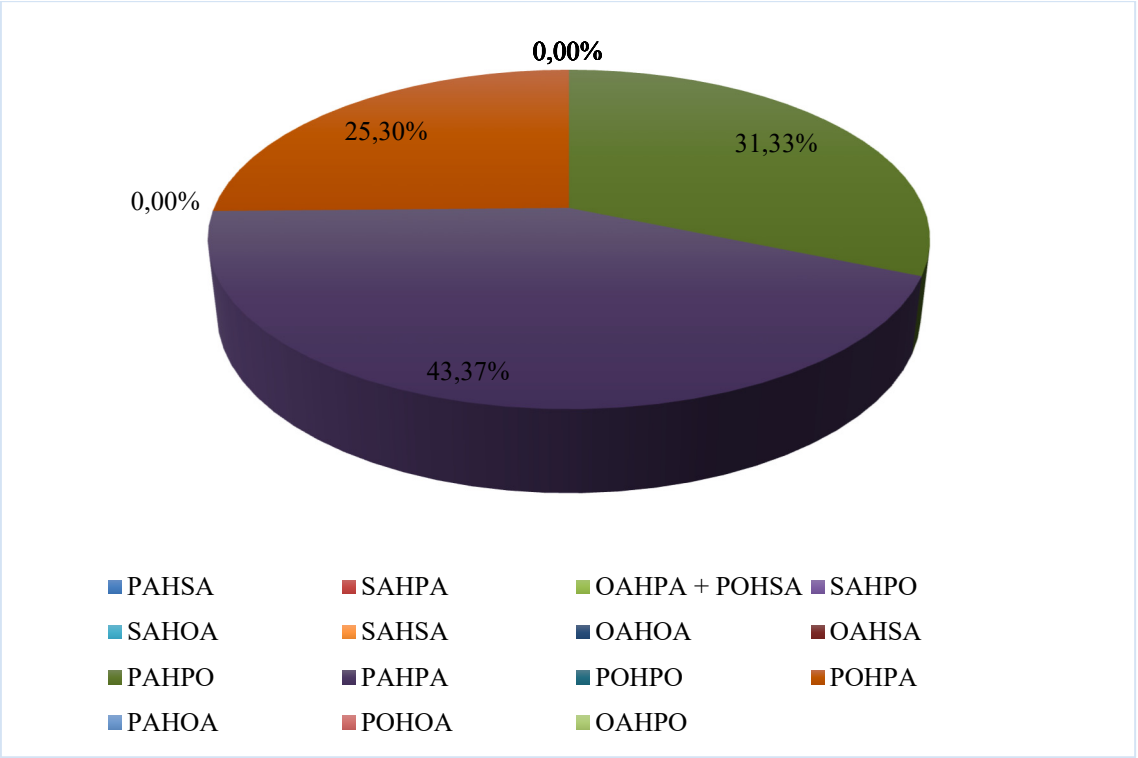
Slika D30. Mango



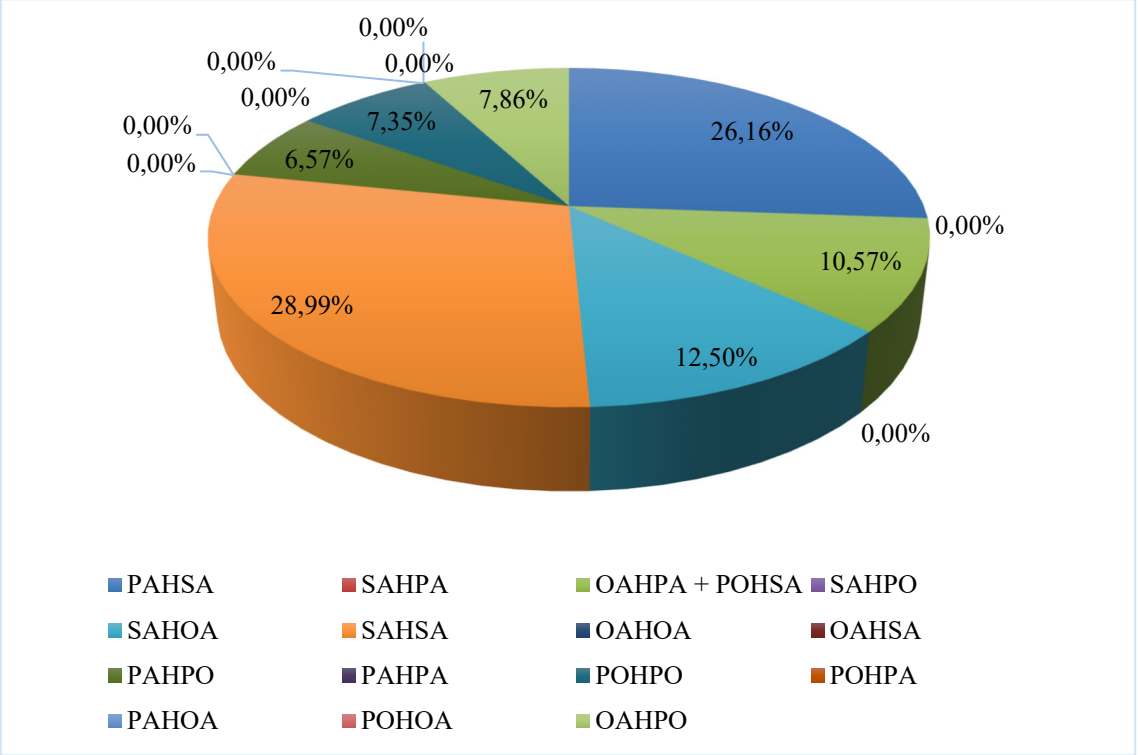
Slika D31. Limun



