

Mladi za napredek Maribora 2022

56. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022

Vpliv izbranih aditivov na človeške hepatocite

DRUGA PODROČJA (ZDRAVSTVO)

Raziskovalna naloga

Avtor: Lina Winkler, Taja Natek

Mentor: Katja Holnthaner Zorec, Eneko Jose Madorran Esterio

Šola: II gimnazija Maribor

Maribor, marec 2022

KAZALO VSEBINE

KAZALO GRAFOV	5
KAZALO SLIK	7
KAZALO TABEL	7
POVZETEK	9
ZAHVALA.....	11
1. UVOD	13
1.1. Namen naloge	14
1.2. Raziskovalno vprašanje	14
1.3. Hipoteze in njihove razlage	14
2. TEORETIČNI DEL	17
2.1. Aditivi.....	17
2.2. Saharin.....	18
2.3. Tartrazin	20
2.4. Citronska kislina	22
2.5. Mononatrijev glutamat	23
2.6. Natrijev benzoat	25
2.7. Jetra	26
2.8. Hepatocite	28
2.9. Gojenje človeških celic.....	29
3. OZNAČEVALCI IN TARČNE BIOMOLEKULE	30
3.1. ROS (reaktivne kisikove spojine)	30
3.2. Glukoza.....	31
3.3. Albumin.....	32
3.4. Trigliceridi	32
4. MATERIALI IN METODE	33
4.1. Seznam materialov in opreme.....	33
4.1.1. Kemikalije.....	33
4.1.2. Celična kultura	33
4.1.3. Laboratorijski pribor	33
4.1.4. Laboratorijske aparature	34
4.2. Metode dela	34
4.2.1. Odtalitev celic	35
4.2.2. Priprava koncentracij izbranih aditivov	35
4.2.3. Priprava vzorcev	36
4.2.4. Meritve biokemijskih parametrov in ROS	36

5. REZULTATI.....	38
6. ANALIZA REZULTATOV	43
6.1. Hipoteza 1.....	43
6.2. Hipoteza 2.....	44
6.3. Hipoteza 3.....	44
6.4. Hipoteza 4.....	45
6.5. Hipoteza 5.....	46
6.6. Vrednotenje metode	46
7. ZAKLJUČEK	48
8. DRUŽBENA ODGOVORNOST	50
9. VIRI	51
Viri slik.....	55
10. PRILOGE	57
Tabele podatkov.....	57

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na koncentracijo glukoze (mmol/L) v mediju hepatocit.....	38
Graf 2: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na koncentracijo albumina (mmol/L) v mediju hepatocit.....	40
Graf 3: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na koncentracijo trigliceridov (mg/L) v mediju hepatocit.....	41
Graf 4: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na vrednost ROS v mediju hepatocit	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska formula saharina (Researchgate)	18
Slika 2: Bonboni, ki vsebujejo saharin (Exporters India).....	18
Slika 3: Kemijska formula tartrazina (Researchgate).....	20
Slika 4: Prehranski izdelki, ki vsebujejo tartrazin (The next phase blog)	20
Slika 5: Kemijska formula citronske kislin (Researchgate).....	22
Slika 6: Citronska kislina uporabljena kot konzervans pri marmeladi (Times of India).....	22
Slika 7: Kemijska formula mononatrijevega glutamata (Researchgate)	23
Slika 8: Mononatrijev glutamat dodan v kitajski prehrani (Askmen)	23
Slika 9: Kemijska formula natrijevega benzoata (Researchgate)	25
Slika 10: Natrijev benzoat v pijačah (Food microbiology)	25
Slika 11: Gojenje celic v inkubatorju (lasten vir)	30
Slika 12: Kemijska zgradba DCFH in DCF (Fernandes, Gomes, Lima, 2005).....	31
Slika 13: Shema poteka dela (lasten vir)	34
Slika 14: Filtriranje pripravljenih koncentracij aditivov (lasten vir).....	35
Slika 15: Celice z določenimi koncentracijami aditivov v mikrotitrski plošči (lasten vir)	36
Slika 16: Mešanje HBSS medija in DCFH (lasten vir)	37

KAZALO TABEL

Tabela 1: Uporabljene koncentracije aditivov (lasten vir)	35
Tabela 2: Izmerjena vrednost glukoze (mmol/L), trigliceridov (mmol/L) in albumina (mg/L) pri osnovni koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, natrijevega benzoata in kontroli	57
Tabela 3: Izmerjena vrednost glukoze (mmol/L), trigliceridov (mmol/L) in albumina (mg/L) pri polovični koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, natrijevega benzoata in kontroli	57
Tabela 4: Povprečje izmerjene vrednosti ROS pri višji koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, tartrazina, natrijevega benzoata in kontroli.....	58
Tabela 5: Povprečje izmerjene vrednosti ROS pri nižji koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, tartrazina, natrijevega benzoata in kontroli.....	58

POVZETEK

Mnoge raziskave potrjujejo, da imajo aditivi negativne učinke na naše telo in lahko vplivajo na delovanje celic. V naši raziskovalni nalogi smo želeli raziskati, kakšne učinke imajo aditivi tartrazin, mononatrijev glutamat, natrijev benzoat, saharin in citronska kislina na jetrne celice človeka. Izbrane aditive smo v dveh različnih koncentracijah dodali v celični medij in merili reaktivne kisikove spojine (ROS), glukozo, albumin in trigliceride. ROS smo merili s spektrofotrometrom, glukozo, albumin in trigliceride pa z biokemičnim analizatorjem.

Rezultati raziskave so pokazali, da imajo vsi aditivi vpliv na ROS v celici, prav tako pa na količino produktov celic, torej albumina, glukoze in trigliceridov. Iz rezultatov smo ugotovili, da je polovična koncentracija aditiva v večini primerov povzročila manjše spremembe kot osnovna. Ker višje koncentracije aditivov povzročajo večjo spremembe, sklepamo tudi na večji škodljivi vpliv na celice in posledično tudi na organizem. Zato svetujemo previdnost pri uživanju večjih količin živil, ki jih vsebujejo.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema mentorjema za spodbude ter deljene nasvete in znanje. Kljub najini radovednosti in želji po raziskovanju, nama brez njune pomoči ne bi uspelo. Ponudila sta nama oporo in naju skozi celotno delo usmerjala, ter nama pomagala pri odkrivanju novih mikrobioloških tehnik. Zahvaljujema se tudi Medicinski fakulteti Maribor, ki nama je omogočila izvajanje praktičnega dela v njenih prostorih, kjer sva imeli na voljo vso opremo, ki sva jo potrebovali za uspešno izdelavo raziskovalne naloge.

1. UVOD

Izbor prehrane ima v naši družbi pomembno vlogo že več stoletij. Predstavlja nam užitek in strast, zato si želimo, da bi bila ta na naših jedilnikih čim bolj slastna in sveža. Vendar nas naše čutne zaznave velikokrat premamijo in se premalokrat vprašamo kaj je tisto, kar naši hrani daje tako vabljiv in edinstven okus. Le s pogledom na embalažo bi takoj ugotovili, da so to aditivi.

Aditivi so kemične snovi, ki se dodajajo živilom za doseganje specifičnih želenih učinkov, kot so konzerviranje, barvanje, slajenje, zgoščevanje... Nahajajo se predvsem v predelani hrani. Te dodatke uporabljajo že od antičnih časov z namenom, da bi ohranili živila sveža, ter jih naredili okusnejša. Aditive uvrščamo v štiri kategorije. To so prehranski dodatki, predelovalna sredstva, konzervansi in senzorična sredstva (Davidson, Michael, Singh, Paul, 2018).

Kljub temu, da uporabnost aditivov sega že stoletja v preteklost, raziskave odkrivajo njihovo nevarnost za pojav različnih bolezenskih stanj v telesu (astmo, hiperaktivnost, nespečnost ...). Posledično so dandanes aditivi podvrženi strogi toksikološki analizi, preden se odobrijo za uporabo v prehrabeno predelovalni industriji. Večino teh študijskih raziskav je izvedenih na podganah ali miših, s katerimi analizirajo učinke spojin na vedenje, rast, umrljivost, organe, potomce... Rezultati jim pomagajo določiti raven brez učinka - najnižjo raven aditiva, ki ne povzroča toksikoloških učinkov (NOEL) (Davidson, Michael, Singh, Paul, 2018).

Eden izmed organov, ki jih aditivi najbolj ogrožajo, so jetra, saj v njih prihaja kri iz črevesa, kjer se absorbirajo. produkti prebave in zaužite snovi. Ključen organ za naše zdravje ima velik pomen pri prebavljanju hrane, hkrati pa igra pomembno vlogo pri procesu razstrupljanja. Škodljivost aditivov na jetra proučujejo mnogi raziskovalci, vendar je večina teh raziskav izvedenih na živalih, predvsem podganah in miših. Prav tako je majhen delež raziskav, ki bi vpliv aditivov na jetra raziskoval na celični ravni. Mnogi so prišli do ugotovitev, da imajo aditivi za živila toksičen vpliv na jetra, saj vplivajo na njihov metabolizem.

1.1. Namen naloge

V raziskovalni nalogi smo preučevali vpliv petih izbranih aditivov na hepatocite, ki so glavne funkcionalne celice jeter. Za raziskavo smo izbrali umetno barvilo tartrazin, ojačevalec okusa mononatrijev glutamat, konzervans natrijev benzoat, sladilo saharin in antioksidant citronska kislina. Izbrane aditive smo dodali jetrnim celicam ter merili reaktivne kisikove spojine (ROS), albumin, trigliceride in glukozo. Dobljene rezultate smo nato analizirali in na njihovi podlagi ocenili ter primerjali vpliv testiranih aditivov na količino celičnih produktov.

V svoji raziskovalni nalogi želimo ugotoviti, ali imajo lahko aditivi, kljub strokovnim toksičnim analizam pred odobritvijo njihove uporabe v industriji, negativen vpliv na naše telo in zdravje. Z raziskovalno nalogo pa želimo tudi ozavestiti družbo in opozoriti na previdnost pri izbiri in uživanju predelane hrane, ki vsebuje aditive.

1.2. Raziskovalno vprašanje

Kakšen je učinek izbranih aditivov: tartrazin, mononatrijev glutamat, natrijev benzoat, saharin in citronska kislina na človeške hepatocite?

1.3. Hipoteze in njihove razlage

Da smo lahko ovrednotili svoja predvidevanja, smo si postavili naslednje hipoteze:

1. Po tretiranju hepatocit s saharinom, se bo koncentracija glukoze in albumina v njih zmanjšala, zvišala se bo količina trigliceridov in ROS.

Glede na to, da sta Amin A. in AlMuzafar v svoji raziskavi (2015) na albino podganah ugotovila zmanjšanje ravni glukoze v serumu ob dodatku saharina, pričakujemo da bodo človeške celice odreagirale enako. Posledično se bo zaradi večjega privzema glukoze, zmanjšal privzem trigliceridov, saj bodo celice želeno energijo za celično dihanje uporabile večinoma iz glukoze. V raziskavi Hasana Azeeza, Yousif Alkass in Suzete Persike (2019) se je koncentracija albumina ob doziranju saharina podganam zmanjšala. Sklepamo, da se bo v naši raziskavi zgodilo enako, saj gre v obeh primerih za živalske celice. Vrednost ROS se bo povišala, saj smo celicam dodali tujo kemikalijo, kar povzroči v celici stresni odziv. Povečanje ROS pa je pokazala tudi raziskava Hasan Azeez, Yousif Alkass in Suzete Persike (2019).

2. Dodajanje aditiva tartrazina bo v hepatocitah spodbudilo nastanek ROS. Povečala se bo tudi raven trigliceridov, glukoze pa zmanjšala. Na produkcijo albumina ne bo imel vpliva.

Analiza učinka tartrazina na testisih podgan je v raziskavi Visweswarana in Krishnamoorthyja (2012) pokazala zmanjšano delovanje encimov pri ustrezni spremembi ravni njihovih kofaktorjev. Sklepa se, da je tartrazin ustvarjal ROS, ki so motile encimsko antioksidativno obrambo njihovih mod. Kljub temu, da sta avtorja raziskave proučevala spremembe delovanja testisov, menimo, da ima tartrazin podoben vpliv na jetra. Amin M. je s svojimi sodelavci (2017) raziskal, da tartrazin vpliva na povišanje trigliceridov v jetrih. Zaradi tega bodo celice posledično iz medija intenzivneje izkoriščale glukozo kot vir energije in s tem se bo koncentracija glukoze v serumu zmanjšala. Ker nikjer nismo zasledili, da bi tartrazin vplival na koncentracijo albumina sklepamo, da nanj ne bo imel vpliva.

3. Dodatek mononatrijevega glutamata bo zmanjšal ravni albumina ter povečal vsebnosti trigliceridov, glukoze in oksidativni stres v hepatocitah.

Al-Badr in Tawfik (2012) sta v raziskavi izvajala teste na miših. Kot posledice zaradi dodatka mononatrijevega glutamata sta potrdila zmanjšane ravni albumina in povečan ROS. Podobne teste sta izvajala tudi Ahluwalia in Malik (2002) in dobila rezultate, ki so pokazali povečano raven trigliceridov v jetrih in glukoze v krvi. Zaradi podobnosti celic sklepamo, da bodo naši rezultati prav tako pokazali povišane ravni trigliceridov ter glukoze in povečan ROS. Zmanjšala se bo raven albumina.

4. Dodatek natrijevega benzoata bo povečal ravni albumina in oksidativni stres hepatocit, na količino glukoze in trigliceridov pa ne bo imel učinka.

O povečanju ravni albumina miši in podgan ob dodatku natrijevega benzoata poročajo v raziskavi Fujitani T. (2002). Ker je tip celice pri miših in podganah ter človeku podoben, sklepamo, da bodo učinki enaki. ROS so v celicah merili Arabsolghar, Borojeni, Khodaei, Khorsand, Rashedinia in Saberzadeh (2017) in dokazali povečan oksidativni stres. Zato predpostavljamo, da bodo naši rezultati enaki. Sklepamo pa tudi, da dodatek natrijevega benzoata ne bo imel učinka na homeostazo glukoze, saj so takšne rezultate pri raziskavi na ljudeh dobili že Clish, Deik, Delaney, Lennerz, Ludwig,

Mootha, Pierce in Vafai (2014). Prav tako natrijev benzoat ne bo imel vpliva na trigliceride, saj o tem ne poroča nobena raziskava.

5. Citronska kislina bo v celicah znižala ROS in koncentracijo trigliceridov, raven glukoze pa zvišala, na albumin ne bo imela vpliva.

Ker se bo citrat, ki je produkt cikla citronske kisline kopičil, celica ne potrebuje več toliko goriva, zato bo s tem zmanjšan privzem glukoze iz medija. Posledično bo narasla koncentracija glukoze v mediju. Prav tako se bo zmanjšala koncentracija trigliceridov v mediju, saj je dokazano, da citrusi, ki vsebujejo večjo količino citronske kisline, nižajo raven maščobe v krvi (Tamayo, 2021). O vplivu citronske kisline na znižanje vrednosti ROS govori raziskava Badrey, Hamed, Sayed in Soliman (2021). Vpliva citronske kisline na albumin v virih nismo zasledili, zato menimo, da se njegove vrednosti ne bodo spremenile.

