

Računalna analiza modela metabolizma glavnih nutrijenata

Nadoveza, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:259755>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2023.

Sara Nadoveza

RAČUNALNA ANALIZA MODELA
METABOLIZMA GLAVNIH
NUTRIJENATA

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Jurinjak Tušek.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

RAČUNALNA ANALIZA MODELA METABOLIZMA GLAVNIH NUTRIJENATA

Sara Nadoveza, univ. bacc. nutr. 0177053066

Sažetak: U ovom radu provedena je simulacija modela metabolizma glavnih nutrijenata pomoću softverskog alata *CellDesigner*. Napravljena su četiri jelovnika za četiri dana, namijenjena za dijabetičare, iz kojih su izračunate početne koncentracije ugljikohidrata, masti i proteina. Na temelju početnih koncentracija glavnih nutrijenata uspješno je provedena simulacija modela metabolizma. Rezultati ukazuju na sličan odgovor nutrijenata za sva četiri dana jer se radi o reguliranim jelovnicima čija je primarna uloga regulacija glukoze u krvi. Također je provedena analiza lokalne osjetljivosti parametara gdje je glavni cilj uočiti kako promjene u vrijednosti parametara utječu na izlazne varijable modela. Rezultati su pokazali kako promjena vrijednosti parametara k_5 , K_5 , k_9 te K_9 ima najveći utjecaj na acetyl-CoA.

Ključne riječi: *metabolizam glavnih nutrijenata, sistemska biologija, računalno modeliranje, CellDesigner, analiza lokalne parametarske osjetljivosti*

Rad sadrži: 51 stranicu, 28 slika, 8 tablica, 42 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (član)
4. doc. dr. sc. Ivana Rumora Samarin (zamjenski član)

Datum obrane: 31. svibnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatization

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

COMPUTER ANALYSIS OF MAIN NUTRIENT METABOLISM MODELS

Sara Nadoveza, univ. bacc. nutr 0177053066

Abstract: In this work, a simulation of the metabolism model of the main nutrients was carried out using the CellDesigner software tool. Four menus for four days were created, intended for diabetics, from which the initial concentrations of carbohydrates, fats and proteins were calculated. Based on the initial concentrations of the main nutrients, the simulation of the metabolism model was successfully carried out. The results indicate a similar response of nutrients for all four days, as these are regulated menus whose primary role is blood glucose regulation. An analysis of the local sensitivity of the parameters was also performed, where the main goal is to observe how changes in the parameter values affect the output variables of the model. The results showed that the change in the value of parameters k_5 , K_5 , k_9 and K_9 has the greatest impact on acetyl-CoA.

Keywords: *metabolism of main nutrients, system biology, computer modeling, CellDesigner, local parametric sensitivity analysis*

Thesis contains: 51 pages, 28 figures, 8 tables, 42 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor

Reviewers:

1. Jasenka Gajdoš Kljusurić, PhD, Full professor (president)
2. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor (mentor)
3. Maja Benković, PhD, Associate professor (member)
4. Ivana Rumora Samarin, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: May 31st, 2023

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. METABOLIZAM UGLJIKOHIDRATA	2
2.1.1. Glikoliza	3
2.1.2. Put pentoza-fosfata (PPP).....	4
2.1.3. Glikogeneza	4
2.1.4. Glukoneogeneza.....	4
2.2. METABOLIZAM MASTI (β -OKSIDACIJA)	5
2.3. METABOLIZAM PROTEINA	6
2.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE METABOLIZMA.....	8
2.5. SISTEMSKA BIOLOGIJA	8
2.5.1. Metabolomika	9
2.5.2. Genomika.....	9
2.5.3. Transkriptomika.....	10
2.5.4. Proteomika.....	10
2.5.5. Bioinformatika i računalno modeliranje.....	10
2.6. ULOGA SISTEMSKE BIOLOGIJE U PLANIRANJU PREHRANE.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. CellDesigner	13
3.1.2. Model metabolizma glavnih nutrijenata.....	15
3.1.3. Smjernice za jelovnik	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Razvoj i simulacija modela metabolizma glavnih nutrijenata u CellDesigner-u ...	19
3.2.2. Analiza lokalne parametarske osjetljivosti.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. PRIKAZ MODELA METABOLIZMAGLAVNIH NUTRIJENATA	21
4.2. PRIKAZ JELOVNIKA	22
4.3. SIMULACIJA MODELA METABOLIZMA GLAVNIH NUTRIJENATA	27
4.4. ANALIZA LOKALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI.....	40
5. ZAKLJUČCI	47
6. LITERATURA	48

1. UVOD

Glavni nutrijenti koji se unose hranom su: ugljikohidrati, masti i proteini, a nazivaju se i makronutrijenti te su glavni donori energije. Metaboličkim procesima u organizmu razgrađuju se na manje jedinice kao što su: jednostavni šećeri, masne kiseline te aminokiseline. Dobivene molekule, daljnjim metaboličkim procesima, koriste se za dobivanje energije. Nastala energija koristi se za rad stanica, održavanje temperature tijela, rada mišića, aktivni transport iona itd. Jednostavni šećeri kao i masne kiseline mogu se skladištiti u obliku glikogena i masti. Tijekom stanja gladi organizam crpi energiju upravo iz tih spremišta energije. Aminokiseline se koriste za sintezu proteina. Svi metabolički procesi su pod kontrolom enzima.

Metabolizam nutrijenata može se prikazati matematičkim modelima što se danas sve češće koristi. Pomoću modela može se vidjeti koliko se brzo iskorištavaju komponente tijela odnosno koliko se brzo skladište. Modeli pomažu kako bi se razumjeli biokemijski procesi u organizmu te daju bolji uvid u fiziološka stanja organizma. Dobiveni rezultati mogu se koristiti kao smjernica za razumijevanje fizioloških stanja u organizmu.

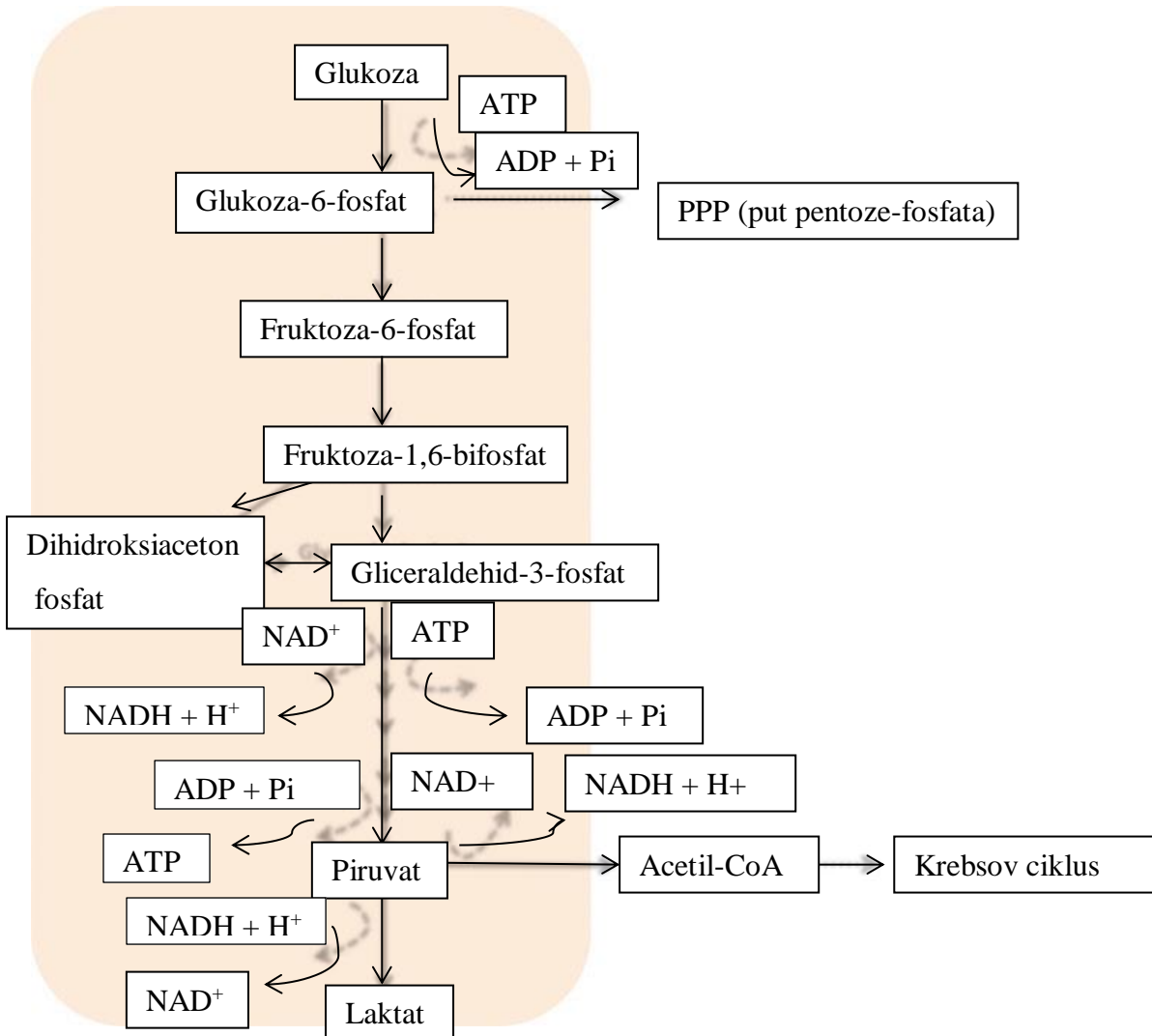
Osim matematičkih modela, systemska/računalna biologija nalazi mjesto u nutricionizmu. Naime, systemska biologija je skup različitih bioznanosti čija uloga je održavanje ljudskog zdravlja te liječenje patoloških stanja organizma. Budući da su prehrana i zdrav način života usko povezani s nastankom raznih medicinskih stanja, systemska biologija zajedno s nutricionizmom predstavlja odličan pristup u prevenciji tih istih medicinskih stanja. Pomoću systemske biologije može se modelirati personalizirana prehrana za pojedinca na osnovu njegovih specifičnih bioloških stanja.

U ovom diplomskom radu koristio se program *CellDesigner* kako bi se analizirao model metabolizma glavnih nutrijenata. Cilj je bio pobliže razumjeti i analizirati promjene u koncentracijama ugljikohidrata, masti i proteina nakon konzumacije jelovnika namijenjenog za dijabetičara. Naime, radi se o jelovniku koji se sastoji od četiri dana, a svaki dan sadrži tri glavna obroka s dnevnim unosom od 1700 kalorija. Prehrana se bazira na smanjenom unosu ugljikohidrata i masti, a većem unosu proteina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. METABOLIZAM UGLJIKOHIDRATA

Metabolizam je niz biokemijskih reakcija nutrijenata (ugljikohidrata, masti i proteina), koji se unose hranom, u organizmu pri čemu nastaje energija. Nastala energija je potrebna kako bi se održale vrlo važne životne funkcije, a i sam život organizma (1). Nakon unosa hranom, ugljikohidrati se u organizmu razgrađuju na jednostavnije šećere. Kao predstavnika jednostavnih šećera smatra se glukoza (2). Metabolizam glukoze započinje ulaskom glukoze u stanicu pomoću specifičnih transportera za glukozu (GLUT) (3). Glukoza se nakon ulaska u stanicu može metabolizirati na četiri načina: (i) glikolizom (aerobna i anarobna), (ii) sintezom glikogena (glikogeneza), (iii) putom pentoza-fosfata (PPP), (iv) glukoneogenezom (1). Metabolizam glukoze u stanici prikazan je na slici 1.



Slika 1. Mehanizam glikolize u stanici (prema Mesquita i Rodrigues, (3))

2.1.1. Glikoliza

Glikoliza se odvija u citosolu skoro svih živih stanica organizma te se može odvijati u prisustvu kisika, ali i ne mora. Produkt glikolize su 2 molekule piruvata koje dalje ulaze u različite metaboličke puteve. Osim dvije molekule piruvata nastaju i dvije molekule adenozin trifosfata (ATP).

Glukoza se prvo fosforilira uz pomoć enzima heksokinaze, ili glukokinaze u jetri i gušterači, do glukoza-6-fosfata. Daljnji korak zahtjeva izomeraciju glukoza-6-fosfata do fruktoza-6-fosfata. Takva fruktoza se dalje fosforilira do fruktoza-1,6-bifosfata uz pomoć fosfofruktokinaze (3). Reakcije fosforilacije pomoću heksokinaze i fosfofruktokinaze zahtijevaju utrošak od jedne molekule ATP-a, stoga su te reakcije ireverzibilne. Fosfofruktokinaza ima vrlo važnu ulogu u glikolizi te ovisi o omjeru adenozin monofosfata (AMP) i adenozin trifosfata jer AMP ga aktivira dok povećane koncentracije ATP-a ga inhibiraju. Daljnji korak zahtjeva aktivaciju enzima aldolaze koja dalje cijepa molekulu fruktoza-1,6-bifosfata na dvije molekule: dihidroksiaceton-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat (4). Dihidroksiaceton-fosfat može prijeći u gliceraldehid-3-fosfat stoga metabolizmom glukoze mogu nastati 2 molekule gliceraldehid-3-fosfat.

Gliceraldehid-3-fosfat se dalje podvrgava reakcijama oksidacije i fosforilacije pri čemu nastaje 1,3-bifosfoglicerat, a sve to kontrolira enzim koji je ovisan o nikotinamid adenin dinukleotid-fosfatu (NADP^+) gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH). Nastala molekula uz pomoć fosfoglicerat-kinaze prelazi u 3-fosfoglicerat pri čemu dolazi do premještanja anorganskog fosfata na ADP. To je prva reakcija u kojoj nastaje ATP (4). 3-fosfoglicerat može se prebaciti u 2-fosfoglicerat uz pomoć fosfoglicerat-mutaze, a 2-fosfoglicerat dalje ulazi u reakciju dehidracije pri čemu nastaje fosfofenolpiruvat (1). Fosfofenolpiruvat uz pomoć piruvat-kinaze se defosforilira pri čemu se fosfatna molekula prenosi na adenozin difosfat (ADP). Rezultat glikolize je piruvat i dvije molekule ATP-a. Iako su zapravo nastale četiri molekule ATP-a, kao što je gore već navedeno, dvije su se potrošile na fosforilaciju molekula (4).

Piruvat ima četiri moguće sudbine: reducirati se do laktata, dekarboksilirati se do acetil – koenzim A (acetil-CoA), karboksilirati se do malata ili oksaloacetata te transaminacija s glutamatom do alanina (4). Acetil-CoA predstavlja supstrat za daljnje reakcije metabolizma koje uključuju Krebsov ciklus (3).

2.1.2. Put pentoza-fosfata (PPP)

Osim glikolize, glukoza sudjeluje i u metaboličkom procesu koji se zove put pentoza-fosfata. To je put koji pomoću nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), produkta dobivenog metaboličkim reakcijama, suzbija oksidativni stres u stanici. Put pentoza-fosfata se može odvijati u anaerobnim i aerobnim uvjetima. Aerobni uvjeti ovise o prisustvu glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, jer upravo ona omogućava da iz glukoza-6-fosfat nastanu 2 molekule NADPH i jedna molekula riboza-5-fosfata (3). Riboza-5-fosfat može dalje služiti za stvaranje nukleotida dok NADPH služi za stvaranje masnih kiselina i suzbijanju oksidativnog stresa (4).

Anaerobni put sastoji se od reverzibilnih reakcije koje ovise o prisutnosti riboza-5-fosfata i NADPH. Riboza-5-fosfat nakon anaerobnog puta može prijeći u glukoza-6-fosfat i kao takva ući u proces glikolize.

2.1.3. Glikogeneza

Pohranjivanje glukoze u stanice u obliku glikogena kao izvor energije. Glikogen se nalazi u jetri i mišićima te kada je potrebna energija tj. glukoza tijelu glikogen služi kao izvor. Prilikom napornije tjelovježbe, dolazi do stanja bez kisika u mišiću te će tijelo iskoristiti glikogen kao izvor energije. Zbog brze opskrbe tijela glukozom, glikogen je bolji izvor energije od masnih kiselina (1)

2.1.4. Glukoneogeneza

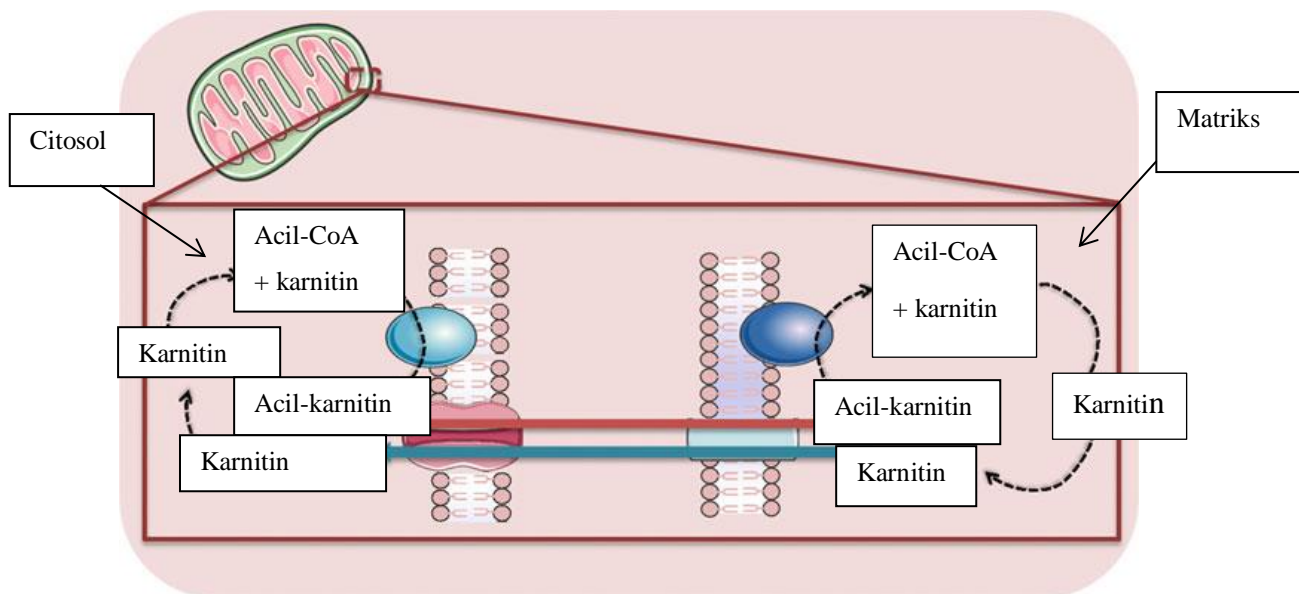
Proces nastanka glukoze iz neugljikohidratnih prekursora (laktat, aminokiselina) u jetri i bubrezima naziva se glukoneogeneza. Iako dijele nekoliko enzima, glukoneogeneza nije obratni proces glikolize (3). Vrlo bitne reakcije koje se razlikuju u oba proces: prva reakcija glukoneogeneze sastoji se od pretvorbe piruvata, u mitohondrijima, u oksaloacetat uz utrošak ATP-a. Oksaloacetat prelazi u malat koji onda prelazi u citosol. U citosolu dolazi do pretvorbe u fosfofenolpiruvat uz pomoć fosfofenolpiruvat karboksikinaze. Ovakva reakcija je energijski puno manje zahtjevna nego kod glikolize. U glikolizi postoje dvije reakcije koje troše ATP, što bi onda značilo da glukoneogenezom se te molekule obnavljaju, međutim to nije moguće. Glukoneogeneza omogućava uvijek dostupnu opskrbu glukozom (1).