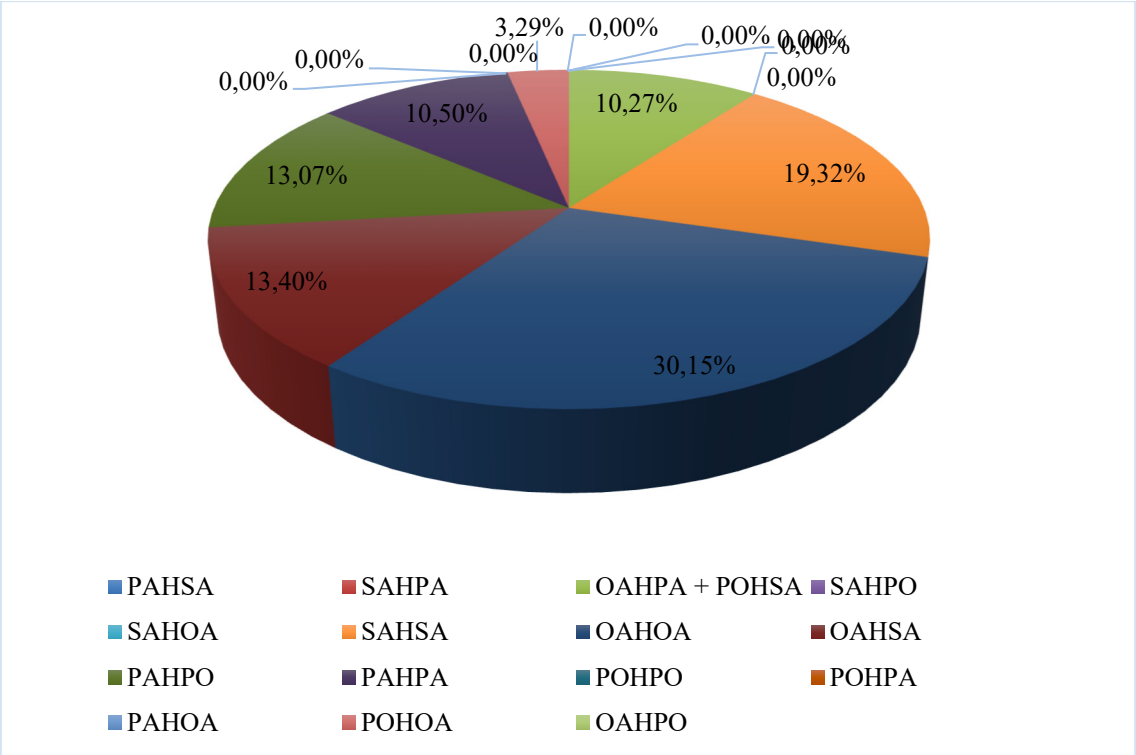
Slika D32. Paprika



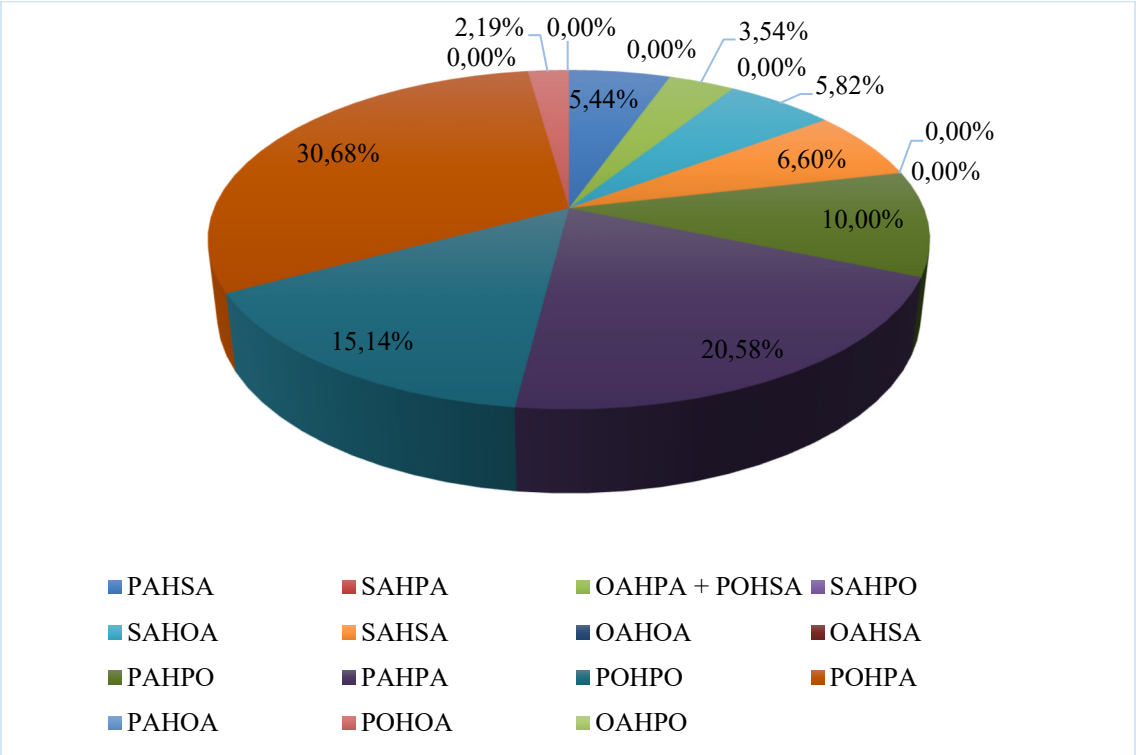
Slika D33. Sitne instant zobene pahuljice



