

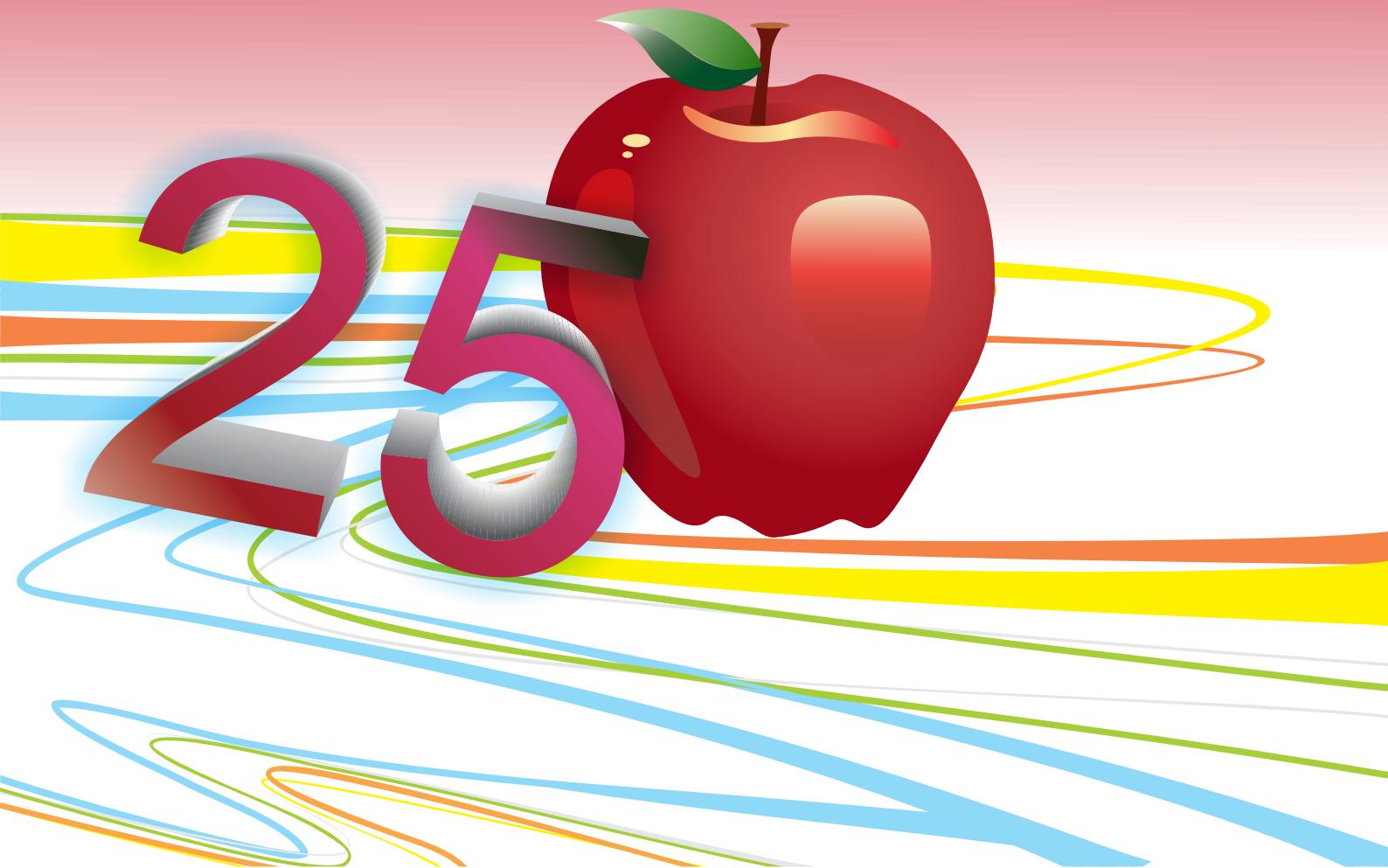
# HRANA U ZDRAVLJU I BOLESTI FOOD IN HEALTH AND DISEASE

ZNANSTVENO-STRUČNI ČASOPIS ZA NUTRICIONIZAM I DIJETETIKU  
SCIENTIFIC-PROFESSIONAL JOURNAL OF NUTRITION AND DIETETICS

vol. 13. broj 1. Srpanj / July 2024.

ISSN 2233-1220

ISSN 2233-1239 (online)





UNIVERZITET U TUZLI  
FARMACEUTSKI FAKULTET/TEHNOLOŠKI FAKULTET  
UNIVERSITY OF TUZLA  
FACULTY OF PHARMACY/FACULTY OF TECHNOLOGY

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK  
JOSIP JURAJ STROSSMAYER UNIVERSITY OF OSIJEK  
FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY OSIJEK

**HRANA U ZDRAVLJU I BOLESTI  
FOOD IN HEALTH AND DISEASE**

ZNANSTVENO-STRUČNI ČASOPIS ZA NUTRICIONIZAM I DIJETETIKU  
SCIENTIFIC-PROFESSIONAL JOURNAL OF NUTRITION AND DIETETICS

**HRANA U ZDRAVLJU I BOLESTI**  
**ZNANSTVENO-STRUČNI ČASOPIS ZA NUTRICIONIZAM I DIJETETIKU**  
**www.hranomdozdravlja.com**  
**ISSN 2233-1220**  
**ISSN: 2233-1239 (Online)**  
**VOLUMEN 13 (1) 2024**

**Glavni i odgovorni urednik:** Midhat Jašić (Tuzla, BiH)  
**Gost urednik:** Damir Alihodžić (Tuzla, BiH)

**Urednici**

Drago Šubarić (Osijek, Hrvatska), Zlata Mujagić (Tuzla BiH), Amra Odobašić (Tuzla, BiH)

**Pomoćnici urednika**

Damir Alihodžić (Tuzla, BiH), Ivana Lauš (Osijek, Hrvatska)

**Uredivački odbor**

Durdica Ačkar (Osijek, Hrvatska),  
Zahida Ademović (Tuzla, BiH),  
Krunoslav Aladić (Osijek, Hrvatska),  
Damir Alihodžić (Tuzla, BiH),  
Jurislav Babić (Osijek, Hrvatska),  
Ines Banjari (Osijek, Hrvatska),  
Azijada Beganlić (Tuzla, BiH),  
Tamara Bosnić (Tuzla, BiH),  
Ramzija Cvrk (Tuzla, BiH),  
Daniela Čačić Kenjerić (Osijek, Hrvatska),  
Ines Drenjančević (Osijek, Hrvatska),  
Brigita Đorđević (Beograd, Srbija),  
Slavica Grujić (Banja Luka, BiH),  
Rubin Gulaboski (Štip, Sjeverna Makedonija),  
Vezirka Jankuloska (Veles, Sjeverna Makedonija)  
Stela Jokić (Osijek, Hrvatska),  
Antun Jozinović (Osijek, Hrvatska),  
Mislav Kovačić (Osijek, Hrvatska)  
Greta Krešić (Opatija, Hrvatska),

Jørgen Lerfall (Trondheim, Norveška),  
Ante Lončarić (Osijek, Hrvatska),  
Snježana Marić (Tuzla, BiH),  
Borislav Miličević (Požega, Hrvatska),  
Maja Miškulin (Osijek, Hrvatska)  
Benjamin Muhamedbegović (Tuzla, BiH),  
Darko Velić (Osijek, Hrvatska)  
Dubravka Vitali Čepo (Zagreb, Hrvatska),

**Naučni savjet**

Jongjit Angkatavanich (Bangkok, Tajland),  
Lejla Begić (Tuzla, BiH),  
Irena Colić Barić (Zagreb, Hrvatska)  
Ibrahim Elmadfa (Beč, Austrija),  
Radoslav Grujić (Istočno Sarajevo, BiH),  
Lisabet Mehli (Trondheim, Norveška),  
Michael Murkovich (Graz, Austrija),  
Nurka Pranjić (Tuzla, BiH),  
Irena Vedrina-Dragojević (Zagreb, Hrvatska)

**Izdavač:**

Farmaceutski fakultet/Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, BiH

**Suizdavač:**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

**Tehnička priprema i dizajn:**

Damir Alihodžić (Tuzla, BiH), Ivana Lauš (Osijek, Hrvatska), Kenan Biberkić (Tuzla, BiH)

Časopis HRANA U ZDRAVLJU I BOLESTI izlazi dva puta godišnje. Ovaj broj tiskan je u 100 primjeraka.

Cijena godišnje pretplate (BiH) 30 €; Cijena godišnje pretplate (Inostranstvo) 50 €

**Broj bankovnog računa:**

NLB BANKA

Transakcijski račun: 1321000256000080

Budžetska organizacija: 2404019

Poziv na broj: 7013000000

**Časopis HRANA U ZDRAVLJU I BOLESTI indeksiran je u/na:**

CAB abstracts bazi podataka; FSTA (Food Science and Technology Abstract) bazi podataka;  
EBSCO Publishing, Inc. bazi podataka; portalu HRČAK (Portal znanstvenih časopisa Republike Hrvatske);  
platformi COBISS (Kooperativni online bibliografski sistem i servisi)

**Štampa:**

ELAK d.o.o Gradačac

**FOOD IN HEALTH AND DISEASE**  
**SCIENTIFIC-PROFESSIONAL JOURNAL OF NUTRITION AND DIETETICS**  
**www.hranomdozdravlja.com**  
**ISSN 2233-1220**  
**ISSN: 2233-1239 (Online)**  
**VOLUME 13 (1) 2024**

**Editor-in-Chief:** Midhat Jašić (Tuzla, B&H)  
**Guest Editor:** Damir Alihodžić (Tuzla, B&H)

**Editors**

Drago Šubarić (Osijek, Croatia), Zlata Mujagić (Tuzla, B&H), Amra Odobašić (Tuzla, B&H)

**Assistant Editors**

Damir Alihodžić (Tuzla, B&H), Ivana Lauš (Osijek, Croatia)

**Editorial board**

Đurđica Ačkar (Osijek, Croatia),  
Zahida Ademović (Tuzla, B&H),  
Krunoslav Aladić (Osijek, Croatia),  
Damir Alihodžić (Tuzla, B&H),  
Jurislav Babić (Osijek, Croatia),  
Ines Banjari (Osijek, Croatia),  
Azijada Beganić (Tuzla, BiH),  
Tamara Bosnić (Tuzla, B&H),  
Ramzija Cvrk (Tuzla, B&H),  
Daniela Čaćić Kenjerić (Osijek, Croatia)  
Ines Drenjančević (Osijek, Croatia),  
Brigita Đorđević (Belgrade, Serbia),  
Slavica Grujić (Banja Luka, B&H),  
Rubin Gulaboski (Stip, Republic of North Macedonia),  
Vezirkaka Jankuloska (Veles, Republic of North Macedonia)  
Stela Jokić (Osijek, Croatia),  
Antun Jozinović (Osijek, Croatia),  
Mislav Kovačić (Osijek, Croatia)  
Greta Krešić (Opatija, Croatia),

Jørgen Lerfall (Trondheim, Norway),  
Ante Lončarić (Osijek, Croatia),  
Snježana Marić (Tuzla, B&H),  
Borislav Miličević (Požega, Croatia),  
Maja Miškulic (Osijek, Croatia)  
Benjamin Muhamedbegović (Tuzla, B&H),  
Darko Velić (Osijek, Croatia)  
Dubravka Vitali Čepo (Zagreb, Croatia),

**Scientific board**

Jongjit Angkatavanich (Bangkok, Thailand),  
Lejla Begić (Tuzla, B&H),  
Irena Colić Barić (Zagreb, Croatia)  
Ibrahim Elmadafa (Vienna, Austria),  
Radoslav Grujić (East Sarajevo, B&H),  
Lisabet Mehli (Trondheim, Norway),  
Michael Murkovich (Graz, Austria),  
Nurka Pranjić (Tuzla, B&H),  
Irena Vedrina-Dragojević (Zagreb, Croatia)

**Publisher:**

Faculty of Pharmacy/Faculty of Technology, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75 000 Tuzla, B&H

**Co-Publisher:**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

**Technical preparation and design:**

Damir Alihodžić (Tuzla, B&H), Ivana Lauš (Osijek, Croatia), Kenan Biberkić (Tuzla, B&H)

FOOD IN HEALTH AND DISEASE journal is published twice a year. This issue is published in 100 copies.

Annual subscription price (B&H) 30 €; Annual subscription price (Foreign countries) 50 €

**Bank account number:**

NLB BANKA

Transaction account: 1321000256000080

Budget organization: 2404019

Reference number: 7013000000

**Journal FOOD IN HEALTH AND DISEASE is indexed in:**

CAB Abstracts database; FSTA (Food Science and Technology Abstract) database;  
EBSCO Publishing, Inc. database; Portal of Croatian Scientific Journals (HRCAK);  
COBISS Platform (Co-operative Online Bibliographic System and Services)

**Printed by:**

ELAK d.o.o Gradačac



**Hrana u zdravlju i bolesti / Food in Health and Disease**  
ZNANSTVENO-STRUČNI ČASOPIS ZA NUTRICIONIZAM I DIJETETIKU  
*SCIENTIFIC-PROFESSIONAL JOURNAL OF NUTRITION AND DIETETICS*

Farmaceutski fakultet/Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli, Tuzla, BiH  
*Faculty of Pharmacy/Faculty of Technology, University of Tuzla, Tuzla, B&H*

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska  
*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Osijek, Croatia*

**ISSN: 2233-1220**  
**ISSN: 2233-1239 (Online)**  
**VOLUMEN / VOLUME 13 2024**  
**(2024) 13 (1) 1 - 52**

**SADRŽAJ / CONTENT**

Izvorni znanstveni rad / *Original scientific paper*

<b>Damir Alihodžić, Midhat Jašić, Benjamin Muhamedbegović, Drago Šubarić, Amel Selimović</b> EFIKASNOST BRZIH IMUNOKROMATOGRAFSKIH TESTOVA ZA ANALIZU PRISUTNOSTI GENETSKI MODIFICIRANOG KUKRUZA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA <i>EFFECTIVENESS OF THE RAPID STRIP TESTS IN THE ANALYSIS OF THE GENETICALLY MODIFIED CORN'S PRESENCE IN FOOD PRODUCTS .....</i>	1-15
<b>Serdar KARAKURT, Hatice Gul BATUR, Irem Mukaddes BILGISEVEN, Sevtap KARAKURT</b> DIETARY EDIBLE FLAVONOID KAEMPFEROL INDUCES APOPTOSIS AND INHIBITS CELL MIGRATION IN PROSTATE CANCER CELLS .....	16-27

Pregledni rad / *Review paper*

<b>Valentina Rahelić, Josipa Matanić, Sandra Bival, Zrinka Šmuljić, Eva Pavić</b> UTJECAJ PREHRANE NA RASPOLOŽENJE I MENTALNO ZDRAVLJE <i>INFLUENCE OF NUTRITION ON MOOD AND MENTAL HEALTH.....</i>	28-35
<b>Kemal Sejranić, Damir Alihodžić, Benjamin Muhamedbegović, Muamer Mandra, Arnela Smajić</b> IDENTIFIKACIJA I RAZLIKE HACCP I HRACCP NA PRIMJERU MLJEĆNE INDUSTRIJE IDENTIFICATION AND DIFFERENCES BETWEEN HACCP AND HRACCP IN THE EXAMPLE OF THE DAIRY INDUSTRY .....	36-48

Upute autorima / *Instructions to authors.....* 49-52



# EFIKASNOST BRZIH IMUNOKROMATOGRAFSKIH TESTOVA ZA ANALIZU PRISUTNOSTI GENETSKI MODIFICIRANOG KUKURUZA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

Damir Alihodžić<sup>1\*</sup>, Midhat Jašić<sup>2</sup>, Benjamin Muhamedbegović<sup>2</sup>,  
Drago Šubarić<sup>3</sup>, Amel Selimović<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agenca za certificiranje halal kvalitete, Turalibegova 73, 75000, Tuzla, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup>Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

<sup>3</sup>Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

izvorni znanstveni rad

## Sažetak

Hrana porijeklom od genetski modificiranih organizama je sve češće prisutna u prehrani stanovništva. Posebno je česta genetska modifikacija soje i kukuruza, pa se na tržištu mogu naći i proizvodi koji vode porijeklo od ovih sirovina. U monitoringu i kontroli prisutnosti genetski modificiranog kukuruza mogu se koristiti brzi imunokromatografski testovi (eng. *Immunochemical Lateral Flow Test - ILF*) i konvencionalne metode.

Cilj rada bio je izvršiti analizu sastojaka porijeklom od genetski modificiranog kukuruza u ispitivanim uzorcima brzim ILF testovima i konvencionalnim metodama, a zatim usporediti dobivene rezultate.

U radu je istražena prisutnost genetski modificiranog kukuruza u pet proizvoda i to: palenta, smjesa za mafine i corn flakes porijeklom iz SAD-a, palenta porijeklom iz Norveške, te tortilja porijeklom iz Švedske. Za detekciju sastojaka porijeklom od GM kukuruza korišten je konvencionalni postupak baziran na polimeraznoj lančanoj reakciji (eng. *Polymerase Chain Reaction-PCR*), a od brzih metoda korišteni su brzi ILF testovi za detekciju CP4 ESPS proteina. Priprema uzorka izvršena je homogenizacijom, a zatim se odvaja 1 g od uzorka, prenese i rastvor u polipropilenskoj epruveti s destilliranom vodom u odnosu 1:4. Rezultati su očitani na nitroceluloznom dijelu imunokromatografskog testa. Za PCR metodu iz pripremljenog uzorka urađena je izolacija DNA uz primjenu DNeasy Tissue Kit, zatim izvršena kvantifikacija izolirane DNA s BiotTek PowerWave HT Microplate spectrophotometerom i primjenom softvera Gen5 Data Analysis. Rezultati polimerazne lančane reakcije očitani su uz primjenu elektroforeze s 1,5 % agaroznim gelom.

Kod svih ispitivanih uzoraka dobiveni su isti rezultati s obje metode. Utvrđeno je da palenta i smjesa za mafine porijeklom iz SAD-a sadrže genetski modificirani kukuruz, dok u proizvodima iz Nordijskih zemalja nije detektiran.

Imunokromatografski strip testeri su podjednako pouzdani kao i PCR metoda za detekciju GM kukuruza u prehrambenim proizvodima. Brze metode su višestruko jeftinije, primjenjive su izvan laboratorijskih uvjeta, a rezultati analiza su gotovi za 10 do 15 minuta.

**Ključne riječi:** GM kukuruz, brzi imunokromatografski test, PCR

## Uvod

Kontrola kvalitete kako kvantitativna tako i kvalitativna danas je nezamisliva bez analitičkih laboratorijskih metoda. Osnovni atribut koji daje obilježe kvalitete prehrambenog proizvoda je zadovoljstvo potrošača (Jašić i sur., 2007). Interesi potrošača su otkrivanje obmana proizvođača iz razloga koji mogu biti ekonomski, kada se u nekom proizvodu upotrebljavaju lošije vrste sastojaka pod etiketom boljih; vjerski, kada sastojci u proizvodu koje određena vjerska grupacija ne konzumira; zdravstveni, kada se u prodaji nađu proizvodi štetni za zdravlje ljudi i životinja, u čijem sadržaju se nalaze nedozvoljene koncentracije teških metala, pesticida, hormona, mikotoksina, lijekova i drugi štetni sastojci (Veladžić i Čaklovica, 2001).

Radi pravovremenog dobivanja rezultata laboratorijskih analiza, sve više se primjenjuju određene brze metode. Tako na primjer u kompanijama za proizvodnju ishrane za stoku ili hrane za ljude koje koriste sirovine koje su na svjetskom tržištu vrlo često genetski modificirane neophodno je izvršiti njihovu analizu na prisutnost genetski modificiranih organizama prije puštanja u proizvodnju. Ova analiza je potrebna radi usklajivanja sa zakonskim propisima o GMO, a time i usklajivanja deklaracije proizvoda i informiranja potrošača.

Tema o genetski modificiranim organizmima je u zadnje vrijeme tako snažno podijelila svjetsku javnost na one koji podržavaju i one koji su ogorčeni protivnici GMO-a. I dok jedni očekuju da će ova tehnologija unijeti brojne pozitivne promjene u naš život te znatno podići i unaprijediti kvalitetu života otvarajući neslućene perspektive, drugi izražavaju

otvoreni strah pred mogućim posljedicama prebacivanja gena iz organizma u organizam probijanjem svih prirodnih prepreka (Ballian, 2009). Genetski modificirani organizmi su organizmi koji sadrže jedan ili više gena koji se u njih umjetno unose u laboratorijsima metodama genetičkog inženjerstva, pri čemu se geni uzimaju od druge, nesrodne ili čak posve udaljene vrste. Uneseni gen poznat je pod nazivom transgen, zbog čega se ovakvi organizmi zovu još i transgeni organizmi (Trkulja i sur., 2018).

## Metode za analizu hrane

Za analizu hrane koristi se veliki broj laboratorijskih metoda i tehnika. S obzirom da je zdravstvena ispravnost proizvoda imperativ, najčešće se koriste metode za analizu zdravstvene ispravnosti prehrambenih proizvoda i namirnica za opću upotrebu. Pored toga određivanje kvalitete i porijekla proizvoda koristi se veliki broj različitih analitičkih metoda.

Analitičke metode su od naročitog značaja za forenzičku upotrebu, ali i za prehrambenu industriju. Postoje različite podjele laboratorijskih metoda i tehnika. Obzirom na način ispitivanja, ove analitičke metode mogu se svrstati u četiri grupe:

- biokemijske (imunološke),
- molekularno-genetske metode,
- spektroskopske i spektrometrijske te
- separacijske metode.

Navedene metode su najučinkovitije za primjenu u određivanju: kvalitativnih i kvantitativnih sastojaka hrane, ispravnosti hrane obzirom na patogene mikroorganizme, nutritivne alergene, ostatke pesticida i toksina, sljedivosti u skladu s geografskim i botaničkim porijeklom te utjecaju tehnološke obrade i skladištenja (Butorac i sur., 2013).

Za detekciju određenih sastojaka i onečišćenja u hrani koriste se različite laboratorijske metode.

Generalno se mogu podijeliti na konvencionalne (standardne) i suvremene brze (screening) metode za analizu hrane.

U suvremene brze metode spadaju imunokromatografski testovi (eng. *Immunochemical Lateral Flow Tests - ILF*) i vrlo često se označavaju kao brzi ili skrining testovi. Za razliku od brzih metoda, klasične metode često su spore, zahtijevaju dosta materijala, radno angažiranje, laboratorijsku infrastrukturu i sofisticirano laboratorijsko znanje i nisu uvek pogodne za određivanje kvalitete i porijekla hrane. Pored toga analiza uzorka klasičnim metodama višestruko je skuplja od analize s brzim metodama. S druge strane

većina brzih metoda nije standardizirana i prihvaćena kod službenih analiza i laboratorijskih provjera.

## Brzi imunokromatografski strip testovi za analizu prisutnosti genetski modificiranog kukuruza

Tijekom posljednjih godina došlo je do razvoja niza analitičkih metoda primjenom kojih je moguće identificirati strane supstance u proizvodima namijenjenima ljudskoj prehrani. Pojedinim analitičkim metodama želi se zaštiti proizvod od mogućeg patvorenja od strane proizvođača te istovremeno zaštiti krajnjeg potrošača od mogućih prijevara na tržištu prehrambenih proizvoda (Gvozdanović i sur., 2017). Pored toga, često se ukazuje potreba za detekcijom drugih neželjenih sastojaka u hrani. U tu svrhu mogu se koristiti imunokromatografski testovi za detekciju mikotoksina, alergena, GMO, rezidua veterinarskih lijekova i sl. (Lai i sur., 2009; Zang i sur., 2006 i Holst-Jensen, 2009).

U analizi hrane imunološke metode se temelje na analizi specifičnih reakcija koje se odvijaju između antitijela i antigena, odnosno na sposobnosti antitijela da prepozna trodimenzionalnu strukturu i pokrenu biokemijsku reakciju. Njihova primjena je raznolika, od polja imunologije do identifikacije različitih drugih molekula kao što su proteini, malih organskih molekula ili složenih spojeva prisutnih u uzorcima hrane i prehrambenih spojeva (Nielsen, 2010). Imunološke metode su brze, visoko specifične i osjetljive te jednostavne za izvođenje (Lefkovits i Pernis, 2014). To su razlozi zbog kojih su postale prihvatljive u postupcima identificiranja različitih sastojaka u prehrambenim proizvodima. Proizvodnja specifičnih antitijela je ključni korak implementacije imunoloških metoda analize obzirom na to da se takvi spojevi koriste za "hvatanje" specifičnih antigena (Asensio i sur., 2008). Na principu detekcije antigena u uzorcima razvijeni su različiti brzi testovi za njihovu detekciju. U literaturi su poznati kao Imunokromatografski Lateral Flow testovi (ILF), *Rapid antigen tests - RADTs*, *Lateral flow strips - LFS*, *Immunochemical Test Strips*, *Lateral Flow Device - LFD* za različite namjene detekcije (Holst-Jensen, 2009; Tanaka i sur., 2006; Grothaus i sur., 2006). Koriste se u prehrambenoj industriji, medicini i veterinarskoj medicini, farmaciji, poljoprivredi i drugim poljima. Tako na primjer Europska komisija je donijela preporuke o strategijama testiranja na COVID-19, uključujući korištenje brzih testova na antigen (Commission Recommendation (EU) C/2020/7502).

Efikasnost se može definirati kao sposobnost postizanja željenih rezultata sa što manjim utroškom resursa. Pored toga potrebno je izvršiti validaciju brzih metoda. Svrha validacije je osiguranje da različiti podaci o analizama proizvoda vode do konzistentnih i visokokvalitetnih rezultata. Validacijom se utvrđuje

**Tablica 1** Prikaz parametara kvalitete za kvantitativne i kvalitativne metode analize (Trullols i sur., 2004)  
**Table 1.** Overview of quality parameters for quantitative and qualitative analysis methods (Trullols et al., 2004).

Kvantitativne metode	Kvalitativne metode
Točnost: istinitost, preciznost	Osjetljivost i specifičnost
Neizvjesnost	Lažno pozitivne i negativne stope
Osjetljivost i specifičnost	Selektivnost
Selektivnost	Granica detekcije
Domet i linearnost	Granični limit
Granica otkrivanja	Regija nepouzdanosti
Robusnost	Robusnost

Kombinacijom navedenih parametara prikazanih u Tablici 1 oblikuje se plan validacije za svaku metodu. Najjednostavnija definicija validacija analitičkih metoda je postupak kojim se dokazuje da metoda služi svrsi za koju je namijenjena, a prije svega potrebno je znati/definirati svrhu metode. Nakon toga se utvrđuju postupci, tj. planiraju i provode eksperimenti čije rezultate treba prikupiti i prikazati kao dokaze o validnosti metode. Isti postupci neće se primjenjivati na sve metode – različito se pristupa validaciji kvalitativnih i kvantitativnih metoda; razlikuju se postupci validacije metode kojom se određuje analit koji preteže u uzorku i one kojom se određuju tragovi u kompleksnoj matrici. Svakoj se metodi pristupa individualno, procjenjuje se što treba napraviti za dokaz svrhovitosti (Lazarić, 2012).

#### *Osjetljivost i specifičnost metode*

U okvirima kvalitativne analize osjetljivost i specifičnost predstavljaju sposobnost testa za razlikovanje stvarno pozitivnih od stvarno negativnih uzoraka.

Osjetljivost je „sposobnost metode da otkrije istinski pozitivne uzorke kao pozitivne“, tako da je stopa osjetljivosti vjerojatnost da će metoda za datu koncentraciju testirani uzorak klasificirati kao pozitivan, s obzirom da je testirani uzorak odranije poznat kao pozitivan. Osjetljivost se može izračunati prema relaciji (O’Rangers i sur., 2000):

$$Osjetljivost = \frac{IP}{(IP + LN)}$$

pri čemu je: *IP* – Istinski pozitivni rezultati; *LN* – lažno negativni rezultati.

pouzdanost metode. Vrijednovanje (validacija) metode je potvrđivanje ispitivanjem i pribavljanjem objektivnih dokaza da su ispunjeni posebni zahtjevi za predviđenu specifičnu upotrebu zadovoljeni (*Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*; Službeni glasnik BiH br. 95/10).

Prema *Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata* specifičnost je svojstvo metode da se razlikuje analit koji se mjeri od drugih supstanci. Ova karakteristika je prije svega funkcija opisane tehnike mjerenja, ali može varirati ovisno od vrste spoja ili matriksa (*Službeni glasnik BiH br. 95/10*). Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit.

Metoda kojom se može određivati više komponenata istovremeno, ali pod uvjetom da te komponente pri određivanju ne smetaju jedna drugoj, naziva se selektivnom.

Specifičnost se definira kao „sposobnost metode da otkrije istinski negativne uzorke kao negativne“. Stopa osjetljivosti je vjerojatnost da će metoda za datu koncentraciju, testirani uzorak klasificirati kao negativan, s obzirom da je testirani uzorak od ranije poznat kao negativan. Specifičnost se može izraziti prema sljedećoj relaciji (O’Rangers i sur., 2000):

$$Specifičnost = \frac{LN}{(LP + LN)}$$

pri čemu je: *LN* – lažno negativni rezultati; *LP* – Lažno pozitivni rezultati.

Metodom se mora u eksperimentalnim uvjetima razlikovati analiti od drugih supstanci.