2. TEORETIČNI DEL

2.1. Aditivi

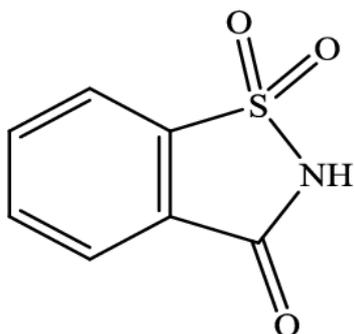
Aditivi so različne kemične snovi, ki se dodajajo živilom za doseganje specifičnih zelenih učinkov. Dodatki kot so sol, začimbe in sulfiti, so se uporabljali že od antičnih časov za ohranjanje čvrstosti živil in njihovo izboljšanje okusa. S povečano predelavo živil v 20. stoletju se je pojavila potreba tako po večji uporabi aditivov, kot po novih vrstah aditivov za živila. Številni sodobni izdelki, kot so nizkokalorična živila, prigrizki in pripravljena priročna živila, ne bi bili mogoči brez aditivov (Michael, Davidson, Paul in Singh, 2018).

Med aditive uvrščamo snovi kot so hranila, sladkorni nadomestki, vsa sladila, antioksidante, barvila, konzervanse, stabilizatorje in razne ojačevalce okusa. V Evropski uniji je registriranih približno 1700 aditivov (Draškovič, 2015).

Preden aditivi pridejo v uporabo, morajo biti opravljeni testi toksičnosti, ki so pogoj za izdajo dovoljenja. S testi toksičnosti pa je določen tudi dopustni dnevni vnos aditiva (ADI) za odraslega človeka z maso 70 kilogramov. ADI določa, da vsakodnevni vnos aditiva v času predvidene življenjske dobe ne bo ogrožal zdravja. Izražen je v miligramih na kilogram telesne teže. Znanstvene raziskave kažejo, da naj bi bila večina uporabljenih aditivov varna, kljub temu pa se v prehrabeni industriji velikokrat pojavljajo tudi aditivi, ki predstavljajo določeno tveganje za zdravje uporabnikov. Zato dovoljenje za uporabo teh velja le za določen čas (Draškovič, 2015).

2.2. Saharin

Saharin je bil odkrit leta 1879, nekaj let kasneje pa je postal prvo komercialno dostopno umetno nehranljivo sladilo. V uporabi je lahko kot netopen saharin v obliki belih kristalov. Poznamo pa tudi drugo, v vodi dobro topno obliko saharina, ki se pojavlja v obliki različnih soli, predvsem natrijevih in kalijevih. Telo saharina ga ne presnavlja in se izloča nespremenjen (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2017).



Slika 1: Kemijska formula saharina (Researchgate)



Slika 2: Bonboni, ki vsebujejo saharin (Exporters India)

Saharin ima približno 200–700 krat večjo sladilno moč kot beli kuhinjski sladkor in ima rahlo grenak in kovinski priokus. Za namizno uporabo se prodaja od ¼ do 1 zrnatih peletov soli, pri čemer je za primerjavo 1 zrnati pelet enakovreden štirim čajnim žličkam sladkorja (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2017).

Zaradi njegovega sladkega okusa, ki je v prehrani ljudem zelo zaželen, ga najdemo v precej produktih. Uporablja se v namiznih sladilih, pekovskih izdelkih, marmeladah, žvečilnih gumijih, konzerviranem sadju, sladkarijah, prelivih za sladice, solatnih prelivih... (Harbolic, 2020). Pogosto se uporablja v prehrani diabetikov in drugih bolnikov, ki se morajo izogibati uživanju sladkorja, saj nima kalorične vrednosti in sam po sebi ne zvišuje ravni sladkorja v krvi (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2017).

FDA (Food and Drug Administration) je v preteklosti že predlagala prepoved saharina, vendar je kongres posredoval po javnem nasprotovanju prepovedi. To je bilo v drugi polovici 20. stoletja edino umetno sladilo, ki je bilo takrat na voljo in javnost ni želela izgubiti dietnih izdelkov, ki so vsebovali saharin. Zato je ta ostal na trgu, vendar je bila obvezna oznaka z etiketo, na kateri je bilo opozorilo o možnosti škodljivosti na zdravje. Še danes imajo saharin za enega izmed najvarnejših sladil, ki jih je FDA odobril za uporabo. Sprejemljiv dnevni vnos (ADI) za saharin je namreč 5 mg/kg telesne teže. Vendar ga zaradi obstoja zadostnih dokazov

o rakotvornosti pri živalih, omejenih dokazih kancerogenosti pri ljudeh, ter tudi nevarnost saharina za alergijske reakcije, ne smemo obravnavati kot varnega in nedolžnega. Mnogi še vedno verjamejo, da bi uporabo saharina morali omejiti, še posebej pri dojenčkih, otrocih in nosečnicah (Harbolic, 2020).

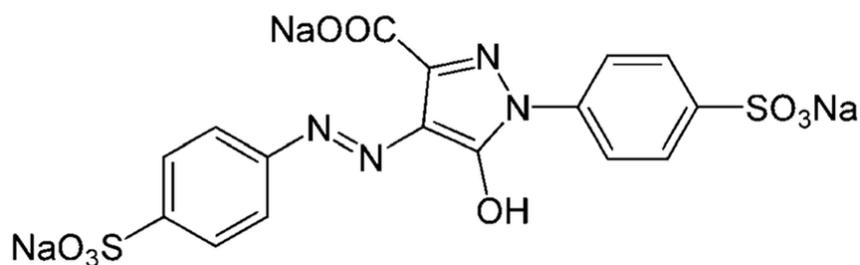
Študija Hasana Azeeza, Yousif Alkassa in Suzete Persike (2019) je ovrednotila učinek kroničnega uživanja saharina na pomembne fiziološke in biokemične parametre pri samcih podgan. Za testiranje so jih razdelili v kontrolno skupino in tri eksperimentalne skupine. Kontrolna skupina je 120 dni prejela le destilirano vodo, eksperimentalne pa različne odmerke saharina - 2,5 mg/kg, 5 mg/kg in 10 mg/kg. Opazovali so njihovo telesno težo, vzorec krvi, urina in tkiva jeter ter možganov. Rezultati so pokazali, da je saharin v odmerku 5 mg/kg povečal telesno maso podgan po 60 (59 %) in 120 (67 %) dneh odmerjanja saharina. Po tretiranju s saharinom se je koncentracija albumina po zdravljenju s saharinom za odmerek 2,5 mg/kg zmanjšala za (34 % in 36 %), 5 mg/kg (39 % in 34 %) in 10 mg/kg (15 % in 21 %) po 60 oziroma 120 dneh zdravljenja. Po opravljeni študiji so avtorji zaključili, da je bilo doziranje saharina v celotnem obdobju eksperimenta povezano z okvarjenim delovanjem ledvic in jeter. Prav tako je prišlo do povečanja oksidativnega stresa jeter. Ob koncu študije so predlagali, da saharin ni varen za vključitev v prehrano (Alkas, Azeez in Persike, 2019).

Podrobneje sta škodljiv vpliv saharina raziskovala Amin A. in AlMuzafar (2015). Raziskavo sta izvajala na 46 mladih samcih albino podgan, katerim sta peroralno dajala saharin v majhnih in visokih odmerkih 30 dni. Vključena je bila tudi kontrolna skupina. Rezultati so pokazali, da so se holesterol, trigliceridi, raven glukoze v serumu in povečanje telesne mase ob visokem odmerku saharina zmanjšali v primerjavi s kontrolo. Ob koncu sta sklenila, da lahko saharin škodljivo vpliva in spreminja biokemične označevalce v jetrnem in ledvičnem tkivu ne le pri večjih odmerkih, ampak tudi pri nizkih (Amin A. in AlMuzafar, 2015).

Prav tako so učinek umetnih sladil na raven sladkorja v krvi raziskovali Manju, Sasmita, Seema in Toora (2018). Za študijo so izbrali 30 oseb starih med 18 in 30 let z normalnim indeksom telesne mase (19 - 25 kg/m²). Izbrani niso smeli imeti predhodnih bolezni. Prostovoljcem so vzeli vzorce krvi na tešče in 1 uro po zaužitju umetnih sladil. Rezultati so pokazali spremembo v koncentraciji glukoze ob zaužitju sladil, saj se je ta nekoliko zvišala (3,0 mg/%) (Manju, Sasmita, Seema, Toora, 2018).

2.3. Tartrazin

Tartrazin je odobreno umetno barvilo, ki se že vrsto let uporablja kot dodatek k živilom in farmacevtskim izdelkom (Ramesh in Muthuraman, 2018). Znan je po svoji živo rumeni barvi, zato je priljubljen za barvanje hrane, pijače, kozmetike... (Wu, 2021). Najdemo ga v bonbonih, jedilnih barvilih, lizalkah ter sladkih pijačah, kjer omogoča obarvanje in posledično lep in mamljiv izgled izdelka (Ninamvseeno, Tartrazin, 2021).



Slika 3: Kemijska formula tartrazina (Researchgate)



Slika 4: Prehranski izdelki, ki vsebujejo tartrazin (The next phase blog)

Ugotavljajo, da se pri uživanju tartrazina pojavljajo predvsem alergijski odzivi kot so izpuščaji na koži (urtikarija), dermatitis, astmatični simptomi ali alergijski nahod (rinitis). Sicer se uporaba tartrazina v živilih v zadnjem desetletju vse bolj zmanjšuje. Pomembno je, da se zavedamo, da se lahko preobčutljivost pojavi tudi pri posameznikih, ki so zaužili količino barvila pod sprejemljivim dnevnim vnosom (Kapitanovič, 2015). Tartrazin se veže na človeški serumski albumin, s katerim tvori kompleks in tako vpliva na fiziološke funkcije. Povzročal naj bi biliarno cirozo (bolezen jeter zaradi avtoimunskih odzivov) pri ženskah po menopavzi. Opazili so tudi, da je tartrazin vzrok nevrotoksičnosti in genotoksičnosti (Ramesh in Muthuraman, 2018). Sprejemljiv dnevni vnos (ADI) za tartrazin je določen že od leta 1964 in znaša 7,5 mg/kg telesne mase dnevno. Kasneje so številne države njegov dovoljen dnevni vnos še bolj omejile ali ga prepovedale za uporabo v prehrani (Wu, 2021). Tako je v Avstriji in na Norveškem prepovedan (Ninamvseeno, Tartrazin, 2021).

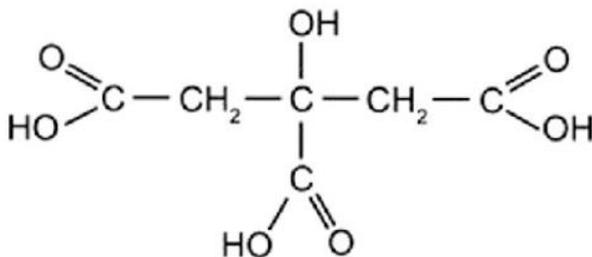
Natančneje sta učinek tartazina na testisih podganah analizirala Visweswaran in Krishnamoorthy (2012). Testne živali sta razdelila v dve skupini - kontrolno, kjer so jim dodajali le vodo, in poskusno, v kateri so prejemale 72 mg/kg telesne teže dnevno, tartrazina raztopljenega v vodi. Rezultati ob koncu poskusa kažejo na zmanjšano aktivnost štirih encimov (katalaze, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze in glutation reduktaze). Avtorji raziskave sklepajo, da je tartrazin ustvarjal reaktivne kisikove vrste (ROS), ki so motile encimsko antioksidativno obrambo njihovih mod in tako povzročila škodo v testisih podgan (Visweswaran in Krishnamoorthy, 2012).

Prav tako je Amin M. s sodelavci (2017) zasnoval raziskavo, v kateri je analiziral strupenost tartrazina na albino miši. Poskusne živali je zdravil s testiranim barvilom v odmerku ravni 200 mg/kg in 400 mg/kg telesne teže. Vključil pa je tudi kontrolno skupino. Za proučevanje toksičnega učinka tartrazina je meril različne biokemične parametre. Njihova študija je pokazala zelo opazno zmanjšanje telesne mase miši pri odmerku 400 mg/kg v primerjavi s kontrolno skupino, prav tako se je povečala teža srca in ledvic, medtem ko se je povprečna teža jeter znatno zmanjšala. Močno je narasla vrednost trigliceridov (Amin, Arefin, Hossain, Hussian, Neshe, 2017).

V študiji, ki jo je zasnoval Rehman K. s svojimi sodelavci, je želel raziskati učinek na trebušno slinavko in homeostazo glukoze pri podganah. Albino podgane so bile razdeljene v tri skupine. Ena skupina je bila kontrolna, drugi dve pa sta bili razvrščeni med nizke in visoke odmerke skupin, ki so bile izpostavljene tartrazinu. Za oceno glukoze so bili zbrani vzorci krvi homeostaza in inzulin, aktivnost amilaze in lipaze, in toleranca za glukozo skupaj z morfologijo trebušne slinavke. Rezultati so pokazali, da je tartrazin pri višjih odmerkih zvišal krvni sladkor ($230,830 \pm 0,940$ mg/dL) in ravni inzulina ($0,395 \pm 0,012$ ng/mL) v primerjavi s kontrolo. Ob koncu so bili sklenjeni rezultati, da tartrazin ima vpliv na homeostazo glukoze. Škodljivi učinki na trebušno slinavko ob izpostavljenosti tartrazina bi lahko povzročili motnje normalnega endokrinega sistema delovanja trebušne slinavke (Ashraf, Azam, Hamid, Rehmana, 2018).

2.4. Citronska kislina

Citronska kislina je brezbarvna kristalna organska spojina, ki spada v družino karboksilnih kislin (The Editors of Encyclopaedia, 2021). Je šibka kislina brez vonja in s kislim okusom. Poleg zagotavljanja željenega okusa deluje tudi kot konzervans (Marengo, 2021).



Slika 5: Kemijska formula citronske kislin (Researchgate)



Slika 6: Citronska kislina uporabljena kot konzervans pri marmeladi (Times of India)

Citronska kislina je naravno prisotna v sadju in zelenjavi, kot dodatek k hrani in pijači pa se v veliki meri uporablja proizvedena citronska kislina (MCA), ki je proizvedena z uporabo glive *Aspergillus niger*. Uporablja se kot sredstvo za zakisljevanje, kot konzervans v živilski industriji in kot kompleksno sredstvo v farmacevtski in kozmetični industriji. Kot kompleksno in kelatno sredstvo se uporablja tudi pri obdelavi kovin, kot mehčalec vode za detergente in kot pufersko sredstvo v toaletni in farmacevtski industriji (Hattori, Honda, Kirimura, 2011).

