

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Nevena Đ. Kardum

**UTICAJ SOKA PLODA ARONIJE NA  
MARKERE OKSIDATIVNOG STATUSA I  
PROFIL MASNIH KISELINA KOD  
ZDRAVIH OSOBA SA I BEZ FAKTORA  
RIZIKA ZA NASTANAK  
KARDIOVASKULARNIH BOLESTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Nevena Đ. Kardum

**THE IMPACT OF ARONIA JUICE ON  
BIOMARKERS OF OXIDATIVE STATUS  
AND FATTY ACID PROFILE IN HEALTHY  
SUBJECTS WITH OR WITHOUT RISK  
FACTORS FOR CARDIOVASCULAR  
DISEASES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

## ČLANOVI KOMISIJE

---

Dr Slavica Spasić, profesor emeritus, mentor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Dr Katarina Šavikin, naučni savetnik,  
Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd

---

Dr Marija Glibetić, naučni savetnik,  
Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Aleksandra Konić Ristić, naučni saradnik,  
Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Aleksandra Stefanović, docent,  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Datum odbrane:

---

*Zahvaljujem se,*

*Svom mentoru, profesoru emeritusu dr Slavici Spasić, za veliku podršku, korisne savete, stalno usmeravanje i nesebičnu pomoć pruženu tokom svih faza izrade ove disertacije.*

*Dr Mariji Glibetić za profesionalnu i prijateljsku podršku i ukazano poverenje u toku izrade ovog rada. Takođe, na prenetim znanjima, iskustvima i savetima koje mi je pružila tokom rada u njenom timu.*

*Dr Katarini Šavikin na velikom poverenju i ukazanoj prilici da se uključim u istraživanja koja su postala deo ove disertacije, kao i na stalnoj podršci, prenetim iskustvima i korisnim savetima.*

*Dr Aleksandri Konić Ristić na ogromnoj pomoći, savetima i aktivnom učešću u svakoj fazi izrade ove disertacije. Posebno se zahvaljujem na nesebično pruženim znanjima, svakodnevnoj podršci i iskrenom prijateljstvu.*

*Dr Aleksandri Stefanović na učešću u izvođenju dela eksperimentalnog rada u okviru ove disertacije, kao i za prijateljske savete i pomoć u tumačenju rezultata.*

*Svim kolegama sa Instituta za medicinska istraživanja na podršci i prenetim znanjima koji su učinili ovaj rad kvalitetnijim. Posebno, kolegi Filipu Stojanoviću za pomoć u eksperimentalnom radu i prijateljsku podršku i kolegatici Mariji Takić za prenetu znanja u oblasti masnih kiselina, prijateljske savete i podršku.*

*Najviše, svojoj porodici i prijateljima na pruženoj podršci, ljubavi i razumevanju.*

# UTICAJ SOKA PLODA ARONIJE NA MARKERE OKSIDATIVNOG STATUSA I PROFIL MASNIH KISELINA KOD ZDRAVIH OSOBA SA I BEZ FAKTORA RIZIKA ZA NASTANAK KARDIOVASKULARNIH BOLESTI

## REZIME

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju najznačajniji uzrok obolevanja i umiranja u svetu. Faktori rizika za nastanak KVB često su praćeni promenama u oksidativnom statusu. Oksidativni stres, definisan kao poremećaj ravnoteže između stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i njihovog uklanjanja antioksidansima, dovodi se u vezu sa patogenezom kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti. Rezultati brojnih epidemioloških studija pokazali su povezanost ishrane bogate voćem, povrćem i integralnim žitaricama sa smanjenjem rizika za nastanak KVB. Povoljno delovanje namirnica biljnog porekla u prevenciji KVB pripisuje se delom nutritivnim sastojcima, ali pre svega nenutritivnim, biološki aktivnim sastojcima, fitohemikalijama. Zahvaljujući visokoj zastupljenosti u biljkama i visokom antioksidativnom kapacitetu, polifenoli se smatraju najznačajnijim dijetarnim antioksidansima. Plod aronije (*Aronia melanocarpa*) i proizvodi dobijeni njegovom preradom predstavljaju jedan od najbogatijih izvora polifenola.

Osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje uticaja konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog statusa i profil masnih kiselina kod zdravih osoba sa ili bez prisutnih faktora rizika za nastanak KVB. Tri grupe ispitanika su uključene, i to zdravi ispitanici bez faktora rizika za KVB, ispitanici sa abdominalnom gojaznošću i ispitanici sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1. Ispitanici sa abdominalnom gojaznošću konzumirali su sok ploda aronije obogaćen dijetarnim vlaknima iz grupe glukomanana.

Redovna konzumacija soka ploda aronije ispoljila je značajan uticaj na pojedine pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu zdravih ispitanika bez faktora rizika za nastanak KVB, kao i u serumu ispitanika sa abdominalnom gojaznošću. Što se tiče uticaja na enzimsku antioksidativnu zaštitu u eritrocitima, značajan porast aktivnosti glutathion-peroksidaze zabeležen je kod sve tri grupe ispitanika. Dodatno, u slučaju zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB, povećana je i aktivnost superoksid-dismutaze dok je kod ispitanika sa visokim-normalnim pritiskom,

odnosno hipertenzijom stadijuma 1, značajan porast aktivnosti zabeležen za sva tri praćena enzima (glutation-peroksidazu, superoksid-dismutazu i katalazu).

Redovna konzumacija soka ploda aronije pokazala je efekat na profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita sve tri grupe ispitanika, sa stastistićki značajnim povećanjem sadržaja ukupnih PUFA i indeksa nezasićenosti u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB. Dodatno, relativni sadržaj n-3 PUFA i omega-3 indeks statistićki značajno su povećani kod sve tri grupe ispitanika.

Sok ploda aronije pokazao je povoljno delovanje i na vrednosti krvnog pritiska, koje su statistićki značajno samanjene u grupi ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1, kao i kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću. Ovo je praćeno delovanjem na vrednosti biohemijskih parametara, koji su tradicionalni faktori rizika za nastanak KVB, uključujući nivoe triglicerida, ukupnog, LDL i HDL holesterola. Redovna konzumacija soka ploda aronije obogaćenog glukomananom kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću ispoljila je uticaj na antropometrijske parametre koji je pokazan statistićki značajnim smanjenjem indeksa telesne mase i obima struka.

Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja upućuju na povoljan efekat soka ploda aronije na nivo oksidativnog stresa kod zdravih osoba sa i bez faktora rizika za nastanak KVB. Delovanje na nivo oksidativnog oštećenja lipida i aktivnost antioksidativnih enzima, zajedno sa uticajem na tradicionalne faktore rizika za nastanak KVB, upućuje na značaj konzumacije soka od aronije u cilju očuvanja zdravlja ljudi i prevencije kardiovaskularnih i drugih hronićnih bolesti.

**Ključne reći:** oksidativni stres; kardiovaskularne bolesti; antioksidativni enzimi; fosfolipidni masnokiselinski profil; polifenoli

**Naućna oblast:** Farmacija

**Uža naućna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:** 616.1:[547.56:615.279 (043.3)

# THE IMPACT OF ARONIA JUICE ON BIOMARKERS OF OXIDATIVE STATUS AND FATTY ACID PROFILE IN HEALTHY SUBJECTS WITH OR WITHOUT RISK FACTORS FOR CARDIOVASCULAR DISEASES

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are one of the most important cause of morbidity and mortality worldwide. Risk factors for CVD development are often accompanied with disturbance in oxidative status. Oxidative stress, defined as disbalance between reactive oxygen species production and their removal by antioxidants, is often related to pathogenesis of cardiovascular and other chronic diseases. Numerous epidemiological studies have shown association between diet rich in fruits, vegetables and cereals and decreased risk of CVD development. Positive impact of plant foods in the prevention of CVD has been attributed partly to their nutritive compounds, but mostly to their biologically active compounds, phytochemicals. Polyphenols are considered to be the most important dietary antioxidants, due to their high abundance in plants and strong antioxidant activity. Aronia (*Aronia melanorpa*) fruits and their products are one of the richest sources of polyphenols.

The main aim of this study was to investigate the impact of aronia juice consumption on biomarkers of oxidative status and fatty acid profile in healthy subjects with or without risk factors for CVD. Three study groups were enrolled including healthy subjects without CVD risk factors, subjects with abdominal obesity and subjects with high-normal blood pressure or grade 1 hypertension. Subjects with abdominal obesity consumed aronia juice enriched with stable glucomannan dietary fibers.

Regular aronia juice consumption showed significant impact on some serum biomarkers of oxidative status and antioxidant protection in healthy subjects without CVD risk facotrs and in subjects with abdominal obesity. Regarding the influence on antioxidant enzymes in erythrocytes, aronia juice consumption led to the significant increase in glutathione-peroxidase activity in all three study groups. Additionally, in case of healthy subjects without CVD risk factors superoxide-dismutase activity was also increased, while in subjects with high-normal blood pressure or grade 1 hypertension, significant increase in activities of all three analysed enzymes (glutathione-peroxidase, superoxide-dismutase and catalase) was recorded.

Regular aronia juice consumption showed an impact on fatty acid profile in erythrocytes' phospholipids in all three study groups, with statistically significant increase in the relative amount of PUFA and unsaturation index in healthy subjects without CVD risk factors. Additionally, relative amount of n-3 PUFA and omega-3 indices were significantly increased in all three study groups.

Aronia juice showed positive impact on blood pressure values, which were statistically significant decreased in subjects with high-normal blood pressure or grade 1 hypertension, as well as in subjects with abdominal obesity. This was accompanied with an influence on biochemical parameters, which are traditional risk factors for CVD, including levels of triglycerides, total, LDL and HDL cholesterol. Regular consumption of glucoamannan-enriched aronia juice in subjects with abdominal obesity resulted in statistically significant decrease in body mass index and waist circumference.

Results obtained in this study demonstrated beneficial effects of aronia juice consumption on oxidative stress status in healthy subjects with or without CVD risk factors. Protective impact on lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in erythrocytes, along with the influence on traditional CVD risk factors, indicates that aronia juice consumption could be of importance in health promotion and the prevention of cardiovascular and other chronic diseases.

**Keywords:** oxidative stress; cardiovascular diseases; antioxidant enzymes; fatty acid profile in phospholipids; polyphenols

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific discipline:** Medical Biochemistry

**UDK number:** 616.1:[547.56:615.279 (043.3)



## LISTA SKRAĆENICA

- ABTS- 2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat )
- ALT- alanin-aminotransferaza
- ANOVA- analiza varijanse (eng. *analysis of variance*)
- AST- aspartat-aminotransferaza
- BHT- butil-hidroksitoluen
- CAT- katalaza
- CGE- ekvivalenti cijanidin-3-glukozi ( eng. *cyanidin-3-glucoside equivalents*)
- DBP- dijastolni krvni pritisak
- DEP- dietilfosforna kiselina
- DHA- dokozaheksaenska kiselina
- DTNB- 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiselina
- DMSO- dimetil-sulfoksid
- DNK- dezoksiribonukleinska kiselina
- DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
- EDTA- etilendiamintetrasirćetna kiselina
- EPA- eikozapentaenska kiselina
- GAE- ekvivalenti galne kiseline (eng. *gallic acid equivalents*)
- GSH- glutation
- GSSG- glutation-disulfid
- GPx- glutation-peroksidaza
- GR- glutation-reduktaza
- HDL- lipoprotein velike gustine (eng. *high-density lipoprotein*)
- HKU- hidrogen-peroksid komplementarne jedinice
- IMHP- 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin
- INT- 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hlorid
- ITM- indeks telesne mase
- LDL- lipoprotein male gustine (eng. *low-density lipoprotein*)
- KVB- kardiovaskularne bolesti
- MDA- malondialdehid
- MUFA- mononezasićene masne kiseline (eng. *monounsaturated fatty acids*)
- NADH- nikotinamid- adenin-dinukleotid

NADPH- nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat  
NO- azot-monoksid  
PAB- prooksidativno-antioksidativni balans  
PNP- p-nitrofenol  
PON1- paraoksonaza-1  
PUFA- polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*)  
RNS- reaktivne vrste azota (eng. *reactive nitrogen species*)  
ROS- reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*)  
SD- standardna devijacija  
SFA- zasićene masne kiseline (eng. *saturated fatty acids*)  
SOD- superoksid-dismutaza  
TAS- ukupni antioksidativni status  
TBA- tiobarbiturna kiselina (eng. *tiobarbituric acid*)  
TBARS- tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance  
(eng. *thiobarbituric acid reacting substances*)  
TLC- tankoslojna hromatografija (eng. *thin layer chromatography*)  
TMB- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin  
TOS- ukupni oksidativni status  
XO- ksantin-oksidaza (eng. *xanthine oxidase*)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Oksidativni stres .....	1
1.1.1. Slobodni radikali; ROS i RNS .....	1
1.1.2. Sistem zaštite od oksidativnih oštećenja.....	5
1.1.3. Marker oksidativnog stresa i njihovo određivanje.....	8
1.1.4. Lipidna peroksidacija.....	9
1.1.5. Polinezasićene masne kiseline i ćelijska membrana.....	13
1.2. Oksidativni stres u patogenezi kardiovaskularnih bolesti .....	15
1.2.1. Oksidativni stres i hipertenzija .....	15
1.2.2. Oksidativni stres i gojaznost .....	16
1.3. Dijetarni faktori u patogenezi kardiovaskularnih bolesti .....	18
1.3.1. Polifenoli kao dijetarni antioksidansi .....	19
1.4. Aronija ( <i>Aronia melanocarpa</i> ) – izvor polifenola .....	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	27
3. MATERIJAL I METODE .....	29
3.1. Dizajn humanih interventnih studija.....	29
3.1.1. Ispitanici i protokol studije za Grupu I .....	29
3.1.2. Ispitanici i protokol studije za Grupu II.....	30
3.1.3. Ispitanici i protokol studije za Grupu III .....	31
3.2. Antropometrijski parametri.....	32
3.3. Uzorkovanje krvi .....	32
3.4. Sok ploda aronije i njegova karakterizacija .....	32
3.4.1. Sok A .....	33
3.4.2. Sok B.....	33
3.4.3. Određivanje ukupnih fenola.....	34
3.4.4. Određivanje ukupnih antocijana .....	35
3.4.5. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti .....	35
3.4.6. Ispitivanje rastvorljive suve materije i pH vrednosti .....	36
3.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa u serumu.....	36

3.5.1. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS).....	36
3.5.2. Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) .....	37
3.5.3. Određivanje ukupnog oksidativnog statusa (TOS).....	38
3.5.4. Određivanje ukupnog antioksidativnog statusa (TAS).....	38
3.5.5. Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa .....	39
3.5.6. Određivanje aktivnosti enzima PON1 .....	39
3.5.6.1. Određivanje paraoksonazne aktivnosti .....	40
3.5.6.2. Određivanje diazoksonazne aktivnosti .....	40
3.6. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima .....	41
3.6.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) .....	41
3.6.2. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPx) .....	42
3.6.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) .....	44
3.6.4. Određivanje koncentracije hemoglobina .....	44
3.7. Određivanje profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita .....	45
3.7.1. Ekstrakcija ukupnih lipida eritrocita.....	45
3.7.2. Razdvajanje lipidnih klasa TLC hromatografijom .....	46
3.7.3. Metilovanje masnih kiselina .....	46
3.7.4. Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom .....	47
3.8. Statistička obrada podataka.....	48
4. REZULTATI.....	49
4.1. Uticaj konzumacije Soka A na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I.....	49
4.1.1. Osnovne karakteristike i biohemijski parametri ispitanika u Grupi I.....	49
4.1.2. Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi I.....	50
4.1.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi I .....	51
4.1.4. Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I.....	53
4.1.5. Korelacije aktivnosti antioksidativnih enzima i profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I .....	56

4.2. Uticaj konzumacije Soka B na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi II .....	57
4.2.1. Osnovne karakteristike, biohemijski i antropometrijski parametri ispitanika u Grupi II .....	57
4.2.2. Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi II.....	59
4.2.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi II .....	60
4.2.4. Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi II .....	61
4.3. Uticaj konzumacije Soka A na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III.....	64
4.3.1. Osnovne karakteristike i biohemijski parametri ispitanika u Grupi III .....	64
4.3.2. Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi III .....	66
4.3.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi III.....	66
4.3.4. Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III .....	68
4.3.5. Vrednosti ambulatorno merenog krvnog pritiska ispitanika u Grupi III .....	70
5. DISKUSIJA .....	73
6. ZAKLJUČCI .....	91
7. LITERATURA .....	94
8. PRILOZI.....	112
BIOGRAFIJA.....	115
IZJAVA O AUTORSTVU .....	116
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA .....	117
IZJAVA O KORIŠĆENJU .....	118

## 1. UVOD

### 1.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres se definiše kao stanje poremećene ravnoteže između prooksidativnih faktora sa jedne i antioksidativnih sa druge strane, odnosno između stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i azota (eng. *reactive oxygen species*, ROS; *reactive nitrogen species*, RNS) i njihovog uklanjanja antioksidansima. Stanje oksidativnog stresa praćeno je povećanim nivoom proizvoda oksidacije, kao što su lipidni hidroperoksidi, oksidacioni proizvodi proteina i fragmenti DNK (1). ROS i RNS su, kao proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma, u niskim i umerenim koncentracijama korisni za žive organizme. Njihovi povoljni efekti se ogledaju u učešću u brojnim ćelijskim signalnim putevima, indukovanju mitogenog odgovora, kao i u odbrani od infektivnih činioca (2). U stanjima povećanog stvaranja, ROS i RNS koje ne mogu u potpunosti biti eliminisane ili neutralisane enzimskim i neenzimskim antioksidansima, dovode do oksidativnog oštećenja proteina, lipida, DNK i ćelijskih komponenti. Ovo remeti uobičajenu strukturu ćelije i njene funkcije doprinoseći patogenezi različitih bolesti (3).

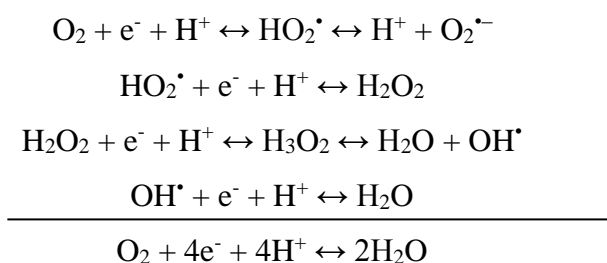
#### 1.1.1. Slobodni radikali; ROS i RNS

Reaktivne vrste koje dovode do stanja oksidativnog stresa u biološkim sistemima, mogu biti radikalske i neradikalske, koje se često lako prevode u slobodne radikale. Slobodnim radikalima se smatraju molekuli ili molekularni fragmenti sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali, koji ih čine veoma reaktivnim i podložnim interakcijama sa biomolekulima. Radikali nastali od kiseonika su najvažnije radikalske vrste u živim sistemima (2). U molekularnom obliku kiseonik je relativno nereaktivan, ali sa dodatkom jednog elektrona nastaje superoksid-anjon radikal koji se smatra primarnim ROS i učestvuje u stvaranju sekundarnih kiseoničnih vrsta (4).

RADIKALSKE VRSTE		NERADIKALSKE VRSTE	
$O_2^{\cdot-}$	superoksid-anjon	$^1O_2$	singlet kiseonik
$OH^{\cdot}$	hidroksil	$H_2O_2$	vodonik-peroksid
$HO_2^{\cdot}$	hidroperoksil	$HOCl$	hipohlorna kiselina
$RO^{\cdot}$	alkoksil	$ROOH$	organski peroksidi
$RO_2^{\cdot}$	peroksil	$O_3$	ozon
$NO^{\cdot}$	azot-monoksid	$ONOO^{\cdot}$	peroksinitrit

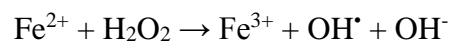
**Shema 1.** Primeri reaktivnih vrsta kiseonika i azota

Važan ćelijski izvor oksidativnog stresa je formiranje ROS kroz nepotpunu redukciju kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija. Pod uobičajenim uslovima aerobnog metabolizma u mitohondrijalnom elektron transportnom lancu molekularni kiseonik podleže tetravalentnoj redukciji do vode. Postupna redukcija  $O_2$  do  $H_2O$  prikazana je u sledećim reakcijama:

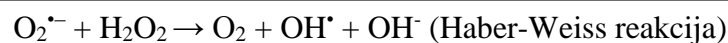
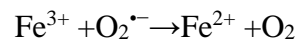
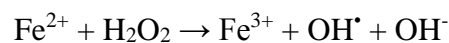


U uslovima nepotpune redukcije kiseonika, formiraju se ROS, kao nestabilne i veoma reaktivne vrste. Pri tome, postoji tačan redosled kojim se ROS stvaraju, odnosno prvo nastaje superoksid-anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), koji dalje daje vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), a potom i hidroksil-radikal ( $OH^{\cdot}$ ) (5). Iako najzastupljeniji među reaktivnim kiseoničnim vrstama,  $O_2^{\cdot-}$  nije dovoljno reaktivan da deluje na makromolekule direktno, ali može da započne lanac stvaranja drugih ROS. On se stoga smatra primarnim ROS koji može da reaguje sa drugim molekulama i generiše sekundarne ROS, direktno ili posredstvom enzimima i metalima katalizovanih procesa (4). Iako primarno nastaje u kompleksu I (NADH-dehidrogenaza) i kompleksu III (citohrom c-reduktaza) mitohondrijalnog

elektron transportnog lanca, znatne količine  $O_2^{\cdot-}$  mogu nastati pod dejstvom različitih enzimskih sistema kao što su ksantin-oksidaza i NAD(P)H-oksidaza. Vodonik-peroksid je mali neradikalni molekul, koji lako difunduje i prolazi kroz ćelijske membrane i ima sposobnost da učestvuje u stvaranju drugih ROS (5). Pored nastajanja u elektron transportnom lancu mitohondrija, važan izvor vodonik-peroksida su i peroksizomi, organele koje u najvećoj meri koriste ćelijski kiseonik za obavljanje više metaboličkih funkcija (6).  $H_2O_2$  učestvuje u formiranju visoko reaktivnog hidroksil-radikala, u Fentonovoj reakciji:



Za Fentonovu reakciju je neophodno gvožđe u dvovalentnom obliku, a pokazano je da se u stanju oksidativnog stresa i povećanog nivoa superoksid-anjona gvožđe oslobađa iz molekula koji ga sadrže (7). Superoksid-anjon učestvuje u Haber-Weiss reakciji koja objedinjuje Fentonovu reakciju i redukciju trovalentnog gvožđa ( $Fe^{3+}$ ) do dvovalentnog ( $Fe^{2+}$ ) (8):

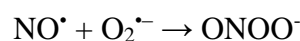


Hidroksil-radikal ( $OH^{\cdot}$ ) je neutralna forma hidroksidnog jona sa visokom reaktivnošću, ali sa malim poluvremenom eliminacije ( $10^{-9}$ s), tako da se njegovo delovanje ostvaruje isključivo na mestu formiranja (9).

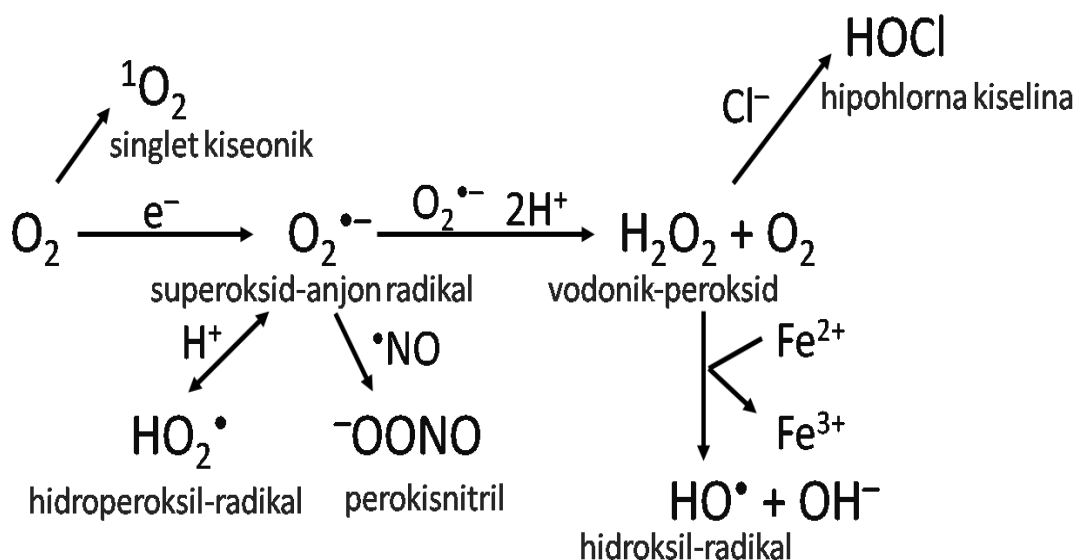
ROS se formiraju i u fagocitima kao odgovor organizma na inflamatorne agense (citokine i bakterijske produkte). U interakciji sa stranim partikulama aktivira se NAD(P)H-oksidaza, najbolje okarakterisana u neutrofilima, gde nastali  $O_2^{\cdot-}$  pokreće seriju reakcija odgovornih za uništavanje bakterija. Ovaj odbrambeni mehanizam praćen je aktivacijom i enzima mijeloperoksidaze, ključnog u nastajanju hipohlorne kiseline (HOCl), neradikalne ROS sa baktericidnim dejstvom. Takođe, opisana je i nefagocitna NAD(P)H-oksidaza, koja produkuje superoksidni anjon, u mnogo manjoj meri nego u neutrofilima, za koji se smatra da učestvuje u intraćelijskim signalnim putevima (2,10).



Pored ROS, reaktivne vrste azota (RNS) mogu takođe da izazovu oštećenja kada njihovo stvaranje u organizmu prevazilazi mogućnosti njihove neutralizacije i eliminacije. Ovakvo stanje naziva se još i nitrozativnim stresom i može da dovede do promene strukture, a time i funkcije proteina, kroz reakcije nitrozilacije (11). Azot-monoksid ( $\text{NO}^\bullet$ ) je važan reaktivni radikal, sintetisan u tkivima pod dejstvom enzima azot-monoksid sintetaza koje metabolišu arginin do citrulina (12). Ovaj mali molekul učestvuje u brojnim fiziološkim procesima, uključujući neurotransmisiju, regulaciju krvnog pritiska, relaksaciju glatkih mišića, regulaciju imunog sistema i odbrambeni sistem organizma (13). Iako sam nema veliku reaktivnost,  $\text{NO}^\bullet$  u prisustvu kiseonika ili superoksida može da pređe u reaktivnije vrste, kao što su azot-dioksid i peroksinitrit (14). Tako, u inflamatornom odgovoru, ćelije imunog sistema stvaraju i superoksid-anjon i azot-monoksid, koji mogu međusobno da reaguju, pri čemu nastaje peroksinitritni anjon ( $\text{ONOO}^-$ ):

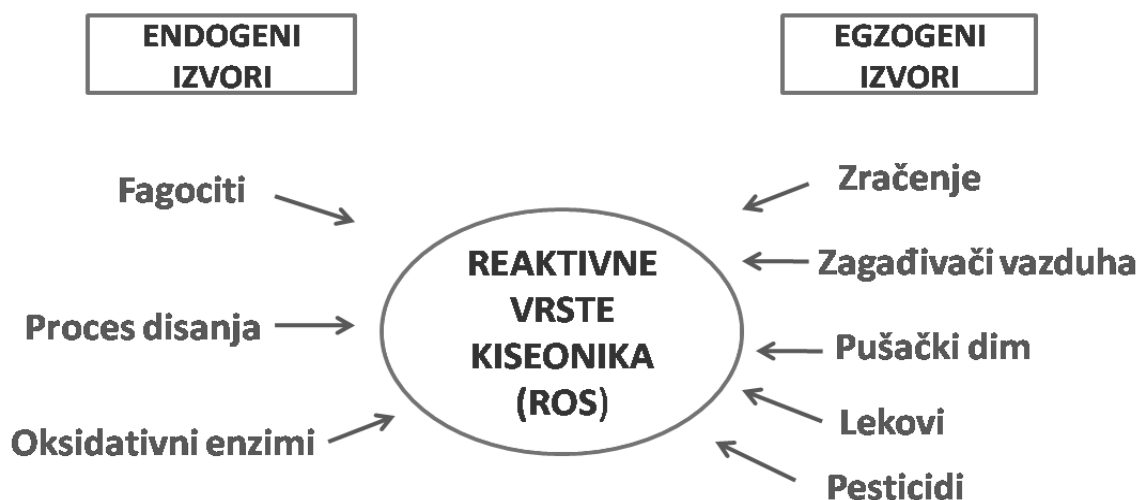


Ovaj anjon je veoma reaktivan agens, koji može da dovede do oksidativnog oštećenja i fragmentacije DNK kao i lipidne peroksidacije (15).



**Shema 2.** Putevi stvaranja ROS i RNS

Pored endogenog stvaranja ROS, koje se vezuje za metaboličke procese, pre svega u mitohondrijama, reaktivne vrste mogu nastati i pod dejstvom egzogenih uticaja (Slika 1), u koje se ubrajaju ekstremne temperature, zračenje, ksenobiotici, hemijski toksini, pesticidi i teški metali (16).



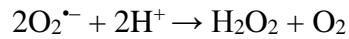
**Slika 1.** Endogeni i egzogeni izvori ROS

### 1.1.2. Sistem zaštite od oksidativnih oštećenja

Izlaganje slobodnim radikalima nastalim u normalnim metaboličkim procesima ili pod dejstvom egzogenih činioca, dovelo je do razvoja serije odbrambenih mehanizama koji uključuju preventivne mehanizme, mehanizme popravke oksidativnih oštećenja, fizičku odbranu i antioksidativnu zaštitu (17). Antioksidansima se smatraju molekuli koji, u maloj koncentraciji u odnosu na biomolekule koje štite, mogu da spreče ili redukuju nivo oksidativnih oštećenja biomolekula i time smanje štetne efekte kontinuiranog stvaranja ROS (18). U antioksidanse se ubrajaju enzimske i neenzimske komponente koje mogu biti locirane u citoplazmi, ćelijskoj membrani i ekstracelularnom prostoru.

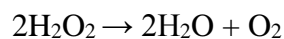
Enzimska antioksidativna zaštita (Slika 2) uključuje enzime superoksid-dismutazu (SOD), katalazu (CAT) i glutation-peroksidazu (GPx).

SOD ima ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnih oštećenja jer predstavlja prvu linije odbrane od ROS. To je metaloprotein koji ubrzava prevođenje  $O_2^{\bullet-}$  do  $H_2O_2$  prema sledećoj jednačini:

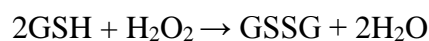


U ljudskom organizmu postoje dva osnovna molekularna tipa ovog enzima. To su citosolna forma (CuZnSOD) koja sadrži bakar i cink i mitohondrijalna forma (MnSOD) koja sadrži mangan kao redoks aktivni metal (5). Protektivno delovanje SOD je povezano sa delovanjem katalaze i peroksidaze da bi se sprečilo nagomilavanje  $H_2O_2$  i njegovo pretvaranje u  $OH^{\bullet}$ .