Mora se navesti procjena te mogućnosti. Pri primjeni metode moraju se izbjegavati sve predvidljive interferencije. Od najveće je važnosti ispitati interferencije koje bi mogli uzrokovati svi sastojci matriksa (*Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*, *Službeni glasnik BiH br. 95/10*).

Metoda je specifična kada omogućava određivanje samo jednog analita u analiziranom uzorku i pored prisutnosti i drugih spojeva u uzorku.

### *Lažno pozitivne i negativne stope*

Lažno pozitivna stopa je vjerojatnost da testni uzorak poznat kao negativan, a testna metoda ga klasificira kao pozitivan. Lažno pozitivna stopa se može izraziti sa sljedećom formulom (Feldsine i sur., 2002):

$$\text{Lažno pozitivna stopa} = \frac{LP}{(IP + LP)}$$

pri čemu je:  $LP$  – Lažno pozitivni rezultati;  $IP$  – istinski pozitivni rezultati.

Lažno negativan stopa je vjerojatnost da testni uzorak poznat kao pozitivan, a testna metoda ga klasificira

kao negativan. Lažno negativna stopa se može izraziti sa sljedećom formulom (Feldsine i sur., 2002):

$$\text{Lažno negativna stopa} = \frac{LN}{(IP + LN)}$$

pri čemu je:  $LN$  – lažno negativni rezultati;  $IP$  – istinski pozitivni rezultati.

Prema Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata alfa ( $\alpha$ ) greška definira se kao vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno negativan, iako su dobiveni pozitivni rezultati (lažno pozitivni rezultat), a grešku beta ( $\beta$ ), vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno pozitivan, iako su dobiveni negativni mjerni rezultati (lažno negativni rezultat).

Za supstance o praćenju rezidua određenih supstanci u živim životinjama i proizvodima životinjskog porijekla greška može biti 1 % ili niža. Za sve ostale supstance greška može biti 5 % ili niža (*Službeni glasnik BiH br. 95/10*).

**Tablica 2.** Relacija između lažno pozitivnih i negativnih te stvarno pozitivnih i negativnih odziva (preuzeto iz: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, National Association of Testing Authorities, Australia 2012).

**Table 2.** The relationship between false positives and negatives, and true positives and negatives (adapted from: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, National Association of Testing Authorities, Australia 2012).

		Uzorci sa sadržajem genetski modificiranog kukuruza	
		Pozitivno	Negativno
Rezultati testa	Pozitivno	Istinski pozitivni <i>IP</i>	Lažno pozitivni <i>LP</i>
	Negativno	Lažno negativan <i>LN</i>	Istinski negativan <i>IN</i>

## Materijali i metode

Za potrebe istraživanja korištene su dvije metode za detekciju genetski modificiranog kukuruza u proizvodima:

1. Brzi strip test (*Imunocromatografic Lateral Flow test*) i
2. Polimerazna lančana reakcija (eng. *Polimerase chain reaction*).

Brzi strip test korišten je *Agri-Screen for CP4 (Roundup Ready®) Strip Test*, proizvođača Neogen Corporation.

PCR metoda je korištena za validaciju rezultata dobivenih brzim strip testom za detekciju Genetski modificiranog kukuruza u uzorcima. Za obje metode korišteni su isti uzorci koji su pripremljeni za laboratorijsku analizu. Nakon provedenih analiza

uspoređeni su dobiveni rezultati te izračunati specifičnost i osjetljivost ILF strip testova za detekciju GM kukuruza u proizvodima.

### *Materijali i postupak rada ILF strip testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza*

Za detekciju genetski modificiranog kukuruza u proizvodima korišteni su komercijalni gotovi proizvodi koji u svom sastavu sadrže kukuruzno brašno i kukuruznu krupicu. Na nekim proizvodima na deklaraciji navedena je prisutnost GM kukuruza.

**Tablica 3.** Prikaz sirovina i proizvoda planiranih za analizu i pripremu uzoraka u svrhu detekcije genetske modifikacije sirovina u proizvodima i uzorcima (Uzorci uzeti iz laboratorija HIST Sveučilišta u Trondheimu)

**Table 3.** Overview of raw materials and products planned for analysis and sample preparation for the purpose of detecting genetic modification in raw materials within products and samples (Samples taken from the HIST laboratory at the University of Trondheim)

R. br.	Materijali / Uzorci	Deklarirani sastav proizvoda	Mjesto uzorkovanja	Zemlja porijekla
1.	Kukuruzni obrok	Brašno žutog kukuruza	*	SAD
2.	Kukuruzne pahuljice	Mljeveni kukuruz, šećer, aroma slada	*	SAD
3.	Smjesa za mafine	Pšenično brašno, brašno žutog kukuruza	*	SAD
4.	Palenta	Gotova kukuruzna krupica	*	Norveška
5.	Tortilja	Kukuruzno brašno	*	Švedska

\*Uzorci uzeti iz laboratorija HIST Sveučilišta u Trondheimu

### Pribor i oprema za primjenu brzih ILF strip testova za kvalitativno određivanje GM kukuruza u proizvodima

Za pripremu uzoraka i provođenje imunokromatografskog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza korišten je sljedeći pribor i laboratorijska oprema:

- analitička vaga *sartorius* s 4 decimalne,
- plastične epruvete za centrifugiranje zapremnine 50 ml,
- vrtložna mješalica *Vibrofix VF1*,
- plastične jednokratne *eppendorf* mikro epruvete zapremnine 1,5 ml,
- laboratorijske špatule i
- tučak i avan.

### Postupak analize uzoraka s ILF strip testovima

Od proizvoda koji su planirani za detekciju genetski modificiranog kukuruza odvagano je 0,2 g i preneseno u mikro epruvetu i dodano je oko 2,5 ml destilirane vode. Nakon dodavanja vode uzorak u mikro epruvetu je izmiješan 30 sekundi uz primjenu vrtložne miješalice i ostavljen nekoliko minuta da se razdvoji čvrsta faza od tekuće. Kada su se razdvojile čvrsta i tekuća faza uronjen je tester u otopinu do označe obilježene strelicama na testeru. Tester je u tekućini zadržan 20 sekundi kako bi otopina iz uzorka dospjela do testne i kontrolne linije. Nakon što je tester izvađen iz otopine ostavljen je na podlogu, kako bi došlo do razvijanja boje na testnoj (ukoliko je uzorak pozitivan na prisutnost GM kukuruza) i kontrolnoj liniji. Nakon 10 minuta očitani su rezultati na osnovu pojave linije/linija na predviđenom području na testeru.

**Tablica 4.** Pregled rezultata dobivenih primjenom imunokromatografskog testa za detekciju GM kukuruza u uzorcima  
**Table 4.** Overview of results obtained using the immunochromatographic test for the detection of GM corn in samples

R. br.	Vrsta uzorka	Testirana vrsta	Kontrolna linija	Testna linija	Validnost testa	Rezultat uzorka
1.	Kukuruzni obrok	Detekcija GM kukuruza	+	+	Test je validan	Pozitivan
2.	Smjesa za mafine	Detekcija GM kukuruza	+	-	Test je validan	Negativan
3.	Kukuruzne pahuljice	Detekcija GM kukuruza	+	+	Test je validan	Pozitivan
4.	Palenta	Detekcija GM kukuruza	+	-	Test je validan	Negativan
5.	Tortilja	Detekcija GM kukuruza	+	-	Test je validan	Negativan

Legenda: + Označava da je testna ili kontrolna linija vidljiva na testu; - Označava da testna ili kontrolna linija nije vidljiva na testu.

Na testnom području očitani su rezultati na osnovu pojave testnih i kontrolnih linija. Iz Tablice 4 je vidljivo da je na svim testiranim uzorcima izražena kontrolna linija koja potvrđuje da su analize uspješno provedene i nije ih potrebno ponavljati.

Od navedenih uzoraka/proizvoda napravljene su dvije smjese: Smjesa s uzrocima pod rednim brojem 1 i 4 i smjesa sa svim navedenim uzorcima. Na tri uzorka su vidljive obije linije koje označavaju da uzorak sadrži genetski modificirani kukuruz. Na dva proizvoda je

izostala linija na testnom području, što označava da je uzorak negativan na prisutnost genetski modificiranog kukuruza. Obje pripremljene smjese su bile pozitivne na GM kukuruz.



**Slika 5.** Vizuelno očitavanje rezultata prisutnosti GM sirovina u uzorku  
**Figure 5.** Visual interpretation of the results for the presence of GM materials in the sample

#### Postupak validacijske PCR metode za detekciju GM soje i kukuruza

Za provođenje PCR analize potrebno je izvršiti ekstrakciju i purifikaciju DNA iz uzorka, nakon toga kvantificirati DNA i odrediti količinu ekstrahirane DNA, zatim provesti amplifikaciju ekstrahirane DNA primjenom PCR termalnog ciklusa i očitavanje rezultata s elektroforezom.

#### Pribor i oprema za PCR analizu

Za provođenje PCR analiza potrebni su sljedeći pribor oprema:

1. Precizne mikro pipete s nastavcima,
2. Stalak za ependorf mikro epruvete,
3. Spectrophotometer PowerWave XS Microplate čitač za kvantifikaciju izolirane DNA,
4. Uredaj za PCR amplifikaciju BIORAD C1000 Termal Cycler,
5. Prajmeri,
6. Uredaj za elektroforezu *BIORAD Power Pac 300 i*
7. Uredaj za očitavanje rezultata s elektroforeze *BIORAD Gel doc 2000* s pripadajućim softverom za vizualizaciju rezultata.

#### Ekstrakcija i purifikacija DNA iz uzorka

Od pripremljenih uzoraka izvršena je ekstrakcija i purifikacija DNA prema sljedećem postupku:

1. Odvagano je 20 mg od svakog uzorka i preneseno u 1,5 ml eppendorf mikrocentrifugirajuću epruvetu. Nakon toga dodano je 180 µl ATL Buffer-a.
2. Dodano je 20 µl proteinaze K. Temeljito izmiješano uz upotrebu vrtložne miješalice

(vortex) i inkubirano na temperaturi od 56 °C da se tkivo kompletno rastvari. Period inkubacije trajao je 1 sat u termomikseru na brzini od 300 rpm.

3. Nakon perioda inkubacije sadržaj je izmiješan s vrtložnom miješalicom 15 sekundi.
4. Dodano 200 µl bufera AL u uzorak i promiješano s vrtložnom miješalicom.
5. Zatim je dodano 200 µl etanola (96 %) i ponovo izmiješano s vrtložnom miješalicom.
6. Iz ovako pripremljene otopine s uzorkom mješavina je pipetirana (zajedno s talogom) i prenesena u DNeasy Mini spin kolonu postavljenu u kolekcijsku tubu. Nakon toga centrifugirano je na brzini od 8000 u vremenu od jedne minute. Kolekcijska tuba zajedno sa permeatom je bačena.
7. U novu kolekcijski tubu od 2 ml dodano je 500 µl bufera AW1 i centrifugirano jednu minutu pri brzini od 8000 obrtaja. Ponovo je bačena kolekcijska tuba zajedno sa permeatom.
8. U novu kolekcijsku tubu od 2 ml dodano je 500 µl bufera AW2 i centrifugirano 3 minute pri brzini od 14000 obrtaja da se osuši na DNeasy membrani. Kolekcijska tuba sa permeatom je bačena.
9. DNeasy mini spin kolona je ubaćena u čistu 2 ml mikrocentrifugirajuću tubu i pipetirano 100 µl AE bufera direktno na DNeasy membranu. Zatim je inkubirano na sobnoj temperaturi jednu minutu, a nakon toga centrifugirano na 8000 obrtaja u trajanju od jedne minute.
10. Radi dobivanja maksimalnog prinosa DNA ponovljen je korak 9.

### Kvantifikacija ekstrahiranog DNA iz uzorka

Kvantifikacija DNA se radi s ciljem određivanja koncentracije DNA i njezine čistoće, kako bi se provela PCR analiza. Kvantifikacija je izvršena uz upotrebu uređaja BioTek Power Wave XS mikroplate spektrofotometra, a očitavanje rezultata uz upotrebu softvera *Gene 5<sup>TM</sup>*. Najmanja količina koja je potrebna za kvalitetno provođenje PCR analize je 15 µg/µl.

Na ploču za uzorke pipetira se 2 µl ranije ekstrahirane DNA i pažljivo se nanosi na predviđena mjesta na ploči za uzorke tako da nanesena količina ekstrahirane DNA bude u obliku male kapljice. Nakon toga ploča s nanesenim DNA uzrocima se pažljivo preklopi i ubaci u mikroplate spektrofotometar i rezultati očitaju uz primjenu softwera *Gen 5* na računalu. Nakon pokretanja softwera na monitoru su prikazane absorbance izražene u ng/ml.



**Slika 6.** BioTek Power Wave XS mikroplate spektrofotometar  
**Figure 6.** BioTek Power Wave XS Microplate Spectrophotometer

### Priprema master mixa

Nakon izolacije i kvantifikacije DNA iz uzorka, izvršena je priprema DNA za provođenje PCR analize. Prvi korak je priprema *master mix*-a. Za PCR analizu GM kukuruza pripremljena su četiri master mix-a s četiri različita prajmera:

- Prajmer za master mix 1: sttmf3a+sttmf2a,
- Prajmer za master mix 2: Ivr-F+Ivr-R,
- Prajmer za master mix 3: 35SFZMP1+35SFZMP2,
- Prajmer za master mix 4: nosFZMP1+nosFZMP2.

**Tablica 5.** Priprema master mix-a po koracima

**Table 5.** Step-by-step preparation of the master mix

Koraci	Naziv rastvora	Volumen x1	Volumen x10
Korak 1	10 x PCR – Buffer	2,5 µl	25 µl
Korak 2	dNTP	0,5 µl	5 µl
Korak 3	Prajmer LecMP1 (10 µm)	1,00 µl	10 µl
Korak 4	Prajmer LecMP2 (10 µm)	1,00 µl	10 µl
Korak 5	Enzim (Taq)*	0,15 µl	1,5 µl
Korak 6	Voda NFW (nuclease free water)	17,85 µl	178,5 µl

\*Prilikom dodavanja enzima neophodno je enzim dodati unutar otopine. Volumen koji je dobiven dodavanjem rastvora i prajmera iznosi 23 µl i 2 µl izolirane DNA.

Svi prajmeri koji su korišteni u istraživanju su od proizvođača Invitrogen otopljeni s *nuclease free water* (NFW) otopinom. Za potrebe PCR-a neophodna je količina prajmera od 25 µl. Na osnovu referenci i ranijih istraživanja odredi se količina koja će biti korištena u analizi te količina prajmera, dNTP rastvor

10xPCR bufera i enzima Taq pilimeraza. Nakon toga oduzme se od količine od 25 µl da bi se odredila količina NFW vode koju je potrebno dodati u master mix.

**Tablica 6.** Sekvence prajmera korištenih za PCR analizu  
**Table 6.** Primer sequences used for PCR analysis

Prajmer	Target	Orijentacija	Sekvenca	Length (bp)
sstmf3a	Cp4-espS	Forward	GCA AAT CCT CTG GCC TTT CC	145
sstmf2a		Reverse	CTT GCC CGT ATT GAT GAC GTC	
Ivr-F	Maize invertase gene	Forward	CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C	226
Ivr-R		Reverse	GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT	
35SFZMP1	P35S	Forward	CCG ACA GTG GTC CCA AAG ATG	158
35SFZMP2		Reverse	AGA GGA AGG GTC TTG CGA AGG	
nosFZMP1	NOS ter	Forward	GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG	125
nosFZMP2		Reverse	GCG GGA CTC TAA TCA TAA AAA CC	

Svi ovi rastvori se pomnože s brojem uzoraka koji se analiziraju te za po jedan uzorak za pozitivnu i negativnu probu i jedan dodatni uzorak.

Za pripremu master mix-a 1 korišteni su sljedeći rastvori i dodavani redom jedan za drugim prikazani u Tablici 5.

Nakon pripreme master mix otopine u mikrotubice dodaje se 23 µl i 2 µl ekstrahirane DNA od svakog uzorka u različite mikrotubice.  
 Neophodno je dobro označiti tubice kako bi kasnije mogli identificirati uzorke.

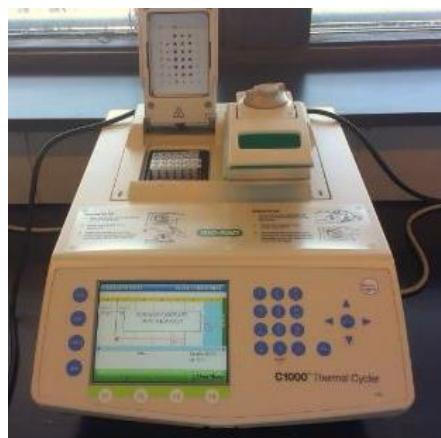


**Slika 3.** Priprema mastermixa dodavanjem različitih reagenasa  
**Figure 3.** Preparation of the master mix by adding various reagents

#### Umnožavanje DNA uz upotrebu PCR termalnog ciklusa

Nakon što je izvršeno kvantificiranje ukupne izolirane DNK, te pripremljenog master mixa pristupa se

amplifikaciji (umnožavanju) ciljanog segmenta pomoću PCR-a aparata BIO RAD C1000™ Termal cycler.



**Slika 4.** PCR Termalni ciklus korišten za umnožavanje DNA  
**Figure 4.** PCR Thermocycler used for DNA amplification

Trideset ciklusa amplifikacije (umnožavanja) DNA programirano je sa sljedećim vremenskim i temperaturnim parametrima:

- inicijalna denaturacija (engl. *Initial denaturation*) podešena je na 94 °C i vremenu 4 minute,
- standardna denaturacija na temperaturi pri 94 °C i vremenom od 30 sekundi,
- nalijeganje/učvršćivanje prajmera (eng. *Primer annealing*) na temperaturi 50 °C i vremenom 30 sekundi,
- produženje prajmera (eng. *Primer extension*) na temperaturi 72 °C i vremenom 30 sekundi. Posljednje produženje podešeno je 5 minuta duže.

#### *Metodologija elektroforeze za očitavanje PCR rezultata*

Za očitavanje i vizualizaciju rezultata nakon amplifikacije korištena je metoda Elektroforeze na agaroznom gelu. Prvenstveno pripremljen je agarozni gel u kojeg će se unijeti amplificirani DNA uzorci. Za pripremu agarognog gela potrebno je:

- TBE bufer (Tris/borat/EDTA)
- Agaroza
- Mikrovalna pećnica

#### *Postupak pripreme agarognog gela za elektroforezu*

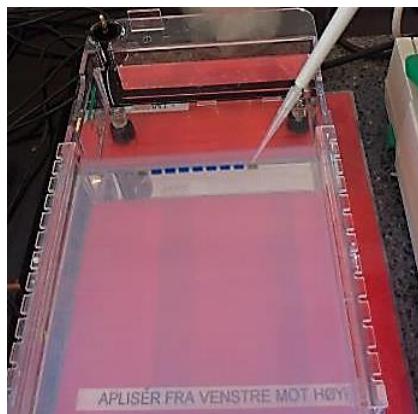
U erlenmajericu dodano je 0,5 % TBE bufera i 2 % agaroze odnosno 3 grama u 150 ml. Izvagano je 3 g agaroze u prahu i preneseno u erlenmajericu. Nakon toga dodano je 150 ml TBE bufera. Lagano je titrirano dok se agaroza nije otopila u TBE buferu. Erlenmajerica s pripremljenom otopinom ubaćena je u pećnicu i zagrijavana oko 40 sekundi. Nakon toga

erlenmajericu s otopinom je izvađena iz pećnice i ponovo titrirana da se dobro otopi agarosa. Ovaj postupak je ponavljan nekoliko puta s tim da se skraćuje vrijeme držanja erlenmajerice u mikrovalnoj pećnici. Potvrda da je agarosa dobro otopljena u buferu, ukoliko se ne vide komadići gela u erlenmajericu. Nakon što je otopljena agarosa u TBE buferu dodana je *gelred* boja u otopinu u iznosu 8 µl. Ovako pripremljena agarozna otopina prenese se u kalup kako bi došlo do stvarnjavanja odnosno stvaranja gela nakon što se ohladi. Nakon toga u još toplu agaroznu otopinu postavljeni s češljevi s 15 režnjeva pri vrhu kako bi se napravila udubljenja u koja će se stavljati uzorci DNA koji su amplificirani u PCR termalnom ciklusu. Nakon što je agarozna otopina očvrsnula u kalupu izvađena je i prenesena u kalup u kojoj će se raditi elektroforeza.

Zatim je ubaćen ranije pripremljeni stvrdnuti agarozni gel, izvađen češalj za elektroforezu iz gela, te u kalup dadan TBE bufer tako da prekrije agarozni gel.

U međuvremenu izvađene su mikrotubice iz PCR termalnog ciklusa i u svaku mikrotubicu dodano je 5 µl 5x DNA load bufera. Pažljivo svaki DNA uzorak izmiješan je u mikrotubicama prilikom dodavanja load bufera mikropipetom na način što je pažljivo uvlačen i ispuštan naizmjениčno sadržaj u mikrotubicama. Svaki put prilikom dodavanja bufera i miješanja sadržaja u mikrotubicama nastavak na pipetama je obavezno zamijenjen novim nastavkom da ne bi došlo do kontaminacije uzorka sa prethodnim.

Nakon što je dodan DNA load bufer u DNA uzorke u mikrotubicama uzorci su zatim prenijeti u kalup u udubljenja gdje su prethodno napravljena s češljem za elektroforezu u agaroznom gelu. Na krajnijim mjestima su dodani markeri. Uvijek su korišteni novi nastavci na mikro pipetama prilikom prenošenja DNA uzorka u agarozni gel da ne bi došlo do kontaminacije DNA uzorka sa prethodnim.



**Slika 5.** Dodavanje DNA amplificiranih uzoraka u agarozni gel  
**Figure 5.** Addition of DNA amplified samples to agarose gel

Nakon što su amplificirani DNA uzorci prenijeti u agarozni gel pokrenuta je metoda elektroforeze s podešenim parametrima od 45 minuta s jačinom napona od 100 V. Uzorci su u agarozni gel dodavani na prethodno napravljenim udubljenjima. Na slici 5 prikazano je dodavanje uzoraka, markera i jednog negativnog uzorka sa sadržajem destilirane vode u deset polja precizno s mikro pipetom. Markeri su dodani u krajnje desno i krajnje lijevo polje na gelu, negativni uzorak u predzadnjem dijelu levog polja, a uzorci koji se analiziraju između njih. Pozicije markera, uzoraka i negativne kontrole (destilirana

voda) mogu se vidjeti na PCR produktu nakon očitavanja rezultata na slikama 7, 8, 9 i 10.

#### Očitavanje rezultata PCR analize

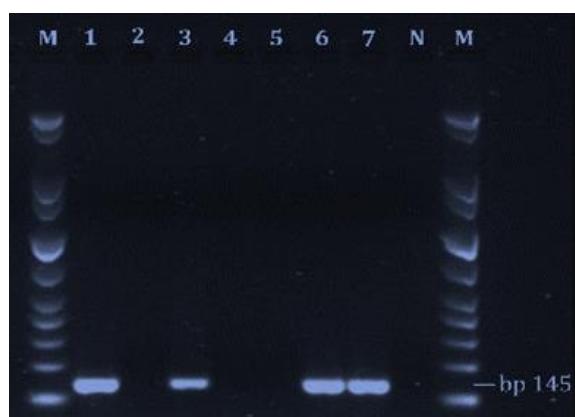
Završetkom procesa elektroforeze, agarozni gel s fragmentiranim uzorcima iz kalupa za elektroforezu je pažljivo prenijet u UV transiluminator (BIO RAD Gel Doc 2000) za vizualizaciju rezultata i očitavanje primjenom računala i softwera (Quantity One, version 4.4.0).



**Slika 6.** UV transiluminator – Uređaj za vizualizaciju i očitavanje rezultata s elektroforeze  
**Figure 6.** UV transilluminator – Device for visualizing and reading results from electrophoresis

Rezultati se očitavaju pojavom linija na trakama (engl. lanes) na određenom nivou koji se uspoređuje s

ljestvama (engl. Lader) koji se formira dodavanjem markera na početnoj i/ili krajnjoj strani agarognog gela.



**Slika 7.** PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: sttmf3a+sttmf2a;  
M - markeri; N – negativan uzorak (destilirana voda); 1 - kukuruzni obrok; 2 – kukuruzne pahuljice; 3 – smjesa za mafine;  
4 – palenta; 5 – tortilja; 6 – mješavina proizvoda 1 i 4; 7 – mješavina proizvoda 1, 2, 3, 4, 5

**Figure 7.** PCR detection of GM corn using primers: sttmf3a+sttmf2a; M – markers; N – negative sample (distilled water);  
1 – cornmeal; 2 – corn flakes; 3 – muffin mix; 4 – polenta; 5 – tortilla; 6 – mixture of products 1 and 4;  
7 – mixture of products 1, 2, 3, 4, 5

Par prajmera *sttmf3a* i *sttmyr2a*, usmjeren je prema transgenu cp4-epsps i pojačava amplificirani DNK fragment od 145 bp. Izvor gena je *Agrobacterium tumefaciens strain CP4*. Oblik 5-enolpiruvulshikimate-3-fosfat sintaza (EPSPS) tolerantan na herbicide. Na slici 7 pod oznakom 1 do 7 su analizirani uzorci ranije dodani u udubljena polja na agaroznom gelu. Na krajevima pod oznakom M su markeri, a pod oznakom N je negativan

uzorak u koji je dodana destilirana voda. Sa slike je vidljiva pojava svijetlog fragmenata, što označava da su uzorci pozitivni na prisutnost GM sirovina. Na označenim mjestima 2, 4, 5 nema svijetlog fragmenta, što označava da uzorci ne sadrže genetski modificirani kukuruz. To svakako potvrđuje i izostanak fragmenta na označenom mjestu N koji je negativna kontrola i koji sadrži samo destiliranu vodu.



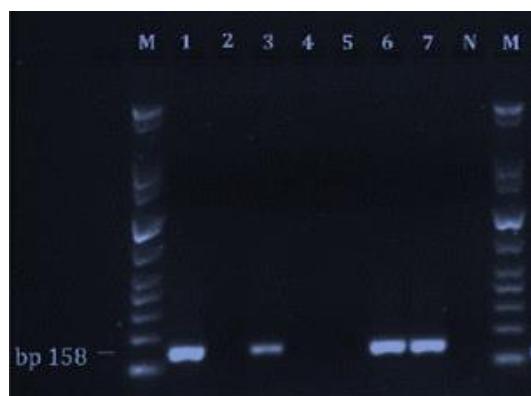
**Slika 8.** PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: *Ivr-F+Ivr-R*;

M - markeri; 1 - kukuruzni obrok; 2 - kukuruzne pahuljice; 3 - smjesa za mafine; 4 - palenta; 5 - tortilja; 6 - mješavina proizvoda 1 i 4; 7 - mješavina proizvoda 1,2,3,4,5; N - negativan uzorak (destilirana voda)

**Figure 8.** PCR detection of GM corn using primers: Ivr-F + Ivr-R; M – markers; 1 – corn meal; 2 – corn flakes; 3 – muffin mix; 4 – polenta; 5 – tortilla; 6 – mixture of products 1 and 4; 7 – mixture of products 1, 2, 3, 4, and 5; N – negative sample (distilled water)

Par prajmera, *Ivr-F* i *Ivr-R* (fragment od 226 bp), ciljaju na endogeni gen invertaze, korišten je za potvrdu prisutnosti DNK kukuruza u uzorcima koji se može pojačati. Očekivani fragment od 226 bp bio je prisutan u svim uzorcima kukuruza osim na uzorku 2 (kukuruzne

pahuljice) koji su testirani. Proizvod pod rednim brojem 2 ili ne sadrži kukuruz ili nije izolirana dovoljna količina DNA. Obzirom da je izostao fragment na označenom mjestu N koji sadrži destiliranu vodu može se tvrditi da je analiza uspješno provedena.



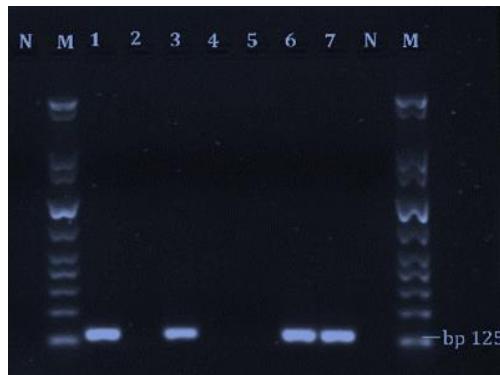
**Slika 9.** PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: 35SFZMP1+35SFZMP2;

M - markeri; 1 - kukuruzni obrok; 2 - kukuruzne pahuljice; 3 - smjesa za mafine; 4 - palenta; 5 - tortilja; 6 - mješavina proizvoda 1 i 4; 7 - mješavina proizvoda 1,2,3,4,5

**Figure 9.** PCR detection of GM corn using primers: 35SFZMP1+35SFZMP2; M - markers; 1 - cornmeal; 2 - corn flakes; 3 - muffin mix; 4 - polenta; 5 - tortilla; 6 - mixture of products 1 and 4; 7 - mixture of products 1, 2, 3, 4, 5

Par prajmera 35SFZMP1 i 35SFZMP2 cilja na 35S promotor i pojačava fragment od 158 bp. *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promotor (P35S) je često korištena meta za otkrivanje genetski modificiranih organizama (GMO). Na slici 9 očekivani fragment od 158 bp bio je prisutan u uzorcima 1, 3, 6 i 7, koji ustvari pokazuje da su uzorci na trakama 1, 3, 6 i 7 pozitivni na

prisutnost genetski modificiranog kukuruza. Na mjestima označenim s 2, 4, 5 su analizirani uzorci i izostanak svijetlog fragmenta označava da uzorci ne sadrže sirovine genetski modificiranog kukuruza. Također na označenom mjestu N izostao je pojačani fragment koji je negativna kontrola, a koji sadrži samo destiliranu vodu.