2.2. METABOLIZAM MASTI (β -OKSIDACIJA)

Ukoliko dođe do dužeg vremena izgladnjivanja, gdje glukoza više nije dostupna, masne kiseline predstavljaju dobar izvor energije. Energija se dobiva oksidacijom (β -oksidacija) koja se vrši u jetri, skeletnim mišićima te srčanom mišiću (5). Moguće su tri vrste masnih kiselina koje se mogu oksidirati tj. metabolizirati: (i) masne kiseline sintetizirane *de novo*, (ii) egzogene masne kiseline koje su unesene hranom ili su mobilizirane iz drugih tkiva, (iii) masne kiseline nastale hidrolizom fosfolipida ili triglicerida (6).

Kako bi mogle ući u različite metaboličke reakcije, masne kiseline se prvo aktiviraju u stanici uz pomoć acil-koenzim A sintetaze do acil-CoA estera (7). Njihova oksidacija vrši se u mitohondriju, međutim u tom obliku mitohondrij ih ne može propustiti. Masne kiseline stupaju u reakcije s karnitin sustavom koji se sastoji od: karnitin palmitoiltransferaze 1 i 2 te karnitin/acilkarnitin transportnog sustava. Karnitin sustav u mitohondriju prikazan je na slici 2. Produkt tih reakcija je acil-CoA esteri koji ulaze u mitohondrij i stupaju u 4 reakcije β -oksidacije u mitohondriju (8).

Prva reakcija katalizirana je s acil-CoA dehidrogenazom gdje nastaje trans- Δ^2 -enoil-CoA koji onda ulazi u reakciju hidratacije pri čemu nastaje L-3-hidroksiacil-CoA (6). Daljnjom dehidrogenacijom pomoću 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaze nastaje 3-ketoacil-CoA. Zadnja reakcija sastoji se od tiolitičkog cijepanja pri čemu nastaje acetil-CoA i za dva ugljika kraći lanac acil-CoA (7). Osim acetil-CoA, β -oksidacijom reduciraju se i flavin-adenin-dinukleotid (FADH₂), koji je sudjelovao u prvoj reakciji oksidacije te nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH), koji je sudjelovao u trećoj reakciji oksidacije (8). Sva tri produkta oksidacije imaju važnu ulogu u Krebsovom ciklusu i respiratornom lancu (7).



Slika 2. Masne kiseline – karnitin sustav u mitohondriju (*prema Mesquita i Rodrigues, (3)*)

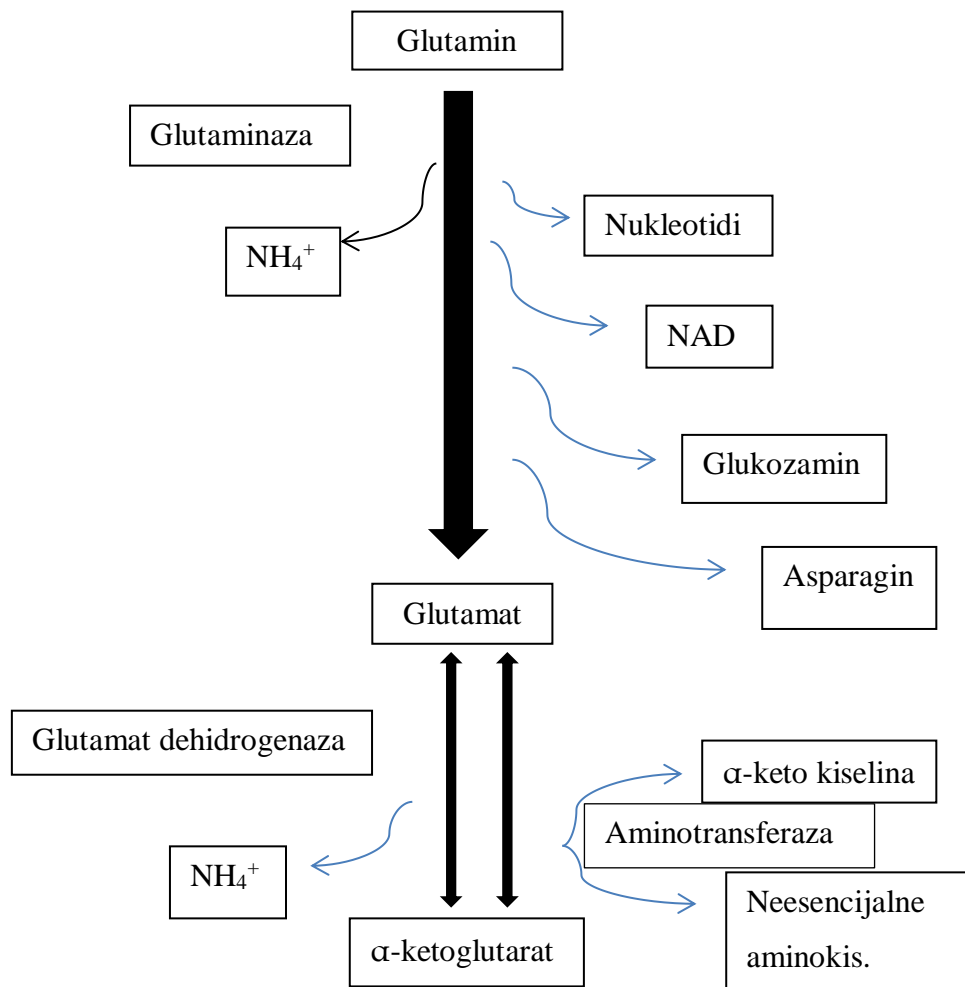
2.3. METABOLIZAM PROTEINA

Kao treći važan nutrijent, proteini se, nakon unosa hranom, u organizmu razgrađuju na aminokiseline. Za razliku od glukoze i masnih kiselina, aminokiseline se ne mogu pohranjivati u tijelu, već se koriste kao metabolička goriva ili kao biosintetski prekursori (3). Aminokiseline mogu biti esencijalne i neesencijalne. Esencijalne aminokiseline čovjek ne može sam sintetizirati, već ih mora unositi hranom dok neesencijalne može sintetizirati (9). Iako se metabolizam najčešće odvija u jetri, moguć je metabolizam i u bubrezima, mišićima i adipoznom tkivu (1). Metabolizam započinje reakcijom transaminacije pri čemu dolazi do premještanja amino skupine s aminokiseline na α -ketokiselinu. Reakciju provode enzimi aminotransferaze uz piridoksal fosfat, a produkt reakcije je nova aminokiselina. Najviše proučavane aminotransferaze su: aspartat aminotransferaza i alanin aminotransferaza. One reguliraju metabolizam alanina i aspartata. Produkti tih reakcija su oksaloacetat i piruvat, koji zajedno s glutamatom ulaze u Krebsov ciklus (3). Slijedeći korak je oksidativna deaminacija gdje se amino skupina prenosi s glutamata i formira se intermedijer. Intermedijer se hidrolizira, nastaje molekula amonijaka i obnavlja se α -ketoglutarat (1).

Neesencijalna aminokiselina, koje ima u izobilju je glutamin (10). Glutamin ima više funkcija u tijelu: sudjeluje u Krebsovom ciklusu, ima ulogu u staničnom metabolizmu te sudjeluje u sintezi nukleotida, glutation i drugih neesencijalnih aminokiselina (11). Navedene uloge glutamina prikazane su na slici 3. U stresnim situacijama u tijelu kao što su npr. sepsa,

malnutricija, oporavak do opekline ili operacije stanice imunološkog sustava iskorištavaju glutamin za oporavak jednako ili čak više od glukoze (10). Njegov metabolizam započinje prijenosom u stanicu pomoću glutamin transportera gdje se u mitohondriju događa pretvorba glutamina u glutamat. Ovu reakciju kataliziraju glutaminaze, a proces se zove glutaminoliza (12). U ovoj reakciji otpušta se amonijev ion. Nastali glutamat može prijeći u citosol i tamo sudjelovati u sintezi glutathiona ili ostati u mitohondriju gdje dolazi do oksidativne deaminacije (11). Oksidativnom deaminacijom nastaje α -ketoglutarat koji dalje može sudjelovati u Krebsovom ciklusu (11).

Esencijalne aminokiseline, kao što je već rečeno, su aminokiseline koje čovjek unosi hranom. U tu skupinu spadaju aminokiseline razgranatog lanca ili BCAA (valin, leucin i izoleucin) (13). Njihov metabolizam se događa u skeletnim mišićima, međutim princip metabolizma je isti kao i kod glutamina (14).



Slika 3. Glutamin kao izvor dušika i ugljika za biosintetske reakcije (prema Zhang i sur., (15))

2.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE METABOLIZMA

Nutrijenti koji se unose hranom prolaze kroz razne metaboličke procese u tijelu. Kako bi se поближе objasnio njihov metabolizam u zadnje vrijeme koristi se matematičko modeliranje (16). Matematičko modeliranje služi za bolje razumijevanje ljudskog metabolizma, bolji uvid u njegov fiziološki aspekt, dinamiku s ciljem dobivanja informacija koje bi se mogle koristiti u praksi (17). Metabolizam se prikazuje kao jedan model koji se proučava kao jedna velika cjelina, a ne skup podsustava koji su detaljno prikazani (16). Na ovaj način, moguće je testiranje hipoteza koje objašnjavaju komplicirana biokemijska stanja u tijelu koja se u praksi ne mogu izvoditi (17).

Postoje tri vrste modela koji se koriste:

1. Matematički model koji uzima u obzir fiziologiju sustava i njegove dijelove pri čemu se koriste matematičke jednačbe. Svaka varijabla ima fiziološko značenje. Pošto je model baziran na fiziologiju sustava veća je mogućnost reprezentativnih rezultata.
2. Model koji koristi matematičke principe koji objašnjavaju funkciju sustava. Jednostavniji su od prijašnjeg modela. Imaju dinamička svojstva promatranog sustava, ali ne striktno i fiziologiju.
3. Model koji se bazira na statističkim podacima. Procjenjuju se parametri i varijable modela pomoću statističkih metoda (18).

Nedostatak ovog pristupa je nedovoljno poznavanje metaboličkih procesa i uvjeta u kojima se ti procesi odvijaju. Također, javljaju se i poteškoće kod prijenosa rezultata matematičkog mjerenja u *in vivo* model. Potrebno je još daljnje poboljšanje modela i parametara (17). Međutim, prednost ovog modeliranja je svakako bolji uvid u metabolizam te usklađenost eksperimentalnih rezultata s matematičkim izrazima koji поближе taj metabolizam objašnjava (19).

2.5. SISTEMSKA BIOLOGIJA

Sistemska biologija je pristup koji se sastoji od *-omics* tehnologija (transkriptomika, metabolomika, proteomika te genomika). Koristi matematičke, statističke i računalne pristupe (bioinformatika i računalno modeliranje) kako bi se što bolje mogle razumjeti poveznice između sustava u ljudskom tijelu (20). Ne fokusira se na pojedine elemente u tijelu, već kako ti elementi (kao npr. geni, proteini, metaboliti) međusobno funkcioniraju i djeluju jedni na

druge. Proučavanjem elemenata na molekularnoj razini te razumijevanje njihovih odnosa uvelike pomaže u razumijevanju nastajanja bolesti i poremećaja u tijelu (21). Pomoću systemske biologije može se razumjeti interakcija između bioloških sustava u tijelu. To daje informacije koje mogu pomoću u liječenju samih bolesti, ali i prevencija istih.

S obzirom da systemska biologija proučava, gene, proteine, metabolite te njihove interakcije, ona također može proučavati utjecaj hrane tj. njenih komponenata na organizam (22). Zbog toga ovaj pristup ima veliki utjecaj na znanost o prehrani. Sve više istraživanja pokazuje kako upravo hrana ima velik utjecaj na razvoj bolesti i poremećaja. Stoga, nutricionizam pomoću systemske biologije pokušava personalizirati prehranu kako bi se zadovoljile biološke potrebe pojedinca na temelju njegovog zdravstvenog stanja (21).

2.5.1. Metabolomika

Metabolomika je grana *-omics* tehnologija koja proučava male molekule odnosno metabolite u biološkim tekućinama, tkivima i stanicama. Tehnologije kojima se služi su: spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR), plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) te tekućinska kromatografija spektrometrija masa (LC-MS) (23). Metabolomika se koristi kako bi se objasnili biokemijski putovi u organizmu te se istražuje poveznica nastanka metaboličkih poremećaja s unosom hrane (43). Neka istraživanja pokazala su da metaboliti imaju utjecaj na crijevnu mikrobiotu i njenu homeostazu (25). Metabolomika omogućava karakterizaciju viška tj. nedostatka nutrijenta, identifikaciju nusproizvoda hrane u biotekućinama ili tkivima, karakterizaciju niza kemikalija u hrani itd. i na taj način olakšava put ka stvaranju personalizirane prehrane (23).

2.5.2. Genomika

Genomika je znanost koja proučava odgovor gena na hranjivu tvar u tijelu te njihovu povezanost s nastankom različitih bolesti. Nutritivna genomika istražuje kako različiti genotipovi utječu na metabolizam hranjivih tvari (26). Koriste se tehnologije sekvenciranja slijedeće generacije (NGS, engl. *next generation sequencing*) kako bi se istraživali mali fragmenti DNA ili RNA. Na taj način moguće je pronalaženje različitih genomskih varijanti koje bi bolje mogle objasniti patofiziologiju bolesti. Uz pomoć ove tehnike, može se utvrditi kako različite genetske varijante utječu na apsorpciju, distribuciju, biotransformaciju hranjive tvari što je vrlo ključno kod sastavljanja personalizirane prehrane. Osim toga, može se vidjeti koja upravo hrana kod pojedinca može dovesti do razvitka određene bolesti ili poremećaja na osnovu njegovog genoma (24).

2.5.3. Transkriptomika

Transkriptomika koristi sekvenciranje RNA kako bi se istražio utjecaj prehrambenih navika na ekspresiju RNA. Ova tehnika se često koristi kako bi se utvrdila povezanost između ekspresije gena i pojave pretilosti u ljudi. Razvoj kroničnih bolesti povezan je s epigenetskim promjenama na MiRNA (male nekodirajuće endogene molekule RNA). Na MiRNA mogu utjecati između ostalog i prehrambeni čimbenici. Stoga, cilj transkriptomike je otkriti koji upravo nutrijenti tj. bioaktivne tvari iz hrane mogu dovesti do razvoja kroničnih bolesti kod pojedinca (24).

2.5.4. Proteomika

Proteomika se bavi istraživanjem strukture, modifikacije, interakcije i ekspresije proteina u tijelu (bilo da se radi o stanicama, biotekućinama, tkivima itd.) (24). Koristi razni niz tehnika, ali bazira se na masenoj spektrometriji (26). Cilj nutritivne proteomike je identifikacija proteina koji ulaze u interakciju s komponentama hrane, razumijevanje na koji način te komponente utječu na ekspresiju proteina te istraživanje bolesti koje su povezane s hranom koja utječe na ekspresiju proteina (24). Provedena istraživanja pokazala su povezanost antigena hrane i pojave autoimunih bolesti, zatim se pokazala povezanost odgode starenja i bolesti povezane sa starenjem zbog primjene dijeta s restrikcijom kalorija (24, 26). Prikupljene informacije koriste se za pripremu personaliziranog jelovnika za pojedinca.