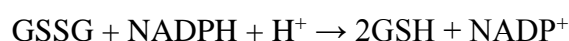
Katalaza se nalazi u peroksizomima i mitohondrijama i po strukturi je tetramer koji u svom aktivnom centru ima  $Fe^{3+}$  vezano za porfirin hem grupu (19). Deluje tako što prevodi  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i jedan je od najefikasnijih enzima u živom svetu. Pokazano je da visoke koncentracije  $H_2O_2$  stimulišu njegovu neutralizaciju katalazom u reakciji u kojoj je  $H_2O_2$  istovremeno i donor i akceptor vodonika (5):

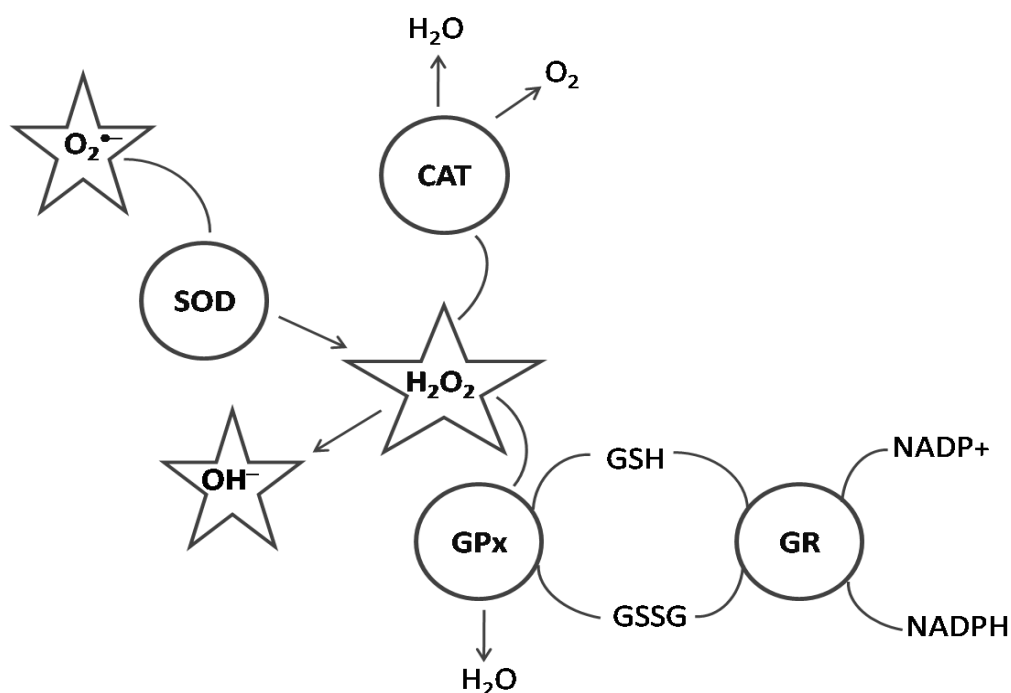


Sa druge strane, niske koncentracije  $H_2O_2$  su neutralisane pre svega peroksidazom. Glutation-peroksidaza je locirana u citosolu i mitohondrijama i katalizuje redukciju  $H_2O_2$  u  $H_2O$ , kao i redukciju i organskih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH) pri čemu se kao kofaktor koristi glutation (GSH):



Pri ovome nastaje oksidovani glutation, glutation-disulfid (GSSG), koji se aktivnošću glutation-reduktaze (GR) prevodi u redukovanu formu (GSH) uz učešće NADPH kao redukujućeg ekvivalenta (20) prema jednačini:





**Slika 2.** Delovanje ćelijskih antioksidativnih enzima

U neenzimske komponente sistema zaštite od oksidativnih oštećenja ubrajaju se različita liposolubilna i hidrosolubilna jedinjenja. Najviše proučavani hidrosolubilni neenzimski antioksidansi su glutation, vitamin C (L-askorbinska kiselina), mokraćna kiselina, albumin, transferin, bilirubin, a liposolubini su vitamin A (retinol), provitamin A ( $\beta$ -karoten), vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) i koenzim Q (ubihinon) (2). Neenzimski antioksidansi mogu učestvovati u zaštiti od oksidativnih oštećenja različitim mehanizmima delovanja. Pod ovim se podrazumeva “hvatanje” slobodnih radikala (vitamin C i E) i zaustavljanje lančanih radikalskih reakcija, heliranje prelaznih metala koji katalizuju radikalske reakcije (flavonoidi), inhibicija oksidativnih enzima (aspirin) ili delovanje kao kofaktora antioksidativnih enzima (selen, koenzim Q) (21). Neenzimski antioksidansi klasifikuju se i na osnovu veličine njihovih molekula. Tako se među makromolekulske ubrajaju proteini, kao što su albumin, ceruloplazmin i feritin, dok su među malim molekulima najznačajniji askorbinska kiselina, glutation, mokraćna kiselina i ubihinon.

Iako pojedinačni antioksidansi imaju jedinstvenu ulogu u borbi protiv oksidativnih oštećenja, merenje njihovih individualnih koncentracija nije dobar pokazatelj zajedničkog delovanja svih u zaštiti od oksidativnih oštećenja u sistemu. Stoga se često pristupa merenju ukupnog antioksidativnog potencijala bioloških sistema, koji predstavlja važan indeks pri merenju nivoa oksidativnog stresa (22).

### 1.1.3. Markeri oksidativnog stresa i njihovo određivanje

Oksidativni stres je uobičajeno definisan kao stanje poremećene ravnoteže između koncentracije ROS i RNS s jedne strane i antioksidativnih odbrambenih mehanizama organizma sa druge. Ipak, oksidativni stres nije jedinstveno definisan u pogledu metoda i markera koji se koriste za određivanje njegovog nivoa. Najčešće korišćen kriterijum za procenu oksidativnog statusa zasniva se na određivanju koncentracije proizvoda oksidacije lipida u telesnim tečnostima ili na merenju podložnosti lipida oksidaciji *ex vivo* (23). Metode koje se koriste za evaluaciju oksidativnog stresa mogu da se podele u tri kategorije:

- metode zasnovane na određivanju koncentracije promotora, inhibitora i proizvoda oksidacije u krvi i drugim telesnim tečnostima (kao što su saliva, urin, cerebrospinalna tečnost, folikularna tečnost, sperma),
- metode zasnovane na proceni redukcionog potencijala organizma, tačnije kapaciteta telesnih tečnosti da redukuju radikale i
- metode zasnovane na merenju oksidabilnosti, odnosno podložnosti različitih makromolekula i partikula (najčešće LDL) oksidaciji.

Pored krvi i ostalih telesnih tečnosti, za određivanje prooksidativnog/antioksidativnog statusa koriste se i homogenizovana tkiva, kao i izolovane ćelije (23).

Procena koncentracije slobodnih radikala, kao direktnih promotora oksidacije može se vršiti direktno merenjem rezonance spina elektrona ili indirektno pomoću hemiluminescentnih vrsta, kao što je luminol (24). U inhibitore oksidacije ubrajaju se hidrosolubilni i liposolubini antioksidansi niske molekulske mase, koji se određuju hromatografskim metodama, često u kombinaciji sa masenom spektroskopijom. U ovoj grupi naročito se ističe značaj određivanja glutationa kao važnog antioksidansa intracelularnih i ekstracelularnih prostora (25). Pod makromolekularnim antioksidansima podrazumevaju se proteini, a najčešće određivani su enzimi, čija se

aktivnost meri praćenjem formiranja produkata ili smanjivanja nivoa supstrata reakcije koju katalizuju. Ovo najčešće podrazumeva primenu komercijalno dostupnih testova (26,27). Mnoge metode koje ocenjuju nivo oksidativnog stresa zasnivaju se na određivanju krajnjih produkata oksidacije, a tu spadaju oksidovani proteini, produkti lipidne oksidacije, fragmenti DNK ili biomarkeri fragmentacije DNK.

Za merenje redukcionog potencijala, odnosno kapaciteta telesnih tečnosti da redukuju slobodne radikale, razvijeni su brojni postupci koji se zasnivaju na *ex vivo* stvaranju reaktivnih vrsta. Tu spadaju metode kao što su ORAC (eng. *oxygen radical absorbance capacity*), TEAC (eng. *trolox equivalent antioxidant capacity*), koji se često označava kao ukupni antioksidativni status, odnosno kapacitet (eng. *total antioxidant capacity*, TAC) i FRAP (eng. *ferric reducing ability of plasma/ferric reducing antioxidant power*) (28,29,30). Osetljivost različitih makromolekula ili partikula (najčešće LDL) na oksidativni stres, odnosno njihova podložnost oksidaciji, najčešće se određuje merenjem apsorpcije produkata nastalih pod dejstvom radikala generisanih jonima bakra (31).

Određivanje markera oksidativnog stresa značajno je u razjašnjavanju učešća ovog fenomena u patogenezi mnogih hroničnih bolesti. Ovo se ostvaruje kroz praćenje prisustva slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta kao i koncentracije antioksidanasa. Ako se stanje oksidativnog stresa uoči, neophodno je odrediti da li je ono uzročnik nastanka bolesti ili njena posledica, odnosno prateći aspekt koji doprinosi oštećenju tkiva (14). Pokazano je i da u različitim patološkim stanjima treba primeniti različite metode da bi se odredili indeksi oksidativnog stresa specifični za dato stanje. Naime, samo u ozbiljnim patološkim stanjima su svi indeksi oksidativnog stresa povišeni i pokazuju međusobnu korelaciju (23).

#### **1.1.4. Lipidna peroksidacija**

Među brojnim indeksima koji se koriste za ocenu oksidativnog statusa i efikasnosti antioksidanasa, najčešće su korišćeni produkti lipidne peroksidacije i relevantni biomarkeri. Lipidna peroksidacija rezultat je kompleksnih lančanih reakcija (Slika 3) koje rezultuju formiranjem različitih oksidovanih proizvoda, tj. peroksi-radikala masnih kiselina ( $\text{ROO}^\cdot$ ) i odgovarajućih hidroperoksida (ROOH) (32). Nastali

peroksi-radikali su nestabilni molekuli čijom daljom konverzijom nastaju stabilniji proizvodi, kao što su izoprostani i aldehidi. Ovako nastali aldehidi najčešće se određuju kao supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (eng. *thiobarbituric acid reacting substances*, TBARS), a njihov nivo izražava se u ekvivalentima malondialdehida (MDA), što je najčešće korišćen indeks lipidne peroksidacije (33). Takođe, kao markeri oksidativnog stresa određuju se i hidroperoksidi (LOOH), često izraženi kao konjugovani dieni, kao i F2-izoprostani.

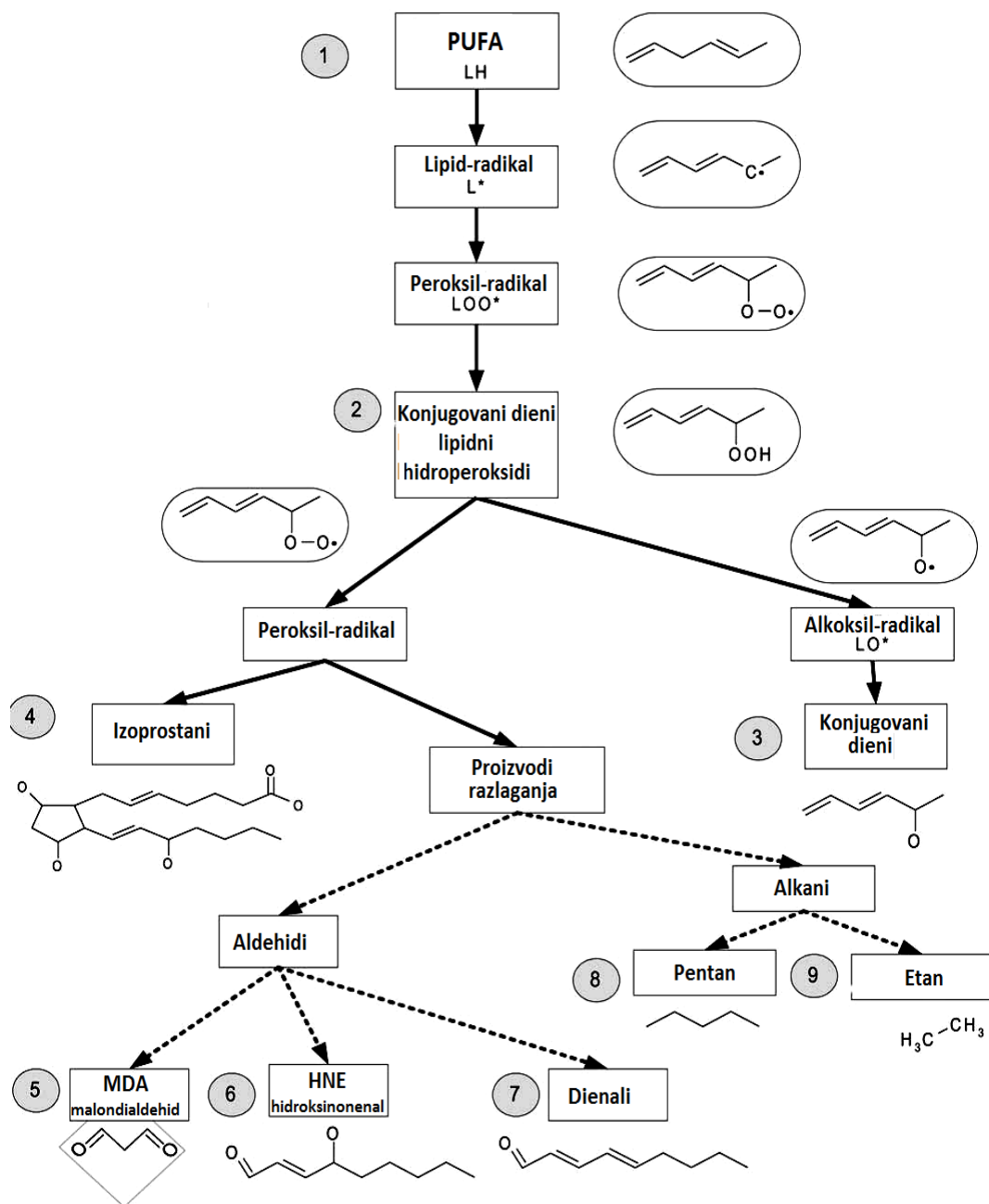
Pored merenja TBARS, relativna koncentracija polinezasićenih masnih kiselina (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) predložena je kao indirektni marker lipidne peroksidacije (34,35). Lipidna peroksidacija započinje tako što reaktivne vrste preuzimaju vodonik sa ugljenika dvostruko vezanog u bočnom lancu masnih kiselina. Što je veći broj nezasićenih veza u bočnom lancu, lakše je uklanjanje vodonikovog atoma, što polinezasićene masne kiseline čini naročito podložnim lipidnoj peroksidaciji. Nastali lipid-radikal može dalje da se transformiše do peroksil-radikala, koji potom stupaju u interakciju jedni sa drugima ili sa membranskim proteinima. Takođe, peroksil-radikali mogu da preuzmu vodonikov atom sa bočnog lanca susedne masne kiseline i time propagiraju lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Stoga inicijacija lipidne peroksidacije može da rezultuje konverzijom nekoliko stotina masnih kiselina do lipidnih hidroperoksida (36).

Masne kiseline su monokarboksilne kiseline, koje se obično na osnovu tipa veze klasifikuju na zasićene i nezasićene. Nezasićene mogu biti mononezasićene, sa jednom dvogubom vezom, i polinezasićene kiseline, sa dve ili više dvogubih veza u alifatičnom nizu (Tabela 1). Kod nezasićenih mogući su cis i trans izomeri, a najzastupljenije masne kiseline u prirodi su ravnog niza sa parnim brojem ugljenikovih atoma i cis konformacije. Polinezasićene masne kiseline se takođe dele na n-3, odnosno  $\omega$ -3 masne kiseline koje sadrže dvostruku C=C vezu na trećem ugljenikovom atomu od metil kraja i n-6, odnosno  $\omega$ -6 masne kiseline sa terminalnom dvostrukom vezom na šestom C atomu od metil kraja.

**Tabela 1.** Najzastupljenije nezasićene masne kiseline

<b>Trivijalni naziv</b>	<b>Hemijski naziv</b>	<b>Skraćena oznaka</b>
Palmitoleinska	cis-9-heksadekaenska	16:1n-7
Oleinska	cis-9-oktadekaenska	18:1n-9
Vakcenska	cis-11-oktadekaenska	18:1n-7
Gadoleinska	cis-9-eikozaenska	20:1n-7
Eručna	cis-13-dokozaenska	22:1n-9
Nervonska	cis-15-tetrakozaenska	24:1n-9
Linolna	cis-9,12-oktadekadienska	18:2n-6
$\gamma$ -Linolenska	cis-6,9,12-oktadekatrienska	18:3n-6
$\alpha$ -Linolenska	cis-9,12,15-oktadekatrienska	18:3n-3
Dihomo- $\gamma$ -linolenska	cis-8,11,14-eikozatrienska	20:3n-6
Arahidonska	cis-5,8,11,14-eikozatetraenska	20:4n-6
Timnodonska	cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenska	20:5n-3
Klupanodonska	cis-7,10,13,16,19-dokozapentaenska	22:5n-3
Cervonska	cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenska	22:6n-3





**Slika 3.** Lipidna peroksidacija i nastali proizvodi  
(Slika modifikovana prema Dotan i sar., 2004. (23))

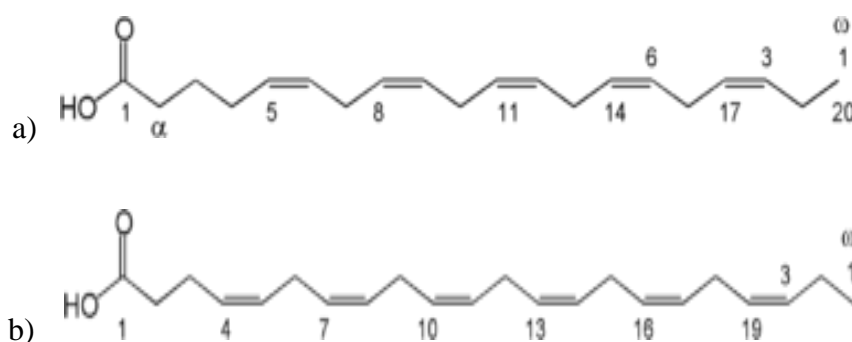
### 1.1.5. Polinezasićene masne kiseline i ćelijska membrana

Smatra se da nekontrolisano formiranje lipidnih peroksida predstavlja jedan od vodećih mehanizama ćelijskog oštećenja, kao i da vodi do nastajanja patoloških stanja poput inflamacije i kardiovaskularnih bolesti (KVB) (34). Dodatno, slobodni radikali interakcijom sa lipidima menjaju njihovu strukturu, pakovanje i distribuciju u ćelijskoj membrani, što dovodi do smanjenja membranske fluidnosti, koja se dovodi u vezu sa razvojem hipertenzije i KVB (35). S obzirom da predstavlja mesto prvog kontakta ekstraćelijskih činioca i same ćelije, ćelijska membrana je ćelijska struktura koja je primarno izložena oštećenju delovanjem prooksidanasa prisutnih u plazmi, nastalih kao rezultat poremećaja prooksidativno-antioksidativne ravnoteže. Osnovno mesto delovanja slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta su molekuli PUFA u fosfolipidima ćelijskih membrana (37). Pojava lipidne peroksidacije u biološkim membranama dovodi do poremećaja njihovih funkcija, promena u fluidnosti, inaktivacije membranski vezanih receptora i enzima i povećanja nespecifične propustljivosti za jone. Tako na primer, izlaganje eritrocita peroksidima i njihova posledična deformacija, čini njihovu membranu visoko permeabilnom za kalijumove jone (36).

U studijama koje se bave evaluacijom oksidativnog stresa u različitim stanjima, kao i efikasnosti potencijalnih antioksidanasa, kao model biološke membrane najčešće se koriste eritrociti. Eritrociti su takođe, kao najbrojnije krvne ćelije, glavni izvor antioksidativnih enzima koji predstavljaju deo odbrambenog mehanizma organizma protiv oksidativnih oštećenja. Ove krvne ćelije smatraju se potencijalnim metama prooksidanasa, zbog činjenice da je njihova membrana bogata polinezasićenim masnim kiselinama, kao i da reaktivne vrste kroz nju lako prolaze. Dodatno, usled nedostatka DNK, eritrociti imaju ograničene mogućnosti za regeneraciju biomolekula oštećenih oksidansima (38). Stoga u stanjima praćenim izrazitim oksidativnim stresom, eritrociti često menjaju svoju strukturu i funkcije, a njihove komponente, pa i membrana bivaju oksidativno ugrožene. Peroksidacija eritrocitne membrane, odnosno lipida, može dovesti do gubitka sposobnosti promene oblika eritrocita i prolaska kroz najmanje kapilare, što ugrožava transport kiseonika do perifernih tkiva. Promene u lipidnom dvosloju membrane eritrocita menjaju njenu fluidnost, što se odražava promenama u strukturi, dinamičkoj deformabilnosti membrane kao i aktivnosti membranski vezanih

enzima, a dovodi se u vezu sa brojnim patološkim stanjima, kao i patogenezom KVB (39,40).

Određivanje sadržaja PUFA, pa i celokupnog profila masnih kiselina u membrani eritrocita od značaja je u predviđanju rizika za nastanak KVB. Uočeno je da je sadržaj polinezasićenih masnih kiselina inverzno povezan sa pojavom hipertenzije, dok veći sadržaj zasićenih masnih kiselina ukazuje na veći rizik za povišen krvni pritisak (41). Dalje je ustanovljeno da veći sadržaj n-3 polinezasićenih masnih kiselina u membranama negativno koreliše sa rizikom za nastanak KVB, ali i pojavom reumatoidnog artitisa i metaboličkog sindroma (42,43,44). Neki autori predlažu i uvođenje „omega-3-indeksa“, koji predstavlja sumu sadržaja dve najznačajnije n-3 masne kiseline, EPA (cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenska) i DHA (cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenska) u membrani eritrocita, kao potencijalnog faktora rizika za smrt od koronarne bolesti srca (45). DHA (Slika 4) je polinezasićena masna kiselina sa najvećim brojem nezasićenih veza, koje su ciljno mesto interakcije sa slobodnim radikalima, te je od značaj određivanje njenog sadržaja. Studije su pokazale njen antiaritmički efekat kao i hipotenzivno dejstvo, posredovano oslobađanjem NO u endotelijumu (46). Utvrđeno je i da visok odnos n-6 i n-3 masnih kiselina u membrani eritrocita promoviše inflamaciju i razvoj hroničnih bolesti, kao i da njegovo smanjenje deluje supresivno na patogenezu kardiovaskularnih i drugih bolesti (47).



**Slika 4.** Strukturna formula a) EPA; b) DHA

## 1.2. Oksidativni stres u patogenezi kardiovaskularnih bolesti

Oksidativni stres dovodi se u vezu sa patološkim stanjima kao što su ateroskleroza, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, hipertenzija, reumatoidni artritis, dijabetes, procesi starenja, dermatitis, kancer, astma, neplodnost, neurodegenerativni poremećaji i drugo (5). KVB predstavljaju bolesti koje zahvataju srce i krvne sudove, a prema podacima Svetske zdravstvene organizacije najznačajniji su uzročnik oboljevanja i umiranja u svetu. Gotovo polovina od ukupne smrtnosti usled hroničnih bolesti pripisuje se KVB (48). Širok spektar faktora rizika za nastanak KVB je identifikovan, a oni se mogu podeliti na nekoliko različitih načina. Jedan od njih je podela na faktore rizika na koje se ne može uticati, dakle nepromenljive faktore (uzrast, pol, nasleđe) i faktore rizika na koje se može delovati, pa se na taj način KVB mogu prevenirati (49). Najznačajniji od promenljivih faktora rizika su povišen krvni pritisak, pušenje, povišen LDL holesterol, nizak HDL holesterol, gojaznost, dijabetes, fizička neaktivnost, neadekvatna ishrana i drugi. Pored tradicionalnih faktora rizika, brojna patološka stanja se dovode u vezu sa povećanim rizikom za nastanak KVB jer su praćena poremećajima metaboličkog statusa, homeostatske regulacije i funkcije organizma. Faktori rizika za nastanak KVB često su praćeni promenama u oksidativnom statusu, a stanje oksidativnog stresa, odnosno povećana koncentracija slobodnih radikala i smanjena aktivnost endogene i egzogene antioksidativne zaštite, dovodi se u vezu sa patogenezi kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti (3).

### 1.2.1. Oksidativni stres i hipertenzija

Povišen krvni pritisak je najčešći faktor rizika za nastanak KVB, pri čemu više vrednosti podrazumevaju veći rizik, naročito kada su prisutni i drugi faktori, kao što su porodična istorija preuranjenih KVB, dijabetes, gojaznost, pušenje ili bolesti bubrega (50). Da je hipertenzija glavni faktor rizika za KVB potvrđeno je u brojnim epidemiološkim studijama sprovedenim kako u razvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju. Istraživanja su pokazala da čak i visoki-normalni arterijski krvni pritisak predstavlja faktor rizika za KVB, tačnije koronarnu bolest srca, kod oba pola i u različitim etničkim grupama (51). U skladu sa podelom preporučenom od strane Evropskog društva za hipertenziju i Evropskog kardiološkog društva (eng. *European*

*Society of Hypertension, European Society of Cardiology*) visokim-normalnom arterijskim krvnim pritiskom se smatra sistolni krvni pritisak vrednosti od 130–139 mmHg i/ili dijastolni od 85–89 mmHg (52). Pokazano je da oksidativni status osoba sa farmakološki nelečenom esencijalnom hipertenzijom karakteriše povećanje nivoa markera lipidne peroksidacije u krvi, kao i povećana produkcija superoksid-anjona i vodonik-peroksida u polimorfonuklearnim leukocitima, i smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije vitamina E. Pri tome, normalizacija vrednosti krvnog pritiska dovodi do normalizacije vrednosti navedenih parametra oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (53). Pokazano je da je u stanju hipertenzije smanjena bioraspoloživost azot-monoksida, važnog vazodilatatora, koji se degradira u prisustvu slobodnih radikala. Naime, poluvreme eliminacije, a samim tim i biološka aktivnost NO zavisi od prisustva ROS, pre svega superoksid-anjona koji reaguje sa NO i dovodi do formiranja visoko reaktivnog peroksinitrita. Ova reakcija se odvija 10 puta brže od reakcije u kojoj superoksid-dismutaza razlaže superoksid-anjon, a rezultat je smanjenje bioraspoloživosti azot-monoksida, kao i njegovih zaštitnih efekata (54). Smatra se da NO oslobođen u vaskularnom endotelu ispoljava anti-aterosklerotsko dejstvo, pa se inicijacija, ali i ubrzavanje procesa ateroskleroze dovodi u vezu sa stanjima deficita NO. Povećana produkcija ROS se sve više dovodi u vezu sa endotelnom disfunkcijom, koja je prisutna kod pacijenata sa aterosklerozom, a novija istraživanja su pokazala da prisustvo endotelne disfunkcije može da predvidi i nivo kardiovaskularnih događaja uopšte (55). Iako su mehanizmi koji dovode do endotelne disfunkcije kompleksni i uključuju više činioca, smatra se da ključnu ulogu u ovom fenomenu mogu imati ROS, kao i da smanjenje njihove produkcije, odnosno nivoa oksidativnog stresa može usporiti ili sprečiti razvoj KVB (54,55). Dodatno, narušena endotelna homeostaza se dovodi u vezu sa gotovo svim faktorima rizika za nastanak KVB, a pokazana je, između ostalog, kod starih ljudi, pacijenata sa dijabetesom tipa 1 ili 2, hipertenzivnih osoba, u stanjima povišenog LDL holesterola i triglicerida, kao i u metaboličkom sindromu (54).

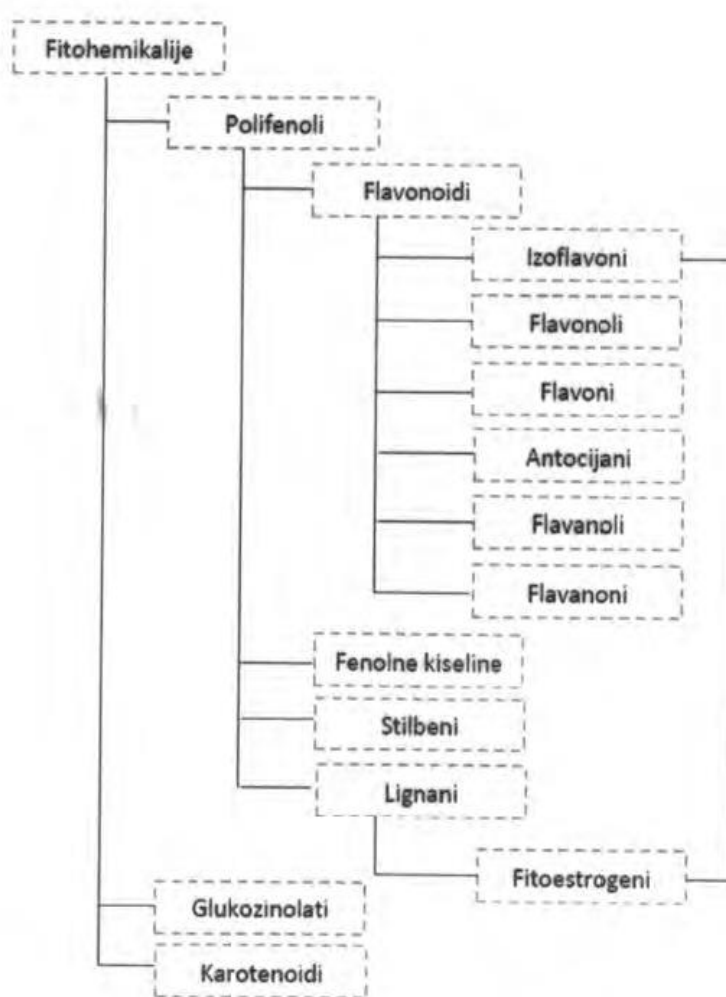
### **1.2.2. Oksidativni stres i gojaznost**

Metabolički sindrom, odnosno insulinska rezistencija, definisan je kao skup kardiovaskularnih faktora rizika, vezanih za poremećaje na nivou metabolizma, a čije prisustvo doprinosi pojavi dijabetesa, ukoliko on već nije prisutan. Trenutno prihvaćene

definicije metaboličkog sindroma izdvajaju gojaznost, dislipidemiju, insulinsku rezistenciju i hipertenziju kao njegove ključne komponente, uz korišćenje različitih kliničkih kriterijuma za njegovo dijagnostikovanje (56). Dve decenije nakon prvobitnog definisanja metaboličkog sindroma, gojaznost gornjeg dela tela (tzv. androidna ili gojaznost muškog tipa) okarakterisana je kao tip gojaznosti najčešće povezan sa poremećajima metabolizma prisutnim u KVB i dijabetesu (57). Takođe, smatra se da centralna ili abdominalna gojaznost, definisana po ATP III (eng. *Adult Treatment Panel III*) kriterijumu kao obim struka  $\geq 102$  cm za muškarce i  $\geq 88$  cm za žene (58) ima ključnu ulogu u nastanku insulinske rezistencije kod metaboličkog sindroma (56). Ovaj tip gojaznosti prati poremećen oksidativni status u “akumuliranoj masti” koji se manifestuje porastom ekspresije enzima NAD(P)H-oksidaze, kao i smanjenom aktivnošću antioksidativnih enzima (59). U stanju brze ekspanzije adipoznog tkiva prisutna je hipoksija koja dovodi do apoptoze adipocita, što služi kao okidač za infiltraciju makrofagima, koji se akumuliraju u adipocitima srazmerno njihovoj veličini i dovode do produkcije veće količine ROS i citokina (60). Hiperprodukcija ROS kod gojaznih kao i obolelih od dijabetesa tipa 2, može biti posledica poremećaja transportnog lanca elektrona u mitohondrijama. Smatra se da smanjena produkcija energije u mitohondrijama usled disbalansa protona, dovodi do formiranja ROS. Navodi se i da visoka koncentracija triglicerida u citosolu može da dovede do deficita ADP-a unutar mitohondrija, što je potencijalni stimulator stvaranja slobodnih radikala (61,62). Pokazano je da je povezanost centralne gojaznosti i smanjenog antioksidativnog kapaciteta plazme nezavisna od starosti, pušenja, krvnog pritiska, nivoa šećera i lipida, kao i da povećanje nivoa oxLDL i biomarkera lipidne peroksidacije, prisutno kod centralne gojaznosti, ne zavisi od indeksa telesne mase (ITM) (63). Gojaznost kao faktor rizika za nastanak KVB u pogledu povezanosti sa oksidativnim stresom, ima veći značaj kod žena u odnosu na muškarce. U studiji koja je uključivala više od tri hiljade ispitanika pokazano je da je kod gojaznih žena (ITM>30) i žena sa povećanom telesnom masom (25<ITM<30) aktivnost antioksidativnih enzima plazme 10 % niža od aktivnosti u kontrolnoj grupi žena sa normalnom telesnom masom (ITM<25), dok je kod muškaraca aktivnost u ispitivanoj grupi niža za 6 % u odnosu na kontrolnu grupu (63).

### 1.3. Dijetarni faktori u patogenezi kardiovaskularnih bolesti

Veliki broj faktora rizika za nastanak KVB (hiperlipidemija, hiperglikemija, hipertenzija, gojaznost) povezan je sa načinom ishrane. Prisustvo faktora rizika za nastanak KVB povezanih sa ishranom i odgovarajućih biomarkera najčešće je posledica dugotrajnih nepravilnih obrazaca u ishrani, odnosno nepravilnog režima ishrane i neoptimalne, neizbalansirane dijeta. S obzirom na očigledni uticaj ishrane na kardiovaskularno zdravlje, koji je posredovan delovanjem na faktore rizika, i sami obrasci ishrane mogu se posmatrati kao prediktori nastanka KVB (64). Rezultati brojnih epidemioloških studija pokazali su povezanost ishrane bogate voćem, povrćem i integralnim žitaricama sa smanjenjem rizika za nastanak KVB (65,66,67).



Slika 5. Različite grupe fitohemikalija sa izraženom antioksidativnom aktivnošću

Povoljno delovanje namirnica u prevenciji KVB pripisuje se delom nutritivnim sastojcima (vitaminima, mineralima, dijetarnim vlaknima), ali pre svega nenutritivnim biološki aktivnim sastojcima – fitohemikalijama (Slika 5). Ove komponente hrane imaju različite mehanizme kardioprotektivnog delovanja, koje ispoljavaju nezavisno ili u sinergizmu jedni sa drugima. Dalja istraživanja delovanja fitohemikalija imaju za cilj potvrdu aktivnosti i naučne zasnovanosti preporuka za uključivanja namirnica koje ih sadrže u sastav optimalne dijete, sa ciljem očuvanja kardiovaskularnog zdravlja i primarne, sekundarne i tercijarne prevencije KVB.

Klinička studija koja je ispitivala uticaj različitih obrazaca ishrane na vrednosti krvnog pritiska, kao vodećeg faktora rizika za KVB, pokazala je da ishrana bogata voćem i povrćem dovodi do redukcije klinički i ambulatorno merenog krvnog pritiska u odnosu na ishranu sa niskim unosom ovih namirnica. Treba istaći da je ovaj efekat uočen ne samo kod osoba sa hipertenzijom, nego i kod onih sa normalnim vrednostima krvnog pritiska (67). Evropsko društvo za hipertenziju i Evropsko kardiološko društvo kao prvu strategiju koju treba primeniti kada je hipertenzija dijagnostikovana, navode promenu načina života. Ovo spada u tzv. nefarmakološke mere lečenja hipertenzije, koje obuhvataju smanjenje telesne mase, fizičku aktivnost, ograničen unos soli, zasićenih masnih kiselina i alkohola, prestanak pušenja, kao i ishranu bogatu voćem i povrćem (52).