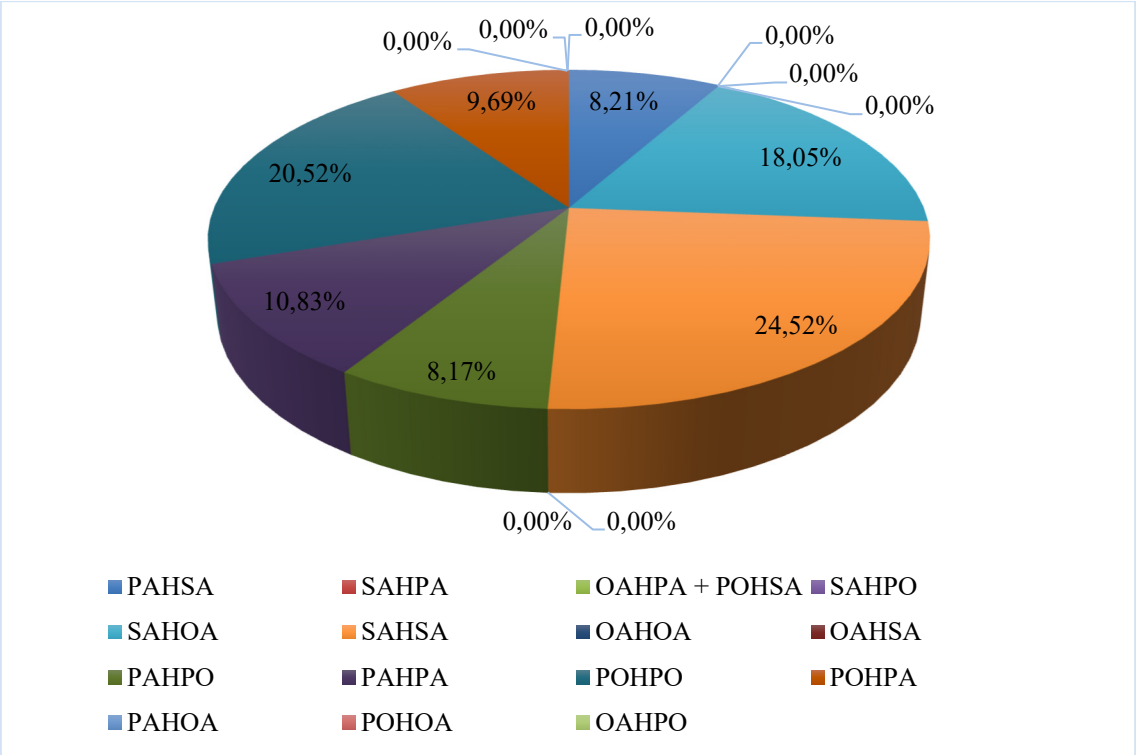
Slika D3419. Krupne zobene pahuljice



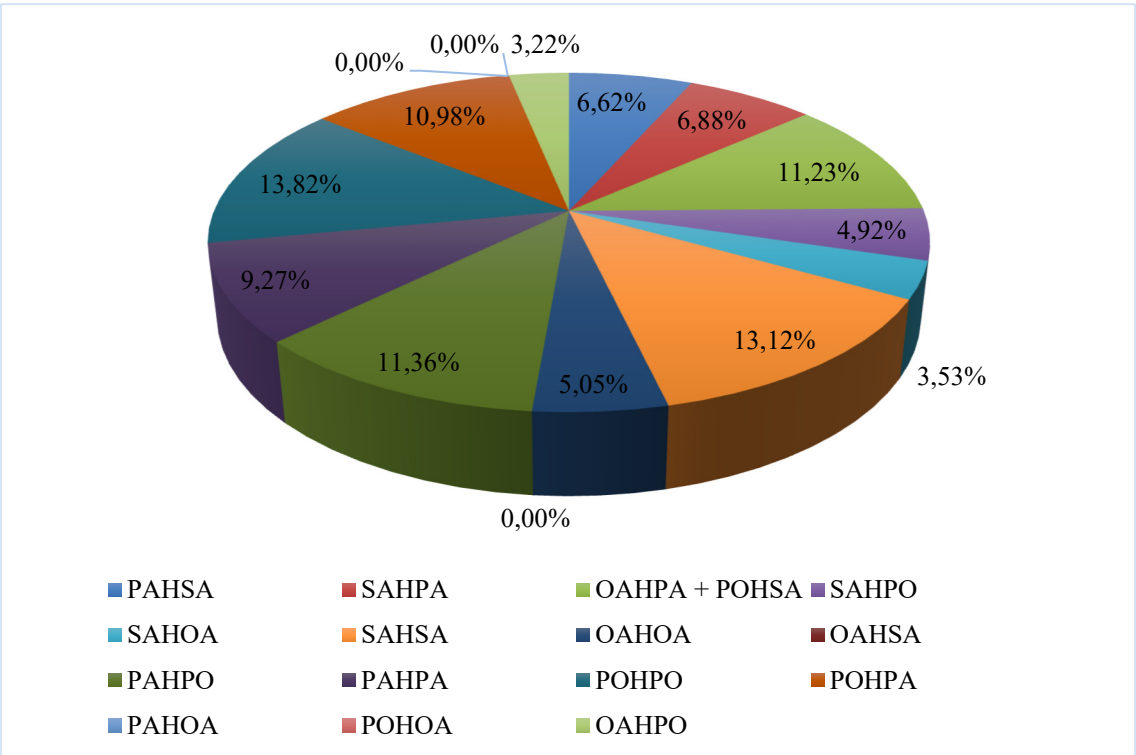
Slika D3520. Cherry rajčica



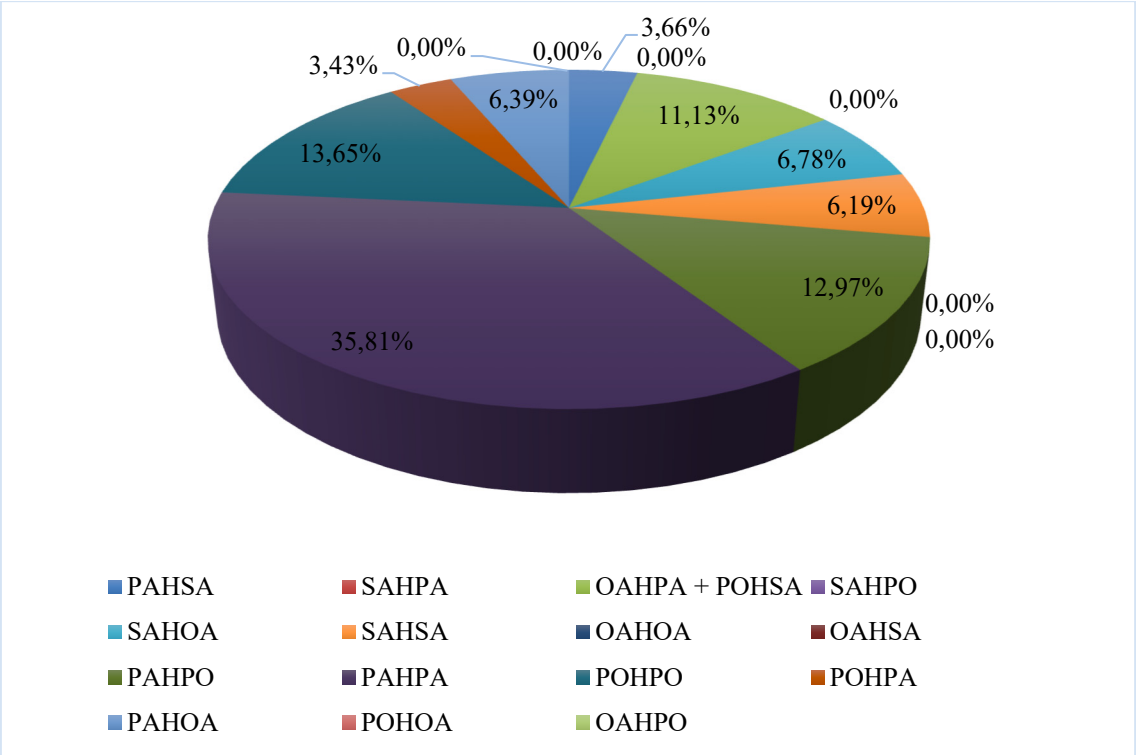
Slika D36. Jabuka



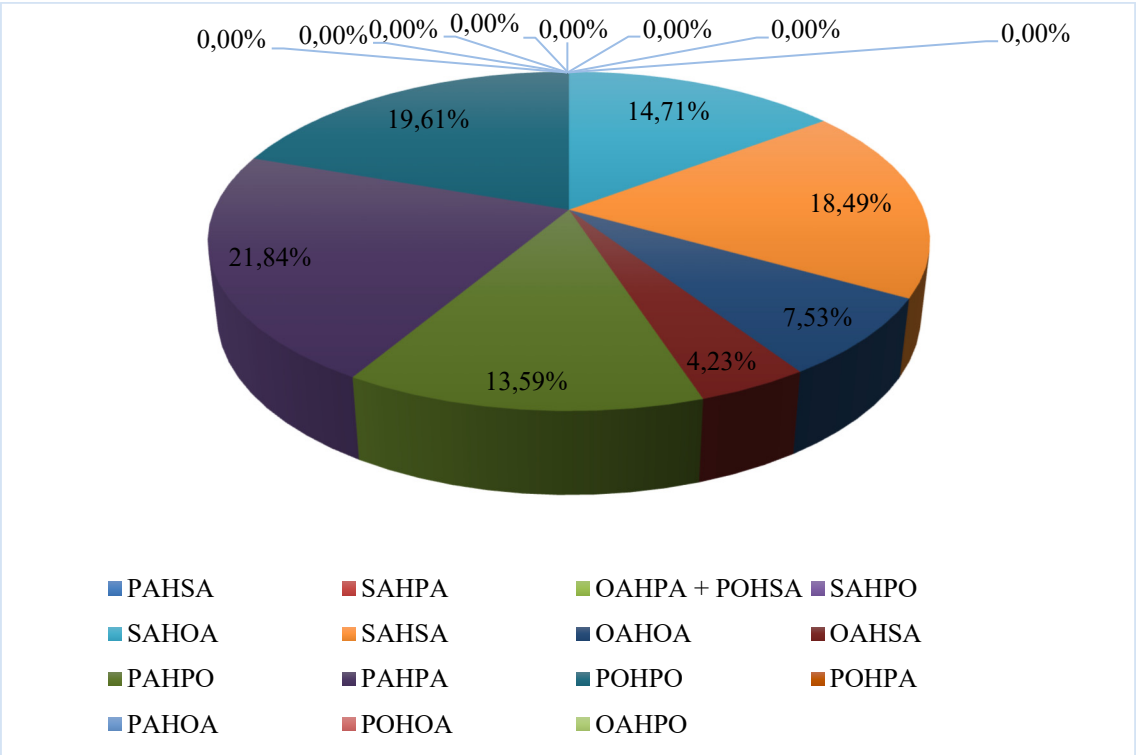
Slika D3721. Borovnica



Slika D3822. Jagoda



Slika D39. Banana



Slika D40. Kivi

Tablica D21. Analiza glavnih komponenti

Komponente	Početne vrijednosti			Suma kvadrata opterećenja			Rotacija sume kvadrata		
	S	V.	K.n.	S	V.	K.n.	S	V.	K.n.
1	4,253	28,356	28,356	4,253	28,356	28,356	3,336	22,238	22,238
2	2,643	17,622	45,979	2,643	17,622	45,979	2,831	18,875	41,112
3	2,141	14,274	60,253	2,141	14,274	60,253	1,956	13,039	54,151
4	1,526	10,175	70,429	1,526	10,175	70,429	1,678	11,187	65,338
5	1,189	7,927	78,355	1,189	7,927	78,355	1,610	10,733	76,071
6	1,071	7,141	85,496	1,071	7,141	85,496	1,414	9,425	85,496
7	,727	4,848	90,344						