Sadje, ki vsebuje citrsko kislino (ananas, limone...) je priporočljivo za uživanje, saj nadzoruje raven holesterola in trigliceridov v našem telesu. Zato so agrumi eni najpogosteje uporabljenih zdravil za znižanje trigliceridov (Tamayo, 2021).

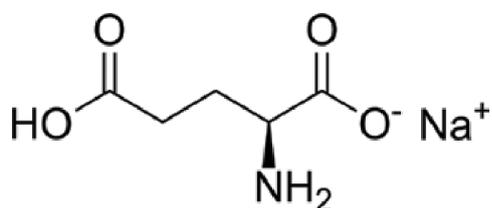
Razširjena prisotnost citronske kisline v živalskem in rastlinskem svetu je zagotovilo za njeno netoksičnost. Prav tako jo JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) priznava kot splošno varno (Hattori, Honda, Kirimura, 2011). Kljub temu lahko citronska kislina pri zaužitju povzroči škodljive učinke, ki so lahko rezultat potencialne prisotnosti nečistoč ali fragmentov iz glive *Aspergillus niger* (Cressey, Sweis, 2018). V Sloveniji dnevni vnos citronske kisline ni omejen (Ninamvseen, Citronska kislina, 2021).

Badrey, Hamed, Sayed in Soliman (2021), so v študiji raziskovali zaščitno vlogo določenih snovi (med njimi citronska kislina) pred toksičnimi učinki mikroplastike pri afriškem somu.

Ena izmed testiranih skupin je zraven prehrane dobivala dodatnih 30 g/kg citronske kisline. Prišli so do ugotovitev, da se je pri njih rahlo povečala antioksidativna aktivnost in da bi lahko citrsko kislino uporabljali kot krmni dodatek za izboljšanje oksidativnega stresa (Badrey, Hamed, Sayed, Soliman, 2021). Cressey in Sweis (2018), pa sta v raziskavah dokazala negativne učinke MCA na človeško telo. Simptomi so vključevali bolečino v sklepih z otekanjem in togostjo, bolečino v mišicah, trebušne krče in izčrpanost. Nobeden od testiranih posameznikov ni doživel simptomov po zaužitju naravnih oblik citronske kisline, iz limone in limete (Cressey, Sweis, 2018).

2.5. Mononatrijev glutamat

MSG ($C_5H_9NO_4Na$) je natrijeva sol iz glutaminske kisline, najbolj razširjene aminokisline v naravi. Uporabljajo ga kot ojačevalec okusa in se običajno nahaja v dušenih mesnih izdelkih, konzerviranih izdelkih, juhah in komercialno predelani hrani. Glavni vir MSG so živila z naravno visoko vsebnostjo beljakovin (ribe, jajca, meso, sir) in zelenjava (predvsem paradižnik, stročji fižol in gobe), poleg tega pa majhen del telesnega vnosa MSG prihaja tudi iz začimb (Liu, Thang, Xu Jinzhao, Xu Jinghan, Xu X., 2021).



Slika 7: Kemijska formula mononatrijevega glutamata (Researchgate)



Slika 8: Mononatrijev glutamat dodan v kitajski prehrani (Askmen)

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) dopustnega dnevnega vnosa mononatrijevega glutamata ni določil (Walker R., 2002). Mononatrijev glutamat, marsikomu poznan tudi pod imenom sindrom kitajske restavracije, je že v preteklosti povzročal negativne

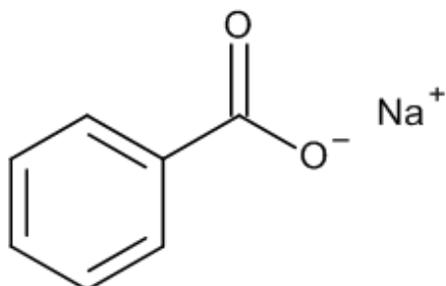
simptome kot so glavobol, slabost in nenavadna otrplost. Razvpitost mononatrijevega glutamata se je povečala leta 1968, ko je dr. Robert Ho Man Kwok opisal svoja razmišljanja o možnih vzrokih sindroma, ki ga je doživel, ko je jedel v kitajskih restavracijah v ZDA. Poročal je o občutku otrplosti v zadnjem delu vratu, ki se je nato razširil na roke in hrbet, zaznal je tudi splošno šibkost in razbijanje srca (Nogrady, 2015).

To, da ima MSG veliko slabih vplivov na telo, potrjujejo tudi raziskave opravljene na podganah. Ima toksičen učinek na testise, povzroča moško neplodnost, krvavitev v modih, prav tako ima nevrotoksične učinke, ki povzročijo poškodbe možganskih celic, poškodbe mrežnice in nekatera patološka stanja kot so možganska kap, epilepsija, shizofrenija, možganska travma, nevropatske bolečine, anksioznost, depresija (Nogrady, 2015). Tawfik in Al-Badr (2012) sta MSG testnim podganam dajala v odmerkih 0,6 mg/kg in 1,6 mg/kg telesne teže, 14 dni. V raziskavi sta ugotovila, da se je podganam znatno povečala telesna teža ter relativna teža jeter in ledvic. Ugotovila sta tudi, da so neželeni učinki delovanja jeter in ledvic, ki jih povzroči MSG, lahko posledica oksidativnega stresa, ki ga povzroča MSG na jetrnem in ledvičnem tkivu. Prav tako sta opazila spremembo albumina, ki se je ob dodajanju MSG znatno zmanjšal (Al-Badr in Tawfik, 2012).

V študiji o učinku MSG v jetrih in krvi odraslih miši samcev sta Ahluwalia in Malik (2002) mišim 6 dni dajala odmerke 2, 4 in 8 mg MSG/g telesne mase. 31 dni po zadnji injekciji se je pokazalo povečanje vsebnosti trigliceridov v jetrih, prav tako pa se je raven glukoze v krvi znatno povečala (Ahluwalia in Malik, 2002).

2.6. Natrijev benzoat

Natrijev benzoat je organska natrijeva sol, ki je posledica zamenjave protona iz karboksilne skupine benzojske kisline z natrijevim ionom (National Center for Biotechnology Information, 2021).



Slika 9: Kemijska formula natrijevega benzoata (Researchgate)



Slika 10: Natrijev benzoat v pijačah (Food microbiology)

Je kristalni prah brez vonja. Benzojska kislina je sama po sebi dober konzervans, v kombinaciji z natrijevim hidroksidom, pa ji ta omogoča dobro topnost v produktih. Natrijev benzoat se v naravi kot tak ne pojavlja, benzojsko kislino pa najdemo v številnih rastlinah, kot so cimeta, brusnice, slive, jagodičevje... Poleg tega nekatere bakterije proizvajajo benzojsko kislino pri fermentaciji mlečnih izdelkov. Uporablja se kot konzervans v predelanih živilih, torej preprečuje bakterijsko in glivično dejavnost ter s tem vzdržuje svežost hrane in podaljšuje njen rok uporabnosti. Poleg uporabe v predelani hrani in pijači, se natrijev benzoat dodaja tudi nekaterim zdravilom in kozmetičnim izdelkom (McCulloch, 2019). Uporabljen je predvsem pri izdelavi sadnih sokov, marmelad, drugih sadnih živil in pri brezalkoholnih pijačah. Pri brezalkoholnih pijačah je največja dovoljena vsebnost 0,15 g/kg, v marmeladah in sorodnih živilih pa 0,5 g/kg (Goriskalekarna, 2017).

Svetovna zdravstvena organizacija WHO (World Health Organization) je za konzervans določila sprejemljive dnevne vnose 5 mg/kg (Nair, 2001).

Fujitani T. (2002), je v raziskavi o kratkoročnem učinku natrijevega benzoata pri podganah in miših ugotovil pomembne posledice uživanja tega aditiva. Samci in samice podgan so 10 dni prejeli 0 %, 1,81 %, 2,09 % ali 2,4 % natrijevega benzoata, miši pa 10 dni 0 %, 2,08 %, 2,5 % ali 3 % natrijevega benzoata. Pri samcih podgan, ki so prejemale 2,4 % aditiva, so se znatno povečale relativne teže jeter in ledvic ter ravni albumina, prav tako pa so bile absolutne mase

jeter znatno povišane pri samcih miši, ki so prejemale 3 % aditiva. Ugotovili so tudi nekrozo hepatocit (Fujitani, 2002).

Z rezultati študije o učinkih natrijevega benzoata na homeostazo glukoze in presnovne profile pri ljudeh, so Clish, Deik, Delaney, Lennerz, Ludwig, Mootha, Pierce in Vafai (2014) pokazali, da odmerki benzoata nimajo akutnega, škodljivega učinka na homeostazo glukoze (Clish, Deik, Delaney, Lennerz, Ludwig, Mootha, Pierce in Vafai, 2014).

V študiji so Arabsolghar in sodelavci (2017) ocenjevali učinek natrijevega benzoata na preživetje PC12 celic. Celice so izpostavili različnim koncentracijam natrijevega benzoata, 0,125 g/ml do 3 mg/ml v prisotnosti almala (aluminijev maltolat, spojina, ki se v maščobah topi bolj kot sam aluminij, gre zaradi tega lažje skozi celično membrano in tako lažje dostavi aluminij v celico) in merili ROS. Rezultati so pokazali, da so ob nizkih koncentracijah natrijevega benzoata celice preživele, ob višjih koncentracijah pa se je sposobnost preživetja manjšala. Natrijev benzoat ni mogel preprečiti proizvodnje ROS, prav tako pa je v primerjavi z almalom znatno povečal aktivnost encima katalaze (Arabsolghar, Borojeni, Khodaei, Khorsand, Rashedinia, Saberzadeh, 2017).

2.7. Jetra

Jetra so največja žleza v človeškem telesu, center našega metabolizma. So eden izmed najdejavnejših organov v našem telesu, saj opravljajo ogromno funkcij. Večina teh funkcij je povezana s prebavo oziroma predelavo prebavljenih in vsrkanih molekul. Jetra sodelujejo pri tvorbi žolča, ki pomaga pri razgradnji maščob v tankem črevesju. Prav tako uravnavajo količine aminokislin, tvorijo holesterol in shranjujejo železo. Odvečno glukozo pretvarjajo v glikogen, ki ga kasneje ponovno lahko pretvori v glukozo za sproščanje energije. Njihova naloga je prav tako razstrupljanje krvi in tvorjenje nekaterih beljakovin za krvno plazmo, med njimi tudi faktorje za uravnavanje strjevanja krvi (Stušek, Škornik, Vodnik, 2011)

Jetra imajo osrednjo vlogo pri vzdrževanju ravni glukoze v krvi. Po zaužitju hrane se lahko presežek glukoze shrani v jetrih kot glikogen, kar je stimulirano s sproščanjem inzulina. Glikogen se lahko nato razgradi, da sprost glukozo med vadbo (zaloge skeletnih mišic) ali na tešče (skladišče jeter). V citoplazmi hepatocit se sintetizirajo tudi maščobne kisline in beljakovine z uporabo aminokislin, zaužitih s hrano. Tako se na primer sintetizira albumin. Me drugim jetra pripomorejo tudi k tvorbi sečnine iz amonijevih ionov, ki nastajajo med razgradnjo

aminokislin. Ker je amonijak strupen za naše telo, se nato v tej obliki prenese do ledvic in se izloči iz našega telesa. Jetra so prav tako pomembna pri presnovni aktivaciji vitamina D, saj ga pretvorijo v biološko aktivno obliko vitamina D (Speller, 2021).

Jetrno tkivo je v odvisnosti masa/volumen v 80 % sestavljeno iz hepatocit (jetrnih celic), ki opravljajo več presnovnih funkcij, kot katera druga skupina celic v telesu (Speller, 2021). Poleg njih so del jetrnega tkiva tudi kupfferjeve celice, katerih glavna naloga je odstranjevanje bakterijskih patogenov, ki so vstopili v portalno kri iz črevesja (Barnes, Dixon, Nagy, Pritchard, Tang, 2016). LSEC celice, ki so vmesnik med med krvnimi celicami na eni strani ter hepatocitami in Kupfferjevimi celicami na drugi strani (Boulanger, Durand, Lemoinne, Moreau, Poisson, Rautou, Valla, 2017) ter HSC celice, ki pokrivajo najmanjše kanale jetrnega žilnega sistema in igrajo vlogo pri tvorbi krvi, proizvodnji protiteles in zaužitju tujih delcev in celičnih ostankov.

Jetra prejemajo kisik in hranila, ki jih potrebujejo, iz dveh velikih krvnih žil. Portalna vena zagotavlja približno dve tretjini krvi. Ta kri vsebuje številna hranila, ki se prenesejo v jetra iz črevesja za predelavo, hkrati pa tudi potencialno škodljive snovi, ki so se absorbirale v črevesu (alkohol, aditivi, pesticidi ...). Preostalo tretjino krvi prinaša jetrna arterija. Ta kri, bogata s kisikom, prihaja iz srca in zagotavlja jetrom približno polovico oskrbe s kisikom. Prejemanje krvi iz dveh krvnih žil pomaga zaščititi jetra. Če je ena od teh krvnih žil poškodovana, lahko jetra pogosto še naprej delujejo, ker prejemajo kisik in hranila iz druge oskrbe s krvjo (Jackson, 2020).

Kri zapušča jetra skozi jetrne vene. Ta kri je mešanica krvi iz jetrne arterije in portalne vene. Jetrne žile prenašajo kri v spodnjo votlo veno – največjo veno v telesu – ki nato prenaša kri iz trebuha in spodnjih delov telesa na desno stran srca (Jackson, 2020).

Jetrno tkivo ni vaskularizirano s kapilarno mrežo kot pri večini drugih organov, ampak je sestavljeno iz s krvjo napoljenih sinusoidov, ki obdajajo jetrne celice (University of Nottingham).

Jetra so lahko podvržena številnim motnjam in boleznim. Pojavi se lahko rak ali bolezní shranjevanja glikogena in skupina dednih motenj, ki povzročajo kopičenje glikogena v jetrih in nezadostno oskrbo z glukozo v krvi (The Editors of Encyclopaedia, 2020).

2.8. Hepatocite

Hepatocite so glavne parenhimske celice v jetrih. Igrajo ključno vlogo pri presnovi, razstrupljanju in sintezi beljakovin. Hepatocite aktivirajo tudi prirojeno imunost proti vdorom mikroorganizmov z izločanjem proteinov prirojene imunosti. Te beljakovine vključujejo baktericidne beljakovine, ki neposredno ubijajo bakterije, ki pomagajo pri fagocitozi tujih bakterij. Te beljakovine prav tako sekvestrirajo železo in blokirajo njegov prevzem s strani bakterij (Zhou, Xu, Gao, 2015).