S obzirom na potencijalnu ulogu oksidativnog stresa u patogenezi kardiovaskularnih bolesti, povoljno delovanje određenih obrazaca ishrane na kardiovaskularno zdravlje moglo bi se pripisati unosu dijetarnih antioksidanasa. Pod dijetarnim antioksidansima podrazumevaju se supstance u hrani koje značajno smanjuju štetne uticaje reaktivnih vrsta, kao što su ROS i RNS, na normalne fiziološke funkcije organizma. Dijetarni antioksidansi mogu delovati neutralizacijom slobodnih radikala i sprečavanjem lančanih radikalskih reakcija, ali i preventivno, odnosno sprečavanjem formiranja reaktivnih radikalskih vrsta (21).

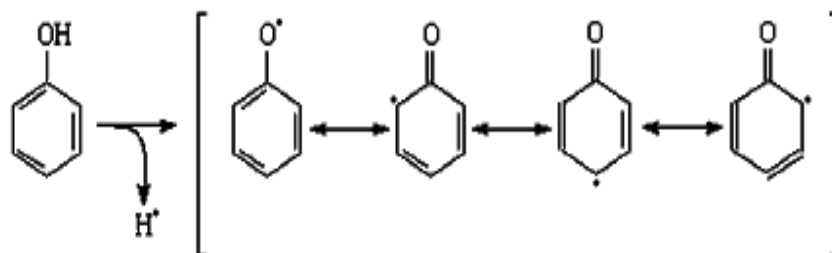
### **1.3.1. Polifenoli kao dijetarni antioksidansi**

Po zastupljenosti u ljudskoj ishrani polifenoli su najznačajniji dijetarni antioksidansi i najznačajnija grupa nenutritivnih sastojaka namirnica. Polifenoli čine najbrojniju i najzastupljeniju grupu biološki aktivnih, sekundarnih metabolita biljaka.

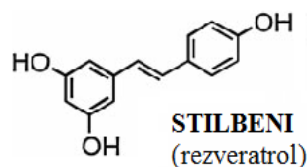


Prisutni su u većini namirnica biljnog porekla, uključujući voće, povrće, leguminoze, pojedina biljna ulja, vino i biljne čajeve. Voće kao što su jabuke, kruške, grožđe i različito bobičasto voće sadrži i do 200-300 mg polifenola na 100 g sveže mase, dok čaša vina ili šolja čaja ili kafe sadrži oko 100 mg (3). Procenjuje se da dijetarni unos polifenola u evropskim zemljama iznosi 1 g po danu (68,69). To je mnogo više od unosa ostalih dijetarnih antioksidanasa uobičajenom ishranom, odnosno 10 puta više od prosečnog unosa vitamina C i 100 puta više od unosa vitamina E i karotenoida (68). Do sada je identifikovano više stotina jedinjenja polifenolne strukture prisutnih u namirnicama, a na osnovu hemijske strukture većina pripada jednoj od četiri osnovne grupe polifenola: fenolnim kiselinama, flavonoidima, stilbenima i lignanima (Slika 6). Ukupnom dijetarnom unosu polifenola najviše doprinose jedinjenja prve dve grupe, fenolne kiseline i flavonoidi. Flavonoidi su grupa polifenolnih jedinjenja zajedničke hemijske strukture koju čine dva aromatična prstena povezana sa tri ugljenikova atoma, koja su deo heterocikličnog prstena sa kiseonikom. Osnovne podgrupe flavonoida su flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli (Slika 6). Fenolne kiseline obuhvataju derivate hidroksi-benzojeve i hidroksi-cimetne kiseline i zahvaljujući njihovom visokom sadržaju u kafi, čaju, voću, voćnim sokovima i žitaricama, imaju značajan udeo u ukupnom dijetarnom unosu polifenola.

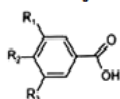
Antioksidativna aktivnost polifenola, za koju je *in vitro* pokazano da je veća od aktivnosti vitamina C i E, zasniva se na njihovoj hemijskoj strukturi i sposobnosti doniranja vodonikovog atoma, odnosno elektrona (37). Na ovaj način ostvaruje se direktni antioksidativni efekat, uklanjanjem reaktivnih slobodnih radikala. Pri tome se formira manje reaktivan fenoksi-radikal, koji je stabilizovan delokalizacijom elektrona u aromatičnom prstenu (Shema 3).



**Shema 3.** Fenoksi-radikal, rezonantna stabilizacija nesporenog elektrona

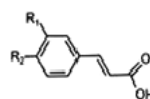
**FENOLNE KISELINE:**

Derivati hidroksi-benzojeve kiseline:

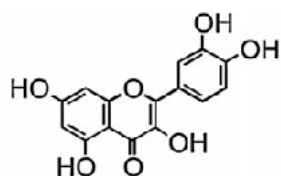


R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H Protokatehnična kis.  
R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH Galna kis.

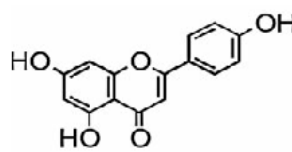
Derivati cimetine kiseline:



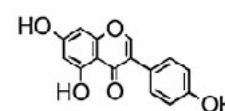
R<sub>1</sub>=OH Kumarinska kis.  
R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH Kafena kis.  
R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OH Ferula kis.

**FLAVONOIDI:**

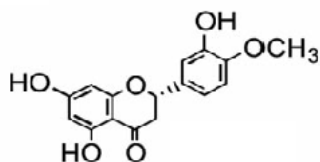
**Flavonoli**  
(kvercetin)



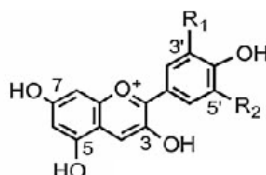
**Flavoni**  
(apigenin)



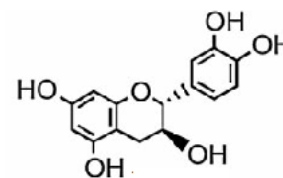
**Izoflavoni**  
(genistein)



**Flavanoni**  
(hesperetin)



**Antocijanidini**



**Flavanoli**  
(katehin)

**Slika 6.** Osnovne klase polifenola

( Slika modifikovana prema Scalbert i Williamson, 2000. (68))

Smatra se da polifenoli mogu ispoljiti i indirektno antioksidativno delovanje, posredovano modulacijom signalnih puteva i ekspresije gena (3,70). Na ovaj način, polifenoli učestvuju u regulaciji aktivnosti antioksidativnih enzima i povoljno deluju na zaštitne mehanizme organizma od oksidativnih oštećenja. Takođe, postoje snažne indicije da polifenoli svoju zaštitnu ulogu ostvaruju i u samim namirnicama, gde preko neutralizacije slobodnih radikala smanjuju oksidaciju lipida i unos prooksidansa u organizam (71). Pojedine klase polifenola ponašaju se kao metalni helatori, odnosno

formiraju metalne komplekse sa jonima bakra i gvožđa, koji su poznati katalizatori radikalnih reakcija (72).

Polifenoli se odlikuju intenzivnim metabolizmom i malom bioraspoloživošću, te su biološki efekti polifenola posledica delovanja njihovih metabolita, proizvoda delovanja metaboličkih enzima i mikroflore humanog organizma. Bioraspoloživost polifenola zavisi od klase kojoj određeno polifenolno jedinjenje pripada, ali i od specifične strukture, te se razlike mogu uočiti i između jedinjenja iste klase. Danas je identifikovano preko 350 metabolita polifenolnih sastojaka biljaka (73,74).

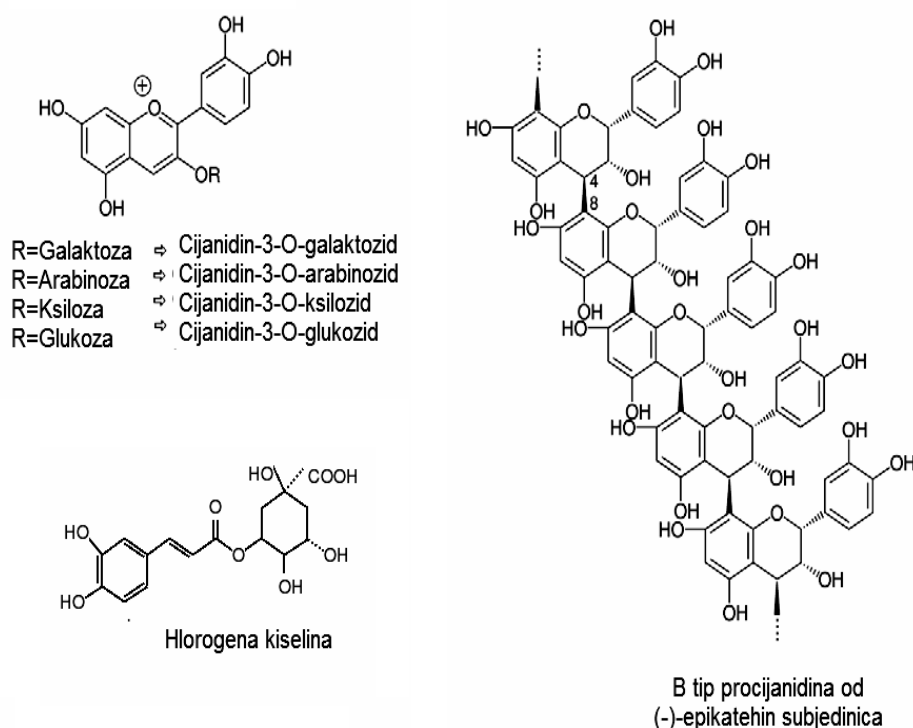
Antioksidativna aktivnost polifenola potvrđena je i u *in vitro* sistemima gde je inkubacija sa polifenolima bogatim ekstraktima dovela do smanjenja oksidativnog oštećenja bioloških membrana. Kao granična površina između ćelije i ekstracelularnog prostora, membrana predstavlja prvu liniju kontakta slobodnih radikala sa ćelijom, i posledično ima važnu ulogu u odbrani ćelije. Zaštitnu ulogu polifenoli su ostvarili putem dva mehanizma: indirektno, „hvatanjem“ slobodnih radikala u medijumu i direktno, ugradnjom u samu ćelijsku membranu (75,76). Pokazano je, na primer, da polifenoli stupaju u interakciju sa lipidnom fazom membrane, sa tendencijom da se inkorporiraju u spoljašnji hidrofилni deo fosfolipidnog dvosloja (77,78). Ova interakcija delovala je povoljno na zaštitu membranskih lipida od oksidacije. Različiti biljni ekstrakti bogati polifenolima pokazali su ovakav efekat uz utvrđenu doznu zavisnost, kao i zavisnost od sadržaja i specifične strukture polifenola prisutnih u ekstraktima. Primera radi, visok antioksidativni potencijal ekstrakta jabuke dovodi se u vezu sa visokim sadržajem hlorogene kiseline u njemu (76). Promene u strukturi pojedinačnih izolovanih polifenola, kao što je glikozilacija, rezultovale su smanjenjem antioksidativne aktivnosti, usled slabijeg vezivanja dobijenih jedinjenja za membranu (79). Smatra se da nakon ugradnje u membranu, polifenoli smanjuju nivo oksidativnog oštećenja i heliranjem atoma gvožđa. Prisustvo karbonilne i hidroksilne grupe u strukturi polifenola pokazalo se značajnim za ostvarivanje ovakvog efekta (78).

#### 1.4. Aronija (*Aronia melanocarpa*) – izvor polifenola

Različit biljni materijal uključujući voće, povrće, uljarice, žitarice, začine, kao i različiti delovi biljaka, odnosno listovi, plodovi, korenje i kora, ispitivani su kao potencijalni izvor polifenola. Među ispitivanim vrstama, po visokom sadržaju širokog spektra flavonoida i fenolnih kiselina sa izraženom antioksidantnom aktivnošću, izdvaja se bobičasto voće. Najzastupljenije flavonoidne podgrupe su procijanidini, antocijani i flavonoli, dok su prisutne fenolne kiseline derivati nastali hidroksilacijom benzojeve i cimetine kiseline (79). Pokazano je da ukupni antioksidativni potencijal pojedinačnog bobičastog voća zavisi od strukture prisutnih fenolnih jedinjenja, kao i od njihovog ukupnog sadržaja. Ispitivanje koje je obuhvatilo 92 različita biljna ekstrakta, dobijena od jestivih i nejestivih biljaka, pokazalo je da bobičasto voće poseduje najveći antioksidativni kapacitet. Ovo se pripisuje visokom sadržaju polifenolnih jedinjenja (80). Dalja ispitivanja su pokazala da se među bobičastim voćem, po antioksidativnoj aktivnosti odnosno sadržaju polifenola, izdvajaju plodovi aronije. Takođe, pokazano je da sok dobijen od plodova aronije ispoljava čak i do 4 puta veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale polifenolima bogate napitke, kao što su sok od borovnice, sok od ribizle i crveno vino (81,82).

Aronija (*Aronia melanocarpa*) pripada familiji *Rosaceae* i potiče iz istočnih delova severne Amerike i istočne Kanade. U Evropi se gaji od početka 20. veka, a na našim prostorima prisutna je više od 50 godina, ali je aronija u široj upotrebi samo poslednjih nekoliko godina. Plod i sok od aronije dobri su dijetarni izvor vitamina C, organskih kiselina i karotenoida (83). Od polifenolnih jedinjenja naročito su zastupljeni procijanidini, antocijani i fenolne kiseline. Aronija se smatra najboljim izvorom antocijana u prirodi i njihov sadržaj se kreće u intervalu 5 000 - 10 000 mg/kg sveže mase (74). Pokazano je da antocijani predstavljaju 25 % od ukupnih polifenola prisutnih u plodovima aronije, što je značajno više od sadržaja ostalih prisutnih klasa polifenola. U poređenju sa ostalim vrstama bobičastog, ali i voća uopšte, spektar prisutnih antocijana u aroniji je prilično jednoličan. To podrazumeva prisustvo gotovo isključivo cijanidin-glikozida, i to cijanidin-3-O-glukozida, cijanidin-3-O-galaktozida, cijanidin-3-O-ksilozida i cijanidin-3-O-arabinozida (Slika 7) (79). Zbog visokog sadržaja, antocijani u najvećoj meri doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti plodova, kao i

soka dobijenih od njih. Tačnije, antocijani doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti plodova sa 33 %, dok je doprinos u soku nešto veći i iznosi 42 % od ukupnog antioksidativnog kapaciteta (84). Procijanidini, prisutni u plodovima aronije, su oligomerni i polimerni (epi)katehini, nastali asocijacijom više monomernih jedinica. Procijanidini se razlikuju međusobno po konfiguraciji i poziciji veza kojim su pojedinačni monomeri spojeni. U slučaju plodova aronije, procijanidini su gotovo isključivo tzv. B tipa (C4-C8 veza) sa (-)-epikatehinom kao glavnom monomernom subjedinicom. Sadržaj katehinske jedinice iznosi svega 1,5 % (79). Treću grupu najzastupljenijih polifenolnih jedinjenja u plodovima aronije čine fenolne kiseline. Kao glavni prisutni predstavnici ove grupe jedinjenja u plodovima i soku identifikovane su hlorogena i neohlorogena kiselina. Aronija se među bobičastim voćem smatra najboljim izvorom ovih kiselina sa 96 mg/100 g sveže mase (85).



**Slika 7.** Aktivni principi plodova aronije  
(Slika modifikovana prema Kulling i Rawel, 2008. (83))

Aktivni principi aronije, tačnije mešavina antocijana, procijanidina i fenolnih kiselina, predstavljaju jedan od najpotentnijih prirodnih antioksidanasa. Zahvaljujući ovome, plodovi aronije i od njih dobijeni proizvodi smatraju se efikasnim u očuvanju zdravlja, kao i u stanjima i bolestima asociranim sa oksidativnim stresom. Ovo se odnosi pre svega na povoljne efekte na kardiovaskularno zdravlje, održavanje normalnih funkcija urinarnog trakta, zaštitu od virusa i bakterija, poboljšavanje memorije i varenja. Takođe proizvodi od aronije pokazali su inhibitorno delovanje na proliferaciju kancerskih ćelija, kao i hepatoprotektivno i antidijabetesno delovanje kroz smanjenje hiperglikemije i hiperlipidemije (86). U dosadašnjoj literaturi nema podataka o eventualnim neželjenim i toksičnim efektima plodova, soka ili ekstrakata aronije (87).

Kardioprotektivno delovanje aktivnih principa aronije ispoljava se kroz uticaj na faktore rizika za nastanak KVB. Ovo je najpre uočeno u *in vitro* ispitivanjima, u kojima je pokazano njihovo vazoaktivno i vazoprotektivno dejstvo, kao i zaštitno delovanje na ćelije endotela i funkciju trombocita (88,89). Takođe, u animalnim eksperimentalnim modelima, sok od aronije pokazao je povoljan efekat na hiperlipidemiju, snižavanjem povišenih nivoa triglicerida, ukupnog i LDL holesterola (90). Smatra se da je ovakav efekat, između ostalog, posledica antioksidativnog delovanja, što je takođe potvrđeno u *in vitro* uslovima. Tako je u plazmi tretiranoj ekstraktom aronije uočen porast u ukupnom antioksidativnom kapacitetu, dok je smanjenje stvaranja superoksid-anjon radikala pokazano u trombocitima zdravih osoba i pacijenata obolelih od karcinoma dojke (91,92). Povoljni efekti aronije ustanovljeni *in vitro*, potvrđeni su i pri hroničnoj konzumaciji njenih proizvoda kao i suplementaciji izolovanim aktivnim principima kod ljudi. Rezultati različitih interventnih studija pokazali su povoljno delovanje aronije u prevenciji kardiovaskularnih bolesti smanjenjem nivoa ukupnog holesterola, LDL-a, oxLDL-a, triglicerida, glukoze, HbA1c, vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, kao i povoljnim delovanjem na postizanje i održavanje idealne telesne mase (93,94). Značajno smanjenje nivoa triglicerida, ukupnog i LDL holesterola uočeno je nakon 6 nedelja svakodnevne konzumacije soka od aronije kod ljudi sa blagom hiperholesterolemijom (95). Slično je potvrđeno i kod ispitanika sa metaboličkim sindromom nakon 2 meseca suplementacije standardizovanim ekstraktom aronije, kod kojih je zabeleženo i umereno smanjenje nivoa glukoze, homocisteina i fibrinogena (94). Ove metaboličke promene asocirane su sa smanjenjem povišenih vrednosti

sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska koje je uočeno kod ljudi sa hiperholesterolemijom, obolelih od dijabetesa, kao i kod pacijenata koji su nakon infarkta miokarda lečeni istovremeno statinima i flavonoidima bogatim ekstraktom aronije (95,96). Mali broj studija u kojima je ispitivan uticaj hronične konzumacije proizvoda od aronije na oksidativni status kod ljudi pokazao je porast u aktivnosti antioksidativnih enzima eritrocita kao i smanjenje nivoa proizvoda lipidne peroksidacije (94,97).

### 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih i drugih hroničnih nezaraznih bolesti. Epidemiološke studije su pokazale da ishrana bogata voćem, povrćem i integralnim žitaricama povoljno deluje u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Smatra se da je ovo posledica prisustva polifenola u ovim namirnicama, kao najpotentnijih i najzastupljenijih dijetarnih antioksidanasa. U skladu sa tim osnovni cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja soka ploda aronije, kao bogatog izvora polifenola, na pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite kod zdravih osoba sa ili bez prisutnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti.

Na osnovu ovoga definisani su sledeći zadaci istraživanja:

1. Odrediti nivo oksidativnog stresa, antioksidativni status i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod zdravih osoba ženskog pola bez prisutnih faktora rizika za nastanak KVB.
2. Odrediti nivo oksidativnog stresa, antioksidativni status i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod osoba ženskog pola sa prisutnom abdominalnom gojaznošću sa i bez pratećih faktora rizika za nastanak KVB.
3. Odrediti nivo oksidativnog stresa, antioksidativni status i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod osoba sa visokim-normalnim arterijskim krvnim pritiskom i arterijskom hipertenzijom stadijuma 1 sa i bez pratećih faktora rizika za nastanak KVB.
4. Ispitati uticaj dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima zdravih osoba ženskog pola bez prisutnih faktora rizika za nastanak KVB.
5. Ispitati uticaj dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod osoba ženskog pola sa prisutnom abdominalnom gojaznošću sa i bez pratećih faktora rizika za nastanak KVB.



6. Ispitati uticaj dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod osoba sa visokim-normalnim arterijskim krvnim pritiskom i arterijskom hipertenzijom stadijuma 1 sa i bez pratećih faktora rizika za nastanak KVB.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Dizajn humanih interventnih studija**

U cilju ispitivanja uticaja dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog statusa i profil masnih kiselina, sprovedene su tri humane interventne studije pri čemu su uključene tri grupe ispitanika i to:

- zdravi ispitanici bez prisutnih faktora rizika za nastanak KVB, koji su činili Grupu I,
- ispitanici sa abdominalnom gojaznošću, koji su činili Grupu II i
- ispitanici sa visokim-normalnim krvnim pritiskom ili hipertenzijom stadijuma 1, koji su činili Grupu III.

##### **3.1.1. Ispitanici i protokol studije za Grupu I**

Grupu I činilo je 29 zdravih osoba ženskog pola starosti od 25 do 49 godina bez prisutnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Kriterijum za uključivanje podrazumevao je žene sa ITM između 18,5 i 29,9 kg/m<sup>2</sup> i stabilnom telesnom masom (bez većih varijacija u prethodna 3 meseca). Zdravstveni status ispitanika procenjen je na osnovu anamnestičkih podataka. Osobe obolele od hroničnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, kancer, alergije, koje zahtevaju aktivnu farmakoterapiju, kao ni trudnice, dojilje i žene u menopauzi ili premenopauzi nisu uključene. Kriterijumi za isključivanje bili su i upotreba oralnih kontraceptiva, kortikosteroida, hormona, kao i redovno uzimanje antacida i laksativa. Takođe, isključene su žene na redukcionoj dijeti, kao i dobrovoljni davaoci krvi koji su u toku 16 nedelja pre početka studije donirali krv ili nameravali da daju krv u periodu od 16 nedelja po završetku studije. Od ispitanika je zatraženo da se pridržavaju uobičajenih životnih navika i načina ishrane kao u prethodna 3 meseca.

Protokol studije podrazumevao je dijetarnu intervenciju sokom od aronije (Sok A) u trajanju od 12 nedelja. Ispitanici su svakodnevno konzumirali 100 mL Soka A, po savetu uz veći obrok. Pri tome nije zatražena restrikcija uobičajenih nutrimenata prisutnih u ishrani ispitanika. Studija je podrazumevala tri studijske vizite, odnosno tri

uzorkovanja krvi. Prva poseta označavala je početak studije, odnosno početak perioda svakodnevne konzumacije soka; druga poseta bila je na sredini interventnog perioda, odnosno nakon 6 nedelja svakodnevne konzumacije soka, dok je treća poseta označavala završetak studije. Biohemijski parametri određivani su samo u početnoj i završnoj tački, s obzirom da se radilo o zdravim ispitanicima i da nisu očekivane veće promene u njihovim vrednostima. Svaka studijska poseta podrazumevala je uzorkovanje krvi, određivanje osnovnih antropometrijskih parametara, kao i merenje krvnog pritiska. Svi ispitanici su dali informisani pristanak pre uključivanja u studiju, a po završetku su popunili upitnik u cilju prijave eventualnih neželjenih reakcija na sok.

### **3.1.2. Ispitanici i protokol studije za Grupu II**

Grupu II činilo je 20 osoba ženskog pola starosti od 46 do 65 godina. Glavni kriterijum za uključivanje u studiju bila je prisutna abdominalna gojaznost (obim struka  $\geq 88$  cm). Zdravstveni status ispitanika ocenjen je na osnovu anamnestičkih podataka, dok su analize pokazale da je veći deo učesnika imao prisutan još neki od faktora rizika za nastanak KVB, kao što su povišen nivo glukoze ili triglicerida, odnosno snižen nivo HDL holesterola. Kriterijumi za isključivanje iz studije podrazumevali su prisustvo dijabetesa tipa I i II, kardiovaskularnih bolesti, moždanog insulta, malignih bolesti, kao i redovna upotreba antacida, laksativa, kortikosteroida i hormona. Dobrovoljni davaoci krvi sa namerom da daju krv u toku, neposredno pre i po završetku studije, kao i učesnici u drugim dijetarnim intervencijama nisu uključeni. Kriterijum za isključivanje bila je i alergija ili intolerancija na aroniju i drugo bobičasto voće. Od ispitanika je zatraženo da se pridržavaju uobičajenih životnih navika i optimalnog dijetarnog režima, kako bi se ublažile eventualne varijacije u ishrani koje bi mogle da maskiraju efekte same intervencije.

Protokol je podrazumevao svakodnevnu konzumaciju 100 mL Soka B u trajanju od 4 nedelje. Studija se sastojala iz dve studijske vizite, odnosno dva dolaska ispitanika i dva uzorkovanja krvi. Prvi dolazak ispitanika odnosio se na sam početak studije, za kojim je sledila svakodnevna konzumacija soka od 4 nedelje, nakon čega je bio drugi dolazak. Studijski dolazak obuhvatio je merenje antropometrijskih parametara i

uzorkovanje krvi. Svi ispitanici su dali informisani pristanak pre uključivanja u studiju, a po završetku su popunili upitnik u cilju prijave eventualnih neželjenih reakcija.

### **3.1.3. Ispitanici i protokol studije za Grupu III**

Grupu III činile su 23 osobe sa visokim-normalnim arterijskim krvnim pritiskom (sistolni krvni pritisak 130–139 mmHg i/ili dijastolni 85–89 mmHg), ili hipertenzijom stadijuma 1 (sistolni krvni pritisak 140–159 mmHg i/ili dijastolni 90–99 mmHg), u skladu sa podelom preporučenom od strane Evropskog društva za hipertenziju i Evropskog kardiološkog društva. Uključeno je 23 ispitanika (11 žena i 12 muškaraca) starosti od 33 do 67 godina. Osnovni kriterijum za uključivanje u studiju bio je prisustvo navedenih vrednosti krvnog pritiska bez redovne upotrebe antihipertenzivnih lekova. Kriterijumi za isključivanje iz studije podrazumevali su pre svega prisustvo koronarne bolesti, arterijske fibrilacije, oboljenja bubrega, autoimunih bolesti i upotrebu lekova kao što su antiaritmici, antidepresivi, neuroleptici. Kao i u slučaju Grupe I i II, dobrovoljni davaoci krvi sa namerom da daju krv u toku, neposredno pre i po završetku studije, kao i učesnici u drugim dijetarnim intervencijama nisu uključeni. Svi ispitanici potpisali su informisani pristanak a od njih je zatraženo da se pridržavaju uobičajenih životnih navika i režima ishrane.

Dijetarna intervencija podrazumevala je svakodnevnu konzumaciju 200 mL Soka A (po savetu u dve doze, 2x100 mL) u trajanju od 4 nedelje. Ispitanici su imali zakazana dva dolaska (pre početka i po završetku perioda intervencije) kada im je uzimana krv i merene vrednosti krvnog pritiska. Arterijski krvni pritisak meren je ambulatorno, odnosno pomoću prenosivog uređaja koji je registrovao pritisak na svakih 15 minuta u toku 24 h. Praćenje je vršeno pre početka i nakon 4 nedelje redovne konzumacije soka, da bi se ustanovio eventualni uticaj intervencije na prosečne vrednosti krvnog pritiska kako u toku celog dana, tako i na prosečne vrednosti u budnom, odnosno stanju sna.

### 3.2. Antropometrijski parametri

Od antropometrijskih parametara merene se telesna masa, visina, indeks telesne mase (ITM), obim struka, % masnog tkiva, metodom impedance na profesionalnom analizatoru telesne konstitucije (Tanita SC331S). Indeks telesne mase izračunavan je na osnovu telesne mase i visine na osnovu formule  $ITM = \text{težina (kg)} / (\text{visina(m)})^2$ .

### 3.3. Uzorkovanje krvi

Kod sve tri grupe ispitanika i u svim studijskim dolascima krv je uzorkovana na tašte, nakon najmanje 12 h gladovanja, u ranim jutarnjim časovima (8-9 h). Krv je uzorkovana u epruветama bez antikoagulansa, odakle je izolovan serum, i epruветama sa etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom, iz kojih su izolovani eritrociti. Serum je nakon odvajanja koaguluma, odvojen centrifugiranjem na 2500 rpm 5 minuta. Biohemijske analize su urađene odmah po odvajanju seruma, a ostatak seruma je podeljen u zapremine od 500  $\mu\text{L}$  i zamrznut na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  za kasnije analize markera oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite.

Za izolovanje eritrocita najpre je odvojena plazma iz epruвета sa EDTA centrifugiranjem na 2500 rpm 5 minuta. Nakon toga eritrociti su isprani tri puta (tri centrifugiranja na 2500 rpm, 5 minuta) u fiziološkom rastvoru (0,9 % NaCl), potom podeljeni u zapremine od 500  $\mu\text{L}$  i zamrznuti na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  da bi dalje bili korišćeni za analize antioksidativnih enzima i profil masnih kiselina.

### 3.4. Sok ploda aronije i njegova karakterizacija

Interventne studije su podrazumevale svakodnevnu konzumaciju soka ploda aronije u trajanju od najmanje 4 nedelje pri čemu su korišćeni:

- Sok A: uzimale su ga Grupa I i Grupa III;
- Sok B: uzimala ga je Grupa II.

### 3.4.1. Sok A

U ispitivanjima delovanja soka ploda aronije na markere oksidativnog statusa i profil masnih kiselina u Grupi I i Grupi III korišćen je Sok A, matični sok od aronije, komercijalno dostupan, domaćeg proizvođača Conimex trade doo, Srbija. Sok A je dobijen hladnim ceđenjem zrelih plodova aronije, konzervisan isključivo pasterizacijom i pakovan bez dodatka aditiva, i po klasifikaciji važećeg nacionalnog Pravilnika o kvalitetu voća i proizvoda od voća spada u kategoriju matičnih sokova. Za potrebe studija korišćen je sok iz jedne šarže, odnosno dobijen iz homogene sirovine i samim tim ujednačenog hemijskog sastava.

Sok A je okarakterisan u pogledu sadržaja ukupnih polifenola (Tabela 2), kao i sadržaja antocijana, kao klase polifenola koja se smatra zaslužnom za biološke aktivnosti soka od aronije. Takođe je određen i sadržaj rastvorljive suve materije, kao i pH vrednost soka. U cilju utvrđivanja antiradikalske aktivnosti primenjen je DPPH test.

**Tabela 2.** Karakteristike Soka A

<b>Ispitivani parametar</b>	<b>Vrednost</b>
Ukupni fenoli (mg /100 mL)*	386 ± 9,7
Ukupni antocijani (mg /100 mL)**	25 ± 1,2
Neutralizacija DPPH radikala	
IC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,74 ± 0,04
Rastvorljiva suva materija (%)	10,94 ± 0,54
pH vrednost	3,35 ± 0,07

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri merenja.

\* Izraženo kao ekvivalenti galne kiseline (GAE).

\*\* Izraženo kao ekvivalenti cijanidin-3-glukozida (CGE).

### 3.4.2. Sok B

U ispitivanjima delovanja soka ploda aronije na markere oksidativnog statusa i profil masnih kiselina u Grupi II korišćen je Sok B, matični sok od aronije, komercijalno dostupan, domaćeg proizvođača Nutrika doo, Srbija (Tabela 3). Sok B je proizveden u skladu sa važećim pravilnicima o kvalitetu proizvoda od voća,

mehaničkom preradom (homogenizacijom i presovanjem) zdravih, tehnološki zrelih plodova aronije, konzervisan kratkotrajnom pasterizacijom u trajanju od nekoliko sekundi na 90 °C i filtriran u cilju dobijanja bistrog soka. Sok B je obogaćen dodatkom dijetarnih vlakana (Luralean<sup>®</sup>, Shimitzu, Japan), koji pripadaju grupi glukomanana i očišćeni su od svih enzima koji u drugim proizvodima ove vrste izazivaju izuzetnu nestabilnost proizvoda. Na ovaj način razvijen je proizvod koji je namenjen osobama sa povećanim ITM, kakvi su bili ispitanici Grupe II.

**Tabela 3.** Karakteristike Soka B

Ispitivani parametar	Vrednost
Ukupni fenoli (mg /100 mL)*	586,7 ± 3,3
Ukupni antocijani (mg /100 mL)**	15,3 ± 0,2
Neutralizacija DPPH radikala	
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	0,44 ± 0,03
Rastvorljiva suva materija (%)	13,70 ± 0,20
pH vrednost	3,10 ± 0,09

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri merenja.

\* Izraženo kao ekvivalenti galne kiseline (GAE).

\*\* Izraženo kao ekvivalenti cijanidin-3-glukozida (CGE).

### 3.4.3. Određivanje ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u Soku A i B određivan je spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom (98,99). Pre analiziranja sokovi su razblaženi destilovanom vodom i centrifugirani. 125 µL radnog rastvora sokova dodato je u 125 µL FC reagensu i 500 µL destilovane vode. Nakon 6 min dodato je 1,25 mL natrijum-karbonata (70 g/L). Nakon 90 min inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi izmerena je apsorbancija na 760 nm prema slepoj probi (125 µL destilovane vode umesto uzorka). U istim eksperimentalnim uslovima izmerena je apsorbancija reakcionih proizvoda serije razblaženja galne kiseline (0-600 µg/mL) i konstruisana je standardna kriva. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) po 100 mL soka i predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

### 3.4.4. Određivanje ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana određivan je primenom pH diferencijalne metode (100). Uzorci sokova su u odgovarajućim razblaženjima rastvoreni u puferu kalijum-hlorida (pH 1) i acetatnom puferu (pH 4,5). Razblaženja u puferu pH 1 su pravljena tako da apsorbance na 520 nm budu u opsegu 0,2-1,4. Ista razblaženja pravljena su i u puferu pH 4,5. Absorbancije dobijenih rastvora su merene na 520 nm i 700 nm.

Sadržaj ukupnih antocijana izražen je kao mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida (CGE) po 100 mL soka, a izračunat je po sledećoj formuli:

$$CGE = \frac{100 \times R \times A \times Mw}{\varepsilon \times b}$$

u kojoj je:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

R - razblaženje; Mw - relativna molekulska masa cijanidin-3-glukozida (449,2 g/mol);

$\varepsilon$  - molarni apsorpcioni koeficijent (26900 L/mol/cm); b - dužina optičkog puta (1cm).

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

### 3.4.5. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti

Antiradikalska aktivnost ispitivana je merenjem sposobnosti neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala primenom prethodno opisane metode uz manje modifikacije (101). Po 100  $\mu$ L uzoraka (odgovarajuća razblaženja Soka A i B) pomešano je sa 1400  $\mu$ L 80  $\mu$ M rastvora DPPH u metanolu. Apsorbancije su očitane na talasnoj dužini 517 nm nakon inkubacije od 20 min u mraku. Procenat neutralizacije DPPH radikala je izračunat po sledećoj formuli:

$$I(\%) = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100$$

u kojoj  $A_k$  predstavlja apsorbanciju negativne kontrole (umesto soka sipan je rastvarač), a  $A_a$  apsorbanciju analize, odnosno uzorka.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije soka. Koncentracije koje neutrališu 50% DPPH radikala ( $IC_{50}$ ) su zatim



određene korišćenjem algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

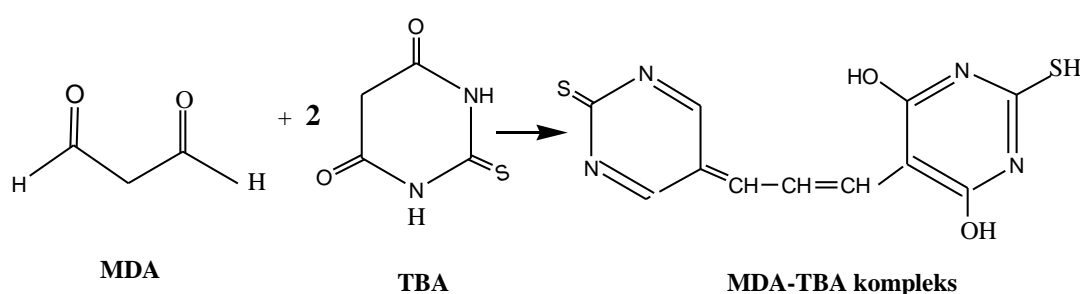
### 3.4.6. Ispitivanje rastvorljive suve materije i pH vrednosti

Rastvorljiva suva materija je određivana refraktometrijskom metodom na konstantnoj temperaturi, korišćenjem Abbe-ovog refraktometra (Carlo Erba, Italija), dok je pH vrednost merena pH-metrom (WTW, Nemačka) na sobnoj temperaturi. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

## 3.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa u serumu

### 3.5.1. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS)

Intenzitet lipidne peroksidacije predstavljen kao koncentracija tiobarbiturna kiselina (TBA) reagujućih supstanci (TBARS) određivan je spektrofotometrijskom metodom po Giroti i sar. (102). Metoda je zasnovana na reakciji malondialdehida (MDA) i ostalih TBARS sa TBA na visokoj temperaturi i u kiseloj sredini pri čemu nastaje hromogeni kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 535 nm. Princip ove metode se zasniva na sledećoj reakciji:



Preciznije, 300  $\mu$ L seruma pomešano je sa 600  $\mu$ L TBA reagensa (0,917 mmol/L trihlorsirćetna kiselina; 2,6 mol/L TBA, 0,25 mol/L HCl u destilovanoj vodi) i inkubirano u vodenom kupatilu na 100 °C. Nakon hlađenja i centrifugiranja (10 min, 10000 g, 4 °C), apsorbanacija je očitana na 535 nm prema slepoj probi pripremljenoj pod istim reakcionim uslovima (destilovana voda umesto uzorka seruma). Za izračunavanje

koncentracije korišćena je kalibraciona kriva konstruisana upotrebom standarda malondialdehid bis-dimetilacetala koncentracije od 1-10  $\mu\text{mol/L}$ .

### 3.5.2. Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

Izvođenje PAB testa omogućava simultano određivanje prooksidanasa i antioksidanasa u datom uzorku, a time i merenje postojeće ravnoteže između njih. Korišćena je metoda Alamdaria i saradnika (103) uz određene modifikacije, a zasnovana je na reakciji hromogena 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) sa vodonik-peroksidom i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) u isto vreme. Reakcija vodonik-peroksida i hromogena je enzimski katalizovana enzimom peroksidazom, pri čemu oksidovanjem TMB nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod. Sa druge strane, reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana hemijska reakcija u kojoj se TMB katjon redukuje do bezbojnog proizvoda.

Uzorak (10  $\mu\text{L}$  seruma), odnosno standardni rastvor i slepa proba (destilovana voda), pomešan je sa 180  $\mu\text{L}$  radnog rastvora i inkubiran 12 minuta na 37 °C, na tamnom mestu. Nakon inkubacije reakcija je prekinuta dodatkom 40  $\mu\text{L}$  2 mol/L hlorovodonične kiseline, pri čemu je dobijena plava boja prevedena u žutu. Apsorbancija je očitana odmah na 450 nm. Radni rastvor pripremljen je mešanjem 1 mL TMB katjona i 10 mL TMB rastvora 6 minuta na sobnoj temperaturi i tamnom mestu.

Za pripremu TMB katjona, 1 mL rastvora TMB/DMSO, TMB u dimetil-sulfoksidu (DMSO) koncentracije 6 mg/mL, je dodat u 50 mL acetatnog pufera (0,05 M; pH 4,5), nakon čega je dodato 175  $\mu\text{L}$  sveže pripremljenog hloramina T (100 mmol/L) i inkubirano 1 sat na 37 °C na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon inkubacije dodato je 25 U enzima peroksidaze.

TMB rastvor pripremljen je rastvaranjem 200  $\mu\text{L}$  TMB/DMSO u 10 mL acetatnog pufera (0,05 M; pH 5,6). Standardni rastvori su pripremljeni mešanjem različitih odnosa (0-100%) 1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa 6 mM mokraćnom kiselinom (rastvorenom u 10 mM NaOH). Vrednosti PAB-a su izražene u arbitrarnim jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat  $\text{H}_2\text{O}_2$  u standardnim rastvorima.

### 3.5.3. Određivanje ukupnog oksidativnog statusa (TOS)

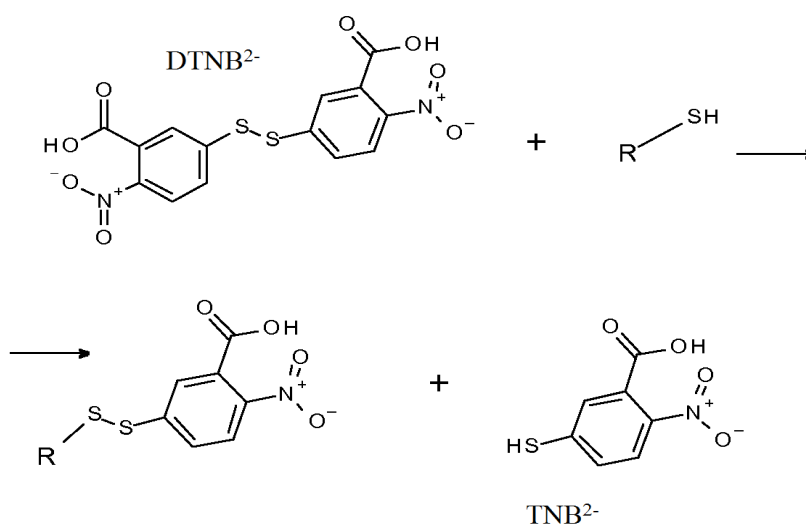
Sadržaj ukupnih oksidansa u serumu određivan je primenom metode koju je opisao Erel (104). Analiza je zasnovana na oksidaciji fero-jona u feri-jon, koji u reakciji sa ksilenol-oranžom u kiselj sredini gradi obojeni kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 560 nm. Kao standard korišćen je vodeni rastvor vodonik-peroksida opsega koncentracije 10-200  $\mu\text{mol/L}$ . Za izvođenje reakcije pripremljen je reagens TOS1 rastvaranjem 114 mg ksilenol-oranža i 8,18 g NaCl u 900 mL 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , uz dodatak 100 mL glicerola (pH vrednost TOS1 podešana je na 1,75) i TOS2, rastvaranjem 1,96 g feroamonijum-sulfata i 3,17 g o-dianizidin-dihidrohlorida u 1000 mL 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Reakcija se izvodi mešanjem 450  $\mu\text{L}$  TOS1 rastvora, 22  $\mu\text{L}$  rastvora TOS2 i 70  $\mu\text{L}$  seruma, standarda, odnosno destilovane vode, i merenjem apsorpcije nakon inkubacije od 3-4 min.

### 3.5.4. Određivanje ukupnog antioksidativnog statusa (TAS)

Za određivanje totalnog antioksidativnog statusa u serumu korišćena je metoda koju je formulisao Erel (105). Metoda je spektrofotometrijska i zasnovana na upotrebi stabilnog  $\text{ABTS}^+$  (2,2-azobis(3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat) ) katjona kao hromogena. Sam rastvor ABTS-a je bezbojan. Oksidacijom do  $\text{ABTS}^+$  katjona, pomoću vodonik-peroksida u kiselom medijumu (acetatni pufer 30 mM, pH 3,6) rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Kada se obojeni  $\text{ABTS}^+$  jon pomeša sa nekom supstancom koja može da se oksiduje (antioksidans), redukuje se do bezbojnog ABTS-a što se manifestuje obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Intenzitet obezbojavanja je srazmeran koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidansa u serumu, a apsorpcija je merena na talasnoj dužini od 660 nm. Kao standard korišćen je hidrosolubilni analog vitamina E, Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina), rastvoren u fosfatnom puferu (0,03 M, pH 7,4) u koncentraciji od 30 mmol/L. Za izvođenje analize pripremljeni su 0,4 M acetatni pufer pH 5,8 i rastvor ABTS-a, pripremljen rastvaranjem 0,549 g čvrstog ABTS-a u 100 mL prethodno pripremljenog rastvora koji čine 30 mL 30 mM acetatnog pufera pH 3,6 i 70 mL 2M rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.5.5. Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa

Ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa u serumu određivan je Ellman-ovom metodom (106), koja se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeve kiseline (DTNB) (Slika 8) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH 9), pri čemu se po jednom molu tiola stvara jedan mol p-nitrofenol anjona, koji se potom meri na talasnoj dužini od 412 nm.



**Slika 8.** Princip određivanja sulfhidrilnih grupa

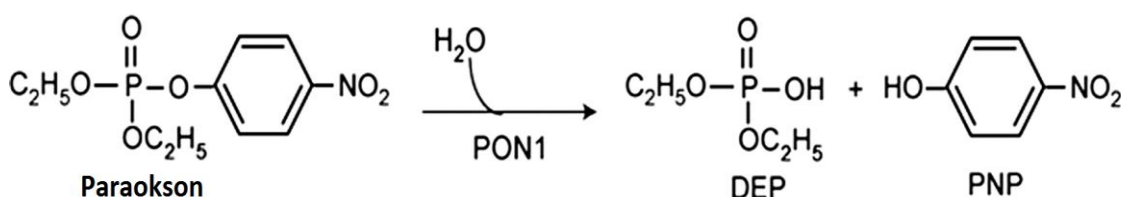
Za potrebe analize pripremljeni su rastvor DTNB reagensa koncentracije 10 mmol/L u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 i pufer pH 9 (0,2 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol/L EDTA). Vodeni rastvor redukovano glutationa (GSH) služio je kao standard (u koncentracionom opsegu od 0,1 mmol/L -1 mmol/L).

### 3.5.6. Određivanje aktivnosti enzima PON1

Aktivnost enzima PON1 određivana je prema dva različita nefiziološka supstrata: paraoksonu (paraoksonazna aktivnost) i diazoksonu (diazoksonazna aktivnost) primenom metode Richtera i Furlonga (107).

### 3.5.6.1. Određivanje paraoksonazne aktivnosti

Određivanje paraoksonazne aktivnosti zasniva se na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksona do p-nitrofenola (PNP) i dietilfosforne kiseline (DEP) (Slika 9). Brzina te promene se prati kinetički merenjem  $\Delta A/\text{min}$  na 405 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum za p-nitrofenol koji se u baznoj sredini nalazi u obliku p-nitrofenoksidnog anjona.



**Slika 9.** Razgradnja paraoksona pod dejstvom PON1

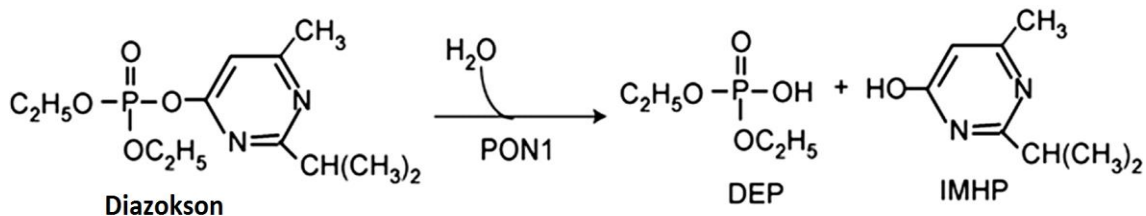
Za izvođenje analize pripremljen je radni pufer, koji je sadržao 2 mol/L NaCl, 0,1 mol/L Tris-HCl, pH 8,5 i 2 mM CaCl<sub>2</sub> i diluent pufer koji je sadržao 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 i 2mM CaCl<sub>2</sub> i koji je korišćen za razblaživanje seruma u odnosu 1:10. Paraokson supstrat je pripremljen rastvaranjem paraoksona u radnom puferu u koncentraciji od 1,2 mmol/L. Aktivnost enzima izračunata je na osnovu merenja  $\Delta A/\text{min}$  u reakciji između seruma i supstrata korišćenjem molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola na pH 8,5 koji je iznosio 18000 L/mol/cm. Jedinica enzimske aktivnosti definisana je kao broj mikromolova stvorenog p-nitrofenola u minutu.

### 3.5.6.2. Određivanje diazoksonazne aktivnosti

Određivanje diazoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat diazokson (diazinon-O-analog), pri čemu dolazi do konverzije diazoksona do 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidina (IMHP) i DEP (Slika 10). Brzina te promene se prati kinetički, merenjem  $\Delta A/\text{min}$  na 270 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum za IMHP (Slika 10).

Za izvođenje analize pripremljeni su radni i diluent puferi na isti način kao za određivanje paraoksonazne aktivnosti, s tim što je diazokson supstrat rastvoren u

koncentraciji 1 mmol/L, a serum razblažen u odnosu 1:20. Aktivnost je izražena u U/L, a izračunata je na osnovu  $\Delta A/\text{min}$  i molarnog apsorpcionog koeficijenta IMHP koji je na pH 8,5 iznosio 3000 L/mol/cm. Jedinica enzimske aktivnosti definisana je kao broj mikromolova stvorenog p-nitrofenola u minutu.



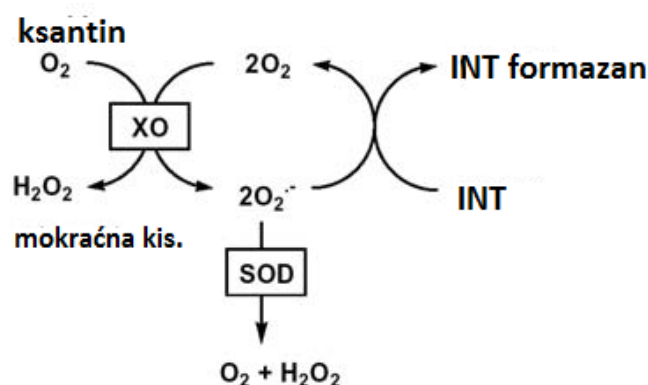
**Slika 10.** Princip određivanja diazoksonazne aktivnosti

### 3.6. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima

#### 3.6.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u eritrocitima merena je primenom komercijalno dostupnog testa (Randox-Ransod, kat. br. SD125). Određivanje SOD aktivnosti ovom metodom zasnovano je na merenju stepena inhibicije produkcije superoksid-anjona u sistemu ksantin/ksantin-oksida. Ksantin-oksida (eng. *xanthine oxidase*, XO) katalizuje stvaranje  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Slika 11) koji dalje reaguje sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (INT), usled čega nastaje crvena formazan boja sa apsorpcionim maksimumom na talasnoj dužini od 505 nm. Sa druge strane, SOD prisutna u uzorcima eritrocita katalizuje razlaganje  $\text{O}_2^{\bullet-}$  čime se smanjuje koncentracija nastalog formazan proizvoda, odnosno intenzitet nastale boje.

Nastanak obojenog jedinjenja praćen je kinetički, kontinuiranim merenjem apsorpcije 3 min na 505 nm i 37 °C da bi se odredila  $\Delta A/\text{min}$ , a aktivnost SOD određena je kao stepen inhibicije stvaranja ovog jedinjenja. Za izračunavanje je korišćena kalibraciona kriva zavisnosti % inhibicije od logaritmovane koncentracije (logC, U/mL) konstruisana na osnovu standardnih rastvora enzima poznate aktivnosti. Jedinica aktivnosti predstavlja vrednost koja daje 50 % inhibicije.



**Slika 11.** Princip određivanja aktivnosti SOD

Procenat inhibicije izračunat je po sledećoj formuli:

$$\% I = 100 - \frac{\frac{\Delta A_{St}}{\min}}{\frac{\Delta A_{So}}{\min}} \times 100$$

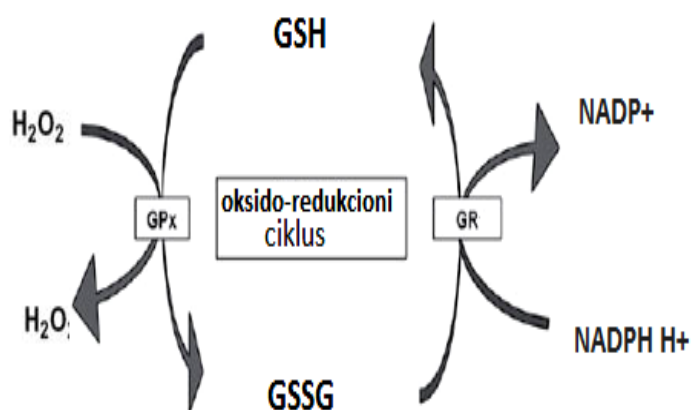
u kojoj St predstavlja različite koncentracije standarda, nastale razblaživanjem u diluent puferu (0,01 M fosfatni pufer, pH 7), dok je So sam diluent pufer, koji daje % inhibicije nula.

Uzorci, odnosno pakovani eritrociti su razblaženi u diluent puferu tako da procenat inhibicije iznosi između 30 i 60 %. Reakcija je izvođena mešanjem uzorka (odnosno standarda) i supstrata (ksantin), u koji je potom dodata ksantin-oksidaza i nakon 30 s apsorbancija je merena u odnosu na vazduh na 505 nm i 37 °C , nakon svakog minuta u ukupnom periodu od 3 min. Na osnovu standardne krive i izračunatog procenta inhibicije određena je aktivnost enzima izražena u U/mL. Krajnji rezultat izražen je na g hemoglobina kao U/gHb.

### 3.6.2. Određivanje aktivnosti glutathion-peroksidaze (GPx)

Aktivnost glutathion-peroksidaze (GPx) u eritrocitima merena je primenom komercijalno dostupnog testa (Randox-Ransel, kat. br. RS 505) koji se zasniva na metodi koju su dali Paglia i Valentine (108). Princip metode se zasniva na spregnutoj aktivnosti GPx, koja katalizuje oksidaciju glutathiona (GSH) u glutathion-disulfid (GSSG)

uz redukciju organskih hidroperoksida i glutation-reduktaze (GR), koja katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju NADPH kao koenzima (Slika 12). Na ovaj način se aktivnost GPx izračunava na osnovu kinetičkog praćenja pada apsorpcije NADPH na talasnoj dužini od 340 nm.



**Slika 12.** Princip određivanja aktivnosti GPx

U reakcionu smešu dodati su uzorak, organski kumen-hidroperoksid, NADPH i GR a aktivnost enzima GPx detektovana je spektrofotometrijski praćenjem oksidacije NADPH u NADP<sup>+</sup>, odnosno pada apsorpcije NADPH na 340 nm. Uzorak pakovanih eritrocita je najpre razblažen 20 puta, a potom pomešan sa Drabkinovim reagensom, tako da je konačno razblaženje bilo 41. U tako pripremljen uzorak dodat je radni reagens (koji je sadržao glutation, glutation-reduktazu, NADPH, fosfatni pufer i EDTA) i rastvor kumen-hidroperoksida. Nakon inkubacije od 1 min izmerena je inicijalna apsorpcija, i merena je dalje simultano na svakih 30 s u trajanju od 2 min, na 340 nm i 37 °C.

Aktivnost GPx izračunata je na osnovu izmerene  $\Delta A/\text{min}$ , umanjene za vrednost slepe probe, koja je umesto uzorka sadržala destilovanu vodu, uz upotrebu molarnog apsorpcionog koeficijenta NADPH, koji na 340 nm iznosi 6220 L/mol/cm. Jedinica enzimske aktivnosti GPx definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min), a aktivnost GSH-Px u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po gramu hemoglobina (U/gHb).



### 3.6.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze u eritrocitima merena je metodom koju je opisao Aebi (109) zasnovanoj na sposobnosti ovog enzima da razgrađuje vodonik-peroksid do vode i molekuskog kiseonika. Smanjenje koncentracije vodonik-peroksida praćeno je smanjenjem apsorbanije na 230 nm, pri čemu je jedna jedinica aktivnosti definisana kao aktivnost enzima potrebna za razgradnju 1  $\mu\text{mol}$  vodonik-peroksida za 60 s na 25°C.

Uzorak je pripremljen tako što je u 50  $\mu\text{L}$  hemolizata eritrocita (1:1) dodato 50  $\mu\text{L}$  etanola i 5 mL vode i inkubirano 10 min na 37 °C. 5-10  $\mu\text{L}$  tako pripremljenog uzorka sipano je direktno u kvarcnu kivetu, dodato je 50  $\mu\text{L}$  1 M Tris pufera pH 8 i 1 mL 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  u Tris puferu. Pad apsorancije praćen je 3 minuta i određena  $\Delta A/\text{min}$ , a aktivnost enzima izražena je po g hemoglobina i izračunata prema jednačini:

$$CAT = \frac{100 \times R \times dA}{Hb \times V \times 0,071}$$

gde je:  $dA$  - srednja vrednost promene apsorbanije u minutu,  $R$  - faktor razblaženja (101),  $Hb$  - količina hemoglobina u hemolizatu (g/100mL),  $V$  - zapremina uzorka u mL i 0,071 milimolarni apsorpcioni koeficijent vodonik-peroksida.

### 3.6.4. Određivanje koncentracije hemoglobina

Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima izražena je u jedinicama po g hemoglobina. Za određivanje koncentracije hemoglobina u uzorcima primenjena je kolorimetrijska cijanomethemoglobinska metoda sa Drabkinovim reagensom (110). Princip ove metode zasnovan je na oksidaciji hemoglobina u prisustvu alkalnog kalijum-fericijanida do methemoglobina, koji potom reaguje sa kalijum-cijanidom i formira cijanomethemoglobin sa apsorpcionim maksimumom na 540 nm. Za određivanje je korišćen komercijalno dostupan Drabkin reagens, koji sadrži kalijum-fericijanid i kalijum-cijanid. Postupak se sastojao u sledećem: 20  $\mu\text{L}$  pakovanih eritrocita je pomešano u epruveti sa 5 mL Drabkin reagensa, a apsorbanija je očitana nakon 3-5 min na 540 nm koristeći Drabkin reagens kao slepu probu.

Sadržaj hemoglobina u g/L određen je na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta prema sledećoj jednačini:

$$\text{Hemoglobin} = A \times \frac{16114 \times 5,02}{11000 \times 0,02}, \text{ odnosno:}$$

$$\text{Hemoglobin} = A \times 368$$

gde je: A - apsorbanca, 16114 g/mol - relativna molekulska masa hemoglobina, 11000 L/mol/cm - molarni apsorpcioni koeficijent, 5,02 mL – ukupna zapremina, 0,02 mL – zapremina pakovanih eritrocita.

### **3.7. Određivanje profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita**

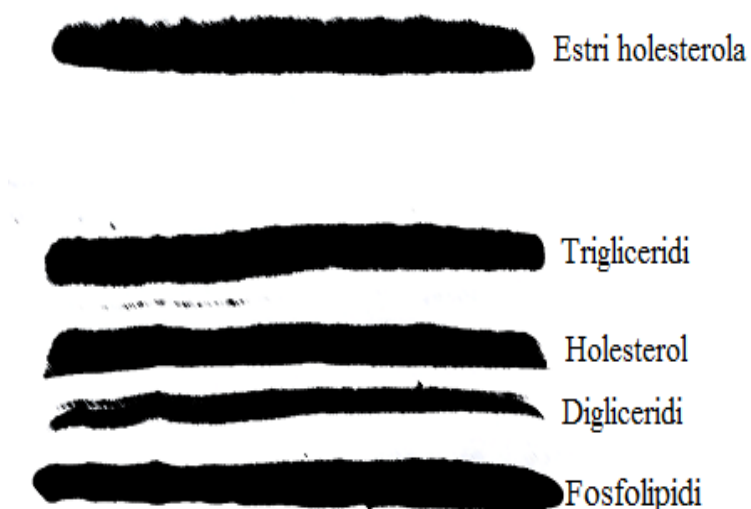
Za analizu profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita, najpre su ukupni lipidi ekstrahovani iz pakovanih eritrocita, a potom različite klase lipida razdvojene primenom tankoslojne hromatografije na silika-gelu. Na taj način odvojeni su fosfolipidi od ostalih lipidnih klasa, a relativni sadržaj masnih kiselina nakon metilacije određen je na gasnom hromatografu.

#### **3.7.1. Ekstrakcija ukupnih lipida eritrocita**

Za ekstrakciju ukupnih lipida iz eritrocita primenjena je metoda koju su opisali Rose i Oklander (111) uz korišćenje hloroforma i izopropanola kao rastvarača. 500  $\mu$ L pakovanih eritrocita prebačeno je u staklene epruvete i pomešano sa istom zapreminom destilovane vode. Nakon stajanja od 15 min u smešu je dodavan izopropanol u 4 porcije u toku sat vremena uz mešanje na vorteksu tako da je ukupna zapremina dodatog rastvarača bila 11 puta veća od početne zapremine eritrocita (odnosno iznosila je 5,5 mL). Nakon toga dodata je 7 puta veća zapremina hloroforma od početne zapremine pakovanih eritrocita, odnosno 3,5 mL hloroforma (koji je sadržao 5 mg/100 mL butilhidroksitoluena, BHT). Sadržaj je ostavljen sat vremena uz povremeno mešanje na vorteksu da bi se lipidi ekstrahovali. Konačno, sadržaj je profiltriran i dobijeni lipidni ekstrakti upareni do suva na vakuum uparivaču.

### 3.7.2. Razdvajanje lipidnih klasa TLC hromatografijom

Fosfolipidi eritrocita izolovani su jednodimenzionalnom tankoslojnom hromatografijom (TLC) na silika gelu GF<sub>254</sub> debljine 0,5 mm. Totalni lipidni ekstrakt dobijen iz 0,5 mL eritrocita nanesen je na ploču u vidu linije dužine oko 3 cm, na visini 2 cm od donje ivice ploče, koja je prethodno aktivirana na 110 °C u toku sat vremena. Kao sistem za razdvajanje korišćena je smeša petroletar-dietiletar-sirćetna kiselina (87:12:1 v/v/v). Razdvojene frakcije lipida identifikuju se pod UV lampom (Slika 13).



Slika 13. TLC hromatogram izolovanih lipida

### 3.7.3. Metilovanje masnih kiselina

Masne kiseline su esterifikovane po modifikovanoj metodi transesterifikacije Christopherson i Glass-a (112).

Frakcija fosfolipida izdvojena na TLC ekstrahovana je sa odgovarajućeg sloja silika gela sa 1,5 mL n-heksana. Posle mešanje na vorteksu, dodato je 0,2 mL 2 mol/L NaOH u metanolu. Epruvete su inkubirane u termostatu na 85 °C u toku jednog sata. Nakon toga, u hidrolizat je dodato 0,2 mL 1mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u metanolu i epruvete su termostatirane na 85 °C dva sata. Nakon hlađenja smeša je centrifugirana na 3000 obrtaja/min 10 minuta nakon čega je heksanski sloj uparen do suva u struji azota.

### 3.7.4. Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom

Masne kiseline fosfolipida su analizirane gasno-tečnom hromatografijom na gasnom hromatografu Shimadzu GC 2014 sa plamenojonizacionim detektorom na Rtx 2330 koloni (dimenzija 60 m x 0,25 mmID, debljina 0,2  $\mu\text{m}$ , Restek, Bellefonte, PA). Protok nosećeg gasa (helijuma) iznosio je 5 mL/min, protok vazduha 320 mL/min, a vodonika 30 mL/min. Temperatura detektora je podešena na 260 °C, a injektora na 220 °C. Adekvatno razdvajanje postignuto je nakon 50 minuta, pri čemu je inicijalna temperatura kolone od 140 °C održavana 5 min, a potom podignuta do 220 °C brzinom 3 °C/min i održavana na finalnoj temperaturi 20 minuta. Identifikacija metil-estara masnih kiselina izvedena je poređenjem sa hromatogramom standarda masnih kiselina.

Sadržaji pojedinačnih masnih kiselina, uključujući masne kiseline od C16:0 do C22:6n-3, izraženi su u procentima od ukupno detektovanih masnih kiselina na osnovu površine njihovih pikova. Na osnovu sadržaja pojedinačnih masnih kiselina određen je sadržaj ukupnih zasićenih masnih kiselina (eng. *saturated fatty acids*, SFA) kao zbir relativnih sadržaja palmitinske (C16:0) i stearinske (C18:0) masne kiseline, dok je sadržaj ukupnih mononezasićenih masnih kiselina (eng. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) izračunat kao zbir relativnih sadržaja palmitoleinske (C16:1n-7), oleinske (C18:1n-9) i vakcenske masne kiseline (C18:1n-7).

Zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) predstavljena je sadržajem ukupnih PUFA, odnosno zbirom pojedinačnih sadržaja C18:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, C20:5n-3, C22:5n-3 i C22:6n-3, kao i sadržajem n-3, odnosno n-6 PUFA, koji se odnosio na zastupljenost PUFA u zavisnosti od položaja nezasićene veze. Takođe, određivan je i indeks nezasićenosti (eng. *unsaturation index*), definisan kao stepen nezasićenosti masnih kiselina, a izračunat kao prosečan sadržaj nezasićenih veza po masnoj kiselini (113).

### 3.8. Statistička obrada podataka

Kod Grupe I, za analizu normalno distribuiranih podataka primenjena je analiza varijanse (ANOVA) za ponovljena merenja sa Bonferoni post hoc testom, a podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Za parametre koji nisu sledili normalnu distribuciju, logaritamska transformacija je primenjena pre poređenja i podaci su predstavljeni kao geometrijska sredina sa 95% intervalom pouzdanosti. Fridmanova ANOVA (eng. *Friedman ANOVA*) je primenjena ukoliko podaci nisu sledili normalnu raspodelu i nakon logaritamskih transformacija. U tom slučaju, za prikaz je korišćena medijana i interval: 5-ti - 95-ti percentil.

Kod Grupe II i Grupe III, podaci koji su sledili normalnu raspodelu analizirani su Student t-testom za razliku parova i prikazani su kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Kada nisu sledili normalnu distribuciju, podaci su analizirani nakon logaritamske transformacije i prikazani kao geometrijska sredina sa 95% intervalom pouzdanosti. Vilkoksonov test označenih rangova primenjen je u slučaju odstupanja od normalne distribucija i nakon logaritamske transformacije. U tom slučaju, podaci su prikazani kao medijana i interval: 5-ti - 95-ti percentil.

Šapiro-Vilk test je korišćen za ispitivanje normalne distribucije podataka.

Pirsonov koeficijent korelacije je korišćen za utvrđivanje povezanosti između aktivnosti antioksidativnih enzima i profila masnih kiselina u eritrocitima.

Minimalan uslov za postojanje statističke značajnosti definisan je p vrednošću (nivoom značajnosti) manjom ili jednakom 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Uticaj konzumacije Soka A na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I

#### 4.1.1. Osnovne karakteristike i biohemijski parametri ispitanika u Grupi I

**Tabela 4.** Osnovne karakteristike i biohemijski parametri ispitanika u Grupi I na početku studije i posle 12 nedelja konzumacije Soka A

	<b>Bazalni status</b>	<b>12 nedelja</b>	<b>P vrednost</b>
Broj ispitanika	29		
Starost	35,1 ± 7,8		
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	22,8 ± 4,0	22,9 ± 4,1	0,303
Sistolni krvni pritisak (mmHg)	119,0 ± 10,6	116,4 ± 16,1	0,344
Dijastolni krvni pritisak (mmHg)	72,6 ± 8,4	71,6 ± 9,6	0,694
Holesterol (mmol/L)	5,08 ± 1,16	5,03 ± 1,04	0,566
HDL holesterol (mmol/L)	1,52 ± 0,30	1,52 ± 0,31	0,990
LDL holesterol (mmol/L)	3,15 ± 1,05	3,13 ± 0,92	0,821
Trigliceridi (mmol/L)	0,90 ± 0,39	0,81 ± 0,37	0,121
Glukoza (mmol/L)	4,44 ± 0,44	4,42 ± 0,48	0,573
Urea (mmol/L)	3,8 ± 0,81	4,14 ± 1,16	0,231
Kreatinin (μmol/L)	62,31 ± 4,61	65,51 ± 4,31	<0,05
Mokraćna kiselina (μmol/L)	192,24 ± 35,54	205,45 ± 47,42	0,079
ALT (U/L)	17,79 ± 9,44	16,96 ± 8,04	0,664
AST (U/L)	19,90 ± 4,38	19,17 ± 5,47	0,479
Gvožđe (μmol/L)	18,64 ± 8,46	15,82 ± 7,77	0,111

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

Osnovne karakteristike ispitanika u Grupi I zajedno sa vrednostima osnovnih biohemijskih parametara u početnoj i završnoj tački prikazane su u Tabeli 4.

Konsumacija soka od aronije u trajanju od 12 nedelja nije uticala na biohemijske parametre, odnosno njihove vrednosti nisu se statistički značajno promenile. Ovo je i bilo očekivano s obzirom da se radilo o zdravim ispitanicima kod kojih su pre početka intervencije, kao i po završetku biohemijski pokazatelji bili u referentnom intervalima.

#### 4.1.2. Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi I

Uticaj konzumacije Soka A u Grupi I na parametre oksidativnog stresa, odnosno pokazatelje oksidativnog oštećenja i antioksidativnog statusa u serumu, praćen je nakon 6 i 12 nedelja od početka intervencije, a rezultati su prikazani u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi I na početku studije, posle 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A

	<b>Bazalni status</b>	<b>6 nedelja</b>	<b>12 nedelja</b>	<b>P vrednost</b>
TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ )*	0,90 $\pm$ 0,17	0,32 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	<0,0001
PAB (HKU)*	120,78 $\pm$ 13,31	109,16 $\pm$ 16,35 <sup>a</sup>	110,98 $\pm$ 20,54	<0,01
TOS ( $\mu\text{mol/L}$ **)	9,7 (8,59-18,14)	8,3 (5,39-12,46) <sup>a</sup>	9,8 (7,19-14,94) <sup>b</sup>	<0,0001
TAS (mmol/L)**)	0,81 (0,62-0,94)	0,83 (0,63-0,91)	0,74 (0,62-0,88) <sup>a,b</sup>	<0,05
SH grupe (mmol/L)**)	0,64 (0,53-0,68)	0,53 (0,47-0,81) <sup>a</sup>	0,54 (0,42-0,85)	<0,01
Diazoksonazna aktivnost (U/L)*	2385,07 $\pm$ 601,63	2368,4 $\pm$ 604,37	2801,96 $\pm$ 739,10 <sup>a,b</sup>	<0,01
Paraoksonazna aktivnost (U/L)**)	174 (111,3-1031,4)	160 (84,75-821,65) <sup>a</sup>	166 (101,8-878,05) <sup>b</sup>	<0,0001

\* Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

\*\* Podaci su prikazani kao medijana (5-ti - 95-ti percentil).

<sup>a</sup> Statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti pre početka intervencije (bazalni status).

<sup>b</sup> Statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti nakon 6 nedelja konzumacije soka.

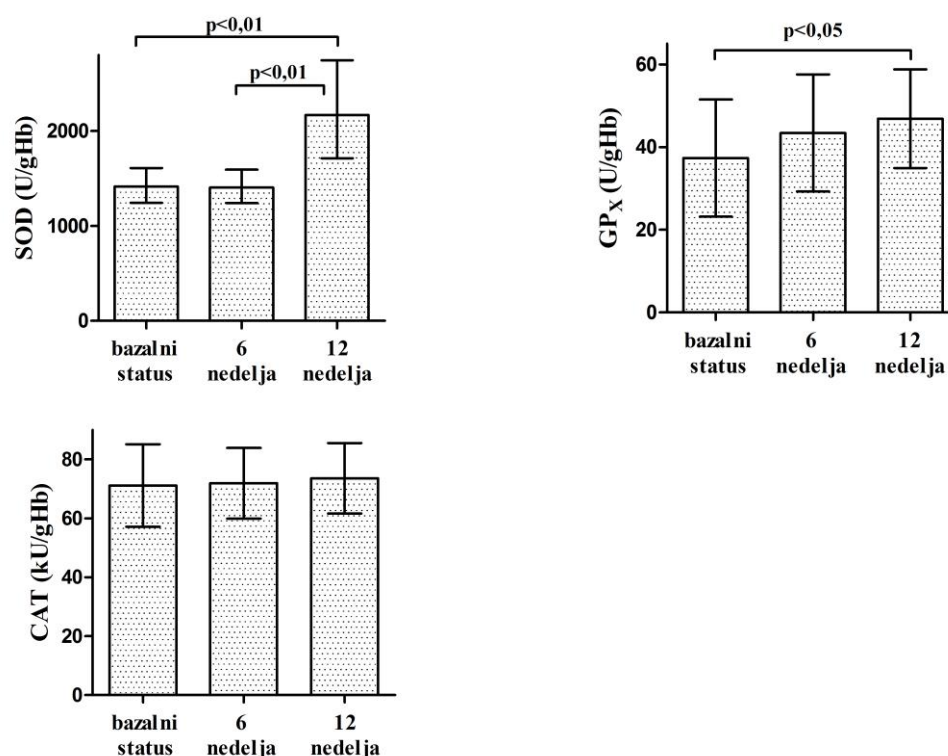
Kao što je prikazano, zabeleženo je statistički značajno smanjenje ( $p < 0,0001$ ) TBARS kao indeksa lipidne peroksidacije nakon 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A u odnosu na bazalni status. Takođe, intervencija je rezultovala i smanjenjem PAB, pri čemu je ovo smanjenje bilo statistički značajno nakon 6 nedelja ( $p < 0,01$ ) od početka konzumacije. Vrednost PAB na kraju interventnog perioda bila je niža u odnosu na bazalni status, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Ukupni oksidativni status (TOS) je isto tako smanjen nakon 6 nedelja, što je bilo statistički značajno ( $p < 0,0001$ ). Vrednost TOS je porasla do kraja intervencije, statistički značajno u odnosu na vrednost nakon 6 nedelja ( $p < 0,01$ ). Ipak, vrednost TOS nakon 12 nedelja konzumacije Soka A nije se razlikovala u odnosu na bazalni status.

Među praćenim činiocima antioksidativne zaštite, zabeleženo je smanjenje sadržaja SH grupa, koje je bilo značajno ( $p < 0,01$ ) nakon 6 nedelja. Ovo je bilo praćeno smanjenjem ukupnog antioksidativnog statusa, odnosno vrednost TAS na kraju interventnog perioda bila je statistički značajno niža u odnosu na vrednost nakon 6 nedelja svakodnevnice konzumacije Soka A, kao i u odnosu na bazalni status ( $p < 0,01$ ). Sa druge strane, porast diazoksonazne aktivnosti, odnosno PON1 aktivnosti prema diazoksonu kao supstratu, uočen je na kraju interventnog perioda. Tačnije, aktivnost izmerena nakon 12 nedelja konzumacije soka bila je statistički značajno veća u odnosu na bazalnu aktivnost, kao i aktivnost izmerenu na sredini interventnog perioda ( $p < 0,01$ ). Aktivnost PON1 prema paraoksonu, bila je nepromenjena na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalni status. Ipak, paraoksonazna aktivnost bila je statistički značajno niža nakon 6 nedelja konzumacije Soka A u odnosu na početnu vrednost ( $p < 0,0001$ ), da bi se do kraja intervencije vratila na nivo koji nije bio statistički značajno različit od bazalne aktivnosti.

### **4.1.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi I**

Uticaj konzumacije Soka A na antioksidativni status praćen je i merenjem aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi I. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 6 i graficima na Slici 14.





**Slika 14.** Grafički prikaz aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi I na početku studije, posle 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A. Za Gpx i CAT podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD; za SOD podaci su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.

Tokom interventnog perioda zabeležena je stimulacija aktivnosti antioksidativnih enzima eritrocita, koja je rezultovala statistički značajno većom aktivnošću SOD na kraju studije u odnosu na početak intervencije ( $p < 0,01$ ), ali i u odnosu na aktivnost nakon 6 nedelja konzumacije Soka A ( $p < 0,01$ ). Zabeležen je porast aktivnosti enzima GPx koji je bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ). Tačnije, aktivnost GPx posle 12 nedelja redovne konzumacije Soka A bila je značajno viša u odnosu na aktivnost pre početka intervencije. U slučaju aktivnosti katalaze, nisu zabeležene statistički značajne promene ( $p = 0,594$ ).

**Tabela 6.** Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi I na početku studije, posle 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A

	<b>Bazalni status</b>	<b>6 nedelja</b>	<b>12 nedelja</b>	<b>P vrednost</b>
SOD (U/gHb)**	1414,85 (1243,50-1609,19)	1405,30 (1239,66-1593,09)	2168,12 (1712,56-2744,87) <sup>a,b</sup>	<0,01
GPx (U/gHb)*	37,35 ± 14,19	43,40 ± 14,14	46,87 ± 11,90 <sup>a</sup>	<0,05
CAT (kU/gHb)*	71,15 ± 14,02	71,89 ± 12,03	73,58 ± 11,97	0,594

\* Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

\*\* Podaci su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.

<sup>a</sup> Statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti pre početka intervencije (bazalni status).

<sup>b</sup> Statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti nakon 6 nedelja konzumacije soka.

#### 4.1.4. Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I

Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I određivan je pre početka intervencije (bazalni status) kao i nakon 6, odnosno 12 nedelja redovne konzumacije Soka A. Rezultati su prikazani u Tabeli 7.

U slučaju zastupljenosti ukupnih PUFA (Slika 15), čiji je relativni sadržaj praćen kao pokazatelj nivoa oksidativnog oštećenja lipida, zabeležen je porast, koji je bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ) nakon 12 nedelja svakodnevne konzumacije soka. U skladu sa ovim, indeks nezasićenosti, koji predstavlja prosečni sadržaj nezasićenih veza, bio je značajno viši ( $p < 0,05$ ) na kraju interventnog perioda u odnosu na vrednost pre početka konzumacije soka.

Statistički značajno smanjenje ( $p < 0,01$ ) zabeleženo je u sadržaju oleinske kiseline (C18:1n-9), što je praćeno smanjenjem i ukupnih mononezasićenih masnih kiselina (MUFA). Takođe, značajno je smanjen i odnos n-6/n-3 masnih kiselina ( $p < 0,001$ ). Ovakav rezultat proistekao je i iz statistički značajnog porasta sadržaja ukupnih n-3 masnih kiselina ( $p < 0,01$ ), odnosno sadržaja najzastupljenije pojedinačne n-3 masne kiseline, C22:6n-3 ( $p < 0,01$ ). Ove promene bile su statistički značajne kako na kraju interventnog perioda, tako i nakon 6 nedelja konzumacije Soka A, u odnosu na bazalni status. Sadržaj ukupnih, kao i pojedinačnih n-6 masnih kiselina nije se statistički

značajno menjao, osim u slučaju C18:2n-6, čiji je sadržaj značajno porastao na kraju intervencije u odnosu na sadržaj zabeležen nakon 6 nedelja ( $p < 0,01$ ).

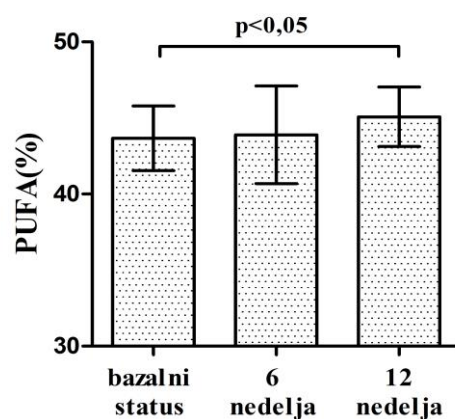
**Tabela 7.** Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I na početku studije, posle 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A

MK (%)	Bazalni status	6 nedelja	12 nedelja	P vrednost
SFA	40,75 ± 2,43	41,42 ± 2,88	40,17 ± 1,93	0,147
16:0	21,49 ± 1,49	20,87 ± 1,59	20,92 ± 1,38	0,264
18:0	19,26 ± 1,80	20,55 ± 2,00 <sup>a</sup>	19,25 ± 1,43	<0,01
MUFA	15,58 ± 1,29	14,68 ± 1,07 <sup>a</sup>	14,75 ± 1,49 <sup>a</sup>	<0,01
16:1n-7	0,25 ± 0,05	0,29 ± 0,09	0,25 ± 0,06	0,06
18:1n-9	13,99 ± 1,37	12,91 ± 1,07 <sup>a</sup>	13,13 ± 1,53 <sup>a</sup>	<0,01
18:1n-7	1,33 ± 0,28	1,46 ± 0,19	1,36 ± 0,25	0,096
n-6 PUFA	38,08 ± 2,17	37,50 ± 3,10	38,79 ± 1,91	0,061
18:2n-6	13,99 ± 1,36	13,44 ± 1,23	14,24 ± 1,08 <sup>b</sup>	<0,01
20:3n-6	2,04 ± 0,51	1,92 ± 0,49	2,09 ± 0,62	0,295
20:4n-6	17,80 ± 1,35	17,64 ± 1,69	18,26 ± 1,38	0,225
22:4n-6	4,23 ± 0,74	4,49 ± 0,86	4,19 ± 0,88	0,135
n-3 PUFA	5,59 ± 1,15	6,40 ± 1,34 <sup>a</sup>	6,30 ± 1,12 <sup>a</sup>	<0,01
20:5n-3	0,28 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,124
22:5n-3	1,50 ± 0,22	1,69 ± 0,46	1,58 ± 0,24	0,064
22:6n-3	3,81 ± 0,89	4,37 ± 1,04 <sup>a</sup>	4,39 ± 0,94 <sup>a</sup>	<0,01
PUFA	43,67 ± 2,13	43,90 ± 3,22	45,08 ± 1,96 <sup>a</sup>	<0,05
n-6/n-3	7,04 ± 1,78	6,15 ± 1,59 <sup>a</sup>	6,39 ± 1,41 <sup>a</sup>	<0,001
Indeks nezasićenosti	170,18 ± 8,01	172,23 ± 12,05	174,94 ± 7,98 <sup>a</sup>	<0,05

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. MK - masne kiseline

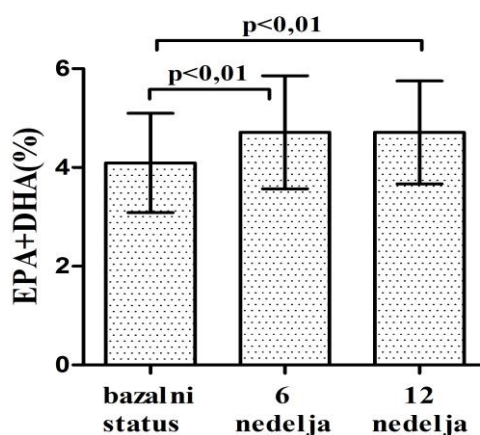
<sup>a</sup> Statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti pre početka intervencije (bazalni status).

<sup>b</sup> Statistički značajna razlika u odnosu na vrednosti nakon 6 nedelja konzumacije soka.



**Slika 15.** Relativni sadržaj PUFA u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I na početku studije, posle 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

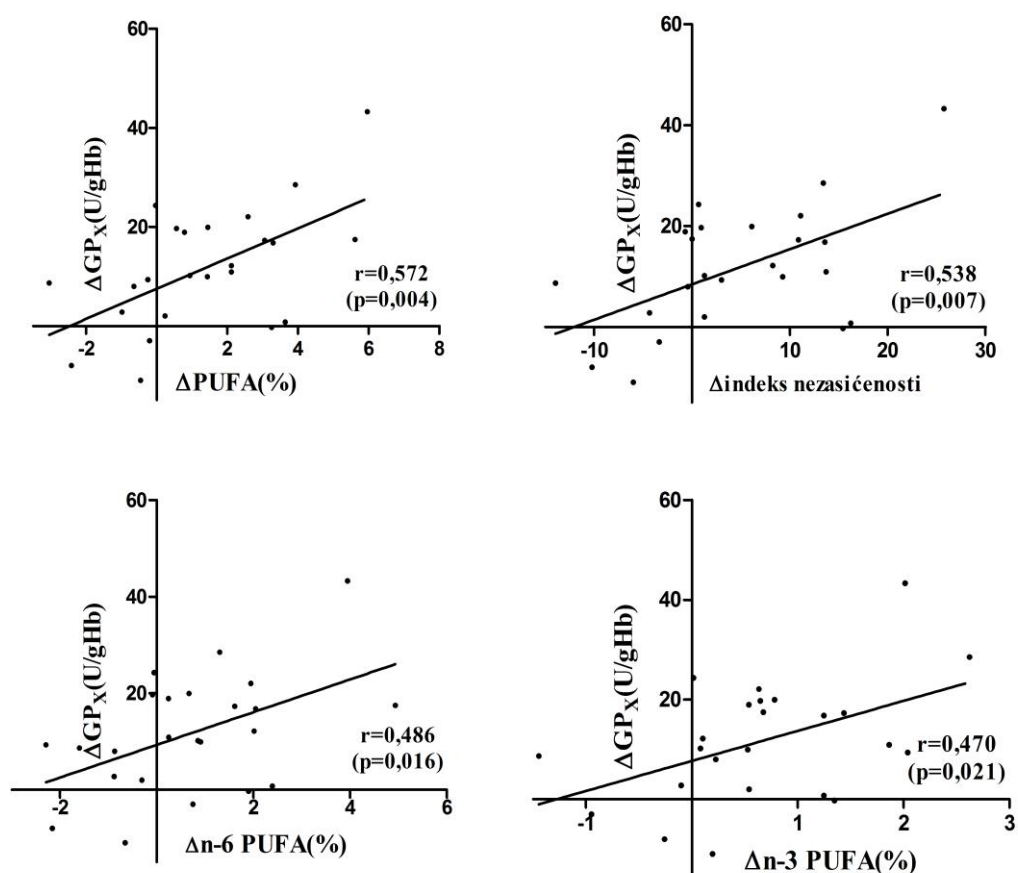
Pojedini autori predlažu sumu relativnih sadržaja EPA i DHA u eritrocitima kao potencijalni marker i prediktor nastanka koronarne bolesti, zasnovano na činjenici da membrana eritrocita reflektuje sadržaj n-3 masnih kiselina u membranama kardiocita. Stoga je praćen uticaj konzumacije Soka A i na ovaj parametar, koji se naziva omega-3 indeks. Kao rezultat uočen je statistički značajan porast i to nakon 6 ( $p < 0,01$ ), kao i nakon 12 nedelja ( $p < 0,01$ ) redovne konzumacije Soka A (Slika 16). Vrednosti pre početka konzumacije soka, nakon 6 nedelja i nakon 12 nedelja svakodnevne konzumacije soka su iznosile redom:  $4,09 \pm 1,00$  %;  $4,71 \pm 1,14$  %;  $4,71 \pm 1,04$  %.



**Slika 16.** Omega-3 indeks ispitanika u Grupi I na početku studije, posle 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

#### 4.1.5. Korelacije aktivnosti antioksidativnih enzima i profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I

Imajući u vidu uočeni efekat konzumacije soka od aronije na aktivnost antioksidativnih enzima sa jedne strane i relativni sadržaj masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita, ispitivana je povezanost između ovih parametara (Slika17).



**Slika 17.** Korelacije aktivnosti GPx i relativnog sadržaja PUFA, indeksa nezasićenosti, n-6 PUFA, n-3 PUFA kod ispitanika u Grupi I;  $\Delta$ - razlika između bazalnih vrednosti i vrednosti nakon 12 nedelja konzumacije Soka A, r-Pirsonov korelacioni koeficijent.

Rezultati ovih analiza pokazali su značajnu korelaciju između efekta na aktivnost glutation-peroksidaze i sadržaja određenih masnih kiselina. Preciznije, korelacija je zabeležena između promena u aktivnosti enzima koje su definisane kao

razlike između aktivnosti nakon 12 nedelja konzumacije Soka A i aktivnosti pre početka intervencije, sa jedne strane i promena u statusu pojedinih masnih kiselina sa druge. Pozitivne korelacije, koje su bile statistički značajne dobijene su za promenu u sadržaju ukupnih PUFA ( $p=0,004$ ), n-3 PUFA ( $p=0,021$ ), n-6 PUFA ( $p=0,016$ ), kao i za promenu u indeksu nezasićenosti ( $p=0,007$ ). U slučaju efekta na aktivnost superoksid-dismutaze i katalaze, nisu dobijene statistički značajne korelacije.

### **4.2. Uticaj konzumacije Soka B na markere oksidativnog stresa i u Grupi II**

Uticaj konzumacije Soka B na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina ispitivan je kod osoba ženskog pola sa abdominalnom gojaznošću kao glavnim faktorom rizika za nastanak KVB. Studija je dizajnirana tako da je podrazumevala svakodnevnu konzumaciju 100 mL Soka B u trajanju od 4 nedelje. Analizirani parametri obuhvatali su markere oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu i eritrocitima i profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita.

#### **4.2.1. Osnovne karakteristike, biohemijski i antropometrijski parametri ispitanika u Grupi II**

Osnovne karakteristike ispitanika, uključujući biohemijske parametre, pre početka i na kraju interventnog perioda predstavljene su u Tabeli 8.

Efekti svakodnevne konzumacije Soka B na vrednosti biohemijskih parametara ukazali su na tendenciju smanjenja vrednosti holesterola, kako ukupnog tako i LDL i HDL holesterola, a vrednost je bila statistički značajno niža na kraju interventnog perioda samo za HDL holesterol ( $p<0,05$ ). Takođe, zabeleženo je statistički značajno sniženje sistolnog krvnog pritiska ( $p=0,05$ ).

**Tabela 8.** Osnovne karakteristike i biohemijski parametri ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B

	<b>Bazalni status</b>	<b>4 nedelje</b>	<b>P vrednost</b>
Broj ispitanika	20		
Starost	53,0 ± 5,4		
Telesna masa (kg)	96,1 ± 12,3	93,9 ± 10,7	0,075
Sistolni krvni pritisak (mmHg)	125,6 ± 16,5	119,3 ± 15,0	0,05
Dijastolni krvni pritisak (mmHg)	82,6 ± 10,0	79,2 ± 9,0	0,225
Holesterol (mmol/L)	6,28 ± 1,41	5,92 ± 1,06	0,164
HDL holesterol (mmol/L)	1,26 ± 0,32	1,18 ± 0,33	<0,05
LDL holesterol (mmol/L)	4,05 ± 1,32	3,80 ± 1,0	0,164
Trigliceridi (mmol/L)	2,05 ± 0,89	2,05 ± 1,23	0,717
Glukoza (mmol/L)	6,45 ± 2,01	6,0 ± 1,38	0,137
Urea (mmol/L)	5,10 ± 1,65	4,45 ± 1,00	0,085
Kreatinin (μmol/L)	62,50 ± 13,33	65,35 ± 14,20	0,224
Mokraćna kiselina (μmol/L)	321,05 ± 61,96	369,50 ± 79,01	<0,05
ALT (U/L)	24,00 ± 6,13	26,79 ± 9,23	0,197
AST (U/L)	24,47 ± 11,92	23,47 ± 5,93	0,686
Gvožđe (μmol/L)	15,75 ± 5,27	14,90 ± 5,52	0,567

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

Kod ispitanika Grupe II, praćen je efekat konzumacije soka B na antropometrijske parametre (Tabela 9). Redovna konzumacija soka B u trajanju od 4 nedelje rezultovala je u statistički značajnom smanjenju obima struka ( $p < 0,0001$ ) i ITM ( $p < 0,0001$ ). Smanjenje telesne mase praćeno je i smanjenjem mase masti ( $p < 0,01$ ), iako % masti nije statistički značajno smanjen. Sa druge strane, došlo je do značajnog smanjenja procenta vode u organizmu ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 9.** Antropometrijski parametri ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B

	<b>Bazalni status</b>	<b>4 nedelje</b>	<b>P vrednost</b>
Telesna masa (kg)	96,1 ± 12,3	93,9 ± 10,7	0,075
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	36,1 ± 4,4	35,0 ± 4,0	<0,0001
Obim struka (cm)	104,8 ± 10,1	100,6 ± 9,2	<0,0001
% Masti	44,4 ± 3,6	44,3 ± 3,4	0,848
Masa masti (kg)	43,1 ± 7,9	41,6 ± 7,5	<0,01
% Vode	39,0 ± 4,3	37,8 ± 3,3	<0,01

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

#### 4.2.2. Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi II

Uticaj redovne konzumacije Soka B na markere oksidativnog stresa, odnosno pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne odbrane u serumu ispitanika u Grupi II prikazan je u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B

	<b>Bazalni status</b>	<b>4 nedelje</b>	<b>P vrednost</b>
TBARS (μmol/L)**	0,33 (0,03-1,60)	0,25 ( 0,03-0,55)	0,088
PAB (HKU)*	158,72 ± 11,24	150,16 ± 11,27	<0,01
TOS (μmol/L)**	14,59 (10,43-81,72)	24,88 (10,91-64,91)	0,156
TAS (mmol/L)*	1,02 ± 0,11	1,07 ± 0,10	<0,05
SH grupe (mmol/L)*	0,597 ± 0,128	0,598 ± 0,151	0,957
Poazoksonazna aktivnost (U/L)**	192 (91,45-882,15)	139 (88,90-681,80)	0,136

\* Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

\*\* Podaci su prikazani kao medijana (5-ti - 95-ti percentil).



Iz tabele se vidi da je nakon interventnog perioda u trajanju od 4 nedelje, uočeno značajno smanjenje vrednosti PAB ( $p < 0,01$ ), kao i značajno povećanje TAS ( $p < 0,05$ ). Ostali serumski pokazatelji oksidativnog oštećenja, odnosno antioksidativne zaštite nisu se značajno razlikovali na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalni status.

#### 4.2.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi II

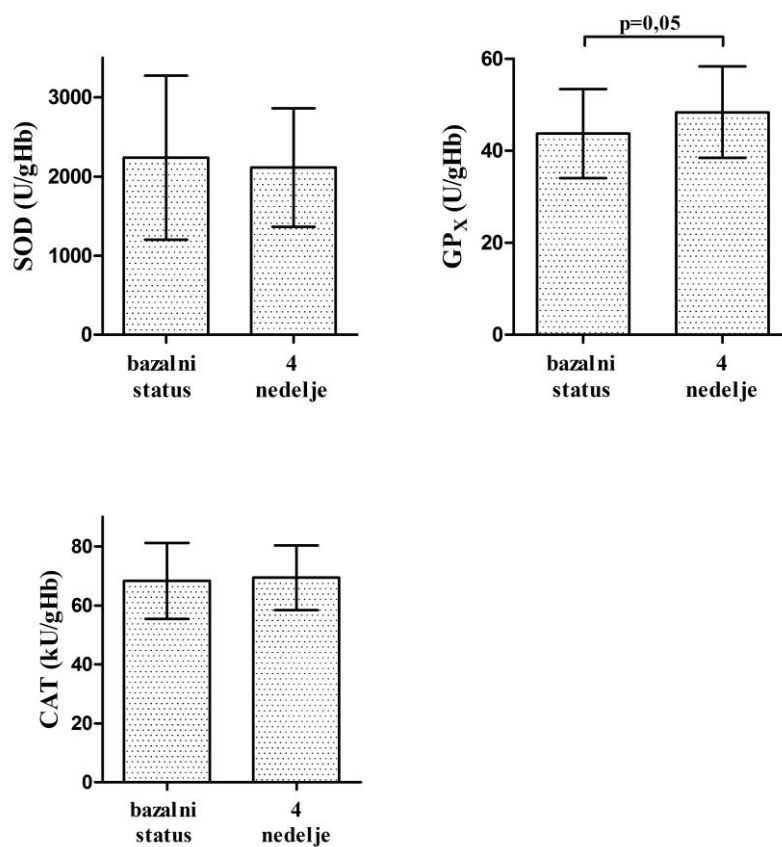
Uporedo sa praćenjem uticaja konzumacije Soka B na markere oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi II, ispitivan je i uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima. Ovo je podrazumevalo određivanje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze i katalaze pre početka i na kraju interventnog perioda. Rezultati su prikazani u Tabeli 11 i grafički Slikom 18.

Slično rezultatima prikazanim za prethodnu grupu ispitanika, i u Grupi II konzumacija Soka B dovela je do statistički značajnog porasta aktivnosti glutation-peroksidaze ( $p = 0,05$ ), ali nije uticala na aktivnost katalaze. Takođe, aktivnost superoksid-dismutaze nije se promenila, što je takođe bilo u skladu sa rezultatima zabeleženim u Grupi I, gde konzumacija soka u trajanju od 6 nedelja nije uticala na aktivnost ovog enzima.

**Tabela 11.** Aktivnost antioksidativnih enzima eritrocita ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B

	<b>Bazalni status</b>	<b>4 nedelje</b>	<b>P vrednost</b>
SOD (U/gHb)	2237,66 ± 1035,23	2115,15 ± 747,83	0,605
GPx (U/gHb)	43,75 ± 9,67	48,39 ± 9,93	0,05
CAT (kU/gHb)	68,28 ± 12,90	69,39 ± 10,99	0,512

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.



**Slika 18.** Grafički prikaz aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

#### 4.2.4. Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi II

Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita, odnosno relativni sadržaj pojedinačnih, kao i ukupnih zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina određivan je kod ispitanika u Grupi II pre početka intervencije i po završetku 4 nedelje svakodnevne konzumacije soka B. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 12.

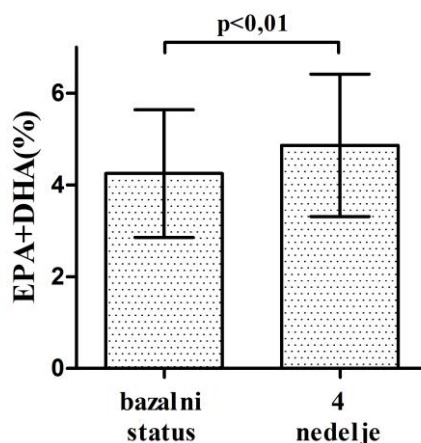
**Tabela 12.** Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B

MK (%)	Bazalni status	4 nedelje	P vrednost
SFA	42,33 ± 5,20	40,58 ± 3,51	0,125
16:0	22,22 ± 4,54	20,24 ± 2,45	0,066
18:0	19,96 ± 2,61	20,34 ± 2,53	0,655
MUFA	15,89 ± 2,10	14,79 ± 1,55	<0,05
16:1n-7	0,31 ± 0,16	0,34 ± 0,14	0,483
18:1n-9	13,99 ± 1,94	12,94 ± 1,44	<0,05
18:1n-7	1,58 ± 0,42	1,51 ± 0,24	0,414
n-6 PUFA	35,86 ± 5,72	37,58 ± 3,16	0,108
18:2n-6	12,50 ± 1,35	12,34 ± 1,67	0,591
20:3n-6	2,20 ± 0,57	2,09 ± 0,56	0,557
20:4n-6	17,13 ± 4,27	18,28 ± 2,49	0,090
22:4n-6	4,48 ± 1,26	4,74 ± 0,83	0,273
n-3 PUFA	5,91 ± 1,59	7,05 ± 2,16	<0,05
20:5n-3	0,32 ± 0,19	0,44 ± 0,47	0,171
22:5n-3	1,71 ± 0,41	1,87 ± 0,26	0,227
22:6n-3	3,89 ± 1,24	4,74 ± 1,60	<0,05
PUFA	41,77 ± 6,69	44,63 ± 3,89	0,062
n-6/n-3	6,51 ± 1,96	5,72 ± 1,48	<0,05
Indeks nezasićenosti	169,62 ± 25,42	178,81 ± 16,60	0,05

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. MK - masne kiseline

Kao što je prikazano, zabeleženo je statistički značajno povećanje sadržaja ukupnih n-3 masnih kiselina ( $p < 0,05$ ), uslovljeno porastom najzastupljenije n-3 masne kiseline, DHA ( $p < 0,05$ ).

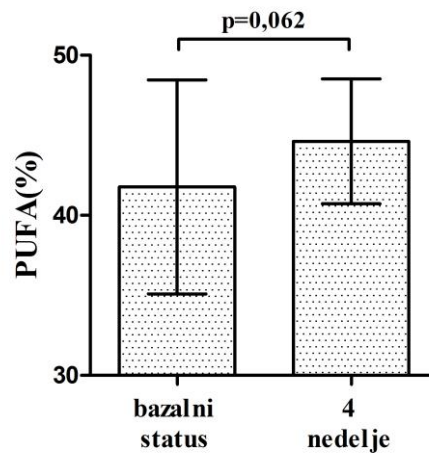
Kao i u slučaju prve grupe ispitanika i u Grupi II praćen je uticaj konzumacije Soka B na omega-3 indeks, odnosno zbir sadržaja EPA i DHA (Slika 19). Vrednost pre početka intervencije iznosila je  $4,24 \pm 1,39$  %, dok je nakon perioda konzumacije vrednost bila statistički značajno viša i iznosila je  $4,86 \pm 1,55$  % ( $p < 0,01$ ).



**Slika 19.** Omega-3 indeks ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

U skladu sa porastom sadržaja n-3 masnih kiselina, dobijeno je i statistički značajno smanjenje odnosa n-6 i n-3 masnih kiselina ( $p < 0,05$ ). Takođe, zabeležen je porast ukupnih PUFA (Slika 20), ali on nije bio statistički značajan ( $p = 0,062$ ). Ipak ovaj rezultat je od važnosti, imajući u vidu da je sadržaj PUFA indirektni marker nivoa lipidne peroksidacije. U skladu sa tim, dobijeno je povećanje indeksa nezasićenosti koje je bilo na samoj granici statističke značajnosti ( $p = 0,05$ ).

Statistički značajna promena zabeležena je i u sadržaju ukupnih MUFA (Tabela 14), odnosno najzastupljenije mononezasićene masne kiseline, C18:1n-9 ( $p < 0,05$ ). U ovom slučaju vrednosti su bile značajno niže na kraju interventnog perioda, u odnosu na vrednosti pre početka intervencije.



**Slika 20.** Relativni sadržaj PUFA u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi II na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka B. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

### **4.3. Uticaj konzumacije Soka A na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III**

Uticaj konzumacije Soka A na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina praćen je i u grupi ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1, farmakološki nelečenom. Studija je dizajnirana tako da je podrazumevala redovnu konzumaciju 200 mL soka u trajanju od 4 nedelje, a ispitanici su isti parametri kao u slučaju prethodno opisane dve grupe. Dodatno, u Grupi III ispitan je uticaj konzumacije Soka A na krvni pritisak, koji je meren ambulatorno, odnosno pomoću prenosivog uređaja u toku 24 h.

#### **4.3.1. Osnovne karakteristike i biohemijski parametri ispitanika u Grupi III**

Osnovne karakteristike ispitanika U Grupi III sa vrednostima biohemijskih parametara prikazane su u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Osnovne karakteristike i biohemijski parametri ispitanika u Grupi III na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A

	<b>Bazalni status</b>	<b>4 nedelje</b>	<b>P vrednost</b>
Broj ispitanika	23		
Starost	47,5 ± 10,4		
Pol (M/Ž)	12/11		
Telesna masa (kg)	81,5 ± 20,4		
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	27,0 ± 4,8		
Holesterol (mmol/L)	6,06 ± 1,31	5,79 ± 1,21	0,183
HDL holesterol (mmol/L)	1,43 ± 0,51	1,42 ± 0,46	0,847
LDL holesterol (mmol/L)	4,08 ± 1,03	3,79 ± 0,92	0,090
Trigliceridi (mmol/L)	1,95 ± 1,42	1,57 ± 0,99	<0,05
Glukoza (mmol/L)	5,17 ± 0,70	5,14 ± 1,31	0,705
Urea (mmol/L)	5,39 ± 1,54	5,22 ± 1,41	0,514
Kreatinin (μmol/L)	76,22 ± 15,59	76,04 ± 16,91	0,930
Mokraćna kiselina (μmol/L)	327,63 ± 113,39	314,63 ± 86,96	0,165
ALT (U/L)	29,87 ± 19,90	28,34 ± 18,85	0,194
AST (U/L)	23,65 ± 8,36	24,04 ± 9,66	0,593
CRP (mg/dl)	2,06 ± 1,90	1,77 ± 2,54	0,300

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

Redovna konzumacija Soka A pokazala je uticaj na lipidni status, jer je zabeleženo statistički značajno smanjenje koncentracije triglicerida ( $p=0,047$ ) na kraju interventnog perioda. Nakon 4 nedelje redovne konzumacije Soka A zabeležene su i niže vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na bazalni status. Ipak, ove promene nisu bile statistički značajne.

### 4.3.2. Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi III

Uticaj redovne konzumacije Soka A na markere oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu ispitanika u Grupi III prikazan je Tabeli 14.

Iz tabele se vidi da se nijedan ispitivani pokazatelj oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu nije statistički značajno razlikovao na kraju interventnog perioda od 4 nedelje u odnosu na početne vrednosti.

**Tabela 14.** Parametri oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi III na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A

	<b>Bazalni status</b>	<b>4 nedelje</b>	<b>P vrednost</b>
TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ )*	1,62 $\pm$ 0,41	1,74 $\pm$ 0,39	0,335
PAB (HKU)*	99,46 $\pm$ 30,11	106,23 $\pm$ 28,19	0,122
TOS ( $\mu\text{mol/L}$ )**	23,07 (17,95-29,66)	22,01 (17,57-27,56)	0,658
TAS (mmol/L)***	1,00 (0,57-1,18)	0,97 (0,72-1,17)	0,421
SH grupe (mmol/L)**	0,56 (0,51-0,61)	0,54 (0,50-0,59)	0,499
Paraoksonazna aktivnost (U/L)***	164 (74,45-856,35)	161 (61,77-824,28)	0,702

\* Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

\*\* Podaci su prikazani kao geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti).

\*\*\* Podaci su prikazani kao medijana (5-ti - 95-ti percentil).

### 4.3.3. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi III

Uticaj konzumacije soka A na antioksidativnu zaštitu kod ispitanika u Grupi III praćen je i u eritrocitima određivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima, glutation-peroksidaze, superoksid-dismutaze i katalaze, a rezultati su prikazani u Tabeli 15 i Slikom 21.

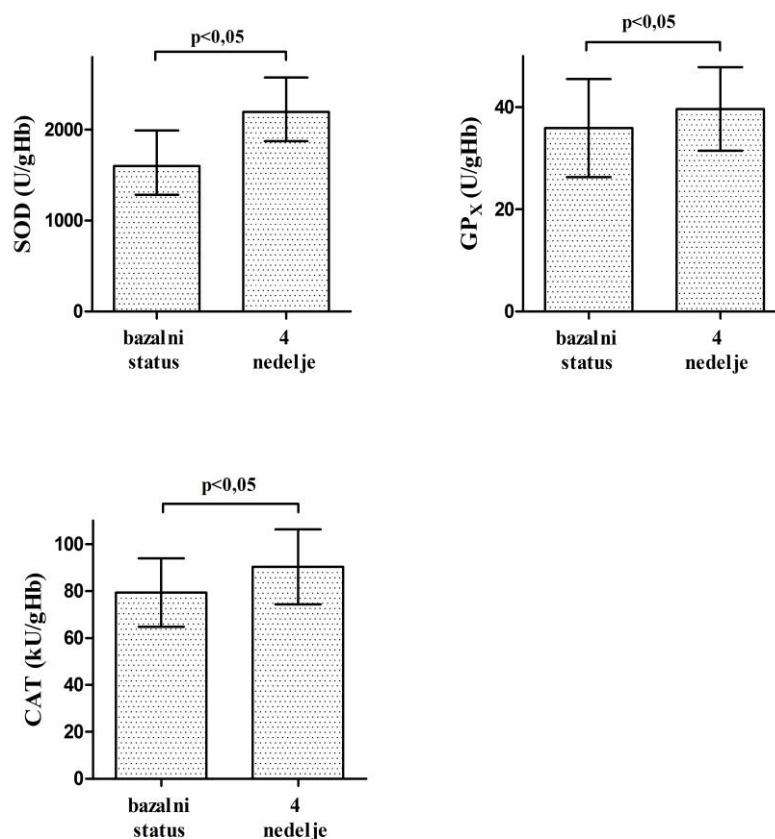
Za razliku od markera oksidativnog stresa u serumu, aktivnost antioksidativnih enzima eritrocita se statistički značajni promenila ( $p < 0,05$ ), odnosno aktivnost SOD, GPx i CAT na kraju interventnog perioda bila je statistički značajno viša u odnosu na bazalnu aktivnost.

**Tabela 15.** Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi III na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A

	Bazalni status	4 nedelje	P vrednost
SOD (U/gHb)**	1598,91 (1284,31-1990,56)	2195,17 (1872,82-2573,02)	<0,05
GPx (U/gHb)*	35,93 ± 9,61	39,66 ± 8,17	<0,05
CAT (kU/gHb)*	79,33 ± 14,56	90,29 ± 15,96	<0,05

\* Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.

\*\* Podaci su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.



**Slika 21.** Grafički prikaz aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima ispitanika u Grupi III na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A. Za Gpx i CAT podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. Za SOD podaci su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.

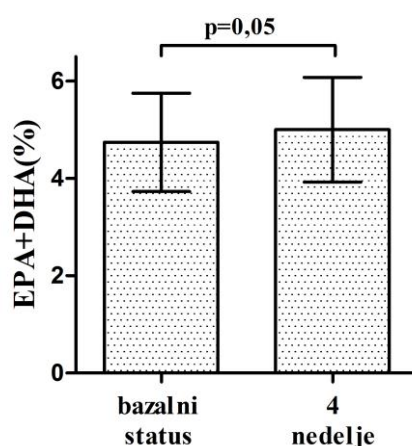


#### 4.3.4. Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III

Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III određivan je pre početka studije i posle 4 nedelje redovne konzumacije Soka A. Određivan je relativni sadržaja pojedinačnih masnih kiselina, kao i nivo ukupnih zasićenih, mononezasićenih, n-3, n-6 i ukupnih polinezasićenih masnih kiselina. Rezultati, predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije prikazani su u Tabeli 16.

Kao posledica redovne konzumacije Soka A u trajanju od 4 nedelje uočen je porast sadržaja ukupnih n-3 masnih kiselina, koji je bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ). Takođe, iako ne statistički značajno ( $p = 0,062$ ), porastao je i sadržaj C20:5n-3 (EPA) koja je pored DHA najznačajnija pojedinačna n-3 masna kiselina. Za razliku od prethodne dve grupe ispitanika, u Grupi III nije zabeležen statistički značajan porast sadržaja DHA nakon konzumacije soka ( $p = 0,121$ ).

Zbir relativnih sadržaja EPA i DHA (omega-3 indeks) bio je viši posle 4 nedelje duge svakodnevne konzumacije Soka A u odnosu na početnu vrednost. Omega-3 indeks pre početka interventnog perioda iznosio je  $4,74 \pm 1,01$  %, da bi na kraju studije njegova vrednost bila  $5,00 \pm 1,07$  %, a zabeležena razlika bila je na granici statističke značajnosti ( $p = 0,05$ ). Vrednosti ovog indeksa prikazane su na Slici 22.



**Slika 22.** Omega-3 indeks ispitanika u Grupi III na početku studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

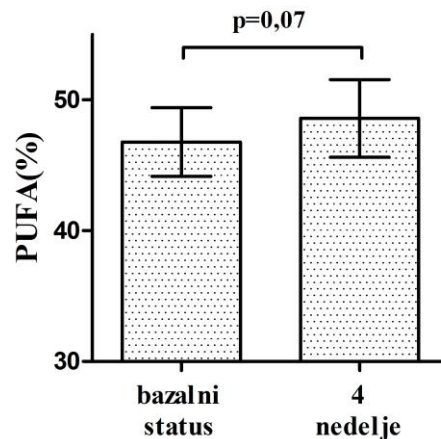
**Tabela 16.** Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III

MK (%)	Bazalni status	4 nedelje	P vrednost
SFA	38,60 ± 2,36	37,23 ± 2,08	0,069
16:0	19,46 ± 2,19	18,51 ± 1,75	0,128
18:0	19,12 ± 1,29	18,67 ± 1,11	0,149
MUFA	14,61 ± 1,20	14,43 ± 1,12	0,290
16:1n-7	0,36 ± 0,23	0,41 ± 0,33	0,545
18:1n-9	12,82 ± 1,12	12,56 ± 1,11	0,135
18:1n-7	1,39 ± 0,22	1,46 ± 0,29	0,347
n-6 PUFA	40,08 ± 2,96	41,46 ± 2,55	0,115
18:2n-6	13,45 ± 2,62	13,67 ± 1,88	0,616
20:3n-6	2,61 ± 0,84	3,28 ± 0,56	<0,05
20:4n-6	18,75 ± 1,61	19,07 ± 1,44	0,440
22:4n-6	5,25 ± 1,11	5,42 ± 0,97	0,380
n-3 PUFA	6,70 ± 1,18	7,12 ± 1,40	<0,05
20:5n-3	0,43 ± 0,17	0,63 ± 0,50	0,062
22:5n-3	1,95 ± 0,37	2,03 ± 0,43	0,385
22:6n-3	4,38 ± 0,91	4,53 ± 0,90	0,121
PUFA	46,79 ± 2,63	48,59 ± 2,97	0,070
n-6/n-3	6,24 ± 1,75	6,08 ± 1,52	0,297
Indeks nezasićenosti	183,30 ± 9,13	189,89 ± 12,67	0,061

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD. MK - masne kiseline

Sadržaj ukupnih PUFA (Slika 23) imao je tendenciju porasta, ali ova promena nije dostigla statističku značajnost ( $p=0,07$ ). U skladu sa porastom PUFA, dobijeno je i povećanje prosečnog sadržaja nezasićenih veza, odnosno indeksa nezasićenosti, ali

takođe bez statističke značajnosti ( $p=0,061$ ). Za razliku od promene u prethodne dve grupe, u slučaju Grupe III svakodnevna konzumacija Soka A u trajanju od 4 nedelje nije značajno uticala na odnos sadržaja n-6 i n-3 masnih kiselina. Takođe, ova grupa se izdvaja po statistički značajnom porastu relativnog sadržaja pojedinačne n-6 masne kiseline C20:3n-6 ( $p<0,05$ ).



**Slika 23.** Relativni sadržaj PUFA u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III pre početka studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

#### 4.3.5. Vrednosti ambulatorno merenog krvnog pritiska ispitanika u Grupi III

Kod Grupe III, koju si činili ispitanici sa visokim-normalnim krvnim pritiskom i hipertenzijom stadijuma 1, praćen je uticaj konzumacije Soka A na vrednosti arterijskog krvnog pritiska. Ovo je podrazumevalo ambulatorno merenje krvnog pritiska, odnosno nošenje prenosivog uređaja koji je registrovao vrednosti krvnog pritiska na svakih 15 minuta u toku 24 h. Merenje je vršeno pre početka studije i posle 4 nedelje redovne konzumacije Soka A. Na ovaj način praćene su prosečne vrednosti pritiska u toku 24 h, odnosno u toku dana (u budnom stanju) i u toku noći (u stanju sna), kao i njihove varijacije. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 17 i na Slici 24.

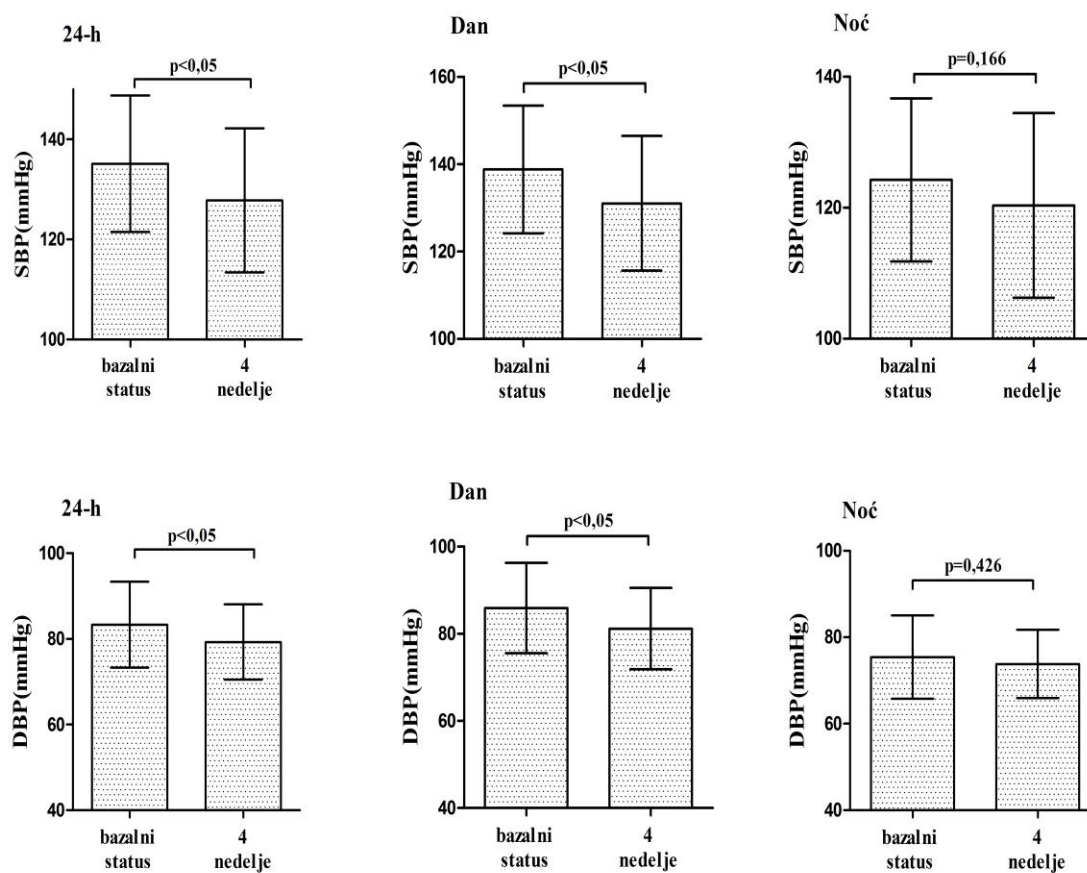
Svakodnevna konzumacija 200 mL soka A rezultovala je statistički značajnim smanjenjem ( $p<0,05$ ) prosečnog krvnog pritiska u toku 24 h, i to sistolnog za 7,3 mmHg, a dijastolnog za 4,0 mmHg. Ovakav efekat zabeležen je i za prosečne vrednosti

pritiska u toku dana, a smanjenja sistolnog, odnosno dijastolnog pritiska su iznosila redom 7,8 mmHg ( $p<0,05$ ) i 4,7 mmHg ( $p<0,05$ ). U slučaju vrednosti u toku sna, nije bilo većih promena. Statistički značajno smanjena je standardna devijacija, odnosno variranje sistolnog krvnog pritiska u toku dana ( $p<0,01$ ), kao i pulsni pritisak u toku 24 h ( $p<0,05$ ).

**Tabela 17.** Prosečne vrednosti krvnog pritiska u toku 24 h kod ispitanika u Grupi III pre početka studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A

	<b>Bazalni status</b>	<b>4 nedelje</b>	<b>P vrednost</b>
<b>Sistolni pritisak (mmHg)</b>			
24-h	135,1 ± 13,6	127,8 ± 14,4	<0,05
Dnevni	138,8 ± 14,6	131,0 ± 15,4	<0,05
Noćni	124,2 ± 12,5	120,3 ± 14,1	0,166
<b>Dijastolni pritisak (mmHg)</b>			
24-h	83,3 ± 10,0	79,3 ± 8,8	<0,05
Dnevni	85,9 ± 10,4	81,2 ± 9,3	<0,05
Noćni	75,4 ± 9,6	73,8 ± 7,9	0,426
<b>Pulsni pritisak (mmHg)</b>			
24-h	49,7 ± 12,3	46,7 ± 12,5	<0,05
Dnevni	50,9 ± 12,8	47,9 ± 13,1	0,071
Noćni	48,8 ± 7,7	46,3 ± 8,9	0,075
<b>Standardna devijacija</b>			
Dnevni sistolni	14,95 ± 4,97	11,67 ± 3,34	<0,01
Dnevni dijastolni	10,51 ± 3,82	8,90 ± 2,87	0,090
Noćni sistolni	12,93 ± 4,95	11,72 ± 4,18	0,285
Noćni dijastolni	10,25 ± 4,18	9,80 ± 3,00	0,617

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± SD.



**Slika 24.** Grafički prikaz vrednosti krvnog pritiska izmerenih u toku 24 h, u budnom stanju i stanju sna kod ispitanika u Grupi III pre početka studije i posle 4 nedelje konzumacije Soka A. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD. SBP - sistolni krvni pritisak, DBP - dijastolni krvni pritisak.

## 5. DISKUSIJA

Oksidativni stres, kao stanje poremećene ravnoteže između stvaranja ROS i sposobnosti antioksidanasa da ih neutrališu, ima za posledicu nastanak oksidativno oštećenih proteina, lipida i DNK. Kao posledica, dolazi do promena u ćelijskoj strukturi i funkciji, što doprinosi razvoju kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, kancera i drugih patoloških stanja (3). Prema procenama Svetske zdravstvene organizacije i Organizacije za hranu i poljoprivredu, nezarazne hronične bolesti, uključujući KVB, gojaznost, dijabetes melitus, hipertenziju i neke tipove kancera, postaju sve značajniji uzročnik invaliditeta i preuranjene smrtnosti u svetu, i to kako u razvijenim tako i zemljama u razvoju (48). Gotovo polovina od ukupne smrtnosti usled hroničnih bolesti pripisuje se KVB, a rastući trend dovodi se, između ostalog, u vezu sa neadekvatnom ishranom, nedovoljnom fizičkom aktivnošću i pušenjem (48). Način ishrane se smatra najznačajnijom promenljivom determinantom hroničnih bolesti, te se stoga adekvatna dijeta ističe kao važan faktor u prevenciji kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti. Pokazana je asocijacija između konzumacije voća, povrća, ribe i ribljeg ulja, hrane bogate kalijumom i niskog do umerenog unosa alkohola sa smanjenjem rizika za nastanak KVB (114-117). Uloga namirnica biljnog porekla u prevenciji kardiovaskularnih i drugih nezaraznih hroničnih bolesti pripisuje se ne samo njihovim nutritivnim sastojcima, već i biološki aktivnim sekundarnim metabolitima biljaka, kakvi su polifenoli. Polifenoli predstavljaju najznačajnije dijetarne antioksidanse s obzirom da su visoko zastupljeni u namirnicama biljnog porekla i da imaju visok antioksidativni kapacitet (3). Zaštitno delovanje polifenola u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja upravo se pripisuje njihovoj antioksidantnoj aktivnosti. Faktori rizika za nastanak KVB, kao što su hipertenzija, gojaznost, dislipidemija, hiperglikemija, često su praćeni poremećajima oksidativnog statusa. Prema Dotanu i sar. (23) različita patološka stanja povezana su sa različitim tipovima oksidativnog stresa, odnosno praćena su izmenjenim vrednostima različitih markera prooksidativnog/antioksidativnog balansa. Otuda i potreba da se oksidativni status procenjuje različitim metodama. Dalje ovi autori navode da su samo u najozbiljnijim patološkim stanjima svi indeksi oksidativnog stresa povišeni i u međusobnoj su

korelaciji. Iako se veća efikasnost dijetarnih antioksidanasa očekuje kod ljudi sa prisutnim faktorima rizika ili već razvijenim bolestima, njihova dugotrajna konzumacija može ispoljiti povoljne efekte na pojedine markere oksidativnog stresa i u slučaju zdravih ispitanika (118). Uzimajući u obzir navedeno, u ovoj tezi ispitivan je uticaj dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na različite markere oksidativnog stresa u serumu i eritrocitima ispitanika sa ili bez faktora rizika za nastanak KVB.

Kao posledica konzumacije Soka A u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB (Grupa I) zabeleženo je smanjenje nivoa TBARS, pokazatelja lipidne peroksidacije u serumu. Ovaj efekat bio je statistički značajan nakon 6 i 12 nedelja svakodnevne konzumacije Soka A u odnosu na bazalni status ( $p < 0,0001$ ). Pozitivni efekti aronije i njenih proizvoda na markere oksidativnog stresa ispitivani su u malom broju dijetarnih interventnih studija kod ljudi. Rezultati tih studija potencijalno antioksidativno delovanje baziraju upravo na smanjenju nivoa TBARS. Značajna smanjenje nivoa TBARS u serumu pokazano je nakon 8 nedelja konzumacije ekstrakta aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom (94), kao i kod veslača koji su konzumirali sok od aronije pre izvođenja ergometarskog testa (97). Uporedo sa smanjenjem TBARS, u Grupi I uočen je i pad nivoa PAB, koji je bio statistički značajan nakon 6 nedelja redovne konzumacije soka A ( $p < 0,01$ ). Prema našim saznanjima, nema objavljenih rezultata o efektima suplementacije proizvodima od aronije, bobičastog voća uopšte ili drugog dijetarnog izvora polifenola na ovaj parametar. PAB je uključen u ispitivanje s obzirom da omogućava procenu opterećenja organizma prooksidativnim vrstama i njegovog antioksidativnog kapaciteta izvođenjem jedne analitičke metode. S obzirom na aditivnu prirodu oksidativnih efekata različitih molekula, koncentracija različitih oksidativnih vrsta u serumu, stvorenih endogeno ili unesenih iz spoljašnje sredine, može se određivati zbirno (104). Na ovaj način određuje se ukupni oksidativni status organizma, TOS. Ovde prikazani rezultati za Grupu I ispitanika, pokazuju da nije bilo promene u TOS na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalni status. Iako je vrednost statistički značajno pala nakon 6 nedelja redovne konzumacije soka ( $p < 0,0001$ ), do kraja interventnog perioda vraćena je na početni nivo, sa značajnom razlikom zabeleženom između vrednosti TOS u 12-oj i 6-oj nedelji ( $p < 0,0001$ ).

Slično TOS-u koji objedinjuje činioce oksidativnog oštećenja, totalni antioksidativni status, skraćeno TAS, objedinjuje neenzimske komponente

antioksidativnog sistema organizma. Naši rezultati pokazali su neočekivani pad vrednosti TAS, te je vrednost na kraju interventnog perioda bila statistički značajno niža u odnosu na bazalnu vrednost i vrednost nakon 6 nedelja konzumacije Soka A ( $p < 0,01$ ). Pojedini autori navode da antocijani, kao glavni aktivni principi aronije, mogu da ispolje prooksidativnu aktivnost u sredini sa niskom koncentracijom oksidativnih vrsta, kakva se očekuje kod zdravih ispitanika (119). Porast TAS pokazana je u *in vitro* uslovima nakon tretiranja plazme ekstraktom aronije (91). Ipak nema podataka u literaturi koji potvrđuju efekat u humanim interventnim studijama. Konzumacija soka od ribizle, koji je po aktivnim principima sličan soku od aronije, u trajanju od 6 nedelja nije pokazala efekat na TAS (120).

Prema literaturnim podacima, ukupne tiolne (-SH) grupe značajno doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu organizma i iznose čak i do 50 % od TAS-a kod zdravih ispitanika (105). Iako je konzumacija napitaka bogatih polifenolima pokazala porast nivoa -SH grupa (121), u našem slučaju kod zdravih ispitanika zabeležen je njegov pad, koji je bio statistički značajan nakon 6 nedelja konzumacije soka od aronije ( $p < 0,01$ ). Ovakav rezultat je bio u skladu sa zabeleženim padom vrednosti TAS. Ipak, vrednost na kraju interventnog perioda od 12 nedelja nije se značajno razlikovala u odnosu na početnu kao i na vrednost zabeleženu posle 6 nedelja redovne konzumacije Soka A. U nedavno sprovedenoj studiji, suplementacija ekstraktom aronije u trajanju od dva meseca nije pokazala značajan uticaj na nivo tiolnih grupa (122). Takođe, ekstrakt aronije nije pokazao efekat ni u *in vitro* uslovima, u plazmi izolovanoj iz krvi zdravih ispitanika (123).

Od ostalih pokazatelja antioksidativne zaštite u serumu, praćen je efekat konzumacije soka od aronije na aktivnost enzima PON1. Humana paraoksonaza je polimorfni enzim tipa esteraza, koji ispoljava anti-aterosklerotsko dejstvo hidrolizom oksidovanog holesterola i/ili fosfolipida u aterosklerotskim lezijama (124). Kod Grupe I, uočen je porast aktivnosti PON1 prema diazoksonu koji je bio statistički značajan na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalnu aktivnost ( $p < 0,01$ ), kao i u odnosu na aktivnost zabeleženu nakon 6 nedelja svakodnevne konzumacije Soka A ( $p < 0,01$ ). Ipak, što se tiče aktivnosti PON1 prema paraoksonu kao supstratu, zabeleženi su donekle neočekivani rezultati. Najpre je aktivnost statistički značajno smanjena nakon 6 nedelja u odnosu na vrednost pre intervencije ( $p < 0,0001$ ), da bi do kraja studije



pokazala porast, koji je u 12-oj nedelji bio statistički značajan u odnosu na aktivnost u 6-oj nedelji ( $p < 0,0001$ ). Ipak, aktivnost na kraju interventnog perioda nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na aktivnost pre početka intervencije. Uzroci pada aktivnosti na sredini interventnog perioda mogu samo da se pretpostave.

Iako su zabeleženi donekle neočekivani efekti na pojedine markere oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi I, može se reći da je ustanovljena fina modulacija pojedinih markera prooksidativnog/antioksidativnog statusa na nivou 12 nedelja konzumacije Soka A. Ovo upućuje na potencijalno antioksidativno delovanje aronije i njenih proizvoda, ali i na potrebu da mehanizam tog delovanja bude dalje razjašnjen.

Što se tiče uticaja konzumacije Soka B na pokazatelje oksidativnog statusa u serumu u Grupi II, uočen je statistički značajan pad PAB ( $p < 0,01$ ), kao i tendencija ka smanjenju vrednosti TBARS koje nije bilo statistički značajno ( $p = 0,088$ ). U slučaju parametara antioksidativne zaštite, za razliku od Grupe I, zabeležen je statistički značajan porast u vrednosti TAS ( $p < 0,05$ ). Kao što je navedeno, dosadašnje dijetarne interventne studije proizvodima od aronije nisu pokazale efekat na neenzimski antioksidativni status meren kao TAS. U studiji koja je evaluirala antioksidativni status preko 3 hiljade ispitanika, pokazana je značajna korelacija između smanjenog ukupnog antioksidativnog kapaciteta i abdominalne gojaznosti i gojaznosti uopšte (63). Dodatno, ova asocijacija bila je nezavisna od godina, pušenja, fizičke aktivnosti i različitih metaboličkih varijabli. Na osnovu toga, autori su predložili promenu načina života i povećan unos antioksidanasa kao potencijalni pristup prevenciji stanja povezanih sa gojaznošću, kao što su metabolički sindrom i dijabetes tip 2, ateroskleroza i druge KVB (63). Inicijacija i propagacija razvoja kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti kod gojaznih osoba uzrokovana je izraženom inflamacijom, povišenim vrednostima lipida i šećera u krvi i smanjenom osetljivošću na insulin (125,126). Pokazano je da je ovakav efekat dramatičniji u slučaju niskog antioksidativnog kapaciteta organizma kao i niskog egzogenog unosa antioksidanasa (127). Stoga je pokazani porast TAS u Grupi II od izuzetnog značaja u prevenciji bolesti i stanja povezanih sa gojaznošću.

S obzirom da je utvrđena povezanost abdominalne gojaznosti i smanjenog antioksidativnog kapaciteta plazme (63), zabeleženi porast TAS mogao bi se dovesti u vezu sa statistički značajnim smanjenjem telesne težine, odnosno ITM i obima struka ( $p < 0,0001$ ) u Grupi II. U Grupi II ispitivani su efekti konzumacije Soka B, koji je

predstavljao sok ploda aronije obogaćen dijetarnim vlaknima iz grupe glukomanana. Unos dijetarnih vlakana preporučen je u cilju očuvanja zdravlja i prevencije razvoja kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti. Studije su pokazale povoljan efekat dijetarnih vlakana na smanjenje nivoa ukupnog i LDL holesterola, kao i kardioprotektivno delovanje hrane bogate dijetarnim vlaknima kroz smanjenje rizika za nastanak koronarne bolesti (128-130). Ipak, podaci o efektima dijetarnih vlakana na regulisanje i postizanje idealne telesne mase nisu uniformni. Na osnovu dostupnih humanih interventnih studija, EFSA (131) je 2010. godine usvojila smernice po kojima konzumacija glukomanana u kombinaciji sa niskokalorijskom dijetom dovodi do značajnog smanjenja telesne mase. Ovo je zasnovano na činjenici da unos ovih vlakana pre obroka, usled apsorpcije vode i višestrukog povećanja zapremine u crevima, može dovesti do smanjenja apetita i povećanja osećaja sitosti. Da bi se postigao efekat na smanjenje telesne mase, EFSA dalje navodi da unos glukomanana treba da iznosi najmanje 3 g po danu (131). Nasuprot ovim saznanjima, nedavno sprovedena meta-analiza osam randomizovanih kliničkih studija pokazala je da smanjenje telesne mase usled konzumacije glukomanana nije statistički značajno u odnosu na placebo (132). Dodatno, u studiji koja je pratila efekat osam nedelja duge administracije 3,99 g glukomanana dnevno kod ispitanika koji su se pridržavali svog uobičajenog kalorijskog unosa, nije postignuto značajno smanjenje telesne mase u poređenju sa kontrolnom grupom (133).

Podaci o eventualnom delovanju aronije i njenih proizvoda na regulaciju telesne mase kod ljudi su ograničeni. Ipak, pojedini autori navode da bi konzumacija namirnica bogatih polifenolima mogla biti od značaja u postizanju idealne telesne mase. Oni ističu povoljno delovanje polifenola i antocijana na insulinski odgovor, adipogenezu, ekspresiju gena specifičnih za adipocite i inflamatorne signalne puteve (134,135). Ispitivanja na animalnom modelu pokazala su da antocijanima bogat ekstrakt aronije ima efekat na smanjenje porasta mase i abdominalne masti kod pacova hranjenih 6 nedelja hranom bogatom fruktozom sa ili bez dodatka ekstrakta (136). Takođe, obogaćivanje visokomasne hrane polifenolima borovnice pokazalo je kod gojaznih i hiperglikemičnih miševa manji porast u telesnoj masi u odnosu na one koji su dobijali kontrolnu hranu (137). Na osnovu navedenog, zaslužnim za smanjenje

antropometrijskih indeksa gojaznosti (ITM i obima struka) u Grupi II može se smatrati sinergistično dejstvo aktivnih principa aronije i prisutnih dijetarnih vlakana.

Kod Grupe III, koju su činili ispitanici sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1, nije uočen statistički značajan uticaj konzumacije Soka A na markere oksidativnog stresa u serumu.

U cilju eventualnog razjašnjenja potencijalnog antioksidativnog delovanja aronije, odnosno njenog soka ispitivali smo uticaj na ćelijski antioksidativni status, tačnije na aktivnost enzima eritrocita. Eritrociti su izabrani kao ćelijski model, s obzirom da predstavljaju najbrojniju ćelijsku populaciju krvi, a time i najveći izvor antioksidativnih enzima, kao i da se njihova struktura i fluidnost dovodi u vezu sa patogenezom KVB (138).

U Grupi III uočen je najizraženiji uticaj konzumacije soka ploda aronije na antioksidativnu aktivnost enzima eritrocita. Tako je na kraju interventnog perioda u trajanju od 4 nedelje zabeležen statistički značajan porast ( $p < 0,05$ ) u aktivnosti sva tri ispitivana enzima, odnosno SOD, GPx i CAT, dok je u Grupi II statistički značajno porasla samo aktivnost GPx ( $p = 0,05$ ). U Grupi I zabeležen je porast aktivnosti GPx koji je bio statistički značajan nakon 12 nedelja konzumacije Soka A ( $p < 0,05$ ) u odnosu na bazalni status, kao i aktivnosti SOD koja je bila statistički značajno veća ( $p < 0,01$ ) u 12-oj nedelji u odnosu na bazalnu, ali i aktivnost nakon 6 nedelja konzumacije Soka A. Ovi rezultati bili su u skladu sa literaturnim podacima. Broncel i saradnici (94) pokazali su porast aktivnosti SOD i GPx posle 2 meseca suplementacije ekstraktom aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom. Sa druge strane, aktivnost katalaze je u ovoj grupi ispitanika statistički značajno opala. Porast aktivnosti GPx pokazan je i kod ispitanika sa hiperholesterolemijom koji su konzumirali ekstrakt izolovanih antocijana aronije u trajanju od mesec dana (139). Takođe, sok od aronije pokazao je smanjenje oksidativnog stresa indukovano fizičkom aktivnošću veslača, kroz stimulaciju antioksidativnih enzima eritrocita nakon jednog meseca redovne konzumacije (97).

U cilju daljeg ispitivanja antioksidativnog delovanja soka od aronije i boljeg razumevanja istog, analizirana je povezanost između efekata na aktivnost antioksidativnih enzima eritrocita i profil masnih kiselina u njihovim membranama. Naime, ispitivano je da li je porast u aktivnosti enzima praćen smanjenjem oksidativnog

oštećenja polinezasićenih masnih kiselina, kao glavne mete slobodnih radikala. Rezultati korelacionih analiza pokazali su značajnu korelaciju između efekta na aktivnost GPx i sadržaja određenih masnih kiselina u Grupi I. Kao parametri koji su korelisani korišćeni su porast aktivnosti enzima, definisan kao razlika u aktivnosti nakon 12 nedelja redovne konzumacije Soka A i bazalne aktivnosti i promena u relativnom sadržaju masnih kiselina, definisana na isti način. Statistički značajna pozitivna korelacija uočena je za promenu u sadržaju ukupnih PUFA ( $p < 0,01$ ), n-3 PUFA ( $p < 0,05$ ) i n-6 PUFA ( $p < 0,05$ ) i posledično za promenu u indeksu nezasićenosti ( $p < 0,01$ ). Drugim rečima, veći porast u aktivnosti enzima GPx praćen je većim porastom u sadržaju PUFA.

Povezanost između aktivnosti antioksidativnih enzima i statusa masnih kiselina pokazana je i u ranijim studijama. Studija koja je poredila pacijente sa akutnim pankreatitisom i zdrave dobrovoljce kao kontrolnu grupu, pokazala je da su razlike u aktivnosti SOD i GPx praćene razlikama u profilu masnih kiselina u fosfolipidima membrana. Tačnije, u grupi pacijenata uočen je niži sadržaj PUFA praćen nižom aktivnošću enzima u odnosu na kontrolnu grupu (140). Takođe, genetski predisponirana povišena aktivnost SOD kod osoba sa Daunovim sindromom i posledično viša aktivnost CAT i GPx, praćena je i izmenjenim profilom masnih kiselina u membrani eritrocita, u odnosu na zdrave ispitanike (141).

Lipidi, odnosno masne kiseline sa većim brojem dvostrukih veza smatraju se biološkim komponentama koje su najpodložnije oksidativnom oštećenju. U slučaju narušene ravnoteže između stvaranja ROS i antioksidativne zaštite dolazi do oksidacije PUFA u ćelijskoj membrani, što menja njene fizičko-hemijske karakteristike i narušava uobičajenu funkciju (142). Ovo se zasniva na činjenici da je ćelijska membrana prva linija odbrane ćelije od slobodnih radikala kao i da ima visok sadržaj lipida, odnosno PUFA. Među brojnim indeksima koji se uz primenu odgovarajućih metoda koriste za ocenu oksidativnog statusa najčešće su korišćeni pokazatelji nivoa lipidne peroksidacije. Tako je i u okviru ove doktorske disertacije, praćen uticaj konzumacije soka od aronije, kao potencijalnog dijetarnog antioksidansa na profil masnih kiselina, odnosno status PUFA u fosfolipidima membrana eritrocita.

U Grupi I, nakon 12 nedelje redovne konzumacije Soka A zabeležen je statistički značajan porast u relativnom sadržaju ukupnih PUFA ( $p < 0,05$ ), što je bilo

praćeno povećanjem indeksa nezasićenosti ( $p < 0,05$ ). Ovakav rezultat svedoči o zaštitnom delovanju aronije i njenih proizvoda na oksidativno oštećenje ćelijske membrane, odnosno membranskih lipida. Imajući u vidu ranije objavljene negativne asocijacije između sadržaja PUFA u membrani eritrocita i rizika za hipertenziju, pokazani efekat upućuje i na potencijalno kardioprotektivno delovanje aronije (41).

Porast je uočen i u slučaju n-3 PUFA, pri čemu je statistički značajna razlika postignuta kako nakon 12, tako i nakon 6 nedelja konzumacije Soka A ( $p < 0,01$ ) u odnosu na bazalni status. Ovaj efekat je od posebnog interesa sa aspekta delovanja na kardiovaskularno zdravlje, s obzirom na pokazanu negativnu korelaciju između sadržaja n-3 masnih kiselina u membranama eritrocita i rizika za nastanak KVB (42) i drugih patoloških stanja kao što su reumatoidni artritis (44) i metabolički sindrom (43). Takođe prema literaturnim podacima, smanjen sadržaj n-3 PUFA u eritrocitima, često zabeležen kod pacijenata sa hipertenzijom i dislipidemijom, doprinosi razvoju inflamatornih stanja (143).

Harris i sar. (45) uveli su termin "omega-3 indeks", zbir relativnog sadržaja EPA i DHA u membrani eritrocita, kao faktor rizika za smrt usled koronarne bolesti. Povoljan uticaj uočen je i na nivou ovog parametra, čija je vrednost bila značajno viša posle 12 ( $p < 0,01$ ), ali i posle 6 nedelja ( $p < 0,01$ ) redovne konzumacije Soka A u odnosu na bazalni status. Porast sadržaja ukupnih n-3 PUFA, kao i omega-3 indeksa najverovatnije je posledica porasta u relativnom sadržaju DHA kao najzastupljenije n-3 masne kiseline. Relativni sadržaj DHA u fosfolipidima membrane eritrocita u Grupi I bio je statistički značajno veći nakon 6 i 12 nedelja svakodnevne konzumacije soka od aronije u odnosu na bazalni status ( $p < 0,01$ ). S obzirom da DHA ima čak 6 nezasićenih veza, koje su glavno mesto interakcije sa slobodnim radikalima, ovaj rezultat može se posmatrati kao indikator smanjenja oksidativnog oštećenja. Takođe, porast u nivou DHA ukazuje i na potencijalno kardioprotektivno delovanje soka, s obzirom na pokazano antiaritmično i hipotenzivno delovanje ove n-3 masne kiseline posredovano oslobađanjem vazodilatatora azot-monoksida iz endotelijuma (47,144).

Porast nivoa n-3 PUFA doveo je do smanjenja odnosa n-6/n-3 masnih kiselina koje je bilo statistički značajno na kraju, ali i u sredini interventnog perioda u odnosu na bazalni status ( $p < 0,01$ ). Pokazano je da visok odnos n-6/n-3 promovise inflamaciju i razvoj mnogih hroničnih bolesti, dok se njegovo smanjenje dovodi u vezu sa

smanjenjem progresije bolesti (47). Uporedo sa porastom u sadržaju PUFA, uočen je pad u nivou ukupnih MUFA i oleinske kiseline, koji je bio statistički značajan nakon 6 i 12 nedelje konzumacije Soka A, u odnosu na bazalni nivo ( $p < 0,05$ ). Moguće je da je sniženje vrednosti MUFA kompenzacija porasta PUFA, imajući u vidu da je sadržaj masnih kiselina izražavan relativno.

U Grupi II, odnosno kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću nakon 4 nedelje konzumacije Soka B zabeležen je porast u sadržaju polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita. Iako promena nije dostigla statističku značajnost u slučaju ukupnih PUFA ( $p = 0,062$ ), sadržaj n-3 PUFA ( $p < 0,05$ ) kao i DHA ( $p < 0,05$ ), značajno su bili viši na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalne vrednosti. Posledično, uočen je porast u indeksu nezasićenosti koji je bio na granici statističke značajnosti ( $p = 0,05$ ) kao i pad u n-6/n-3 odnosu ( $p < 0,05$ ). Slično kao u Grupi I, porast u sadržaju PUFA praćen je padom u sadržaju oleinske kiseline i ukupnih MUFA ( $p < 0,05$ ) s tom razlikom što je i sadržaj palmitinske ( $p = 0,066$ ) i ukupnih zasićenih masnih kiselina ( $p = 0,125$ ) pokazao trend opadanja.

Dobijeni rezultati od značaja su ne samo zato što potvrđuju antioksidativno delovanje Soka B koje je pokazano i kroz uticaj na PAB, TAS i GPx, već svedoče i o potencijalno kardioprotektivnom delovanju njegove dugotrajne konzumacije kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću. Pokazano je da asocijacija između gojaznosti i oksidativnog stresa može doprineti inflamatornim procesima i bolestima kao što su insulinska rezistencija i dijabetes (62). Direktna povezanost gojaznosti sa oksidativnim stresom objašnjena je infiltracijom makrofaga u masnom tkivu i povećanom produkcijom reaktivnih vrsta i citokina. Makrofagi se akumuliraju u adipocitima srazmerno njihovoj veličini i prouzrokuju inflamaciju, koja je jedan od uzročnika povećane incidence kardiovaskularnih bolesti u stanju centralne akumulacije masti (145,146). Usled brze ekspanzije masnog tkiva dolazi do hipoksije i posledične apoptoze adipocita, koja doprinosi infiltraciji makrofaga. Hipoksija takođe dovodi do porasta u koncentraciji  $H^+$  koja inhibira mitohondrijalnu produkciju energije i stimuliše formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (60, 147).

Gojaznost kao veliki zdravstveni problem u savremenom svetu, ima uticaja na morbiditet i mortalitet ljudi svih godina. Dodatno gojaznost, a naročito ona abdominalnog tipa, navodi se kao značajan faktor nastanka metaboličkog sindroma i

povećane incidence kardiovaskularnih događaja (147). Mehanizmi kojima gojaznost doprinosi povećanom kardiovaskularnom riziku uključuju metaboličke poremećaje, kao što su dislipidemija i hiperinsulinemija, promene u homeostazi i inflamaciju (147,148). Statistički značajna korelacija pokazana je između podložnosti lipoproteina peroksidaciji, stepena gojaznosti i rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti (149). Povećana peroksidacija dovodi do smanjenja nivoa polinezasićenih masnih kiselina, ali i smanjene fluidnosti i promene strukture membrane eritrocita što uzrokuje promenu oblika i difuzionog kapaciteta eritrocita, a time i smanjuje snabdevanje tkiva kiseonikom (138). Upravo smanjena oksigenacija kardiovaskularnih i endotelnih ćelija može biti jedan od mehanizama kojima gojaznost u relaciji sa oksidativnim stresom doprinosi nastanku ateroskleroze, hipertenzije i kardiovaskularnih događaja uopšte (150).

U fosfolipidima membrane eritrocita gojaznih žena pokazan je značajno niži sadržaj n-3 PUFA i indeks nezasićenosti, kao i značajno viši odnos n-6/n-3 PUFA u odnosu na žene sa normalnim ITM (151). U ovoj grupi, viši prooksidativni status doprineo je i smanjenoj fluidnosti membrane eritrocita odnosno njenoj rigidnosti. Autori su dobijene rezultati objasnili većom podložnošću membrane eritrocita *in vitro* indukovanoj peroksidaciji, većim sadržajem holesterola i smanjenim odnosom sadržaja holesterola i fosfolipida u membranama eritrocita gojaznih ispitanika. Slično su pokazali Cordero i sar. (152) koji su pratili status masnih kiselina u membranama eritrocita i markere inflamacije kod adolescenata sa normalnom i prekomernom telesnom masom. U eritrocitima gojaznih adolescenata zabeležen je statistički značajno niži sadržaj MUFA, ukupnih i n-6 PUFA, a viši sadržaj SFA. Dodatno, veći nivo pokazatelja inflamacije je uočen u ovoj grupi. Ovim je potvrđeno da je gojaznost praćena stanjem hronične inflamacije što doprinosi većem riziku za nastanak KVB. Navedeni literaturni podaci potvrđuju značaj zabeleženih efekata koje je konzumacija soka ispoljila na profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika sa abdominalnom gojaznošću (Grupa II).

Slično efektima konzumacije soka od aronije u Grupama I i II, i u Grupi III ispitanika zabeležen je porast sadržaja nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima membrana eritrocita. Iako vrednost ukupnih PUFA nije bila statistički značajno viša na kraju interventnog perioda u odnosu na početnu vrednost ( $p=0,07$ ), ovaj rezultat je od

značaja jer upućuje na smanjenje oksidativnog oštećenja membranskih lipida. Relativni sadržaj n-3 PUFA značajno je porastao nakon 4 nedelje svakodnevne konzumacije 200 mL Soka A ( $p < 0,05$ ). Zastupljenost najvažnijih pojedinačnih n-3 masnih kiselina, EPA (C20:5n-3) i DHA (C22:6n-3), nije se statistički značajno promenila. Ipak, za obe kiseline zabeležena je tendencija porasta u njihovom relativnom sadržaju, nešto izraženija u slučaju EPA ( $p = 0,062$ ). Posledično, omega-3 indeks bio je statistički značajno viši na kraju interventnog perioda ( $p = 0,05$ ). Za razliku od prethodne dve grupe, kod ispitanika sa povišenim krvnim pritiskom redovna konzumacija soka od aronije u trajanju od 4 nedelje nije dovela do značajnog smanjenja relativnog odnosa n-6/n-3 ( $p = 0,297$ ). S obzirom da je sadržaj n-3 PUFA statistički povećan, ovo se može objasniti blagim porastom i u sadržaju ukupnih n-6 PUFA koji je za masnu kiselinu C20:3n-6 bio statistički značajan ( $p < 0,05$ ). Indeks nezasićenosti, kao merilo prosečnog sadržaja dvostrukih veza u masnim kiselinama bio je viši na kraju interventnog perioda u odnosu na vrednost pre početka konzumacije. Ipak, kao i u slučaju sadržaja PUFA, ovaj porast nije bio statistički značajan ( $p = 0,061$ ).

Pokazano je da je patogeneza arterijske hipertenzije povezana sa modifikovanim profilom masnih kiselina u membranskom lipidnom matriksu. Smatra se da upravo ova modifikacija, pre svega smanjen sadržaj PUFA, deluje stimulatивно na sintezu proinflamatornih eikozanoida i čini mišićne ćelije u arterijskom zidu osetljivijim na uticaj vazokonstriktora (143). Zajedno sa povećanom membranskom viskoznošću, ovo doprinosi nastanku hipertenzije. Deficit PUFA u membrani dovodi do promena u fluidnosti fosfolipida kao i konfiguraciji i funkciji integralnih proteina, jonskih kanala i receptora (153,154). Hipotenzivni efekti n-3 masnih kiselina dovode se u vezu sa regulacijom vaskularne, srčane i autonomne funkcije. Uticaj na vaskularnu funkciju n-3 masne kiseline, između ostalog, ostvaruju i na nivou ćelijske membrane, s obzirom da utiču na njene fizičko-hemijske karakteristike, fluidnost i permeabilnost. Ovo se odražava na funkciju kako membrane, tako i membranski vezanih proteina (155). Povećanje sadržaja n-3 masnih kiselina u membrani moduliše signalne puteve i doprinosi antiinflamatornim i antiaritmijским efektima kroz interakciju sa membranskim kanalima i receptorima. N-3 PUFA su ligandi za nuklearne receptore u različitim tkivima, a uticaj na inflamatorne procese i metabolizam lipida ostvaruju i kroz regulaciju genske ekspresije nuklearnih receptora i transkripcionih faktora (154).



Pored pokazane inverzne asocijacije između sadržaja PUFA u membranama i rizika za nastanak hipertenzije (41) masnokiselinski profil membrana od značaja je u određivanju ukupnog kardiovaskularnog rizika. Studija koja je evaluirala sadržaj n-3 masnih kiselina u membranama eritrocita kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom, anginom pectoris ili infarktom miokarda, ustanovila je negativnu asocijaciju između sadržaja EPA i DHA i rizika za ove kardiovaskularne događaje (156). Autori studije dalje dodaju da porast sadržaja n-3 masnih kiselina u membranama kardiocita smanjuje podložnost ventrikularnim aritmijama i smanjuje verovatnoću srčanog napada i iznenadne smrti. Ispitivanje povezanosti između ambulatorno merenog krvnog pritiska i profila masnih kiselina u eritrocitima pokazalo je negativnu korelaciju između 24 h SBP i relativnog sadržaja n-3 masnih kiselina u membrani. Negativna korelacija pokazana je, nezavisno od godina, pola i ITM, kako za sadržaj ukupnih n-3 masnih kiselina tako i za omega-3 indeks i relativni sadržaj EPA (157).

Ambulatorno merenje krvnog pritiska se sve više preporučuje u kliničkoj praksi, naročito kod pacijenata sa velikim varijacijama u vrednostima krvnog pritiska merenog u ordinaciji ili u kućnim uslovima (158). Ovaj način omogućava praćenje pritiska tokom 24 h pri uobičajenim dnevnim aktivnostima, a smatra se da može da dijagnostikuje hipertenziju u čak 10 do 40 % ispitanika koji su normotenzivni pri uobičajenom merenju krvnog pritiska (159,160). Dodatno, brojne studije pokazale su da rizik za kardiovaskularne bolesti bolje koreliše sa vrednostima krvnog pritiska dobijenim ambulatornim putem nego sa uobičajenim merenjem u ordinaciji (161-163). Između ostalog, ambulatorno merenje preporučuje se kada se prati efekat antihipertenzivne terapije jer smanjuje varijabilnost procene krvnog pritiska. Uzimajući u obzir navedeno, upravo ambulatornim merenjem krvnog pritiska pratili smo potencijalni hipotenzivni efekat svakodnevne konzumacije Soka A u trajanju od 4 nedelje u III Grupi ispitanika.

Rezultati ispitivanja uticaja svakodnevne konzumacije 200 mL Soka A na vrednosti krvnog pritiska u Grupi III upućuju na potencijalno hipotenzivno delovanje aronije. Nakon 4 nedelje konzumacije soka zabeleženo je statistički značajno smanjenje ( $p < 0,05$ ) prosečnog krvnog pritiska u toku 24 h, koje je iznosilo za sistolni 7,3 mmHg, odnosno 4,0 mmHg za dijastolni. Ovakav efekat zabeležen je i za prosečne vrednosti pritiska u toku dana, kada su vrednosti SBP i DBP snižene za 7,8 mmHg ( $p < 0,05$ ) i 4,7 mmHg ( $p < 0,05$ ). U slučaju vrednosti u toku sna, nije bilo većih promena. Statistički

značajno smanjena je standardna devijacija, odnosno variranje sistolnog krvnog pritiska u toku dana ( $p < 0,01$ ), kao i pulsni pritisak u toku 24 h ( $p < 0,05$ ).

U skladu sa rezultatima dobijenim u Grupi III, bilo je zabeleženo smanjenje krvnog pritiska u Grupi II koje je bilo na granici statističke značajnosti za vrednost sistolnog pritiska ( $p = 0,05$ ) i iznosilo je 6,3 mmHg. Iako su vrednosti krvnog pritiska u Grupi II određivane klasičnim putem, zabeleženi hipotenzivni efekat je od značaja s obzirom na ukazanu povezanost gojaznosti, naročito centralne akumulacije masti, sa rizikom za nastanak hipertenzije i KVB. Može se reći, da je ovakav efekat bio očekivan budući da je sok od aronije pokazao povoljan efekat na nivo oksidativnog stresa i ITM u Grupi II, a kao što je već navedeno oksidativni stres i prekomerna telesna masa doprinose patogenezi hipertenzije.

Povoljno delovanje proizvoda od aronije na krvni pritisak pokazano je i u drugim humanim interventnim studijama. Statistički značajno smanjenje krvnog pritiska, kako sistolnog tako i dijastolnog, zabeleženo je kod ispitanika sa metaboličkim sindromom nakon redovne konzumacije polifenolima bogatog ekstrakta aronije u trajanju od 2 meseca (94). Slično je pokazano i kod osoba sa blagom hiperholesterolemijom kod kojih je 6 nedelja duga konzumacija soka od aronije rezultovala smanjenjem krvnog pritiska, koje je bilo statistički značajno za DBP (95). Primena ekstrakta aronije bogatog flavonoidima u trajanju od 6 nedelja pokazala je značajnu redukciju SBP i DBP kod pacijenata koji su preživeli infarkt miokarda i redovno uzimali statine (96).

Poslednjih godina intenzivno se traga za prirodnim proizvodima koji bi se, zahvaljujući prisutnim aktivnim komponentama, mogli primenjivati kao funkcionalna hrana sa antihipertenzivnim delovanjem. Rezultati epidemioloških studija su pokazali da unos polifenola smanjuje rizik za nastanak ateroskleroze kroz povoljan efekat na krvni pritisak, lipidni profil i nivo šećera u krvi. Hipotenzivni efekat polifenola dovodi se u vezu sa njihovim uticajem na vaskularnu funkciju i sintezu azot-monoksida (NO) u vaskularnom endotelijumu (164). Dodatno, pokazano je da pojedini flavonoidi pri svojim fiziološkim koncentracijama deluju kao inhibitori angiotenzin I-konvertujućeg enzima (ACE) i time smanjuju vazokonstriktivno dejstvo angiotenzina II. Među jedinjenjima koja su pokazala *in vitro* ACE inhibitorni efekat nalaze se i cijanidin-glikozidi, čiji su najveći biološki izvor plodovi aronije (165). Neki autori smatraju da je

hipotenzivno dejstvo proizvoda od aronije, potvrđeno *in vitro* i *in vivo*, posledica različitih mehanizama delovanja, kao i njihovog visokog antioksidativnog kapaciteta (166). Polifenolima bogat ekstrakt aronije pokazao je *in vitro* ACE inhibitornu aktivnost u plazmi zdravih ispitanika, pri čemu je  $IC_{50}$  vrednost bila oko 300 puta veća u odnosu na  $IC_{50}$  koju je pokazao kaptopril, standardni ACE inhibitor (166). Hellström i sar. su pokazali *in vivo* hipotenzivni efekat soka od aronije kod spontano hipertenzivnih pacova, koji je bio najizraženiji 3 sata po administraciji soka (167). Iako se hipotenzivno delovanje soka od aronije uglavnom pripisuje polifenolima kao glavnim aktivnim principima, neki autori smatraju da ovaj efekat potiče i od drugih komponenti soka koje na krvni pritisak deluju nezavisno ili udruženo sa polifenolima (167). Ispitivanja hemijskog sastava soka od aronije, pokazala su relativno visok sadržaj kalijuma, koji je u svežem soku iznosi nešto manje od 3 g/L, a u pasterizovanom oko 2 g/L (86). Adekvatan unos kalijuma pokazuje povoljan efekat na krvni pritisak i smanjuje rizik od srčanih aritmija. Meta-analiza randomizovanih kliničkih studija pokazala je da unos suplemenata kalijuma redukuje vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska kako kod hipertenzivnih tako i kod normotenzivnih osoba (117).

Povoljan efekat koji je konzumacija soka ploda aronije pokazala na vrednosti krvnog pritiska u Grupama II i III značajan je pokazatelj njegovog kardioprotektivnog delovanja. Hipertenzija se smatra vodećim faktorom rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti i povezana je sa brojnim neželjenim događajima, kao što su srčana insuficijencija, aritmije, fatalni infarkt miokarda, moždani udar i intrakranijalna hemoragija (168-170). Kod starijih ljudi pokazana je direktna asocijacija između SBP, DBP i pulsog pritiska i rizika od infarkta miokarda i šloga, a kao najbolji prediktor kardiovaskularnih događaja pokazao se SBP (169). Iako je asocijacija između kardiovaskularnog rizika i različitih stadijuma hipertenzije široko prihvaćena, daleko manji broj studija ocenjivao je apsolutni i relativni rizik za KVB kod ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom. Ipak, ispitivanje sprovedeno u različitim etničkim grupama pokazalo je da je i visoki-normalan krvni pritisak faktor rizika za koronarnu bolest srca i to kod oba pola (51). Dodatno, rizik za pojavu infarkta miokarda i šloga praćen u urbanoj populaciji Japana, bio je veći kod osoba sa visokim-normalnim krvnim pritiskom u odnosu na osobe sa vrednostima krvnog pritiska u optimalnom opsegu (171).

Kod većine osoba kojima je dijagnostikovana hipertenzija, pored povišenog krvnog pritiska, prisutni su i dodatni faktori rizika za nastanak KVB. Zapravo, mali broj ljudi ima izolovanu hipertenziju. Hipertenzija je često praćena visokim vrednostima holesterola, triglicerida, povećanim ITM, glikemijom i povišenim srčanim ritmom (172). Smatra se da incidenca kardiovaskularnih događaja zavisi od dodatnih faktora rizika, prisutnih uz povišen pritisak, kao i njihovog broja (49,173,174). Povoljni efekti aronije na tradicionalne metaboličke faktore rizika za nastanak KVB, pokazan je u različitim interventnim studijama (93-96). Rezultati svakodnevne konzumacije Soka A kod ispitanika u Grupi III pokazali su statistički značajno smanjenje nivoa triglicerida nakon 4 nedelje ( $p < 0,05$ ). Ovo je bilo u skladu sa prethodnim studijama. Značajno smanjenje nivoa triglicerida, kao i ukupnog i LDL holesterola zabeleženo je kod ljudi sa blagom hiperholesterolemijom nakon 6 nedelja svakodnevne konzumacije soka (95). Slično je pokazano i nakon 2 meseca konzumacije ekstrakta aronije kod ljudi sa metaboličkim sindromom (94). U slučaju Grupe III, zabeleženu su i nešto niže vrednosti LDL holesterola na kraju interventnog perioda, ali ovo nije bilo statistički značajno ( $p = 0,090$ ). Kod druge dve grupe ispitanika, nisu zabeležene značajnije promene u biohemijskim parametrima. U slučaju Grupe I, koju su činili zdravi ispitanici bez faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, vrednosti svih merenih biohemijskih parametara bile su u referentnim intervalima, kako na početku tako i na kraju interventnog perioda. Kod Grupe II zabeležene su povišene vrednosti ukupnog i LDL holesterola, triglicerida i glukoze pre početka konzumacije soka. Iako je, osim u slučaju glukoze, zabeležen pad u vrednostima ovih parametara, promene nisu bile statističke značajne. Pad u ukupnom i LDL holesterolu, praćen je smanjenjem vrednosti HDL holesterola ( $p < 0,05$ ).

Imajući u vidu utvrđenu asocijaciju između oksidativnog stresa i patogeneze hroničnih bolesti, u cilju smanjenja učestalosti njihovog nastanka i kardiovaskularnog rizika, predloženo je uključivanje dijetarnih antioksidanasa u svakodnevnu ishranu (65,66). Među komponentama prisutnim u biljnoj hrani, kao najpotentniji antioksidansi izdvajaju se polifenoli, s obzirom na njihovu široku zastupljenost, visok dijetarni unos i izražen antioksidativni kapacitet. Hrana bogata polifenolima, pre svega, voće, čajevi i crno vino, pokazala je korisne efekte po zdravlje ljudi u brojnim epidemiološkim studijama. Smanjenje nivoa oksidativnog stresa i inflamatornih procesa nakon

suplementacije polifenolima bogatim proizvodima zabeleženi su kod ispitanika sa različitim faktorima rizika za KVB, kao što su pacijenti na dijalizi, oboleli od dijabetesa i osobe sa metaboličkim sindromom (175-177). Od značaja je i činjenica da su protektivni efekti dijetarnih antioksidanasa ustanovljeni i kod zdravih dobrovoljaca, kako mladih, tako i starijih, te je sugerisano na njihovu potencijalnu primenu u primarnoj prevenciji kardiovaskularnih i drugih bolesti (175,178). Tako je smanjenje nivoa lipidne peroksidacije zabeleženo i kod ispitanika sa metaboličkim sindromom i u zdravoj kontrolnoj grupi nakon suplementacije sokom od citrusa koji je u sebi sadržao ekstrakt aronije (175).

Polifenoli se smatraju bioaktivnim principima plodova aronije i njihovih proizvoda, zaslužnim za povoljne efekte na očuvanje zdravlja ljudi. Među prisutnim klasama polifenola, najviše pažnje posvećuje se antocijanima, koji čine oko 25% ukupnih polifenola u plodovima aronije. Smatra se da njihov doprinos antoksidativnoj aktivnosti soka od aronije iznosi i do 40% (84). Antocijani su u plodovima aronije prisutni u formi cijanidin-3-glikozida, i to kao arabinozid, glukozid, galaktozid i ksilozid. Da bi polifenoli, kao i druge komponente hrane, delovali u organizmu, moraju putem krvi da dospeju do tkiva, odnosno ćelija ciljnih organa. Zbog toga je neophodno identifikovanje formi i metabolita u kojima su dijetarni polifenoli prisutni u organizmu. Za većinu polifenolnih jedinjenja pokazano je da se intenzivno metabolišu, te se molekularne forme u kojima su prisutni u cirkulaciji razlikuju od oblika u kojima su prisutni u hrani. Kao rezultat metaboličkih transformacija, polifenoli su u organizmu najčešće prisutni u formi metabolita, konjugata, odnosno glukuronida i sulfata, koji mogu biti dodatno metilovani (179). Iako je zabeležen značajan pomak u identifikovanju formi u kojima su polifenoli prisutni *in vivo*, podaci koji se tiču bioraspoloživosti i metabolizma antocijana nisu u potpunosti uniformni. U literaturi se antocijani često navode kao klasa polifenola sa slabom apsorpcijom i brзом eliminacijom, te veoma niskom bioraspoloživošću. U skladu sa tim, kompromitovani su zaključci o njihovom delovanju *in vivo* (73). Ipak, novije istraživanje identifikovalo je cijanidin-glikozide u neizmenjenoj formi i u formi metabolita u organizmu, nakon konzumacije soka od aronije koji je sadržao antocijane u relevantnim dnevnim dozama. Prisustvo neizmenjenih formi antocijana, njihovih glukuronida i metilovanih derivata, pokazano je u plazmi i urinu u toku 24 h po unošenju soka (180). Suprotno pojedinim

literaturnim navodima da se antocijani u cirkulaciji nalaze isključivo u formi nemetabolisanih glikozida, Kay i sar. su nakon administracije cijanidin-3-glikozida odraslim muškarcima, kao najzastupljenije forme u serumu detektovali konjugovane metabolite (181). Studije sprovedene na pacovima pokazale su da se antocijani brzo apsorbuju u želucu i tankom crevu, kao i da imaju široku distribuciju u organizmu (182,183). Njihovo prisustvo u različitim organima, uključujući srce i masno tkivo (183) svedoči o potencijalnim povoljnim efektima koje bi antocijani mogli ispoljiti na očuvanje zdravlja ljudi i prevenciju KVB i drugih hroničnih bolesti.

Na osnovu dobijenih rezultata i iznetih literaturnih podataka, može se zaključiti da je sok ploda aronije ispoljio povoljan efekat na nivo oksidativnog stresa kod zdravih osoba sa i bez faktora rizika za nastanak KVB. Potencijalni antioksidativni efekat soka pokazan je kroz stimulaciju aktivnosti antioksidativnih enzima eritrocita koja je zabeležena kod sve tri grupe ispitanika. Delovanje na antioksidativnu enzimsku aktivnost, uočeno je i u serumu ispitanika Grupe I, gde je pokazan rast aktivnosti PON1 prema diazoksonu. Povoljno delovanje na ćelijsku antioksidativnu zaštitu, praćeno je i smanjenjem nivoa oksidativnog oštećenja membranskih lipida. Ovo je uočeno kroz porast relativnog sadržaja ukupnih i n-3 PUFA zabeležen u sve tri grupe ispitanika. Pokazani efekat na profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita svedoče i potencijalnom kardioprotektivnom delovanju soka ploda aronije, imajući u vidu uticaj membranske strukture i funkcije na kardiovaskularno zdravlje.

Dalja ispitivanja su potrebna kako bi se u potpunosti razjasnili mehanizmi potencijalnog antioksidativnog delovanja soka. Dok kod ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1 nije zabeležen efekat ni na jedan određivan parametar oksidativnog stresa u serumu, u druge dve grupe ispitanika zabeleženo je smanjenje TBARS i PAB, kao pokazatelja oksidativnog oštećenja. Dodatno, kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću zabeležen je i porast TAS, što je od značaja s obzirom na pokazanu vezu između gojaznosti i sniženog antioksidativnog kapaciteta. Nasuprot tome, u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za nastanak KVB zabeleženo je smanjenje nivoa SH grupa i TAS. Ipak, kada se porede vrednosti parametara oksidativnog stresa u serumu nakon 12 nedelja konzumacije soka i one pre početka intervencije, može se reći da je zabeležena fina modulacija pojedinih

pokazatelja oksidativnog oštećenja i antioksidativne zaštite. Ovo upućuje na potencijalnu primenu soka od aronije i kod ljudi bez faktora rizika za kardiovaskularne i druge hronične bolesti u cilju preveniranja istih.

## 6. ZAKLJUČCI

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije pokazali su povoljne efekte konzumacije soka ploda aronije, bogatog polifenolima, na pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu i eritrocitima zdravih osoba sa i bez faktora rizika za nastanak KVB. U skladu sa postavljenim ciljevima i na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Redovna konzumacija soka ploda aronije ispoljila je značajan uticaj na pojedine pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu koji je pokazan:

- smanjenjem nivoa TBARS, PAB, SH grupa i TAS i povećanjem aktivnosti PON1 prema diazoksonu u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za nastanak KVB nakon redovne konzumacije 100 mL soka u trajanju od 12 nedelja i

- smanjenjem nivoa PAB i TBARS i povećanjem TAS u grupi ispitanika sa abdominalnom gojaznošću nakon redovne konzumacije 100 mL soka obogaćenog glukomananom u trajanju od 4 nedelje.

2. Redovna konzumacija soka ploda aronije ispoljila je uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima pri čemu je zabeleženo:

- statistički značajno povećanje aktivnosti SOD i GPx nakon 12 nedelja redovne konzumacije kod zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB,

- statistički značajno povećanje aktivnosti GPx nakon 4 nedelje redovne konzumacije soka obogaćenog glukomananom kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću i

- statistički značajno povećanje aktivnosti sva tri praćena enzima (SOD, GPx i CAT) nakon 4 nedelje redovne konzumacije soka kod ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1.

3. Redovna konzumacija soka ploda aronije imala je uticaj na profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita koji se ispoljio kroz:



- povećanje relativnog sadržaja ukupnih PUFA, praćeno povećanjem indeksa nezasićenosti, zabeleženo u sve tri grupe ispitanika sa statističkom značajnošću u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB,

- statistički značajno povećanje relativnog sadržaja n-3 PUFA i omega-3 indeksa u sve tri grupe ispitanika,

- statistički značajno povećanje relativnog sadržaja DHA i smanjenje n-6/n-3 odnosa u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB i grupi ispitanika sa abdominalnom gojaznošću i

- statistički značajno smanjenje relativnog sadržaja ukupnih MUFA i oleinske kiseline (C18:1n-9) u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB i grupi ispitanika sa abdominalnom gojaznošću.

4. Redovna konzumacija soka ploda aronije u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za nastanak KVB dovela je do porasta u aktivnosti enzima GPx koji je bio u korelaciji sa porastom u sadržaju PUFA. Pozitivna korelacija je ustanovljena između porasta u aktivnosti GPx i porasta u relativnom sadržaju ukupnih PUFA, n-3 PUFA, n-6 PUFA i indeksa nezasićenosti nakon 12 nedelja redovne konzumacije soka.

5. Redovna konzumacija soka ploda aronije u trajanju od 4 nedelje ispoljila je uticaj na vrednosti ambulatorno merenog arterijskog krvnog pritiska kod ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1 pri čemu je zabeleženo:

- statistički značajno smanjenje prosečnog SBP i DBP u toku 24 h

- statistički značajno smanjene prosečnih vrednosti SBP i DBP u toku dana (u budnom stanju),

- statistički značajno smanjenje prosečnog pulsnoeg pritiska u toku 24 h,

- statistički značajno smanjenje standardne devijacije sistolnog krvnog pritiska u toku dana.

Redovna konzumacija soka ploda aronije obogaćenog glukomananom kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću u trajanju od 4 nedelje dovela je do smanjenja vrednosti arterijskog krvnog pritiska, merenog klasičnim putem, koje je bilo statistički značajno za SBP.

6. Redovna konzumacija soka ploda aronije obogaćenog glukomananom kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću u trajanju od 4 nedelje ispoljila je uticaj na antropometrijske parametre koji je pokazan statistički značajnim smanjenjem ITM, obima struka, mase masti i % vode.

7. Redovna konzumacija soka ploda aronije ispoljila je efekat na vrednosti biohemijskih parametara koji su tradicionalni faktori rizika za nastanak KVB. Pri tome je zabeleženo:

- statistički značajno smanjenje nivoa triglicerida kod ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1 nakon 4 nedelje redovne konzumacije soka, praćeno smanjenjem nivoa ukupnog i LDL holesterola, koje nije bilo statistički značajno i

- smanjenje nivoa ukupnog, LDL i HDL holesterola, koje je bilo statistički značajno za HDL holesterol, kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću nakon 4 nedelje redovne konzumacije soka obogaćenog glukomananom.

Zabeleženi efekti na faktore rizika za KVB u skladu su sa pokazanim delovanjem na markere oksidativnog stresa, s obzirom da brojni literaturni podaci svedoče o asocijaciji oksidativnog stresa sa patogenezo KVB i drugih hroničnih bolesti.

Povoljno delovanje na nivo oksidativnog oštećenja lipida i aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima, zajedno sa hipotenzivnim efektima i uticajem na lipidni status i antropometrijske pokazatelje gojaznosti, upućuje na značaj konzumacije soka od aronije u cilju očuvanja zdravlja ljudi i prevencije kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti.

## 7. LITERATURA

1. Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids*. 2012;165(6):638-47.
2. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
3. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45:287–306.
4. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-208.
5. Pinazo-Durán MD, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, Zanón-Moreno V, Nucci C, Dolz-Marco R, et al. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging*. 2014;9:637-52.
6. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle - 70 years later: an alternative view. *Redox Rep*. 2002;7(1):55-7.
7. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol*. 2000;304(1):55-68.
8. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004;266(1-2):37-56.
9. Liochev SI, Fridovich I. The role of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>•: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 1994;16(1):29-33.
10. Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(19-20):2173-93.
11. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric

- oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem*. 2004;385(1):1-10.
12. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(4):190-5.
13. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. 1999;65(18-19):1865-74.
14. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 2001;306(1-2):1-17.
15. Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*. 1999;13(9):1007-24.
16. Cadet JL, Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int*. 1998;32(2):117-31.
17. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*. 1997;6(4):391-7.
18. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990;9(1):1-32.
19. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(7):995-1014.
20. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):1019-26.
21. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841-56.
22. Atsumi T, Tonosaki K, Fujisawa S. Salivary free radical-scavenging activity is affected by physical and mental activities. *Oral Dis*. 2008;14(6):490-6.
23. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res*. 2004;43(3):200-27.
24. Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M. Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(6):708-16.

25. Chiou TJ, Tzeng WF. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology*. 2000;154(1-3):75-84.
26. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.
27. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1989;179(1):8-18.
28. Cao G, Prior RL. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol*. 1999;299:50-62.
29. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-7.
30. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*. 1999;299:15-27.
31. Regnström J, Ström K, Moldeus P, Nilsson J. Analysis of lipoprotein diene formation in human serum exposed to copper. *Free Radic Res Commun*. 1993;19(4):267-78.
32. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1984;105:273-82.
33. Moore K, Roberts LJ 2nd: Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 1998;28:659-671.
34. Suárez A, Ramírez-Tortosa M, Gil A, Faus MJ. Addition of vitamin E to long-chain polyunsaturated fatty acid-enriched diets protects neonatal tissue lipids against peroxidation in rats. *Eur J Nutr*. 1999;38(4):169-76.
35. Solans R, Motta C, Solá R, La Ville AE, Lima J, Simeón P, Montellà N, Armadans-Gil L, Fonollosa V, Vilardell M. Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: evidence of free radical-mediated injury. *Arthritis Rheum*. 2000;43(4):894-900.

36. Halliwell B, Chirco S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(Suppl 5):715S-725S.
37. Rice-Evans C, Miller M, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 1997;2(4):152-159.
38. Magalhães J, Ascensão A, Marques F, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Duarte JA. Effect of a high-altitude expedition to a Himalayan peak (Pumori, 7,161 m) on plasma and erythrocyte antioxidant profile. *Eur J Appl Physiol.* 2005;93(5-6):726-32.
39. Watanabe H, Kobayashi A, Yamamoto T, Suzuki S, Hayashi H, Yamazaki N. Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(6):507-14.
40. Cooper RA. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med.* 1977;297(7):371-7.
41. Wang L, Tsai M, Manson JE, Djousse L, Gaziano JM, Buring JE, Sesso HD. Erythrocyte fatty acid composition is associated with the risk of hypertension in middle-aged and older women. *J Nutr.* 2011;141(9):1691-7.
42. Piñeiro-Corrales G, Lago Rivero N, Culebras-Fernández J.M. Role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease prevention. *Nutrición hospitalaria.* 2013;28:1-5.
43. Simopoulos AP. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients.* 2013;5(8):2901-23.
44. Lee AL, Park Y. The association between n-3 polyunsaturated fatty acid levels in erythrocytes and the risk of rheumatoid arthritis in Korean women. *Ann Nutr Metab.* 2013;63(1-2):88-95.
45. Harris WS, Von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med.* 2004;39(1):212-20.
46. Hashimoto M, Shinozuka K, Gamoh S, Tanabe Y, Hossain MS, Kwon YM, et al. The hypotensive effect of docosahexaenoic acid is associated with the enhanced release of ATP from the caudal artery of aged rats. *J Nutr.* 1999;129(1):70-6.

47. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother.* 2006;60(9):502-7.
48. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health OrganTech Rep Ser.* 2003;916:i-viii:1-149.
49. D'Agostino RB Sr, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P; CHD Risk Prediction Group. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *JAMA.* 2001;286(2):180-7.
50. Van den Hoogen PC, Feskens EJ, Nagelkerke NJ, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the world. *Seven Countries Study Research Group. N Engl J Med.* 2000;342(1):1-8.
51. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2001;345(18):1291-7.
52. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens.* 2007;25(9):1751-62.
53. Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun.* 1993;19:59-66.
54. Münzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J.* 2010;31(22):2741-8.
55. Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2008;40(3):180-96.
56. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006;23(5):469-80.

57. Vague J. La differenciation sexuelle—Facteur determinant des formes de l'obesite. *Presse Med.* 1947;30:339-340.
58. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.
59. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro T, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-1761.
60. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav.* 2008;94(2):206-18.
61. Martínez JA. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *J Physiol Biochem.* 2006;62(4):303-6.
62. Berkemeyer S. The straight line hypothesis elaborated: case reference obesity, an argument for acidosis, oxidative stress, and disease conglomeration? *Med Hypotheses.* 2011;75(1):59-64.
63. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, Economou M, Stefanadis C. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(8):590-7.
64. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, Hu FB. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(1):61-7.
65. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(Suppl 1):317S-325S.
66. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(1):38-50.



67. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1997;336(16):1117-24.
68. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130(Suppl 8S):2073S-85S.
69. Zujko ME, Witkowska AM, Waśkiewicz A, Sygnowska E. Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population. *Adv Med Sci.* 2012;57(2):375-84.
70. Mitjavila MT, Moreno JJ: The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(9):1113-1122.
71. Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr.* 2011;141(5):989S-1009S.
72. Hider RC, Liu ZD, Khodr H. Metal chelating of polyphenols. In L. Packer (Eds.) *Methods in enzymology, flavonoids and other polyphenols.* San Diego: Academic Press. 2001;335:190-203.
73. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(Suppl 1):230S-42S.
74. Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford).* 2010;2010:bap024.
75. Cyboran S, Oszmiański J, Kleszczyńska H. Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane. *Cell Mol Biol Lett.* 2012;17(1):77-88.
76. Raudoniūtė I, Rovira J, Venskutonis P, Damašius J, Rivero-Pérez M, González-SanJosé, M. Antioxidant properties of garden strawberry leaf extract and its effect on fish oil oxidation. *Int J Food Sci Tech.* 2011;46(5):935-943.

77. Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmiański J, Sarapuk J, Kleszczyńska H. Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*. 2011;6(1):58-67.
78. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*. 1997;416(2):123-9.
79. Oszmiański J, Wojdyło A. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*. 2005;221:809–13.
80. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 1999;47(10):3954-62.
81. Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem*. 2008;56(4):1415-22.
82. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*. 2000;48(10):4581-9.
83. Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med*. 2008;74(13):1625-34.
84. Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem*. 2003;51(2):502-9.
85. Mattila P, Hellström J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem*. 2006;54(19):7193-9.
86. Chrubasik C, Li G, Chrubasik S. The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytother Res*. 2010;24(8):1107-14.
87. Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)*. 2006;48(2):11-7.

88. Han GL, Li CM, Mazza G, Yang XG. [Effect of anthocyanin rich fruit extract on PGE2 produced by endothelial cells]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2005;34(5):581-4.
89. Olas B, Wachowicz B, Tomczak A, Erler J, Stochmal A, Oleszek W. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* in vitro. *Platelets*. 2008;19(1):70-7.
90. Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Mihova V, Krasnaliev I, Borisova P, Belcheva A. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods Hum Nutr*. 2007;62(1):19-24.
91. Malinowska J, Babicz K, Olas B, Stochmal A, Oleszek W. *Aronia melanocarpa* extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma. *Nutrition*. 2012;28(7-8):793-8.
92. Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E, Czernek U, Szydłowska-Pazera K, Potemski P, Piekarski J, Jeziorski A. Effects of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phases of the chemotherapy. *Fitoterapia*. 2012;83(2):310-7.
93. Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)*. 2002;44(3):20-3.
94. Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit*. 2010;16(1):CR28-34.
95. Skoczynska A, Jedrychowska I, Poreba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, Andrzejak R. Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep*. 2007;59:177-182.
96. Naruszewicz M, Laniewska I, Millo B, Dłuzniewski M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in

cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). *Atherosclerosis*. 2007;194(2):e179-84.

97. Pilaczynska-Szczesniak L, Skarpanska-Steinborn A, Deskur E, Basta P, Horoszkiewicz-Hassan M. The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2005;15(1):48-58.

98. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. 2003;51(3):609-14.

99. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2002;50(10):3010-4.

100. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int*. 2005;88(5):1269-78.

101. Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull*. 2001;24(10):1202-5.

102. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma*. 1991;31(1):32-5.

103. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem*. 2007;40(3-4):248-54.

104. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-11.

105. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-85.

106. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959 ;82(1):70-7.
107. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics.* 1999;9(6):745-53.
108. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.
109. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
110. Van Kampen E, Zijlstra WG. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method. *Clin Chim Acta.* 1961;6:538-44.
111. Rose HG, Oklander M. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res.* 1965;6:428-31.
112. Cristopherson SW, Glass RL. Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J Dairy Sci.* 1969;52:1289-90.
113. Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med.* 1993;328(4):238-44.
114. Ness AR, Powles JW. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol.* 1997;26(1):1-13.
115. Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(4):922-8.
116. Marckmann P, Grønbaek M. Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr.* 1999; 53(8):585-90.
117. Whelton PK, He J, Cutler JA, Brancati FL, Appel LJ, Follmann D, Klag MJ. Effects of oral potassium on blood pressure. Meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *JAMA.* 1997;277(20):1624-32.
118. Zamora-Ros R, Serafini M, Estruch R, Lamuela-Raventós RM, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Fiol M, Lapetra J, Arós F, Covas MI, Andres-Lacueva

C;PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(12):1167-74.

119. Faff J, Frankiewicz-Józko A. Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on the exercise-induced oxidative stress in rat tissues. *Biol Sport.* 2003;20(1):15-23.

120. Skarpan´ska-Stejnborn A, Basta P, Pilaczyn´ska-Szcześniak Ł. The influence of supplementation with the black currant (*Ribes nigrum*) extract on selected prooxidative-antioxidative balance parameters in rowers. *Stud Phys Cult Tourism.* 2006;13(2):51-8.

121. Rosenblat M, Volkova N, Attias J, Mahamid R, Aviram M. Consumption of polyphenolic-rich beverages (mostly pomegranate and black currant juices) by healthy subjects for a short term increased serum antioxidant status, and the serum's ability to attenuate macrophage cholesterol accumulation. *Food Funct.* 2010;1(1):99-109.

122. Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M. In vivo influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monit.* 2012;18(9):CR569-74.

123. Kędzińska M, Głowacki R, Czernek U, Szydłowska-Pazera K, Potemski P, Piekarski J, Jeziorski A, Olas B. Changes in plasma thiol levels induced by different phases of treatment in breast cancer; the role of commercial extract from black chokeberry. *Mol Cell Biochem.* 2013;372(1-2):47-55.

124. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;369(1):78-88.

125. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983;67(5):968-77.

126. Elisaf M. The treatment of coronary heart disease: an update. Part 1: An overview of the risk factors for cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin.* 2001;17(1):18-26.

127. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9:813-39

128. Tonstad S, Malik N, Haddad E. A high-fibre bean-rich diet versus a low-carbohydrate diet for obesity. *J Hum Nutr Diet.* 2014;27(Suppl2):109-16.
129. Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Hennekens CH, Willett WC. Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(3):412-9.
130. Pietinen P, Rimm EB, Korhonen P, Hartman AM, Willett WC, Albanes D, Virtamo J. Intake of dietary fiber and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Circulation.* 1996;94(11):2720-7.
131. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to konjac mannan (glucomannan) and reduction of body weight. *EFSA J.* 2010;8(10):1798.
132. Onakpoya I, Posadzki P, Ernst E. The efficacy of glucomannan supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Nutr.* 2014;33(1):70-8.
133. Keithley JK, Swanson B, Mikolaitis SL, DeMeo M, Zeller JM, Fogg L, Adamji J. Safety and efficacy of glucomannan for weight loss in overweight and moderately obese adults. *J Obes.* 2013;2013:610908.
134. Tsuda T, Ueno Y, Aoki H, Koda T, Horio F, Takahashi N, Kawada T, Osawa T. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(1):149-57.
135. Guo H, Ling W, Wang Q, Liu C, Hu Y, Xia M. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(6):1393-401.
136. Qin B, Anderson RA. An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Br J Nutr.* 2012;108(4):581-7.

137. Roopchand DE, Kuhn P, Rojo LE, Lila MA, Raskin I. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacol Res.* 2013;68(1):59-67.
138. Buchwald H, Menchaca HJ, Michalek VN, Rohde TD, Hunninghake DB, O'Dea TJ. Plasma cholesterol: an influencing factor in red blood cell oxygen release and cellular oxygen availability. *J Am Coll Surg.* 2000;191(5):490-7.
139. Kowalczyk E, Fijałkowski P, Kura M, Krzesiński P, Błaszczak J, Kowalski J, Smigielski J, Rutkowski M, Kopff M. The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia. *Pol Merkur Lekarski.* 2005;19(113):651-3.
140. Kuliaviene I, Gulbinas A, Cremers J, Pundzius J, Kupcinskas L, Dambrauskas Z, Jansen E. Fatty acids of erythrocyte membrane in acute pancreatitis patients. *World J Gastroenterol.* 2013;19(34):5678-84.
141. Pastor MC, Sierra C, Doladé M, Navarro E, Brandi N, Cabré E, Mira A, Serés A. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin Chem.* 1998;44(5):924-9.
142. Ozbay B, Dülger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med.* 2002;197(2):119-24.
143. Novgorodtseva TP, Kantur TA, Karaman YK, Antonyuk MV, Zhukova NV. Modification of fatty acids composition in erythrocytes lipids in arterial hypertension associated with dyslipidemia. *Lipids Health Dis.* 2011;10:18.
144. Mori TA. Omega-3 fatty acids and hypertension in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(9):842-6.
145. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808.
146. Gordon S. The macrophage. *Bioessays.* 1995;17(11):977-86.



147. Bento LM, Fagian MM, Vercesi AE, Gontijo JA. Effects of NH<sub>4</sub>Cl-induced systemic metabolic acidosis on kidney mitochondrial coupling and calcium transport in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(10):2817-23.
148. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA*. 1999;282(16):1523-9.
149. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, Prabhala A, Afzal A, Garg R. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(1):355-62.
150. Egan BM, Greene EL, Goodfriend TL. Insulin resistance and cardiovascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14(6 Pt 2):116S-125S.
151. Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res*. 2004;45(10):1846-51.
152. Aguilar Cordero MJ, González Jiménez E, Sánchez Perona J, Padilla López CA, Álvarez Ferre J, Ocete Hita E, Rizo Baeza M, Guisado Barrilao R, García Rivas F. Obesity and its relation with markers of inflammation and erythrocyte fatty acids in a group of overweight adolescents. *Nutr Hosp*. 2012;27(1):161-4.
153. Dart C. Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. *J Physiol*. 2010 ;588(Pt 17):3169-78.
154. Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(20):2047-67.
155. Mori TA, Bao DQ, Burke V, Puddey IB, Beilin LJ. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension*. 1999;34(2):253-60.
156. Block RC, Harris WS, Reid KJ, Sands SA, Spertus JA. EPA and DHA in blood cell membranes from acute coronary syndrome patients and controls. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):821-8.

157. Park Y, Oh SH, Rhee MY. Association between 24-hour ambulatory blood pressure and erythrocyte n-3 polyunsaturated fatty acids in Korean subjects with hypertension. *Nutr Res.* 2010;30(12):807-14.
158. Myers MG. Ambulatory blood pressure monitoring for routine clinical practice. *Hypertension.* 2005;45(4):483-4.
159. Pickering TG, Davidson K, Gerin W, Schwartz JE. Masked hypertension. *Hypertension.* 2002;40(6):795-6.
160. Mallion JM, Clerson P, Bobrie G, Genes N, Vaisse B, Chatellier G. Predictive factors for masked hypertension within a population of controlled hypertensives. *J Hypertens.* 2006;24(12):2365-70.
161. Clement DL, De Buyzere ML, De Bacquer DA, de Leeuw PW, Duprez DA, Fagard RH, Gheeraert PJ, Missault LH, Braun JJ, Six RO, Van Der Niepen P, O'Brien E; Office versus Ambulatory Pressure Study Investigators. Prognostic value of ambulatory blood-pressure recordings in patients with treated hypertension. *N Engl J Med.* 2003;348(24):2407-15.
162. White WB. Relating cardiovascular risk to out-of-office blood pressure and the importance of controlling blood pressure 24 hours a day. *Am J Med.* 2008;121(Suppl 8):S2-7.
163. Dolan E, Stanton A, Thijs L, Hinedi K, Atkins N, McClory S, Den Hond E, McCormack P, Staessen JA, O'Brien E. Superiority of ambulatory over clinic blood pressure measurement in predicting mortality: the Dublin outcome study. *Hypertension.* 2005;46(1):156-61.
164. Appeldoorn MM, Venema DP, Peters TH, Koenen ME, Arts IC, Vincken JP, Gruppen H, Keijer J, Hollman PC. Some phenolic compounds increase the nitric oxide level in endothelial cells in vitro. *J Agric Food Chem.* 2009;57(17):7693-9.
165. Balasuriya N, Rupasinghe HP. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chem.* 2012;135(4):2320-5.

166. Sikora J, Broncel M, Mikiciuk-Olasik E. Aronia melanocarpa Elliot reduces the activity of angiotensin i-converting enzyme-in vitro and ex vivo studies. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:739721.
167. Hellström JK, Shikov AN, Makarova MN, Pihlanto AM, Pozharitskaya ON, Ryhänen EL, Kivijärvi P, Makarov VG, Mattila PH. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var. Viking). *J Funct Foods*. 2010;2(2):163-169.
168. Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertens*. 1994;7(7 Pt 2):7S-12S.
169. Psaty BM, Furberg CD, Kuller LH, Cushman M, Savage PJ, Levine D, O'Leary DH, Bryan RN, Anderson M, Lumley T. Association between blood pressure level and the risk of myocardial infarction, stroke, and total mortality: the cardiovascular health study. *Arch Intern Med*. 2001;161(9):1183-92.
170. Thrift AG, McNeil JJ, Forbes A, Donnan GA. Risk factors for cerebral hemorrhage in the era of well-controlled hypertension. Melbourne Risk Factor Study (MERFS) Group. *Stroke*. 1996;27(11):2020-5.
171. Kokubo Y, Kamide K, Okamura T, Watanabe M, Higashiyama A, Kawanishi K, Okayama A, Kawano Y. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease in a Japanese urban cohort: the Suita study. *Hypertension*. 2008;52(4):652-9.
172. Thomas F, Rudnichi A, Bacri AM, Bean K, Guize L, Benetos A. Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors. *Hypertension*. 2001;37(5):1256-61.
173. Jackson R, Lawes CM, Bennett DA, Milne RJ, Rodgers A. Treatment with drugs to lower blood pressure and blood cholesterol based on an individual's absolute cardiovascular risk. *Lancet*. 2005;365(9457):434-41.
174. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24(11):987-1003.

175. Bernabé J, Mulero J, Cerdá B, García-ViguerabC, Moreno DA, Parra S, Avilés F, Gil-Izquierdo A, Abellán J, Zafrilla P. Effects of citrus based juice on biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome patients. *J Funct Foods*. 2013;5(3):1031-8.
176. Boaventura BCB, Di Pietro PF, Klein GA, Stefanuto A, de Morais EC, de Andrade F, Wazlawik E, da Silva EL. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. *J Funct Foods*. 2013.5(3):1057-64.
177. Vertolli U, Davis PA, Dal Maso L, Maiolino G, Naso A, Plebani M, Calò LA. Daily green tea extract supplementation reduces prothrombotic and inflammatory states in dialysis patients. *J Funct Foods*. 2013;5(3):1366-71.
178. Abete I, Perez-Cornago A, Navas-Carretero S, Bondia-Pons I, Zulet MA, Martinez JA. A regular lycopene enriched tomato sauce consumption influences antioxidant status of healthy young-subjects: A crossover study. *J Funct Foods*. 2013;5(1): 28-35.
179. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr*. 2004;80(1):15-21.
180. Wiczowski W, Romaszko E, Piskula MK. Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans. *J Agric Food Chem*. 2010;58(23):12130-6.
181. Kay CD, Mazza GJ, Holub BJ. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr*. 2005;135(11):2582-8.
182. Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Manach C, Lamaison JL, Rémésy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J Nutr*. 2004;134(9):2275-9.
183. Felgines C, Texier O, Garcin P, Besson C, Lamaison JL, Scalbert A. Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(9):1098-103.

## 8.PRILOZI

### PRILOG 1. Hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu

**Tabela P1.** Hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu

Naziv hemikalije	Proizvođač
Folin-Ciocalteu reagens	Sigma-Aldrich, Nemačka
Natrijum-karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Sigma-Aldrich, Nemačka
Galna kiselina	Sigma-Aldrich, Nemačka
Kalijum-hlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Natrijum-acetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	Sigma-Aldrich, Nemačka
Metanol	Zorka Pharma, Srbija
Etanol	Zorka Pharma, Srbija
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Hlorovodonična kiselina	Centrohém, Srbija
Tiobariturna kiselina (TBA)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Trihlorsirćetna kiselina (TCA)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Malondialdehid bis-dimetilacetal	Acros Organics, Belgija
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)	Acros Organics, Belgija
Vodonik-peroksid (30%)	Acros Organics, Belgija
Mokraćna kiselina	Acros Organics, Belgija
Dimetil-sulfoksid (DMSO)	Acros Organics, Belgija
Hloramin T	Acros Organics, Belgija
Peroksidaza	Acros Organics, Belgija

Ksilenol-oranž	Acros Organics, Belgija
Natrijum-hlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Sumporna kiselina	Centrohem, Srbija
Glicerol	Lach: Ner, Češka
Feroamonijum-sulfat	Acros Organics, Belgija
O-dianizidin-dihidrochlorid	Sigma-Aldrich, Nemačka
2,2-azobis(3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat) (ABTS)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Trolox: 6-hidroksi-2,5,7,8 - tetrametilroman-2-karboksilna kiselina	Sigma-Aldrich, Nemačka
2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiselina (DTNB)	Merck, Nemačka
Glutation (GSH)	Acros Organics, Belgija
Kalcijum-hlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Nemačka
Paraokson (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat)	Chem Service, SAD
Diazokson (O,O-dietil-O-(2-izopropil-6-metil-4-pirimidinil)-fosfat)	Chem Service, SAD
Izopropanol	Centrohem, Srbija
Hloroform	Centrohem, Srbija
Butil-hidroksitoluen (BHT)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Petrol etar	Centrohem, Srbija
Dietil etar	Centrohem, Srbija
Sirćetna kiselina	Centrohem, Srbija
Silika gel GF <sub>254</sub>	Merck, Nemačka
Natrijum-hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Nemačka
n-Heksan	J. T. Baker, SAD
Standard masnih kiselina	Sigma-Aldrich, Nemačka

**PRILOG 2.** Rastvori korišćeni u eksperimentalnom radu**Tabela P2.** Rastvori korišćeni u eksperimentalnom radu

Naziv rastvora	Sastav
Pufer sa natrijum-acetatom	0,4 M CH <sub>3</sub> COONa x 3H <sub>2</sub> O pH 4,5 (HCl)
Pufer sa kalijum-hloridom	0,025 M KCl pH 1 (HCl)
Acetatni pufer pH 5,6	0,05 M CH <sub>3</sub> COOH pH 5,6 (2,5 M NaOH)
Acetatni pufer pH 4,5	0,05 M CH <sub>3</sub> COOH pH 5,6 (2,5 M NaOH)
Acetatni pufer pH 3,6	0,03 M CH <sub>3</sub> COOH 0,03 M CH <sub>3</sub> COONa
Acetatni pufer pH 5,8	0,04 M CH <sub>3</sub> COOH 0,04 M CH <sub>3</sub> COONa
Fosfatni pufer pH 7,4	0,03 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,03 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Fosfatni pufer pH 7	0,05 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Fosfatni pufer pH 9	0,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,002 M tetranatrijum-EDTA pH 9 (NaOH ili HCl)
Tris-HCl pufer pH 8,5	1 M Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol) pH 8.5 (1 M HCl)
Tris-HCl pufer pH 8,0	1 M Tris pH 8 (1 M HCl)
Drabkin reagens	Komercijalan; MOL Beograd, Srbija

## **BIOGRAFIJA**

Nevena Kardum rođena je 21.4.1987. godine u Novom Sadu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu, odsek farmacija, upisala je školske 2006/07. godine, a diplomirala 11. jula 2011. godine kao student generacije, sa prosečnom ocenom 9,78. Time je stekla zvanje magistar farmacije. Doktorske akademske studije, modul Medicinska biohemija, upisala je školske 2011/12. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 17. oktobra 2011. godine zaposlena je na Institutu za medicinska istraživanja, u Centru izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma. Septembra 2013. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik. U toku dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada, Nevena Kardum angažovana je na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji (III 41030). Trenutno je uključena i u rad evropskog projekta pod nazivom: Povoljni efekti dijetarnih bioaktivnih peptida i polifenola na kardiovaskularno zdravlje ljudi (Bacchus) (FP7). Takodje je učestvovala u projektu finansiranom od strane Evropske komisije pod nazivom: Održiva eksploatacija bioaktivnih komponenata tradicionalnih namirnica crnomorskog regiona (BaSeFood) (FP7). Autor je i koautor 6 radova publikovanih u međunarodnim časopisima, od kojih 3 rada čine deo doktorske teze. Autor je i koautor 9 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova, od kojih su 2 rezultati iz doktorske disertacije.



## IZJAVA O AUTORSTVU

Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписана \_\_\_\_\_ Невена Кардум \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ 3/11 \_\_\_\_\_

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај сока плода ароније на маркере оксидативног статуса и профил  
масних киселина код здравих особа са и без фактора ризика за настанак  
кардиоваскуларних болести

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 15.02.2015.

Невена Кардум

## IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Невена Кардум

Број индекса 3/11

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Утицај сока плода ароније на маркере оксидативног статуса и профил масних киселина код здравих особа са и без фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести

Ментор Др Славица Спасић, професор емеритус Фармацеутског факултета Универзитета у Београду

Потписана Невена Кардум

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 15.02.2015.

Невена Кардум

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај сока плода ароније на маркере оксидативног статуса и профил масних киселина код здравих особа са и без фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15.02.2015.