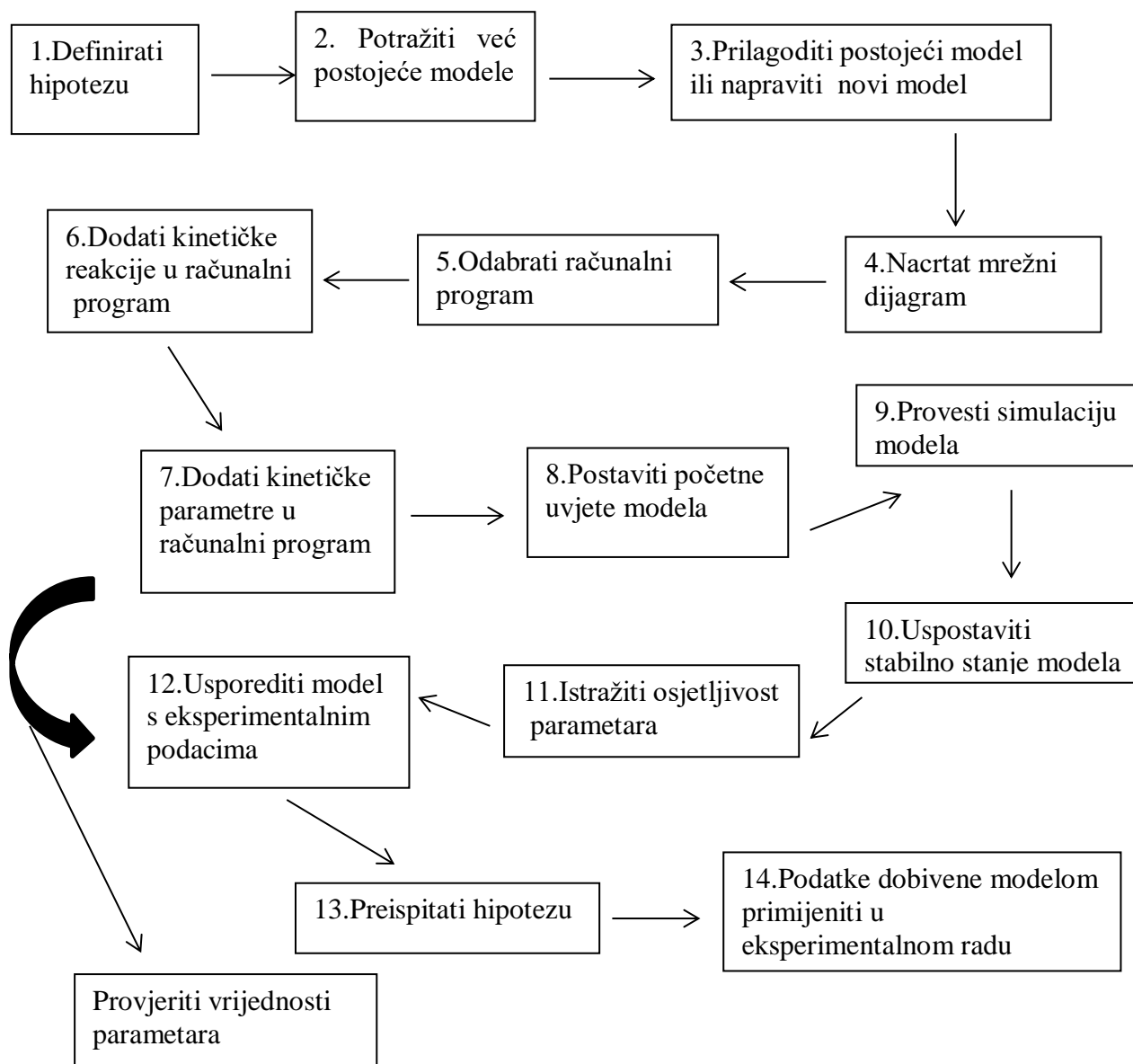
2.5.5. Bioinformatika i računalno modeliranje

Bioinformatika ima za cilj prikupiti podatke iz *-omics* znanosti (genomika, transkriptomika, proteomika i metabolomika) te ih analizirati, sistematizirati, pohraniti i na kraju protumačiti. Nakon toga slijede zaključci vezani uz dobivene podatke i mogućnost pojave različitih zdravstvenih stanja (26).

Važan dio systemske biologije jest računalno modeliranje. Naime, riječ je o pristupu koji koristi računalne modele koji objašnjavaju biološke sustave pomoću matematičkih jednadžbi. Cilj je objasniti dinamiku bioloških sustava i međusobno interakciju sustava kako bi se istraživale razne hipoteze (27). Razumijevanje bioloških sustava pomoglo bi liječenju mnogih bolesti (28).

Kod stvaranja modela vrlo je bitno postaviti hipotezu, poznavati temu koja će se obrađivati i biti vrlo sažet. Hipoteza mora biti jasno definirana, ne smije se ići u detalje te se zatrpavati mnoštvom informacija. Takav model neće biti reprezentativan. Koraci koji su potrebni za stvaranje modela navedeni su na slici 4. Postoje dva softvera pomoću kojih se izrađuju

modeli: *CellDesigner* i *COPASI*. Napravljen model se uspoređuje s *in vivo* modelom te ako se rezultati ne mogu usporediti potrebna je dorada modela (26). Velika prednost računalnih modela je što mogu objasniti razna biokemijska i molekulska čvorišta koja su direktno povezana sa zdravljem cijelog organskog sustava i tkiva. Ovakav način istraživanja ima budućnost jer biološki sustavi su jako složeni te ponekad nije moguće provesti eksperimente *in vivo* (28).



Slika 4. Koraci uključeni u razvoj računalnog modela (prema Mc Auley i Mooney, (27))

2.6. ULOGA SISTEMSKJE BIOLOGIJE U PLANIRANJU PREHRANE

Zdrav način života i uravnotežena prehrana imaju velik utjecaj na razvoj bolesti. Naime, sve više istraživanja pokazuje kako upravo prehrana može biti ključan faktor za razvoj bolesti (kardiovaskularne bolesti, dijabetes i slično). Individualan pristup je ključan kako bi se što efektivnije liječilo neko zdravstveno stanje ili pak unaprijed preveniralo od istog. Stoga, personalizirana prehrana je prvi korak ka tome (29).

Sistemska biologija pomoću *-omics* tehnologija pripomaže u stvaranju personalizirane prehrane. Genomika, transkriptomika, proteomika te metabolomika omogućavaju bolje poznavanje bioloških sustava na razni molekula. Na taj način dobiva se bolji uvid u patofiziologiju bolesti, a samim time saznaju se i njeni okidači. Pomoću tih informacija može se regulirati razvoj bolesti odnosno može se pokušati izbjeći razvoj bolesti (23). Na temelju poznavanja bioloških sustava, njihovih interakcija s hranom može se osmisliti personalizirana prehrana. Ta prehrana vrijedi upravo za pojedinca na temelju njegovih bioloških sustava koji su promatrani kao cjelina (29).

Znanost o prehrani pomoću ovog pristupa pokušava liječiti ili usporiti stanja kao što su pretilost, hipertenzija, dijabetes, starenje itd. Potrebna su još daljnja istraživanja kako bi se usavršio ovaj pristup s obzirom da su biološki sustavi vrlo kompleksni, a modeli *in vivo* ponekad neizvedivi.

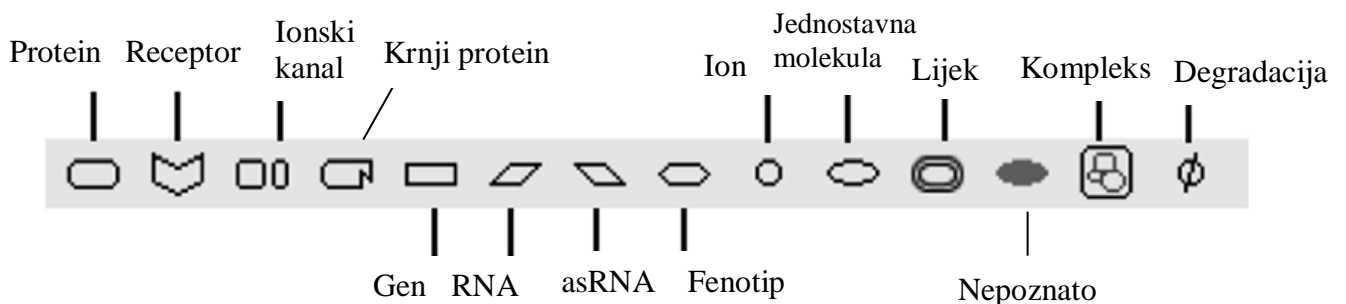
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. CellDesigner

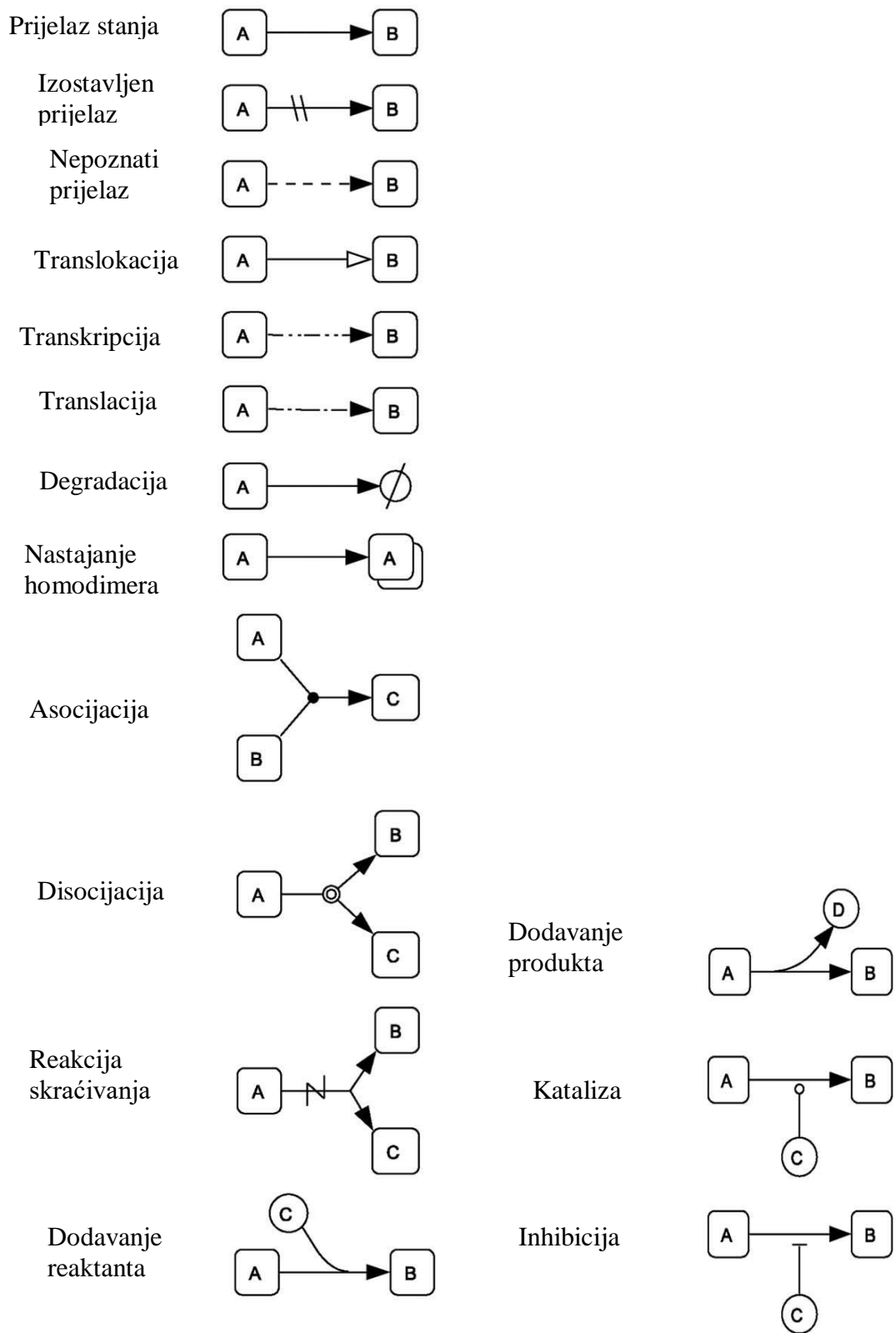
Za izradu i bolje razumijevanje biokemijskih putova u biološkim sustavima koristi se *CellDesigner*. *CellDesigner* je softverski alat koji se koristi za izgradnju modela biokemijskih putova, a koristi smjernice iz sustava SBML (engl. *Systems Biology Markup Language*) i SBGN (engl. *Systems Biology Graphical Notation*) (30). SBML je format koji se koristi za predstavljanje računalnih modela koji se sastoje od različitih regulatornih, signalnih i metaboličkih putova (30). Pomoću SBGN-a (za kojeg se smatra da će postati standard u ovom području) omogućava se grafički prikaz koji objašnjava biokemijski put (31). Postoje razne baze podataka koje sadržavaju različite modele bioloških sustava. S obzirom da je *CellDesigner* povezan s takvim bazama podataka to omogućava preuzimanje modela iz istih i daljnji rad na njima (32). *CellDesigner 4.4.2* (Systems Biolog Institute, Tokyo, Japan) je korišten u ovom radu.

Kako bi započela izrada modela potrebno je otvoriti *CellDesigner*, stvoriti novu datoteku te odrediti koliki će biti prostor u kojem će se odvijati reakcije. Zatim u prostor koji je napravljen dodaju se različiti supstrati koji sudjeluju u reakcijama. S obzirom da sudjeluju različite vrste spojeva u biokemijskim reakcijama, u *CellDesigneru* postoje različiti simboli za te iste spojeve (vidi na slici 5).



Slika 5. Simboli biokemijskih vrsta u *CellDesigner-u* (prema Matsuoka i sur., (30))

Različite reakcije imaju svoj način obilježavanja (slika 6).



Slika 6. Prikaz biokemijskih reakcija (prema Funahashi i sur., (33))

Nakon što su svi supstrati povezani odnosno uvršteni u reakciju definiraju se izrazi za brzine reakcija. Izrazi za brzine reakcija uključuju kinetike parametara kojima se mora zadati vrijednost. Nakon što su unesene vrijednosti za parametre, određuju se početne koncentracije supstrata i vrijeme koje je potrebno da se reakcije odvijaju. Vrlo je bitno da su svi parametri označeni i da svi imaju određenu vrijednost kako bi se simulacija mogla izvesti. Nakon što su sve vrijednosti definirane provodi se simulacija.

3.1.2. Model metabolizma glavnih nutrijenata

Model se sastoji od tri energetska izvora: masne kiseline, jednostavni šećeri te aminokiseline. Model također obuhvaća i 3 oblika njihove pohrane: masti, glikogen i proteini. Piruvat i acetil-CoA djeluju kao molekule prijenosnici. Model sadrži 8 biokemijskih reakcija i 32 parametara. Reakcije su pojednostavljene kako bi se što lakše mogao razumjeti mehanizam metabolizma. Navedenih 8 reakcija može se vidjeti u tablici 1. Izlučivanje masnih kiselina u modelu prikazano je kao reakcija degradacije. Brzina kojom se jednostavni šećeri dostavljaju iz hrane označena je oznakom S_1 . S_2 predstavlja brzinu kojom se dostavljaju masne kiseline iz hrane dok je S_3 brzina kojom se dostavljaju aminokiseline. Navedeni parametri uvršteni su kao dio reakcija, ali nisu prikazani u modelu jer su oni konstante. Svim parametrima je odmah definirana vrijednost koja je navedena u tablici 2. Nekim parametrima je vrijednost određena prema profilu krivulja metabolita modela (oni su u tablici 2 označeni zvjezdicom). Određene molekule već postoje u tijelu odnosno imaju nekakvu početnu koncentraciju, koja je zabilježena u tablici 3. Početne koncentracije supstrata dobivene su na temelju se napravljenih jelovnika (tablica 4). Prilikom računanja koncentracije ugljikohidrata, masa vlakana nije uračunata jer se vlakna ne metaboliziraju. Vlakna se dijele na topljiva (pektini, gume, fruktan inuliskog tipa) i netopljiva (lignin, celuloza, neke hemiceluloze..). U istraživanju Lattimer, Haub iz 2010. godine uočeno je da topljiva vlakna dovode do smanjene apsorpcije makronutrijenata i do odgođenog pražnjenja želudca (34). To rezultira smanjenim postprandijalnim odgovorom glukoze u krvi. Smatra se da je razlog tome viskoznost topivih vlakana. Što se tiče netopivih vlakana, smatra se da on nemaju veliki utjecaj na apsorpciju makronutrijenata jer povećavaju brzinu prolaska hrane kroz crijeva. Međutim, neka istraživanja pokazala su da netopiva vlakna poboljšavaju odlaganje glukoze u tijelu što dovodi do bolje osjetljivosti na inzulin (34).

Tablica 1. Biokemijske reakcije u metabolizmu glavnih nutrijenata i njihovi kinetički izrazi (prema Drew, (2))

REAKCIJA	KINETIČKI IZRAZ
Sinteza jednostavnih šećera	$\frac{dSS}{dt} = k_1 \frac{G}{1 + \frac{G}{K_1}} - k_2 \frac{SS}{1 + \frac{SS}{K_2}} + k_3 \frac{Pyr}{1 + \frac{Pyr}{K_3}} - k_4 \frac{SS}{1 + \frac{SS}{K_4}} + S_1$
Stvaranje piruvata	$\frac{dPyr}{dt} = k_4 \frac{SS}{1 + \frac{SS}{K_4}} - k_3 \frac{Pyr}{1 + \frac{Pyr}{K_3}} + k_{11} \frac{AA}{1 + \frac{AA}{K_{11}}} - k_{10} \frac{Pyr}{1 + \frac{Pyr}{K_{10}}} - k_5 \frac{Pyr}{1 + \frac{Pyr}{K_5}}$
Stvaranje acetil-CoA	$\frac{dAcA}{dt} = k_5 \frac{Pyr}{1 + \frac{Pyr}{K_5}} + k_6 \frac{FA}{1 + \frac{FA}{K_6}} - k_9 \frac{AcA}{1 + \frac{AcA}{K_9}} + k_{14} \frac{AA}{1 + \frac{AA}{K_{14}}} - U$
Sinteza aminokiselina	$\frac{dAA}{dt} = k_{13}P - k_{12} \frac{AA}{1 + \frac{AA}{K_{12}}} + k_{10} \frac{Pyr}{1 + \frac{Pyr}{K_{10}}} - k_{11} \frac{AA}{1 + \frac{AA}{K_{11}}} + S_3 - k_{14} \frac{AA}{1 + \frac{AA}{K_{14}}}$
Stvaranje proteina	$\frac{dP}{dt} = k_{12} \frac{AA}{1 + \frac{AA}{K_{12}}} - k_{13}P$
Sinteza masnih kiselina	$\frac{dFA}{dt} = k_9 \frac{AcA}{1 + \frac{AcA}{K_9}} - k_6 \frac{FA}{1 + \frac{FA}{K_6}} + k_7 \frac{F}{1 + \frac{F}{K_7}} - k_8 \frac{FA}{1 + \frac{FA}{K_8}} + S_2 - k_E FA$
Skladištenje masnih kiselina u obliku masti	$\frac{dF}{dt} = k_8 \frac{FA}{1 + \frac{FA}{K_8}} - k_7 \frac{F}{1 + \frac{F}{K_7}}$

*SS-jednostavni šećeri, F-masti, P-proteini

Tablica 2. Parametri i njihove vrijednosti (prema Pearson i sur., (16))

PARAMETAR	VRIJEDNOST (mmol/min/L)
Brzina pretvorbe glikogena, k_1	7,2 *
Konstanta disocijacije glikogena, K_1	$1,8 \cdot 10^{-4}$
Brzina dobavljanja jednostavnih šećera, S_1	1,44 *

Tablica 2. Parametri i njihove vrijednosti (prema Pearson, Wattis, King, MacDonald, Mazzatti, 2014 (16)) – nastavak