Hepatocite predstavljajo približno 80 % jeter in imajo premer 20 μm - 30 μm . Običajno imajo eno okroglo jedro s središčem v citoplazmi, v jetrih odraslih ljudi pa je lahko tudi do 25 % hepatocit dvojedrnih. Večina jeder je tetraploidov, zato vsebujejo dvojno količino DNK v primerjavi z običajno celico. So precej dolgožive celice, saj se obnavljajo približno vsakih 5 mesecev, lahko pa se spremenijo v regenerativnih procesih, zato imajo visoko sposobnost proliferacije in regeneracije poškodovanega jetrnega tkiva (Megias, Molist, Pombal, 2021).

Pomembna funkcija hepatocit je presnova snovi, ki prihaja iz prebave. Jetra so preplavljena s portalno veno v kateri so zbrane molekule, ki so posledica prebave v črevesju. Ena izmed pomembnih snovi, ki jih pridobi iz krvi so molekule glukoze. Te jetra shranijo kot glikogen, ki se mobilizira, ko telo potrebuje energijo (Megias, Molist, Pombal, 2021).

Hepatocite so tudi močno vključene v razstrupljanje potencialno škodljivih molekul, po drugi strani pa hepatocite sintetizirajo žolč, ki se na koncu sprosti v črevesje in pomaga pri prebavi. Za presnovo molekul iz prebave so hepatocite postavljene na privilegirano mesto v jetrih - v stik s sinusoidi, ki prinašajo prebavljene molekule. Njihove plazemske membrane tvorijo tudi žolčne kanalčke, ki odvajajo žolč iz jetrnih lobulov (Megias, Molist, Pombal, 2021).

2.9. Gojenje človeških celic

Celična kultura se nanaša na odstranitev celic iz živali ali rastline in njihovo naknadno rast v ugodnem umetnem okolju. Celice se lahko odstranijo iz tkiva neposredno, kjer se nato pred gojenjem razčlenijo z encimskimi ali mehanskimi sredstvi, lahko pa izhajajo iz že uveljavljene celične linije ali celičnega seva (Gibco, 2011).

Stopnjo, ko celice izoliramo iz tkiva in se nato razmnožujejo pod ustreznimi pogoji dokler ne zasedejo vseh razpoložljivih substrat, imenujemo primarna kultura. Po tem je potrebno celice subkultivirati tako, da jih prenesemo v novo posodo in jim s tem omogočimo več prostora za nadaljnjo rast. Tako primarna kultura postane celična linija, v kateri imajo celice omejeno življenjsko dobo. Ko se celice prenašajo, prevladujejo tiste z najvišjo rastno sposobnostjo, posledica česar je določena stopnja genotipske in fenotipske enotnosti v populaciji (Gibco, 2011).

Pogoji kulture se zelo razlikujejo za vsako vrsto celice. Vsem je skupno, da njihovo umetno okolje sestoji iz primerne posode, v katerem je substrat oz. medij, ki vsebuje esencialne hranilne snovi (aminokisliline, ogljikove hidrate, vitamine, minerale), rastne faktorje, hormone in pline (O_2 , CO_2) ter uravnava fizikalno-kemijsko okolje (pH, osmotski tlak, temperaturo). Večino celic lahko gojimo le, ko so pritrjene na trden ali poltrden substrat, nekatere pa lahko gojimo tudi lebdeče v kulturnem mediju (Suspenzijska kultura) (Gibco, 2011).

Uspešna celična kultura je močno odvisna od ohranjanja celic brez kontaminacije mikroorganizmov, kot so bakterije, glive in virusi. Viri teh so lahko nesterilni material, mediji, reagenti, inkubatorji, delovne površine ter delci v zraku, obremenjeni z mikroorganizmi. Da se temu izognemo uporabljamo aseptično tehniko, ki je zasnovana tako, da zagotavlja pregrado med mikroorganizmi v okolju in sterilno celično kulturo. Elementi te so sterilno delovno območje, dobra osebna higiena, sterilni reagenti in mediji ter sterilno rokovanje. To lahko dosežemo z UV svetlobo, dezinfekcijo, segrevanjem na visoki temperaturi... (Gibco, 2011).



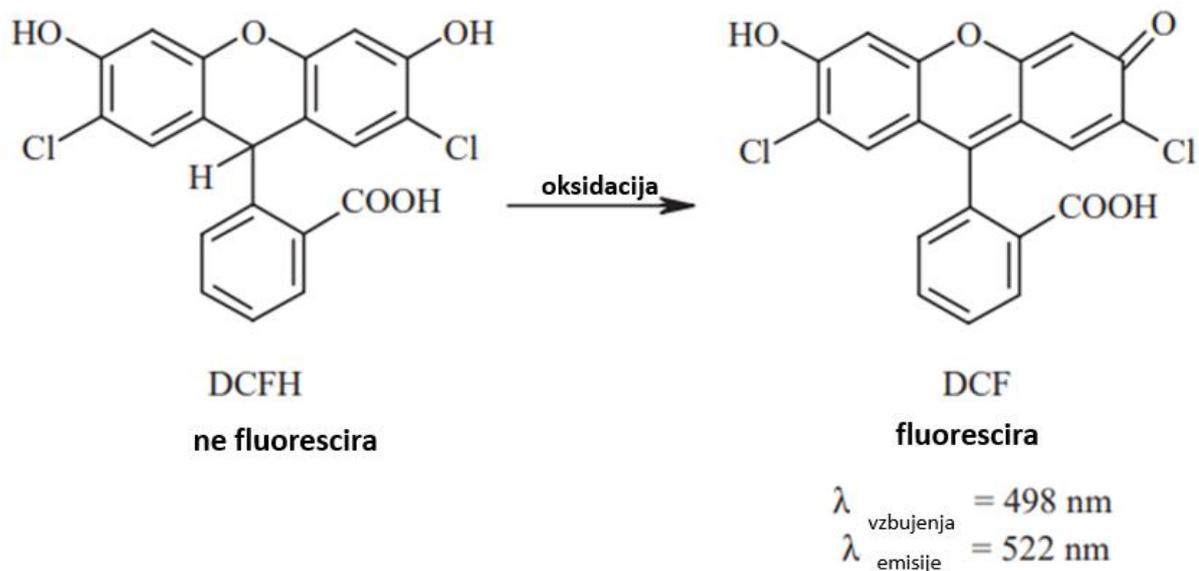
Slika 11: Gojenje celic v inkubatorju (lasten vir)

3. OZNAČEVALCI IN TARČNE BIOMOLEKULE

3.1. ROS (reaktivne kisikove spojine)

Reaktivne kisikove spojine (ROS) so visoko reaktivne spojine, med katere sodijo prosti kisikovi radikali (hidroksidni, superoksidni radikal) in spojine kot so vodikov peroksid ter ozon (Osredkar, 2012). Nastajajo kot stranski produkt celične presnove, predvsem v mitohondrijih. Ko celična proizvodnja ROS preseže njihovo antioksidativno sposobnost, lahko pride do oksidativnega stresa in poškodb celičnih makromolekul, kot so lipidi, beljakovine in DNK. Tako lahko ROS na splošno opredelimo kot neravnovesje med proizvodnjo oksidantov in antioksidativno zmogljivostjo celice za preprečevanje oksidativnih poškodb. Takšno stanje oksidativnega stresa naj bi prispevalo k patogenezi številnih človeških bolezni, vključno z aterosklerozo, pljučno fibrozo, rakom, nevrodegenerativnimi boleznimi in staranjem. Za zaščito pred potencialno škodljivimi učinki ROS imajo celice več antioksidativnih encimov, kot so superoksid dismutaza (ki reducira O_2 v H_2O_2), katalaza in glutation peroksidaza (ki reducira H_2O_2 v H_2O in je še posebej pomembna v jetrih) (Fanburg, Thannickal, 2000).

Za določanje ROS v celicah (in vitro) se pogosto uporablja različne fluorescenčne označevalce kot so na primer dihidroetidij, 1,3 – difenilizobenzofuran, skopoletin, diklorodihidrofluorescein (DCFH), ki je bil uporabljen tudi v našem poskusu. Ob vstopu v celice prisotne reaktivne kisikove spojine oksidirajo DCFH v diklorofluorescein (DCF), ki fluorescira, kar lahko izmerimo s spektrofluorimetrom (Fernandes, Gomes, Lima, 2005).



Slika 12: Kemijska zgradba DCFH in DCF (Fernandes, Gomes, Lima, 2005)

3.2. Glukoza

Glukoza je monosaharid ($C_6H_{12}O_6$) in je iz vidika prehrane najpomembnejši ogljikov hidrat za človeka. Je gradbeni element drugih sladkorjev, vendar ni tako sladka kot kuhinjski sladkor. Glukoza se pojavlja v krvi in iz prebavil prehaja v vse celice telesa. Pomembna je predvsem kot substrat za celično dihanje, za pridobivanje energijsko bogate snovi ATP (adenozin trifosfata). Normalne ravni glukoze v krvi znašajo od 80 do 100 mg/ml krvi (Boh, Vrtačnik, Zmazek, 2014). Jetra proizvajajo, shranjujejo in sproščajo glukozo, odvisno od potreb telesa po glukozi. Ravni glukoze v krvi regulirata hormona inzulin in glukagon. Jetrne celice imajo zelo pomembno vlogo ravno zato, ker z glikogenezo pretvorijo presežke glukoze v glikogen (oblika za shranjevanje glukoze). Ko se koncentracija glukoze v krvi zmanjša jetra sprožijo glikogenolizo, razgradnjo glikogena nazaj v glukozo, ki se nato sprosti v kri (Diabetes.co, 2019).

3.3. Albumin

Albumin je beljakovina brez ogljikovih hidratov, ki predstavlja 55–65 % vseh plazemskih beljakovin. (Bolleyn, Buyl, De Kock, Rogiers, Vanhaecke, 2015). Ena najpomembnejših funkcij hepatocit je sinteza serumskih beljakovin, natančneje serumskega albumina. Izločanje albumina v serumu je bistveno, saj vzdržuje onkotski tlak v telesu (plazmi) (Boron, Boulpaep, 2016). Albumin poleg tega sodeluje pri transportu in shranjevanju najrazličnejših ligandov, ter je vir endogenih aminokislin. Ledvice običajno preprečujejo izgubo serumskega albumina v urinu, vendar se ta še vedno nahaja v običajnem urinu v majhnih količinah. Rahlo povišano izločanje albumina v urinu, imenovano mikroalbuminurija, je še posebej pomembno pri zgodnji diagnozi diabetične nefropatije, ki se razvije pri skoraj 40 % bolnikov s sladkorno boleznijo. Mikroalbuminurija je natančneje opredeljena kot izločanje nad normalno, vendar nižjo od meje zaznave tradicionalnih testov z merilno palico, to je med 20 in 200 $\mu\text{g}/\text{min}$ (Bolleyn, Buyl, De Kock, Rogiers, Vanhaecke, 2015). Merjenje izločanja albumina se uporablja tudi kot test delovanja jeter, ki nakazuje morebitno poškodbo jeter in jetrno patologijo (Boron, Boulpaep, 2016).

3.4. Trigliceridi

Najpomembnejši maščobi v krvi sta holesterol in trigliceridi (Černe, 2016). Vloga trigliceridov je, da skladiščijo neuporabljene kalorije in organizmu zagotavljajo energijo. Telo jih pridobiva iz hrane, proizvaja pa jih tudi samo in sicer v jetrih (Zasrce, 2020). Ker trigliceridi v vodi niso topni, se po krvi prenašajo vezani z beljakovinami v delcih, imenovanih lipoproteini. Med vsemi maščobami so ravno trigliceridi v telesu najbolj prisotni, saj se prav v obliki teh estrov maščobnih kislin skladišči energija v maščevju. Najpogostejši vzrok povišane ravni maščob v krvi je nepravilna prehrana, drugi dejavniki tveganja pa so debelost, nekatere podedovane lastnosti in majhna telesna aktivnost. Če je maščob, kot so trigliceridi v naši krvi preveč, lahko te ogrožajo naše življenje. Maščobe se odlagajo zlasti na stenah arterij in s tem povzročajo postopno zožitev in končno zamašitev žile. Zato priporočene koncentracije trigliceridov v krvi znašajo največ 2 mmol/L (Černe, 2016). Povišana količina trigliceridov je lahko znak raznih bolezenskih stanj, kot so sladkorna bolezen, hipotiroidizem (zmanjšano delovanje ščitnice), bolezn jeter in ledvic in genetske motnje, lahko pa tudi posledica nekaterih zdravil. Zaradi povišane količine trigliceridov pa lahko pride do povečanega tveganja za srčno-žilne bolezni (Zasrce, 2020).

4. MATERIALI IN METODE

4.1. Seznam materialov in opreme

4.1.1. Kemikalije

- saharin (Merck)
- citronska kislina (DROGA)
- tartrazin (E- 102, Fun Cakes)
- mononatrijev glutamat (AJI-NO-MOTO)
- natrijev benzoat (dr Oetker)
- natrijev hidroksid (Merck)
- DCFH - diklorofluorescin (Merck)
- medij HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) (ThermoFisher Scientific)

4.1.2. Celična kultura

- celični medij (Gibco) (raztopina sladkorjev, ionov, vitaminov....)
- človeške hepatocite - HepaRG (ThermoFisher Scientific)
- Serum (Gibco) (dodatek h gojiščem za gojenje celic z rastnimi faktorji)

4.1.3. Laboratorijski pribor

- zaščitni plašč
- zaščitne rokavice
- vibracijski mešalnik za epruvete - vortex (RS-VA10, Phoenix Instrument)
- pipete z nastavki (ThermoFisher Scientific)
- posoda za gojenje celičnih kultur (Nunc)
- centrifugirke
- čaša (250 mL)
- bakterijski filter (0,22 μm)
- injekcijska brizgalka (20 mL)
- bireta
- stojalo
- eppendorfi (mikrocentrifugirke)
- mikrotitrna plošča (Nunc)