8	,571	3,804	94,148						
9	,339	2,262	96,410						
10	,251	1,671	98,080						
11	,137	,911	98,991						
12	,080	,535	99,526						
13	,036	,242	99,768						
14	,021	,137	99,906						
15	,014	,094	100,000						

S – Suma; v. – % varijanca; K.n. – Kumulativni niz %

Tablica D22. Faktorska matrica

	Komponente					
	1	2	3	4	5	6
PAHSA	,923	,064	-,121	,001	-,152	-,056
SAHPA	,347	-,250	,016	,292	,229	,696
OAHPA + POHSA	,777	-,164	,156	,181	-,013	,118
SAHPO	,362	-,379	,319	-,001	,143	,352
SAHOA	,669	-,622	,216	-,093	-,045	-,197
SAHSA	,662	-,420	,445	,042	,128	-,196
OAHOA	,383	,658	,075	,584	,034	-,143
OAHSA	-,148	,128	,129	,920	,026	-,195
PAHPO	-,166	,470	,663	-,082	,484	,155
PAHPA	,011	,614	,555	-,362	,317	-,097
POHPO	,643	,653	-,220	-,085	-,138	,127
POHPA	,447	,572	-,251	-,157	-,309	,355
PAHOA	,778	,134	,107	-,193	,041	-,330
POHOA	-,006	-,131	-,687	,020	,634	-,031
OAHPO	,494	,089	-,624	-,060	,469	-,158