Brzina pretvorbe jednostavnih šećera, k_2	0,9 *
Konstanta disocijacije jedn. šeć., K_2	3,55 *
Brzina pretvorbe piruvata, k_3	0,5772 *
Konstanta disocijacije piruvata, K_3	0,00402 *
Brzina pretvorbe jednostavnih šećera, k_4	0,28192 *
Konstanta disocijacije jedn. šeć., K_4	$5,8 \cdot 10^{-4}$
Brzina pretvorbe piruvata, k_5	1,18
Konstanta disocijacije piruvata, K_5	1,19
Stupanj potrošnje energije, U	1,02 *
Brzina pretvorbe masnih kiselina, k_6	$1,0 \cdot 10^{-4}$
Konstanta disocijacije masnih kiselina, K_6	$1,8 \cdot 10^{-4}$
Brzina pretvorbe masti, k_7	3,5761 *
Konstanta disocijacije masti, K_7	0,01733 *
Brzina dobavljanja masnih kiselina, S_2	0,12 *
Brzina pretvorbe masnih kiselina, k_8	0,40033
Konstanta disocijacije masnih kiselina, K_8	7,63485 *
Brzina pretvorbe acetil-CoA, k_9	0,55 *
Konstanta disocijacije acetil-CoA, K_9	0,229
Brzina pretvorbe piruvata, k_{10}	0,2 *
Konstanta disocijacije piruvata, K_{10}	0,556
Brzina dobavljanja aminokiselina, S_3	1,41 *
Brzina pretvorbe aminokiselina, k_{11}	1,51
Konstanta disocijacije aminokiselina, K_{11}	10,96 *
Brzina pretvorbe aminokiselina, k_{12}	0,067 *
Konstanta disocijacije aminokiselina, K_{12}	1,56
Brzina pretvorbe proteina, k_{13}	0,12 *
Brzina pretvorbe aminokiselina, k_{14}	0,151
Konstanta disocijacije aminokiselina, K_{14}	1,31
Konstanta izlučivanja masnih kiselina, k_{EX}	0,28 *

*- vrijednost parametara određena prema profilu krivulja metabolita modela

Tablica 3. Početne koncentracije varijabli modela (prema Lakatos i sur., (35))

VARIJABLA	KONCENTRACIJA (mol/L)
Glikogen, G	6,7
Masne kiseline, FA	0,23
Aminokiseline, AA	3,53
Piruvat, Pyr	0,53
Acetil-CoA, AcA	13,28

Tablica 4. Početne koncentracije supstrata

SUPSTRATI	1. jelovnik	2. jelovnik	3. jelovnik	4. jelovnik
DORUČAK (mol/L)				
PROTEINI	$9,65 \cdot 10^{-5}$	$9,95 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-4}$	$9,42 \cdot 10^{-5}$
MASTI	$1,97 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$1,83 \cdot 10^{-3}$
UGLJIKOHIDRATI	$6,26 \cdot 10^{-2}$	$5,76 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^{-2}$	$5,87 \cdot 10^{-2}$
RUČAK (mol/L)				
PROTEINI	$1,11 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,06 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$
MASTI	$4,45 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$6,26 \cdot 10^{-3}$
UGLJIKOHIDRATI	$6,71 \cdot 10^{-2}$	$7,36 \cdot 10^{-2}$	$8,49 \cdot 10^{-2}$	$8,55 \cdot 10^{-2}$
VEČERA (mol/L)				
PROTEINI	$1,30 \cdot 10^{-4}$	$9,15 \cdot 10^{-5}$	$8,68 \cdot 10^{-5}$	$1,16 \cdot 10^{-4}$
MASTI	$5 \cdot 10^{-3}$	$3,35 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$4,45 \cdot 10^{-3}$
UGLJIKOHIDRATI	$6,69 \cdot 10^{-2}$	$6,29 \cdot 10^{-2}$	$6,26 \cdot 10^{-2}$	$7,5 \cdot 10^{-2}$

3.1.3. Smjernice za jelovnik

U sklopu ovog rada napravljen je dijabetički jelovnik za 4 dana. Dnevni energetske unos bio je 1700 kcal koje su se rasporedile na 3 glavna obroka i 1 noćni obrok. Jelovnici su pratili prehrambene smjernice određene za dijabetičare.

Kod dijabetičara vrlo važnu ulogu ima prehrana te zdrav način života. Fokus je na izboru namirnica i načinu odnosno količini njihove konzumacije. Hrana je podijeljena u 6 skupina:

mlijeko i zamjene, meso i zamjene, kruh i zamjene, voće, povrće te masnoće i zamjene (36). Ugljikohidrati, kao primarni izvor energije, imaju vrlo važnu ulogu u regulaciji postprandijalnog odgovora glukoze u krvi. Kod odabira hrane bogate ugljikohidratima vrlo je bitno odabrati hranu niskog glikemijskog indeksa te hranu bogatu vlaknima (povrće, mahunarke, voće, cjelovite žitarice) (37). Dokazano je da povećana konzumacija vlakana može poboljšati razinu glukoze u krvi. Što se tiče unosa masti, studije pokazuju da je važnija vrsta masti nego količina. Polinezasićene masti pokazale su povoljan učinak na smanjenje rizika od dijabetesa tipa 2 te da imaju zaštitnu ulogu kod koronarnih bolesti (38). Kako bi se povećao unos polinezasićenih masti vrlo je bitan unos ribe (37). Adekvatan unos proteina ima važnu ulogu kod dijabetesa jer osobe s dijabetesom prilikom neadekvatne prehrane gube puno brže mišićnu masu od zdrave osobe (38). Smatra se da je upravo Mediteranska prehrana najbolji način ishrane kako bi pojedinac povoljno utjecao na razinu glukoze te smanjio postotak pojave koronarnih bolesti povezanih s dijabetesom (37).

S obzirom da se radi o prehrani koja se temelji na skupinama i jedinicama hrane, vrlo je bitno držati se pravila u cilju postizanja optimalne razine glukoze u krvi, imati dobar lipidni profil, postići uredan krvni tlak itd. Treba smanjiti unos soli i alkohola. Osim prehrambenih čimbenika vrlo je bitna tjelesna aktivnost kako bi se održala adekvatna tjelesna masa (36). Prilikom izrade jelovnika te kod računanja mase i udjela makronutrijenata korištena je USDA (*engl. United States Department of Agriculture*) tablica koja sadrži kemijski sastav namirnica.

3.2. METODE

3.2.1. Razvoj i simulacija modela metabolizma glavnih nutrijenata u CellDesigner-u

U računalnom programu *CellDesigner* provedena je simulacija metabolizma glavnih nutrijenata prema modelu koji je predložen u radu Drew iz 2018. godine (2). Cilj je bio simulacijom vidjeti promjenu koncentracije metabolita glavnih nutrijenata nakon određenog vremena. Početne koncentracije uzete su iz kreiranih jelovnika namijenjenih za dijabetičare.

3.2.2. Analiza lokalne parametarske osjetljivosti

Kao što je već navedeno u radu, u sistemskoj biologiji matematički modeli se koriste kako bi se objasnili biološki sustavi te njihova dinamika. Prilikom izrade modela vrlo je bitno biti upoznat s eksperimentalnim putem, znati vremenski tijek reakcija i između ostalog znati i

kinetičke parametre (39). Problemi vezani uz parametre su: vrijednost parametara se vrlo teško može izmjeriti eksperimentalno ili se uopće ne mogu izmjeriti ili pak postoje velike razlike u vrijednosti parametara tokom različitih eksperimentalnih uvjeta. Kako bi se što lakše odnosno što točnije napravio model, gdje su vrijednosti parametara pouzdane, koristi se analiza osjetljivosti parametara. Radi se o tehnici koja provjerava povezanost promjena u izlaznim informacijama s promjenama na ulaznim informacijama modela. Analiza osjetljivosti parametara pokazuje koliko su rezultati modela pouzdani s obzirom na promjene parametara. To je vrlo bitno za izradu bioloških sustava. Također, pomoću analize može se vidjeti koji zapravo parametri su ključni za važne promjene u modelu te tu informaciju koristiti za daljnja eksperimentiranja. Analiza lokalne osjetljivosti koristi se na način da se mijenja vrijednost jednog parametra te se gleda kako ta promjena utječe na rezultat modela (40).

U ovom radu napravljena je analiza lokalne osjetljivosti parametara na 32 parametra (navedena u tablici 2), gdje je vrijednost parametara povećana i umanjena za 5 %. Promatralo se kako upravo varijacije u vrijednosti parametara utječu na izlazne varijable: glikogen, jednostavni šećeri, piruvat, aminokiseline, proteini, masne kiseline, masti, acetyl-CoA te izlučivanje. Rezultati su prikazani pomoću je *Microsoft Office Excel 2010* (Microsoft, Redmond, Washington, SAD).

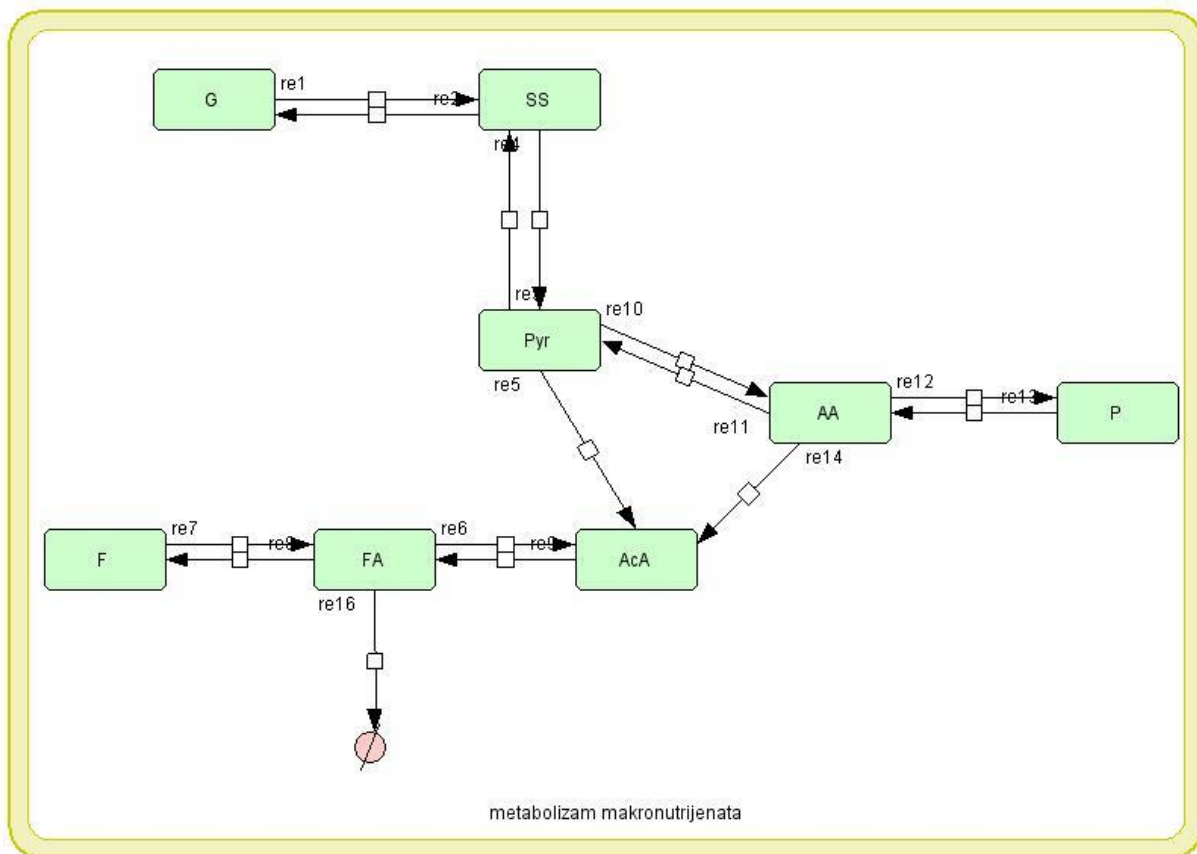
4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedena je simulacija metabolizma glavnih nutrijenata u *CellDesigner-u*. Promatra se promjena koncentracija metabolita nutrijenata kroz vremenski period od 100 minuta (1h 40min). Početne koncentracije nutrijenata izračunate su iz napravljenih jelovnika koja se sastoje od tri glavna obroka (doručak, ručak, večera) + noćni obrok. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 8 - 25. Na grafovima se nalazi promjena koncentracije jednog metabolita kroz 100 minuta s tim da je graf podijeljen po obrocima. To znači da se na svakom grafu nalazi promjena koncentracije metabolita npr. masti koja se konzumirala kroz četiri doručka.

Nakon simulacije provedena je analiza lokalne osjetljivosti parametara. Svim parametrima se vrijednost prvo povećala za 5 %, a zatim smanjila. Proučavalo se kako upravo promjena vrijednosti parametara može utjecati na vrijednost izlaznih varijabli. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 25 - 28.

4.1. PRIKAZ MODELA METABOLIZMA GLAVNIH NUTRIJENATA

Model metabolizma glavnih nutrijenata prikazan je pomoću računalnog programa *CellDesigner*. *CellDesigner* je računalni program koji ima važnu ulogu u sistemskoj biologiji. On omogućava dizajniranje raznih modela koji prikazuju mehanizme bioloških sustava. Na taj način moguća je provedba raznih eksperimenata na temelju hipoteza koje pomažu u rješavanju raznih zdravstvenih stanja (26). Model metabolizma glavnih nutrijenata se sastoji od 8 biokemijskih reakcija prikazanih u tablici 1 te od 27 parametara koji su prikazani u tablici 2. U modelu su reakcije pojednostavljen (bilo da se rado o reverzibilnim ili ireverzibilnim) kako bi se što lakše mogao razumjeti mehanizam samog metabolizma nutrijenata koji se unose hranom. Također, svaka reakcija u tijelu je katalizirana s više enzima, ali s obzirom da se model želi prikazati vrlo sažeto smatra se da jedan enzim katalizira svaku reakciju (2). Reakcija izlučivanja masnih kiselina je prikazana kao reakcija degradacije. Grafički prikaz modela u *CellDesigner-u* prikazan je na slici 7.



Slika 7. Prikaz modela metabolizma makronutrijenata u *CellDesigner-u*

4.2. PRIKAZ JELOVNIKA

Prilikom izrade jelovnika pratile su se smjernice koje su određene za dijabetičare. Vrlo je bitno da se unosu namirnice koje će pomoći regulirati razinu glukoze u krvi te omogućiti što zdraviji način života. Uz pridržavanje prehrambenih smjernica vrlo je bitno uključiti i nekakvu tjelesnu aktivnost. Mediteranska prehrana se pokazala kao adekvatan prehrambeni obrazac koji bi pružio dijabetičarima zdraviji način života (37). Prilikom razvoja jelovnika bilo je bitno da se unese što više namirnica kao što su cjelovite žitarice, povrće, voće, mahunarke (namirnice koje sadržavaju dosta prehrambenih vlakana), ali i dobar izvor proteina, pogotovo ribe zbog omega-3-masnih kiselina te unos masnoća u obliku maslinova

ulja. Ove namirnice bi treba doprinijeti boljoj regulaciji glukoze, lipidnom profilu, ali i smanjenju mogućih komplikacija vezanih uz bolesti.

Rad se sastoji od 4 jelovnika, svaki podijeljen na 3 glavna obroka i 1 noćni obrok. Svaki jelovnik ima kalorijski unos od oko 1700 kcal (± 70 kcal). Jelovnik od 3 glavna obroka i 1 noćni obrok preporučaju se dijabetičarima koji su na bazal bolusnoj inzulinskoj terapiji ili na premiješanim inzulinskim analogima u dvije ili tri doze (36). Doručak se sastoji od: 1 jedinice mlijeka i zamjena, 2 jedinice mesa i zamjena, 2 jedinice kruha i zamjena te 1 jedinice voća. Ručak sadrži: 2 jedinice mesa i zamjena, 2 jedinice povrća, 3 jedinice kruha i zamjena, 2 jedinice masnoća i zamjena te 1 jedinicu voća. Večeru čini: 2 jedinice mesa i zamjena, 1 jedinica povrća, 3 jedinice kruha i zamjena, 2 jedinice masnoća i zamjena te 1 jedinicu voća. Noćni obrok se sastoji od 1 jedinice mlijeka i zamjena (obično se radi ili o čaši mlijeka ili o čaši jogurta).

Prvi jelovnik prikazan u tablici 5 sadrži 1650,9 kcal. Unos ugljikohidrata iznosi 224,90 g, proteina 91,0 g te masnoća 48,57 g. Unos zasićenih masti 14,09 g dok je masa vlakana 30,93 g. Drugi jelovnik (tablica 6) osigurava 1623,52 kcal gdje masa ugljikohidrata iznosi 225,53 g, proteina 82,42 g te unos masti iznosi 54,51 g. Unos zasićenih masti čini 18,85 g dok unos vlakana iznosi 33,79 g. U trećem jelovniku, koji je prikazan u tablici 7, uneseno je 1628,42 kcal. Unos ugljikohidrata čini 234,03 g dok proteini čine 80,73 g te masnoće 48,69 g. Unos prehrambenih vlakana iznosi 31,76 grama dok masa zasićenih masti 17,56 g. Posljednji, četvrti jelovnik se sastoji od 1741,41 kcal, a od toga 250,39 g otpada na ugljikohidrate. Masa proteina iznosi 90,39 g, a masa masti 52,12 g dok unos zasićenih masti čini 16,43 g. Unos vlakana iznosi 36,02 g. Navedeni jelovnik možemo vidjeti u tablici 8.