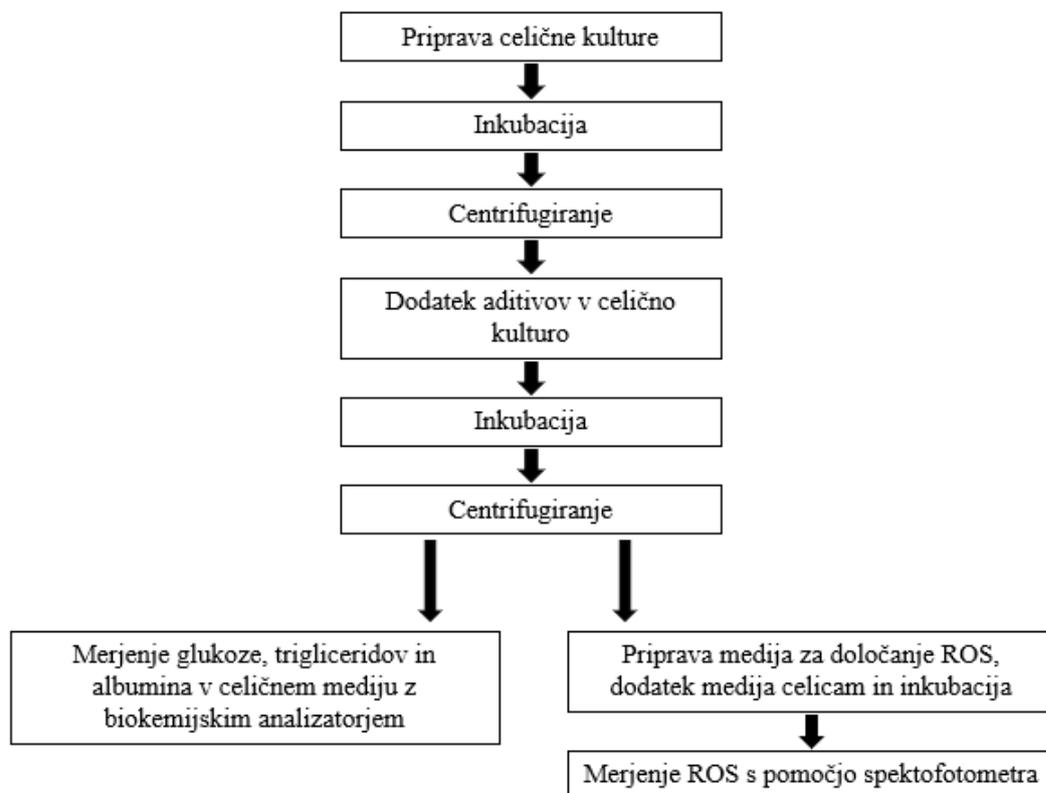
- kivete

4.1.4. Laboratorijske aparature

- zamrzovalnik (ThermoFisher Scientific)
- hladilnik (ThermoFisher Scientific)
- digestorij
- vodna kopel
- centrifuga
- celični inkubator
- svetlobni mikroskop
- tehtnica
- spektrofotometer (VarioskanFlash, ThermoFisher Scientific)
- biokemijski analizator (Cobas c 111, Roche)

4.2. Metode dela

Raziskovalno delo je potekalo v stopnjah prikazanih na sliki 12:



Slika 13: Shema poteka dela (lasten vir)

4.2.1. Odtalitev celic

Iz zamrzovalnika (-80 °C) smo vzeli hepatocite, iz hladilnika s 4°C pa celični medij. Celice in reagente smo dali v vodno kopel, na 37 °C, da smo preprečili toplotni šok. 9 ml celičnega medija in 1 ml celic smo zmešali z vortexom in centrifugirali. Tekočino smo odlili, celicam pa dodali 1 ml celičnega seruma in 9 ml celičnega medija. To smo zmešali, dali v posodo za gojenje celičnih kultur in nato v inkubator. Naslednji dan smo celicam menjali celični medij.

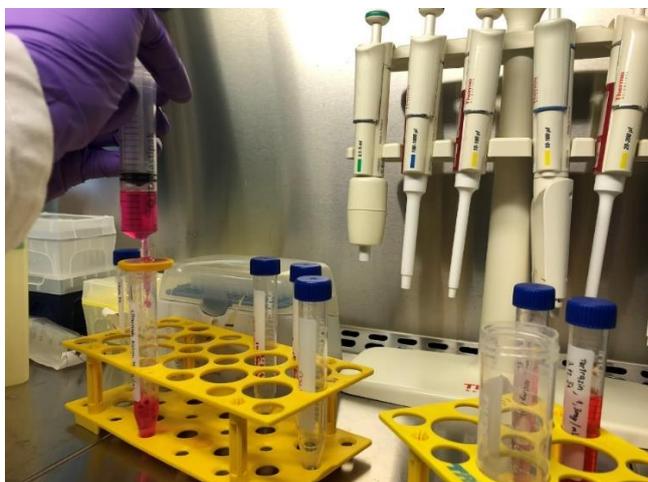
4.2.2. Priprava koncentracij izbranih aditivov

Naslednji dan smo odtehtali osnovne koncentracije za 10 ml celičnega medija. Te smo določili s pomočjo priporočenih dnevnih vnosov in z upoštevanjem kemijskih lastnosti uporabljenih aditivov. Za nižje koncentracije smo določili polovično koncentracijo osnovnih.

Tabela 1: Uporabljene koncentracije aditivov (lasten vir)

Aditiv	saharin	tartrazin	mononatrijev glutamat	citronska kislina	natrijev benzoat
koncentracija (mol/L)	0,546	0,002	0,059	0,520	0,694

Ker sta citronska kislina in saharin kisli snovi, sta znižali pH celičnega medija. Zaradi pomembnosti ohranjanja optimalnega pH v celičnem mediju smo ga nevtralizirali z NaOH. Zmes aditiva in 10 ml celičnega medija smo titrirali z NaOH do spremembe barve – roza (pH 7,4). Nato smo 10 ml celičnega medija dodali še ostalim aditivom. Pripravljene koncentracije smo zaradi nesterilnosti celičnega medija prefiltrirali skozi bakterijski filter in do uporabe hranili v hladilniku.



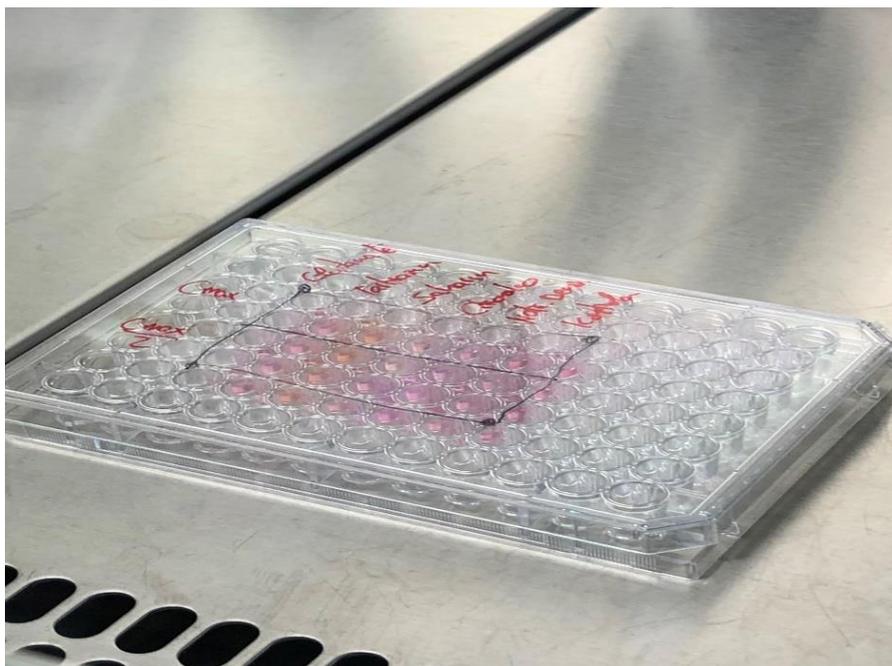
Slika 14: Filtriranje pripravljenih koncentracij aditivov (lasten vir)

4.2.3. Priprava vzorcev

5. dan smo medij in celice iz posode za gojenje celičnih kultur prenesli v 6 eppendorfov (5 za aditive in enega za kontrolo). Te smo centrifugirali in odlili medij, tako da so v eppendorfih ostale le celice. S pipeto smo odmerili 400 μ l pripravljenih koncentracij aditivov ter jih dodali v eppendorfe in premešali. Po 200 μ l mešanice smo prenesli v novo pripravljenih 6 eppendorfov.

Označili smo mikrotitrsko ploščo in iz 6 eppendorfov dva krat po 100 μ l dali v dve vrsti zaradi ponovljivosti poskusa. Nato smo ostalih 6 eppendorfov uporabili za nižje koncentracije. Te smo pripravili tako, da smo k prvotni koncentraciji dodali še enkrat toliko celičnega medija in tako koncentracijo za polovico razredčili. Nato smo jih prenesli v mikrotitrsko ploščo.

Čez 2 dni (7. dan), smo v mikrotitrsko ploščo dodali še 100 μ l koncentracij aditivov vsem vzorcem (vsakemu s svojo formulacijo), da so celice dobile hrano.



Slika 15: Celice z določenimi koncentracijami aditivov v mikrotitrski plošči (lasten vir)

4.2.4. Meritve biokemijskih parametrov in ROS

Iz mikrotitrške plošče smo po 200 μ l celične kulture z aditivi premestili v na novo označenih 22 eppendorfov (2x5 eppendorfov za posamezno koncentracijo in eno kontrolo za vsako koncentracijo), nato smo centrifugirali. Supernatant smo odpipetirali v pripravljene kivete in s pomočjo biokemijskega analizatorja izmerili količino glukoze, trigliceridov in albumina.

Nato smo pripravili medij za določanje ROS. S pipeto smo zmešali 5 ml HBSS medija in 25 μ l DCFH medija. 100 μ l zmesi smo dali v vsakega od eppendorfov, kjer so se nahajale celice, s pipeto zmešali, premestili v mikrotitrsko ploščo in za 1 uro dali v inkubator.

ROS smo merili s pomočjo spektrofлуorimetra (eksitacija pri 504 nm, emisija pri 529 nm), merili smo dvakrat, da smo dobili povprečje.



Slika 16: Mešanje HBSS medija in DCFH (lasten vir)

5. REZULTATI

V grafih so prikazane izmerjene vrednosti glukoze, trigliceridov in albumina pri izbranih aditivih. Z biokemičnim analizatorjem smo merili produkte hepatocit, ki smo jih 5 dni gojili pod vplivom izbranega aditiva. V tabeli 2 so vrednosti ob izpostavitvi osnovni koncentraciji aditivov, v tabeli 3 pa polovični. V obeh tabelah je dodana tudi kontrola za primerjavo. Ta predstavlja medij, v katerem so produkti hepatocit, ki niso bile izpostavljene nobenemu aditivu.

Iz grafov 1, 2 in 3 lahko razberemo, da se vrednosti glukoze, albumina in trigliceridov drugačne kot pri kontroli in je aditiv imel vpliv na količino njihovih produktov. Opazimo lahko, da so pri osnovni koncentraciji aditivov nastale večje spremembe, medtem ko so pri polovični koncentraciji, torej nižji, razlike manjše ali pa jih sploh ni. To kaže na dejstvo, da različna količina aditiva vpliva na količino produktov - višje kot so, večja so odstopanja od kontrole.

Primerjava rezultatov:

V spodnjih grafih so pregledneje zbrane vrednosti, ki smo jih izmerili v mediju po deset dnevem gojenju hepatocit. Graf 1 prikazuje koncentracije glukoze, ki so jih produktirale hepatocite ob izpostavljenosti različnim aditivom pri osnovni in polovični koncentraciji. Ob vsakem aditivu je za primerjavo dodana še kontrola. Enako velja za grafa 2 in 3, le da so na grafu 2 prikazani rezultati koncentracij albumina, na grafu 3 pa trigliceridov.

Legenda grafov:

MSG – mononatrijev glutamat

TAR - tartrazin

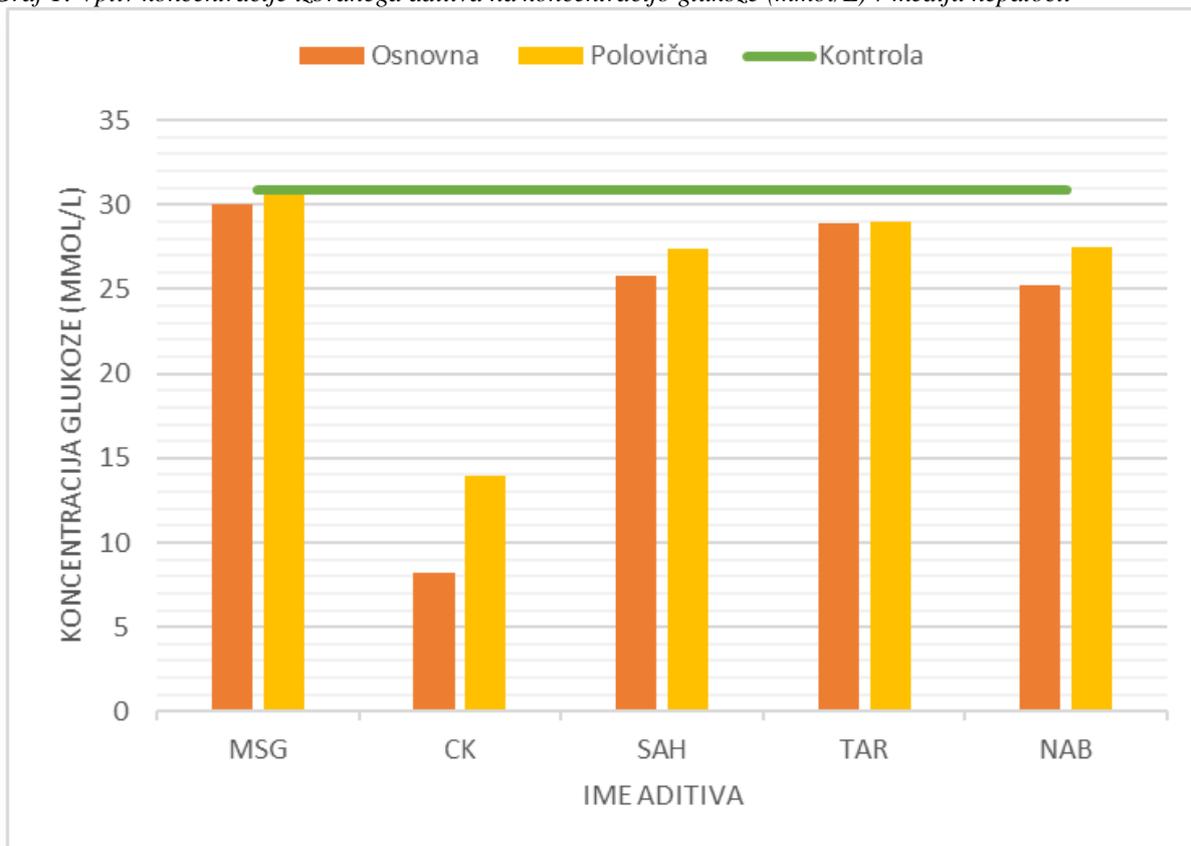
K - kontrola

CK - citronska kislina

SAH - saharin

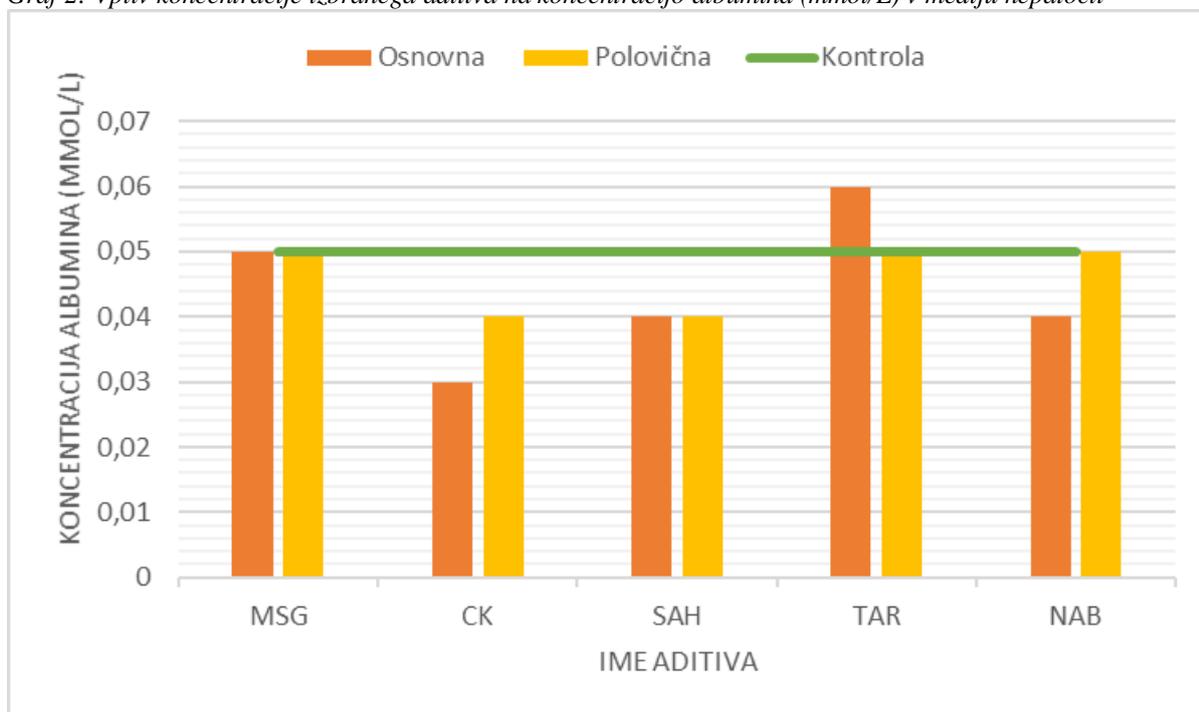
NAB - natrijev benzoat

Graf 1: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na koncentracijo glukoze (mmol/L) v mediju hepatocit