Metoda ekstrakcije: Analiza glavnih komponenti za 6 izlučenih faktora

Tablica D23. Rotirana faktorska matrica[a]

	Komponente					
	1	2	3	4	5	6
PAHSA	**,670**	,626	-,169	,137	,054	,081
SAHPA	,101	,095	-,076	,106	,066	**,874**
OAHPA + POHSA	**,663**	,297	-,079	,004	,142	,383
SAHPO	,403	-,087	,064	-,092	-,136	**,565**
SAHOA	**,901**	-,114	-,226	-,024	-,173	,153
SAHSA	**,896**	-,122	,077	-,050	,041	,203
OAHOA	,103	,502	,232	,052	**,791**	-,057
OAHSA	-,093	-,207	-,075	-,081	**,936**	,032
PAHPO	-,119	-,078	**,940**	-,127	,113	,145
PAHPA	,032	,169	**,917**	-,104	-,056	-,202
POHPO	,136	**,933**	,122	,138	,085	-,029
POHPA	-,084	**,903**	-,001	-,034	-,079	,080
PAHOA	**,726**	,418	,164	,150	-,013	-,176
POHOA	-,155	-,120	-,144	**,908**	-,045	,081
OAHPO	,220	,318	-,087	**,856**	-,005	-,035

Metoda ekstrakcije: Analiza glavnih komponenti. Metoda rotacije: Varimax sa Kaiser Normalizacijom.