Tablica 5. Dijabetički jelovnik za prvi dan

OBROK	NAMIRNICE	MAKRONUTRIJENTI
Doručak: kruh sa svježim sirom te smoothie od banane	240 g mlijeka 60 g svježeg kravljeg sira 70 g integralnog kruha (dvije šnite) 60 g banane	22,4 g proteina 7,61 g masti 60,75 g ugljikohidrata
Ručak: salata od tune, prosa, avokada, cherry rajčica i zelene salate, jabuka	60 g tune 120 g skuhanog prosa 100 g zelene salate 100 g cherry rajčice 5 g maslinovog ulja 30 g avokada 80 g kukuruza 100 g jabuke	25,75 g proteina 17,17 g masti 72,85 g ugljikohidrata
Večera: kajgana s mozarellom i tikvicama s kruhom, salata od slanutka te kivi	70 g bjelanjaka 30 g mozarelle 100 g tikvica 10 g maslinovog ulja 75 g slanutka 70 g raženog kruha (dvije fete) 100 g kivija	30,26 g proteina 20,07 g masti 74,41 g ugljikohidrata
Noćni obrok: probiotički jogurt	240 g probiotičkog jogurta	12,6 g proteina 3,72 g masti 16,90 g ugljikohidrata
Energetski unos: 1653,90 kcal		
Unos makronutrijenata: Proteini 20 % Ugljikohidrati 54,40 % Masti 26,40 %		

Tablica 6. Dijabetički jelovnik za drugi dan

OBROK	NAMIRNICE	MAKRONUTRIJENTI
Doručak: zobena kaša na mlijeku s jabukom i borovnicama, sendvič s purećom šunkom i sirom	240 g mlijeka 30 g posnog sira 30 g pureće šunke 35 g integralnog kruha 20 g zobenih pahuljica 50 g borovnica 50 g jabuka	23,11 g proteina 12,73 g masti 57,68 g ugljikohidrata
Ručak: juha od graška i mrkve, pečena pileća prsa s krumpirom s malo ulja, zelena salata te kruška	100 g mrkve 100 g graška 60 g pilećih prsa 160 g pečenog krumpira 100 g zelene salate 10 g maslinovog ulja 100 g kruške	25,47 g proteina 25,10 g masti 82,98 g ugljikohidrata
Večera: tjestenina s piletinom, tikvicama, kukuruzom te salata od rajčica, naranča	60 g piletine 50 g rajčice 50 g tikvice 80 g kukuruza 120 g tjestenine 10 g maslinovog ulja 100 g naranče	21,24 g proteina 12,95 g masti 67,97 g ugljikohidrata
Noćni obrok: probiotički jogurt	240 g probiotičkog jogurta	12,6 g proteina 3,72 g masti 16,90 g ugljikohidrata
Energetski unos: 1623,52 kcal		
Unos makronutrijenata: Proteini 15,5 % Ugljikohidrati 55,60 % Masti 30,20 %		

Tablica 7. Dijabetički jelovnik za treći dan

OBROK	NAMIRNICE	MAKRONUTRIJENTI
Doručak: raženi kruh s kuhanim jajima, purećom šunkom, probiotički jogurt i jabuka	240 g probiotičkog jogurta 30 g pureće šunke 70 g raženog kruha (dvije šnite) 30 g jaja 100 g jabuka	28,19 g proteina 11,55 g masti 65,01 g ugljikohidrata
Ručak: kuhani oslić s kuhanim krumpirom i mahunama	60 g oslića 300 g krumpira 200 g mahuna 10 g maslinovog ulja 100 g kruške	24,66 g proteina 13,90 g masti 91,61 g ugljikohidrata
Večera: rižot od pilećih prsa, graška, mrkve i luka te naranča	60 g piletine 50 g luka 50 g mrkve 100 g graška 120 g riže 10 g maslinovog ulja 100 g naranče	20,15 g proteina 15,45 g masti 66,56 g ugljikohidrata
Noćni obrok: mlijeko	240 g mlijeka	7,73 g proteina 7,80 g masti 10,85 g ugljikohidrata
Energetski unos: 1628,42 kcal		
Unos makronutrijenata: Proteini 17,1 % Ugljikohidrati 57,50 % Masti 26,90 %		

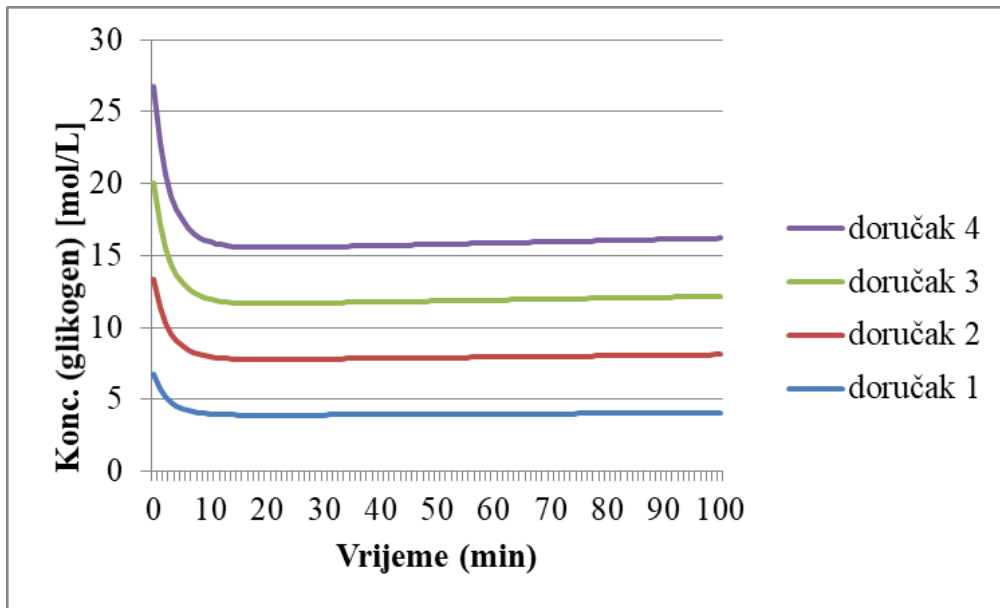
Tablica 8. Dijabetički jelovnik za četvrti dan

OBROK	NAMIRNICE	MAKRONUTRIJENTI
Doručak: heljdina kaša na mlijeku s bananom, feta kruha sa sirom	240 g mlijeka 60 g svježeg kravljeg sira 35 g raženog kruha 20 g heljde 60 g banane	21,86 g proteina 7,07 g masti 58,49 g ugljikohidrata
Ručak: varivo od svinjetine, krumpira, mrkve, graška i paprike, bademi s jabukom	60 g svinjetine 100 g mrkve 100 g graška 200 g krumpira 50 g luka 50 g crvene paprike 10 g maslinovog ulja 8 g badema 100 g jabuke	28,93 g proteina 24,17 g masti 93,80 g ugljikohidrata
Večera: salata od piletine, kvinoje, slanutka, paprike, rajčice, kivi	60 g piletine 50 g paprike 50 g rajčice 75 g slanutka 120 g kvinoje 10 g maslinovog ulja 100 g kivija	27,01 g proteina 17,16 g masti 81,21 g ugljikohidrata
Noćni obrok: probiotički jogurt	240 g probiotičkog jogurta	12,6 g proteina 3,72 g masti 16,90 g ugljikohidrata
Energetski unos: 1741,41 kcal		
Unos makronutrijenata: Proteini 17,1 % Ugljikohidrati 57,50 % Masti 26,90 %		

4.3. SIMULACIJA MODELA METABOLIZMA GLAVNIH NUTRIJENATA

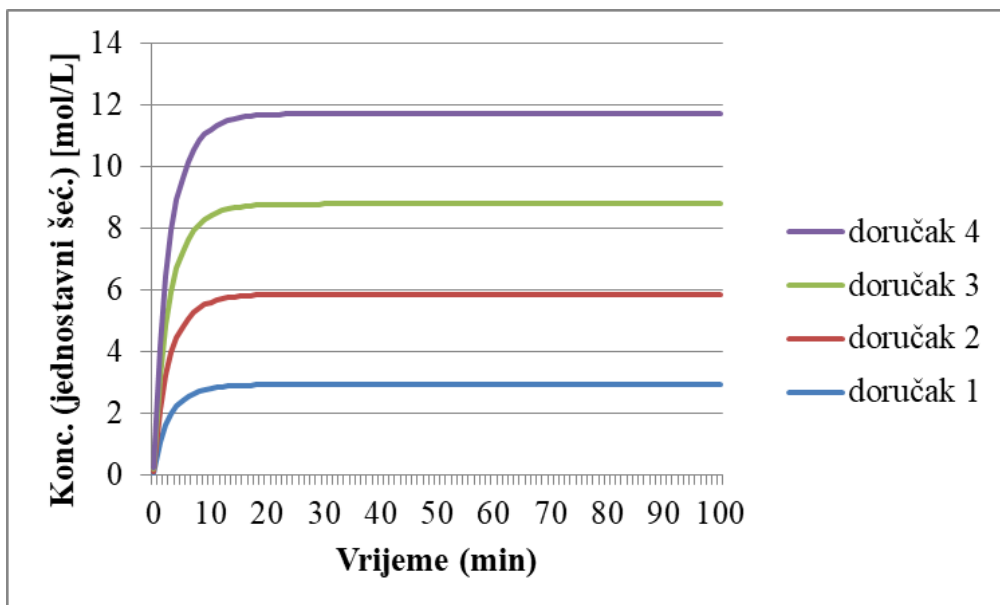
Nakon razvijenih jelovnika provedena je simulacija u *CellDesigner-u*. Početne koncentracije supstrata izračunate su pomoću jelovnika prikazanih u tablicama 5 – 8. Koncentracije supstrata mogu se vidjeti u tablici 4. Koncentracija metabolita (tablica 3) prikazana u istim jedinicama kao i koncentracija supstrata (mol/L). Koncentracija ugljikohidrata ne uključuje masu vlakana jer se ne mogu metabolizirati. Promjena koncentracije supstrata i njihovih metabolita praćena je iza svakog obroka u razdoblju od 100 minuta. Smatra se da svaku reakciju katalizira jedan enzim te su reakcije pojednostavljene zbog jasnijeg pristupa. Nakon simulacije napravljeni su grafovi koji su prikazani na slikama 8 - 25. Svaki graf prikazuje promjenu koncentracije pojedinog supstrata i metabolita kroz 100 minuta za 4 ista obroka npr. promjena koncentracije aminokiselina u vremenskom razdoblju od 100 minuta za četiri doručka. Kao što je već rečeno, grafovi su određeni prema obrocima, stoga će se prvo prikazati grafovi koji pokazuju promjene koncentracije supstrata i njihovih metabolita tijekom doručka. Zatim slijedi ručak i na kraju večera. Noćni obrok se nije uzimao u obzir jer se uvijek radilo o unosu jedne namirnice koja je bila ili mlijeko ili jogurt.

Kao što je u radu Drew (2) spomenuto, nakon konzumacije hrane došlo je do skokova u koncentraciji ugljikohidrata, masnih kiselina i aminokiselina. U radu se pomoću modela promatrala ravnoteža te se zaključilo da ukoliko je koncentracija skladišnih molekula nutrijenata iznad ravnoteže koncentracija istih molekula će i dalje rasti bez obzira na uravnotežen unos i iskorištenje molekula. Međutim, ako je koncentracija skladišnih molekula ispod ravnoteže smanjivati će se njihova koncentracija. Ravnoteža proteina stabilna dok ravnoteža masti ovisi o razini masnih kiselina i nakupljanja masti navodi rad Drew (2). Ovisno o tome koliko se unosi masti i koliki je utrošak energije odredit će ravnotežu masti. Ako se unosi malo masti smanjena će biti i razina masnih kiselina. To se može vidjeti i na grafovima prikazanim na slikama 10 i 11. S obzirom da model pretpostavlja da su sve reakcije brze, osim reakcija koje opisuju otpuštanje molekula iz njihovih skladišnih oblika, smatra se da je model ugljikohidrata u približnoj ravnoteži.



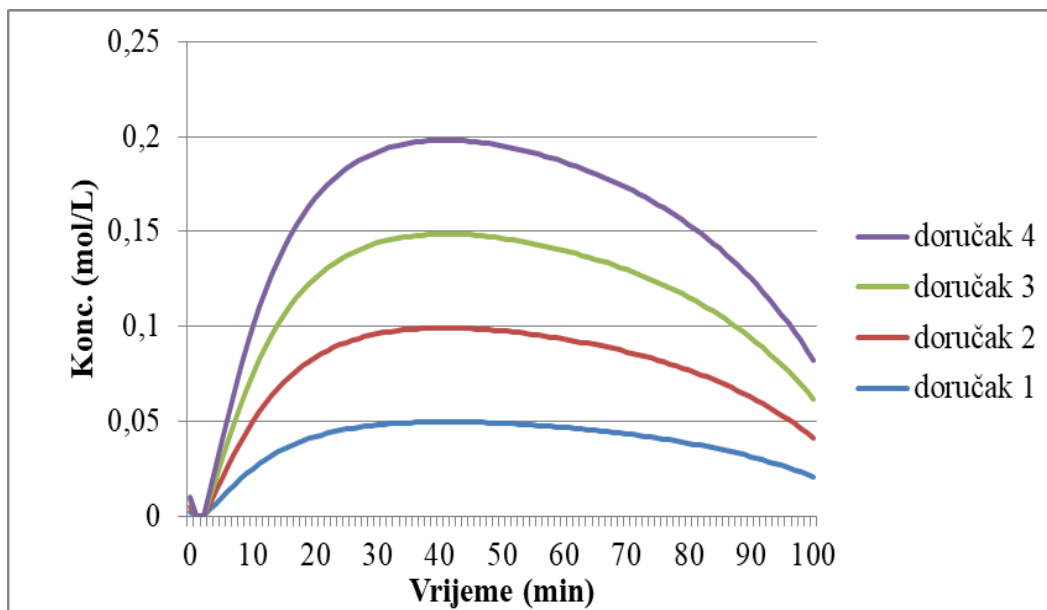
Slika 8. Promjena koncentracije glikogena nakon doručka tijekom 100 minuta

Plava krivulja predstavlja promjenu koncentracije glikogena nakon prvog doručka, crvena krivulja predstavlja promjenu u koncentraciji glikogena nakon drugog doručka. Promjenu nakon trećeg doručka pokazuje zelena krivulja dok ljubičasta krivulja označava promjenu koncentracije glikogena nakon četvrtog doručka (slika 8).



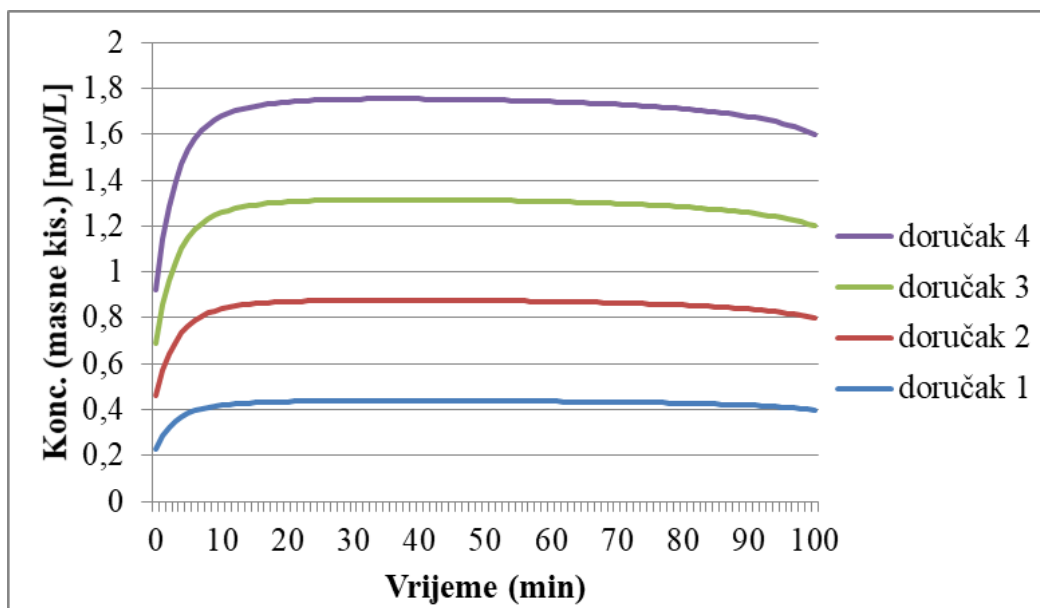
Slika 9. Promjena koncentracije jednostavnih šećera (glukoze) kroz 100 minuta nakon konzumacije doručka

Plavom krivuljom prikazana je promjena koncentracije jednostavnih šećera nakon prvog doručka (početna koncentracija bila je 0,0626 mol/L), crvenom krivuljom prikazana je promjena koncentracije (početna koncentracija bila je 0,0576 mol/L) nakon drugog doručka. Zelena i ljubičasta krivulja prikazuju promjene koncentracija jednostavnih šećera nakon konzumacije trećeg i četvrtog doručka. Početna koncentracija za treći doručak bila je 0,065 mol/L dok je za četvrti bila 0,0587 mol/L (slika 9).



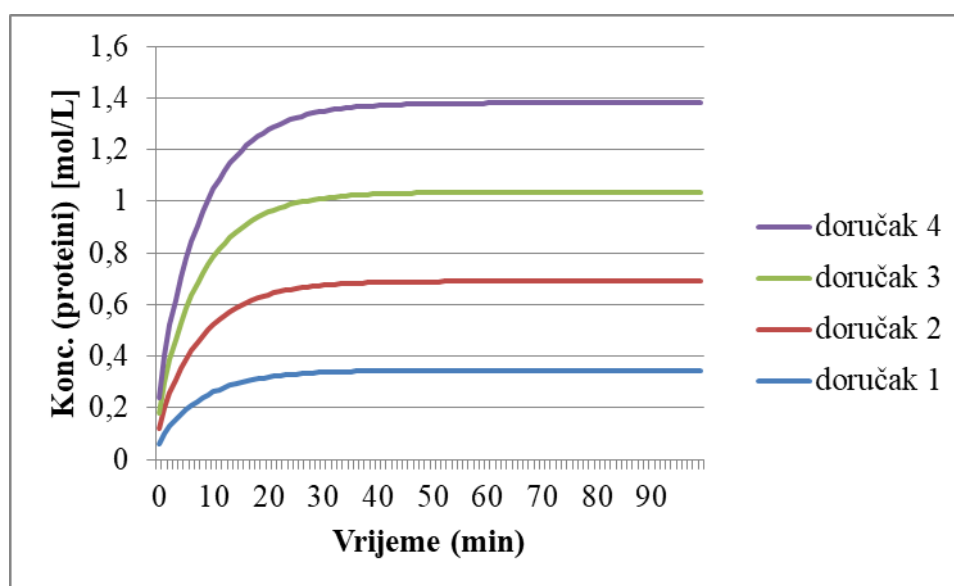
Slika 10. Promjena koncentracije masti tijekom 100 minuta nakon četiri doručka

Kao i na prethodnim grafovima, svaka krivulja predstavlja isti redoslijed doručaka. U prvom doručku početna koncentracija masti je bila 0,00197 mol/L, u drugom 0,0033 mol/L. Početna koncentracija masti u trećem doručku bila je 0,003 mol/L, a u četvrtom je bila 0,00183 mol/L (slika 10).