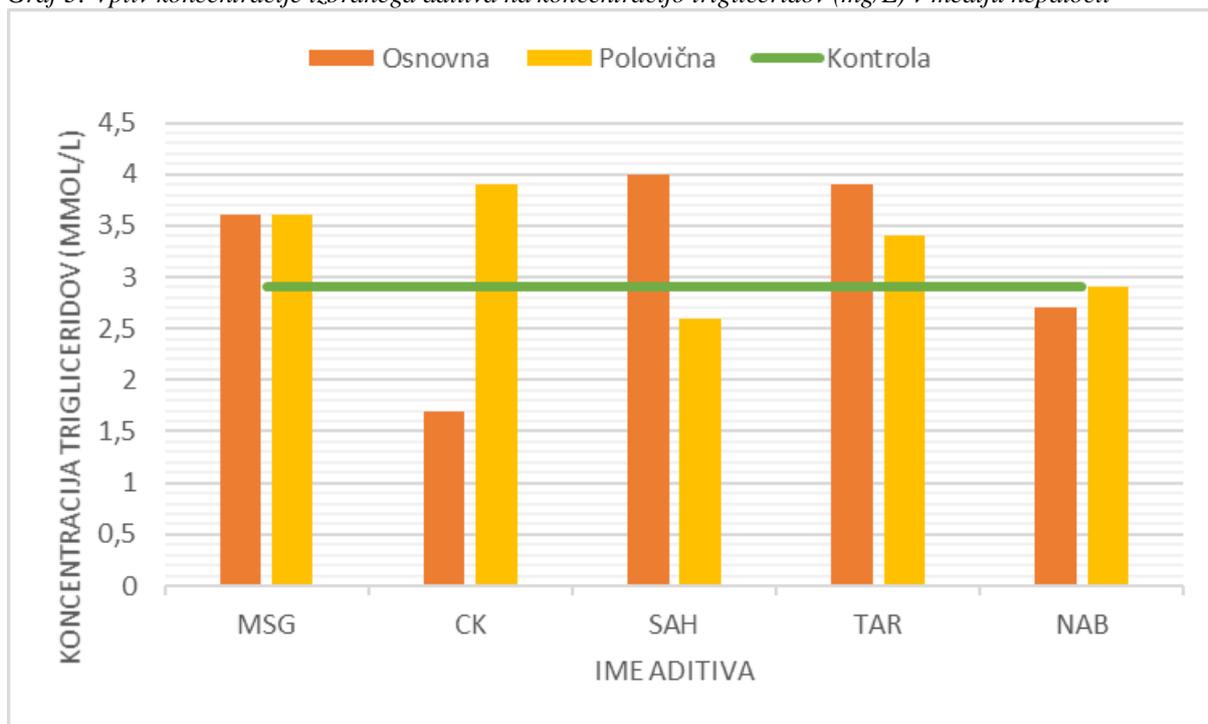
Kot lahko opazimo na grafu 1, se je koncentracija glukoze v mediju hepatocit ob dodatku vseh izbranih aditivov zmanjšala. Največja razlika je nastala pod vplivom citronske kisline. Nekoliko večji vpliv sta imela tudi natrijev benzoat in saharin. Vrednosti so ostale skoraj nespremenjene v mediju, kjer so hepatocite proizvajale pri dodatku mononatrijevega glutamata in tartrazina. Za vse aditive velja, da so pri višjih koncentracijah nastale večje spremembe, torej se je koncentracija glukoze v mediju zmanjšala. Pri polovičnem odmerku aditiva so medtem spremembe manjše. Iz tega lahko sklepamo, da ima aditiv vpliv na produkcijo glukoze in, da se ta vpliv z večanjem koncentracije aditiva viša.

Graf 2: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na koncentracijo albumina (mmol/L) v mediju hepatocit



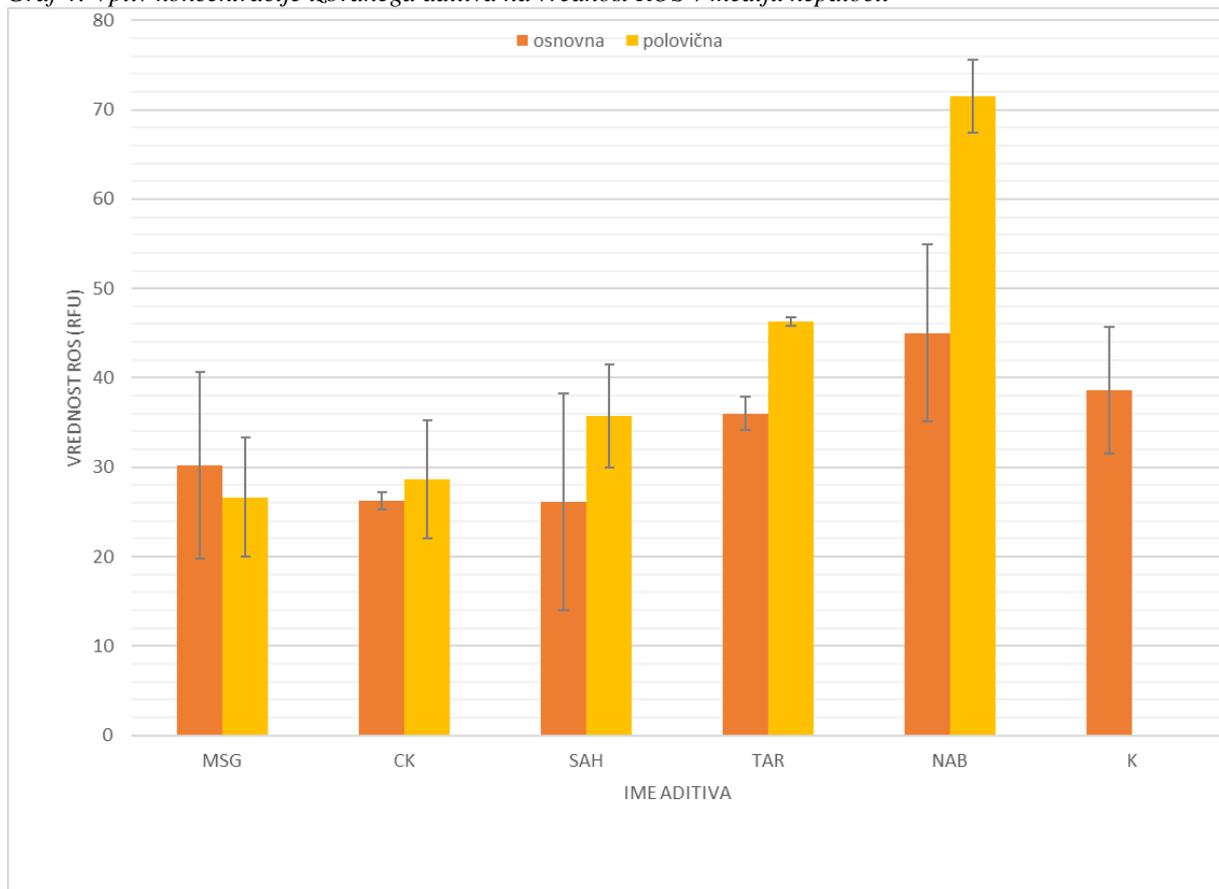
Iz grafa 2 lahko razberemo, da gre pri večini aditivov za spremembo koncentracije albumina v mediju hepatocit. Ta se je povečala le v primeru osnovne koncentracije tartrazina. Ob dodatku citronske kisline, saharina in natrijevega benzoata se je koncentracija albumina zmanjšala. Največja razlika je nastala pri citrinski kislini. Prav tako se je koncentracija albumina kar precej zmanjšala pri saharinu, kjer sta vrednosti albumina pri osnovni in polovični koncentraciji aditiva enaki. Manjša sprememba v koncentraciji produktiranega albumina je bila prisotna tudi pri osnovni koncentraciji natrijevega benzoata, medtem ko se pri polovični koncentraciji vrednost ni spremenila, tako kot pri tartrazinu. Opazimo pa tudi, da mononatrijev glutamat nima vpliva na raven albumina v mediju, saj so ob njegovem dodatku vrednosti ostale enake, kot pri kontroli.

Graf 3: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na koncentracijo trigliceridov (mg/L) v mediju hepatocit



Graf 3 predstavlja koncentracijo trigliceridov v mediju po 10 dnevnom gojenju hepatocit. Pod vplivom mononatrijevega glutamata in tartrazina se je koncentracija teh zvišala. Na drugi strani pa se je koncentracija trigliceridov ob dodatku natrijevega benzoata zmanjšala. Pri citronski kislini se je ob osnovni koncentraciji aditiva koncentracija produktov precej zmanjšala, medtem ko se je pri polovični koncentraciji močno povečala. Glede na kontrolo je prav tako zvišanje koncentracije trigliceridov povzročil saharin, ob nižji koncentraciji aditiva pa je vrednost teh padla. Iz teh rezultatov je težko razbrati ali aditiv vpliva na zvišanje ali znižanje koncentracije produktov, predvsem pri saharinu in citronski kislini.

Graf 4: Vpliv koncentracije izbranega aditiva na vrednost ROS v mediju hepatocit



Iz grafa 4 se opazi, da je ob dodatku vseh aditivov prihajalo do spremembe vrednosti ROS v celici. Najmanjša razlika je bila ob dodatku tartrazina. Če upoštevamo standardno deviacijo vidimo, da je ta v razponu kontrole pri osnovni in polovični koncentraciji. Vrednost ROS je najbolj narastla v mediju z natrijevim benzoatom. Ta je bila celo večja pri polovični koncentraciji. V primeru saharina, citronske kisline in natrijevega benzoata so vrednosti ROS padle. Sicer razlike niso velike, saj v primeru upoštevanja standardne deviacije lahko opazimo, da so vrednosti primerljive z razponom kontrole.

6. ANALIZA REZULTATOV

V raziskovalni nalogi smo želeli ugotoviti ali izbrani aditivi (tartrazin, mononatrijev glutamat, citronska kislina, saharin in natrijev benzoat) škodujejo delovanju hepatocit. V ta namen smo v obdobju 10 dni gojili hepatocite v mediju, kateremu je bil dodan izbran aditiv. Nato smo v medijih izmerili koncentracijo glukoze, albumina in trigliceridov, v samih hepatocitah pa ROS.

Z raziskavo smo pridobili podatke, ki so nam pomagali ovrednotiti naše hipoteze.

6.1. Hipoteza 1

Naša prva hipoteza je predvidevala učinek saharina na raven biomolekul v mediju hepatocit ter na ROS, ki se je kopičil v njih. Kot je razvidno iz grafa 1, je bila koncentracija glukoze v mediju v obeh uporabljenih koncentracijah saharina manjša v primerjavi s kontrolo. Ker je bila ob osnovni koncentraciji razlika večja, lahko sklepamo, da je vpliv na spremembo koncentracije glukoze celic večji ob višjem dodatku saharina. V grafu 3 je prikazano, da se je raven trigliceridov ob dodatku osnovne koncentracije povečala za malo več kot 1 mmol/L, pri polovični koncentraciji pa se je zmanjšala. Kot smo že predvideli v hipotezi, se je koncentracija albumina ob dodatku obeh koncentracij zmanjšala. Razlika v vrednosti albumina se med osnovno in polovično koncentracijo saharina ni pojavila. Pri obeh se je zmanjšala za 0,01 mg/L. ROS se je ob dodatku osnovne koncentracije saharina nekoliko zmanjšal, medtem ko se ob polovični dozi saharina vrednost ni spremenila oziroma je ostala v obsegu kontrole. Naši rezultati o koncentraciji glukoze v mediju so skladni s tem, kar je že potrdila raziskava Amin A. in AlMuzafar (2015) v serumu albino podganjih samcev. Sklepamo, da je saharin pospešil privzem glukoze. Morda je celica pospešila celično dihanje in je potrebovala več energije. Prav tako so naši rezultati skladni z rezultati raziskave Z Asan Azeez, Yousif Alkass in Suzete Persike (2019), kjer so sicer poskus izvedli na podganah. Iz tega lahko sklepamo, da v tem primeru gre za podobnosti med odzivanjem podganjih in človeških celic na saharin. Možno je, da lahko raven trigliceridov povežemo z prevzemom glukoze iz medija. Lahko da je celica energijo za celično dihanje jemala večinoma iz glukoze, zato se je s tem povečala koncentracija trigliceridov, saj jih ni toliko potrebovala. S tem lahko prvo hipotezo delno potrdimo, saj se naši rezultati skladajo z našimi predvidevanji glede biomolekul, ne pa z vrednostmi ROS.