**Slika 10.** PCR detekcija GM kukuruza uz primjenu prajmera: nosFZMP1+nosFZMP2;

M – markeri; N – negativan uzorak (destilirana voda); 1 - kukuruzni obrok; 2 – kukuruzne pahuljice; 3 – smjesa za mafine; 4 – palenta; 5 – tortilja; 6 – mješavina proizvoda 1 i 4; 7 – mješavina proizvoda 1, 2, 3, 4, 5

**Figure 10.** PCR detection of GM corn using primers: nosFZMP1+nosFZMP2;

M – markers; N – negative sample (distilled water); 1 – cornmeal; 2 – corn flakes; 3 – muffin mix; 4 – polenta; 5 – tortilla; 6 – mixture of products 1 and 4; 7 – mixture of products 1, 2, 3, 4, 5. As with previous analyses using the PCR method.

#### Rezultati analize ILF testa za detekciju GM kukuruza

Hrana za perad najčešće dijelom sadrži sojinu sačmu i kukuruz. To su žitarice koje su najčešće genetski modificirane od svih biljaka u svijetu (Trkulja i sur., 2018). Genetski modificirana soja i kukuruz sadrže CP4 EPSPS gen umetnut da bi se postigla tolerantnost prema herbicidima na bazi glifosata (Trkulja i sur., 2018). Proizvod ili uzorak koji sadrži CP4 EPSPS označava da je genetski modificiran. Postoji i niz drugih vrsta genetskih modifikacija soje i kukuruza.

Za detekciju GM kukuruza analizirano je 5 uzoraka i provedeno 23 analize s brzim imunokromatografskim lateral flow testom.

Svi imunokromatografski testeri koji su korišteni za analizu pokazali su kontrolnu liniju koja potvrđuje da je analiza provedena uspješno. Uzorci 1, 2, 3, 4, 5 i 7 su rađeni po 3 puta s ILF metodom dok je uzorak pod rednim brojem 7 rađen 5 puta. Svi uzorci su rađeni 4 puta s PCR metodom s različitim prajmerima. U svakom ponovljenom testiranju uzorci s prisutnosti GM- kukuruza su pokazali pozitivan rezultat na prisutnost GM. Uzorci s odsustvom GM kukuruza u svakom ponovljenom testu su pokazali negativne rezultate.

**Tablica 7.** Usporedba analiziranih uzoraka testiranih imunokromatskim lateral flow testom (ILFT) i PCR metodom  
**Table 7.** Comparison of analyzed samples tested by immunochromatographic lateral flow test (ILFT) and PCR method

R.br.	Testirani uzorci	Rezultati			
		ILFT		PCR	
		Broj provedenih analiza	Rezultati Analize	Broj provedenih analiza	Rezultati Analize
1.	Kukuruzni obrok	3	(+)	4	(+)
2.	Smjesa za mafine	3	(-)	4	(-)
3.	Kukuruzne pahuljice	3	(+)	4	(+)
4.	Palenta	3	(-)	4	(-)
5.	Tortilja	3	(-)	4	(-)
6.	Smjesa proizvoda pod R. br. 1 i 4	5	(+)	4	(+)
7.	Smjesa proizvoda svih proizvoda	3	(+)	4	(+)
Ukupno		14+ i 9-			
Ukupan broj analiziranih uzoraka po metodama		<b>23</b>		<b>28</b>	

Od ukupno 7 uzoraka provedeno je 23 uzastopna ponavljanja od čega je 14 testova je bilo pozitivno na prisutnost GM kukuruza, a 9 negativno.

*Točnost ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza*

Rezultati analize primjenom ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza u uzorcima potvrđeni su PCR metodom.

**Tablica 8.** Prikaz istinski pozitivnih i negativnih, lažno pozitivnih i negativnih rezultata  
**Table 8.** Overview of true positive and negative, and false positive and negative results

		Uzorci sa sadržajem genetski modificiranog kukuruza	
		Pozitivno	Negativno
Rezultati testa	Pozitivno	Istinski pozitivni IP = 14	Lažno pozitivni LP = 0
	Negativno	Lažno negativan LN = 0	Istinski negativan IN = 9

#### *Osjetljivost ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza*

Rezultati pokazuju da je 14 analiza istinski pozitivno, a niti jedna lažno negativna. Uvrštavanjem rezultata u relaciju za određivanje osjetljivosti dobit će se:

$$\text{Osjetljivost} = \frac{IP}{(IP + LN)} = \frac{14}{(14 + 0)} \cdot 100 = 100 \%$$

Sve analize su pokazale pozitivan rezultat na prisutnost GM kukuruza. Ovi rezultati su potvrđeni s validacijskom PCR metodom.

Na osnovu provedenih analiza i rezultata može se utvrditi da je imunokromatografski test veoma osjetljiv obzirom da je osjetljivost iznad granice *cut off* vrijednosti 100 %.

#### *Specifičnost ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza*

Analiza uzoraka s imunokromatografskim testom su pokazali da nije bilo lažno negativnih analiza i nije bilo niti jedne analize s lažno pozitivnim rezultatom.

$$\text{Specifičnost} = \frac{IN}{(IN + LP)} = \frac{12}{(12 + 0)} \cdot 100 = 100 \%$$

Uvrštavanjem rezultata u formulu za određivanje specifičnosti i proračunom može se utvrditi da je metoda/test sposoban da otkrije zaista negativne uzorce kao negativne.

*Određivanje lažno pozitivne stope imunkromatografskog testa za detekciju GM kukuruza*

Uvrštavanjem rezultata analiza u relaciju za određivanje stope lažno pozitivnih rezultata dobit će se lažno pozitivna stopa imunkromatografskog testa za detekciju genetski modificirane soje u uzorku.

$$\text{Lažno poz. stopa} = \frac{LP}{(IP + LP)} = \frac{0}{(14 + 0)} \cdot 100 = 0 \%$$

*Određivanje lažno negativne stope ILF brzog testa za detekciju genetski modificiranog kukuruza*

Rezultati analize su pokazali da nije bilo uzoraka koji su pokazali lažno negativne rezultate, a 14 analiza su pokazale istinski pozitivne rezultate. Uvrštavanje rezultata u relaciju za određivanje stope lažno negativnih rezultata dobit će se lažno negativna stopa imunokromatografskog testa za detekciju GM kukuruza u uzorku.

$$\text{Lažno neg. stopa} = \frac{LN}{(IP + LN)} = \frac{0}{(14 + 0)} \cdot 100 = 0 \%$$

Obzirom da je lažno pozitivna stopa 0 %, odnosno da je:  $\beta < 5 \%$ , može se utvrditi da ovaj test ne prikazuje lažno negativne rezultate za detekciju CP4 ESPS proteina koji označava proizvod i ne sadrži genetske modifikacije.

## Zaključak

Za detekciju genetski modificiranog kukuruza na 7 uzoraka rađena su 23 analize od kojih je 14 bilo istinski pozitivno, a 9 istinski negativno.

Rezultati analiza za detekciju genetski modificiranog kukuruza dobiveni primjenom ILF testa potvrđeni su PCR metodom.

Tijekom analize GM kukuruza nisu utvrđeni lažno negativni i lažno pozitivni rezultati. Osjetljivost i specifičnost brzog ILF testa za detekciju sadržaja GM kukuruza iznosi 100 %.

Analizom i proračunom utvrđena je: lažno pozitivna stopa brzog ILF testa koja iznosi 0 %, pogreška  $\alpha < 5 \%$ , i lažno negativna stopa od 0 %, pogreška  $\beta < 5 \%$ .

Ovaj test ne prikazuje lažno pozitivne i lažno negativne rezultate za detekciju GM kukuruza. Rezultati validacije pokazuju da je ILF test točan i pouzdan za detekciju genetski modificiranog kukuruza.

U praksi se često pojavljuje potreba za brzom detekcijom GM sirovina soje i kukuruza, posebno prilikom prijema i otkupa od farmera koja se može provesti primjenom ovih ILF testova.

Na osnovu deklaracije proizvođača brzi ILF test može detektirati GM soju i GM kukuruz i obzirom da pokazuje kvalitativne rezultate ne može se odrediti da li uzorak sadrži GM soju ili GM kukuruz.

## Literatura

- Asensio, L., González, I., García, T., Martin, R. (2008): Determination of food authenticity by enzyme-linked imunosorbent assay (ELISA), *Food Control* 19, 1–8.
- Ballian, D. (2009): Bioetika i genetičko zagađenje šuma. Inegrativna bioetika i interkulturnalnost. Zbornik radova: 285–296. Bioetičko društvo u BiH, Sarajevo.
- Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V. (2013): Analitičke metode u forenzici hrane, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 8 (3-4), 90-101.
- DNeasy Blood & Tissue Handbook, July 2006.
- European Commission, Commission Recommendation on COVID-19 Testing strategies, including the use of rapid antigen tests C(2020) 7502 final (2020); Official Journal of the European Union L 360/43.
- Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W.H. (2002): AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis; AOAC Int. 85 1187.
- Grothaus, G. D., Bandla, M., Currier, T., Giroux, R., Jenkins, G. R., Lipp, M., Shan, G., Stave, J. W., Pantella, V. (2006): Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology, *Journal of AOAC International* 89 (4).

- Gvozdanović, K., Margeta, P., Margeta, V. (2017): Application of analytical methods for food authentication, *Stočarstvo* 71 (1), 29-38.
- Holst-Jensen, A. (2009): Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives, *Biotechnology Advances* 27, 1071–1082.
- Jašić, M., Bašić, M., Sakić, A., Čengić, F. (2007): Halal status aditiva u mlijeku i mlijecnim proizvodima, *Mjekarstvo* 57 (2), 153-159.
- Lai, W., Fung, Y.C D., Xu, Y., Liu, R., Xiong, Y. (2009): Development of a colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A with mimotope peptide, *Food Control* 20, 791–795.
- Lazarić, K. (2012): Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri* 1, 61-64.
- Lefkovits, I., Pernis, B. (2014): Immunological methods (Vol. 3) Elsevier.
- Nielsen, S.S. (2010): Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. In Food Analysis Laboratory Manual (pp. 47-53). Springer US.
- O'Rangers, J.J., Condon, R.J., in: Kay, J.F., MacNeil, J.D., O'Rangers, J.J.(Editors) (2000): Current Issues in Regulatory Chemistry, AOAC Int., Gaithersburg, Maryland, USA.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata; Službeni glasnik BiH br. 95/10.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata; Službeni glasnik BiH br. 95/10.
- Tanaka, R., Yuhi, T., Nagatani, N., Endo, T., Kerman, K., Takamura, Y., Tamiya, E. (2006): A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles, *Anal Bioanal Chem* 385, 1414–1420.
- Trkulja, V., Ballian, D., Vidović, S., Terzić, R., Ostojić, I., Čaklovica, F., Džubur, A., Hajrić, Dž., Perković, G., Brenjo, D., Čolaković, A. (2018): Genetski modificirani organizmi, stanje i perspektive, Agencija za sigurnost hrane BiH.
- Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, X.F. (2004): Validation of qualitative analytical methods, *Trends in analytical chemistry* 23 (2).
- Uputstvo za upotrebu; CP4 (Roundup Ready®) Strip Test; Neogen Corporation.
- Veladžić, M., Čaklovica, F. (2001): Instrumentalne metode u biološkoj analizi, Naučna i univerzitetska knjiga, IK «Ljiljan», Sarajevo.
- Zakon o genetski modificiranim organizmima „Službeni glasnik BiH”, broj 23/09.

# EFFECTIVENESS OF THE RAPID STRIP TESTS IN THE ANALYSIS OF THE GENETICALLY MODIFIED CORN'S PRESENCE IN FOOD PRODUCTS

**Damir Alihodžić<sup>1</sup>, Midhat Jašić<sup>2</sup>, Benjamin Muhamedbegović<sup>2</sup>,  
Drago Šubarić<sup>3</sup>, Amel Selimović<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Agency for Halal Quality Certification, Turalibegova 73, 75000, Tuzla, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup>Faculty of Technology, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

<sup>3</sup>Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

*original scientific paper*

## Summary

Food derived from genetically modified organisms is increasingly present in the diet of the world population. Genetic modification of soy and corn is especially frequent, resulting in products originating from these raw materials found in the market. Rapid and conventional methods may be used for monitoring and controlling the presence of genetically modified corn. The aim of this study was to compare the use of rapid methods with conventional methods when analyzing ingredients derived from genetically modified corn.

In this study the presence of genetically modified corn has been analyzed in five products: polenta, muffin mixture and corn flakes from the USA, polenta from Norway and tortillas from Sweden. Conventional procedure based on polymerase chain reaction (PCR) and rapid method immunochromatography strip tests for CP4 ESPS protein detection were used to detect the ingredients originating from genetically modified corn. Sample preparation was done through homogenization and dissolved in polypropylene tube with distilled water in ratio 1:4. The results were read at nitrocellulose part of the strip test. For PCR method, the isolation of the DNA with application DNEasy Tissue Kit was done from prepared sample, followed by quantification of the isolated DNA with BioTek Powerwave HT Microplate spectrometer and application of Gen5 Data Analysis software. The PCR results were read with the application of electrophoresis with 1.5% of agar gel.

Both the rapid method and the conventional method showed similar results for all samples analysed. Polenta and muffin mixture originating from the USA contained genetically modified corn, whereas the products from the Nordic countries showed non-detectable levels.

Imunnochromatography strip tests are equally reliable as the PCR method in detection of genetically modified corn in food products. The rapid methods are several times cheaper, applicable outside the laboratory conditions and the analysis results are ready in 10-15 minutes.

**Keywords:** genetically modified corn, imunnochromatography strip test, PCR

## DIETARY EDIBLE FLAVONOID KAEMPFEROL INDUCES APOPTOSIS AND INHIBITS CELL MIGRATION IN PROSTATE CANCER CELLS

Serdar Karakurt<sup>1\*</sup>, Hatice Gul Batur<sup>1</sup>, Irem Mukaddes Bilgiseven<sup>1</sup>, Sevtap Karakurt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Selcuk University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Konya, Turkey

<sup>2</sup>Selcuk University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Konya, Turkey

original scientific paper

### Summary

Metastatic prostate cancer is the second most common cancer globally, with high mortality and morbidity rates. This study aimed to elucidate the effects of plant-derived kaempferol on the proliferation and migration of human prostate cancer cells at the molecular level. Spectrophotometric analyses proved that kaempferol was stable up to 48 h. Antioxidant properties were investigated by DPPH, CUPRAC, and ABTS methods, and kaempferol possess 3.6 mg/mL DPPH activity. Cytotoxic properties of kaempferol were investigated on various human cancerous cells, including A549(Lung), PC-3(Prostate), NCI-H295R(Adrenal Gland), HUH-7(Liver), HeLa(Cervix) using the Alamar Blue method. Western Blotting and qRT-PCR was employed to analyze Bax, BcL-2, Caspase-3, Caspase-9, Caspase-12, p53, NF-κB, Smad-4, Kras, APC, MLH-1 expressions. Kaempferol was found the most potent inhibitor against the proliferation of PC-3 cells with an IC<sub>50</sub> value of 16.9 μM. Confocal microscopy studies proved that kaempferol was primarily localized in the cytoplasm. Besides, PC-3 cells' migration and colony formation rates significantly ( $p<0.0001$ ) inhibited 46% and 68%, respectively. Increased protein expressions of TP53 and NF-κB due to kaempferol activated the E-cadherin, key protein in the migration process. Kaempferol treatment elevated the early rate of apoptosis by regulating apoptotic and antiapoptotic genes and proteins, including Bax, BcL-2, Caspase-3, Caspase-9, Caspase-12. Protein expression of Bax was increased 2.63-fold ( $p<0.001$ ), while BcL-2 protein expression was decreased 87% ( $p<0.05$ ). Besides, kaempferol modulated PI3K-Akt, TGFβ, and MAPK signaling pathways. mRNA expressions of Smad-4 and Kras were inhibited while APC and MLH-1 mRNA expressions were increased. The low cost and high efficiency of kaempferol used in treating fatal and increased incidence of prostate cancer can reduce and treat prostate cancer by showing a new direction to traditional treatments.

**Keywords:** kaempferol, prostate cancer, cell migration, apoptosis, cytotoxicity

### Introduction

Increased mortality and morbidity rates have made cancer one of the most critical problems worldwide. In 2020, there were an estimated 19.3 million new cancer cases and 10 million cancer-related deaths worldwide (Sung et al., 2021). Prostate cancer is the second most frequently diagnosed noncutaneous cancer among men and the fifth leading cause of cancer deaths, with 1.4 million new cases and 375.000 deaths in 2020 (Carioli et al., 2020). The prostate's malignant transformation follows a multistep process. First, it initiates as prostatic intraepithelial neoplasia followed by localized prostate cancerous cells. Advanced prostate adenocarcinoma starting with local invasion results in metastatic prostate cancer (Jin et al., 2011). The metastatic stage of the prostate is the leading cause of prostate cancer-associated deaths. Even after intensive treatment processes, the chance of success in metastatic prostate cancer is almost negligible (Sumanasuriya & De Bono, 2018). Therefore, clarification of the molecular mechanism of the metastatic process possesses crucial importance in increasing patients' survival rates. P53, tumor suppressor protein, plays a critical role in the regulation of the prostate cancer signaling pathway.

Mutation of p53 has been associated with metastatic prostate cancer. Abnormal expression of p53 affects malignant proliferation, metastasis, and differentiation of prostate cancer cells (Meek, 2015; Wan et al., 2018). Hence, alteration of p53 activity is one of the strategies against the proliferation of prostate cancer. Not only p53 but also other genes such as Smad-4, NF-κB, KRAS, APC, MLH-1 were also prognostic factors for metastatic prostate cancer (Ding et al., 2011). NF-κB expression plays a critical role in prostate cancer progression to castrate-resistant and metastatic cancer (Jin et al., 2008).

Many attempts have been developed against prostate cancer; chemotherapy, radiotherapy, or surgery. However, these treatments' effectiveness and severe side effects decrease patients' welfare and increase the mortality rates and leads to the investigation of alternative new drug candidates against prostate cancer. Photosynthetic plants synthesize secondary metabolites to protect them against bacteria, fungi, and insects. Flavonoids, one of the primary-secondary metabolites, are highly preferred in various pharmaceutical and medical applications due to their active side groups (Batra & Sharma, 2013; Panche et al., 2016; Tapas et al., 2008). The yellow color dietary

\*Corresponding author: kserdar1@yahoo.com

flavonoid, kaempferol (3, 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone) found in various plant parts such as seeds and leaves, fruits, flowers, and vegetables (Rajendran et al., 2014). Kaempferol's antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, neuroprotective, and anti-cancer properties have been demonstrated (Chen & Chen, 2013; Wang et al., 2018). Direct or indirect interference of kaempferol to multiple signaling pathways triggers the cells to apoptosis and inhibits cell proliferation and migration (Ravishankar et al., 2013). Unlike traditional chemotherapeutic drugs used in cancer treatment, kaempferol showed fewer side effects with combinations with different medicines (Chen et al., 2013; Kim & Choi, 2013). Kaempferol targets cell proliferation, tumor growth, apoptosis, and metastasis in most cancer types (Avtanski & Poretsky, 2018; Boam, 2015; Srinivas, 2015). Kaempferol was shown to inactivate Akt signaling pathway and stimulates caspase-dependent apoptosis in human leukemia cells and oral cavity cancer cells (Kang et al., 2010; Marfe et al., 2009). Besides, it inhibits the proliferation and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian cancer cells (Luo et al., 2009). Furthermore, it has been found that kaempferol suppresses epithelial-mesenchymal transition and cell migration in lung cancer cells (Han et al., 2018). Also, Kang et al. (2009) proved that kaempferol could cause apoptosis in MCF-7 (breast cancer cells) by activating the intrinsic apoptotic signaling pathway and down-regulating the PLK1 expression. Besides, it has been found that kaempferol induces apoptosis via the CHOP pathway by causing ER stress in HepG2 cells (Guo et al., 2016). Multiple effects of kaempferol lead us to investigate its potential role against human prostate cancer. This study aims to elucidate the effects of kaempferol on cell death, proliferation, and migration of prostate cancer cells at the molecular level.

## Methods

### Materials

Kaempferol was purchased from Cayman Chemical (USA) and dissolved in DMSO. The growth mediums (DMEM, RPMI-1640, DMEM F12, F12K, EMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), L-Glutamine, and Penicillin-Streptomycin were obtained from Biological Industries-BI (USA). QIAzol Lysis Reagent was purchased from QIAGEN (USA). Real-time PCR SYBR Green Master Mix, cDNA Synthesis Kit, ECL Western Blotting Substrates, and Immunoblot PVDF membranes were obtained from Bio-Rad (USA). The primary antibodies; GAPDH (60004-1-Ig), Bax (50599-2-Ig), P53 (60283-2-Ig), and MLH-1

(11697-1-AP) antibodies were purchased from ProteinTech (USA) and Bcl-2 (ab182858), NF- $\kappa$ B (ab16502) and Smad-4 (ab40759) antibodies were purchased from Abcam (USA).

### *Analysis of the Kaempferol*

#### *Stability of the Kaempferol*

A double beam UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan) was used to determine the stability of kaempferol between 0-48 h. 10 mM of kaempferol was prepared in acetate buffer, and UV spectrum was taken between 200-800 nm.

#### *Antioxidant Activity of the Kaempferol*

##### *DPPH Free Radical Scavenging Assay*

The free radical scavenging activity of kaempferol was determined by the DPPH Free Radical Scavenging assay, in which methanol was used as a control (Blois, 1958). The reaction mixture contains 0.4 M of DPPH and various concentrations of methanol diluted kaempferol. The color change was measured spectrophotometrically at 517 nm (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, USA). DPPH Free Radical Scavenging Assay activity was calculated by GraphPad Prism 8.0.2 as described by Deveci et al. (2019).

##### *ABTS<sup>+</sup> Cation Radical Scavenging Assay*

The cation radical scavenging activity of kaempferol was determined by the ABTS<sup>+</sup> Cation Radical Scavenging assay in which methanol was used as a control (Re et al., 1999). The reaction of 7 mM ABTS<sup>+</sup> and 2.45 mM potassium persulfate was incubated for 12 h at room temperature in a dark environment. The ABTS<sup>+</sup> solution was then added to the kaempferol solution in methanol at different concentrations. After a 10 min incubation, absorbance at 734 nm was measured using a Multiskan Go microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA). ABTS<sup>+</sup> Cation Radical Scavenging assay activity was calculated by GraphPad Prism 8.0.2.

##### *Cupric-Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Assay*

The cupric reducing antioxidant capacity of kaempferol was determined by the Cupric Reducing Antioxidant Capacity assay (Apak et al., 2004). The reaction mixture contains 10 mM Cu (II), 7.5 mM neocuproin, 1 M NH<sub>4</sub>Ac buffer, and different concentrations of kaempferol, and the mixture were added to each well of

a 96-well plate. After 1 h incubation, the absorbance at 450 nm was measured using a Multiskan Go microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA). Results were given as  $A_{0.50}$  that corresponds to the concentration providing 0.500 absorbance. The Cupric Reducing Antioxidant Capacity assay activity was calculated by GraphPad Prism 8.0.2.

#### *In Vitro Cytotoxicity Studies*

##### *Cell Lines and Culture*

PC-3 (Human prostate cancer), A549 (Human lung cancer), HUH-7 (Human hepatocarcinoma), NCI-H295R (Human adrenal gland carcinoma), and HeLa (Human cervical cancer) cells were obtained from the ATCC (American Type Culture Collection), and PNT1A (Human healthy epithelia) cells were obtained from Sigma Aldrich. PC-3, HUH-7, A549, NCI-H295R, HeLa, and PNT1A cells were cultured in a DMEM, F12K, DMEM F12, EMEM, and RPMI-1640 medium, respectively, and these media were supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM L-Glutamine, and 1% with Penicillin-Streptomycin. The cell cultures were maintained in the incubator (BINDER, USA) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

##### *Determination of Cell Viability*

The cell viability was determined using an Alamar Blue method (Karakurt, 2016). Briefly, cells were seeded at 10<sup>4</sup> cells/well in flat-bottom 96-well plates and allowed to grow for 24 h and then treated with kaempferol (0, 10, 25, 50, 100, 150, 200, and 250 µM) for 48 h. After the incubation, the media were removed, and the cells were washed with PBS and incubated with Alamar Blue (10%) for 3 h. The absorption was measured at 570 nm and 600 nm in an ELISA plate reader (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, USA). The values of the half-maximum inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) were calculated from the sigmoidal plot of the cell viability.

##### *Flow Cytometric Analyses*

The effects of kaempferol on the cells' apoptosis were evaluated by flow cytometry using the PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD, Biosciences, USA). Cells in 6-well plates were treated with an  $IC_{50}$  value of the kaempferol for 37 °C for 48 h. The harvested cells were then rinsed with PBS and then incubated with Annexin V-APC and 7-AAD in a binding buffer for 20 min. The stained cells were analyzed using a NovoCyte Flow Cytometer System (Acea, North America).

##### *Bio-imaging Studies*

To determine the localization of PC-3 cells, the cells were plated at 75x10<sup>3</sup> cells/well in the glass-bottom 8-well chamber (Ibidi, Munchen, Germany) and incubated at 37 °C for 24 h. Then the media was removed, and cells were washed with 10 mM of PBS. The cells were treated with an  $IC_{50}$  value of the kaempferol and incubated at 37 °C for 30 min. Following the incubation, the kaempferol was removed, and the cells were washed with 10 mM of PBS. The fluorescence intensity were monitored with a confocal microscope (Nikon, USA).

##### *Wound Healing Assay*

*In vitro* wound-healing assay was performed to detect the migration of kaempferol on PC-3 cells. PC-3 cells were seeded into 24-well plates and treated with an  $IC_{50}$  value of the kaempferol at 37 °C for 48 h. Then the media was removed, and cells were washed with 10 mM of PBS. Alive cells were trypsinized, and 5x10<sup>5</sup> of these cells were seeded on both sides of the inserts (Ibidi, Munchen, Germany) that could form a 0.9 mm thick space and photographed. The cells were incubated for 24 h at 37 °C to form a confluent and homogeneous layer and rephotographed. The number of cells migrated to the wound was analyzed by Image J software.

##### *Cell Colony-Forming Assay*

A soft agar colony-forming assay was performed to evaluate the colony formation and growth abilities of kaempferol on PC-3 cells. A single-cell suspension (3x10<sup>4</sup> cells/well) was seeded into 24-well plates and incubated at 37 °C for 48 h at the  $IC_{50}$  value of the kaempferol. Base Agar (1%) was mixed with DMEM and added to 6-well plates as the base layer. Then 0.7% top agar was mixed with the cell suspension, and the mixture was added on top of the base agar. Finally, the cell growth medium was added and incubated at 37 °C and 5%CO<sub>2</sub> for 15 days. After incubation, cells were stained with 0.01% (w/v) crystal violet, and colony numbers were calculated with Image J software.

##### *Western Blot Analyses*

To determine the effects of kaempferol on protein expressions, western blot analyses were performed. Total Protein was extracted using RIPA lysis buffer (Danvers, Massachusetts) supplemented 1 mM PMSF, and protein concentration was determined by the BCA method (Karakurt et al., 2016). 15 µg protein lysed were loaded on 7.5–12% SDS/PAGE gel and then transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF)

membranes (Bio-Rad, USA). After transblotting, the membrane was blocked in 5% non-fat dry milk at room temperature (RT) for 1 h, and the blots were probed with primary antibodies with dilutions of 1:1000 overnight at 4 °C (Bax (21 kDa, 1/1000 dilution), Bcl-2 (26 kDa, 1/1000 dilution), Nf-κB (60 kDa, 1/1000 dilution), p53 (53 kDa, 1/1000 dilution), Smad-4 (59 kDa, 1/1000 dilution), MLH-1 (85 kDa, 1/1000 dilution)). After washing with TBS-T, the membrane was incubated with secondary antibody (1/5000 dilution) at RT for 1 h and finally with ECL solution (Bio-Rad, USA). Immunoblot analysis was visualized using Syngene chemiluminescent gel documentation systems (Syngene, United Kingdom).

#### *Quantitative Real-Time PCR Analyses*

To determine the effects of kaempferol on mRNA expressions of the cells, qRT-PCR studies were

performed. Total RNA was isolated by the Trizol method (Rio et al., 2010). The concentration and purity of RNA were measured with the Nanodrop (NanoDrop™ 2000 / Thermo Scientific). Then, cDNA was synthesized using 1 ng of RNA (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad). qRT-PCR analyses were performed using the SYBR Green PCR Master Mix Kit (iTaq™ Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Thermal cycling condition was programmed as: an initial denaturation step for 5 min at 95 °C followed by 40 cycles including a denaturation step for 10 sec at 95 °C and annealing step for 30 sec (Gao et al., 2020). The primers used in qRT-PCR were designed using Primer 3 software (Table 1), and gene specificity was checked by NCBI blast. Each sample was analyzed in duplicate, and GAPDH was used as the normalizer. Fold changes in gene expression were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001).