Slika 11. Promjena koncentracije masnih kiselina nakon četiri doručka tokom 100 minuta

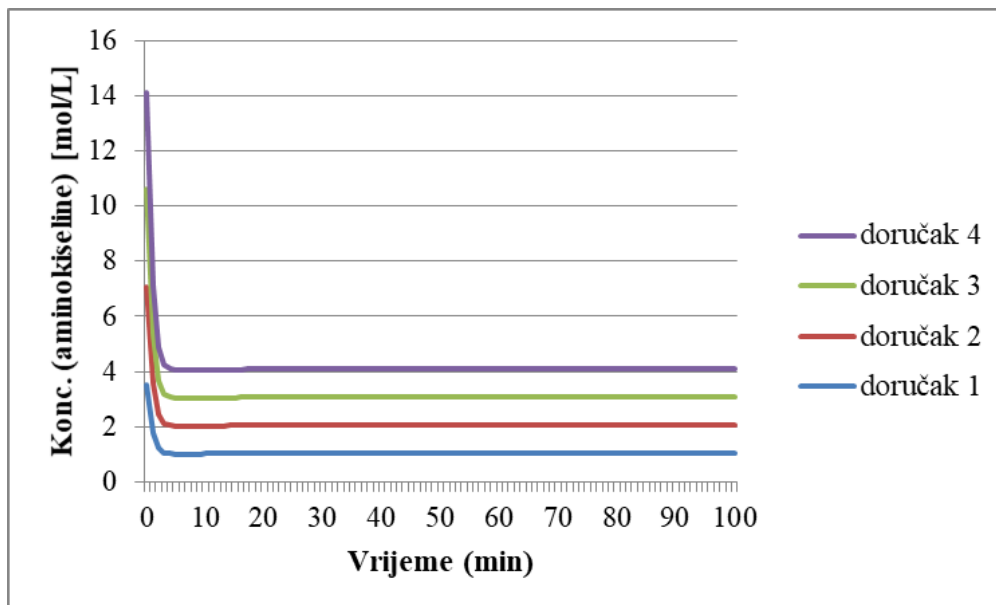
Početne koncentracije masnih kiselina su jednake za sva 4 doručka ($0,23 \text{ mol/L}$). S obzirom da su se doručci razlikovali po unosu masti, kako je navedeno u grafu iznad, radi se o različitim promjenama u koncentraciji masnih kiselina (slika 11).



Slika 12. Promjena koncentracije proteina nakon četiri doručka tokom 100 minuta

Plava krivulja predstavlja promjenu koncentracije proteina nakon prvog doručka gdje je početna koncentracija bila $9,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$. Crvena krivulja predstavlja promjenu koncentracije proteina nakon drugog doručka gdje je početna koncentracija bila $9,95 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$. Promjenu nakon trećeg doručka pokazuje zelena krivulja, gdje je početna

koncentracija bila $1,21 \cdot 10^{-4}$ mol/L, a promjenu nakon četvrtog doručka pokazuje ljubičasta krivulja s početnom koncentracijom $9,42 \cdot 10^{-5}$ mol/L (slika 12).



Slika 13. Promjena koncentracije aminokiselina nakon konzumacije četiri doručka tokom 100 minuta

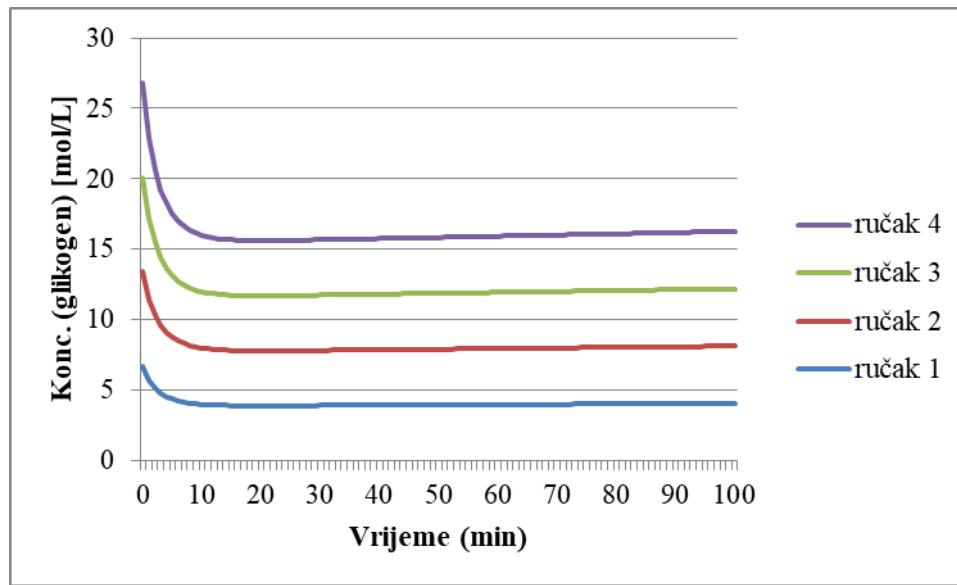
Početne koncentracije aminokiselina za sva četiri doručka su $3,53$ mol/L. Promjena u koncentraciji aminokiselina ovisi o unosu proteina koji je različit za sva 4 doručka (slika 13).

Prikazanih šest grafova predstavlja promjenu koncentracija glavnih nutrijenata i njihovih metabolita nakon prvog obroka – doručka. Grafovi prikazani na slikama 9 - 12 prikazuju povećanje koncentracije komponenata dok grafovi prikazani na slici 8 i na slici 12 prikazuju smanjenje koncentracije. Kod grafa koji prikazuje promjenu koncentracije glikogena (slika 8) sve četiri početne koncentracije glikogena su iste ($6,7$ mol/L), ali dolazi do različitih promjena u koncentraciji glikogena jer se svaki doručak razlikuje po unosu ugljikohidrata. Prvi doručak sadrži $60,75$ g ugljikohidrata, drugi doručak $57,68$ g, treći doručak $65,01$ g te četvrti doručak sadrži $58,49$ g ugljikohidrata.

U svim grafovima, osim kod grafa koji prikazuje promjenu koncentracije masti, dolazi do promjene koncentracije tokom prvih 10 - 20 minuta, a onda se ta koncentracija uravnoteži. Na grafu jednostavnih šećera, koji je prikazan na slici 9, vidi se da nema naglog pada glukoze upravo jer se radi o dijabetičkim jelovnicima kojima je cilj sama regulacija glukoze u krvi. Kod grafa koji prikazuje promjenu koncentracije masti (slika 10) prvo dolazi do naglog pada

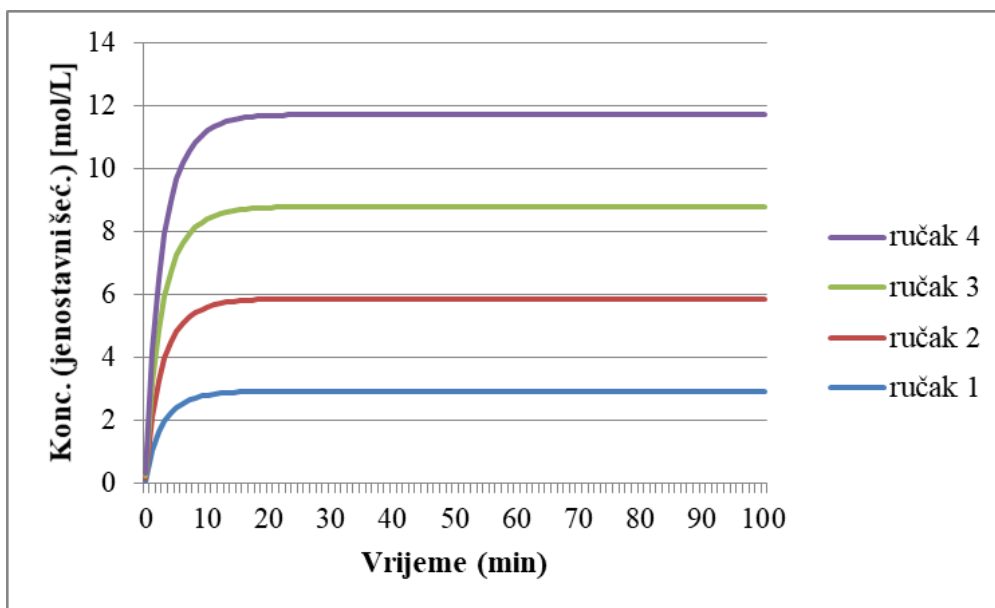
u koncentraciji, onda se koncentracija povećava te se nakon nekoliko minuta ta koncentracija uravnoteži i onda dolazi do pada koncentracije.

Slijedeća skupina grafova prikazuje promjenu koncentracije glavnih nutrijenata i njihovih metabolita nakon drugog obroka – ručka (slike 14 – 19).



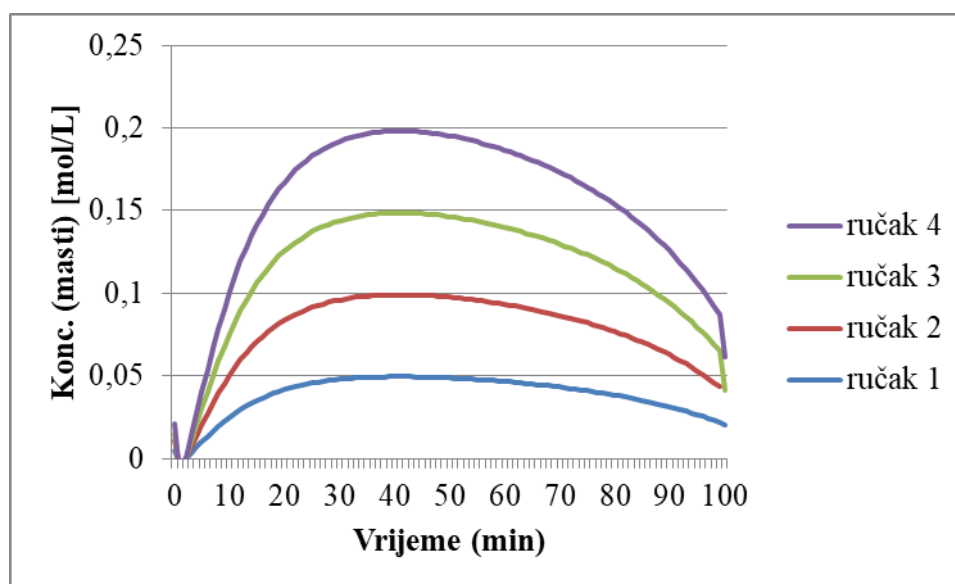
Slika 14. Promjena koncentracije glikogena nakon konzumacije četiri ručka tokom 100 minuta

Oznake krivulja glikogena u ovom grafu iste su kao i kod grafa koji pokazuje promjenu koncentracije glikogena nakon konzumacije doručka. Početna koncentracija glikogena je i dalje 6,7 mol/L. Prvim ručkom unosilo se 72,85 g ugljikohidrata, drugim ručkom 82,98 g, trećim ručkom 91,61 g te četvrtim ručkom se unijelo 93,80 g ugljikohidrata (slika14).



Slika 15. Promjena koncentracije jednostavnih šećera (glukoze) nakon konzumacije četiri ručka tokom 100 minuta

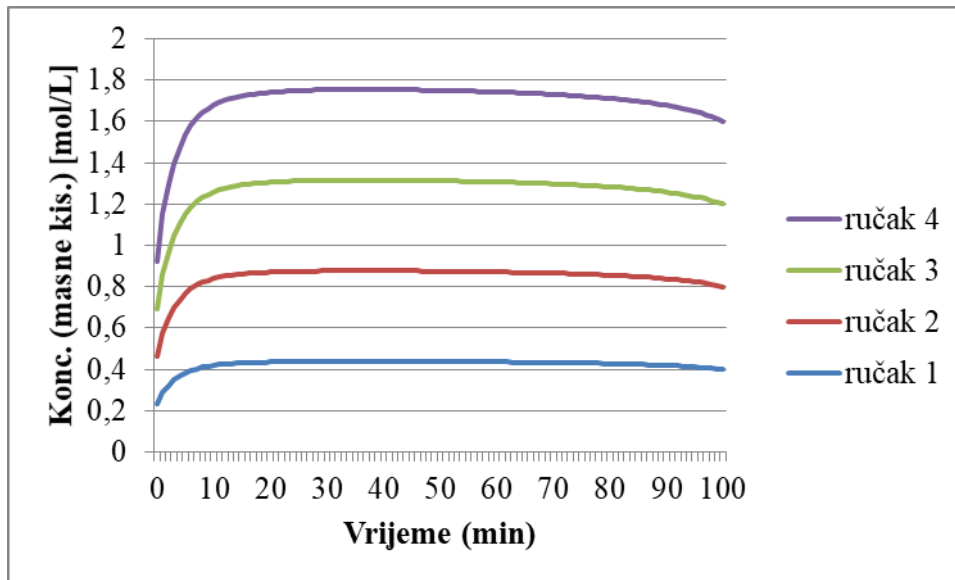
Krivulje poredane po grafu odozdo prema gore predstavljaju poredak konzumacije ručaka (plava krivulja – prvi ručak, crvena – drugi ručak, zelena – treći ručak te ljubičasta krivulja – četvrti ručak). Početne koncentracije jednostavnih šećera za sva 4 ručka su: 1. 0,0671 mol/L, 2. 0,0736 mol/L, 3. 0,0849 mol/L i 4. 0,0855 mol/L (slika 15).



Slika 16. Promjena koncentracije masti nakon četiri ručka tokom 100 minuta

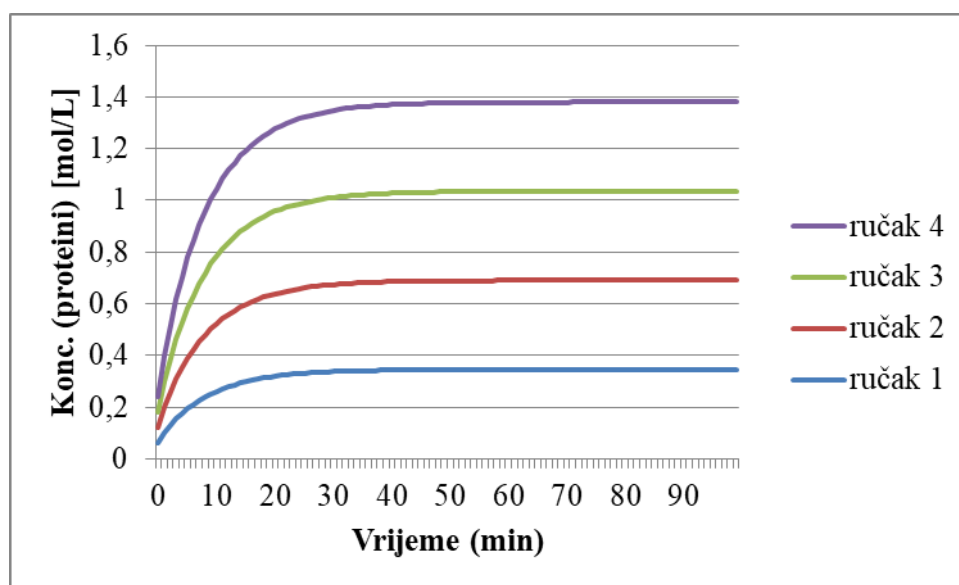
Promjenu koncentracije nakon prvog ručka prikazuje plava krivulja (početna koncentracija masti 0,00445 mol/L), nakon drugog ručka crvena krivulja (početna koncentracija masti

0,0065 mol/L), nakon trećeg ručka zelena krivulja (početna koncentracija masti 0,0036 mol/L) te promjenu koncentracije masti nakon četvrtog ručka prikazuje ljubičasta krivulja (početna koncentracija masti 0,00626 mol/L) (slika16).



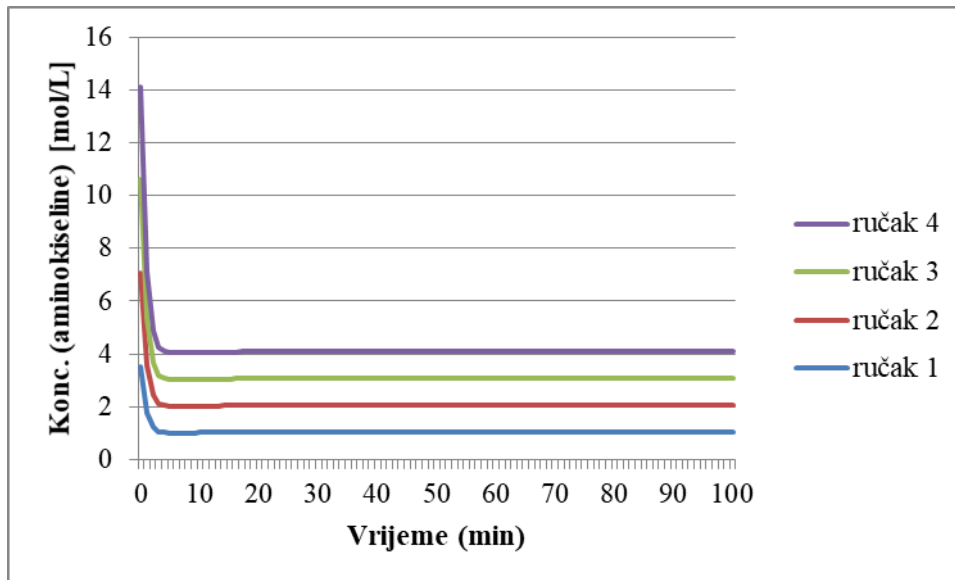
Slika 17. Promjena koncentracije masnih kiselina nakon konzumacije četiri ručka tokom 100 minuta

Plava krivulja pokazuje promjenu koncentracije masnih kiselina nakon prvog ručka, crvena krivulja pokazuje promjenu nakon drugog ručka, zelena krivulja nakon trećeg ručka te ljubičasta krivulja pokazuje promjenu koncentracije masnih kiselina nakon četvrtog ručka. Početne koncentracije masnih kiselina su svugdje iste i iznose 0,23 mol/L (slika 17).



Slika 18. Promjena koncentracije proteina nakon unosa četiri ručka tokom 100 minuta

Prikaz promjene koncentracije nakon svakog ručka prikazan je istim redoslijedom krivulja kao i u prethodnim grafovima. Početna koncentracija proteina prvog ručka je $1,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L, drugog ručka $1,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L. $1,06 \cdot 10^{-4}$ mol/L je početna koncentracija proteina trećeg ručka dok početna koncentracija proteina četvrtog ručka iznosi $1,25 \cdot 10^{-4}$ mol/L (slika 18).