a. Rotacija je konvergirana u 6 iteracija

Tablica D24. Spearmanov koeficijent korelacije za promatrane kiseline

		PAHSA	SAHPA	OAHPA + POHSA	SAHPO	SAHOA	SAHSA	OAHOA	OAHSA	PAHPO	PAHPA	POHPO	POHPA	PAHOA	POHOA	OAHPO	Ukupno
PAHSA	r	1,000	,205	**,736****	,146	**,675****	**,622****	,171	-,225	-,249	-,204	,485*	,310	,557*	,143	**,573****	**,726****
	p	.	,385	,000	,540	,001	,003	,470	,340	,289	,387	,030	,184	,011	,548	,008	,000
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
SAHPA	r	,205	1,000	,376	,420	,181	,216	,117	,374	-,072	-,154	,368	,206	-,029	,165	,052	,322
	p	,385	.	,103	,065	,446	,360	,622	,104	,762	,517	,110	,385	,905	,487	,829	,167
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
OAHPA + POHSA	r	,736**	,376	1,000	,328	**,576****	**,584****	,364	,030	-,082	,019	,293	,246	,535*	,274	,467*	**,778****
	p	,000	,103	.	,158	,008	,007	,115	,901	,732	,937	,210	,297	,015	,242	,038	,000
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
SAHPO	r	,146	,420	,328	1,000	,150	,227	-,043	,088	,024	-,070	,244	-,036	,109	-,095	,133	,257
	p	,540	,065	,158	.	,528	,335	,859	,711	,919	,768	,300	,879	,648	,689	,576	,275
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
SAHOA	r	,675**	,181	,576**	,150	1,000	**,783****	-,116	-,044	-,486*	-,250	,149	,048	,488*	,064	,329	**,566****
	p	,001	,446	,008	,528	.	,000	,625	,855	,030	,288	,532	,841	,029	,788	,157	,009
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
SAHSA	r	,622**	,216	,584**	,227	,783**	1,000	,303	,058	-,143	-,075	,021	-,104	,400	,002	,263	**,790****
	p	,003	,360	,007	,335	,000	.	,193	,808	,547	,754	,929	,662	,081	,995	,263	,000
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
OAHOA	r	,171	,117	,364	-,043	-,116	,303	1,000	,357	,444	,436	,222	,158	,062	-,002	,163	,473*
	p	,470	,622	,115	,859	,625	,193	.	,122	,050	,055	,346	,507	,795	,994	,492	,035
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
OAHSA	r	-,225	,374	,030	,088	-,044	,058	,357	1,000	-,012	-,004	,061	-,310	-,054	,065	-,158	-,097
	p	,340	,104	,901	,711	,855	,808	,122	.	,960	,986	,799	,183	,822	,786	,506	,685
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PAHPO	r	-,249	-,072	-,082	,024	-,486*	-,143	,444	-,012	1,000	**,758****	,159	-,024	-,063	-,326	-,341	,176
	p	,289	,762	,732	,919	,030	,547	,050	,960	.	,000	,502	,920	,791	,160	,141	,457
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PAHPA	r	-,204	-,154	,019	-,070	-,250	-,075	,436	-,004	,758**	1,000	,189	,160	,181	-,179	-,199	,251
	p	,387	,517	,937	,768	,288	,754	,055	,986	,000	.	,426	,501	,445	,449	,401	,286
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
POHPO	r	,485*	,368	,293	,244	,149	,021	,222	,061	,159	,189	1,000	**,567****	,231	-,118	,176	,324
	p	,030	,110	,210	,300	,532	,929	,346	,799	,502	,426	.	,009	,328	,621	,457	,163
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
POHPA	r	,310	,206	,246	-,036	,048	-,104	,158	-,310	-,024	,160	,567**	1,000	-,088	,047	,066	,232
	p	,184	,385	,297	,879	,841	,662	,507	,183	,920	,501	,009	.	,713	,845	,781	,326
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PAHOA	r	,557*	-,029	,535*	,109	,488*	,400	,062	-,054	-,063	,181	,231	-,088	1,000	,231	,347	**,583****
	p	,011	,905	,015	,648	,029	,081	,795	,822	,791	,445	,328	,713	.	,326	,134	,007
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
POHOA	r	,143	,165	,274	-,095	,064	,002	-,002	,065	-,326	-,179	-,118	,047	,231	1,000	,496*	,190
	p	,548	,487	,242	,689	,788	,995	,994	,786	,160	,449	,621	,845	,326	.	,026	,422
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

OAHPO	r	,573**	,052	,467*	,133	,329	,263	,163	-,158	-,341	-,199	,176	,066	,347	,496*	1,000	,387
	p	,008	,829	,038	,576	,157	,263	,492	,506	,141	,401	,457	,781	,134	,026	.	,092
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Ukupno	r	,726**	,322	,778**	,257	,566**	,790**	,473*	-,097	,176	,251	,324	,232	,583**	,190	,387	1,000
	p	,000	,167	,000	,275	,009	,000	,035	,685	,457	,286	,163	,326	,007	,422	,092	.
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

**. Korelacija je značajna na razini 0.01 (2-tailed).

*. Korelacija je značajna na razini 0.05 (2-tailed).

Tablica D25. Analiza glavnih komponenti

Komponente	Početne vrijednosti			Suma kvadrata opterećenja			Rotacija sume Kvadrata		
	S	V.	K.n.	S	V.	K.n.	S	V.	K.n.
1	9,127	45,634	45,634	9,127	45,634	45,634	7,735	38,677	38,677
2	4,020	20,101	65,734	4,020	20,101	65,734	4,483	22,417	61,094
3	1,955	9,776	75,511	1,955	9,776	75,511	2,731	13,653	74,747
4	1,544	7,722	83,233	1,544	7,722	83,233	1,697	8,486	83,233
5	,899	4,495	87,728						
6	,797	3,985	91,713						
7	,550	2,748	94,461						
8	,443	2,217	96,678						
9	,359	1,797	98,476						
10	,141	,706	99,182						
11	,097	,483	99,665						
12	,039	,193	9 9,858						
13	,020	,101	99,959						
14	,008	,041	100,000						
15	1,013E-013	1,063E-013	100,000						
16	1,004E-013	1,020E-013	100,000						
17	1,001E-013	1,007E-013	100,000						
18	-1,001E-013	-1,003E-013	100,000						
19	-1,003E-013	-1,016E-013	100,000						
20	-1,006E-013	-1,032E-013	100,000						

S – Suma; v. – % variance; K.n. – Kumulativni niz %

Tablica D26. Faktorska matrica[a]

	Komponente			
	1	2	3	4
Peršin (korijen)	,691	-,386	,072	,321
Rotkvica	,451	,459	,460	,482
Mrkva	,737	,467	,400	-,079
Klementina	,874	-,449	-,018	,012
Ananas	,909	-,146	-,001	-,021
Cjelovita zob	,355	,280	-,748	,089
Češnjak	,877	-,429	,142	-,002
Luk	,850	-,495	,102	,021
Avokado	,925	-,052	,047	-,073
Mango	,787	,241	,339	-,300
Limun	-,097	-,016	,486	,572
Paprika	,855	-,345	-,080	,180
Sitne zobene pahuljice	,151	,896	,159	,049
Krupne zobene pahuljice	,734	-,419	-,178	,003
Cherry rajčica	,246	,079	,286	-,741
Jabuka	,337	,699	-,374	,336
Borovnica	,868	,140	-,315	,091
Jagoda	,598	,379	-,488	-,116
Banana	,398	,811	,108	-,012
Kivi	,691	,487	,013	-,230

Metoda ekstrakcije: Analiza glavnih komponenti

a. 4 izlučena faktora

Tablica D27. Rotirana faktorska matrica[a]

	Komponente			
	1	2	3	4
Peršin (korijen)	**,825**	,048	-,018	-,226
Rotkvica	,238	**,802**	-,130	-,375
Mrkva	,413	**,842**	,005	,217
Klementina	**,974**	,002	,091	,098
Ananas	**,849**	,261	,192	,145
Cjelovita zob	,130	,051	**,864**	-,073
Češnjak	**,974**	,088	-,044	,122
Luk	**,984**	,010	-,039	,091
Avokado	**,814**	,357	,188	,203
Mango	,541	**,635**	-,005	,433
Limun	,017	,220	-,469	**-,552**
Paprika	**,920**	,067	,178	-,072
Sitne zobene pahuljice	-,303	**,846**	,216	,006
Krupne zobene pahuljice	**,828**	-,103	,208	,079
Cherry rajčica	,106	,212	-,160	**,785**
Jabuka	-,045	,564	**,672**	-,288
Borovnica	**,666**	,344	,564	,018
Jagoda	,282	,323	**,732**	,181
Banana	-,059	**,853**	,298	,095
Kivi	,324	**,654**	,347	,338

Metoda ekstrakcije: Analiza glavnih komponenti.

Metoda rotacije: Varimax sa Kaiser Normalizacijom.

a. Rotacija je konvergirana u 4 iritacije

Tablica D28. Spermanova korelacija učestalosti

		Peršin (korijen)	Rotkvica	Mrkva	Klementina	Ananas	Cjelovita zob	Češnjak	Luk	Avokado	Mango	Limun	Paprika	Sitne zobene pahuljice	Krupne zobee pahuljice	Cherry rajčica	Jabuka	Borovnica	Jagoda	Banana	Kivi
Peršin (korijen)	r	1,000	,460	,299	,503	,492	,220	,333	**,556***	,374	,196	,168	**,611***	-,099	**,517***	,025	,422	,379	,346	,149	-,049
	p	.	,084	,278	,056	,062	,430	,225	,031	,170	,485	,549	,016	,726	,048	,930	,117	,163	,206	,597	,862
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Rotkvica	r	,460	1,000	,374	,244	**,544***	,169	,269	,319	,333	,356	**,544***	,353	,328	,138	,045	,489	,346	,019	,270	,187
	p	,084	.	,170	,381	,036	,547	,332	,246	,225	,193	,036	,197	,232	,625	,873	,064	,207	,945	,330	,505
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Mrkva	r	,299	,374	1,000	,591*	**,690****	,340	**,679****	,476	**,652****	**,730****	,306	,367	,342	,568*	,225	,581*	**,657****	,457	**,840****	,604*
	p	,278	,170	.	,020	,004	,215	,005	,073	,008	,002	,267	,178	,212	,027	,421	,023	,008	,087	,000	,017
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Klementina	r	,503	,244	,591*	1,000	,629*	,495	,638*	**,730****	,447	,322	,151	**,664****	-,319	**,802****	-,105	,234	,504	,358	,404	,267
	p	,056	,381	,020	.	,012	,061	,010	,002	,095	,241	,591	,007	,246	,000	,711	,401	,056	,190	,135	,336
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Ananas	r	,492	,544*	,690**	,629*	1,000	**,694****	,525*	,462	,585*	**,677****	,103	**,732****	,239	,641*	,250	**,652****	**,679****	,602*	,565*	,456
	p	,062	,036	,004	,012	.	,004	,044	,083	,022	,006	,716	,002	,391	,010	,368	,008	,005	,018	,028	,088
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Cjelovita zob	r	,220	,169	,340	,495	,694**	1,000	,228	,233	,175	,218	-,002	**,665****	,138	,478	-,014	,616*	**,649****	,572*	,453	,327
	p	,430	,547	,215	,061	,004	.	,414	,403	,532	,434	,995	,007	,623	,071	,962	,014	,009	,026	,090	,235
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Češnjak	r	,333	,269	,679**	,638*	,525*	,228	1,000	**,799****	,419	,330	,139	,536*	-,240	**,738****	-,140	,153	,376	,154	,425	,126
	p	,225	,332	,005	,010	,044	,414	.	,000	,120	,230	,622	,039	,389	,002	,619	,587	,168	,584	,115	,654
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Luk	r	,556*	,319	,476	,730**	,462	,233	,799**	1,000	,110	,184	,148	,616*	-,436	**,756****	-,095	,002	,227	-,091	,148	-,098
	p	,031	,246	,073	,002	,083	,403	,000	.	,695	,513	,598	,015	,104	,001	,738	,994	,416	,746	,599	,729
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Avokado	r	,374	,333	,652**	,447	,585*	,175	,419	,110	1,000	,566*	,193	,438	,221	,408	,126	,582*	**,698****	**,672****	,631*	**,673****
	p	,170	,225	,008	,095	,022	,532	,120	,695	.	,028	,490	,103	,429	,131	,654	,023	,004	,006	,012	,006
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Mango	r	,196	,356	,730**	,322	,677**	,218	,330	,184	,566*	1,000	,319	,140	,397	,315	**,686****	,402	,446	,457	,497	**,688****
	p	,485	,193	,002	,241	,006	,434	,230	,513	,028	.	,246	,619	,142	,253	,005	,138	,096	,087	,059	,005
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Limun	r	,168	,544*	,306	,151	,103	-,002	,139	,148	,193	,319	1,000	,033	,276	,208	,114	,319	,292	-,006	,236	,389
	p	,549	,036	,267	,591	,716	,995	,622	,598	,490	,246	.	,908	,320	,457	,685	,246	,291	,984	,397	,152
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Paprika	r	,611*	,353	,367	,664**	,732**	,665**	,536*	,616*	,438	,140	,033	1,000	-,130	**,776****	-,226	,519*	**,695****	,426	,285	,162
	p	,016	,197	,178	,007	,002	,007	,039	,015	,103	,619	,908	.	,644	,001	,418	,047	,004	,114	,303	,565
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Sitne zobene pahuljice	r	-,099	,328	,342	-,319	,239	,138	-,240	-,436	,221	,397	,276	-,130	1,000	-,249	,181	**,667****	,338	,379	,477	,328
	p	,726	,232	,212	,246	,391	,623	,389	,104	,429	,142	,320	,644	.	,370	,518	,007	,218	,163	,072	,232
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Krupne zobene pahuljice	r	,517*	,138	,568*	,802**	,641*	,478	,738**	,756**	,408	,315	,208	,776**	-,249	1,000	-,038	,297	,519*	,398	,369	,213
	p	,048	,625	,027	,000	,010	,071	,002	,001	,131	,253	,457	,001	,370	.	,894	,282	,047	,141	,176	,445
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

Cherry rajčica	r	,025	,045	,225	-,105	,250	-,014	-,140	-,095	,126	,686**	,114	-,226	,181	-,038	1,000	,030	-,006	,159	,035	,462
	p	,930	,873	,421	,711	,368	,962	,619	,738	,654	,005	,685	,418	,518	,894	.	,915	,982	,570	,901	,083
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Jabuka	r	,422	,489	,581*	,234	,652**	,616*	,153	,002	,582*	,402	,319	,519*	,667**	,297	,030	1,000	**,840****	**,692****	**,727****	,528*
	p	,117	,064	,023	,401	,008	,014	,587	,994	,023	,138	,246	,047	,007	,282	,915	.	,000	,004	,002	,043
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Borovnica	r	,379	,346	,657**	,504	,679**	,649**	,376	,227	,698**	,446	,292	,695**	,338	,519*	-,006	,840**	1,000	,626*	**,646****	**,704****
	p	,163	,207	,008	,056	,005	,009	,168	,416	,004	,096	,291	,004	,218	,047	,982	,000	.	,013	,009	,003
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Jagoda	r	,346	,019	,457	,358	,602*	,572*	,154	-,091	,672**	,457	-,006	,426	,379	,398	,159	,692**	,626*	1,000	,592*	,451
	p	,206	,945	,087	,190	,018	,026	,584	,746	,006	,087	,984	,114	,163	,141	,570	,004	,013	.	,020	,092
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Banana	r	,149	,270	,840**	,404	,565*	,453	,425	,148	,631*	,497	,236	,285	,477	,369	,035	,727**	,646**	,592*	1,000	,596*
	p	,597	,330	,000	,135	,028	,090	,115	,599	,012	,059	,397	,303	,072	,176	,901	,002	,009	,020	.	,019
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Kivi	r	-,049	,187	,604*	,267	,456	,327	,126	-,098	,673**	,688**	,389	,162	,328	,213	,462	,528*	,704**	,451	,596*	1,000
	p	,862	,505	,017	,336	,088	,235	,654	,729	,006	,005	,152	,565	,232	,445	,083	,043	,003	,092	,019	.
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

**. Korelacija značajna na razini 0.01

*. Korelacija značajna na razini 0.05