**Table 1.** Primary sequences of the genes involved in the apoptosis pathway

Gene Name	NCBI Code	Forward Primer (F) Reverse Primer (R)	Tm Value (°C)	Product Size (bp)
Bax	NM_001291430.2	F: CAGCTTTAATGCCGTC R: CTCAGCCCATCTTCCAG	59 °C	245
Smad-4	NM_005359.6	F: GCAGATGCTGGATAGGAAG R: GTTGGTAGCCTCCGTTCA	60 °C	150
TP53	NM_001276696.2	F: TTGATGTTCTCAACGATTGGR: ACCGTTCTCCTTCTCGAT	60 °C	158
Bcl-2	NM_000657.3	F: GCTCTTGAGATCTCCGGTTG R: AATGCATAAGCAACGATCC	58 °C	186
Nf-κB	NM_006509.4	F: ACATCAAGGAGAACGGCTTC R: CTCCGTGATGACCAGGTG	57 °C	215
Caspase-3	NM_004346.3	F: TGTTTGTGTGCTTCTGAGCC R: CACGCCATGTCATCATCAC	60 °C	136
Caspase-9	NM_001278054.2	F: CTCACCCCTGCCTTATCTTGC R: TGCGTCAATCTGAAAGCTG	58 °C	162
Caspase-12	NM_001191016.2	F: ATGGCTGGAAATGAAACAG R: TGGCAGTTACGGTTGTGAA	57 °C	192
Kras	NM_001369786.1	F: TCGAGAAATTGAAACATAAAGA R: GTCTGCATGGAGCAGAAA	60 °C	201
APC	NM_001127510.3	F: CTGAGGCACTGCAGAAAGTG R: CCGCATCTCGGTAAAGCATAG	60 °C	158
MLH-1	NM_000249.4	F: GCGAATCGCTTCAGTCTTG R: AATCATTCCCTTGGTAAACG	60 °C	157
GAPDH	NM_001357943.2	F: GTCAGTGGTGGACCTGACCT R: TGCTGTAGCCAATTCTGG	60 °C	82

#### *Statistical Analyses*

Data are presented as mean value ± standard deviation (SD). Differences between groups were assessed using one-way ANOVA and Student's t-test. Statistical significance was expressed as \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$  and \*\*\*  $p < 0.0001$ . All calculations, graphs, and

statistical analyses were constituted using GraphPad Prism (GraphPad Software 8.0.2).

#### **Results**

The antioxidant activities of kaempferol were tested using DPPH radical scavenging, ABTS cation radical scavenging, and cupric-reducing antioxidant capacity

(CUPRAC) assay systems, and ascorbic acid is used as a standard. The radical scavenging activities of kaempferol were evaluated by DPPH and ABTS. As shown in Table 2, the IC<sub>50</sub> values of DPPH and ABTS

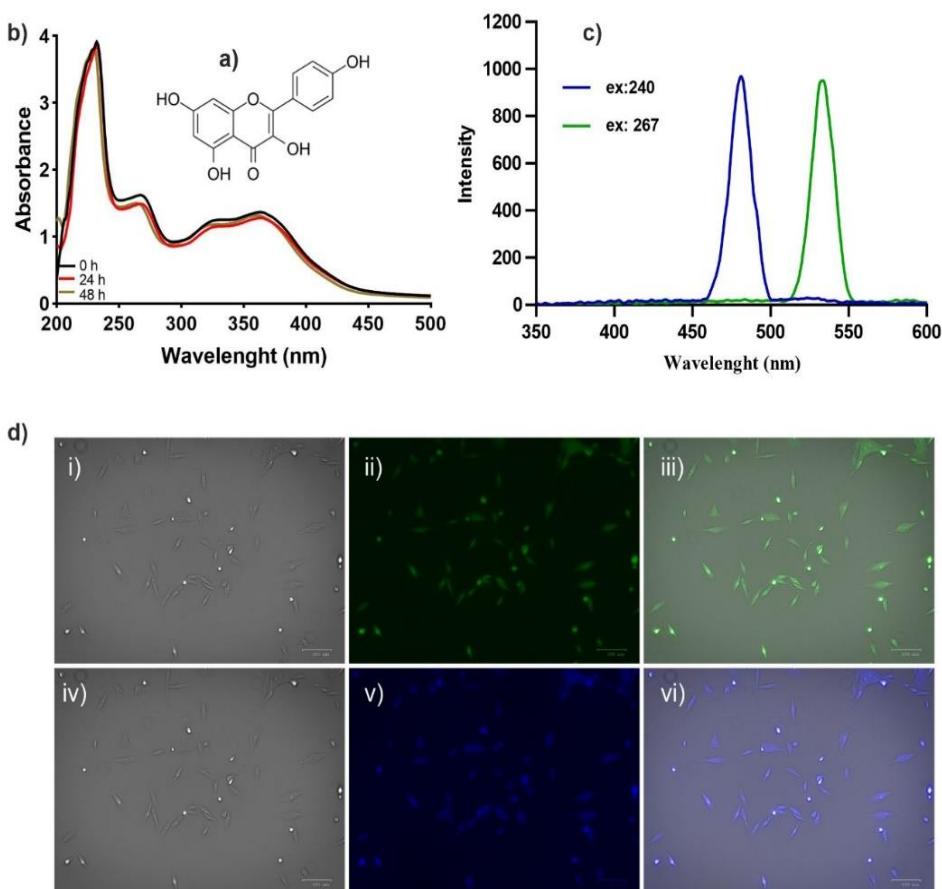
were calculated 3.66 µg/mL and 3.31 µg/mL, respectively. Besides, it was found that kaempferol possesses significant reducing power potency given in Table 2 ( $A_{0.50}=4.84 \mu\text{g/ml}$ ).

**Table 2.** Antioxidant activities of the Kaempferol by DPPH, ABTS, and CUPRAC assays

	DPPH assay	ABTS assay	CUPRAC assay
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	A <sub>0.50</sub> (µg/ml)
<b>Kaempferol</b>	3.66	3.31	4.84
<b>Ascorbic Acid</b>	-	-	20.67±0.01

Kaempferol was found to have the maximum absorption peak at 226 nm (Figure 1b).

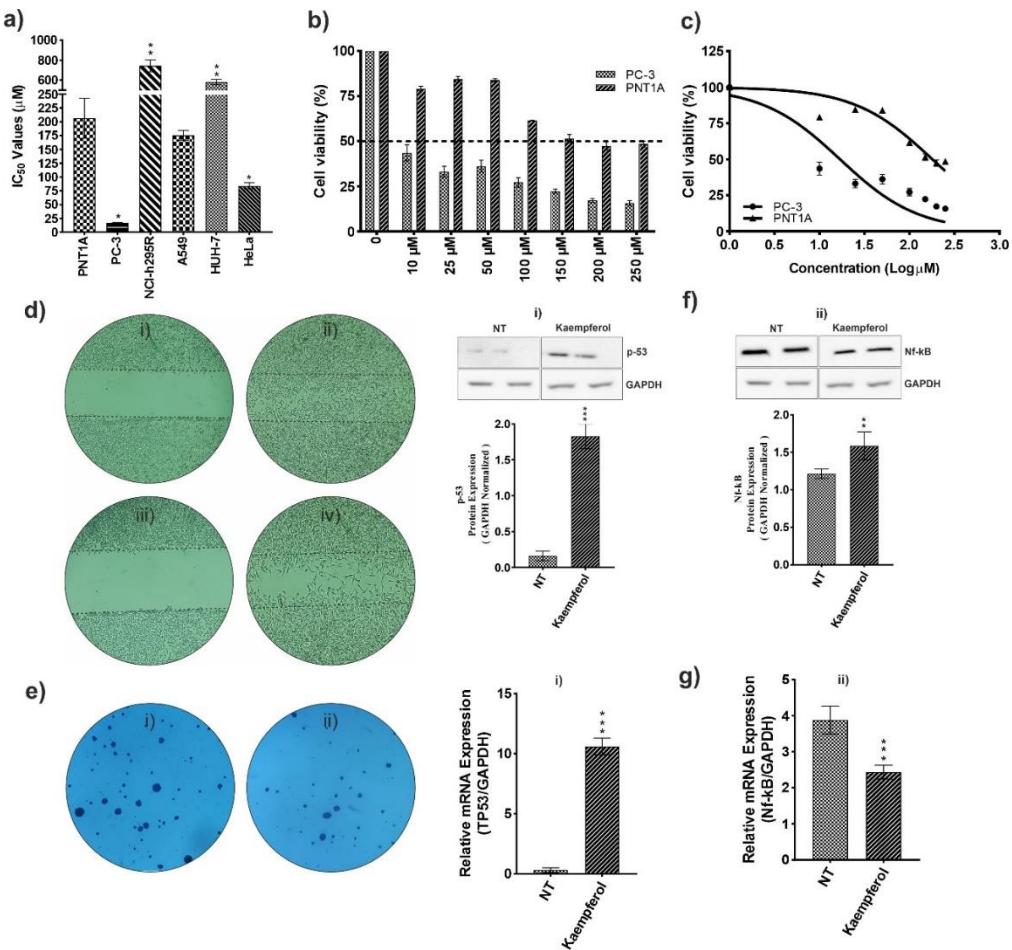
spectrophotometric analyses proved that kaempferol was stable for up to 48 h.



**Figure 1.** Characterization of kaempferol. **a)** Chemical structure of kaempferol. **b)** UV-visible absorption spectra of kaempferol measured at 0 h, 24 h, and 48 h. Kaempferol exhibits maximum absorbance peaks at 226 nm, 266 nm, and 366 nm. **c)** Fluorescence emission spectra of 10 µM kaempferol, with excitation at 240 nm and 267 nm. **d)** Fluorescence cell imaging of kaempferol on PC-3 cells. **i-iv)** Brightfield images, **ii-v)** Fluorescence images, and **iii-vi)** Merged images.

Fluorimetric analyses showed that when kaempferol was excited at 240 nm and 260 nm, it gave emission peaks at 481 nm and 529 nm (Figure 1c). Confocal

studies were also proved that when the cells treated with kaempferol, it mostly localized in cytoplasm and slightly penetrated into the nucleus (Figure 1d).



**Figure 2.** Anti-cancer properties of kaempferol. **a)** Cytotoxic effects of kaempferol on various human cancer cell lines.  $IC_{50}$  values of kaempferol were determined in PNT1A, PC-3, NCI-h295R, A549, HUH-7, and HeLa cells. **b)** Dose-dependent cell viability of kaempferol on PC-3 and PNT1A cells. **c)** Sigmoidal plot representing % cell viability versus log concentration of kaempferol in PC-3 and PNT1A cells. Kaempferol concentrations ranged from 0 to 250  $\mu M$ . **d)** In vitro wound healing assay: Images from a scratch assay conducted at different time points. **i)** Image at 0 hours (initial scratch), **ii)** Image at 24 hours for untreated cells, **iii)** Image at 0 hours for the kaempferol-treated group, **iv)** Image at 24 hours for kaempferol-treated cells. **e)** In vitro soft agar colony formation assay. **i)** Colonies formed by untreated (NT) cells and **ii)** Colonies formed by kaempferol-treated cells after 15 days of incubation. **f)** Effect of kaempferol on the protein expression levels of p53 and NF- $\kappa$ B. **g)** Effect of Kaempferol on the mRNA expression levels of TP53 and NF- $\kappa$ B. (Data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using Student's t-test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant).

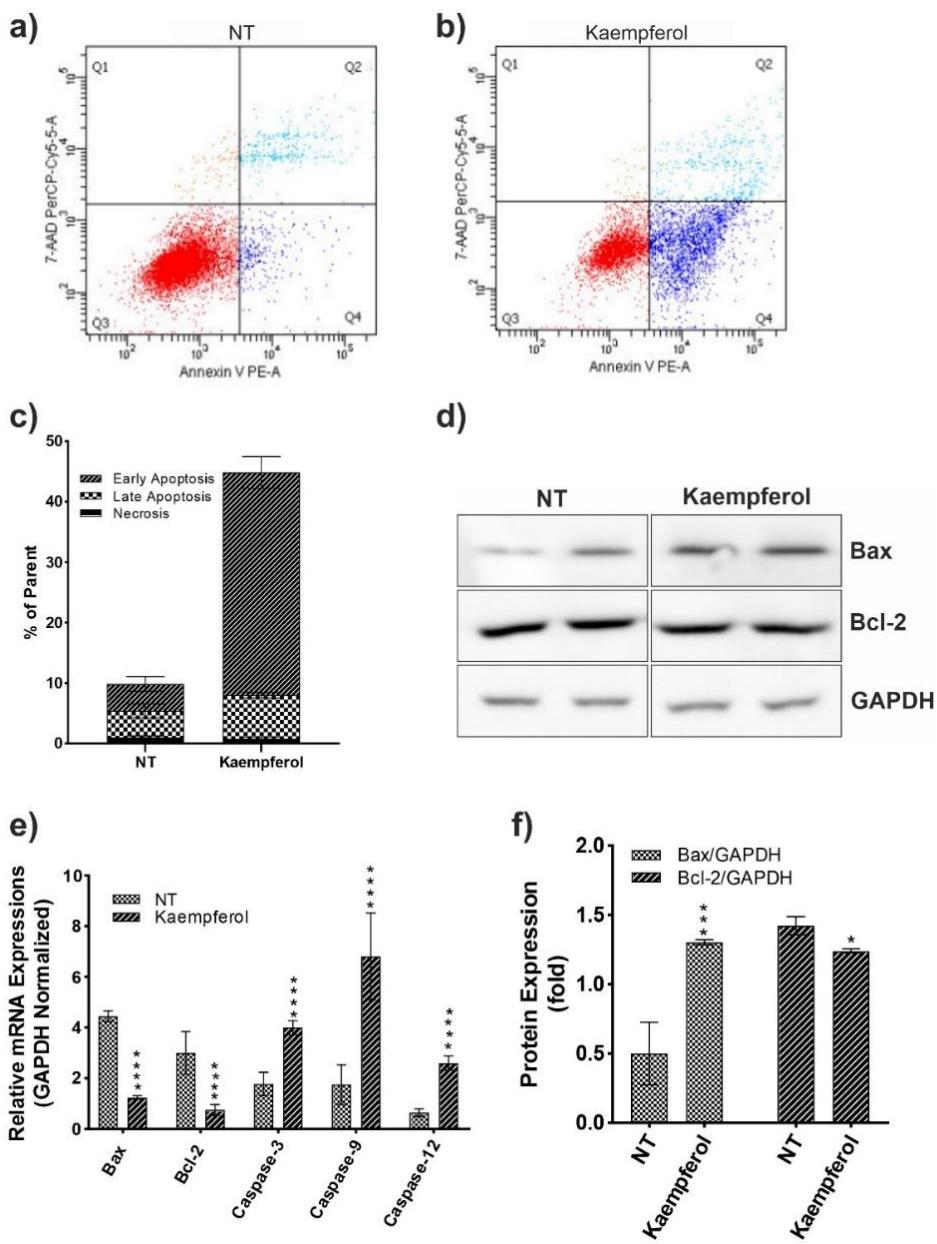
Kaempferol selectively inhibited proliferation of human cancerous cells, and its action was found as dose-dependent manner. Cytotoxic potential of kaempferol was investigate against the viability and proliferation of various human cancerous cells (PC-3, NCI-h295R, A549, HUH-7, HeLa) and healthy epithelial cells (PNT1A) (Figure 2a). No significant cytotoxic effects were observed on HUH-7, NCI-h295R and PNT1A cells ( $>200 \mu M$ ). The  $IC_{50}$  values were calculated as 787.9  $\mu M$  (NCI-h295R), 562.2  $\mu M$  (HUH-7), 182.4  $\mu M$  (A549), 88  $\mu M$  (HeLa), 16.9  $\mu M$  (PC-3), and 206.4  $\mu M$  (PNT1A), respectively. Kaempferol was found the most potent inhibitor on the

viability of PC-3 cells (Figure 2b, 2c). Hence, we further studies were focus on this cell line.

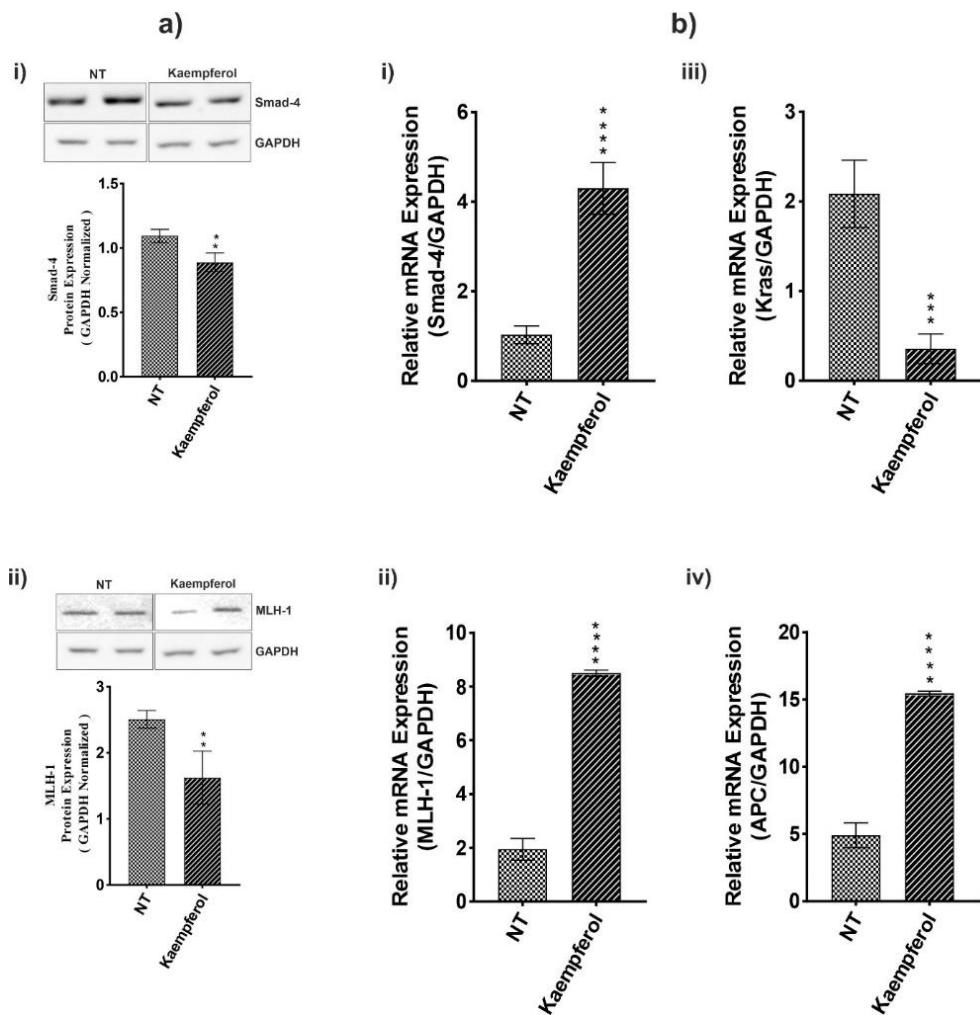
To evaluate the effect of kaempferol in limiting the two dimensions cell migration on PC-3 cells, an *in vitro* wound-healing assay was performed, and gap closure was observed for 24 h (Figure 2d). As a result, the kaempferol-treated group still had a large gap after 24 h compared to the control group, and hence kaempferol was able to slow the cell invasiveness (46%) (Figure 2d-ii, 2d-iv). The colony formation potential of PC-3 cells was clarified by a soft agar colony formation assay. As seen in Figure 2e, colony formation was reduced by 68% in the kaempferol-treated group (Figure 2e-ii)

compared to the control group (Figure 2e-i). p53 (TP53) mRNA (33.6-fold) and protein expressions (19-fold) significantly increased with kaempferol treatment

(Figure 2f-i, 2g-i). Kaempferol increased NF- $\kappa$ B protein expression (1.31-fold) while decreasing gene expression (1.59-fold) in PC-3 cells (Figure 2f-ii, 2g-ii).



**Figure 3.** The effects of kaempferol on apoptosis of PC-3 cells at the equivalent concentration of  $IC_{50}$ . a) Flow cytometric plot of the non-treated (NT) group. b) Flow cytometric plot of the kaempferol-treated group. The quadrants represent: Q1: Necrotic cells (Annexin-, 7-AAD+), Q2: Late apoptotic cells (Annexin+, 7-AAD+), Q3: Viable cells (Annexin-, 7-AAD+), Q4: Early apoptotic cells (Annexin+, 7-AAD-). c) Statistical analysis graph from the flow cytometry data, showing the percentage of cells in early apoptosis, late apoptosis, and necrosis stages. d) Representative immunoblot displaying Bax and Bcl-2 protein expression, key regulators of the apoptosis pathway. e) Relative mRNA expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9, and Caspase-12 following kaempferol treatment. f) Relative protein expression levels of Bax and Bcl-2 following kaempferol treatment. (Data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using Student's t-test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant).



**Figure 4.** The effect of kaempferol on protein and mRNA expressions in PC-3 cells. Cells were treated with equivalent concentration of IC<sub>50</sub> value of Kaempferol. **a)** Effect of kaempferol on Protein Expression **i)** and **ii)** represent the immunoblots of Smad-4 and MLH-1 proteins, respectively, in PC-3 cells from the experimental control and kaempferol-treated groups. **b)** Effect of kaempferol on mRNA expressions. Alterations in mRNA expressions of Smad-4 (**i**), MLH-1 (**ii**) Kras (**iii**) and APC (**iv**) were analyzed by using qRT-PCR. Effects of kaempferol on mRNA levels of the tested genes were normalized to housekeeping GAPDH mRNA. Fold of inhibition was calculated by the following formula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where  $\Delta\Delta Ct$ :  $\Delta Ct$  (treated) -  $\Delta Ct$ (control);  $\Delta Ct$  (treated):  $\Delta Ct$  (gene)-  $\Delta Ct$ (GAPDH);  $\Delta Ct$ (control):  $\Delta Ct$  (gene)-  $\Delta Ct$ (GAPDH). Experiments were repeated at least 3 times (n=6). \*\*\*, p<0.0001 signify a statistically significant difference compared with the control.

To clarify the cell death mechanism, the effects of kaempferol on Apoptosis of the PC-3 cells were investigated by flow cytometer (Figure 3a, 3b). 38% of kaempferol-treated cells progress to early apoptosis (Annexin V-FITC+ / 7-AAD-), 7.2% to late apoptosis (Annexin V-FITC- / 7-AAD+). Thus, the early stage apoptosis rate of kaempferol increased significantly compared to the control group (Figure 3c). Kaempferol significantly increased the expressions of Caspase-9 (3.88-fold), Caspase-3 (2.25-fold), Caspase-12 (4.03-fold), (Figure 3e) and Bax (2.63-fold) (Figure 3f). Besides, kaempferol decreased the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 (0.87-fold) (Figure 3f).

To clarify the molecular mechanism of kaempferol on the proliferation of human metastatic prostate cancer cells, we investigated the protein and gene expression of key genes in signal transduction pathways, including PI3K-Akt, TGF $\beta$ , MAPK signaling pathways. Kaempferol caused significant changes in apoptotic and antiapoptotic gene and protein expressions (Figure 4). Kaempferol decreased SMAD-4 protein expression (0.8-fold) while increasing gene expression (4.17-fold) in PC-3 cells (Figure 4a-i, 4b-i). Kaempferol decreased MLH-1 protein expression (0.65-fold) although mRNA expression was increased (4.36-fold) (Figure 4a-ii, 4b-ii). Finally, kaempferol decreased KRAS gene expression 5.87-fold (Figure

4b-iii) and increased APC gene expression 3.15-fold (Figure 4b-iv) in PC-3 cells.

## Discussion

Prostate cancer is one of the leading causes of death among men, and the need for more effective treatments has led to more research (Halimah et al., 2015). Kaempferol, a naturally occurring compound, has high cytotoxicity, making it frequently used in cancer therapy. Recently, the cytotoxicity of kaempferol against various cancer cells has been investigated and remarkable results have been obtained.

Fluorometric analyses showed that when kaempferol was excited at 240 nm and 260 nm, it gave emission peaks at 481 nm and 529 nm, which shows that kaempferol has strong fluorescent properties in the blue and green areas. Confocal studies were also proved that when the cells treated with kaempferol, it mostly localized in cytoplasm and slightly penetrated into the nucleus. Aglycone structure of kaempferol led it to pass freely through cell membranes (De Pascual-Teresa et al., 2007; Viskupicva et al., 2008). Kaempferol selectively inhibited proliferation of human cancerous cells, and its action was found as dose-dependent manner. Kaempferol showed the highest toxic effect on PC-3 cells, indicating the selective toxicity of kaempferol on cells. For the specific treatment specific to cancer cells, this was a perfect effect. Kaempferol also increases the level of E-cadherin by increasing the expression of p53 and NF- $\kappa$ B proteins. Thus, the cell's ability to metastasize and colony formation potential is reduced. Also, it has been reported that p53, an independent transcriptional mechanism, migrates to the mitochondria and regulates apoptosis by interacting with members of the Bcl-2 family (Kandasamy et al., 2003; Shankar et al., 2007). Accordingly, our results revealed that p53 increased protein expression in the metastatic prostate cancer cells (PC-3) with kaempferol treatment, which could have a beneficial effect against PCa progression. Analysis of multiple microarray studies where the NF- $\kappa$ B pathway was significantly irregular in metastatic prostate cancer confirmed the opposite effect in our result (Setlur et al., 2007). Increased expression of NF- $\kappa$ B in prostate cancer is associated with a poor prognosis. Therefore, activation of the NF- $\kappa$ B pathway results in prostate cancer progression to androgen independence (Jin et al., 2008). 38% of kaempferol-treated cells progress to early apoptosis. There are death receptors in the external pathway of apoptosis, and they can recognize substances that cause death and enter the internal cytoplasm. Death receptors include tumor necrosis factor (TNF), FAS,

and TRAIL (Thorburn, 2004). Kaempferol significantly upregulates TRAIL receptors, suggesting that kaempferol can be an effective factor in treating TRAIL-related diseases (Yoshida et al., 2008). Kaempferol significantly increased the expressions of Caspase-9, Caspase-3, Caspase-12, and Bax. Kaempferol may have synergistically suppressed cell growth by inhibiting the activation of the PI3K/Akt signaling pathway (Li et al., 2019). Besides, kaempferol decreased the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2, which is thought to reduce Akt activity (Abotaleb et al., 2018; Ahmed et al., 2019). The proapoptotic and antiapoptotic protein ratios of the Bcl-2 family, specifically the Bax/Bcl-2 ratio, control the resistance or sensitivity of cells to apoptotic stimuli. Moreover, the tumor suppressor TP53 gene manages apoptosis by increasing the expression of several proapoptotic proteins involved in the intrinsic pathway. On the other hand, activation of PI3K/Akt signaling cascade helps cells resist apoptotic triggers (Moradzadeh et al., 2018). That is, the ratio of Bax/Bcl-2 and Caspase-3, Caspase-9, and Caspase-12 were significantly increased in cells treated with kaempferol, suggesting that kaempferol induced Apoptosis both intrinsic and extrinsic pathways in metastatic prostate cancer cells. Kaempferol caused significant changes in apoptotic and antiapoptotic gene and protein expressions. Furthermore, initiation of the MAPK pathway is a key factor in apoptosis, and kaempferol-induced MAPK induction prevents healthy cells from turning into cancer cells (Qattan et al., 2022). Kaempferol decreased SMAD-4 protein expression while increasing gene expression in PC-3 cells. Kaempferol decreased MLH-1 protein expression although mRNA expression was increased. MLH-1 was found to be down-regulated in tumor regions in prostate tissues compared to normal prostate (Chen et al., 2001). MLH-1 protein expression has been shown to be down-regulated in DU145 cells, another prostate cancer cell line, and our results confirm this protein expression deficiency in PC-3 cells (Yeh et al., 2001). This reduction may result from a truncation of the MLH-1 gene caused by the premature stop codon (Chen et al., 2001).

## Conclusion

Given the importance of flavonoids as potential adjuvants or therapeutic agents in cancer treatment, the search for natural products to induce apoptosis of cancer cells could be an excellent strategy for prostate cancer chemoprevention. Kaempferol is a natural flavonoid that inhibits cancerous cells' proliferation while not affect healthy cells; this causes it to be used

frequently in cancer treatment. Prostate cancer is one of the leading causes of cancer-related deaths due to its strong metastatic effect. In this study, low doses of kaempferol highly affected the ability of strong metastatic prostate cancer cells (PC-3) to metastasize and prevented their proliferation. Also, its effects at the protein and gene level in PC-3 cells are quite remarkable. Therefore, the low cost and high efficiency of natural compounds used in treating fatal and increased incidence of prostate cancer can reduce and treat prostate cancer by showing a new direction to traditional treatments. However, some difficulties arise due to the lysosomal degradation and easy excretion of kaempferol from the body. In addition, the poor bioavailability of kaempferol can be increased by developing nano-based formulations. In addition to all these, various animal models can be created to investigate the bioavailability of kaempferol *in vivo* and can be designed as an effective therapeutic agent for preclinical cancer treatments. Therefore, this study will shed light on future studies that can increase the bioavailability of kaempferol and its degradation time.

#### *Conflict of Interest*

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

#### *Authors' Contributions*

Serdar Karakurt designed the research; Hatice Gul Batur and Irem Mukaddes Bilgiseven performed the experimental study; Sevtap Karakurt analyzed the data; Serdar Karakurt, Hatice Gul Batur and Irem Mukaddes Bilgiseven prepared the manuscript.

#### *Acknowledgments*

We would like to thank the Research Foundation of Selcuk University [Grant number 19401162].