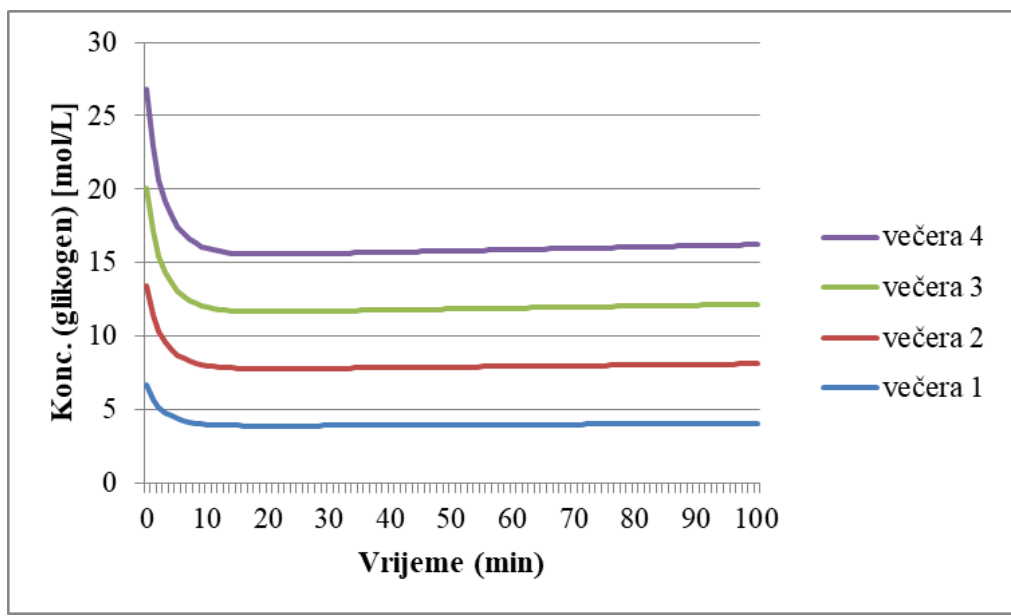


Slika 19. Promjena koncentracije aminokiselina nakon konzumacije četiri ručka tokom 100 minuta

Plava krivulja predstavlja promjenu koncentracije aminokiselina nakon konzumacije prvog ručka, crvena krivulja pokazuje promjenu koncentracije aminokiselina nakon drugog ručka. Zelena i ljubičasta krivulja prikazuju promjenu u koncentraciji aminokiselina nakon trećeg i četvrtog ručka. Početne koncentracije aminokiselina za sva četiri ručka iznose $3,53$ mol/L (slika 19).

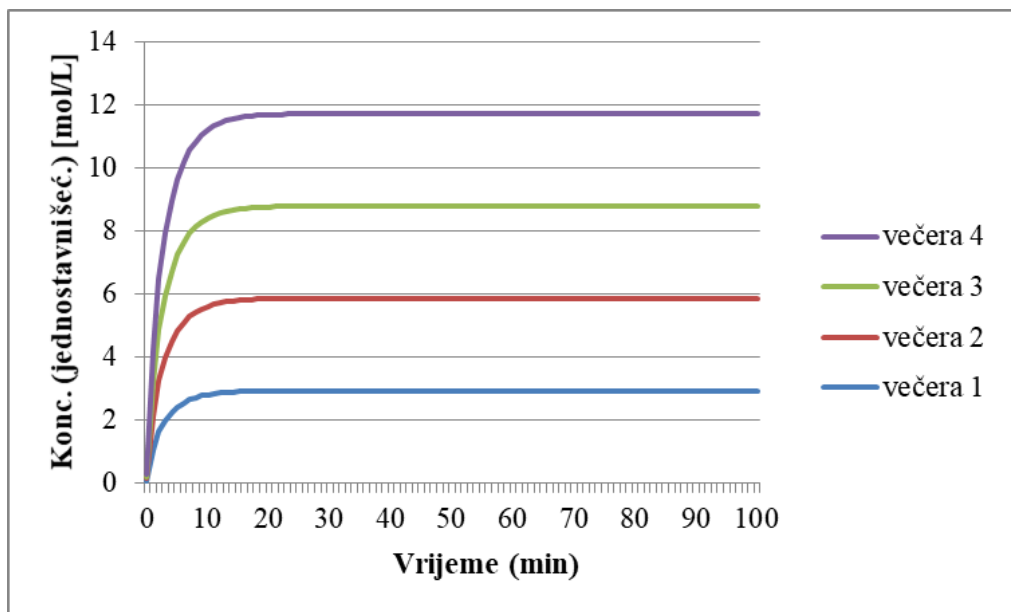
Navedeni grafovi koji prikazuju promjenu koncentracije glavnih nutrijenata i njihovih metabolitima nakon konzumacije ručka prikazuju slične rezultate kao grafovi koji pokazuju promjenu koncentracije glavnih nutrijenata i njihovih metabolitima nakon konzumacije doručka.

Slijedeći grafovi prikazuju promjenu koncentracija glavnih nutrijenata i njihovih metabolitima nakon konzumacije 4 različite večere.



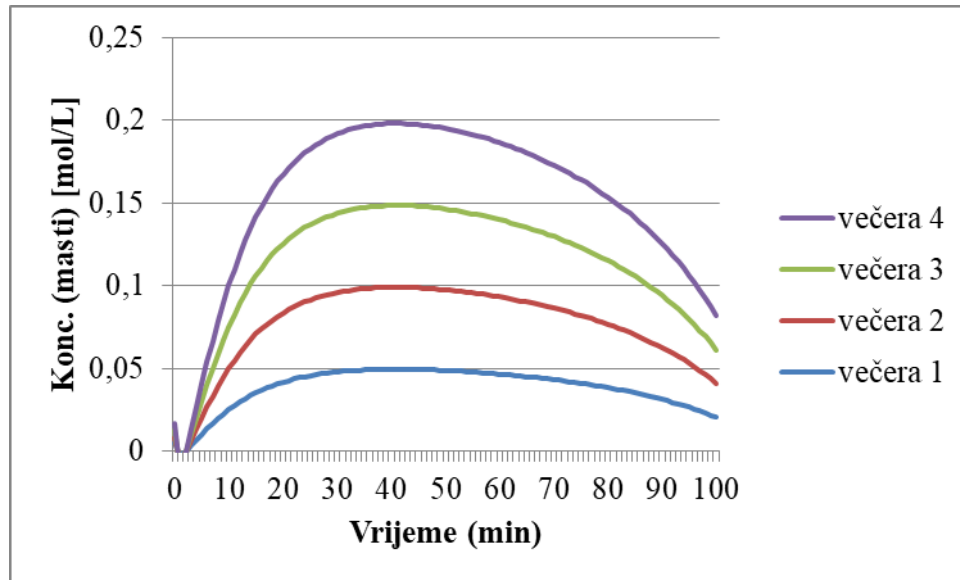
Slika 20. Promjena koncentracije glikogena nakon konzumacije 4 večere tokom 100 minuta

Krivulje predstavljaju isti poredak konzumacije večera kao i u prethodnim grafovima. Koncentracije glikogena su iste kao i u prethodnim grafovima 6,7 mol/L. Treća večera ima najmanji unos (66,56 g) ugljikohidrata dok zadnja ima najveći unos (81,21 g). Prva večera sadrži 74,41 g ugljikohidrata, a druga 67,97 g (slika 20).



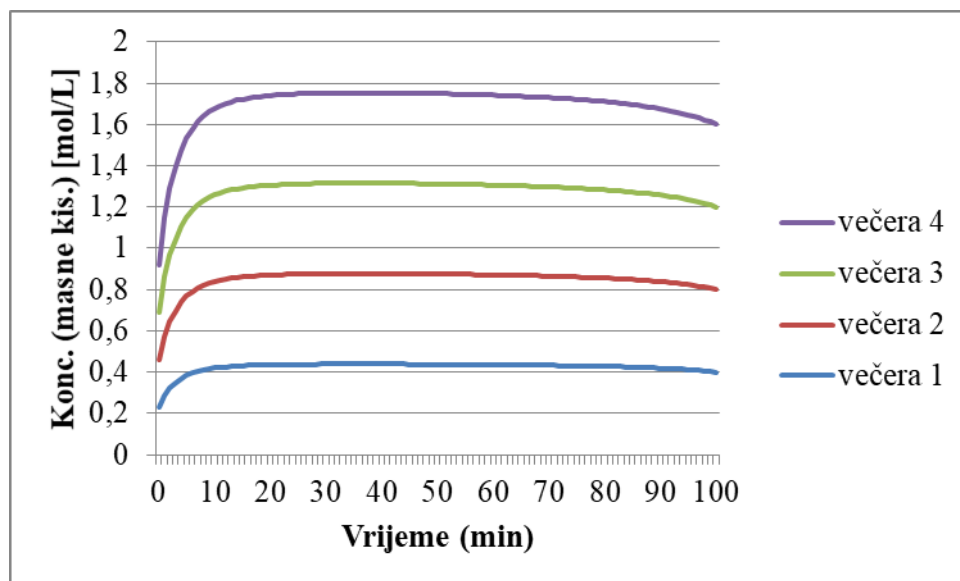
Slika 21. Promjena koncentracije jednostavnih šećera (glukoze) nakon konzumacije večere tokom 100 minuta

Krivulje predstavljaju isti poredak konzumacije obroka kao i u prethodnim grafovima. Početna koncentracija glukoze kod prve večere je 0,0699 mol/L, a kod druge večere 0,0629 mol/L. Treća večera ima početnu koncentraciju glukoze 0,0626 mol/L, a zadnja, četvrta, 0,075 mol/L (slika 21).



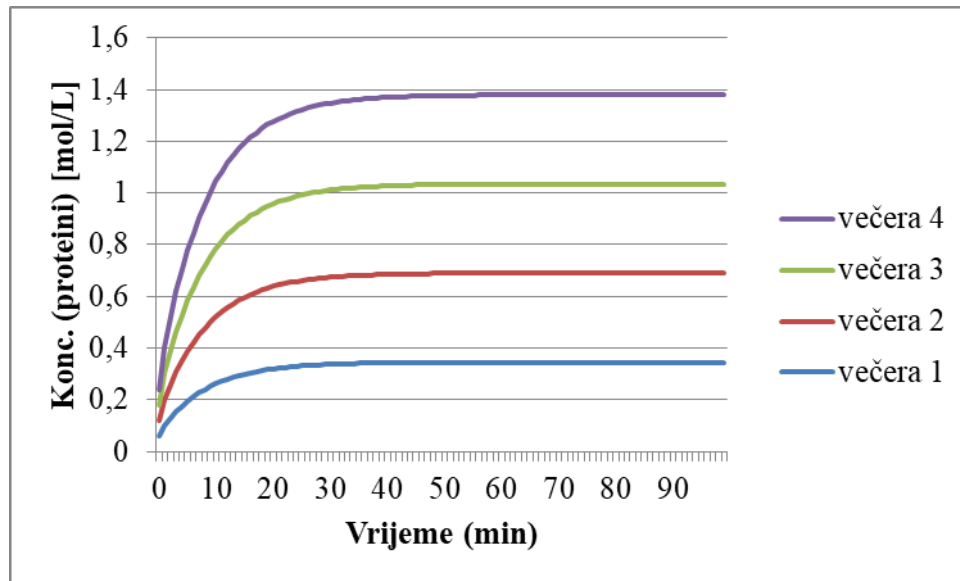
Slika 22. Promjena koncentracije masti tokom 100 minuta nakon konzumacije četiri večere

Krivulje predstavljaju isti poredak konzumacije večera kao i u prethodnim grafovima. Početne koncentracije masti po večerama, od prve do četvrte iznose: 0,0052 mol/L, 0,00335 mol/L, 0,004 mol/L i 0,00445 mol/L (slika 22).



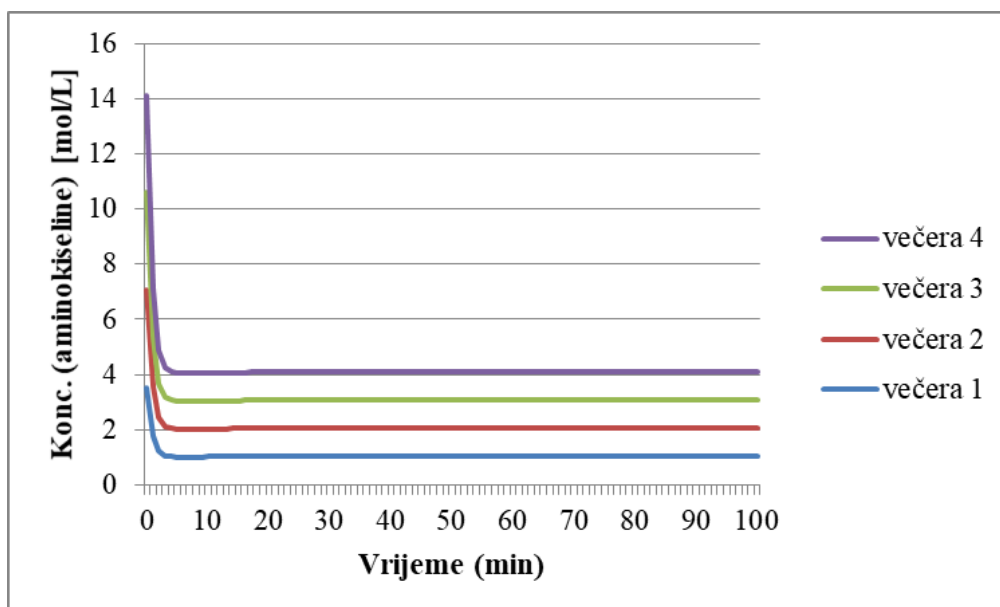
Slika 23. Promjena koncentracije masnih kiselina tijekom 100 minuta nakon konzumacije četiri večere

Krivulje predstavljaju isti poredak konzumacije večera kao i u prethodnim grafovima. Početne koncentracije masnih kiselina za sve večere iznosi 0,23 mol/L (slika 23).



Slika 24. Promjena koncentracije proteina nakon konzumacije 4 večere tijekom 100 minuta

Krivulje predstavljaju isti poredak konzumacije večera kao i u prethodnim grafovima. Početna koncentracija proteina za prvu večeru iznosi $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L, za drugu večeru iznosi $9,15 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Kod treće večere početna koncentracija proteina iznosi $8,68 \cdot 10^{-5}$ mol/L te za četvrtu večeru koncentraciju iznosi $1,16 \cdot 10^{-4}$ mol/L (slika 24).



Slika 25. Promjena koncentracije aminokiseline tijekom 100 minuta nakon konzumacije četiri večere

Krivulje predstavljaju isti poredak konzumacije večera kao i u prethodnim grafovima. Početne koncentracije aminokiselina kao i u prethodnim slučajevima iznosi 3,53 mol/L (slika 25).

Usporedbom grafova napravljenih prema obrocima može se uočiti da su grafovi za sva tri obroka vrlo slična jer se radi o dijabetičkom jelovniku gdje je unos hrane kontroliran. Svaki obrok ima određeni broj jedinica hrane koji su vrlo sličan za svaki obrok.

Grafovi koji prikazuju promjenu koncentracije jednostavnih šećera i masti su u skladu s radom Pearson i sur. (16). U tom radu prikazuje se odgovor masti i ugljikohidrata nakon konzumacije balansiranojela i jela bogatog mastima. Koncentracija na početku raste zatim dolazi do pada koncentracije (s obzirom da se u ovom radu radi o dijabetičkom jelovniku taj pad je nešto manji od onog prikazanog u radu Pearson i sur. (16)) te se uspostavlja ravnoteža. Što se tiče odgovora proteina, grafovi koji prikazuju promjenu koncentracije aminokiselina poklapaju se s grafom koji prikazuje apsorpciju mješavine slobodnih aminokiselina koja je obogaćena leucinom iz rada Dangin i sur. iz 2000. godine (41). Radi se o brznoj apsorpciji aminokiselina što dovodi do sinteze proteina, a to potvrđuju grafovi. U radu Markova i sur. iz 2018. godine gdje se ispitalo djelovanje proteina animalnog i biljnog porijekla na dijabetičarima može se uočiti da prvo dolazi do rasta koncentracije kod aminokiselina tek onda dolazi do pada dok u ovom radu koncentracija aminokiselina odmah pada (42).

4.4. ANALIZA LOKALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI

Provedena je analiza lokalne parametarske osjetljivosti na modelu na način da su se vrijednosti parametara povećale za 5 % te nakon toga smanjile za 5 %. Vrijednost parametara mijenjala se postepeno tako da se prvo mijenja vrijednost jednog parametra, a ostale vrijednosti parametara se ne mijenjaju. Nakon što se provela simulacija, promijenjena vrijednost parametra se vraća na početnu vrijednost te mijenja vrijednost drugog parametra. Kao što je već navedeno, prvo se svakom parametru povećala vrijednost za 5 %, nakon toga se svakom parametru, na način koji je prethodno objašnjen, smanji vrijednost za 5 %. Za sve promijenjene vrijednosti vrijeme simulacije je 100 minuta. Početne koncentracije supstrata su uzete iz prvog ručka (koncentracija ugljikohidrata je 0,0671 mol/L, proteina 0,000111 mol/L te masti 0,00445 mol/L). Nakon simulacije, promatralo se kako promjena vrijednosti

parametara utječe na izlazne varijable; glikogen, jednostavne šećere, piruvat, acetil-CoA, masne kiseline, masti, aminokiseline, proteine i izlučivanje.

Dobiveni rezultati su prikazani pomoću *Microsoft Office Excel 2010*. Žuta polja u tablici predstavljaju vrijednosti koje imaju zanemariv utjecaj na koncentraciju metabolita i na same reakcije. Zelena polja predstavljaju vrijednosti parametara koje imaju pozitivan utjecaj na koncentraciju metabolita i reakcije te crvena boja predstavlja vrijednosti parametara koje imaju negativan tj. inhibirajući utjecaj na metabolite i njihove reakcije. Postoje različite nijanse boja, što je intenzitet boje veći to je veći utjecaj promjene vrijednosti parametara. Navedeni rezultati mogu se vidjeti na slikama 25 – 28.

	G	SS	Pyr	AA	AcA	FA	F	Ex	P
K1									
k1									
S1									
k2									
K2									
k3									
K3									
k4									
K4									
k5									
K5									
U									
k6									
K6									
k7									
K7									
S2									
k8									
K8									
k9									
K9									
k10									
K10									
S3									
k11									
K11									
k12									
K12									
k13									
k14									
K14									
kEx									

Slika 25. Utjecaj parametra na promjenu koncentracije metabolita nakon povećanja vrijednosti parametra za 5 % (parametri su: k1, K1, k2, K2, k3, K3, S1, k4, K4, k5, K5, k6,

K6,U, k7, K7, k8, K8, S2, k9, K9, k10, K10, S3, k11, K11, k12, K12, k13, k14, K14, kEx, a metaboliti su: G (glikogen), SS (jednostavni šećeri), Pyr (piruvat), AA (aminokiseline), P (proteini), FA (masne kiseline), F (masti), AcA (acetil-CoA), Ex (izlučivanje)).