6.2. Hipoteza 2

Naša druga hipoteza je predvidevala vpliv dodatka tartrazina v medij za gojenje hepatocit. Graf 1 prikazuje zmanjšanje vrednosti glukoze pri obeh koncentracijah. Ker je razlika v spremembi med osnovno in polovično koncentracijo zelo majhna, lahko sklepamo, da količina tartrazina nima vpliva na velikost spremembe koncentracije glukoze v mediju. Raven trigliceridov se je ob dodatku obeh koncentracij povečala, pri osnovni bolj kot pri polovični. Iz tega sklepamo, da večja kot je koncentracija aditiva, manj trigliceridov bo celica koristila. Graf 2 prikazuje, da je pri osnovni koncentraciji prišlo do rahlega povišanja (0,01 mg/L) vrednosti albumina, medtem ko pri polovični dozi albumin ni ne narastel, ne padel. Rezultati so prav tako pokazali, da so vrednosti ROS ostale nespremenjene v primerjavi s kontrolo. Raziskava Amina M. in njegovih sodelavcev (2017) je pokazala povišanje trigliceridov v hepatocitah albino miši pod vplivom tartrazina, zato smo predvidevali, da bo v človeških celicah podobno, kar smo potdili za našimi rezultati. Naša hipoteza se je navezovala tudi na rezultate raziskave Visweswaran in Krishnamoorthy (2012), vendar v njihovem članku poročajo o povišanju ROS. Ker pa koncentracije ROS niso merili, ampak so nanjo sklepali le na podlagi zmanjšanja delovanja encima, je možno, da so bila njihova predvidevanja napačna. Možno pa je tudi, da so testisi podgan odreagirali drugače in ni povezave z njimi in človeškimi hepatocitami. Predvideli smo, da se bo zaradi povišanja trigliceridov posledično zmanjšala koncentracija glukoze, saj bodo celice energijo začele izkoriščati iz glukoze. Ker so bili rezultati skladni z našimi sklepi, je možno, da obstaja med produkcijo trigliceridov in glukoze res povezava. Glede na to, da nikjer nismo zasledili, da bi tartrazin lahko imel vpliv na albumin smo pričakovali, da tukaj ne bo prišlo do spremembe. Naši rezultati kažejo, da lahko višje koncentracije zmotijo produkcijo albumina, medtem ko nižje ne povzročajo sprememb. Hipotezo lahko torej delno potrdimo, saj se ROS ni povečal, prav tako pa tudi vrednost albumina ni ostala popolnoma nespremenjena.

6.3. Hipoteza 3

V tretji hipotezi smo predvideli rezultate ob dodajanju mononatrijevega glutamata. Rezultati so pokazali, da je odstopanje vrednosti glukoze od kontrole zelo majhna, zato lahko posplošimo, da na uravnavanje glukoze hepatocit mononatrijev glutamat nima motečega vpliva. Vrednost trigliceridov je, kot smo pričakovali v hipotezi, pri obeh koncentracijah aditiva narasla za 1 mmol/L. Koncentracija albumina se ni spremenila. Prav tako v mediju naših gojenih celic ROS ni narastel. Pri osnovni koncentraciji mononatrijevega glutamata je ostal skladen s kontrolo,

medtem ko je se je pri polovični koncentraciji celo nekoliko zmanjšal. Sicer je odklon standardne deviacije kar precej velik, zato menimo, da so rezultati nezanesljivi. Glede na raziskavo Al-Badr in Tawfik (2012), ki sta eksperimente izvajala na miših, smo predvideli, da bodo človeške celice reagirale podobno. Rezultati njune raziskave so namreč pokazali, da se bo produkcija albumina zmanjšala. V naši raziskavi pa se je izkazalo, da je raven albumina ostala enaka v primerjavi s kontrolo. V raziskavi sta prav tako predvidevala, da se je v celicah povečal ROS, kar se ne sklada z našimi rezultati. Verjetno mononatrijev glutamat direktno za celico ne predstavlja tako motečega dejavnika, da bi spremenil raven albumina, ROS in glukoze v mediju. V primejavi z raziskavo Ahluwalia in Malik (2002), ki sta izvajala teste na miših, je tudi naša raziskava pokazala povišanje trigliceridov v mediju. Ta je morda posledica tega, da je mononatrijev glutamat motil prevzem trigliceridov v notranjost celice. Se pa je v naši raziskavi s koncentracijo glukoze zgodilo nasprotno. Morda človeške celice ob dodatku mononatrijevega glutamata odreagirajo drugače na reguliranje glukoze izven telesa. Prav tako tudi to hipotezo delno potrdimo. Z našimi pričakovanji zapisanimi v hipotezi se sklada le v koncentraciji trigliceridov, rezultati o albuminu, glukozi in ROS pa so pokazali drugače.

6.4. Hipoteza 4

V četrti hipotezi smo predvideli, da se bo koncentracija glukoze v mediju ob dodatku natrijevega benzoata zmanjšala. Naši rezultati so pokazali, da se je raven glukoze ob dodatku osnovne koncentracije izbranega aditiva za malenkost zmanjšala, pri polovični koncentraciji pa je bila razlika s kontrolo še manjša. Koncentracija trigliceridov je pri polovični koncentraciji ostala enaka, pri osnovni pa se je koncentracija znižala le za 0,2 mmol/L. Pri osnovni ravni se je koncentracija albumina zmanjšala, pri polovični pa se ta ni spremenila. Iz grafa 4 je razvidno, da se je ROS povečal. To je bilo dokazano že v raziskavi Arabsolghar, Borojeni, Khodaei, Khorsand, Rashedinia in Saberzadeh (2017), kjer so ROS merili v celicah PC12. Gre za celice nadledvične žleze podgan. Glede na naše rezultate lahko predvidevamo, da natrijev benzoat povzroča stres različnim tipom celic. Raziskava Fujitani T. (2002) je ob dodatku natrijevega benzoata pokazala povečane vrednosti albumina pri podganah. Rezultati našega poskusa kažejo drugače. Možno je, da ima natrijev benzoat drugačen vpliva na človeške celice kot podganje. O spremembah glukoze so poročali tudi Clish, Deik, Delaney, Lennerz, Ludwig, Mootha, Pierce in Vafai (2014) v svoji raziskavi, ki so jo izvedli na ljudeh, zato smo naša pričakovanja v hipotezi zapisali skladno z njihovimi rezultati. Izkazalo se je, da je tudi naša raziskava

potrdila, da ob dodatku natrijevega benzoata celica v večji meri izkorišča glukozo. Morda potrebuje več vira energije, ker je celično dihanje pospešeno. Ker glede vpliva natrijevega benzoata na trigliceride nismo zasledili nobenih študij smo sklepali, da se njihova produkcija ne bo spremenila. Kljub temu je v naši raziskavi prišlo do majhne spremembe pri višji koncentraciji. Možno je, da razlike niso pomembne, lahko pa je celica trigliceride v večji meri potrebovala za vir energije. S tem lahko našo hipotezo potrdimo z izjemo albumina.

6.5. Hipoteza 5

Naši rezultati so pokazali znižanje koncentracije glukoze v mediju, kar se ne sklada z zastavljeno hipotezo. Raven trigliceridov se je pri osnovni koncentraciji precej znižala, pri polovični pa zvišala. V naši raziskavi smo prav tako ugotovili, da se je koncentracija albumina in vrednost ROS znižala. Sklepali smo, da se bo citrat, ki je produkt cikla citronske kisline kopičil in s tem celica ne bo potrebovala več toliko goriva, zato se bo s tem zvišala koncentracija glukoze v primerjavi s kontrolo. Rezultati poskusa ne potrjujejo naših predvidevanj. Zmanjšanje ROS pod vplivom citronske kisline je pokazala že raziskava pri somih (Hamed, Sayed, Soliman 2021), Glede na to, da je raven trigliceridov ob dodatku koncentracij in kontrole nihala, je možno, da je na to imela vpliv napačna metoda dela, saj je citronska kislina močno znižala pH v mediju, kar pa smo kompenzirali z bazo. Kljub temu, da o vplivu natrijevega benzoata na albumin nismo našli nobenih zanesljivih raziskav, se je albumin v našem primeru zmanjšal. Predvidevamo, da je celica ob dodatku natrijevega benzoata doživela stres in je zato preusmerila svoje delovanje v zaščito pred njim, ne pa toliko v proizvodnjo albumina. Tudi te hipoteze ne moremo v celoti potrditi, saj je koncentracija glukoze in albumina nasprotna s predvidenim.

6.6. Vrednotenje metode

Preden smo celicam dodali določene koncentracije aditivov, smo celice nekaj dni gojili. Ker je za gojenje celičnih kultur potrebna menjava medija, je morda prišlo do majhne izgube celic ob izlitju medija po centrifugiranju. Medij smo menjavali le na začetku, v naslednjih dneh, ko pa so bile celice že v mikrotitrski plošči z dodanimi aditivi, smo se izgubi celic izognili tako, da smo celični medij le dodali.

Do napak je lahko prišlo tudi pri odmerjanju količin s pipeto. Kljub temu, da smo uporabljali avtomatsko pipeto, smo včasih zajeli tudi nekaj zraka (prisotnost mehurčkov), kar je vplivalo na nenatančnost odmerjanja količin.

V raziskavi smo uporabljali dve močno kisli snovi, citronsko kislino in saharin. Ker je za ohranjanje celic v celičnem mediju pomemben tudi pH, smo ti snovi nevtralizirali z natrijevim hidroksidom. Zaradi nenatančnosti titracije ti snovi morda nista bili optimalno nevtralizirani, kar je vplivalo na odstopanja v naših rezultatih.

Da so se v raziskavi pojavljale razlike v rezultatih, katere so bile posledice napak, kažejo tudi intervali napak na grafu ROS. Razberemo lahko, da je pri nekaterih aditivih prišlo do velikega razpona, zaradi česar smo težko oblikovali zaključke. Za povečanje zanesljivosti rezultatov bi bilo potrebno povečanje števila ponovitev.

7. ZAKLJUČEK

V raziskavi so nas presenetili rezultati o reaktivnih kisikovih spojinah. Pri vseh primerih razen pri natrijevem benzoatu se te niso povečale. Ker se ROS zaradi UV žarkov, težkih kovin, antiblastičnih kovin in drugih neželenih dejavnikov poveča (Altavilla, Arcoraci, Bitto, Cucinotta, Irrera, Mannino, Pallio, Pizzino, Squadrito, 2017), smo pričakovali, da bodo tudi testirani aditivi v njem sprožili povečanje ROS, saj v telo dodajamo tujo umetno substanco. Predvidevamo, da je padec ROS posledica tega, da smo ROS v mediju merili komaj peti dan po doziranju aditivov hepatocitam. Ker ima celica svoje mehanizme proti nastanku ROS (glutatione), je verjetno, da je do trenutka merjenja ROS celicam že uspelo zravnanje njihovo raven. Naši rezultati so torej v večini primerov pokazali, da ti nimajo negativnega vpliva na reaktivne kisikove spojine, zato ti ne ogrožajo celičnega oziroma tkivnega propadanja. Izjema je natrijev benzoat, pri katerem je vrednost ROS narastla. Zato tega aditiva iz vidika škodljivosti jetrom ne priporočamo, oziroma celo svetujemo njegovo odstranitev iz prodaje. Hkrati pa predlagamo nadaljnje študije, kjer se bo ROS meril še v istem dnevu.

Ker se je vrednost glukoze v vseh primerih zmanjšala, predvidevamo, da je celica potrebovala več vira energije, ki ga je izkoriščala iz glukoze. Morda si je s pospešenim celičnim dihanjem in več energije uspela zagotoviti zaščito proti stresu, ki ji ga je povzročil dodatek aditivov.

Najini rezultati kažejo tudi na to, da obstaja verjetnost povezave med trigliceridi in glukozo. Kadar je celica intenzivneje izkoriščala glukozo iz medija, je zmanjšala prevzem trigliceridov. Možno je, da je želeno energijo raje izkoriščala iz glukoze, kot iz trigliceridov.

Če je prišlo do spremembe koncentracije albumina v mediju, je v večini primerov šlo za znižanje. Možno je, da je celica svoje delovanje raje preusmerila na zaščito pred tujo kemikalijo in posledično zmanjšala proizvodnjo albumina.

Rezultati naše raziskovalne naloge so pokazali, da vsi uporabljeni aditivi vplivajo na spremembe pri produkciji testiranih molekul in ROS v hepatocitah. Večinoma se je izkazalo, da je polovična koncentracija aditiva povzročila manjšo spremembo kot osnovna, torej višja, zato lahko sklenemo, da višje koncentracije aditivov resneje vplivajo na celico in posledično celoten organizem. Iz tega vidika podpiramo, da je njihova dovoljena uporaba vsaj omejena, če

se že celoten izdelek ne izključi iz prodaje. Poleg že izpostavljenega natrijevega benzoata, je velike spremembe povzročal tudi saharin, za katerega prav tako predlagamo, da se iz prodaje izključi. Glede na rezultate je najmanjši učinek povzročil mononatrijev glutamat, ki je očitno spremembo povzročil le v primeru trigliceridov. Kljub temu ga ne izločamo iz seznama nevarnih aditivov, saj povečanje trigliceridov lahko povzroči razne srčne bolezni, kot so srčni infarkti, pa tudi možgansko kap (Sachdev, 2021). Zato predlagamo, da so tudi za mononatrijev glutamat potrebne dodatne raziskave, ali je res ustrezen za neomejeno uporabo na trgu.

Ker je naše raziskovalno delo potekalo *in vitro* in smo spremembe opazovali le na ravni celice, ne moremo z gotovostjo trditi, da ti v človeškem telesu povzročajo bolezenske motnje. Organski sistemi v človeškem telesu namreč sodelujejo povezano, zato sprememb na ravni celice ne moremo posplošiti na celotno telo. Prav tako do jeter pride manjša koncentracija aditiva, kot ga zaužijemo, saj se ne absorbira v celoti ter se v krvi na poti do jeter razredči, zato koncentracijo aditiva ne moremo enačiti pri vsakdanjem zaužitju in pri doziranju teh *in vitro*. Ugotovili smo, da ob dodatku aditivov jetrna celica deluje drugače. Upamo, da bodo rezultati našega dela vzpodbudili zanimanje za dodatne raziskave in za večjo pozornost potrošnikov pri izbiri hrane, saj ima le ta veliko vlogo za zdravo življenje.

8. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema naše raziskovalne naloge se navezuje na osnovna načela družbene odgovornosti. Raziskovalne naloge smo se lotili z zavedanjem, da je zdravje najpomembnejša človeška vrednota. Raziskava je pokazala, da aditivi motijo in posledično spreminjajo delovanje naših jetrnih celic, kar lahko vodi do različnih bolezenskih stanj. Upamo, da smo z našo raziskovalno nalogo prispevali k osveščanju ljudi in k razmisleku o izbiri ustrezne, zdrave in čim manj predelane hrane. Z našo raziskovalno nalogo pa želimo vzpodbuditi nadaljnje raziskave na tem področju.

9. VIRI

- Ahluwalia P., Malik V. B. T. (2002). Studies on effect of monosodium glutamate (MSG) on various fractions of lipids and certain carbohydrate metabolic enzymes in liver and blood of adult male mice. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427494900752> (13. 11. 2021)
- Al-Badr N., Tawfik S. M. (2012). Adverse Effects of Monosodium Glutamate on Liver and Kidney Functions in Adult Rats and Potential Protective Effect of Vitamins C and E. Povzeto: https://www.scirp.org/html/9-2700392_19078.htm (13. 11. 2021)
- Alkass Y. S., Azeez H. O., Persike S. D. (2019). Long-Term Saccharin Consumption and Increased Risk of Obesity Diabetes, Hepatic Dysfunction, and Renal Impairment in Rats. Povzeto: <https://www.mdpi.com/1648-9144/55/10/681/htm> (26. 12. 2021)
- Altavilla D., Arcoraci V., Bitto A., Cucinotta M., Irrera N., Mannino F., Pallio G., Pizzino G., Squadrito F. (2017). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. Povzeto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4101632/> (13.2.2021)
- Amin A. K., AlMuzafar H. M. (2015). Alterations in lipid profile, oxidative stress and hepatic function in rat fed with saccharin and methyl-salicylates. Povzeto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4483985/> (5. 3. 2022)
- Amin M. T., Arefin S., Hossain M. S., Hussian Md. S., Neshe S. A. (2017). Tartrazine induced changes in physiological and biochemical parameters in Swiss albino mice, *Mus musculus*. Povzeto: https://www.researchgate.net/figure/Effect-of-tartrazine-on-Cholesterol-Triglyceride-Bilirubin-Creatinine_tbl3_317706949
- Arabsolghar R., Borojeni A. R., Khodaei F., Khorsand M., Rashedinia M., Saberzadeh J. (2017). The protective effect of sodium benzoate on aluminum toxicity in PC12 cell line. Povzeto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5615869/> (13. 11. 2021)
- Ashrafa A., Azam F., Hamid A. S. M., Rehmana K. (2018). Effect of food azo-dye tartrazine on physiological functions of pancreas and glucose homeostasis. Povzeto: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/tjb-2017-0296/html> (7. 3. 2022)
- Badrey E. A., Hamed M., Sayed H., Soliman A. M., (2021). Bioremediation of hemotoxic and oxidative stress induced by polyethylene microplastic in *Clarias gariepinus* using lycopene, citric acid, and chlorella. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045621002167> (13. 11. 2021)
- Bakhshizadeh M., Khoshnoud J. M., Rashedinia M., Siavashpour A. (2017). Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice. Povzeto: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbt.22022> (26. 12. 2021)

- Barnes M., Dixon J. L., Nagy E. L., Pritchard T. M., Tang H. (2016). Kupffer Cells in the Liver. Povzeto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4748178/> (21. 1. 2022)
- Borron W. F. , Boulpaep E. L. (2012). Medical Physiology: a cellular and molecular approach. Saunders Elsevier.
- Boulanger C., Durand F., Lemoine S., Moreau R., Poisson J., Rautou P. E., Valla D. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. Povzeto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27423426/> (21. 1. 2022)
- Boh B., Vrtačnik M., Zmazek B. (2014) Glukoza. I-učbenik za kemijo v 3. letniku gimnazije. Povzeto: <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1184/index2.html#> (2. 12. 2021)
- Bolleyn J., Buyl K., De Kock J., Rogiers V., Vanhaecke T. (2015). Measurement of Albumin Secretion as Functionality Test in Primary Hepatocyte Cultures. Povzeto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26272152/> (20. 11. 2021)
- Cressey B. C., Sweis I. E. (2018) Potential role of the common food additive manufactured citric acid in eliciting significant inflammatory reactions contributing to serious disease states: A series of four case reports. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750018300362> (5. 11. 2021)
- Clish B., C., Deik A. A., Delaney F. N., Lennerz S. B., Ludwig S. D., Mootha K. V., Pierce A. K., Vafai B. S. (2014). Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1096719214003552> (13. 11. 2021)
- Černe A. (2016). Holesterol in trigliceridi - maščobe v krvi. Povzeto: <https://fidimed.si/strokovni-clanki/holesterol-in-trigliceridi-mascobe-v-krvi> (20. 11. 2021)
- Davidson P. M. (2018). Food additive. Povzeto: <https://www.britannica.com/topic/food-additive> (26. 12. 2021)
- Diabetes.co (2019). The Liver and Blood Glucose Levels. Povzeto: https://www.diabetes.co.uk/body/liver-and-blood-glucose-levels.html#google_vignette (2. 11. 2021)
- Draškovič B. V. (2015). Vpliv aditivov na razvojni krog glive Schizosaccharomyces Pombe. Povzeto: <https://zpm-mb.si/wp-content/uploads/2015/06/S%C5%A0 Biologija Vpliv aditivov na razvojni.pdf> (26. 12. 2021)
- Fujitani T. (2002). Short-term effect of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F1 mice. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0378427493901024> (13. 11. 2021)

- Fanburg L. B., Thannickal J. V. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. Povzeto: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005> (20. 11. 2021)
- Fernandes E., Gomes A., Lima J. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. Povzeto: https://www.academia.edu/25300511/Fluorescence_probes_used_for_detection_of_reactive_oxygen_species (7. 3. 2022)
- Gao B., Xu M. J., Zhou Z. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. Povzeto: <https://www.nature.com/articles/cmi201597> (26. 12. 2021)
- Gibco (2011). Cell culture basics. Povzeto: <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf> (1. 12. 2021)
- Goriskalekarna (2017). Natrijev benzoat 10 g. Povzeto: <https://www.goriskalekarna.si/galenski-laboratorij-nova-gorica/izdelki-galenskega-laboratorija/natrijev-benzoat-10-g> (1. 12. 2021)
- G-Biosciences (2019). DCFH-DA Redox Probe. Povzeto: https://www.gbiosciences.com/image/pdfs/protocol/DCFH-DA_REDOX_Probe.pdf (20. 11. 2021)
- Harbolic K. B. (2020). Artificial Serrteners Side Effects and Chart. Povzeto: https://www.medicinenet.com/artificial_sweeteners/article.htm (26. 12. 2021)
- Hattori T., Honda Y., Kirimura K. (2011) 3.13 - Citric acid. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080885049001690> (5. 11. 2021)
- Jackson W. (2020). Overview of Blood Vessel Disorders of the Liver. Povzeto: <https://www.msdmanuals.com/home/liver-and-gallbladder-disorders/blood-vessel-disorders-of-the-liver/overview-of-blood-vessel-disorders-of-the-liver> (26. 12. 2021)
- Kaneko R., Kim M., Kusayanagi S., Munakata K., Mizuno K., Ogawa M., Ohishi C., Sato Y., Shiina M. (2012). Two cases of food additive-induced severe liver damage associated with positive results on lymphocyte stimulation test and for antinuclear antibodies. Povzeto: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26182392/> (26. 12. 2021)
- Kapitanovič P. (2015). Ni vse okusno, kar se sveti. DELO. Povzeto: <https://old.delo.si/prosti-cas/zdravje/ni-vse-okusno-kar-se-sveti.html> (26. 12. 2021)
- Kornberg H. (2021). Metabolism. Povzeto: <https://www.britannica.com/science/metabolism> (17. 1. 2022)
- Liu Y., Thang M., Xu Jinzhao, Xu Jinghan, Xu X. (2021). Safety assessment of monosodium glutamate based on intestinal function and flora in mice. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453021000823> (6. 11. 2021)
- Long W. (2021). Analysis of food Additives. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/tartrazine>

- Manju M., Sasmita M., Seema S., Toora B. D. (2018). Effect of Artificial Sweeteners on the Blood Glucose Concentration. Povzeto: https://www.researchgate.net/publication/334313366_Effect_of_Artificial_Sweeteners_on_the_Blood_Glucose_Concentration
- Megias Pacheco M., Molist Garcia P., Pombal Diego M. A. (2021). Hepatocyte. Povzeto: <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/8-tipos-celulares/hepatocito.php?tema=w> (26. 12. 2021)
- National Center for Biotechnology Information. (2021). Sodium benzoate. Povzeto: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-benzoate> (13. 11. 2012)
- Nair B. (2001). Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. Povzeto: <https://europepmc.org/article/med/11766131> (1. 12. 2021)
- Ninamvseeno. (2021). Citronska kislina. Povzeto: <http://www.ninamvseeno.org/pregled-aditiva.aspx?id=E330> (26.12. 2021)
- Ninamvseeno. (2021). Tartrazin. Povzeto: <http://www.ninamvseeno.org/pregled-aditiva.aspx?id=E102> (26.12. 2021)
- Nogrady B. (2015). Monosodium glutamate is blamed for a range of nasty side effects. But is there evidence to back up these claims? Povzeto: <https://www.bbc.com/future/article/20151106-is-msg-as-bad-as-its-made-out-to-be> (26. 12. 2021)
- Osredkar J. (2011). Oksidativni stres. Povzeto: <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-XT6KNQ6K> (7. 3. 2022)
- Sachdev P. (2021). High Triglycerides: What you need to know. Povzeto: <https://www.webmd.com/cholesterol-management/high-triglycerides-what-you-need-to-know> (16.1.2022)
- Sherrel Z. (2021). What is citric acid, and what is it used for? Povzeto: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/citric-acid> (26. 12. 2021)
- Speller J. (2021). Metabolic Functions of the Liver. Povzeto: <https://teachmeanatomy.com/gastrointestinal-system/liver/metabolic-functions-liver/> (26. 12. 2021)
- Stušek P., Škornik S. in Vodnik D. (2011). Zgradba in delovanje organizmov. Ljubljana: DZS.
- Tamayo M. (2021). This is how these juices affect triglycerides in your organism. Povzeto: <https://www.tododisca.com/us/this-is-how-juices-affect-triglycerides-organism/> (17.1.2021)
- The Editors of Encyclopaedia (2017). Saccharin. Povzeto: <https://www.britannica.com/science/saccharin> (3. 11. 2021)

- The Editors of Encyclopaedia Britannica (2020). Liver. Povzeto: <https://www.britannica.com/science/liver> (26. 12. 2021)
- University of Nottingham. Povzeto: https://www.nottingham.ac.uk/nursing/sonet/rlos/bioproc/liveranatomy/page_two.html (26. 12. 2021)
- Walker R. (2002). The Significance of Excursions above the ADI: Case Study: Monosodium Glutamate. Povzeto: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230099913375> (1. 12. 2021)
- Zasrce (2020). Trigliceridi in njihov vpliv na srce in ožilje. Povzeto: <https://zasrce.si/clanek/trigliceridi-in-njihov-vpliv-na-zdravje-srca-in-ozilja/> (20. 11. 2021)

Viri slik

- Slika 1: Kemijska formula saharina. Researchgate. Povzeto: https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-saccharine_fig1_336799814 (27. 2. 2021)
- Slika 2: Bonboni, ki vsebujejo saharin. Exporters India. Povzeto: <https://www.exportersindia.com/product-detail/cardborad-boxes-sodium-saccharin-5008260.htm> (5. 3. 2022)
- Slika 3: Kemijska formula tartrazina. Researchgate. Povzeto: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-tartrazine-E102-52_fig1_335062811 (27. 2. 2021)
- Slika 4: Prehranski izdelki, ki vsebujejo tartrazin. The next phase blog. Povzeto: <https://aknextphase.com/yellow-5-textile-dye-your-food/> (5. 3. 2022)
- Slika 5: Kemijska formula citronske kisline. Researchgate. Povzeto: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-citric-acid_fig6_277253632 (27. 2. 2021)
- Slika 6: Citronska kislina uporabljena kot konzervans pri marmeladi. Times of India. Povzeto: <https://timesofindia.indiatimes.com/life-style/food-news/is-is-advisable-to-consume-citric-acid/articleshow/69789380.cmsn> (5. 3. 2022)
- Slika 7: Kemijska formula mononatrijevega glutamata. Researchgate. Povzeto: https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-monosodium-glutamate_fig1_311582797 (27. 2. 2021)
- Slika 8: Mononatrijev glutamat dodan v kitajski prehrani. Askmen. Povzeto: <https://www.askmen.com/sports/bodybuilding/can-you-make-chinese-takeout-healthy.html> (5. 3. 2022)

- Slika 9: Kemijska formula natrijevega benzoata. Researchgate. Povzeto: https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-sodium-benzoate-SB_fig1_334662196 (27. 2. 2021)
- Slika 10: Natrijev benzoat v pijačah. Food microbiology. Povzeto: <https://www.lgcstandards.com/JP/en/Sodium-Benzoate/p/MM0730.00> (5. 3. 2022)
- Slika 11: Gojenje celic v inkubatorju (lasten vir, 2. 12. 2021)
- Slika 12: Kemijska zgradba DCFH in DCF. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. Povzeto: https://www.academia.edu/25300511/Fluorescence_probes_used_for_detection_of_reactive_oxygen_species (7. 3. 2022)
- Slika 13: Shema poteka dela (lasten vir, 5. 3. 2022)
- Slika 14: Filtriranje pripravljenih koncentracij aditivov (lasten vir, 3. 12. 2021)
- Slika 15: Celice z določenimi koncentracijami aditivov v mikrotitrski plošči (lasten vir, 8. 12. 2021)
- Slika 16: Mešanje HBSS medija in DCFH (lasten vir, 10. 12. 2021)

10. PRILOGE

Tabele podatkov

Tabela 2: Izmerjena vrednost glukoze (mmol/L), trigliceridov (mmol/L) in albumina (mg/L) pri osnovni koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, natrijevega benzoata in kontroli

	Vrsta dodanega aditiva					
	mononatrijev glutamat	citronska kislina	saharin	tartrazin	natrijev benzoat	kontrola
glukoza (mmol/L)	29,98	8,20	25,76	28,91	25,27	30,86
albumin (mg/L)	0,05	0,03	0,04	0,06	0,04	0,05
trigliceridi (mmol/L)	3,9	1,7	4,0	3,9	2,7	2,9

Tabela 3: Izmerjena vrednost glukoze (mmol/L), trigliceridov (mmol/L) in albumina (mg/L) pri polovični koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, natrijevega benzoata in kontroli

	Vrsta dodanega aditiva					
	mononatrijev glutamat	citronska kislina	saharin	tartrazin	natrijev benzoat	kontrola
glukoza (mmol/L)	30,73	13,94	27,36	29,02	27,53	30,86
albumin (mg/L)	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05
trigliceridi (mmol/L)	3,6	3,9	2,6	3,4	2,9	2,9

Tabela 4: Povprečje izmerjene vrednosti ROS pri višji koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, tartrazina, natrijevega benzoata in kontroli

Aditiv	mononatrijev glutamat	tartrazin	saharin	citronska kislina	natrijev benzoat	kontrola
Vrednost ROS	30,21	26,21	26,12	36,03	45,00	38,60
standardna deviacija	10,44	0,98	12,13	1,85	9,90	7,13

Tabela 5: Povprečje izmerjene vrednosti ROS pri nižji koncentraciji mononatrijevega glutamata, citronske kisline, saharina, tartrazina, natrijevega benzoata in kontroli

Aditiv	mononatrijev glutamat	tartrazin	saharin	citronska kislina	natrijev benzoat	kontrola
povprečna vrednost	26,66	28,65	35,72	46,26	71,47	38,60
standardna deviacija	6,64	6,59	5,80	0,46	4,07	7,13