## References

- Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., Busselberg, D. (2018): Flavonoids in Cancer and Apoptosis, *Cancers (Basel)* 11(1).
- Ahmed, K., Zaidi, S. F., Cui, Z. G., Zhou, D., Saeed, S. A., Inadera, H. (2019): Potential proapoptotic phytochemical agents for the treatment and prevention of colorectal cancer, *Oncol Lett* 18(1), 487-498.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E. (2004): Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(26), 7970-7981.
- Avtanski, D., Poretsky, L. (2018): Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis, *Molecular Medicine* 24.
- Batra, P., Sharma, A. K. (2013): Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives, *3 Biotech* 3(6), 439-459.
- Blois, M. S. (1958): Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature* 181, 1199-1200.
- Boam, T. (2015): Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer, *Ecancermedicalscience* 9.
- Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., Negri, E., Malvezzi, M. (2020): European cancer mortality predictions for the year 2020 with a focus on prostate cancer, *Ann Oncol* 31(5), 650-658.
- Chen, A. Y., Chen, Y. C. (2013): A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention, *Food Chemistry* 138(4), 2099-2107.
- Chen, H. J., Lin, C. M., Lee, C. Y., Shih, N. C., Peng, S. F., Tsuzuki, M., Amagaya, S., Huang, W. W., Yang, J. S. (2013): Kaempferol suppresses cell metastasis via inhibition of the ERK-p38-JNK and AP-1 signaling pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells, *Oncol Rep* 30(2), 925-932.
- Chen, Y., Wang, J., Fraig, M. M., Metcalf, J., Turner, W. R., Bissada, N. K., Watson, D. K., Schweinfest, C. W. (2001): Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer, *Cancer Res* 61(10), 4112-4121.
- De Pascual-Teresa, S., Sanchez-Moreno, C., Granado, E., Olmedilla, B., De Ancos, B., Cano, M. P. (2007): Short and mid-term bioavailability of flavanones from oranges in humans, *Current Topics in Nutraceutical Research* 5(2-3), 129-134.
- Deveci, E., Tel-Cayan, G., Usluer, O., Emin Duru, M. (2019): Chemical Composition, Antioxidant, Anticholinesterase and Anti-Tyrosinase Activities of Essential Oils of Two Sideritis Species from Turkey, *Iran J Pharm Res* 18(2), 903-913.
- Ding, Z., Wu, C. J., Chu, G. C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S. R., Labrot, E. S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A. H., Scott, K. L., Signoretti, S., Bardeesy, N., DePinho, R. A. (2011): SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression, *Nature* 470(7333), 269-273.
- Gao, Y., Gao, Y., Huang, B., Meng, Z., Jia, Y. (2020): Reference gene validation for quantification of gene expression during ovarian development of turbot (*Scophthalmus maximus*), *Sci Rep* 10(1), 823.
- Guo, H., Ren, F., Zhang, L., Zhang, X., Yang, R., Xie, B., Li, Z., Hu, Z., Duan, Z., Zhang, J. (2016): Kaempferol induces apoptosis in HepG2 cells via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway, *Mol Med Rep* 13(3), 2791-2800.
- Halimah, E., Diantini, A., Destiani, D. P., Pradipta, I. S., Sastramihardja, H. S., Lestari, K., Subarnas, A., Abdulah, R., Koyama, H. (2015): Induction of caspase cascade pathway by kaempferol-3-O-rhamnoside in LNCaP prostate cancer cell lines, *Biomed Rep* 3(1), 115-117.

- Han, X., Liu, C. F., Gao, N., Zhao, J., Xu, J. (2018): Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells, *Biomed Pharmacother* 108, 809-816.
- Jin, J. K., Dayyani, F., Gallick, G. E. (2011): Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis, *Int J Cancer* 128(11), 2545-2561.
- Jin, R. J., Lho, Y., Connelly, L., Wang, Y., Yu, X., Saint Jean, L., Case, T. C., Ellwood-Yen, K., Sawyers, C. L., Bhowmick, N. A., Blackwell, T. S., Yull, F. E., Matusik, R. J. (2008): The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth, *Cancer Res* 68(16), 6762-6769.
- Kandasamy, K., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., Bryant, J. L., Srivastava, R. K. (2003): Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release, *Cancer Res* 63(7), 1712-1721.
- Kang, G. Y., Lee, E. R., Kim, J. H., Jung, J. W., Lim, J., Kim, S. K., Cho, S. G., Kim, K. P. (2009): Downregulation of PLK-1 expression in kaempferol-induced apoptosis of MCF-7 cells, *Eur J Pharmacol* 611(1-3), 17-21.
- Kang, J. W., Kim, J. H., Song, K., Kim, S. H., Yoon, J. H., Kim, K. S. (2010): Kaempferol and Quercetin, Components of Ginkgo biloba Extract (EGb 761), Induce Caspase-3-Dependent Apoptosis in Oral Cavity Cancer Cells, *Phytotherapy Research* 24, S77-S82.
- Karakurt, S. (2016): Modulatory effects of rutin on the expression of cytochrome P450s and antioxidant enzymes in human hepatoma cells, *Acta Pharm* 66(4), 491-502.
- Karakurt, S., Semiz, A., Celik, G., Gencler-Ozkan, A. M., Sen, A., Adali, O. (2016): Contribution of ellagic acid on the antioxidant potential of medicinal plant Epilobium hirsutum, *Nutr Cancer* 68(1), 173-183.
- Kim, S. H., Choi, K. C. (2013): Anti-cancer Effect and Underlying Mechanism(s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models, *Toxicol Res* 29(4), 229-234.
- Li, Q., Wei, L., Lin, S., Chen, Y., Lin, J., Peng, J. (2019): Synergistic effect of kaempferol and 5-fluorouracil on the growth of colorectal cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway, *Molecular Medicine Reports* 20(1), 728-734.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25(4), 402-408.
- Luo, H. T., Rankin, G. O., Liu, L. Z., Daddysman, M. K., Jiang, B. H., Chen, Y. C. (2009): Kaempferol Inhibits Angiogenesis and VEGF Expression Through Both HIF Dependent and Independent Pathways in Human Ovarian Cancer Cells, *Nutrition and Cancer-an International Journal* 61(4), 554-563.
- Marfe, G., Tafani, M., Indelicato, M., Sinibaldi-Salime, P., Real, V., Pucci, B., Fini, M., Russo, M. A. (2009): Kaempferol Induces Apoptosis in Two Different Cell Lines Via Akt Inactivation, Bax and SIRT3 Activation, and Mitochondrial Dysfunction, *Journal of Cellular Biochemistry* 106(4), 643-650.
- Meek, D. W. (2015): Regulation of the p53 response and its relationship to cancer, *Biochem J* 469(3), 325-346.
- Moradzadeh, M., Tabarraei, A., Sadeghnia, H. R., Ghorbani, A., Mohamadkhani, A., Erfanian, S., Sahebkar, A. (2018): Kaempferol increases apoptosis in human acute promyelocytic leukemia cells and inhibits multidrug resistance genes, *Journal of Cellular Biochemistry* 119(2), 2288-2297.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016): Flavonoids: an overview, *J Nutr Sci* 5, e47.
- Qattan, M. Y., Khan, M. I., Alharbi, S. H., Verma, A. K., Al-Saeed, F. A., Abdulla, A. M., Al Areefy, A. A. (2022): Therapeutic importance of kaempferol in the treatment of cancer through the modulation of cell signalling pathways, *Molecules* 27(24), 8864.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y., Nishigaki, I. (2014): Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders, *Eur J Med Chem* 86, 103-112.
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., Osborn, H. M. I. (2013): Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(12), 2821-2831.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10), 1231-1237.
- Rio, D. C., Ares, M., Jr., Hannon, G. J., Nilsen, T. W. (2010): Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent), *Cold Spring Harb Protoc* 2010(6), pdb prot5439.
- Setlur, S. R., Royce, T. E., Sboner, A., Mosquera, J. M., Demichelis, F., Hofer, M. D., Mertz, K. D., Gerstein, M., Rubin, M. A. (2007): Integrative microarray analysis of pathways dysregulated in metastatic prostate cancer, *Cancer Res* 67(21), 10296-10303.
- Shankar, S., Chen, Q., Siddiqui, I., Sarva, K., Srivastava, R. K. (2007): Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential, *J Mol Signal* 2, 7.
- Srinivas, N. R. (2015): Recent trends in preclinical drug-drug interaction studies of flavonoids-Review of case studies, issues and perspectives, *Phytotherapy Research* 29(11), 1679-1691.
- Sumanasuriya, S., De Bono, J. (2018): Treatment of Advanced Prostate Cancer-A Review of Current Therapies and Future Promise, *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(6).
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021): Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin.*

- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008): Flavonoids as Nutraceuticals: A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7, 1089-1099.
- Thorburn, A. (2004): Death receptor-induced cell killing, *Cellular Signalling* 16(2), 139-144.
- Viskupicva, J., Ondrejovic, M., Sturdik, E. (2008): Bioavailability and metabolism of flavonoids, *Journal of Food and Nutrition Research* 47(4), 151-162.
- Wan, J., Zhang, J., Zhang, J. (2018): Expression of p53 and its mechanism in prostate cancer, *Oncol Lett* 16(1), 378-382.
- Wang, J., Fang, X., Ge, L., Cao, F., Zhao, L., Wang, Z., Xiao, W. (2018): Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol, *Plos One* 13(5), e0197563.
- Yeh, C. C., Lee, C., Dahiya, R. (2001): DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer, *Biochem Biophys Res Commun* 285(2), 409-413.
- Yoshida, T., Konishi, M., Horinaka, M., Yasuda, T., Goda, A. E., Taniguchi, H., Yano, K., Wakada, M., Sakai, T. (2008): Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375(1), 129-133.

## UTJECAJ PREHRANE NA RASPOLOŽENJE I MENTALNO ZDRAVLJE

Valentina Rahelić<sup>1,2,3\*</sup>, Josipa Matanić<sup>1</sup>, Sandra Bival<sup>1</sup>, Zrinka Šmuljić<sup>1,2</sup>, Eva Pavić<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Klinički Bolnički Centar Zagreb, Služba za prehranu i dijetetiku, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

<sup>2</sup>Zdravstveno Veleučilište Zagreb, Mlinarska cesta 38, 10000 Zagreb

<sup>3</sup>Sveučilište Sjever, Odjel za prehrambenu tehnologiju, 48000 Koprivnica

pregledni rad

### Sažetak

Tijekom posljednjih desetljeća zabilježen je značajan porast prevalencije poremećaja mentalnog zdravlja, paralelno s promjenama u načinu života, prehrane i tjelesne aktivnosti. Procjenjuje se da više od 300 milijuna svjetske populacije boluje od depresije, a više od 260 milijuna od anksioznih poremećaja. Prehrana i njezine različite bioaktivne komponente prepoznate su kao promjenjivi čimbenici rizika koji mogu utjecati na patogenezu mentalnih poremećaja, a temeljni mehanizmi pozitivnog učinka rezultat su uglavnom zajedničkog međudjelovanja različitih komponenti. Kao preporučeni obrasci prehrane s pozitivnim učinkom na zdravlje, radom mozga te živčanog sustava ističu se Mediteranska i MIND dijeta koje naglasak stavlju na hranu biljnog podrijetla. Ovi načini prehrane izvor su različitih nutrijenata ključnih za mentalno zdravlje (fitokemikalija, flavonoida i karotenoida, omega-3 masnih kiselina, folne kiseline, vitamina E, cinka i magnezija, prehrambenih vlakana, itd.). Osim toga, doprinose zdravlju i raznolikosti crijevne mikrobiote, a njezini metaboliti mogu imati važnu ulogu u mentalnom zdravlju kroz crijevno - moždanu os. Kroz taj dvosmjerni put, različiti hormoni i neurotransmiteri utječu na regulaciju osjećaja gladi i sitosti, ali i na raspoloženje te stres koji je također reguliran djelovanjem hormona. Usvajanje zdravog načina života koji podrazumijeva pravilnu (raznoliku i uravnovezenu) prehranu, višestruko će doprinijeti očuvanju mentalnog zdravlja te prevenciji i/ili liječenju već razvijenih poremećaja.

*Ključne riječi:* mentalno zdravlje, stres, Mediteranska dijeta, MIND dijeta

### Popis kratica

AgRP - agouti-povezani peptid (eng. *agouti-related protein*)

CART - kokainom i amfetaminom reguliran transkript (eng. *cocaine and amphetamine regulated transcript*)

CKK - kolecistokinin (eng. *Cholecystokinin*)

CRP - C-reaktivni protein (eng. *C-reactive protein*)

DASH dijeta - (eng. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*)

DHA - dokozaheksantska kiselina

EPA - eikozapentaentska kiselina

GLP-1 - glukagonu sličan peptid-1 (eng. *glucagon-like peptide-1*)

GSH - glutation

HOMA-IR - indeks inzulinske rezistencije

PYY - peptid YY (eng. *peptide tyrosine tyrosine*)

MIND dijeta - (eng. *The Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay diet*)

NPY - neuropeptid Y (eng. *neuropeptide Y*)

POMC - proopiomelanokortin (eng. *pro-opiomelanocortin*)

SCFA - kratkolančane masne kiseline (eng. *short-chain fatty acids*)

TMD - ukupni poremećaji raspoloženja (eng. *total mood disturbance*)

TNF- $\alpha$  - čimbenik tumorske nekroze alfa (eng. *tumor necrosis factor-alpha*)

### Uvod

Mentalno zdravlje sastavna je i važna komponenta čovjekova zdravlja. Tijekom posljednjih desetljeća došlo je do značajnog porasta prevalencije poremećaja mentalnog zdravlja, uključujući povećanu prevalenciju depresije, anksioznosti, kognitivnih

poremećaja i poremećaja spavanja. Procjenjuje se da više od 300 milijuna svjetske populacije boluje od depresije, a više od 260 milijuna od anksioznih poremećaja (Friedrich, 2017). Istraživanja su pokazala da osobe koje bolju od kroničnih nezaraznih bolesti, poput pretilost, šećerne bolesti tipa 2, arterijske hipertenzije i ostalih, imaju veći rizik za razvoj

mentalnih bolesti, uključujući depresiju i anksioznost, a jedan od najčešćih razloga je dugotrajna priroda navedenih bolesti. Ujedno istraživanja su pokazala da u usporedbi s oboljelima bez multimorbiditeta, oni s razvijenim multimorbidnim stanjima imaju dvostruko veću vjerojatnost da će razviti depresiju (Read i sur., 2017; Zhang i sur., 2018; Ma i sur., 2021). Općenito procjenjuje se da između 9,3 % i 25 % oboljelih od kroničnih nezaraznih bolesti boluje i od depresije (Ingle i sur., 2017). Dodatno sve više dokaza upućuju na to da je COVID pandemija posljedično dovela do porasta broja oboljelih od mentalnih bolesti uključujući porast prevalencije depresije i anksioznosti za 28 % (Santomauro i sur., 2021; WHO, 2022). Dobar nutritivni status i prehrana općenito, važni su za održavanje normalnih funkcija u organizmu te sprječavanje potencijalnih disfunkcija izazvanih raznim unutarnjim ili vanjskim čimbenicima. Sve veći broj provedenih istraživanja potvrđuje kako je prehrana ključna, ne samo za sastav tijela, fiziološke procese i prevenciju kroničnih nezaraznih bolesti nego može imati značajan utjecaj na raspoloženje i mentalno zdravlje (Muscaritoli, 2021).

## Biološka osnova hranjenja

Regulacija apetita ovisi o dvosmjerne međusobnoj komunikaciji između gastrointestinalnog sustava i mozga tj. središnjeg živčanog sustava, a taj put se još naziva crijevno – moždana os (eng. *gut – brain axis*). Tri primarna hormona koja se izlučuju u crijevima, zadužena za regulaciju apetita, su glukagonu sličan peptid-1 (eng. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1), kolecistokinin (eng. *cholecystokinin*, CKK) i peptid YY (eng. *peptide tyrosine tyrosine*, PYY). Kada se izlučuju navedeni hormoni crijevno - moždana os reagira smanjenjem apetita. Međutim, taj odgovor može varirati ovisno o vrsti hrane koja se konzumira, ponajviše o sastavu makronutrijenata (Moris i sur., 2022). Hipotalamus djeluje kao kontrolni centar za osjećaj gladi i sitosti. Dio hipotalamusa, infundibularna jezgra, omogućuje perifernim peptidima i proteinima prolazak kroz crijevno - moždanu os, a oni dalje izravno djeluju na neurone. To uključuje neurone koji eksprimiraju peptide odgovorne za stimulaciju unosa hrane, osobito neuropeptid Y (eng. *neuropeptide Y*, NPY) i agouti-povezani peptid (eng. *agouti-related protein*, AgRP), kao i one neurone koji eksprimiraju proopiomelanokortin (eng. *pro-opiomelanocortin*, POMC) te kokainom i amfetaminom reguliran transkript (eng. *cocaine and amphetamine regulated transcript*, CART) koji inhibiraju apetit. Navedeni neuroni i peptidi dakle zajedno reguliraju osjećaj gladi i sitosti (Austin i sur., 2008; Gahagan, 2012). Osim toga, cirkulirajući

periferni peptidi također igraju važnu ulogu u regulaciji apetita. Kao stimulator apetita ističe se grelin koji uglavnom nastaje u endokrinim stanicama želučane sluznice. Grelin dovodi do povećanog unosa hrane tako što potiče sintezu NPY i AgRP. Nadalje, može utjecati na energijsku ravnotežu stimuliranjem adipogeneze, inhibicijom apoptoze, inhibicijom aktivnosti simpatičkog živčanog sustava itd. Isto tako, utječe na homeostazu glukoze, motilitet crijeva, egzokrinu sekreciju gušterače, kardiovaskularni sustav, imunitet i upalne procese. S druge strane, brojni su periferni peptidi povezani s osjećajem sitosti. Te hormone luče razni organi, uključujući gastrointestinalni sustav, gušterača i masno tkivo. Nadalje, inkretini, hormoni koji se luče iz gastrointestinalnog sustava u cirkulaciju, kao odgovor na konzumaciju hrane – oksintomodulin i GLP-1-a dovode do odgođenog pražnjenja želuca, stimulacije lučenja inzulina, inhibicije lučenja glukagona i stimulacije lučenja somatostatina. Također, i hormoni inzulin, adiponektin i leptin sudjeluju u regulaciji tj. inhibiciji apetita (Austin i sur., 2008). Ujedno, leptin pojačava želju za hranom i osjećajem gladi u slučajevima kalorijskog nedostatka, a smanjuje u slučajevima suficita, slično kao i adiponektin (Gahagan, 2012).

## Hormoni sreće – dopamin, serotonin, endorfín, oksitocin

Neurotransmiteri su biološki aktivni spojevi koji posreduju u elektrokemijskom prijenosu između neurona te kontroliraju brojne ključne funkcije u organizmu, između ostalih, i one emocionalne (pričekano u tablici 1.). Neravnoteža neurotransmitera može uzrokovati određene bolesti i poremećaje, a hrana koja ih sadrži (ili njihove prekursore) mogla bi pomoći u održavanju ravnoteže te prevenciji mentalnih poremećaja (Gasmi i sur., 2023).

Endorfín, proučavan i kao neurotransmiter sreće, endogeni je opioidni peptid. Smatra se da njegove povećane koncentracije dovode do boljeg raspoloženja i smanjenja osjećaja boli, a snižene koncentracije inhibiraju pozitivne osjećaje. Oslobađa se tijekom provođenja tjelesne aktivnosti, meditacije, smijanja, ugodnih druženja, slušanja glazbe i sl. Oksitocin je peptidni hormon koji se oslobađa iz hipofize, a uzrokuje širok spektar bihevioralnih i fizioloških učinaka posredovanih receptorima u mozgu (npr. majčinsko i općenito pozitivno društveno ponašanje) (Dfarhud i sur., 2014). Osim navedenoga, potpuno funkcionalna aktivnost neurotransmitera potrebna je i za optimalnu regulaciju apetita te ponašanja u pogledu prehrane (Moris i sur., 2022).

**Tablica 1.** Glavni neurotransmiteri, njihovi prekursori, prehrambeni izvori i funkcije  
**Table 1.** Main neurotransmitters, their precursors, dietary sources and functions  
(prilagođeno prema: Pruneti i sur., 2023; Holford, 2003)

Neurotransmiter/ Neurotransmitter	Prekursor/Pr ecursor	Izvori iz hrane i nutrijenti/ Dietary sources and nutrients	Utjecaj na raspoloženje/ Effect on mood
<b>Acetilkolin/Acetylcholine</b>	Kolin	žumanjak jaja, perad, junetina, grašak, jetrica, losos, skuša, tuna svježa, soja, grah, leća, naranče, jagode, radič	Sjećanje, koncentracija, pažnja, mišićna aktivnost, razmišljanje, raspoloženje Nedostatak: smanjena mogućnost pamćenja i zamišljanja, snova, povećana zbumjenost, zaboravnost i neorganiziranost
<b>Dopamin/Dopamine</b>	Fenilalanin	perad, riba, sezam, banane mahunarke, pšenica, lubenica, rajčica, maslinovo ulje, općenito voće i povrće bogato vitaminom C, B6, cinkom, fermentirani proizvodi	Entuzijazam, sjećanje, spoznaja, svijest, donošenje odluka, kontrola spavanja Nedostatak: smanjena motivacija, koncentracija i pamćenje
<b>Epinefrin i Norepinefrin/Epinephrine and Norepinephrine</b>	Tirozin	mahunarke, sir, meso, jaja, općenito hrana bogata folnom kiselinom, vitaminom C, magnezijem, bakrom, željezom	Povećava otkucaje srca, arterijski tlak, odgovoran za reakciju „bori se ili bježi“ odnosno da se i tijelo i mozak mogu nositi s bilo kojim emocionalnim ili fizičkim stresom Nedostatak: loše raspoloženje, anksioznost, slaba koncentracija
<b>Gama-amino butirična kiselina (GABA)/Gamma-amino butyric acid (GABA)</b>	Glutamin	mahunarke, grašak, zob, pšenica, ječam, riža, krumpir, banana, špinat, općenito tamnozeleno lisnato povrće, orašasti plodovi i sjemenke, jaja	Smanjuje aktivnost neurona u mozgu i središnjem živčanom sustavu, djeluje na opuštanje i time smanjenje stresa, stabilizacija raspoloženja, smanjenje боли i poboljšanje sna Nedostatak: smanjena motivacija, koncentracija i pamćenje
<b>Serotonin/Serotonin</b>	Tryptofan	banane, višnje, cikorija, zelje, ananas, papaja, avokado, lješnjak, kava, patlidžan, zeleno odnosno bijelo grožđe, mahunarke, luk, jaja, nemasno bijelo meso i sir	Raspoloženje, apetit, socijalno ponašanje, san, reminiscencija, učenje, gastrointestinalna pokretljivost Nedostatak: loše raspoloženje, anksioznost i depresija, poremećaj sna

## Stres, raspoloženje i prehrana

Poznato je da je i stres reguliran djelovanjem hormona. Stresne situacije mogu dovesti do pojačanog lučenja brojnih hormona uključujući glukokortikoid, kateholamine, hormon rasta i prolaktin. Neke od ovih promjena su neophodne za prilagodbu pojedinca novim okolnostima, ali mogu i dovesti do endokrinih poremećaja. Biološki tj. hormonalni uzrok prejedanju u stresnim situacijama može biti to što kontinuirani stres uzrokuje povećano i kontinuirano lučenje kortizola („hormona stresa“), grelina („hormona gladi“) i inzulina (pojedinci s povećanom tjelesnom masom ili pretili pojedinci imaju povišene koncentracije, a debeljanje povezano sa stresom vjerojatnije će se dogoditi u prisutnosti takvih koncentracija) – dakle, povećane koncentracije ovih hormona na više su načina povezane s pojačanim apetitom u stresnim periodima (Ranabir i sur., 2011; Michels, 2019). Čini se da je kortizol glavni biološki čimbenik koji vodi od stresa prema visceralnoj

pretilosti. U povezanosti stres-prehrana ističe se koncept hrane za utjehu ili emocionalnog jedenja (eng. *emotional eating, comfort eating, stress-induced eating*), budući da kortizol utječe na puteve samonagrađivanja i centre za apetit u mozgu, gdje ulogu imaju i leptin, neuropeptid Y, inzulin, oreksin i gastrointestinalni hormoni (Michels, 2019). Brojna do danas provedena istraživanja pokazala su da je navedeni koncept hranjenja povezan s razvojem metaboličkog sindroma, arterijske hipertenzije, šećerne bolesti tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, morbiditeti te mortaliteta (Finch i sur., 2019). Nacionalno istraživanje provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama 2011. godine pokazalo je kako je 44 % ispitanika više pod stresom nego prije 5 godina. Osim toga, 39 % ispitanika izjavilo je da u takvim periodima jedu količinski više i „nezdravije“ hrane (American Psychological Association, 2012). Kod mnogih osoba stres je općenito povezan s promjenama u prehrambenom ponašanju. Hrana koja se u takvim situacijama najčešće konzumira je ona

koja na neki način mentalno vraća u bezbrižniji period, period djetinjstva – uglavnom bogata šećerom, masnoćama ili oboje. To je najčešće psihološka ili emocionalna potreba koja općenito nema nikakve veze sa stvarnom gladu. Osim nutritivno siromašne hrane, period stresa uglavnom karakterizira i nedostatak kontrole nad vrstom i količinom konzumirane hrane, nedovoljan i nekvalitetan san, smanjena tjelesna aktivnost, prekomjerna konzumacija alkohola i sl., a sve navedeno u kombinaciji vrlo lako može dovesti do kalorijskog suficita te posljedično i do porasta na tjelesnoj masi (Heidari i sur., 2023). Nedavno istraživanje provedeno u Njemačkoj, na oko 1200 ispitanika (80,6 %, 994 Ž), utvrdilo je da je oko 50 % sudionika okarakteriziralo sebe kao „*stress eaters*“, a kao najčešću vrste hrane koju konzumiraju u stresnim periodima naveli su čokoladu, kavu i kekse. Općenito često konzumirani, kao „hrana za utjehu“, navode se i kolači, sladoled, slane grickalice, brza hrana, šećerom

zaslađeni napitci te alkohol (Tomiyama i sur., 2015; Gemesi i sur., 2022). S druge strane, kratkoročna izloženost stresu može i smanjiti odnosno zatvoriti apetit. Živčani sustav šalje poruke nadbubrežnim žlijezdama da izluče hormon epinefrin. Epinefrin pomaže pokrenuti reakciju tijela na borbu ili bijeg (eng. *flight, fight, freeze*), ubrzano fiziološko stanje koje privremeno odlaže potrebu za hranom (Goldstein, 2010; Finch i sur., 2019). U istraživanjima o samoprocjeni stresa i unosa hrane, otprilike 40-70 % ispitanika navodi povećanu konzumaciju hrane u stresnim periodima, dok 30-60 % navodi smanjenju konzumaciju (Hyldelund i sur., 2022). Do danas provedena istraživanja još uvijek nisu u potpunosti razjasnila čimbenike koji objašnjavaju te individualne razlike (Finch i sur., 2019). Općenito, povezanost između utjecaja raspoloženja na odabir hrane te na bihevioralne i psihološke reakcije prikazana je u tablici 2.

**Tablica 2.** Utjecaj odabira hrane na bihevioralne i psihološke reakcije  
**Table 2.** Influence of food selection on behavioral and psychological reactions  
(prilagođeno prema: Heidari i sur., 2023)

	Utjecaj/Influence
<b>Hrana i raspoloženje/ Food and mood</b>	Stres i depresija mogu uzrokovati emocionalno jedenje.
	Nepravilni prehrambeni izbori smanjuju osjećaj zadovoljstva i psihosomatske dobrobiti.
	Konzumacija voća i povrća smanjuje razinu stresa.
	Antioksidansi iz hrane podižu raspoloženje, smanjuju napetost i osjećaj tjeskobe.
<b>Hrana i depresija/ Food and depression</b>	Nepravilna prehrana, pušenje i smanjena tjelesna aktivnost povećavaju rizik za razvoj depresije.
	Isključivanje određenih skupina hrane povećava rizik od depresije.
	Nedostatak vitamina B skupine, D i C te cinka, omega-3 masnih kiselina i antioksidansa može negativno djelovati na raspoloženje i dovesti do depresije.
	Konzumacija hrane koja djeluje proučalno povećava rizik za razvoj depresije; protuupalna prehrana smanjuje simptome.
	Adrenalin, kortisol i glukagon utječu na anksioznost, osjet gladi i hipoglikemiju.
<b>Hrana i osjećaj sreće/ Food and happiness</b>	Nutritivno kvalitetna hrana i dobri prehrambeni izbori doprinose fizičkom i mentalnom zdravlju.
<b>Hrana i potiskivanje emocija/Food and suppression of emotions</b>	U periodima potiskivanja emocija, žene s prekomjernom tjelesnom masom konzumiraju veće količine hrane u odnosu na one s normalnom tjelesnom masom.
<b>Crijevno – moždana os/ Gut-brain axis</b>	Biljni ekstrakti reguliraju sastav crijevnog mikrobioma te pozitivno utječu na ponašanja povezana s depresijom.
	Flavonoidi utječu na sastav crijevne mikrobiote te neurone koji reguliraju neurokognitivne funkcije i adaptivne bihevioralne reakcije.

## Hrana, nutrijenti i mentalno zdravlje

Prehrana i njezine bioaktivne komponente prepoznate su kao promjenjivi čimbenici rizika koji mogu utjecati na patogenezu mentalnih poremećaja. Na zdravlje i funkciju mozga utječe optimalan unos makronutrijenata, vrijeme obroka i cirkadijalni ritam,

kao i antioksidativno i protuupalno djelovanje različitih mikronutrijenata (Godos i sur., 2020). Neki od ključnih nutrijenata za koje je dokazano da mogu imati pozitivan utjecaj su eikozapentaenska (EPA) i dokozahexaenska (DHA) omega-3 masna kiselina,  $\alpha$ -tokoferol, magnezij, cink i folna kiselina – izraženiji utjecaj na stres, poremećaje spavanja, tjeskobu, blage

kognitivne, kao i neuropsihijatrijske poremećaje što značajno može utjecati na kvalitetu života (Mörkl i sur., 2020; Muscaritoli i sur., 2021; Ardekani i sur., 2023). EPA i DHA su višestruko nezasićene masne kiseline s protuupalnim svojstvima koje mogu utjecati na smanjenje kognitivnih oštećenja povezanih sa starenjem, smanjenjem razine stresa, anksioznosti i depresije. DHA se u visokim koncentracijama nalazi u središnjem živčanom sustavu gdje ima ključnu ulogu u optimalnom razvoju, a kasnije i kognitivnom funkcioniranju. Suprotno tome, koncentracije EPA u mozgu su niske upravo zbog njezinog brzog metabolizma. Koncentracija DHA se starenjem smanjuje, što uz nepravilne prehrambene navike može rezultirati njihovim nedovoljnim unosom. Nadalje,  $\alpha$ -tokoferol je jedna od izoformi vitamina E koja se nalazi u staničnim membranama, poboljšava lipidne slojeve te sprječava njihovu peroksidaciju protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem. Neophodan je za neurološki razvoj te pozitivno djeluje na smanjenje anksioznosti. Folna kiselina sintetski je oblik vitamina topivog u vodi, B9 (folat), metabolizirana u svoj aktivni oblik prelazi krvno - moždanu barijeru te regulira proizvodnju neurotransmitera dopamina, norepinefrina i serotoninu čime doprinosi boljoj mentalnoj funkciji i učinku. Osim toga, jedan je od kofaktora u metabolizmu homocisteina koji smanjuju upalu uzrokovanu visokim koncentracijama ove aminokiseline. Magnezij je drugi najzastupljeniji unutarstanični kation koji ima širok raspon bioloških uloga. Sudjeluje u metabolizmu energije, provodljivosti živaca, stabilnosti membrana te sinaptičkom prijenosu; dovodi do smanjenja oksidativnog stresa, anksioznosti i depresije (Muscaritoli i sur., 2021).

Visok unos zasićenih masnih kiselina i rafiniranih ugljikohidrata, često dovodi do prekomjerne tjelesne mase i pretilosti, neuroinflamacije i neuronske disfunkcije te se povezuje s kognitivnim oštećenjima i emocionalnim poremećajima. Ovakav način prehrane može negativno utjecati na sastav crijevne mikrobiote, utječući time i na funkciju mozga kroz različite mehanizme dvosmjerne veze crijevno – moždane osi. Osim toga, dugoročna konzumacija ovakve palatabilne hrane može potaknuti ponašanje u prehrani nalik ovisnosti i dovesti do disregulacije u vezi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, što je dalje povezano s kroničnim stresom, tjeskobom i depresijom (López-Taboada i sur., 2020).

Kao preporučeni obrasci hranjenja koji dokazano imaju pozitivan utjecaj na zdravlje i funkcioniranje mozga, a time i živčanog sustava ističu se Mediteranska i MIND (eng. *The Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay diet*) dijeta. MIND dijeta način je prehrane koji kombinira načela Mediteranske i

DASH (eng. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*) dijete te naglasak stavlja na hranu biljnog podrijetla. Temelji se na visokom unosu povrća, voća, orašastih plodova, cjelovitih žitarica, mahunarki, maslinova ulja i ribe te umjerenoj konzumaciji mesa i crvenog vina. Pozitivno djeluje na smanjenje i prevenciju neurodegenerativnih promjena mozga i poboljšanje funkcije živčanog sustava, a pokazala se učinkovitom i kod kognitivnog pada koji se događa prilikom starenja (Grajek i sur., 2022).

## Glavne komponente Mediteranske i MIND dijete važne za mentalno zdravlje

Mogući temeljni mehanizmi pozitivnog učinka hrane na mentalno zdravlje i kardiometaboličke čimbenike rizika rezultat su uglavnom zajedničkog međudjelovanja različitih komponenti. Mediteranska i MIND dijeta su obrasci prehrane koji obiluju povrćem i voćem, a samim time i različitim mikronutrijentima koji pozitivno djeluju na smanjenje rizika od kognitivnog pada – folatima, vitaminom E, karotenoidima i flavonoidima. Osim toga, različite fitokemikalije i prehrambena vlakna mogu utjecati na produljenje osjećaja sitosti, odgođeno pražnjenje želuca, bolju glukoregulaciju i kontrolu tjelesne mase. Složeni ugljikohidrati i vitamini B skupine općenito pospješuju neurološke funkcije te potiču sintezu serotoninu. Orašasti plodovi i sjemenke su skupina hrane koja ima visok udio antioksidansa te  $\alpha$ -linolensku omega-3 masnu kiselinu; doprinose smanjenju upalnih procesa, smanjenju stvaranja slobodnih radikala i lipidne peroksidacije čime se smanjuje rizik za kognitivni pad. Sastavni dio ovih obrazaca prehrane je i bobičasto voće koje obiluje antocijanima koji mogu utjecati na snižavanje razine oksidativnog stresa smanjujući broj prouparnih molekula. Slično djelovanje imaju i topljiva vlakna te fitosteroli koji mogu utjecati i na smanjenje koncentracije kolesterola. Omega-3 masne kiseline mogu utjecati na smanjenje rizika od razvoja depresije, smanjuju endotelnu disfunkciju te pospješuju kardiometaboličko zdravlje. Maslinovo ulje izvor je fenolnih spojeva i jednostruko nezasićenih masnih kiselina koji mogu utjecati na smanjenje neuroloških oštećenja, kognitivni pad, koncentracije LDL kolesterola i triglicerida te povećanje koncentracije HDL kolesterola. Umjerena konzumacija crvenog vina (izvor resveratrola, katehina, epikatehina, kvercetina, antocijanina i procijanidina) dokazano može doprinijeti smanjenju upalnih procesa i indeksa inzulinske rezistencije (HOMA-IR), pospješiti endotelnu funkciju te dovesti do porasta koncentracije HDL kolesterola (Ardekani i sur., 2023).

## Crijevna mikrobiota

Crijevna mikrobiota i njezini metaboliti mogu imati važnu ulogu u mentalnom zdravlju kroz crijevno - moždanu os. Sastav crijevne mikrobiote tj. brojnost određenih bakterijskih vrsta (osobito iz roda *Firmicutes* i *Bacteroides*) povezani su s nekoliko mentalnih poremećaja, kao što su npr. anksioznost, depresija, bipolarni poremećaj, shizofrenija i spektar autističnih poremećaja (ASD). Epidemiološka, eksperimentalna i klinička istraživanja pokazala su da mnoge vrste probiotika (osobito *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*), prebiotika (npr. prehrambena vlakna, galaktooligosaharidi, alfa-laktalbumin), sinbiotika, postbiotika (proizvodi metabolizma bakterija, npr. kratkolančane masne kiseline (eng. *short-chain fatty acids*, SCFA)), fermentiranih mlijecnih proizvoda, začina (kurkumin, kapsaicin), voća, povrća i ljekovitog bilja mogu sprječiti i/ili doprinijeti liječenju mentalnih poremećaja kroz modulaciju crijevne mikrobiote (Xiong i sur., 2023). Randomizirano kontrolirano istraživanje koje je proučavalo utjecaj visokog unosa prebiotika iz hrane u odnosu na suplementaciju probioticima, kao i njihov sinbionički utjecaj na simptome vezane za mentalno zdravlje kod odraslih, kroz period od 8 tjedana, dalo je preliminarne rezultate koji ukazuju na pozitivan utjecaj prehrane, ali ne i značajniji utjecaj suplementacije. Potencijalni razlog tome je to što je skupina koja je konzumirala veću količinu prebiotika iz hrane, osim toga, poboljšala i ukupnu kvalitetu prehrane, povećala konzumaciju i drugih oblika prehrambenih vlakana, minerala, vitamina, fitokemikalija i drugih biološki aktivnih komponenti. Prehrana je uključivala minimalno prerađenu hranu, bogatu prebioticima (frukto- i galaktooligosaharidima, inulinom,  $\beta$ -glukanom, otpornim škrobom, polifenolima) te je dovela do poboljšanja primarnih ishoda (ukupni poremećaji raspoloženja) (eng. *total mood disturbance*, TMD), ali i onih sekundarnih (anksioznost, depresija, percipirani stres i kvaliteta spavanja). U grupi koja je uzimala probiotike kao dodatak prehrani, došlo je do poboljšanja u vidu opće dobrobiti (eng. *well being*) (Freijy i sur., 2023). S druge strane, meta analiza koja je uključivala 12 randomiziranih kontroliranih istraživanja, pokazala je određeni pozitivni utjecaj suplementacije probioticima kod oboljelih od psihiatrijskih poremećaja (smanjenje težine simptoma depresije, smanjenje koncentracije C-reaktivnog proteina (eng. *C-reactive protein*, CRP), interleukina 10 i malondialdehida – fiziološkog metabolita i markera oksidativnog stresa). Međutim, nije došlo do značajnije promjene u koncentracijama drugih upalnih markera – čimbenika tumorske nekroze alfa (eng. *tumor necrosis factor-alfa*, TNF- $\alpha$ ),

interleukina 1 i interleukina 6, dušikova oksida, glutationa (GSH) i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (Amirani i sur., 2020).

Dvosmjerni odnos između mozga i crijeva tj. crijevne mikrobiote ne samo da utječe na apsorpciju i iskorištavanje hranjivih tvari, nego ima značajan utjecaj na kognitivne procese, regulaciju raspoloženja, neuroplastičnost i druge pokazatelje mentalnog zdravlja. Neuroplastičnost podrazumijeva sposobnost mozga da se razvija i mijenja, sposobnost za prilagodbu i neuralnu regeneraciju, kao odgovor na različite podražaje. Brojne hranjive tvari s epigenetskim potencijalom prisutne su u hrani ili nastaju kao produkt mikrobnog metabolizma (npr. SCFA, vitamini B skupine, polifenoli). Stoga je važno pravilnom i raznolikom prehranom poticati i održavati zdravlje i raznolikost crijevne mikrobiote što će dalje doprinijeti zdravlju i funkciji mozga i živčanog sustava (Merlo i sur., 2024).

## Zaključak

Potaknuti brzom urbanizacijom i izloženosti stresu, način života, prehrana i tjelesna aktivnost, značajno su se promijenili posljednjih desetljeća. Kao stanovnici urbaniziranih zemalja, suočeni smo s paradoxom; unatoč gotovo neograničenoj dostupnosti hrane, često se preferira nutritivno siromašna, energijski bogata, uglavnom industrijski prerađena hrana. Kao rezultat bilježi se sve veći porast povećane tjelesne mase i pretilosti te vezanih kroničnih nezaraznih bolesti uključujući i mentalne bolesti. Brojna znanstvena istraživanja potiču uključivanje ključnih makronutrijenata i mikronutrijenata u uravnoteženu i raznoliku prehranu te općenito usvajanje zdravog načina života, s ciljem očuvanja mentalnog zdravlja. Nutritivne intervencije, s ciljem prevencije i/ili bolje regulacije i liječenja već razvijenih poremećaja, stoga su važan, ako ne i glavni, promjenjivi čimbenik rizika te važna komponenta u očuvanju zdravlja i optimalnog funkcioniranja mozga i živčanog sustava.

## Literatura

- American Psychological Association (2012): Stress in America: Our health at risk. Dostupno na: <http://www.apa.org/news/press/releases/stress/2011/final-2011.pdf>.
- Amirani, E., Milajerdi, A., Mirzaei, H., Jamilian, H., Mansournia, M.A., Hallajzadeh, J., Ghaderi, A. (2020): The effects of probiotic supplementation on mental health, biomarkers of inflammation and oxidative stress in patients with psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Complement Ther Med.* 49, 102361.

- Ardekani, A.M., Vahdat, S., Hojati, A., Moradi, H., Tousi, A.Z., Ebrahimzadeh, F., Farhangi, M.A. (2023): Evaluating the association between the Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) diet, mental health, and cardio-metabolic risk factors among individuals with obesity, *BMC Endocr Disord.* 23 (1), 29.
- Austin, J., Marks, D. (2008): Hormonal regulators of appetite, *Int J Pediatr Endocrinol.* 2009, 1-9.
- Dfarhud, D., Malmir, M., Khanahmadi, M. (2014): Happiness & health: the biological factors-systematic review article, *Iran J Public Health* 43(11), 1468.
- Finch, L.E., Tiongco-Hofschneider, L., Tomiyama, A.J. (2019): Stress-induced eating dampens physiological and behavioral stress responses. In: Nutrition in the prevention and treatment of abdominal obesity, Academic Press, pp. 175-187.
- Freijy, T.M., Cribb, L., Oliver, G., Metri, N.J., Opie, R.S., Jacka, F.N., Hawrelak, J.A., Rucklidge, J.J., Chee Ng, H., Sarris, J. (2023): Effects of a high-prebiotic diet versus probiotic supplements versus synbiotics on adult mental health: The “Gut Feelings” randomised controlled trial, *Front Neurosci.* 16, 1097278.
- Friedrich, M.J. (2017): Depression is the leading cause of disability around the world, *JAMA* 317, 1517.
- Gahagan, S. (2012): The development of eating behavior-biology and context, *J Dev Behav Pediatr.* 33 (3), 261.
- Gasmi, A., Nasreen, A., Menzel, A., Gasmi Benahmed, A., Pivina, L., Noor, S., Peana, M., Chirumbolo, S., Bjørklund, G. (2023): Neurotransmitters Regulation and Food Intake: The Role of Dietary Sources in Neurotransmission, *Molecules* 28 (1), 210.
- Gemesi, K., Holzmann, S. L., Kaiser, B., Wintergerst, M., Lurz, M., Groh, G., Böhm, M., Krcmar, H., Gedrich, K., Hauner, H., Holzapfel, C. (2022): Stress eating: an online survey of eating behaviours, comfort foods, and healthy food substitutes in German adults, *BMC Public Health* 22 (1), 391.
- Godos, J., Currenti, W., Angelino, D., Mena, P., Castellano, S., Caraci, F., Galvano, F., Del Rio, D., Ferri, R., Grossi, G. (2020): Diet and mental health: Review of the recent updates on molecular mechanisms, *Antioxidants* 9 (4), 346.
- Goldstein, D.S. (2010): Adrenal Responses to Stress, *Cell Mol Neurobiol.* 30, 1433-1440.
- Grajek, M., Krupa-Kotara, K., Bialek-Dratwa, A., Sobczyk, K., Grot, M., Kowalski, O., Staśkiewicz, W. (2022): Nutrition and mental health: A review of current knowledge about the impact of diet on mental health, *Front Nutr.* 9, 943998.
- Heidari, M., Khodadadi Jokar, Y., Madani, S., Shahi, S., Shahi, M. S., Goli, M. (2023): Influence of food type on human Psychological–Behavioral responses and crime reduction, *Nutrients* 15 (17), 3715.
- Holford, P. (2003): Depression: the nutrition connection, *Prim. Care Ment. Health* 1 (1), 9-16.
- Hyldelund, N.B., Frederiksen, C., Byrne, D.V., Andersen, B.V. (2022): Is stress taking the pleasure out of food? - A characterization of the food pleasure profiles, appetite, and eating behaviors of people with chronic stress, *Foods* 11 (13), 1980.
- Ingle, V.K., Pandey, I., Singh, A.R., Pakhare, A., & Kumar, S. (2017): Screening of Patients with Chronic Medical Disorders in the Outpatient Department for Depression Using Handheld Computers as Interface and Patient Health Questionnaire-9 as a Tool, *Int J Appl Basic Med Res.* 7 (2), 129-133.
- López-Taboada, I., González-Pardo, H., Conejo, N.M. (2020): Western diet: implications for brain function and behavior, *Front Psychol.* 11, 564413.
- Ma, Y., Xiang, Q., Yan, C., Liao, H., Wang, J. (2021): Relationship between chronic diseases and depression: the mediating effect of pain, *BMC Psychiatry* 21(1), 436.
- Merlo, G., Bachtel, G., Sugden, S.G. (2024): Gut microbiota, nutrition, and mental health, *Front Nutr.* 11, 1337889.
- Michels, N. (2019): Biological underpinnings from psychosocial stress towards appetite and obesity during youth: research implications towards metagenomics, epigenomics and metabolomics, *Nutr Res Rev.* 32 (2), 282-293.
- Moris, J.M., Heinold, C., Blades, A., Koh, Y. (2022): Nutrient-based appetite regulation, *J Obes Metab Syndr.* 31 (2), 161.
- Mörköl, S., Wagner-Skacel, J., Lahousen, T., Lackner, S., Holasek, S.J., Bengesser, S.A., Painold, A., Reininghaus, E. (2020): The role of nutrition and the gut-brain axis in psychiatry: a review of the literature, *Neuropsychobiology* 79 (1), 80-88.
- Muscaritoli, M. (2021): The impact of nutrients on mental health and well-being: insights from the literature, *Front Nutr.* 97.
- Pruneti, C., Guidotti, S. (2023): Need for Multidimensional and Multidisciplinary Management of Depressed Preadolescents and Adolescents: A Review of Randomized Controlled Trials on Oral Supplementation (Omega-3, Fish Oil, Vitamin D3), *Nutrients* 15 (10), 2306.
- Ranabir, S., Reetu, K. (2011): Stress and hormones, *Indian J Endocrinol Metab.* 15 (1), 18-22.
- Santomauro, D.F., Mantilla Herrera, A.M., Shadid, J., Zheng, P., Ashbaugh, C., Pigott, D.M. .... (2021): Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic, *Lancet* 398 (10312), 1700-1712.
- Read, J.R., Sharpe, L., Modini, M., Dear, B.F. (2017): Multimorbidity and depression: A systematic review and meta-analysis, *J Affect Disord.* 221, 36-46.
- Tomiyama, A.J., Finch, L.E., Cummings, J.R. (2015): Did that brownie do its job? Stress, eating, and the biobehavioral effects of comfort food. In: Emerging trends in the social and behavioral sciences, John Wiley & Sons, Inc., pp. 1-15.
- World Health Organization (2022): Mental Health and COVID-19: Early evidence of the pandemic's impact. Dostupno na: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/352189/WHO-2019-nCoV-Sci-Brief-Mental-health-2022.1-eng.pdf?sequence=1>.

Xiong, R. G., Li, J., Cheng, J., Zhou, D.D., Wu, S. X., Huang, S.Y., Saimaiti, A., Yang, Z.J., Gan, R.Y., Li, H.B. (2023): The role of gut microbiota in anxiety, depression, and other mental disorders as well as the protective effects of dietary components, *Nutrients* 15 (14), 3258.

Zhang, Y., Chen, Y., Ma, L. (2018): Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding, *J Clin Neuroscience*. 47, 1-5.

## INFLUENCE OF NUTRITION ON MOOD AND MENTAL HEALTH

**Valentina Rahelić<sup>1,2,3</sup>, Josipa Matanić<sup>1</sup>, Sandra Bival<sup>1</sup>, Zrinka Šmuljić<sup>1,2</sup>, Eva Pavić<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>University Hospital Center Zagreb, Department of Nutrition and Dietetics, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup>University of Applied Health Sciences, Mlinarska cesta 38, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>3</sup>University North, Department of Food Technology, 48000 Koprivnica, Croatia

*review paper*

### Summary

Over the past decades, a significant increase in the prevalence of mental health disorders has been recorded, parallel to changes in lifestyle, diet and physical activity. It is estimated that more than 300 million of world's population suffer from depression, and more than 260 million from anxiety disorders. Nutrition and its various bioactive components are recognized as modifiable risk factors that can influence on pathogenesis of mental disorders and the underlying mechanisms of the positive effect are the result of the joint interaction of various components. Recommended dietary patterns with a positive effect on health, brain and nervous system are Mediterranean and MIND diets, which emphasize plant-based foods. These dietary patterns are a source of various nutrients crucial for mental health (phytochemicals, flavonoids and carotenoids, omega-3 fatty acids, folic acid, vitamin E, zinc and magnesium, dietary fiber, etc.). In addition, they contribute to the health and diversity of gut microbiota, and its metabolites can play an important role in mental health through the gut-brain axis. Through this two-way pathway, various hormones and neurotransmitters affect the regulation of hunger and satiety, as well as mood and stress, which are also regulated by hormones. Adopting a healthy lifestyle, which includes a balanced diet, will contribute to the preservation of mental health and prevention and/or treatment of already developed disorders.

**Keywords:** mental health, stress, Mediterranean diet, MIND diet

## IDENTIFIKACIJA I RAZLIKE HACCP I HRACCP NA PRIMJERU MLIJEČNE INDUSTRIJE

Kemal Sejranić<sup>1\*</sup>, Damir Alihodžić<sup>1</sup>, Benjamin Muhamedbegović<sup>2</sup>,  
Muamer Mandra<sup>3</sup>, Arnela Smajić<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Agencija za certificiranje halal kvalitete, Turalibegova 73, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup>Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, Univerzitetska br. 8, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

<sup>3</sup>Perutnina Ptuj BH, Potkrajska BB, 71370 Breza, Bosna i Hercegovina

<sup>4</sup>FINRA Univerzitet, Mitra Trifunovića Uče br.9, 75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

pregledni rad

### Sažetak

Rad analizira implementaciju i primjenu sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) i HrACCP (Haram Analysis Critical Control Points) u mliječnoj industriji, s posebnim osvrtom na osiguranje sigurnosti hrane i usklađenost proizvoda sa halal standardom za hranu. HACCP sistem je globalno prepoznat kao ključni alat za identifikaciju, procjenu i kontrolu bioloških, kemijskih i fizičkih opasnosti u prehrambenoj industriji. U mliječnoj industriji, primjena HACCP-a uključuje identifikaciju opasnosti, određivanje kritičnih kontrolnih točaka (CCP), postavljanje kritičnih granica, praćenje tih točaka, provođenje korektivnih mjeru u slučaju odstupanja, te verifikaciju i evidenciju cijelog procesa.

HrACCP sistem, s druge strane, predstavlja specifičan pristup prilagođen halal standardima, s fokusom na identifikaciju i kontrolu točaka u proizvodnom procesu koje bi mogle učiniti proizvod nehalal (haram). Ovo uključuje nabavku sirovina iz halal izvora, osiguranje čistoće opreme, te kontrolu skladištenja i transporta kako bi se spriječila kontaminacija haram supstancama. Rad naglašava važnost kombinovanja oba sistema u mliječnoj industriji radi proizvodnje sigurnih i halal proizvoda, čime se zadovoljavaju zahtjevi kako sigurnosnih standarda, tako i islamskih propisa. Kroz primjere iz prakse, rad pokazuje kako se HACCP i HrACCP integriraju u različite faze proizvodnje mliječnih proizvoda, osiguravajući time njihovu kvalitetu i usklađenost sa standardima.

*Ključne riječi:* HACCP, HrACCP, zdravstvena ispravnost, halal, haram

### Uvod

U osiguranju kvaliteta, zdravstvene i higijenske ispravnosti hrane koristi se niz standarda koji se mogu implementirati u proizvodnim pogonima. Jedan od sistema koji se bavi osiguranjem i upravljanjem zdravstvenom i higijenskom ispravnosti hrane je HACCP.

HACCP je sistematski preventivni pristup sigurnosti hrane koji identificira, procjenjuje i kontrolisce opasnosti u procesu proizvodnje i obrade hrane. Zasnovan je na naučnim saznanjima preko kojeg se identificuju konkretnе opasnosti i mјere za kontrolu istih, s konačnim ciljem osiguranja zdravstvene ispravnosti i sigurnosti hrane. HACCP je primjenjiv u svim fazama proizvodnje prehrambenog proizvoda. Svi koji dolaze u dodir sa proizvodom u bilo kojoj fazi njegove obrade, prerade ili distribucije treba da primjenjuju HACCP principe (Šehović, 2023).

Pored HACCP-a postoji i niz drugih standarda koji se bave osiguranjem zdravstvene i higijenske ispravnosti proizvoda. U grupu standarda koji pored halal statusa proizvoda zahtijevaju i osiguranje zdravstvene i higijenske ispravnosti proizvoda je i Halal standard BAS 1049:2023 Halal hrana, zahtjevi i mјere. Kako je navedeno u području primjene: Halal standardom

utvrđuju se zahtjevi i mјere za sve procese i proizvode/usluge koji se moraju uskladiti s islamskim pravilima kako bi se ispunili uvjeti za dobijanje certifikata za halal kvalitet. Svi zahtjevi ovog standarda su generički i primjenjivi na sve organizacije u prehrambenom lancu bez obzira na veličinu i složenost (BAS 1049:2010 – Halal hrana zahtjevi i mјere, 2023). Općenito, halal označava sve stvari i postupke koji su dozvoljeni prema islamskim propisima. Sirovine, aditivi i drugi sastojci u hrani mogu imati različit status u skladu s islamskim propisima, ovisno o tome jesu li dozvoljeni, zabranjeni ili sumnjivi, odnosno jesu li halal, haram ili mešuh. Halal hrana je ona koja je prema islamskim propisima dozvoljena, haram hrana je zabranjena i potencijalno ili dokazano štetna za um i tijelo, dok je mešuh hrana sumnjiva i smatra se haramom (nedozvoljenom) dok se ne dokaže suprotno. Da bi određeni prehrambeni proizvod bio potvrđen kao halal – dozvoljen, mora biti proizveden u skladu s halal standardima i proći kontrolu nadležnih institucija ovlaštenih za izdavanje halal certifikata i oznaka (Topoljak, 2010; Riaz and Chaudry, 2019).

HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) i Haram CCP (Critical Control Points za Haram - HrCCP) su dva koncepta koja se koriste u

prehrambenoj industriji za osiguranje zdravstvene i higijenske ispravnosti, te usklađenosti proizvoda sa islamskim principima. Generalno većina zahtjeva koji su propisani prema HACCP-u su istovjetni i primjenjivi u zahtjevima halal standarda, odnosno definisanju i izradi HrACCP planova. Kada se govori o dokumentiranosti oba sistema, gdje god je moguće, može se uraditi integracija, vođenje i upravljanja dokumentacijom (zapise, evidencije, radna uputstva i sl.), osim u slučajevima gdje se zahtjevi HACCP-a razlikuju od zahtjeva halal standarda. Tako na primjer ukoliko je prema HACCP proceduri u procesu pasterizacije mlijeka određena i HrACCP, dovoljno je samo na dijagramu toka proizvodnje i pratećoj dokumentaciji odrediti, opisati i označiti te točke. Međutim, kada se radi o zahtjevima gdje zahtjevi HACCP-a nisu definisani, kao npr. osoba na liniji klanja u klaonici, tada je potrebno da se na tom mjestu definiše HrACCP, te se navedena točka detaljno opiše i jasno označi u dijagramu toka proizvodnje (Jašić i Alihodžić, 2022).

## HACCP u mliječnoj industriji

Mlijeko i mliječni proizvodi su osnovne namirnice u ljudskoj ishrani i spadaju u grupu najosjetljivijih proizvoda s aspekta očuvanja zdravstvene ispravnosti tokom proizvodnje, distribucije i konzumacije (Bijeljac i Sarić, 2005). Kako bi se očuvalo povjerenje potrošača i zadržala konkurentna pozicija na tržištu, od ključne je važnosti kontrolirati uvjete pod kojima se odvija proces proizvodnje i prerade. Time se osigurava ujednačen kvalitet i higijenska ispravnost proizvoda.

Higijenski ispravno mlijeko, a samim time i mliječni proizvodi, mogu se dobiti isključivo od zdravih životinja. Takvo mlijeko ne smije sadržavati patogene bakterije niti rezidue štetnih tvari koje ugrožavaju ljudsko zdravlje, poput antibiotika i drugih antibakterijskih supstanci korištenih u veterinarskoj praksi, pesticida, dezinficijensa ili drugih štetnih tvari. Upotreba antibiotika u stočarstvu pomogla je u suzbijanju mnogih zaraznih bolesti, ali je također stvorila probleme u mljekarstvu. Antibiotici mogu dospjeti u mlijeko nakon terapije bolesti ili kao dodatak stočnoj hrani. Vrijeme izlučivanja antibiotika iz organizma životinja varira u zavisnosti od vrste lijeka, količine, načina primjene, starosti životinje, njenog zdravstvenog stanja, stadija laktacije, te individualnih karakteristika životinje (Pintić i sur., 2006).

Prema Zakonu o zdravstvenoj ispravnosti životnih namirnica i predmeta opšte upotrebe (Sl. novine FBIH br. 77/2020) namirnice ili predmeti opšte upotrebe smatraju se higijenski neispravnim ukoliko:

- Sadrže patogene mikroorganizme, parazite ili njihove izlučevine koje mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi.
- Sadrže pesticide, toksične metale, metaloide, hemioterapeutike, anabolike i druge otrovne supstancije u količinama opasnim po zdravlje.
- Potiču od uginulih životinja ili životinja oboljelih od bolesti koje mogu štetiti ljudskom zdravlju.
- Sadrže mehaničke nečistoće koje mogu biti štetne ili izazivaju gađenje.
- Sadrže nedozvoljene aditive, aditive u nedozvoljenim količinama ili su aditivi tehnološki nepravilno primjenjeni.
- Imaju izmijenjen sastav ili organoleptička svojstva (ukus, miris, izgled) uslijed fizičkih, kemijskih, mikrobioloških ili drugih procesa i nisu prikladni za ishranu.
- Sadrže radionuklide iznad dozvoljenih granica ili su ozračeni iznad zakonom propisanih limita.
- Imaju sastav ili druga svojstva koja mogu štetno uticati na zdravlje ljudi.

Cilj identifikacije i analize opasnosti je vezan za istraživanje kemijskih, fizičkih i mikrobioloških osobina svježeg mlijeka i poduzimanje mjera za poboljšanje istih primjenom HACCP sistema kontrole.

U tehničko tehnološkom pogledu cilj je bolja usklađenost tehnoloških linija, optimizacija procesa proizvodnje i definisanje svih mogućih predviđenih opasnosti u tehnološkom toku.

Ekonomski motiv je sprečavanje šteta, smanjenje škarta i povrata, povećanje sigurnosti i planirane dobiti.

Moguće je identificirati tri vrste potencijalnih opasnosti u mlijeku i mliječnim proizvodima, a to su: fizičke, kemijske i mikrobiološke opasnosti,

## Fizičke opasnosti

Sirovo mlijeko mora imati svojstven izgled, boju, miris i okus. Bijelo do blago žute boje, bez stranih mirisa (osim onog karakterističnog za mlijeko), da se ne osjeti miris na štalu ili na miris neisprane kante.

Sirovo mlijeko ne smije sadržavati nikakve vanjske mehaničke nečistoće (ostaci trave ili sijena, staklo, drvo, željezo, pjesak, plastike, nokti, nakit radnika i sl.).

Mlijeko se mora odmah poslije muže, a najduže u roku 2 sata, ohladiti na temperaturu do 6 °C. Mlijeko ne smije sadržavati dodane količine vode (Keran i sur., 2007; Pračić i sur., 2019).

## Kemijske opasnosti

Prema *Pravilniku o sirovom mlijeku* (Sl. glasnik BiH br. 21/2011) sirovo mlijeko mora ispunjavati slijedeće zahtjeve kvaliteta:

- da sadrži najmanje 3.2 % mliječne masti
- da sadrži najmanje 3 % bjelančevina
- da sadrži najmanje 8.5 % suhe tvari bez masti
- da mu je gustoća od 1.028 do 1.034 g/cm na temperaturi od 20 °C
- da mu je kiselinski stepen od 6.6 do 6.8 ° SH, a pH vrijednost od 6.5 do 6.7
- da mu točka ledišta nije viša od - 0,517 °C
- da mu je rezultat alkoholne probe sa 72 % etilnim alkoholom negativan.
- Sirovo mlijeko ne smije sadržavati rezidue iznad dozvoljene količine koje imaju farmakološko ili hormonalno djelovanje te antibiotike, pesticide, detergente i druge štetne tvari koje mijenjaju organoleptička svojstva mlijeka.

- Dozvoljene količine rezidua i štetnih tvari propisane su posebnim veterinarsko zdravstvenim propisima.

## Mikrobiološke opasnosti

Prisustvo povećanog broja mikroorganizama u mlijeku, naročito štetnih, umanjuje njegov kvalitet i higijensku ispravnost i predstavlja opasnost za potrošača. Kontrolu kvaliteta neophodno je prilagoditi uslovima proizvodnje i ne ograničiti je na važeće propise o kvalitetu i higijenskoj ispravnosti, nego proširiti i prilagoditi novim propisima u Evropskoj uniji.

Prema *Pravilniku o higijeni hrane životinjskog porijekla* (Službeni glasnik BiH br. 103/2012) sirovo mlijeko mora zadovoljiti kriterije u pogledu broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija prikazanih u Tablici 1.

**Tablica 1.** Kriteriji za sirovo kravljie mlijeko (*Pravilnik o higijeni hrane životinjskog porijekla* - Službeni glasnik Bosne i Hercegovine br. 103/2012)

**Table 1.** Criteria for raw cow's milk (*Regulation on the hygiene animal origin of food* - Službeni glasnik Bosne i Hercegovine br. 103/2012)

Broj mikroorganizama (broj kolonija na podlozi) na 30 °C (u 1 ml)	< 100 000
Broj somatskih ćelija (u 1 ml)	< 400 000 (**)

Najznačajniji mikrobiološki indikatori fekalnog zagadenja su *Escherichia coli*, termotolerantne (fermentišu laktuzu na 44-45 °C) i druge koliformne bakterije

(G - štapičaste bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*) te fekalne streptokoke.

**Tablica 2.** Primjer ograničenja mikroorganizama u određenim mliječnim proizvodima propisani *Pravilnikom o mikrobiološkim kritirenjima za hranu* (Službeni glasnik BiH br. 11)

**Table 2.** Example of restrictions on microorganisms in certain dairy products prescribed by the *Rulebook on Microbiological Criteria for Food* (Službeni glasnik BiH br. 11)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi	Ograničenja		Faza u kojoj se kriterij primjenjuje	Radnja u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		M	M		
Pasterizirano mlijeko i drugi pasterizirani tečni mliječni proizvodi	<i>Enterobakterije</i>	10 cfu/ml		Završetak proizvodnog procesa	Provjeriti djelotvornost termičke obrade i sprečavanje ponovne kontaminacije kao i kvalitet sirovina
Sirevi pravljeni od mlijeka ili surutke koji su podvrgnuti termičkoj obradi	<i>E.coli</i>	100 cfu/g	1 000 cfu/g	U onom momentu tokom procesa proizvodnje kada se očekuje najveći zbir <i>E. coli</i>	Unapređenje higijene proizvodnje i selekcije sirovina

Pored ograničenja prisustva za *Enterobakterije* i *E. coli* postoje i ograničenje i drugih mikroorganizama

kao što su *Koagulaza pozitivne stafilocoke* pirisustvo *Bacillus cereus*.

U mlijeko industriji, HACCP planovi obuhvataju sedam sljedećih principa: identifikaciju opasnosti, određivanje kritičnih kontrolnih točaka, postavljanje kritičnih granica, praćenje kritičnih kontrolnih točaka, korektivne mjere, verifikacija i evidencija. Implementacija ovih principa u okviru HACCP sistema omogućava proaktivno upravljanje rizicima i osigurava proizvodnju sigurne hrane.

**Identifikacija opasnosti** u HACCP sistemu je ključni korak u osiguravanju zdravstvene ispravnosti hrane. Proces identifikacije opasnosti uključuje prepoznavanje bioloških, kemijskih i fizičkih opasnosti koje mogu ugroziti sigurnost hrane tokom različitih faza proizvodnje, prerade i distribucije (Keran, 2009). Pregled svakog koraka u dijagramu toka i identifikacija mogućih bioloških, kemijskih i fizičkih opasnosti. Ovo uključuje:

- Biološke opasnosti (Bakterije, virusi, paraziti, pljesni, kvasti)
- Kemijske opasnosti (Pesticidi, veterinarski lijekovi, alergeni, industrijske kemikalije)
- Fizičke opasnosti (Metalni fragmenti, staklo, plastika, drvo, kosti)

Sve ove opasnosti su moguće i predstavljaju potencijalni rizik kada je riječ o preradi mlijeka i proizvodnji mlijecnih proizvoda.

**Određivanje kritičnih kontrolnih točaka (CCP)** je proces u kojem se identificuju točke u proizvodnom procesu gdje se mogu primijeniti kontrolne mjere kako bi se spriječile, eliminisale ili smanjile opasnosti za sigurnost hrane (Pračić i sur., 2019). Ovaj proces uključuje analizu svih faza proizvodnje, identifikaciju potencijalnih opasnosti i određivanje ključnih točaka gdje je kontrola neophodna za osiguranje sigurnosti proizvoda. CCP je pasterizacija mlijeka, jer je to ključna točka gdje se eliminiraju patogeni mikroorganizmi. Ove točke se potom prate i kontroliraju kako bi se osigurala sigurnost i kvalitet proizvoda. Takođe, CCP može biti i uslovi skladištenja i transporta, odnosno hladni lanac kako bi se osigurala sirovina do samog prijema u mljekari (Keran i sur., 2007).

**Postavljanje kritičnih granica** je proces određivanja specifičnih kriterija na kritičnim kontrolnim točkama koje moraju biti ispunjene kako bi se osigurala sigurnost hrane. Mjerljivi parametri kojima se upravlja CCT u mlijeko industriji najčešće su temperatura, vrijeme, razina vlage i pH (Mortimore i Wallace, 2001). Te granice, kao što su određena temperatura ili pH vrijednost, definišu se na osnovu naučnih podataka i standarda kako bi se eliminisale ili smanjile

identificirane opasnosti na prihvatljiv nivo. U mlijeko industriji, kritična granica za pasterizaciju može biti minimalna temperatura koja mora biti postignuta da bi se uništili štetni mikroorganizmi (Pračić i sur., 2019).

**Praćenje kritičnih kontrolnih točaka (CCP)** podrazumijeva kontinuirano ili periodično provjeravanje da li su kritične granice na tim točkama ispunjene. Ovo uključuje mjerjenje i zapisivanje relevantnih podataka, kao što su temperatura, pH vrijednost ili vrijeme, kako bi se osiguralo da procesi ostaju unutar definiranih granica. Praćenje omogućava brzo otkrivanje odstupanja i poduzimanje korektivnih mjeru kako bi se spriječilo da nesigurni proizvodi dođu do potrošača. Praćenje propisane temperature i vremena zadržavanja tokom pasterizacije mlijeka osigurava eliminaciju patogenih te je jamačno zdravstveni ispravan proizvod (Pračić i sur., 2019).

**Korektivne mjere** su postupci koji se primjenjuju kada praćenje kritičnih kontrolnih točaka (CCP) pokaže da su kritične granice prekršene. Njihov cilj je da se povrati kontrola nad procesom i osigura sigurnost hrane. To može uključivati prilagođavanje procesa, ponovnu obradu proizvoda, ili čak eliminaciju proizvoda koji ne zadovoljavaju sigurnosne standarde. Korektivne mjere također uključuju identifikaciju uzroka odstupanja i primjenu promjena kako bi se spriječilo ponavljanje problema. Ukoliko se u mlijeko industriji utvrdi da temperatura pasterizacije nije dostigla minimalnu propisanu vrijednost, mlijeko se ponovno pasterizuje na propisanoj temperaturi kroz propisano vrijeme zadržavanja na istoj. Takav proizvod ima status neusaglašenog proizvoda do rješavanja njegove neusaglašenosti provođenjem korektivnih mjeru, odnosno otpisa, prerade ili u ovom slučaju dorade proizvoda. Time se osigurava proizvod koji je zdravstveno ispravan za konzumiranje tokom vremena roka trajanja koji je naznačen na ambalaži proizvoda (Keran, 2009).

**Verifikacija** je proces kojim se potvrđuje da HACCP sistem efikasno funkcioniše i da osigurava sigurnost hrane. To uključuje pregled svih aspekata HACCP plana, poput testiranja proizvoda, analize zapisa, i provjere postupaka praćenja i korektivnih mjeru. Cilj verifikacije je osigurati da su sve kritične kontrolne točke (CCP) pod kontrolom i da kritične granice nisu prekoračene, te da su sve primjenjene mjeru efikasne u eliminaciji ili smanjenju identificiranih opasnosti. U mlijeko industriji, kao i drugim prehrabbenim industrijama, verifikacija može uključivati laboratorijske analize mlijeka kako bi se potvrdilo da

ne sadrži štetne mikroorganizme, kao i da je broj ukupnih mikroorganizama na dopuštenom nivou prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

**Ustavljanje dokumentacije i evidencije** u HACCP sistemu uključuje detaljno bilježenje svih postupaka, mjerena, praćenja, korektivnih mjera i rezultata verifikacije. Cilj je osigurati trag podataka koji potvrđuju da su svi procesi vođeni u skladu s utvrđenim standardima sigurnosti hrane. Ova dokumentacija omogućava praćenje i pregledanje svih faza proizvodnje, pomaže u identifikaciji i rješavanju problema, te je neophodna za revizije i inspekcije. Na primjer, u mliječnoj industriji, zapisi o temperaturama tokom pasterizacije, rezultatima mikrobioloških testova i korektivnim mjerama se čuvaju kako bi se dokazala usklađenost s HACCP planom.

## HrACCP u mliječnoj industriji

Halal hrana definirana je halal standardima za hranu, a prema Kohilavani i sur. (2013) treba da ispunjava šest (6) glavnih uvjeta. Prvi uvjet je da proizvod ili sastojak mora biti bez bilo kojih dijelova proizvoda od životinja koje nisu halal i dijelova životinja koje nisu zaklancane u skladu sa šerijatskim zakonom. Drugi uvjet je da proizvod ili sastojci ne smiju sadržavati nečistoće (najs). Treći uvjet je da je sigurno za konzumaciju, da nije otrovno, opojno ili štetno po zdravlje. Četvrti uvjet je da proizvod mora biti pripremljen, obrađen ili proizveden koristeći opremu koja je oslobođena nečistoća (najs). Peti uvjet je da mora biti bez bilo kojih ljudskih dijelova ili njihovih derivata. Na kraju, šesti uvjet je fizička odvojenost od bilo koje druge hrane koja ne ispunjava prvi pet uvjeta, tokom procesa ili opisa koji su šerijatskim zakonom proglašeni kao nečisti (najs).

Analiza harama (HrACCP) se odnosi na identifikaciju i kontrolu točaka u svim proizvodnim procesima u kojima bi moglo do narušavanja halal statusa proizvoda prema zahtjevima halal standarda. U mliječnoj industriji, to najčešće uključuje: nabavu sirovina, proizvodnju, pakovanje i označavanje, skladištenje i transport.

**Nabava sirovina.** U analizi HrACCP prema zahtjevima halal standarda nabava sirovina je ključni korak. Sve sirovine koje se koriste u proizvodnji ne smiju da sadrže haram sastojke i moraju da potječu iz halal izvora. Ovo uključuje detaljnu provjeru certifikata dobavljača, kao i analizu sastojaka kako bi se osiguralo da ne postoji kontaminacija sa zabranjenim (haram) tvarima, poput svinjskih derivata ili alkohola. U mliječnoj industriji, to znači da mlijeko,

starter kulture i svi aditivi moraju biti halal certifikovani, a svaki dobavljač mora pružiti dokaze o usklađenosti s halal standardima. Ova provjera doprinosi osiguranju da konačni proizvod bude u skladu s islamskim propisima, odnosno u skladu sa zahtjevima halal standarda (BAS 1049:2010).

**Proizvodnja.** U analizi kritičnih kontrolnih točaka (HrACCP), proizvodnja, oprema i uslovi proizvodnje moraju biti pažljivo kontrolisani kako bi se osigurala usklađenost sa zahtjevima halal standarda. Svi aspekti proizvodnog procesa trebaju biti pregledani kako bi se izbjegla kontaminacija haram supstancama. Prvo, oprema koja se koristi u proizvodnji mora biti čista i prethodno nije smjela doći u kontakt sa haram materijalima. Oprema korištena za proizvodnju haram proizvoda, mora biti temeljito očišćena i dezinficirana prema halal propisima, što često uključuje specifične metode čišćenja, te se takva vrsta čišćenja i prelaska sa haram na halal može uraditi samo jedanput s ciljem trajnog prelaska na isključivo halal proizvodnju. Također, prelazak se mora evidentirati i ovjeriti od strane nadležnog certifikacijskog autoriteta. Drugo, uslovi proizvodnje moraju biti takvi da se sprječi unakrsna kontaminacija. To podrazumijeva odvajanje proizvodnih linija za halal i haram proizvode, ako se oba tipa proizvoda proizvode u istoj fabrici. Takođe, radnici moraju biti obučeni da razumiju i poštuju halal standarde, uključujući nošenje zaštitne opreme koja sprječava kontaminaciju. Na primjer, u mliječnoj industriji, svi dodaci, enzimi i starter kulture koji se koriste moraju biti halal certifikovani, a proces pasterizacije mora biti pažljivo kontrolisan kako bi se osiguralo da nema dodira sa haram tvarima. Održavanje takvih strogih uslova proizvodnje osigurava da krajnji proizvod bude halal i prihvatljiv za potrošače koji slijede islamske prehrambene zakone (Jašić i sur., 2007).

**Pakovanje i označavanje.** U analizi haram kritičnih kontrolnih točaka (HrCCP), pakovanje i označavanje proizvoda osiguravaju da konačni proizvod ostane halal i da bude ispravno informisan potrošač. Pakovanje mora biti od materijala koji nije kontaminiran haram supstancama, te da primarna ambalaža bude usklađena sa zahtjevima halal standarda (Talib i Johan, 2012). Ovo uključuje provjeru da li su svi materijali korišteni za pakovanje, kao što su ambalaža, etikete i ljepila, halal certifikovani ili usklađeni sa zahtjevima halal standarda. Ambalaža ne smije doći u kontakt sa haram supstancama tokom skladištenja i transporta. Označavanje proizvoda treba jasno i precizno informisati potrošače o statusu proizvoda (Muhamedbegović i sur., 2018). Halal oznaka mora

biti jasno vidljiva i potvrđena od strane ovlaštene halal certifikacijske organizacije. Etiketa treba uključivati informacije o sastojcima, porijeklu sirovina i halal certifikatima, kako bi potrošači mogli biti sigurni da proizvod zadovoljava sve zahtjeve halal standarda. Na primjer, u mlijeko industriji, jogurt koji se proizvodi kao halal mora biti pakovan u posude koje nisu kontaminirane haram tvarima, a na etiketi mora biti jasno naznačeno da je proizvod halal, uz navođenje certifikacione organizacije koja je izdala halal certifikat. Time se osigurava povjerenje potrošača i sukladnost s islamskim prehrambenim zakonima (Muhamedbegović i sur., 2022).

**Skladištenje i transport.** U analizi haram kritičnih kontrolnih točaka (HrACCP), skladištenje i transport su ključni za očuvanje halal statusa proizvoda. Skladištenje mora biti organizovano tako da se halal proizvodi čuvaju odvojeno od haram proizvoda, kako

bi se izbjegla bilo kakva mogućnost kontaminacije. Proizvodi koji su proglašeni kao neusaglašen proizvod te nad njima treba sprovesti korektivne mjere, moraju biti označeni i skladišteni odvojeno od proizvoda koji su uskladišteni. Transport halal proizvoda također mora biti uređen tako da se spriječi unakrsna kontaminacija. To znači da se vozila koja se koriste za transport halal proizvoda ne smiju koristiti za transport haram proizvoda. Vozači i osoblje koje rukuje transportom moraju biti educirani i svjesni važnosti održavanja halal statusa i pridržavati se strogo definisanih procedura. Mlijeko i mlijeko proizvodi koji su halal moraju biti skladišteni u odvojenim prostorima od proizvoda koji sadrže haram sastojke. Prilikom transporta, potrebno je osigurati da su kamioni ili druga vozila čisti i certificirani za transport halal proizvoda, kako bi se osiguralo da mlijeko proizvodi budu u skladu s zahtjevima halal standardima do trenutka kada stignu do potrošača (MS 1500:2019).

**Tablica 3.** Ključne razlike u analizi CCP i HrCCP  
**Table 3.** Key differences in the analysis of CCP and HrCCP

Cilj	HACCP	Fokusira se na osiguranje sigurnosti hrane za potrošače kroz kontrolu opasnosti.
	<b>HrCCP</b>	Fokusira se na osiguranje uskladištenosti sa islamskim propisima, sa ciljem da se obezbijedi halal proizvod.
Priroda opasnosti	<b>HACCP</b>	Uključuje fizičke, kemijske i biološke opasnosti.
	<b>HrCCP</b>	Pored fizičkih, kemijskih i bioloških opasnosti, potrebno je obezbjediti da sirovine koje ulaze u sastav proizvoda imaju halal status, kao i postupci koji se sprovode kako bi se izbjeglo ohramljenje (narušavanje halal statusa proizvoda).
Kontrolne mjere	<b>HACCP</b>	Uključuje mјere kao što su pasterizacija, filtracija, laboratorijska ispitivanja.
	<b>HrCCP</b>	Uključuje mјere kao što su provjera porijekla sirovina, čišćenje opreme, odvojeno skladištenje halal i ne-halal sirovina.
Verifikacija	<b>HACCP</b>	Temelji se na znanstvenim metodama i analizi rizika.
	<b>HrCCP</b>	Temelji se analizi rizika (HrACCP) i certifikaciji od strane akreditovanih halal certifikacijskih tijela.

## Primjer u mlijeko industriji

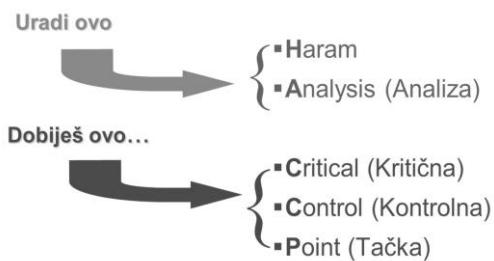
U proizvodnji jogurta, HACCP i Haram CCP mogu se primijeniti na sljedeći način:

- HACCP:** Osigurati da je mlijeko pasterizirano na odgovarajućoj temperaturi kako bi se eliminirale patogene bakterije. Redovno testiranje uzorka jogurta na prisutnost mikroorganizama.
- HrCCP:** Osigurati da se koriste samo halal certificirane starter kulture za fermentaciju jogurta. Provodenje adekvatnog čišćenja opreme prije proizvodnje halal jogurta i skladištenje jogurta u odvojenim prostorima od proizvoda koji sadrže haram sastojke.

Primjena oba sistema omogućava mlijeko industriji da proizvede sigurne i halal proizvode za potrošače koji slijede islamske prehrambene zakone.

## HACCP / HrACCP analiza u kontroli proizvodnje halal hrane

Da bi se uspostavio sistem kontrole, monitoringa i praćenja procesa proizvodnje i potvrdilo da je proizvod halal, potrebno je uspostaviti HrACCP sistem. HrACCP predstavlja analizu kompletног lanca proizvodnje u svim fazama, počevši od primarne poljoprivredne proizvodnje, zatim prerade, pakovanja i distribucije do korisnika proizvoda. Cilj analize je da se u svakoj fazi proizvodnje prepoznačaju točke koje mogu dovesti do eventualog ohramljenja. Zbog toga je preporučeno uraditi analizu harama kako bi se identificirale točke mogućeg ohramljenja, koje se skraćeno nazivaju HrACCP, prema engleskom Haram Analysis Critical Control Point, odnosno haram kritične kontrolne točke. Ovaj naziv je usvojen u formi koja je slična terminu HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) koji se odnosi na sistematski pristup identifikaciji, procjeni i kontroli opasnosti (hazarda) po sigurnost hrane.



**Slika 1.** Struktura HrACCP analize u kontroli proizvodnje halal hrane (Jašić & Alihodžić, 2022)

**Figure 1.** The structure of HrACCP analysis in the control of halal food production (Jašić & Alihodžić, 2022)

Postoji analogija u pristupu HACCP-a i HrACCP-a. Kod HACCP-a se koristi točka u kojoj može doći do kontaminacije proizvoda i stvaranje štetnih materijala po zdravlje konzumenata. Kod HrACCP-a može doći do oharamljenja proizvoda, bilo da se čini greška u koracima proizvodnje i postupanju sa sirovinama i međuproizvodima ili da se čini greška u nematerijalnom pristupu, kao što je naprimjer izgovaranje obrednih riječi prilikom halal klanja životinja. Također, to mogu biti i drugi agensi koji mogu uzrokovati oharamljenje. Metodologija i pristup HACCP-a i HrACCP-a su identični, s tim što prvi traga za hazardom ili opasnošću po sigurnost hrane, a HrACCP analizira proces da bi se otkrile kritične točke harama. Analiza sama po sebi počinje od izrade dijagrama toka proizvodnje, koji je osnova za bilo koju analizu, bilo da se radi o analizi za utvrđivanje kritičnih kontrolnih točaka ili da se radi o analizi harama i utvrđivanja kontrolnih točaka.

Prvi korak u proizvodnji je nabava sirovine i pomoćnih materijala, drugi korak je njihovo skladištenje, treći korak je obično proces prerade koji se može odvijati u više koraka i tako redom sve do isporuke proizvoda. Svaki korak je potrebno detaljno opisati i dati mu posebnu oznaku koja može biti opisna ili šifrirana. Naprimjer, prva faza može nositi oznaku A1 i odnosi se na nabavu sirovina, druga faza A2 skladištenje sirovina, treća faza A3 procesi prerade, četvrta faza A4 je skladištenje gotovog proizvoda, faza A5 je distribucija do krajnjeg kupca. Sve proizvodnje su manje-više organizirane po ovom principu.

Svaka faza se može podijeliti na više koraka koji se kasnije analiziraju. Kada se izvrši opis procesa proizvodnje sa svim inputima i outputima (ulazima i izlazima) u svakom koraku, onda se radi dijagram toka. Ovdje je važno napomenuti da svaki korak ima svoje inpute i outpute. Tako u koraku čišćenja i pranja ulaz je neočišćena, a izlaz čista sirovina, ali također ulaz je i čista voda, a izlaz otpadna voda. Mogu se, takođe, dodavati sredstva za pranje, npr. soda

bikarbona i slično. Svi ulazi i izlazi moraju biti jasno definirani jer oni mogu biti uzrok harama.

S tim u vezi može se pozvati na kur'anski ajet koji poručuje da se ne remeti red na Zemlji, a otpadna voda je vrsta harama ako šteti okolišu i ako će onečistiti vodu za piće, ukoliko se, naprimjer, blizu proizvodnje nalazi izvor pitke vode. Kada sve ove korake opišemo i definišemo, tada kreiramo dijagram toka proizvodnje, a zatim se dijagram toka verificira (Jašić i Alihodžić, 2022).

Verifikacija podrazumijeva da osoba koja je kreirala dijagram toka provjerava zajedno sa odgovornom osobom za određenu fazu proizvodnje. Prethodno se za svaku fazu određuje odgovorna osoba koja se imenuje u tim za HrACCP analizu. Dijagram toka koji se verificira na ovaj način je adekvatan i vjerodostojan. U pojedinim zemljama u okviru GMP (Good Manufacturing Practises) uvedena je obaveza izrade dijagrama toka koji je garancija da se proizvodnja vrši na unaprijed propisan način. Dobra proizvodačka praksa je sistem koji propisuje minimalne zahtjeve za kontrolu procesa i sanitacije tokom proizvodnog procesa, prikladnost lokacije, objekta, opreme i materijala te procese kontrole štetočina (Wallace i Williams, 2001). Verifikacija dijagrama toka je obavezna, a nju vrši komisija za verifikaciju. Te komisije sačinjavaju odgovorne osobe za pojedine faze procesa proizvodnje. Nakon izrade dijagrama pristupa se analizi harama u procesu na osnovu koje se izrađuje tablica analize harama u pojedinim procesima.

## Analiza harama

Analizu harama vrši HrACCP tim kojeg sačinjavaju interni auditori organizacije i osoblje iz različitih faza proizvodnje koje imaju zadatak da definiraju mogućnosti oharamljenja. Prva faza u uspostavi HrACCP-a bazirana je na dijagramu toka sa detaljnim koracima procesa. Pravila kod opisivanja procesa proizvodnje uz upotrebu dijagrama toka su ista svugdje u svijetu i postoje nekoliko metoda za pristup njihovom rješavanju.

## Primjer analize i određivanja CCP i HrCCP u proizvodnji jogurta

### HrCCP1: Sirovo mlijeko

Mlijeko i mlijecni proizvodi dobijeni od domaćih životinja (krave, ovce, koze, deve,) i divljih negrabljivih (biljojedi) životinja (srna, antilopa, divokoza, divlja goveda) su halal. Kada je u pitanju sirovo mlijeko, od koji se dobija sirovo mlijeko moraju biti hranjene

hranom biljnog porijekla, bez upotrebe GMO i drugih sastojaka zabranjenih za upotrebu.

### HrCCP 2: Standardizacija

Tokom standardizacije mlijecnih proizvoda, različiti sastojci se mogu dodati ili ukloniti kako bi se postigao željeni kvalitet i dosljednost proizvoda.

### HrCCP3: Dodavanje enzima, kultura i boja

Ovo je najkritičnija točka u proizvodnji sira zbog toga što starter kulture i enzimi koji se koriste u mlijecnoj industriji mogu biti od dozvoljenih i zabranjenih životinja, kao i od mikroorganizama. Ukoliko su enzimi i starter kulture

porijeklom od zabranjene životinje onda nisu dozvoljeni za upotrebu u proizvodnji halal mlijecnih proizvoda. Enizmi porijeklom od dozvoljenih životinja i mikroorganizma su dozvoljeni u proizvodnji mlijecnih proizvoda. Također, ako se u proizvodnji upotrebljavaju i drugi sastojci, moraju biti dozvoljeni. Sve navedeno potrebno je dokumentovati.

### HrCCP 4: Pakovanje

Pakovanje se mora obaviti u čistim i prikladnim ambalažnim oblicima. Ako se vosak nanosi kao barijera za vlagu ili konzervans, mora biti čistog halal kvaliteta. Etikete trebaju imati jasne halal oznake.

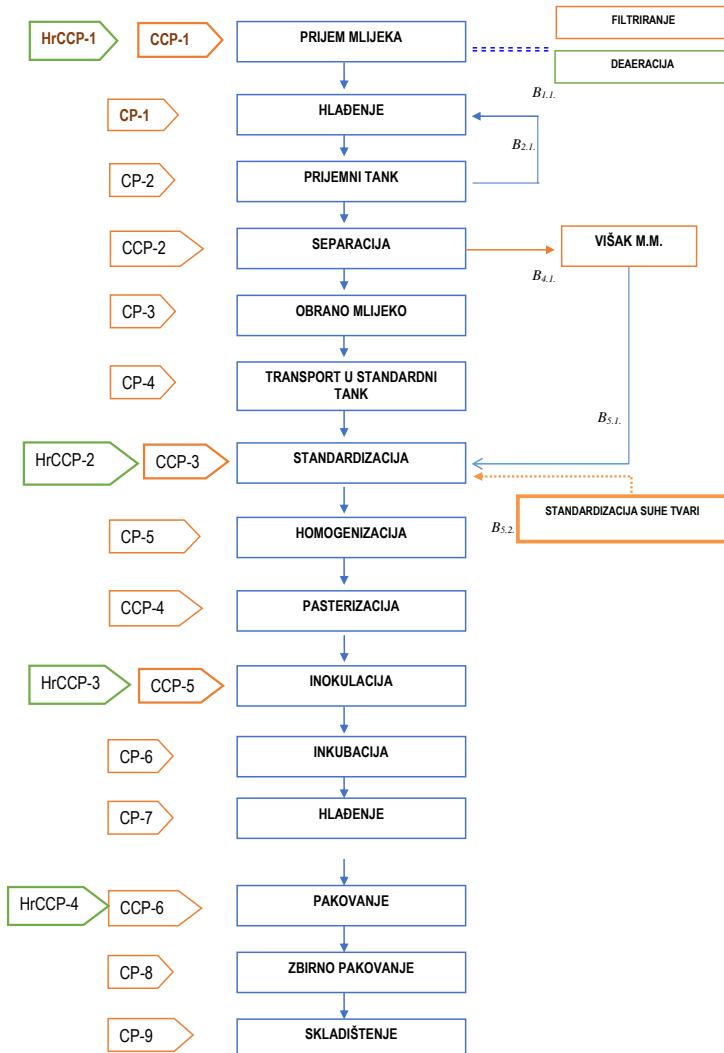
**Tablica 4.** Identifikacija opasnosti, analiza rizika i identifikacija CCP za jogurt

**Table 4.** Hazard identification, risk analysis and identification of CCPs for yogurt

ODREĐIVANJE KRITIČNIH KONTROLNIH TAČAKA NA OSNOVU STABLA ODLUČIVANJA						JOGURT				
Procesni korak	Hazard	Preventivna mjera	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP			
Prijem mlijeka	Fizički	Provjera ispravnosti opreme, crijeva, filtera za prečišćavanje mlijeka	DA	DA	DA	NE	CCP1 HrCCP1			
	Hemijski	Kontrola mlijeka prije preuzimanja. Kontrola temperature, % MM, °SH, broja mikroorganizama i sl.								
	Biološki	Kontrola na prisustvo rezidua								
	Haram	Prisustvo rezidua i kontrola i provjera ishrane stoke	DA	DA	DA	NE				
Hlađenje	Fizički	Kontrola sistema za hlađenje, prisustva rashladne tečnosti, ventila	DA	DA	DA	DA				
	Hemijski									
	Biološki									
Skladištenje	Fizički	Kontrola ispravnosti posuda za lagerovanje mlijeka	DA	DA	NE	-				
	Hemijski	Dezinfekcija tankova i cjevovoda								
	Biološki									
Separacija	Fizički	Kontrola ispravnosti separatora, manometra i cjevovoda	DA	DA	DA	NE	CCP2			
	Hemijski	Dezinfekcija separatora i cjevovoda								
	Biološki									
Standardizacija	Fizički	Kontrola ispravnosti opreme	DA	DA	DA	NE	CCP3 HrCCP2			
	Hemijski	Kontrola materijala (Interni standard)								
	Biološki									
	Haram	Kontrola halal statusa materijala koji se dodaju	DA	DA	DA	NE				
Pasterizacija	Fizički	Provjera ispravnosti opreme, cjevovoda, manometara, automatike i sl.	DA	DA	DA	NE	CCP4			
	Hemijski	Pranje i dezinfekcija opreme i cjevovoda								
	Biološki									
Inokulacija	Fizički	Kontrola fizičke ispravnosti pribora	DA	DA	DA	NE	CCP5 HrCCP3			
	Hemijski	Kontrola materijala (Interni standard), sterilizacija pribora								
	Biološki									
	Haram	Kontrola halal statusa i porijekla starter kultura	DA	DA	DA	NE				

S obzirom da je metodologija određivanja Haram kritičnih kontrolnih točaka HACCP može se koristiti isto stablo odlučivanja ili modifikovano stablo odlučivanja kako bi se odredile HrCCP i CCP. Određivanje kritičnih kontrolnih točaka za HACCP i HALAL može se inkorporirati u istu tablicu. Takođe na jednom dijagramu toka mogu se označiti i HrCCP i CCP. S obzirom da jedan od uvijeta halal standadara da je hrana sigurna za konzumaciju, da nije otrovno, opojno ili štetno po zdravlje, definisane kritične

kontrolne točke ne moraju se posebno definisati prema HrCCP, jer je već njima definisana prevencija narušavanja zdravstvene opasnosti proizvoda.



**Slika 2.** Primjer dijagrama toka za proizvodnju jogurta sa označenim CCP i HrCCP točkama  
**Figure 2.** An example of a flow chart for yogurt production with marked CCP and HrCCP points

Procesni dijagrami toka su, zajedno sa opisom proizvoda, osnova za identifikaciju i analizu harama. U njih je potrebno uključiti detalje svih procesa – spremnike, transportne puteve, zastoje, kontrolu i sl. Potrebno je označiti sve ulaze u procese: sirovine, ambalažu, pomoćni materijal (pranje i čišćenje, voda, ljepilo, plinovi i sl.) te sve izlaze iz procesa: proizvodi, otpad, dorade i popravci. Dijagram toka omogućava da se u svakom koraku procesa identificira i opiše haram, a zatim sačini lista svih mogućih harama u svakoj fazi ili koraku proizvodnje.

Prilikom analize u pogonima prehrambene industrije moraju se razmotriti moguća oharamljenja koja potiču od: sirovina, ambalaže ili pomoćnih materijala, dizajna i razmještaja mašina i ostale opreme i njihovog održavanja, higijene i sanitacije, zastoja i pauza u proizvodnji, proizvodnih i skladišnih prostora, ljudi,

postupka pakovanja, skladištenja i distribucije, a svaki pojedini procesni korak specificirati u dijagramu. Da bi se potvrdila točnost procesnog dijagrama toka, HrACCP tim je dužan provesti verifikaciju dijagrama toka u proizvodnom pogonu. Verifikacija se vrši obilaskom svakog naznačenog procesnog koraka, kontrolom svih ulaza i izlaza, te svih naznačenih ostalih vrijednosti i podataka. O provedenoj verifikaciji potrebno je sačiniti zapis, te po potrebi korigovati procesne dijagrame.

### Uspostava monitoringa

Nakon urađenog dijagrama toka, njegove verifikacije, izrade analize harama i određivanja HrACCP-a, uspostavlja se plan monitoringa kako bi se mogao nadzirati tok proizvodnje.

**Tablica 5.** Primjer plana monitoringa HrCCP  
**Table 5.** An example of the HrCCP monitoring plan

HrCCP	Procesni korak /opis harama	Preventivna mjera	Korektivna mjera	NADZOR				
				ŠTA?	KO?	GDJE?	KAKO?	KADA?
HrCCP1	Prijem mlijeka	Osiguranje halal sirovina u nabavi	Nabava halal sirovina	Prijem mlijeka	Šef nabave	U skladištu sirovina	Provjerom Izjava od dobavljača	Pri svakom prijemu sirovina
HrCCP2	Standardizacija	Osigurati da su sirovine halal porijekla	Nabava sirovina i pomoćnih supstanci	Nabava i prijem supstanci	Šef nabave	U odjelu nabave i skladištu sirovina	Provjerom specifikacija i certifikata	Pri svakoj novoj isporuci
HrCCP3	Inokulacija	Osigurati da su mikrobne kulture halal	Zamjena mikrobnih kultura sa halal porijeklom	Mikrobične kulture	Šef nabave	U odjelu nabave i skladišta sirovina	Provjerom specifikacija i certifikata	Pri svakoj novoj isporuci
HrCCP4	Pakovanje	Osigurati halal status ambalaže	Zamjena ambalaže za halal	Ambalaža i pakovanje	Tehnolog	Na liniji pakovanja	Provjerom specifikacija i certifikata	Pri svakoj novoj isporuci

Potrebno je definirati i uspostaviti sistem posmatranja (monitoringa) identificiranih HrACCP. To može biti procedura ili opisan postupak koji definira: šta, ko, kada i kako nadzire. Pri tome se vode odgovarajući zapisi koji se čuvaju najmanje za dvostruki period koliko je rok trajanja proizvoda.

Plan monitoringa treba da definira kako se kontroliše HrACCP, gdje, kada i ko kontroliše i šta se poduzima ukoliko bi došlo do oharamljenja proizvoda.

U tablici se obavezno navode faze i koraci procesa proizvodnje, a potom se daje ocjena potencijalnog harama, vjerovatnoća da se to može dogoditi i mjere koje treba poduzeti unaprijed da se takav događaj prevenira i spriječi. Dobro urađena analiza harama je prvi korak za upješnu prevenciju. Ovdje se koristi proaktivni preventivni pristup, što znači da se unaprijed preduzmu sve mjere i da se rizici svedu na minimum. Nakon kreiranja tablice, kompletirane analize opasnosti i određivanja HrACCP-a, pristupa se izradi kartica kontrole.

Neki procesi proizvodnje mogu biti potpuno halal, što znači da cijeli sistem bude halal, a neki mogu biti djelimično halal, odnosno dobiti certifikat samo za jedan proizvod ili seriju proizvodnje. Kada je proizvodni pogon halal u cijelosti, onda haram mora biti isključen iz svih faza proizvodnje i onemogućiti da dođe do oharamljenja u bilo kojoj fazi. Međutim, često firme imaju potrebu za certificiranjem za samo jedan ili više halal proizvoda. U tom slučaju moguće je izvesti certificiranje samo određeng broja

proizvoda, proizvodnih linija, jedne ili više šarži. Certificiranje određene proizvodne linije podrazumijeva uspostavu HrACCP-a na toj proizvodnoj liniji. Potrebno je uspostaviti preventivne mjere da ne dođe do miješanja sa sirovinama i sastojcima koji nisu halal sa drugih proizvodnih linija.

### Uspostava postupka verifikacije i validacije HACCP/HrACCP

Uspostava postupka verifikacije HACCP/HrACCP-a sastoji se od izrade praktičnog plana za provjeru da li HACCP/HrACCP funkcioniра ili ne. Prema definicijima iz standarda ISO 9000, pod verifikacijom se podrazumijeva potvrđivanje i pružanje objektivnog dokaza da su ispunjeni specificirani zahtjevi, dok se pod validacijom podrazumijeva potvrđivanje pružanjem objektivnog dokaza da su ispunjeni zahtjevi za specifičnu predviđenu upotrebu ili primjenu.

Prema tome, verifikacija i validacija halala su skup aktivnosti kojima se utvrđuje odgovara li HACCP/HrACCP zahtjevima halala. Proces verifikacije je procjena da li proizvod, proces i sistem ispunjavaju zahtjeve i uvjete koji su zadani u dokumentaciji.

Potrebno je uspostaviti i postupke validacije procesa i proizvoda, a ako se certificira kompletan halal sistem onda je potrebno uspostaviti validaciju i verifikaciju sistema. HACCP/HrACCP predviđa uspostavljanje

postupaka koji treba da potvrde kontrolu identifikovanih haram točaka i da provjere da li sistem funkcioniра kako je predviđeno.

Validacija (utvrđivanje valjanosti) treba da osigura da su informacije točne, potvrđuje da se identificirane haram točke kontroliraju uspostavljenim HACCP/HrACCP planom, ali i utvrđuju da li su obuhvaćene sve potencijalne haram opasnosti. Validacija provjerava procese i ocjenjuje da li oni odgovaraju stvarnim zahtjevima i potrebama korisnika.

Ukoliko je HACCP/HrACCP validiran i verificiran, to ne znači da on ne može imati grešku, već da je pouzdan i pogodan za proizvodnju halal hrane zato što postoji neprekidni monitoring i vrši se njegova validacija.

Uz pojam verifikacije i validacije često se veže i pojam testiranje koje predstavlja aktivnost ocjenjivanja, najčešće, proizvoda kroz pronalaženje neispravnosti i pogrešaka.

Metode koje se koriste za verifikaciju i validaciju su statička verifikacija, validacija i testiranje.

Nakon verifikacije se vrši validacija, koja se ogleda u kontroli proizvoda. Najčešće je to analiza proizvoda na prisustvo harama. Verifikacija i validacija proizvoda su esencijalne u određivanju kritičnih kontrolnih točaka i njihovom praćenju. Drugi oblik verifikacije je interni i eksterni audit. Audit je također metoda verifikacije.

## **Uspostava dokumentacije**

Za implementaciju HACCP/HrACCP potrebno je dokumentirati sve procedure i upravljati zapisima u skladu sa metodama upravljanja dokumentima i obrascima koji se rade po ISO standardima. Sve vrste dokumenata rade nosioci procesa u skladu sa odgovornostima za obavljanje poslova. Svi dokumenti se označavaju prema pravilima o načinu označavanja u skladu sa ISO standardima.

Značajniji dokumenti vezani za HACCP/HrACCP su interni standardi sirovina, specifikacija gotovih proizvoda, planovi kontrole, identifikacija i analiza harama po procesima, određivanje CCP/HrCCP, uspostavljanje monitoringa sa planovima monitoringa, validacija proizvoda, odnosno dokazi o izvršenoj validaciji, zapisi i dr.

## **Zaključak**

Sigurnost i kvaliteta proizvoda - Implementacija HACCP i HrACCP sistema doprinosi postizanju visokih standarda sigurnosti i kvalitete mlijecnih proizvoda. Kroz identifikaciju i kontrolu kritičnih kontrolnih točaka (CCP) u proizvodnom procesu,

smanjuje se rizik od kontaminacije i osigurava se zdravstvena ispravnost proizvoda.

Integracija HACCP i HrACCP sistema - Primjena kombinovanog pristupa HACCP i HrACCP sistema u mlijecnoj industriji pruža sveobuhvatan okvir za osiguranje sigurnosti hrane, kao i usklađenosti sa halal standardima. Ovaj integrisani pristup omogućava efikasno upravljanje biološkim, kemijskim i fizičkim opasnostima, dok istovremeno garantuje da proizvodi ostaju u skladu sa halal standardima za hranu.

Halal standardi u mlijecnoj industriji - HrACCP sistem je ključan za osiguranje da mlijecni proizvodi zadovoljavaju halal standarde. To uključuje nabavku sirovina iz halal izvora, kontrolu proizvodne opreme, kao i skladištenje i transport u skladu sa halal pravilima. Održavanje ovih standarda povećava povjerenje potrošača i omogućava pristup širkom tržištu halal proizvoda.

Praktična primjena u industriji - Kroz primjere iz prakse, ovaj rad pokazuje kako se HACCP i HrACCP sistemi mogu efikasno integrisati u sve faze proizvodnje mlijecnih proizvoda. Uspješna primjena ovih sistema demonstrira mogućnost postizanja dualne usklađenosti sa sigurnosnim i vjerskim standardima, što je od posebnog značaja za industrije koje ciljaju halal tržišta.

Doprinos globalnoj sigurnosti hrane - Implementacija HACCP i HrACCP sistema u mlijecnoj industriji ne samo da doprinosi lokalnim standardima kvalitete i sigurnosti, već i globalnoj sigurnosti hrane. Ovi sistemi omogućavaju proizvođačima da proizvode visokokvalitetne, sigurne i halal proizvode koji su konkurentni na međunarodnom tržištu.

## **Literatura**

- BAS 1049:2010 – Halal hrana zahtjevi i mjere. (2023): Sarajevo: Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine.
- Bijeljac, S., i Sarić, Z. (2005): Autohtonji mlijecni proizvodi sa osnovama sirarstva, Poljoprivredni fakultet Sarajevo.
- Jašić, M., Alihodžić, D. (2022): Halal kvalitet koncept i standardizacija. Tuzla: Agencija za certificiranje halal kvalitete.
- Jašić, M., Bašić, M., Sakić, A., Čengić, F. (2007): Halal status aditiva u mlijeku i mlijecnim proizvodima, *Mjekarstvo* 57 (2) 153-159.
- Karahmet, E., Toroman A., Hamidović, S. (2017): Higijena i sanitacija pogona u prehrambenoj industriji, Sarajevo, BiH.
- Keran, H. (2009): Sistemi upravljanja u prehrambenoj industriji ISO 9001, HACCP I GLOBAL GAP, Nerd Tuzla.
- Keran, H., Salkić, M., Ahmetović, N., Muhamedbegović, B. (2007): Primjena HACCP-a sistema u otkupu sirovog mlijeka, *1-2 Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi* 18 (1-2), 52-56.

- Kohilavani, Zzaman, W., Ariefandie Febrianto, N., Syafarah Zakariya, N., Wan Abdullah, W., Tajul Aris, Y. (2013): Embedding Islamic dietary requirements into HACCP approach, *Food Control* 34, 607-612.
- Mortimore, S.E., Wallace, C.A. (2001): Food Industry Briefing Series: HACCP. Blackwell, UK.
- MS 1500:2019 Halal food - Production, preparation, handling and storage - General guidelines (second revision).
- Muhamedbegović, B., Alihodžić, D., Jašić, M., Sejranić, K. (2022): "Packaging In The Process Of Halal Certification Of Food Products" Proceedings of the World Halal Summit Scientific Conference, 24-26 Nov 2022 Istanbul.
- Muhamedbegović, B., Jahić, S., Pračić, N., Mujic, E. (2018) How to Inform the Consumer on Packaged Food? Proc. 6th Int. Scientific Conf. "June 5th - World environment day", 18 – 19 June 2018, Bihać, BiH.
- OIC/SMIIC 1: 2019 Second Edition General Requirements for Halal Food.
- Pintić, N., Dakić, A., Poljak, F., Stručić, D., Tomše-Đuranec, V., Jelen, T. i Pintić, V. (2006): Učestalost pojave antibiotika i drugih antibakterijskih tvari u mlijeku isporučenom za tržište, *Stočarstvo* 60 (2), 83-95. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/365>
- Pračić, N., Muhamedbegović, B., Jahić, S., Jusufhodžić, Z. (2019): Sanitarna inspekcija i sigurnost hrane, Univerzitetsko izdanje, Bihać, BiH.
- Pravilnik o higijeni hrane životinjskog porijekla (2012). Službeni glasnik BiH br. 103.
- Pravilnik o mikrobiološkim kritirejima za hranu (2013). Službeni glasnik BiH br. 11.
- Pravilnik o sirovom mlijeku (2011). Službeni glasnik BiH br. 21.
- Riaz, MN., Chaudry, MM. (2019): Halal Production Requirements For Dairy Products, in Handbook of Halal Food Production, CRC Press, USA, p 260-264.
- Riaz, MN., Chaudry, MM. (2019): Labeling, Packaging and Coating for Halal Food, in Handbook of Halal Food Production, CRC Press, USA, p 260-264.
- Šehović, A. (2023): HACCP Priručnik. Sarajevo: Investicijska fondacija Impakt.
- Talib, M. S. A., Johan, M. R. M. (2012): Issues in Halal Packaging: A Conceptual Paper, *International Business and Management* 5(2), 94-98, 2012.
- Topoljak, S. (2010): Halal i haram u islamu, Journal Special, KDBH Preporod Zagreb.
- Wallace, C.A., Williams, T. (2001): Pre-requisites: a help or a hindrance to HACCP?, *Food Control* 12, 235-240.
- Zakon o zdravstvenoj ispravnosti životnih namirnica i predmeta opšte upotrebe (2020). Sl. novine FBiH br. 77/2020.

## IDENTIFICATION AND DIFFERENCES BETWEEN HACCP AND HRACCP IN THE EXAMPLE OF THE DAIRY INDUSTRY

**Kemal Sejranic<sup>1</sup>, Damir Alihodžić<sup>1</sup>, Benjamin Muhamedbegović<sup>2</sup>,  
Muamer Mandra<sup>3</sup>, Arnela Smajić<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Agency for Halal Quality Certification, Turalibegova 73, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup>Faculty of Technology, University of Tuzla, Univerzitetska br. 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

<sup>3</sup>Perutnina Ptuj BH, Potkrajska BB, Breza 71370, Bosnia and Herzegovina

<sup>4</sup>FINRA University, Mitra Trifunovića Uče br.9, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

*review paper*

### Summary

The paper analyzes the implementation and application of the HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) and HrACCP (Haram Analysis Critical Control Points) systems in the dairy industry, with special reference to ensuring food safety and product compliance with the halal food standard. The HACCP system is globally recognized as a key tool for the identification, assessment and control of biological, chemical and physical hazards in the food industry. In the dairy industry, the application of HACCP includes the identification of hazards, the determination of critical control points (CCPs), the establishment of critical limits, the monitoring of these points, the implementation of corrective measures in case of deviations, and the verification and recording of the entire process.

The HrACCP system, on the other hand, represents a specific approach adapted to halal standards, with a focus on identifying and controlling points in the production process that could make the product non-halal (haram). This includes sourcing raw materials from halal sources, ensuring the cleanliness of equipment, and controlling storage and transportation to prevent contamination with haram substances.

The paper emphasizes the importance of combining both systems in the dairy industry in order to produce safe and halal products, thus meeting the requirements of both safety standards and Islamic regulations. Through examples from practice, the paper shows how HACCP and HrACCP are integrated in different stages of dairy production, thus ensuring their quality and compliance with standards.

**Keywords:** HACCP, HrACCP, health safety, halal, haram

## Instructions to authors

Authors are kindly asked to read the following instructions while preparing the manuscript for publishing in the journal *Food in health and disease*.

*Food in health and disease* is a scientific-professional journal of nutrition and dietetics, published by the Faculty of Pharmacy, University of Tuzla with Co-Publisher Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

*Food in health and disease* publishes *original scientific papers, preliminary communications, scientific notes, reviews and professional papers*. All papers need to be written and submitted in English. All contributing manuscripts will be subjected to critical peer review.

Difference between *scientific* and *professional* papers is in the originality of methods, results and conclusions. Although a professional paper may imply more tangible applications it is generally not considered a new scientific contribution.

*Original scientific papers* report unpublished results of original research. They must contain significant and original observations to be critically evaluated. Experimental data should be presented in a way that enables reproduction and verification of analyses and deductions on which the conclusions are based.

*Preliminary communications* include short information on the results of scientific research which require immediate publication.

*Scientific notes* include reports on shorter but completed research or descriptions of original laboratory techniques (methods, apparatus etc.) and should be concise.

*Reviews* are original, critical and up-to-date surveys of an area in which, preferably, the author himself/herself is active. They should include recent references from international publications.

*Professional papers* present new possibilities of improvement within the area of food technology. The emphasis is on the application of known methods and facts as well as on broadening the knowledge in the particular area. The acquired knowledge is applied to the object of research.

## Procedure

All contributions are evaluated according to criteria of originality and quality of their scientific and professional content. All manuscripts received for consideration will be acknowledged by the Editorial office. All manuscripts are sent to at least two referees. Based on their opinion, the Editor and the Editorial Board bring a decision about the acceptance of the manuscripts. Contributions may be rejected without reviewing if considered inappropriate for the journal.

## Copyright

The authors bear the sole responsibility for the content of the contributions. The Editorial Board assumes that by submitting their papers the authors have not violated any internal rules or regulations of their institutions related to the content of the contributions and that they have not submitted the paper somewhere else. The acceptance of the paper obliges the authors not to publish the same material elsewhere.

## Manuscript preparation

The manuscript should consist of max. 15 type written pages including tables, graphs, schemes and photographs. It should be written with 1.5 spacing on one side of the paper and margins 2.5 cm. For the text should be used normal

plain font (Times New Roman, font size 12). The title of the manuscript and the title of the chapter should be short and written in bold. The title of subheading should be written in italic.

Under the title, author/s full name/s and surname/s should be written, with asterisk next to the name of the corresponding author. Footnote at the bottom of the first page should contain information about the corresponding author (address and e-mail). The affiliations for all authors must be given in the following sequence: University/Institution, Faculty/Department, Postal address, City, Country. When authors have different affiliations, should be used superscripted Arabic numbers after last name of the author.

Manuscript has to be written without spelling mistakes, impersonal style. It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

The first word in the paragraph must not be retracted. Paragraphs have to be separated by clicking on enter key. Pages have to be numerated (on the bottom right). For decimal numbers in text and tables dot should be used.

Latin words, phrases and abbreviations, including generic and specific names, should be written in italic.

**Manuscripts should be submitted by e-mail, as attached document, to the Editor's office. The manuscripts should be sent to the following address:**

**journalFHD@gmail.com**

For clearness the paper should be divided into the following sections: **Summary, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions and References.**

## **Summary**

Summary must not exceed 300 words and has to show relevant data, methodology, main results and conclusion. It should not contain abbreviations or references. After summary, authors are asked to list several keywords.

## *Keywords*

Keywords include the main topic of the paper and should not contain more than 5 words or phrases, which should be separated by commas.

## **Introduction**

Introduction should refer to previous research results and explain the purpose of the investigations.

## **Materials and methods**

Experimental part should be written clearly and in sufficient detail to allow the work to be repeated. Materials and Methods should indicate instruments, samples, subjects, chemicals, etc., giving enough details only if new methods and/or procedures and/or principles are used. For the well-known methods and techniques an adequate reference(s) citation will suffice.

## **Results and discussion**

The information given in tables and figures should not be repeated, and only relevant data discussed and explained. Combining the results with discussion can simplify the presentation.

Tables and figures should be completely understandable without reference to the text. For publishing reasons, they have to be delivered in graphical formats (\*.xls, \*.tif or \*.jpg) and at the end of the paper.

All illustrations (graphs, schemes, diagrams, pictures, etc.) should be named as figures. Refer to figures by the abbreviation "Fig.". All figures and tables should be cited in the text and numbered consecutively throughout. Preferred program for preparing figures and tables is Microsoft Office Excel.

Be sure to use lettering, data lines, and symbols sufficiently large and thick to be clearly legible when the figure is reduced to the normal published size. In graphs and charts, curves should be identified by using different symbols for points (•, ◊, ○, □, ■, ▲, etc.) and not by line width or colour. Several figures should be grouped in a plate on one page. Do not place figures into bordered frames. Figure caption and legend should be placed at the bottom of each figure, while table headings should appear above the tables. The text into the figures and tables should be written in the same language as the body text.

Whenever possible formulae and equations are to be written in one line, centred on the page, and consecutively numbered in Arabic numbers between round brackets at the right margin of the paper. Refer to equations by the abbreviation "Eq.".

SI (System International) units should be used. Only symbols (not their subscripts, superscripts or description in brackets) of physical quantities should be written in italic. All physical quantities given in table columns or rows and corresponding table headings with units, or graphical plots and corresponding table headings with units, or graphic plots and corresponding axis labels should conform to the algebraic rules, i.e.

$$\text{physical quantity / unit} = \text{numerical value.}$$

It is preferred to write the measurement units as "kg/m<sup>3</sup>".

## Conclusions

Conclusions have to briefly explain significance of the research results.

## References

References should be selective rather than extensive (with the exception of review articles). Literature citations in the text should be referred by author's last name and year, in brackets, such as (Knowles, 2007), or with the last name of the author as part of the sentence, immediately followed by the year of publication in brackets, such as ("Smith (1963) reported growth on media."). If there are more than two authors, mention the first author and add et al., followed by the year.

In the reference list which has to be written at the end of the paper, all authors have to be listed (surname and name initials – capitalizing only the initial letters) in alphabetical order, and paper of the same author by chronological order. If there are more papers from the same author published in the same year, references have to be differentiated by letters in the text (a, b, c, d) behind the year of publishing. In case of multi author papers, in reference list all the authors have to be written (not the first author and mark "et al.").

Italicize only those words that were underlined or italicized in the original, such as names of microorganisms. Also titles of journals have to be written in italics.

For papers published on the web, it is necessary to write the source and the date when the paper was downloaded, besides basic information (title, author's name, etc.).

Abbreviations for periodicals should be in accordance with the latest edition of the Thomson ISI List of Journal Abbreviations (Thomson Scientific, USA). Full stop should be used after each abbreviation.

*Reference list should be written as shown:*

Journals:

Kopjar, M., Piližota, V., Hribar, J., Nedić Tiban, N., Šubarić, D., Babić, J., Požrl, T. (2008): Influence of trehalose addition on instrumental textural properties of strawberry pastes, *Int. J. Food Prop.* 11 (3), 646-655.

Books:

Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (2001): Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Washington, USA: ASM Press, pp. 572-573.

Chapter in book:

Varoquaux, P., Wiley, R.C. (1994): Biological and Biochemical Changes in Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. In: Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables, Wiley, R.C. (ed.), New York, USA: Chapman, pp. 226-268.

Conference proceedings:

Babić, J., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Kopjar, M. (2008): Utjecaj hidrokoloida na reološka svojstva voštanog kukuruznog škroba. In: 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture, Pospišil, M. (ed.), Zagreb, HR, pp. 558-562.