Na slici 25 može se zaključiti da najveći negativan utjecaj na koncentraciju acetil-CoA imaju parametri k9 i K9, prilikom povećanja njihove vrijednosti za 5 %. Parametri k9 i K9 sudjeluju u reakciji stvaranja masnih kiselina iz acetil-CoA stoga ako se povećaju vrijednosti tih parametara znači da će se i koncentracija acetil-CoA više i brže trošiti. Također, inhibirajući učinak na koncentraciju acetil-CoA ima i povećanje vrijednosti parametra U. U predstavlja stopu potrošnje energije, a s obzirom da acetil-CoA sudjeluje u stvaranju energije, povećanjem stope potrošnje povećat će se i potrošnja samog acetil-CoA. Na slici se vidi da je moguć mali negativan utjecaj parametara k5 i K5 na koncentraciju piruvata, dok na koncentraciju acetil-CoA parametri k5 i K5 imaju jako pozitivan utjecaj. S obzirom da parametri k5 i K5 sudjeluju u reakciji stvaranja acetil-CoA iz piruvata, logično je da povećanjem njihove vrijednosti ide više u korist acetil-CoA. Povećanjem vrijednosti parametra S1 ima pozitivan utjecaj na koncentraciju jednostavnih šećera upravo zato jer S1 predstavlja brzinu dostavljanja jednostavnih šećera iz hrane. Na glikogen povećanjem vrijednosti parametra za 5 % ima pozitivan utjecaj k2 (parametar koji sudjeluje u reakciji pohranjivanja glukoze u obliku glikogena). Parametar U pozitivno djeluje na koncentraciju piruvata.

	G	SS	Pyr	AA	AcA	FA	F	Ex	P
K1									
k1									
S1									
k2									
K2									
k3									
K3									
k4									
K4									
k5									
K5									
U									
k6									
K6									
k7									
K7									
S2									
k8									
K8									
k9									
K9									
k10									
K10									
S3									
k11									
K11									
k12									
K12									
k13									
k14									
K14									
kEx									

Slika 26. Utjecaj parametra na promjenu koncentracije metabolita nakon smanjenja vrijednosti parametra za 5 % (parametri su: k1, K1, k2, K2, k3, K3, S1, k4, K4, k5, K5, k6, K6, U, k7, K7, k8, K8, S2, k9, K9, k10, K10, S3, k11, K11, k12, K12, k13, k14, K14, kEx, metaboliti su: G (glikogen), SS (jednostavni šećeri), Pyr (piruvat), AA (aminokiseline), P (proteini), FA (masne kiseline), F (masti), AcA (acetil-CoA), Ex (izlučivanje)).

Na slici 26 može se uočiti da smanjenje vrijednosti parametra za 5 % najznačajniji negativan utjecaj ima k5 i K5 na koncentraciju acetil-CoA. Smanjenjem vrijednosti parametara k5 i K5 smanjuje se pretvorba piruvata u acetil-CoA.

Također, negativan utjecaju imaju i parametri: S1 na koncentraciju jednostavnih šećera (smanjena je brzina dostavljanja šećera iz hrane), k2 na koncentraciju glikogena (smanjeno je skladištenje glukoze u obliku glikogena) te U na koncentraciju piruvata (smanjena stopa iskorištenja energije pa je smanjena i proizvodnja piruvata). Pozitivan utjecaj smanjenja vrijednosti parametara za 5 % pojavljuje se kod k9 i K9 na koncentraciju acetil-CoA. Smanjenjem vrijednosti k9 i K9 smanjeno je i iskorištenje acetil-CoA za stvaranje masnih kiselina. Pozitivan učinak imaju i vrijednosti parametara: U na koncentraciju acetil-CoA, nešto malo slabiji pozitivan utjecaj imaju i k5 i K5 na koncentraciju piruvata.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da parametri koji su imali pozitivan utjecaj na koncentracije metabolita kada im se vrijednost povećala za 5 % da će ti isti parametri imati negativan utjecaj kada im se vrijednost smanji za 5 %. Isto tako parametri, koji su imali negativan utjecaj kada im se vrijednost povećala za 5 %, imat će pozitivan utjecaj kad ima se smanji vrijednost za 5 %.

	re1	re2	re3	re4	re5	re6	re7	re8	re9	re10	re11	re12	re13	re14	re15
K1															
k1															
S1															
k2															
K2															
k3															
K3															
k4															
K4															
k5															
K5															
U															
k6															
K6															
k7															
K7															
S2															
k8															
K8															
k9															
K9															
k10															
K10															
S3															
k11															
K11															
k12															
K12															
k13															
k14															
K14															
kEx															

Slika 27. Utjecaj parametra na reakcije metabolizma nakon povećanja vrijednosti parametra za 5 % (parametri su: k1, K1, k2, K2, k3, K3, S1, k4, K4, k5, K5, k6, K6, U, k7, K7, k8, K8, S2, k9, K9, k10, K10, S3, k11, K11, k12, K12, k13, k14, K14, kEx, a reakcije su: re1, re2, re3, re4, re5, re6, re7, re8, re9, re10, re11, re12, re13, re14 i re15).

Na slici 27 može se vidjeti da dosta parametara ima negativan tj. inhibirajući učinak na reakciju 6, nakon povećanja vrijednosti parametara za 5 %. Ti parametri su: k1, k2, K2, k4, k5, K5,U, K6, k13, kEx. Radi se o reakciji nastajanja acetil-CoA. S obzirom da dosta parametara ima utjecaj na ovu reakciju može se reći da se radi o vrlo osjetljivoj reakciji jer je acetil-CoA vrlo važan kofaktor mnogih metaboličkih reakcija. To je zapravo jedini negativan utjecaj prikazan na slici. Pozitivan utjecaj povećanja vrijednosti parametara za 5 % na reakcije su parametri: S1 na reakciju 1 (stvaranje jednostavnih šećera) i 2 (pohrana šećera u obliku glikogena), k3 i K3 na reakciju 3 (sinteza jednostavnih šećera), k6 na reakciju 6 (sinteza acetil-CoA), k8 na reakciju 8 (pohrana masnih kiselina u obliku masti). Na reakcije 10 (sinteza aminokiselina iz piruvata), 11 (dobivanje piruvata iz aminokiselina), 12 (sinteza proteina), 13 (razgradnja proteina na aminokiseline) i 14 (sinteza acetil-CoA iz aminokiselina) pozitivan učinak ima parametar S3. Na reakcije 12 i 13 pozitivan učinak ima k12 i k13. Parametar k14 ima pozitivan učinak na reakciju 5 (sinteza acetil-CoA iz priuvata) i 14.

	re1	re2	re3	re4	re5	re6	re7	re8	re9	re10	re11	re12	re13	re14	re15
K1															
k1															
S1															
k2															
K2															
k3															
K3															
k4															
K4															
k5															
K5															
U															
k6															
K6															
k7															
K7															
S2															
k8															
K8															
k9															
K9															
k10															
K10															
S3															
k11															
K11															
k12															
K12															
k13															
k14															
K14															
kEx															

Slika 28. Utjecaj parametra na reakcije metabolizma nakon smanjenja vrijednosti parametra za 5 % (parametri su: k1, K1, k2, K2, k3, K3, S1, k4, K4, k5, K5, k6, K6,U, k7, K7, k8, K8, S2, k9, K9, k10, K10, S3, k11, K11, k12, K12, k13, k14, K14, kEx, a reakcije su: re1, re2, re3, re4, re5, re6, re7, re8, re9, re10, re11, re12, re13, re14 i re15).

Smanjenjem vrijednosti parametara za 5 % ima isti učinak na reakciju 6 (stvaranje acetil-CoA) kao i kod povećanja vrijednosti za 5 %. Na prethodnoj slici se pokazalo da 10 parametara ima negativni učinak na reakciju 6, a ovdje se čak radi o 13 parametara koji imaju negativan utjecaj. Kao što je već navedeno na slici 27, radi se o osjetljivoj reakciji gdje i vrlo male varijacije u vrijednosti nekolicine parametara ima utjecaj na stvaranje acetil-CoA.

Za razliku od prethodne slike, na ovoj slici može se vidjeti da smanjenje vrijednosti parametra ima dosta manji pozitivan utjecaj na reakcije. Jedino parametar kEx ima neki značajniji pozitivan učinak na reakciju 8 (skladištenje masnih kiselina u obliku masti) jer se radi o smanjenom izlučivanju masnih kiselina. Pozitivan utjecaj na reakcije 12, 13 i 14 ima parametar k11 jer se manje troše aminokiselina za stvaranje piruvata.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedbe simulacije modela metabolizma glavnih nutrijenata došlo se do navedenih zaključaka:

- 1) Simulacija modela metabolizma glavnih nutrijenata u programu *CellDesigner* je bila uspješna, a promjene koncentracije metabolita su u skladu s eksperimentalnim radom.
- 2) Model je pojednostavljen na način da jedan enzim katalizira jednu reakciju. Reakcije su svedene na minimum kako bi se što lakše razumio mehanizam metabolizma.
- 3) Uočeno je da iza svakog obroka postoji gotovi isti odgovor na promatrane nutrijente i njihove metabolite jer se radi o dijabetičkom jelovniku podijeljenom na tri obroka koji sadrže vrlo sličan broj jedinica nutrijenata.
- 4) Analiza lokalne osjetljivosti parametra omogućila je uvid kako promjene vrijednosti parametara utječu na koncentracije metabolita, a i na same reakcije. Najveći utjecaj parametri su imali na koncentraciju acetil-CoA te na reakcije koje omogućuju stvaranje acetil-CoA.
- 5) Primjena alata koji se koriste u sistemskoj biologiji, a primijenjeni u planiranju prehrane, olakšava razumijevanje razgradnje makronutrijenata za različite udjele (ulazne vrijednosti) što je od iznimne pomoći osobama koje kreiraju planove prehrane i omogućava individualni pristup svakom korisniku prema njegovim stanjima (ili bolestima).

6. LITERATURA

1. Judge A, Dodd MS (2020) Metabolism. *Essays Biochem* **64**, 607-647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
2. Drew DA (2018) A mathematical model for nutrient metabolic chemistry. *Appl Math* **9**,647-671. <https://doi.org/10.4236/am.2018.96045>
3. Mesquita I, Rodrigues F (2018) Metabolic interaction in infection, R. Silvestre, E. Torrado, Portugal, str. 3-25.
4. Werner C, Doenst T, Schwarzer M (2015) The scientist's guide to cardiac metabolism, Schwarzer M., Doenst T., str. 39-53.
5. LongoN, Frigeni M, Pasquali M (2016) Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta* **10**, 2422–2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023>
6. Guerra IMS, Ferreira HB, Melo T, Rocha H, Moreira S, Diogo L i sur. (2022) Mitochondrial fatty acid -oxidation disorders: from disease to lipidomic studies—A critical review. *Int J Mol Sci* **23**, 13933. <https://doi.org/10.3390/ijms232213933>
7. Houten SM, Violante S, Ventur FV, Wanders RJA (2016) The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -oxidation and its genetic disorders. *Annu Rev Physiol* **78**, 23-44. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>
8. Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Seco-Filgueira M, Fernández-Fernández C, Mouriño-Bayolo D (2018) Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitoch* **46**, 73-90. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.009>
9. Li Z, Zhang H (2016) Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci* **73**, 377–392. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2070-4>
10. Cruzat V, Rogero MM , Keane KN, Curi R, Newsholme P (2018) Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients* **10**, 1564. <https://doi.org/10.3390/nu10111564>
11. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM (2020) Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp. Mol Med* **52**, 1496–1516. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00504-8>

12. Wei Z, Liu X, Cheng C, Yu W, Yi P (2021) Metabolism of amino acids in cancer. *Front. Cell Dev Biol* **8**, 603837. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.603837>
13. Peng H, Wang Y, Luo W (2020) Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Oncogene* **44**, 6747–6756. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01480-z>.
14. Kamei Y, Hatazawa Y, Uchitomi R, Yoshimura R, Miura S (2020) Regulation of skeletal muscle function by amino acids. *Nutrients* **12**, 261. <https://doi.org/10.3390/nu12010261>
15. Zhang J, Pavlova NN, Thompson CB (2017) Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J* **36**, 1302–1315. <https://doi.org/10.15252/embj.201696151>
16. Pearson T, Wattis JAD, King JR, MacDonald IA, Mazzatti DJ (2014) A mathematical model of the human metabolic system and metabolic flexibility. *Bull Math Biol* **76**, 2091–2121. <https://doi.org/10.1007/s11538-014-0001-4>
17. Madsen MF, Danø S, Quistorff B (2012) A strategy for development of realistic mathematical models of whole-body metabolism. *Open J Appl Sci* **2**, 11-27. <https://doi:10.4236/ojapps.2012.21002>
18. Asgari-Targhi A, Klerman EB (2020) Mathematical modelling of circadian rhythms. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, e1439. <https://doi:10.1002/wsbm.1439>.
19. Mari A, Tura A, Grespan E, Bizzotto R (2020) Mathematical modelling for the physiological and clinical investigation of glucose homeostasis and diabetes. *Front Physiol* **11**, 575789. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.575789>
20. Penalver Bernabe B, Cralle L, Gilbert JA (2018) Systems biology of the human microbiome. *COBIOT* **51**, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.018>
21. Badimon L, Vilahur G, Padro T (2016) Systems biology approaches to understand the effects of nutrition and promote health. *Br J Clin Pharmacol* **83**, 38–45. <https://doi.org/10.1111/bcp.12965>
22. Delles C, Husi H (2017) Hypertension: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Touyz RM, Schiffrin EL, New York, str. 69-79.

23. LeVatte M, Keshteli AH, Zarei P, Wishart DS (2021) Applications of metabolomics to precision nutrition. *Lifestyle Genom* **15**, 1-9. <https://doi.org/10.1159/000518489>
24. Cassotta M, Forbes-Hernandez TY, Cianciosi D, Zabaleta ME, Cano SS, Dominguez I i sur. (2021) Nutrition and rheumatoid arthritis in the ‘omics’ era. *Nutrients* **13**, 763. <https://doi.org/10.3390/nu13030763>
25. Cassotta M, Forbes-Hernández TY, Iglesias RC, Ruiz R, Zabaleta ME, Giampieri F i sur. (2020) Links between nutrition, infectious diseases, and microbiota: Emerging technologies and opportunities for human-focused research. *Nutrients* **12**, 1827. <https://doi.org/10.3390/nu12061827> www
26. Mc Auley MT (2020) Systems biology and nutrition. U: Marriott BP, Birt DF, Stalling VA, Yates AA (ured.) Present Knowledge in Nutrition: Basic Nutrition and Metabolism, 11. izd., Elsevier, str. 593-604.
27. Mc Auley MT, Mooney KM (2015) Computational Systems Biology for Aging Research. *Interdiscipl Top Gerontol* **40**, 35-48. <https://doi.org/10.1159/000364928>
28. Peng H, Tan H, Zhao W, Jin G, Sharma S, Xing F i sur. (2022) Computational systems biology in cancer brain metastasis. *Front Biosci (Schol Ed)* **8**, 169–186. <https://doi.org/10.2741/s456>.
29. Van Ommen B, Van den Broek T, De Hoogh I, Van Erk M, Van Someren E, Rouhani-Rankouh T i sur. (2017) Systems biology of personalized nutrition. *Nutr Rev* **75**, 579–599. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux029>
30. Matsuoka Y, Funahashi A, Ghosh S, Kitano H (2014) Modeling and simulation using *CellDesigner*. U: Miyamoto-Sato E i sur. (ured.) Transcription factor regulatory networks: Methods and protocols, Springer Science Business Media, New York, str. 121-145.
31. Flórez LA, Lammers CR, Michna R, Stülke J (2010) CellPublisher: a web platform for the intuitive visualization and sharing of metabolic, signalling and regulatory pathways. *Bioinform* **26**, 2997–2999. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq585>
32. Van Hemert JL, Dickerson JA (2010) PathwayAccess: CellDesigner plugins for pathway databases. *Bioinform* **26**, 2345–2346. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq423>

33. Funahashi A, Matsuoka Y, Jouraku A, Morohashi M, Kikuchi N, Kitano H (2008) CellDesigner 3.5: A versatile modeling tool for biochemical networks. *Proc IEEE* **8**, 1254 – 1265. <https://doi.org/JPROC.2008.925458>
34. Lattimer JM, Haub MD (2010) Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients* **2**, 1266-1289. . <https://doi:10.3390/nu2121266>
35. Lakatos E, Meszéna D, Szederkényi G (2016) Identifiability analysis and improved parameter estimation of a human blood glucose control system model. *Lect Notes Comput Sci* **8130**, 248-249.
36. KBC Zagreb (2017) Osnovne smjernice u liječenju šećerne bolesti. Klinički bolnički centar Zagreb, <https://www.kbc-zagreb.hr/EasyEdit/UserFiles/dijetetika/osnovne-smjernice-u-lijecenju-secerne-bolestikbc-zagrebeva-pavic.pdf>. Pristupljeno 18. travnja 2023.
37. Evert AB, Dennison M, Gardner CD, Garvey WT, Lau KHK, MacLeod J i sur. (2019) Nutrition therapy for adults with diabetes or prediabetes: A consensus report. *Diabetes Care* **42**, 731–754. <https://doi.org/10.2337/dci19-0014>
38. Hamdy O, Barakatun-Nisak MY (2016) Nutrition in Diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am* **45**, 799–817. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.010>
39. Inoue K (2019) Sensitivity analysis for reproducible candidate values of model parameters in signalling hub model. *PLoS one* **14**, 1 – 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211654>
40. Zi Z (2011) Sensitivity analysis approaches applied to systems biology models. *IET Syst Bio*. **5**, 336–346. <https://doi.org/10.1049/iet-syb.2011.0015>.
41. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P i sur. (2000) The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2**, 340 – 348. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.2.E340>
42. Markova M, Horneman S, Sucher S, Wegner K, Pivovarova O, Rudovich N i sur. (2018) Rate of appearance of amino acids after a meal regulates insulin and glucagon secretion in patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* **108**, 279–291.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Sara Nadoveza izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis