

Hepatoprotektivni učinak aronije u c57bl miša

Vučinić, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:197838>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Valentina Vučinić

6413/N

HEPATOPROTEKTIVNI UČINAK ARONIJE U
C57BL MIŠA
ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i biokemija hrane

Mentor: Izv. prof. dr.sc. *Irena Landeka Jurčević*

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Hepatoprotektivni učinak aronije u C57BL miša

Valentina Vučinić, 6413/N

Sažetak: *Aronia melanocarpa* je voće bogato fenolnim spojevima - uglavnom flavonoidima iz podrazreda antocijana. Antocijani su u vodi topljivi biljni pigmenti s antioksidacijskim, protuupalnim, antimikrobnim, hepatoprotektivnim i gastroprotektivnim svojstvima. Proučavali smo učinak praha *A. melanocarpa* (PAM) u miša sa 2%-tnim kolesterolom izazvanom hiperkolesterolemijom. PAM (1 g/kg/dan) je primjenjen oralno. Malondialdehid (MDA), superoxide dismutaza (SOD), reducirani glutation (GSH) i oksidirani glutation (GSSG) određeni su u jetri miša i korišteni kao biokemijski markeri oksidacijskog stresa. Primjena kolesterola izazvala je lipidnu peroksidaciju u jetri (izmjereno preko malondialdehida - MDA) i iscrpljivanje reduciranog glutationa (GSH). U usporedbi s kontrolom, SOD i GSH znatno su povećani ($p < 0,05$) u grupi miševa koji su tretirani sa prahom aronije.

Ključne riječi: hepatoprotektivni učinak, *Aronia melanocarpa*, MDA, SOD, GSH

Rad sadrži: 34 stranice, 7 slika, 2 tablice, 63 literaturnih navoda

Jezik izvornika : hrvatski

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

Mentor: Izv. prof. dr.sc. Irena Landeka Jurčević

Pomoć pri izradi

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Hepatoprotective effect of *aronia* in mouse C57BL

Valentina Vučinić, 6413/N

Abstract: *Aronia melanocarpa* fruits are rich in phenolic substances—mainly flavonoids from the anthocyanin subclass. The anthocyanins are water-soluble plant pigments with antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, hepatoprotective, gastroprotective and other activities. We studied the effect of *A. melanocarpa* powder (PAM) on 2% cholesterol induced hypercholesterolemia in mice. PAM (1 g/kg/day) was applied orally. Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase and also reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in mouse liver were determined and used as biochemical markers of the oxidative status. The administration of cholesterol increased liver lipid peroxidation (as measured by malondialdehyde - MDA) and caused a depletion of liver reduced glutathione (GSH). Compared with the control, SOD and GSH were significantly increased ($p < 0.05$) in the group of mice treated with powder chokeberry.

Keywords: Hepatoprotective effect, *Aronia melanocarpa*, MDA, SOD, GSH

Thesis contains: 34 pages, 7 figures, 2 tables, 63 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor : Irena Landeka Jurčević, PhD, Associate Professor

Technical support and assistance

Thesis delivered: September 2015.

SADRŽAJ

1.0. UVOD	1
2.0. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ARONIJA (<i>Aronia melanocarpa</i>)	2
2.1.1. Kemijski sastav aronije	3
2.2. REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE (RKV) I SLOBODNI RADIKALI	5
2.3. ANTIOKSIDACIJSKA OBRANA OD RKV	6
2.3.1. Superoksid dismutaza (SOD)	7
2.3.2. Glutation peroksidaza (GPx)	8
2.4. OKSIDACIJSKI STRES	8
2.4.1. Lipidna peroksidacija	9
2.5. ULOGA ARONIJE U ORGANIZMU I UTJECAJ NA ZDRAVLJE	10
3.0. MATERIJALI I METODE	13
3.1. MATERIJALI	13
3.2. POKUSNE ŽIVOTINJE	13
3.2.1. Eksperimentalne grupe životinja	14
3.2.2. Priprema tkiva jetre za određivanje antioksidacijskih enzima	14
3.3. MJERENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA)	15
3.3.1. Priprema otopina	15
3.2.2. Postupak	15
3.4. AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH)	16
3.4.1. Postupak	16
3.5. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)	16
3.5.1. Priprema otopina	16
3.5.2. Postupak	17
3.6. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO LOWRYJU	17
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
3.7.1. Statističke metode	18
4.0. REZULTATI	19
4.1. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA AKTIVNOST ENZIMA REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH) U JETRI C57BL MIŠA	19
4.2. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA AKTIVNOST ENZIMA SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD) U JETRI C57BL MIŠA	20
4.3. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA NA MARKERE OKSIDACIJSKOG STRESA I LIPIDNE PEROKSIDACIJE U JETRI C57BL MIŠA	21
4.4. POSTOTAK PROMJENE OKSIDACIJSKIH ENZIMA (MDA, GSH I SOD) U JETRI C57BL MIŠA U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU ŽIVOTINJA	22
4.5. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA OMJER GSH/GSSG ENZIMA U JETRI C57BL MIŠA	23
5.0. RASPRAVA	24
6.0. ZAKLJUČCI	30
7.0. LITERATURA	31

1.0 UVOD

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju najznačajniji uzrok oboljenja i umiranja u svijetu. Faktori rizika za nastanak KVB često su praćeni promjenama u oksidacijskom statusu.

Oksidacijski stres, definiran kao poremećaj ravnoteže između stvaranja reaktivnih vrsta kisika i njihovog uklanjanja antioksidansima, dovodi se u vezu sa patogeneom kardiovaskularnih i drugih kroničnih bolesti.

Rezultati brojnih epidemioloških studija pokazali su povezanost prehrane bogate voćem, povrćem i integralnim žitaricama sa smanjenjem rizika za nastanak KVB. Povoljno djelovanje namirnica biljnog porijekla u prevenciji KVB pripisuje se dijelom nutritivnim sastojcima, ali prije svega nenutritivnim, biološki aktivnim sastojcima, fitokemikalijama.

Tijekom XX. stoljeća trend primjene kemije u dizajniranju lijekova, pogotovo HTS-a (*High Throughput Screening*), doveo je do pada interesa za prirodne proizvode. Kako su očekivanja ovih istraživanja precijenjena, u posljednjih nekoliko godina svjetska znanstvena javnost ponovo se usmjerava na istraživanja prirodnih biomolekula. Pored neospornog značaja za farmaceutsku industriju, prirodni proizvodi biljaka nalaze široku primjenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava pokazuje i određene farmakološke i fiziološke efekte na ljudsko zdravlje, što je od velikog značaja u prevenciji nastanka bolesti suvremenog čovjeka. Zbog toga je ispitivanje biološke aktivnosti i kemijska karakterizacija do sad neispitanih biljnih vrsta od izuzetnog znanstvenog interesa, jer vodi ka novim izvorima potentnih, biološki aktivnih prirodnih proizvoda.

Zahvaljujući visokoj zastupljenosti u biljkama i visokom antioksidacijskom kapacitetu, polifenoli se smatraju najznačajnijim dijetarnim antioksidansima. Plod aronije (*Aronia melanocarpa*) i proizvodi dobiveni njegovom preradom predstavljaju jedan od najbogatijih izvora polifenola.

Osnovni cilj ovoga rada bio je ispitivanje konzumacije praha aronije na markere oksidacijskog stresa.

2.0. TEORIJSKI DIO

2.1. ARONIJA (*Aronia melanocarpa*)

Aronija je rod listopadnih grmova koji potječu iz istočnih dijelova Sjeverne Amerike (slika 1.). Kao prvi korisnici se spominju još Indijanci, koji su primjetili terapeutska svojstva ove biljke te su navodno koristili istu za kuhanje čajeva u svrhu liječenja prehlade. U 20. stoljeću aronija je postala popularna u Sovjetskom Savezu odakle se njena primjena proširila u zemlje Istočne Europe koristeći se za proizvodnju sokova, džemova i vina te kao bogat izvor prirodnih bojila (Scott i Skirvin, 2007).

Rod *Aronia* (porodica Rosaceae, potporodica Maloideae) uključuje tri vrste listopadnih grmova podrijetlom iz Sjeverne Amerike: *Aronia Melanocarpa* ili crnoplodna aronija, *Aronia arbutifolia* ili crvenoplodna aronija te *Aronia purnifolia* ili ljubičastoplodna aronija, hibrid gore navedenih vrsta.

S obzirom da je ova vrsta Aronije najviše cijenjena kao sastojak hrane te kao izvor prirodnih pigmenata, najviše informacija o kultivaciji Aronije se odnosi upravo na *Aroniu melanocarpa*.



Slika 1. *Aronia melanocarpa* (Anonymous 1, 2015)

S obzirom na visoki udjel antocijana, plodovi aronije su pogodni za preradu u funkcionalne sokove, čajeve i likere s visokim udjelom antioksidansa (Balcerek i Szopa, 2002.).

Prilikom proizvodnje treba koristiti brze metode sušenja s obzirom da je potvrđeno da izlaganje soka od crnoplodne aronije temperaturama od 60°C u vremenu od 8 sati smanjuje razine antocijana za 30%, te utječe na gubitak više od 50% antioksidacijskih svojstava (Kasparaviciene i Briedis, 2003)

2.1.1. Kemijski sastav aronije

Različiti biljni materijali uključujući voće, povrće, uljarice, žitarice, začine, kao i različiti dijelovi biljaka (listovi, plodovi, korijenje i kora) ispitivani su kao potencijalni izvor polifenola. Među ispitivanim vrstama, po visokom sadržaju širokog spektra flavonoida i fenolnih kiselina s izraženom antioksidacijskom 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 (Oszmiański i Wojdyło, 2005).

Znanstvena istraživanja su pokazala da se među bobičastim voćem, po antioksidacijskoj aktivnosti odnosno sadržaju polifenola, izdvajaju plodovi aronije. Sok dobiven od plodova aronije ispoljava čak i do 4 puta veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ostale polifenolima bogate napitke, kao što su sok od borovnice, sok od ribizle i crveno vino (Seeram i sur., 2008; Gil i sur., 2000).

Komponente aronije su pod utjecajem različitih faktora poput kultivara, fertilizacije, zrelosti plodova, perioda berbe te staništa (Jeppsson i Johansson, 2000).

Crnoplodna aronija predstavlja jedan od najbogatijih izvora farmakološki važnih komponenti. Glavnu skupinu aktivnih tvari u aroniji čine polifenoli, pogotovo antocijani i procijanidini te su isti zaslužni za antioksidacijska svojstva biljke. Ukupan sadržaj fenola varira između 2000-8000 mg/100g osušene mase ovisno o gore navedenim uvjetima poput kultivara, uvjetima kultivacije kao i vremenu berbe aronije (tablica 1.) (Benvenuti i sur., 2004).

Procijanidini su oligomerni i polimerni (epi)katehini, te se razlikuju ovisno o poziciji i konfiguraciji veza monomernih jedinica. Dominiraju procijanidini s vezama C4/C8 i/ili C4/C6 tzv. veze B-tipa. Aronija sadrži isključivo homogeni B-tip procijanidina s (-)-epikatekinom kao glavnom jedinicom. Sadržaj procijanidina varira između 0,66% do 5,18% sušene mase (Oszmianski i Sapis, 1988). Stupanj polarizacije varira od 2 do 23 jedinice, s dominacijom frakcija >10 jedinica.

Druga najveća skupina farmakološki aktivnih komponenti su antocijani koji čine 25% ukupnih polifenola u aroniji. Udjel antocijana varira između 0,06% do 2,0% sušene mase. Glavni cilj prilikom uzgoja aronije je povećati upravo sadržaj antocijana. Ova skupina flavonoida je odgovorna za pigmente koje daju bobicama tamnocrvenu, plavu i ljubičastu boju. *Aronia melanocarpa* je jedan od najbogatijih izvora antocijana, te većinski sadrži cijanidne glikozide: 3-galaktozide, 3-glukoze, 3-arabinozide i 3-ksilozide (Kulling i Rawel, 2008).

Tablica 1. Usporedba koncentracija ukupnih antocijana i polifenola u prirodnim sokovima od crvenog voća (Jakobek i sur., 2007)

	Ukupni antocijani (mg/L)	Ukupni polifenoli (mg/L)
Crni Ribiz	1543,9	2770,9
Malina	217,4	1234,3
Kupina	739,1	1831,2
Višnja	369,4	2054,4
Trešnja	250,6	1566,8
Jagoda	205,9	1271,8
Aronija	3042,2	9154,5
Bazga	4188,6	6361,9

Bobice aronije sadrže do 5,62 g prehrambenih vlakana na 100 g svježe sirovine te nizak sadržaj pektina između 0,3-0,6% (Tanaka i Tanaka, 2001). Mnoga istraživanja su pokazala da su plodovi i proizvodi od aronije dobar izvor prehrambenih vlakana pogotovo celuloze, hemiceluloze i lignina.

Sadržaj reducirajućih šećera u svježoj aroniji iznosi između 10-18%. Također, prisutan je i šećerni alkohol sorbitol. Ukupni sadržaj masti je vrlo nizak i analizom je utvrđeno da iznosi 0,14 g/100 g svježe sirovine, te da je glavna komponenta linolna kiselina. Proteinske frakcije bobica je teško objasniti te je utvrđeno da je udio istih vrlo malen, tek oko 0,7 g/100 g svježe sirovine, dok je najzastupljenija aminokiselina asparagin (Stroev i Martynov, 1979).

Prema Kane i sur. (1991.) mineralni sastav (količina pepela) iznosi 0,44%, dok su najzastupljeniji minerali bili kalij i cink te u manjem udjelu natrij, kalcij, magnezij i željezo.

Vitamini B1 (25–90 µg/100 mL), B2 (25–110 µg/100 mL), B6 (30–85 µg/100 mL), C (5–100 mg/100 mL), pantotenska kiselina (50–380 µg/100 mL) i niacin (100–550 µg/100 mL) su pronađeni u navedenim količinama u svježe iscijeđenom soku crnoplodne aronije (Ara, 2002). Među triterpenima identificirani su β-sitosterol i kampesterol (Zlatanov, 1999).

U aroniji je također identificirano prisustvo cijanogenog glikozida amigdalina, odgovornog za miris svježeg ploda po gorkim bademima. Prema istraživanju Lehmana (1990.) količina amigdalina u aroniji je 20,1 mg/100 g svježe sirovine, 5,7 mg/100 g svježeg soka te u mesnatom dijelu ploda 52,3 mg/100 g.

2.2. REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE (RKV) I SLOBODNI RADIKALI

Prednost aerobnih organizama je stvaranje i iskorištavanje znatno veće količine energije za obavljanje životnih funkcija u odnosu na anaerobne organizme. Međutim, aerobni metabolizam povezan je sa toksičnim djelovanjem kisika oksidacijom osnovnih bioloških molekula. Naime, tijekom metabolizma kisika u organizmu stvaraju se kao proizvodi reaktivne kisikove vrste (RKV) koje uključuju niz kemijski reaktivnih molekula. RKV čine slobodni radikali, ioni i peroksidi, bilo organski ili anorganski. Biološki važni pripadnici RKV su superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) i hidrosilni radikal (OH^{\cdot}). RKV sačinjavaju i reaktivne molekule koje nisu slobodni radikali, poput vodikovog peroksida (H_2O_2), ozona (O_3), singletnog kisika (1O_2) i hipoklorne kiseline ($HOCl$).

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona koji su odgovorni za nestabilnost i reaktivnost svih radikala. Prema naboju radikali mogu biti pozitivni, negativni ili neutralni. Iako je većina slobodnih radikala organske, mogu biti i neorganske prirode. Jednom stvoreni slobodni radikal može izazvati niz lančanih reakcija reagirajući s drugim manje reaktivnim vrstama. Zbog visoke kemijske reaktivnosti slobodni radikali lako stupaju u reakciju međusobno ili sa drugim molekulama pri čemu nespareni elektroni stvaraju kemijske veze, oslobađa se energija, a sustav prelazi u niže energetske stanje.

Uz mogućnost stvaranja kovalentne veze, slobodni radikali mogu reagirati s biomolekulama i na brojne druge načine. Karakteristične reakcije slobodnih radikala su: davanje elektrona (s reducirajućeg radikala), primanje elektrona (na oksidirajući radikal), oduzimanje vodika, reakcija adicije, reakcija poništavanja, reakcija disproporcionalnosti.

Enzimi koji su sposobni stvarati RKV su brojni, a uključuju citokrome P450 (CYP), različite oksidaze, peroksidaze, lipooksigenaze i dehidrogenaze. Djelovanje slobodnih

radikala je zbog njihove vrlo velike reaktivnosti ograničeno na supstrate iz najbliže okoline. Srednji polumjer difuzije slobodnih radikala vrlo je malen (manji od 100 nm), a poluživot u biološkim sustavima najčešće nekoliko mikrosekundi.

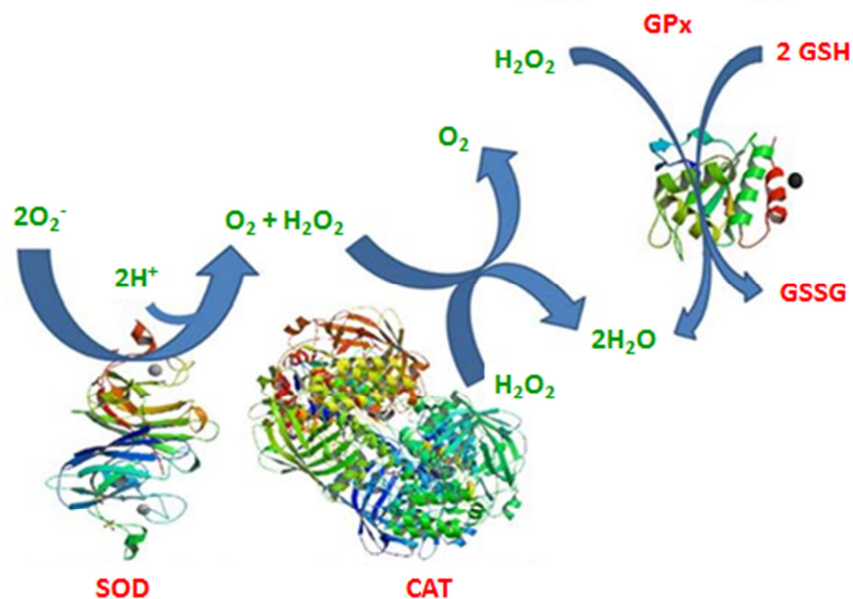
Izvori RKV u stanicama mogu biti endogeni i egzogeni. RKV i slobodni radikali neprestano se endogeno stvaraju u organizmu tijekom metaboličkih procesa, prvenstveno u procesima fosforilacije. Karakteristični egzogeni načini stvaranja slobodnih radikala su djelovanje ultravioletnog i ionizirajućeg zračenja, ozon, stres, određeni lijekovi (poput kemoterapeutika), opijati, alkohol, herbicidi, kemijski onečišćivači (sastojci smoga, duhanski dim), a može biti i hrana (Esterbauer i sur., 1991).

Premda su slobodni radikali u organizmu obično prisutni u vrlo niskoj koncentraciji (10^{-5} - 10^{-9} mola), u višim koncentracijama pokazuju toksične učinke. Visoka razina RKV u stanici dovodi do stanja oksidacijskog stresa koji može biti uzrok različitim metaboličkim poremećajima i oštećenju bioloških makromolekula - DNA, proteina i lipida (Davies, 2003 i Kehrer, 2000).

Oštećenje bioloških makromolekula može dovesti do promjena u staničnoj strukturi i funkciji, a time pridonijeti oštećenju obrambenog sustava i sustava za popravak organizma što dovodi do daljnje neravnoteže u redoks sustavu i gubitka homeostaze.

2.3. ANTIOKSIDACIJSKA OBRANA OD RKV

Održavanje homeostaze oksidacijsko/antioksidacijskog stanja je preduvjet aerobnog života. Tijekom evolucije razvilo se više mehanizama zaštite od djelovanja RKV koji obuhvaćaju regulaciju stvaranja RKV, poništavanje djelovanja RKV (antioksidansi) ili pak popravak nastalih oštećenja. Antioksidacijski sustav enzima predstavlja prvu liniju antioksidacijske zaštite dok neenzimski "čistači" čine drugu liniju obrane organizma. Antioksidansi su tvari koje sprječavaju oksidacijske procese i smanjuju ili onemogućavaju oksidaciju supstrata čak i ako su prisutni u značajno nižim koncentracijama od oksidiranog supstrata (Gutteridge i Halliwell, 2010; Halliwell i Gutteridge, 2007)



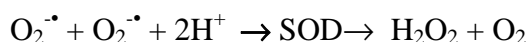
Slika 2. Sustav antioksidacijskih enzima (SOD-superoksid dismutaza; CAT-katalaza; GPx-glutation peroksidaza; GSH-glutation) (Anonymous 2, 2015)

Antioksidacijski sustav enzima (slika 2.) vrlo je složen i sastoji se od primarnih enzimskih antioksidacijskih sustava kao što su: superoksid dismutaza (SOD, katalizira dismutaciju $\text{O}_2^{\bullet -}$), glutation peroksidaza (GPx, odstranjuje H_2O_2 i sprječava stvaranje OH^{\bullet}) i katalaza (KAT, odstranjuje H_2O_2 razgradnjom u vodu i kisik); te sekundarnih enzimskih antioksidacijskih sustava: glutation reduktaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, glutation, glutaredoksin, peroksiredoksin i tioredoksin).

2.3.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza (EC 1.15.1.1) je protein (metaloenzim) neophodan u zaštiti od toksičnog djelovanja RKV koji se stvaraju tijekom metabolizma. Nalazi se i u prokariotskim i u eukariotskim stanicama (Fridovich, 1995).

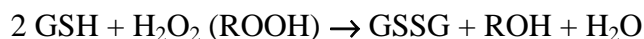
SOD razgrađuje visoko reaktivni slobodni radikal $\text{O}_2^{\bullet -}$ u manje reaktivni H_2O_2 :



SOD su enzimi od iznimnog farmakološkog značaja zbog sprječavanja patoloških stanja uzrokovanih oksidacijskim oštećenjem.

2.3.2 Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza (EC 1.11.1.9) je tetramer sa četiri podjedinice od kojih svaka sadrži po jedan atom selena u obliku selenocisteina, a koji tvori aktivno mjesto enzima. Enzim u prisustvu reduciranog glutationa (supstrat) najčešće katalizira reakciju redukcije H_2O_2 uključujući i lipidni hidroperoksid:



Sustav glutation peroksidaze odgovoran je za razgradnju najvećeg dijela H_2O_2 u stanici. Glutation reduktaza uz pomoć NADPH regulira reducirani GSH:



Tkiva s najvećom koncentracijom GPx su jetra i bubrezi, u umjerenoj količini prisutna je u srcu, plućima i mozgu, a u maloj količini u mišićima. Unutar stanice aktivnost GPx u jezgri nije zabilježena dok je visoka aktivnost prisutna u mitohondrijima i citosolu.

2.4. OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u oksidacijsko/antioksidacijskom statusu organizma u korist oksidacijskog stanja koje može dovesti do oštećenja tkiva i organa (Sies i Jones, 2007).

Aerobni život obilježen je stalnim stvaranjem oksidansa čija je razina pod neprekidnim nadzorom antioksidacijskih zaštitnih mehanizama. Antioksidacijska zaštita odvija se u organizmu trajno čime se sprječava nakupljanje oksidacijskih oštećenja i održava ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidansa. Međutim, kada se ravnoteža u oksidacijsko/antioksidacijskom statusu organizma pomakne u korist oksidansa, u organizmu nastaje stanje oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres nastaje ili zbog povećanog nastanka slobodnih radikala ili smanjene antioksidacijske zaštite. Stanice mogu do određene razine podnijeti stanje oksidacijskog stresa povećanjem sinteze antioksidansa. Duže trajanje stanja oksidacijskog stresa može, među ostalim, dovesti do inaktivacije proteina, aktivacije određenih gena, oksidacijskog oštećenja staničnih struktura i tkiva što omogućuje razvoj novotvorina i drugih bolesti (Kinnula i sur., 1995).

Na molekularnoj razini slobodni radikali mogu modificirati proteine, oštetiti DNA i transkripciju gena te započeti lančanu reakciju peroksidacije lipida.

2.4.1. Lipidna peroksidacija

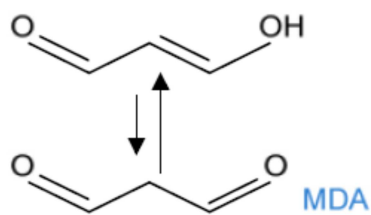
Lipidi su sastavni dio staničnih membrana i imaju važnu strukturalnu i funkcionalnu ulogu u stanici. Reakcijom RKV s lipidima započinje proces LPO koji mijenja i oštećuje lipidnu molekularnu strukturu. Osim toga, LPO je glavni izvor ostalih citotoksičnih proizvoda, primjerice malondialdehida (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE) koji su biološki aktivni i mogu djelovati na razne stanične komponente i enzime.

Slobodni radikali nastali u krvi i tkivima mogu izazvati oksidaciju na višestruko nezasićenim masnim kiselinama koje sadrže visoko reaktivne dvostruke veze. Time započinje proces LPO. Zasićene masne kiseline su kemijski stabilne dok kod nezasićenih masnih kiselina brzina oksidacije raste s povećanjem stupnja nezasićenosti. Lipidi u biološkim sustavima sadrže višestruko nezasićene masne kiseline u obliku fosfolipida, estera, triacilglicerola, kolesterola, slobodnih masnih kiselina tako da se LPO potaknuta slobodnim radikalima nesmetano odvija i u fiziološkim uvjetima (Catala, 2009).

LPO zahvaća sve biološke membrane gdje 30-80% masenog udjela čine lipidi, a preostali dio čine ugljikohidrati (0-10%) te proteini (20-60%). U životinjskim stanicama peroksidirane membrane gube svoju propusnost, postaju rigidne i nefunkcionalne (Choe i sur., 1995).

MDA (slika 3.) prolazi kroz staničnu membranu i može izazvati oštećenja na udaljenim mjestima od mjesta stvaranja. Djelovanjem na stanične membrane uzrokuje nastanak lipofuscina (žutosmeđi pigment koji se nakuplja tijekom starenja). Osim s lipidima, MDA može reagirati i s proteinima mijenjajući njihova biokemijska svojstva. Najviše MDA nalazi se u mikrosomima jetre gdje nastaje peroksidacijom nezasićenih masnih kiselina s dvije ili više dvostrukih veza (poput linolenske ili arahidonske kiseline). MDA se vrlo brzo metabolizira u tkivu sisavaca pri čemu može nastati malonska kiselina koja je kompetitivni inhibitor sukcinat dehidrogenaze u mitohondriju (Yin, 1996).

4-HNE je reaktivni aldehyd mjerljiv i u fiziološkim uvjetima, specifičan jer se može vezati za proteine s kojima tvori stabilne i biološki aktivne konjugate. Njegova prisutnost, kao i prisutnost MDA, zapažena je u nizu patoloških stanja kao što su ateroskleroza, dijabetes, razne neurodegenerativne i autoimune bolesti, ali i tijekom starenja (Oberley i sur., 1999).



Slika 3. Struktura malondialdehida (Anonymous 3, 2015)

2.5. ULOGA ARONIJE U ORGANIZMU I UTJECAJ NA ZDRAVLJE

Mješavina antocijana, procijanidina i fenolnih kiselina u aroniji, predstavljaju jedan od najpotentnijih prirodnih antioksidansa. Zahvaljujući ovome, plodovi aronije i od njih dobiveni proizvodi smatraju se efikasnim u očuvanju zdravlja. Ovo se prije svega odnosi na povoljne efekte na kardiovaskularno zdravlje, održavanje normalnih funkcija urinarnog trakta, zaštitu od virusa i bakterija te poboljšanje memorije. Također proizvodi od aronije pokazali su inhibicijsko djelovanje na proliferaciju kancerogenih stanica, kao i hepatoprotektivno i antidijabetičko djelovanje kroz smanjenje hiperglikemije i hiperlipidemije (Chrubasik i Chrubasik, 2010).

Kardioprotektivno djelovanje aronije ispoljava se kroz utjecaj na faktore rizika od nastanka KVB. Ovo je najprije uočeno u *in vitro* ispitivanjima, u kojima je pokazano vazoprotektivno djelovanje, kao i zaštitno djelovanje na stanice endotela i funkciju trombocita (Olas i sur., 2008).

U animalnim eksperimentalnim modelima, sok od aronije pokazao je povoljan efekt na hiperlipidemiju, snižavanjem povišenih nivoa triglicerida, ukupnog i LDL kolesterola (Valcheva-Kuzmanova i sur., 2007). Smatra se da je ovakav efekt posljedica antioksidacijskog djelovanja, što je također potvrđeno i u *in vitro* uvjetima. Tako je u plazmi tretiranoj ekstraktom aronije uočen porast u ukupnom antioksidacijskom kapacitetu, dok je smanjenje stvaranja superoksid-anion radikala pokazano u trombocitima zdravih osoba i pacijenata oboljelih od karcinoma dojke (Kedzierska i sur., 2012; Malinowska i sur., 2012).

Povoljni utjecaj aronije ustanovljeni *in vitro*, potvrđeni su i pri kroničnoj konzumaciji njenih proizvoda kao i suplementaciji izoliranih aktivnih sastojaka kod ljudi. Rezultati različitih interventnih studija pokazali su povoljno djelovanje aronije u prevenciji kardiovaskularnih bolesti smanjenjem nivoa ukupnog kolesterola, LDL-a, oxLDL-a,

triglicerida, glukoze, HbA1c, vrijednosti krvnog tlaka, kao i povoljnim djelovanjem na postizanje i održavanje idealne tjelesne mase (Broncel i sur., 2010; Simeonov i sur., 2002).

Značajno smanjenje nivoa triglicerida, ukupnog i LDL kolesterola uočeno je nakon 6 tjedana svakodnevne konzumacije soka od aronije kod ljudi sa blagom hiperkolesterolemijom (Skoczynska i sur., 2007). Slično je potvrđeno i kod ispitanika sa metaboličkim sindromom nakon 2 mjeseca suplementacije ekstraktom aronije, kod kojih je zabilježeno i umjereno smanjenje nivoa glukoze, homocisteina i fibrinogena (Broncel i sur., 2010).

Ove metaboličke promjene asocirane su sa smanjenjem povišenih vrijednosti krvnog tlaka koje je uočeno kod ljudi sa hiperkolesterolemijom, oboljelih od dijabetesa, kao i kod pacijenata koji su nakon infarkta miokarda liječeni istovremeno statinima i flavonoidima bogatim ekstraktom aronije (Naruszewicz i sur., 2007).

Mali broj studija u kojima je ispitivan utjecaj kronične konzumacije proizvoda od aronije na oksidacijski status kod ljudi pokazao je porast u aktivnosti antioksidacijskih enzima kao i smanjenje nivoa proizvoda lipidne peroksidacije (Pilaczynska-Szczesniak i sur., 2005).

Najjača antioksidacijska aktivnost je uočena u ekstraktima izoliranim pomoću metanola iz zamrznutog sušenog mesnatog dijela ploda aronije, dok je aktivnost u vodenom ekstraktu tj. soku bila najniža. Vodene infuzije dobivene iz osušenog mesnatog dijela ploda imaju 10 puta više antocijana nego one pripremljene iz osušenih plodova aronije (Bober i Oszmianski, 2004).

Među ostalim kemoprotektivnim aktivnostima, nektar crnoplodne aronije je učinkovito inhibirao formiranje kancerogenog N-nitrozamina u štakora koji su primali aminopirin i natrijev nitrit. Reducirana formacija N-nitrozamina je manifestirana reduciranom aktivnošću transaminaza u serumu i ublaženim oštećenjima jetre (Atanasova-Goranova i sur., 1997).

Kardioprotektivna aktivnost crnoplodne aronije se može pripisati sposobnosti njenih ekstrakta bogatih antocijanima pri snižavanja koncentracije lipida u krvi, antiagregacijskom i vazoaktivnom učinku. Također, aronija sadrži i značajnu količinu niacina koji blagotvorno djeluje na snižavanje koncentracije lipida u krvi (Ganji i sur., 2003).

Utjecaj na lipide je dobro dokumentiran provođenjem istraživanja na modelima štakora s umjetno induciranom hiperkolesterolemijom. Suplementacija prehrane kod inducirane hiperkolesterolemije (1-4% kolesterola) sa sokom od aronije je kroz 30 dana rezultirala u značajnoj redukciji razine ukupnih triglicerida i kolesterola u krvnoj plazmi u usporedbi sa štakorima koji nisu primali sok od aronije. Također, ni povišena koncentracija

kolesterola ni sok od aronije nisu značajno utjecali na razinu HDL-kolesterola (Valcheva-Kuzmanova i sur., 2007).

Drugo istraživanje, koje je oponašalo simptome metaboličkog sindroma (povišena razina lipida i glukoze u krvi) inducirane primjenom prehrane bogate na fruktozi i intraperitonealnom injekcijom streptozotocina, je pokazalo da je dodatak ekstrakta aronije u visoko fruktoznoj prehrani djelovao na redukciju visoke razine ukupnih triglicerida (Jurgonski i sur., 2008).

Hepatoprotektivna aktivnost soka aronije je utvrđena u eksperimentu sa štakorima s induciranim oštećenjima jetre primjenom CCl₄, gdje je dodatak soka značajno reducirao histopatološke promjene u jetri poput nekroze, degeneracije hepatocita te upalni infiltrat limfocita, što se pripisuje antioksidacijskim svojstvima aronije, te sposobnosti hvatanja slobodnih radikala (Valcheva-Kuzmanova i sur., 2004).

Gastroprotektivna aktivnost se pokazala u istraživanju na štakorima s kemijski induciranim gastričnim lezijama. Ingestija soka prije administracije indometacina je značajno reducirala broj, područja i ozbiljnost lezija uzrokovanih antiupalnim lijekovima. Vjerojatnije je da je protektivni učinak soka aronije rezultirao iz povećanog stvaranja gastrične mukoze i zbog olakšavanja oksidacijskog stresa izazvanog indometacinom (Valcheva-Kuzmanova i sur., 200.).

U istraživanju Valcheve-Kuzmanove i sur., 2007. antidijabetička aktivnost je utvrđena i za ekstrakte plodova i lišća crnoplodne aronije na životinjskim modelima. Oralna administracija soka kroz 6 tjedana je smanjila razinu glukoze u krvi za više od 40% kod štakora s dijabetesom induciranim primjenom streptozotocina, dok kod zdravih štakora nije primijećen isti učinak. Budući da su brojna slična istraživanja pokazala iste rezultate, predloženi mehanizam djelovanja aronije je da učinak rezultira iz smanjene aktivnosti mukozne maltaze i sukraze u tankom crijevu, no smatra se da su uključeni i drugi mehanizmi poput stimulacije upijanja glukoze, povećanog lučenja inzulina ili redukcije oksidacijskog stresa.

Antidijabetički učinak je ispitivan i kod pacijenata s dijabetes mellitusom. Kroz period od 3 mjeseca dnevne primjene 200 ml soka od aronije pacijentima s inzulin neovisnim dijabetesom se značajno smanjila razina glukoze natašte u usporedbi s kontrolnom grupom (Simeonov i sur., 2002).

3.0. MATERIJALI I METODE

3.1. KEMIKALIJE

- NaH_2PO_4 - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na_2HPO_4 - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- HCl – Kemika, Zagreb, Hrvatska
- SDS – Merck, Darmstadt, Njemačka
- Octena kiselina – Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Tiobarbiturna kiselina (TBA) – Sigma, St. Louis, SAD
- 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP) – Sigma, St. Louis, SAD
- NaOH – Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol (99.9%) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- DTNB (Ellman-ov reagens) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- NDPH - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Glutation reduktaza - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- KH_2PO_4 , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- EDTA – Sigma, St. Louis, SAD
- Citokrom C – Sigma, St. Louis, SAD
- Ksantin – Sigma, St. Louis, SAD
- Ksantin oksidaza – Sigma, St. Louis, SAD
- SOD iz govedih eritrocita – Sigma, St. Louis, SAD
- H_2O_2 , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Albumin govedeg seruma - Armour Pharmaceutical Co. Ltd. Eastborne, SAD

3.2. POKUSNE ŽIVOTINJE

Pokuse smo radili na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su C57BL miševi, u dobi od tri mjeseca. Životinje su hranjene tijekom 30 dana. Po sedam životinja je bilo smješteno u kavezu, na temperaturi od 22°C , uz neograničen pristup hrani i vodi.

Životinje smo hranili komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Životinje smo držali u uvjetima 12 sati svjetla i 12 sati tame pri 22 °C i 60% vlažnosti. Hrana kojom smo hranili miševe je standardna hrana za miševe i štakore 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), a sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuske lješnjaka.

3.2.1. Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe su činile četiri grupe životinja:

- I grupa – KO (kontrolna grupa); tretirana je sa 0,2 ml fiziološke otopine.
- II grupa – CH (2% kolesterol)
- III grupa - PAM (prah aronije); 1 g/kg/dnevno
- IV grupa – CH + PAM

Životinje smo žrtvovali 30. dana pokusa te smo uzeli uzorke jetre za daljnju analizu. Miševi su anestetizirani eterom te su iskrvareni punkcijom iz srca bez antikoagulansa.

Jetru smo izolirali iz životinja odmah nakon što smo sakupili uzorke krvi, te je izvagali i zabilježili masu i potom pohranili na -80°C za daljnju analizu. Analize vezane uz jetru nakon ovog koraka radili smo isključivo na ledu i u roku od tjedan dana nakon što su prikupljeni uzorci.

3.2.2. Priprema tkiva jetre za određivanje antioksidacijskih enzima

Svježe tkivo homogenizira se u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,8 u omjeru 1 : 10 (w/v). Fosfatni pufer (50 mM, pH 7,8): pripremi se otopina (a) 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ i otopina (b) 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 17 ml otopine (a) pomiješa se s 183 ml otopine (b), uskladi pH i doda H_2O do 800 ml.

Jetra se potom homogenizira na ultrazvučnom homogenizatoru u 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa. Uzorke je potrebno cijelo vrijeme držati na ledu. Homogenate bubrega potom je potrebno centrifugirati pri 20 000 x g tijekom 15 min na 4°C.

3.3. MJERENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA)

3.3.1. Priprema otopina

1.15 g HCl-a razrijedi se u 100 ml H₂O; 0,81 g natrij dodecil sulfata (SDS) razrijedi se u 10 mL dH₂O; 20 mL 99,5 postotne octene kiseline i 2,31 mL HCl pomiješa se i dopuni do 50 mL sa dH₂O. pH vrijednost se podesi na 3,5 dodavanjem 17 mL 5M NaOH i dopuni se sa dH₂O do konačnog volumena od 100 mL.

0,8 postotna TBA priprema se otapanjem 0,4 g TBA-e u 40 mL dH₂O uz zagrijavanje. Na taj volumen dodaje se 500 µl 5M NaOH i dopuni do konačnog volumena od 50 mL sa dH₂O. Otopina treba biti svježe pripremljena na dan pokusa.

Na 25 µl TMP-a dodaje se 50 mL etanola te se od tako pripremljene otopine rade razrjeđenja (50 µl TMP + 9,95 mL etanola; 100 µl TMP + 9,90 mL etanola itd.).

3.3.2. Postupak

Prisutnost lipidne peroksidacije smo određivali modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur., 2008. Ova metoda se temelji na mjerenju koncentracije malonil dialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Malonil dialdehid reagira sa tiobarbiturnom kiselinom i stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

Uzorku jetre mase 100 mg dodali smo 1 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 7.0) i homogenirali ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10%. Homogenat smo centrifugirali centrifugom Mikro 200R (Hettich, Njemačka) 15 minuta pri brzini od 10 000 rpm.

200 µL supernatanta pomiješali smo sa 200 µL 8,1%-tne vodene otopine SDS-a, 1,5 mL 20%-tne vodene otopine octene kiseline (pH 3.5) i 1,5 mL 0.81%-tne vodene otopine tiobarbiturne kiseline. Smjesu smo zagrijavali 60 minuta pri temperaturi od 95 °C.

Ohlađenim uzorcima izmjerili smo apsorbanciju pri 532 nm i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Ukupnu apsorbanciju određivali smo prema formuli $A_{uk} = A_{532} - A_{600}$. Koncentraciju smo izračunali prema jednadžbi:

$$C (\text{MDA}) = A \times V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) / \epsilon \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL}) \times c_{\text{proteina}} (\text{mg mL}^{-1}) \quad [1]$$

gdje ϵ iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, a duljina kivete l iznosi 1 cm. Koncentraciju lipidnih peroksida izrazili smo kao nmol MDA/mg proteina.

3.4. AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH)

3.4.1. Postupak

Aktivnost reduciranog glutationa (GSH) – postupak određivanja koncentracije GSH se temelji na reakciji GSH i DNTB-a (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina). DNTB je poznat i kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima. Ellmanov reagens uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja veće količine 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i male količine glutation disulfida (GSSG). NTB je žuto obojeni produkt koji se mjeri na Plate Reader-u pri 412 nm, a na temelju čega indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur. 2003).

Koncentraciju smo izračunali prema formuli:

$$C = \Delta A \times V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) / \epsilon \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL}) \times c_{\text{proteina}} (\text{mg mL}^{-1}) \quad [2]$$

gdje ϵ (DTNB) iznosi $8,22 \text{ cm}^{-1} \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, a duljina kivete l iznosi 0,6 cm. Koncentraciju proteina u uzorku izmjerili smo metodom Lowryju (Lowry i sur., 1951).

Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) smo izrazili kao mU/mg proteina (nmol/min/mg proteina).

3.5. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)

3.5.1. Priprema otopina

Otopina A: 1,5 mg 1 mM ksantina otopljen je u 9,86 mL 1 mM NaOH i tome je dodano 12,96 mg 0,05 mM citokroma C otopljenog u 85 mL 50 mM fosfatnog pufera pH=7.8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e.

Otopina B: 1500 μl otopine svježe pripremljene ksantin oksidaze u 50 mM fosfatnom puferu pH=7.8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e, konačne aktivnosti od 0,2 U mL^{-1} .

Osnovna otopina SOD-a iz goveđih eritrocita u koncentraciji 1 mg/mL razrjeđuje se do koncentracije 1000 ng/100 μ l; ta se koncentracija namjesti na koncentraciju 500 ng/50 μ l kojom se rade serije razrjeđenja u rasponu od 100 ng/50 μ l do 500 ng/50 μ l.

3.5.2. Postupak

Superoksid dismutaza katalizira dismutaciju superoksidnih radikala (O_2^*) u vodikov peroksid (H_2O_2), pri čemu se jedna molekula H_2O_2 oksidira u O_2 , a druga reducira u H_2O .

Aktivnost SOD-a određena je u supernatantima homogenata jetre inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i sur. (1971).

U staklenu kivetu s 1,45 mL otopine A doda se 25 μ l uzorka (po potrebi razrijeđenog fosfatnim puferom pH=7.8 bez EDTA-e) i reakcija se započne dodatkom 25 μ l otopine B.

Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute na valnoj duljini 550 nm. Svaki uzorak termostatiran je na 25°C. Kako aktivnost ksantin-oksidaze može varirati od pokusa do pokusa, nužno je uskladiti koncentraciju tog enzima tako da brzina redukcije citokroma C bude analogna porastu apsorbancije od 0,025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez superoksid dismutaze.

Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Aktivnost SOD-a izražena je kao U/mg proteina.

3.6. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO LOWRYJU

Sadržaj proteina u homogenatima jetre, bubrega, slezene i testisa određen je metodom po Lowryju (1951.), a izražen je u miligramima proteina po mililitru ($mg\ ml^{-1}$).

Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (Bovin serum albumin, Armour Pharmaceutical Co. Ltd. Eastborne).

3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

3.7.1. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [3]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [4]$$

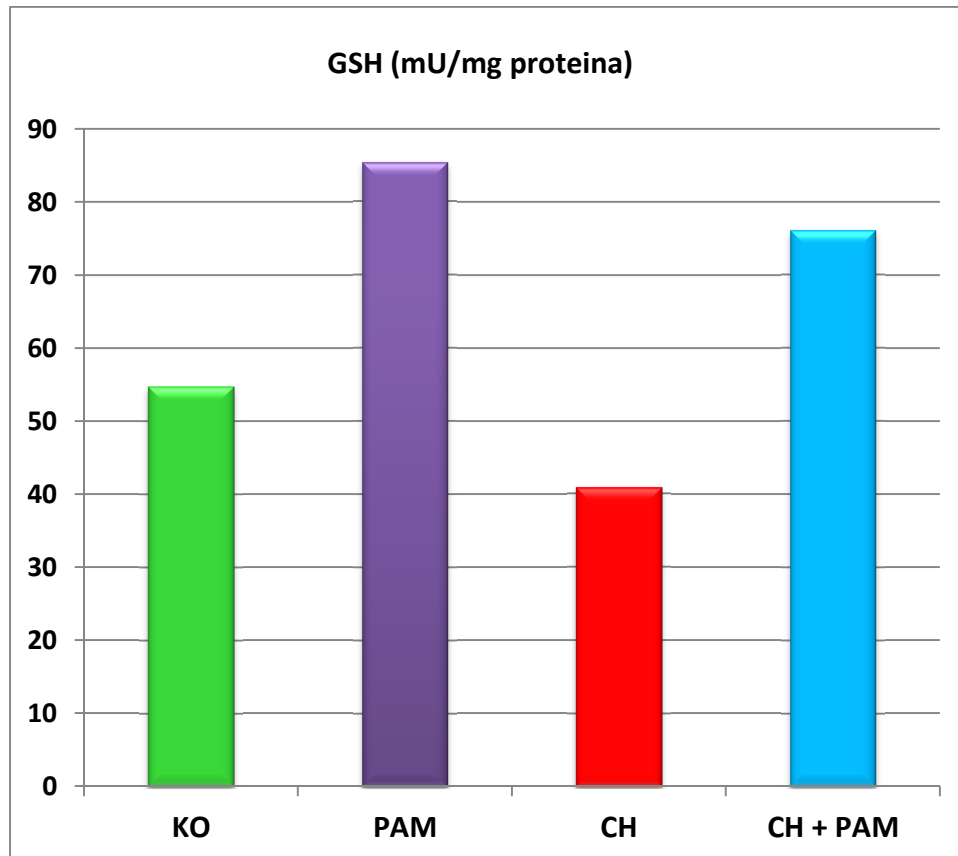
N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,05$. Statističku analizu podataka smo napravili koristeći Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjenje Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulza, Sjedinjenje Američke Države). Dobivene podatke smo izražavali u obliku srednja vrijednost \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruku usporedbu kontrolne i tretiranih skupina miševa izvršili smo ANOVA analizom varijance. Interval pouzdanosti namjestili smo na $p \leq 0.05$. Post-hoc analize smo izvršili koristeći Newman-Keuls test (Newman, 1939.; Keuls, 1952.) kako bismo ustanovili razlike između pokusnih grupa.

4.0. REZULTATI

4.1. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA AKTIVNOST ENZIMA REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH) U JETRI C57BL MIŠA



Slika 4. Utjecaj praha aronije na aktivnost enzima GSH u jetri kontrolne i tretiranih skupina životinja; $p < 0.05$ (ANOVA).

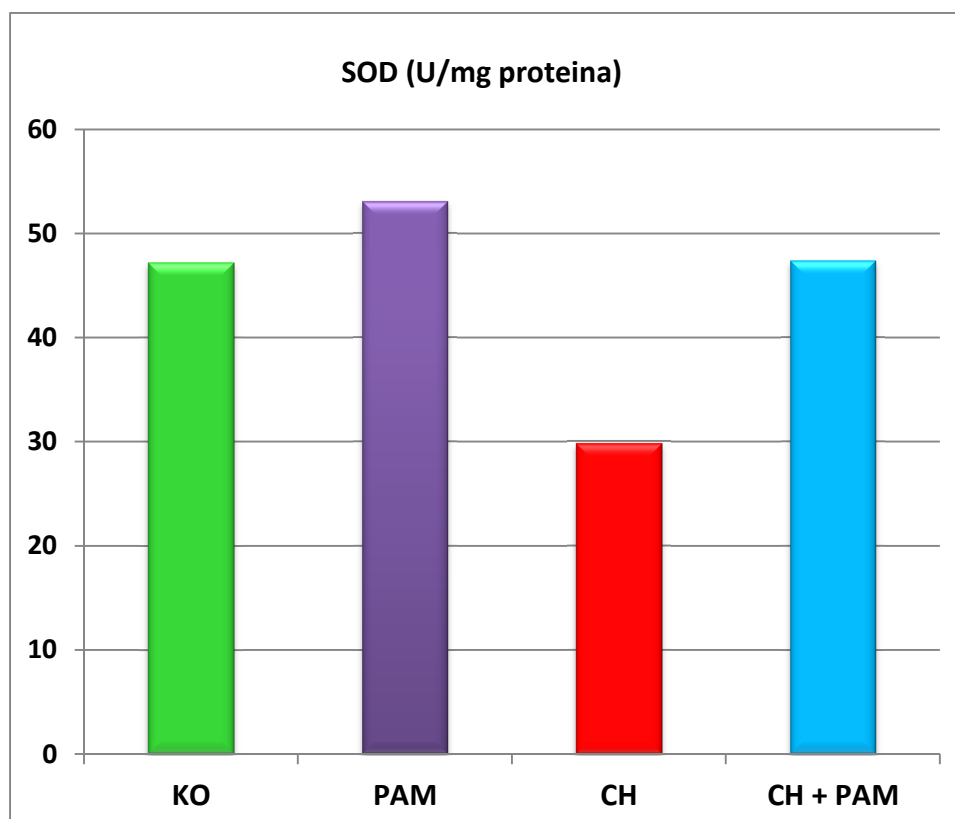
Na slici 4. prikazani su rezultati utjecaja praha aronije na aktivnost reduciranog glutationa u jetri životinja.

Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti GSH u jetri zabilježeno je kod grupe životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu tretirana sa kolesterolom (CH - $40,87 \pm 0,51$ mU mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $54,78 \pm 0,42$ mU mg^{-1} proteina).

Također, došlo je i do povećanja (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti GSH kod grupe koja je tretirana prahom aronije (PAM - $85,35 \pm 0,44$ mU mg^{-1} proteina) i grupe koja je uz

komercijalno dostupnu hranu tretirana sa kolesterolom i prahom aronije (CH+PAM - $76,06 \pm 0,48$ mU mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu vrijednost.

4.2. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA AKTIVNOST ENZIMA SUPEROKSID DISMUTASE (SOD) U JETRI C57BL MIŠA



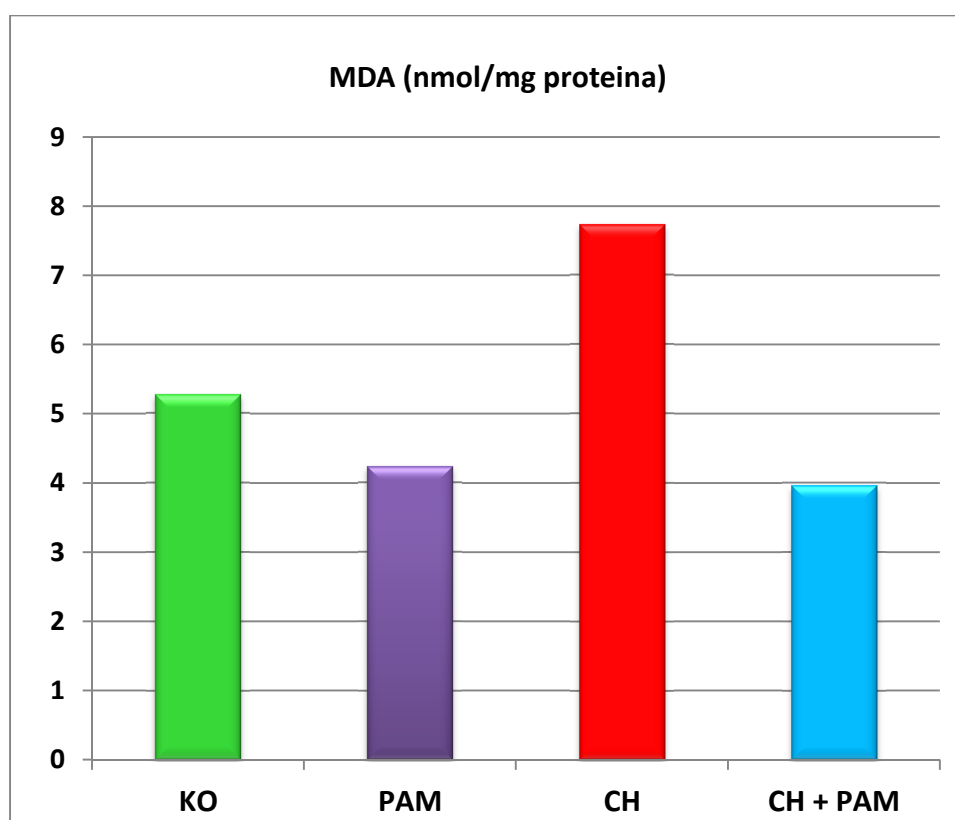
Slika 5. Utjecaj praha aronije na aktivnost enzima SOD u jetri kontrolne i tretiranih skupina životinja; $p < 0.05$ (ANOVA).

Na slici 5. prikazani su rezultati utjecaja praha aronije na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u jetri životinja.

Statistički značajno povećanje (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti SOD u jetri zabilježeno je kod grupa koje su uz komercijalno dostupnu hranu tretirane sa prahom aronije i sa kolesterolom i prahom aronije (PAM - $53,05 \pm 3,4$ U mg^{-1} proteina; CH+PAM - $47,38 \pm 3,2$ U mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu (KO - $47,23 \pm 3,2$ U mg^{-1} proteina) tretiranih životinja.

Kod grupe koja je tretirana sa kolesterolom došlo je do statistički značajnog smanjenja (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti SOD (CH - $29,81 \pm 3,0$ U mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $47,23 \pm 3,2$ U mg^{-1} proteina).

4.3. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA MARKERE OKSIDACIJSKOG STRESA I LIPIDNE PEROKSIDACIJE U JETRI C57BL MIŠA



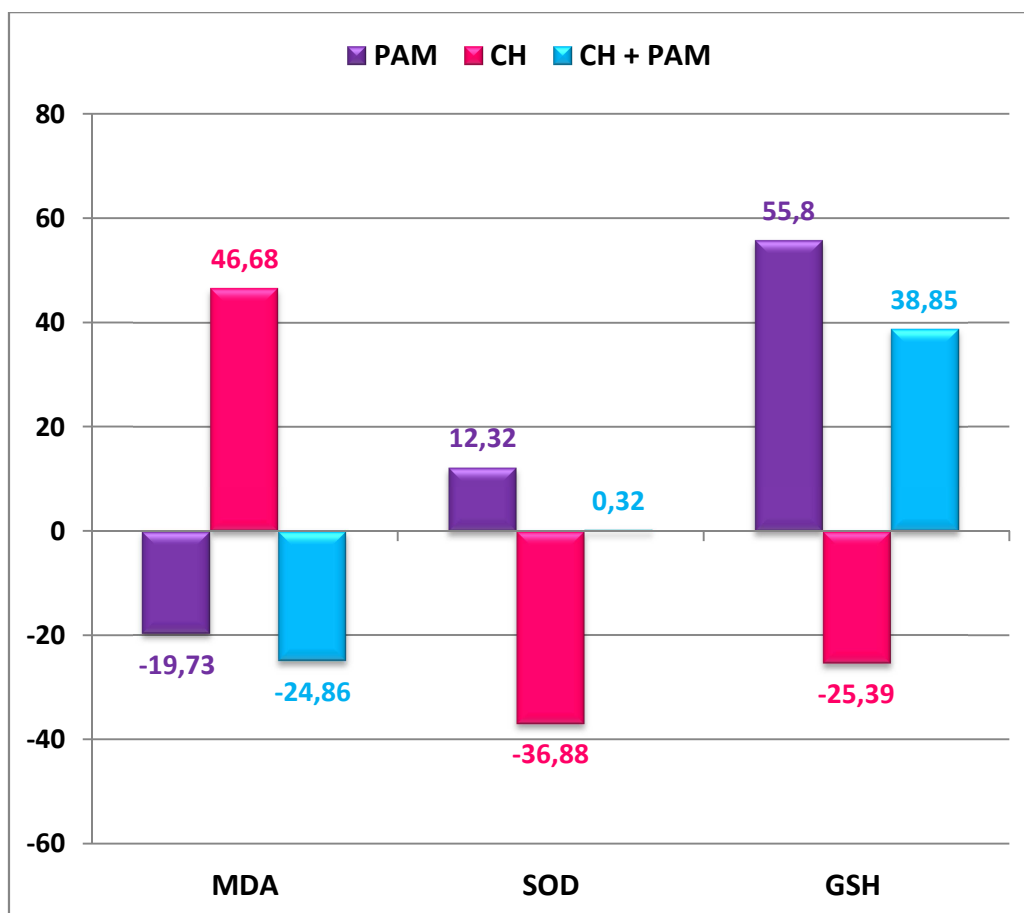
Slika 6. Utjecaj praha aronije na aktivnost lipidne peroksidacije (MDA) u jetri kontrolne i tretiranih skupina životinja; $p < 0.05$ (ANOVA).

Na slici 6. prikazani su rezultati hepatoprotektivnog učinka praha aronije na aktivnost MDA u jetri životinja.

Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti MDA zabilježeno je kod 2 suplementa u jetri: prah aronije (PAM - $4,23 \pm 0,16$ nmol mg proteina^{-1}) i kolesterol+prah aronije (CH+PAM - $3,96 \pm 0,22$ nmol mg proteina^{-1}) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $5,27 \pm 0,22$ nmol mg proteina^{-1}).

Kod tretmana sa 2% kolesterolom došlo je do statistički značajnog povećanja (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti MDA (CH - $7,73 \pm 0,24$ nmol mg proteina⁻¹) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $5,27 \pm 0,22$ nmol mg proteina⁻¹).

4.4. POSTOTAK PROMJENE OKSIDACIJSKIH ENZIMA (MDA, GSH I SOD) U JETRI C57BL MIŠA U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU ŽIVOTINJA



Slika 7. Utjecaj hepatoprotektivnog praha aronije na aktivnost MDA, SOD i GSH glavnih faktora rizika od kardiovaskularnih bolesti (KVB).

Na slici 7. prikazani su rezultati utjecaja na aktivnost malonildialdehida (MDA), reduciranog glutaciona (GSH) i superoksid dismutaze (SOD) u jetri životinja kao postotak promjene u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

4.5. UTJECAJ HEPATOPROTEKTIVNOG PRAHA ARONIJE NA OMJER GSH/GSSG ENZIMA U JETRI C57BL MIŠA

U tablici 2. prikazan je omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG). Smanjenje GSH/GSSG omjera ukazuje na prisutnost oksidacijskog stresa.

Tablica 2. Utjecaj hepatoprotektivnog praha aronije na aktivnost GSH i GSSG u jetri C57BL miša kroz 30 dana tretmana.

Grupe	GSH (mU/mg protein)	GSSG (mU/mg protein)	GSH/GSSG
Normokolesterolemična dijeta			
KO	54,78 ± 0,42	0,68 ± 0,06	80,56 ± 11,15
PAM	85,35 ± 0,44	0,62 ± 0,07	137,66 ± 10,88
Hiperkolesterolemična dijeta			
CH	40,87 ± 0,51	0,69 ± 0,05	59,23 ± 12,86
CH + PAM	76,06 ± 0,48	0,63 ± 0,08	120,64 ± 11,22

*(SD – standardna devijacija; 7 životinja u grupi).

KO – KONTROLA

PAM – prah aronije

CH – kolesterol

5.0. RASPRAVA

Oksidacijski stres, kao stanje poremećene ravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i sposobnosti antioksidansa da ih neutraliziraju, ima za posljedicu nastanak oksidacijski oštećenih proteina, lipida i DNA. Kao posljedica ROS-a, dolazi do promjena u staničnoj strukturi i funkciji, što doprinosi razvoju kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, karcinoma i drugih patoloških stanja (Scalbert i sur., 2005).

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije i Organizacije za hranu i poljoprivredu, nezarazne kronične bolesti, uključujući KVB, pretilost, dijabetes, hipertenziju i neke tipove karcinoma, postaju sve značajniji uzročnik invaliditeta i preuranjene smrtnosti u svijetu. Gotovo polovica od ukupne smrtnosti uslijed kroničnih bolesti pripisuje se KVB, a rastući trend dovodi se, između ostalog, u vezu sa neadekvatnom prehranom, nedovoljnom fizičkom aktivnošću i pušenjem.

Način prehrane se smatra najznačajnijom promjenjivom determinantom kroničnih bolesti, te se stoga adekvatna dijeta ističe kao važan faktor u prevenciji kardiovaskularnih i drugih kroničnih bolesti. Pokazana je uzajamna povezanost između konzumacije voća, povrća, ribe i ribljeg ulja, hrane bogate kalijem i niskog do umjerenog unosa alkohola sa smanjenjem rizika za nastanak KVB (Liu i sur., 2000).

Uloga namirnica biljnog porijekla u prevenciji kardiovaskularnih bolesti pripisuje se ne samo njihovim nutritivnim sastojcima, već i biološki aktivnim sekundarnim metabolitima biljaka, polifenolima. Polifenoli predstavljaju najznačajnije dijetetske antioksidanse s obzirom da su visoko zastupljeni u namirnicama biljnog porijekla i da imaju visok antioksidacijski kapacitet (Scalbert i sur., 2005).

Faktori rizika za nastanak KVB često su praćeni poremećajima oksidacijskog statusa. Iako se veća efikasnost dijetetskih antioksidansa očekuje kod ljudi sa prisutnim faktorima rizika ili već razvijenim bolestima, njihova dugotrajna konzumacija može ispoljiti povoljne efekte na pojedine markere oksidacijskog stresa i u slučaju zdravih ispitanika (Zamora-Ros i sur., 2013).

Zreli plodovi aronije sadrže veliku količinu biološki aktivnih spojeva poznatih pod imenom polifenolni spojevi. U aroniji najzastupljeniji su proantocijanini, antocijanini te flavonoli. Udio polifenolnih spojeva u aroniji je mnogo veći u usporedbi s ostalim bobičastim voćem kao što su borovnica, kupina i malina (Jakobek i sur., 2012).

Aronija sadrži 5-10 puta veću koncentraciju antocijanina i polifenola nego brusnica. Ima najveću koncentraciju fenolnih spojeva u suhoj tvari u usporedbi s drugim bobičastim voćem (Chong i sur., 2010). Odlikuje je poželjan udio prehrambenih vlakana (5,62 g/100 g ploda). Njena prehrambena vlakna sadrže veliku koncentraciju celuloze, hemiceluloze i lignina (Kulling i Rawel, 2008). Ukupan udio organskih kiselina je relativno mali (1 - 1,5 %) u usporedbi s ostalim bobičastim voćem. Udio reducirajućih šećera u plodu aronije kreće se od 16-18 %. Zajednički udio glukoze i fruktoze u svježem plodu aronije je od 13-17,6 g/100 g ploda.

U usporedbi s ostalim bobičastim voćem aronija ima visok udio sorbitola, odnosno šećernog alkohola. Sorbitol se često koristi u prehrambenoj industriji kao zamjena za šećer te može imati blago laksativno djelovanje (Kulling i Rawel, 2008).

Plodovi aronije predstavljaju i odličan izvor vitamina i mineralnih tvari. Među vitaminima najviše su zastupljeni vitamini B-skupine, ponajviše niacin i pantotenska kiselina, a ističu se i vitamini C, A i E. Od mineralnih tvari u aroniji se mogu naći kalij, kalcij, željezo, mangan, zink i jod. Aronija sadržava i 9 karotenoida od čega su 3 karotena (likopen, beta-karoten, gama-karoten) i 6 ksantofila (neoksantin, trans i cis-violaksantin, 5,6-epoksilutein, lutein, beta-kriptoksantin) (Wu i sur., 2004). U usporedbi s ostalim bobičastim voćem sadrži veću koncentraciju beta-karotena i beta kriptoksantina (Kulling i Rawel, 2008).

Jedna od najvažniji komponenti prisutnih u aroniji su dakako fenolni spojevi. Procijanidini su najzastupljeniji od polifenolnih spojeva prisutnih u aroniji, nalaze se u koncentraciji od 664 mg/100 g svježeg ploda. Udio antocijana je 428 g/100 g svježeg ploda (Kulling i Rawel, 2008). Najvažnija funkcija antocijana je osiguravanje boje biljci, no djeluju i kao antioksidansi (Soriano Sancho i Pastore, 2012).

Antioksidacijska aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres odnosno indukciju "antioksidacijskih" enzima. Ujedno polifenoli imaju sposobnost keliranja metala te vezanja ugljikohidrata i proteina s pomoću hidroksilnih skupina.

U posljednjih nekoliko godina mnogo se govori o učinku Aronije na zdravlje ljudi. Nedavne studije su ukazale na njeno antioksidacijsko, antimutageno, hepatoprotektivno, kardioprotektivno, antidijabetsko, kao i antiupalno djelovanje (Jurgoński i sur., 2008; Kulling i Rawel, 2008; Soriano Sancho i Pastore, 2012).

Uzimajući u obzir navedeno, u ovom radu ispitan je hepatoprotektivni utjecaj konzumacije praha aronije na različite markere oksidacijskog stresa u jetri C57BL miša.

Pozitivni efekti aronije i njenih proizvoda na markere oksidacijskog stresa ispitivani su u malom broju dijetetskih interventnih studija kod ljudi. Rezultati tih studija potencijalno antioksidacijsko djelovanje baziraju upravo na smanjenju nivoa MDA. Značajno smanjenje koncentracije MDA u serumu pokazano je nakon 8 tjedana konzumacije ekstrakta aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom (Broncel i sur., 2010), kao i kod veslača koji su konzumirali sok od aronije prije izvođenja ergonometrijskog testa (Pilaczynska-Szczesniak i sur., 2005).

U ovom provedenom istraživanju s ekstraktom praha aronije na lipidnu peroksidaciju u jetri C57BL miša su dobiveni slični rezultati. Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti MDA zabilježeno je kod 2 suplementa u jetri: prah aronije (PAM - $4,23 \pm 0,16$ nmol mg proteina⁻¹) i kolesterol+prah aronije (CH+PAM - $3,96 \pm 0,22$ nmol mg proteina⁻¹) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $5,27 \pm 0,22$ nmol mg proteina⁻¹). Kod tretmana sa 2% kolesterolom došlo je do statistički značajnog povećanja (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti MDA (CH - $7,73 \pm 0,24$ nmol mg proteina⁻¹) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $5,27 \pm 0,22$ nmol mg proteina⁻¹).

U cilju eventualnog razjašnjenja potencijalnog antioksidacijskog djelovanja praha aronije, ispitali smo utjecaj na aktivnost antioksidacijskih enzima. Tri najznačajnija unutarstanična, enzimatska antioksidacijska obrambena sustava su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx). Ovi enzimi su prisutni u plazmi i djeluju pretvarajući reaktivne vrste kisika i reaktivne dušikove vrste u stabilne forme. Superoksid dismutaza sudjeluje u dismutaciji superoksida u vodikov peroksid, a do njegova uništavanja može doći katalazom ili glutation peroksidazom (Kumar i Kumar, 2006).

Statistički značajno povećanje (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti SOD u jetri zabilježeno je kod grupa koje su uz komercijalno dostupnu hranu tretirane sa prahom aronije i sa kolesterolom i prahom aronije (PAM - $53,05 \pm 3,4$ U mg⁻¹ proteina; CH+PAM - $47,38 \pm 3,2$ U mg⁻¹ proteina) u odnosu na kontrolnu grupu (KO - $47,23 \pm 3,2$ U mg⁻¹ proteina) tretiranih životinja.

Dakle, aktivnost SOD je za 12,32% povišena u jetri miševa tretiranih prahom aronije u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što znači da prah aronije ima povoljan učinak na razinu SOD zdrave populacije, a time i hepatoprotektivan učinak.

Kod grupe koja je tretirana sa kolesterolom došlo je do statistički značajnog smanjenja (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti SOD (CH - $29,81 \pm 3,0$ U mg⁻¹ proteina) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $47,23 \pm 3,2$ U mg⁻¹ proteina).

S obzirom na to da je došlo do smanjenja razine SOD u jetri kolesterolom suplementiranih miševa za 36,88% u odnosu na kontrolnu grupu životinja, može se zaključiti da je došlo do pojave oksidacijskog stresa u jetri te skupine životinja, odnosno do pojave hiperkolesterolemije.

Ovo istraživanje je rezultiralo statistički značajnim (ANOVA, $p < 0.05$) povećanjem aktivnosti GSH kod grupe koja je tretirana prahom aronije (PAM - $85,35 \pm 0,44$ mU mg^{-1} proteina) i grupe koja je uz komercijalno dostupnu hranu tretirana sa kolesterolom i prahom aronije (CH+PAM - $76,06 \pm 0,48$ mU mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu vrijednost.

Također, došlo je i do statistički značajnog smanjenja (ANOVA, $p < 0.05$) aktivnosti GSH u jetri zabilježeno je kod grupe životinja koja je uz komercijalno dostupnu hranu tretirana sa kolesterolom (CH - $40,87 \pm 0,51$ mU mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO - $54,78 \pm 0,42$ mU mg^{-1} proteina), što dovodi stanice jetre u opasnost od oksidacijskih oštećenja te razvoja bolesti.

Jedan od najboljih biomarkera za oksidacijski stres je omjer reduciranog (GSH) i oksidiranog glutationa (GSSG). Smanjenje omjera GSH/GSSG indikator je za stanje bolesti.

Suplementi ovog istraživanja utjecali su na omjer GSH/GSSG u tkivu jetre. Prah aronije je uzrokovao povećanje omjera GSH/GSSG u normokolesterolemičnoj dijeti za 70,87%, u hiperkolesterolemičnoj dijeti za 49,75% u odnosu na kontrolnu skupinu miševa ($P < 0,05$), dok je kolesterol u grupi koja je bila na hiperkolesterolemičnoj dijeti izazvao smanjenje omjera GSH/GSSG za 26,48% u odnosu na kontrolnu skupinu životinja.

Ovi rezultati bili su u skladu sa literaturnim podacima. Broncel i suradnici (Broncel i sur., 2010) pokazali su porast aktivnosti SOD i GPx poslije 2 mjeseca suplementacije ekstraktom aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom. Porast aktivnosti GPx pokazan je i kod ispitanika sa hiperholesterolemijom koji su konzumirali ekstrakt izoliranih antocijana aronije u trajanju od mjesec dana (Kowalczyk i sur., 2005).

Također, sok od aronije pokazao je smanjenje oksidacijskog stresa induciranog fizičkom aktivnošću veslača, kroz stimulaciju antioksidacijskih enzima eritrocita nakon jednog mjeseca redovite konzumacije (Pilaczynska-Szczesniak i sur., 2005).

Lipidi, odnosno masne kiseline sa većim brojem dvostrukih veza smatraju se biološkim komponentama koje su najpodložnije oksidacijskom oštećenju. U slučaju narušene ravnoteže između stvaranja ROS i antioksidacijske zaštite dolazi do oksidacije PUFA u staničnoj membrani, što mijenja njene fizičko-kemijske karakteristike i narušava uobičajenu funkciju (Ozbay i Dülger, 2002). Ovo se zasniva na činjenici da je stanična membrana prva linija odbrane stanice od slobodnih radikala kao i da ima visok sadržaj lipida, odnosno PUFA.

Među brojnim indeksima koji se uz primjenu odgovarajućih metoda koriste za ocjenu oksidacijskog statusa najčešće su korišteni pokazatelji nivoa lipidne peroksidacije.

Polifenoli se smatraju bioaktivnim sastojcima 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 antioksidacijskoj aktivnosti soka od aronije iznosi i do 40% (Zheng i Wang, 2003).

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, djelovali u organizmu, moraju putem krvi doći do tkiva, odnosno stanica ciljnih organa. Zbog toga je neophodno identificiranje formi i metabolita u kojima su polifenoli prisutni u organizmu. Za većinu polifenolnih spojeva pokazano je da se intenzivno metaboliziraju, 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 metilirani (Kroon i sur., 2004).

Iako je zabilježen značajan pomak u identifikaciji formi u kojima su polifenoli prisutni *in vivo*, podaci koji se tiču bioraspoloživosti i metabolizma antocijana nisu u potpunosti uniformirani. U literaturi se antocijani često navode kao klasa polifenola sa slabom apsorpcijom i brzom eliminacijom, te veoma niskom bioraspoloživošću. U skladu sa tim, kompromitirani su zaključci o njihovom djelovanju *in vivo* (Manach i sur., 2005).

Ipak, novije istraživanje identificiralo je cijanidin-glikozide u neizmjenjenoj formi i u formi metabolita u organizmu, nakon konzumacije soka od aronije koji je sadržao antocijane u relevantnim dnevnim dozama. Prisustvo neizmjenjenih formi antocijana, njihovih glukuronida i metiliranih derivata, pokazano je u plazmi i urinu u toku 24 h po unošenju soka (Wiczowski i sur., 2010).

Suprotno pojedinim literaturnim navodima da se antocijani u cirkulaciji nalaze isključivo u formi nemetaboliziranih glikozida, Kay i sur. su nakon administracije cijanidin-3-glikozida odraslim muškarcima, kao najzastupljenije forme u serumu detektirali konjugirane metabolite (Kay i sur., 2005).

Studije provedene na štakorima pokazale su da se antocijani brzo apsorbiraju u želucu i tankom crijevu, kao i da imaju široku distribuciju u organizmu (Felgines i sur., 2009; Talavéra i sur., 2004). Njihovo prisustvo u različitim organima, uključujući srce i masno tkivo

svjedoči o potencijalnim povoljnim efektima koje bi antocijani mogli ispoljiti na očuvanje zdravlja ljudi i prevenciju KVB i drugih kroničnih bolesti.

6.0. ZAKLJUČCI

U provedenom istraživanju hepatoprotektivnog učinka praha aronije na jetri C57BL miša došli smo do sljedećih rezultata:

1. Statistički značajno smanjenje aktivnosti MDA zabilježeno je kod grupe životinja koja je tretirana prahom aronije (PAM) za 19,73%, dok je kod grupe koja je tretirana sa 2% kolesterola (CH) radi izazivanja hiperkolesterolemije došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti MDA za 46,68% u odnosu na kontrolnu grupu životinja (KO).
2. Statistički značajno smanjenje aktivnosti GSH zabilježeno je kod grupe tretirane sa CH za 25,39%, no također je došlo i do povećanja aktivnosti GSH kod grupa koje su tretirane sa PAM za 55,8% i CH+PAM za 38,85% u odnosu na kontrolnu vrijednost.
3. Statistički značajno povećanje aktivnosti SOD zabilježeno je kod grupe koja je tretirana sa PAM za 12,32%, dok je kod grupe koja je tretirana sa CH došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti SOD za 36,88% u odnosu na kontrolnu grupu životinja.
4. Povećanje koncentracije GSH i SOD u jetri kod ispitivanog dodatka praha aronije ukazuje na protektivnu antioksidacijsku aktivnost praha aronije. U istom dodatku došlo je do značajnog smanjenja koncentracije MDA te prema tome možemo zaključiti kako navedeni pripravci snizuju rizik od pojave oksidacijskog stresa, kao i lipidne peroksidacije.

7.0 LITERATURA

- Anonymous 1 (2015.) *Aronia melanocarpa* (<http://www.bodiekko.si/sibiriska-borovnica-crnoplodna-aronija>). Pristupljeno 20. lipnja 2015.
- Anonymous 2 (2015.) Sustav antioksidacijskih enzima (SOD-superoksid dismutaza; CAT-katalaza; GPx-glutation peroksidaza; GSH-glutation). (<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2011/467180/fig1/>). Pristupljeno 20. lipnja 2015.
- Anonymous 3 (2015.) Struktura malondialdehida (<https://sh.wikipedia.org/wiki/Malondialdehid>). Pristupljeno 20. lipnja 2015.
- Atanasova-Goranova V.K., Dimova P.I., Pevicharova G.T. (1997) Effect of food products on endogenous generation of *N*-nitrosamines in rats. *Br J Nutr.* **78**, 335–45.
- Balcerek, M., Sczopa, J.S. (2002) Optimization of the technology of aronia spirit production-part 1: selection of the fermentation conditions. *Dtsch Lebensm Rundsch.* **98**, 326-331.
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D. (2004) Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes* and *Aronia*. *J Food Sci.* **69**, 164-169.
- Berend, S., Grabarić, Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **59**, 205. - 212.
- Broncel, M., Kozirog, M., Duchnowicz, P., Koter-Michalak, M., Sikora, J., Chojnowska-Jeziarska, J. (2010) *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit.* **16**, 28-34.
- Catala, A. (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids.* **157**, 1-11.
- Choe M., Jackson C., Yu B.P. (1995) Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med.* **18**, 977-84.
- Chong, M.F.F., Macdonald, R., Lovegrove, J. A. (2012) Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Brit J Nutr.* **104**, 28.–39.
- Chrubasik, C., Li, G., Chrubasik, S. (2010) The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytother Res.* **24**, 1107-1114.
- Davies, M.J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.* **305**, 761-770.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* **11**, 81-128.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem.* **312**, 224–227.
- Felgines, C., Texier, O., Garcin, P., Besson, C., Lamaison, J.L., Scalbert, A. (2009) Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet. *Mol Nutr Food Res.* **53**, 1098-1103.
- Flohe, J., Brigelius-Flohe, I. (2001) Selenium: its molecular biology and role in human health, Selenoproteins of the glutathione system. *Norwel.* **33**, 157-178.
- Ganji, SH., Kamanna, VS., Kashyap, ML (2003) Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* **14**: 298-305.

- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* **48**, 4581-4589.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* **393**, 561-564.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) Free radicals in biology and medicine. 4 izdanje. Oxford University Press: Oxford.
- Jakobek, L., Drenjančević, M., Jukić, V., Šeruga, M. (2012) Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries. *Sci. Hortic.-Amsterdam.* **147**, 56-63.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M. (2007) Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau,* **103**, 369-378.
- Jeppsson, N., Johansson, R. (2000) Changes in fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) during maturation. *J Hort Sci Biotechnol* **75**: 340-345.
- Jurgoński, A., Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z. (2008) Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant Foods Hum Nutr.* **63**, 176-182.
- Kane, ME., Dehgan, B., Sheehan, TJ. (1991) *In vitro* propagation of Florida native plants: *Aronia arbutifolia*. *Proc Fla State Hort Soc.* **104**, 287-290.
- Kasparaviciene, G., Briedis, V. (2003) Stability and antioxidant activity of black currant and black *Aronia* berry juices. *Medicina (Kannas)* **39**, 65-69.
- Kay, C.D., Mazza, G.J., Holub, B.J. (2005) Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr.* **135**, 2582-2588.
- Kedzierska, M., Olas, B., Wachowicz, B., Glowacki, R., Bald, E., Czernek, U., Szydłowska-Pazera, K., Potemski, P., Piekarski, J., Jeziorski, A. (2012) 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.* **83**, 310-317.
- Kehrer, J.P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* **149**, 43-50.
- Kinnula, V.L., Crapo, J.D., Raivio, K.O. (1995) Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest.* **73**, 3-19.
- Kowalczyk, E., Fijałkowski, P., Kura, M., Krzesiński, P., Błaszczuk, J., Kowalski, J., Smigielski, J., Rutkowski, M., Kopff, M. (2005) The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia. *Pol Merkur Lekarski.* **19**, 651-653.
- Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C., Williamson, G. (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.* **80**, 15-21.
- Kulling, S. E., Rawel, H.M. (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – a review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* **74**, 1625-1634.
- Kulling, Se., Rawel, HM. (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-a review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* **74**:1625-1634.
- Lehmann, H. (1990) Die Aroniabeere und ihre Verarbeitung. *Flüssiges Obst* , **57**: 746-52.
- Liu, S., Manson, J.E., Lee, I.M., Cole, S.R., Hennekens, C.H., Willett, W.C., Buring, J.E. (2000) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's HealthStudy. *Am J Clin Nutr.* **72**, 922-928.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.

- Malinowska, J., Babicz, K., Olas, B., Stochmal, A., Oleszek, W. (2012) Aronia melanocarpa extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma. *Nutrition*. **28**, 793-798.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. **81**, 230-242.
- Naruszewicz, M., Laniewska, I., Millo, B., Dłuzniewski, M. (2007) Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). *Atherosclerosis*. **194**, 179-184.
- Oberley, T.D., Toyokuni, S., Szweda, L.I. (1999) Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med*. **27**, 695-703.
- Olas, B., Wachowicz, B., Tomczak, A., Erler, J., Stochmal, A., Oleszek, W. (2008) 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*. **19**, 70-77.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A. (2005) Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*. **221**, 809–813.
- Ozbay, B., Dülger, H. (2002) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku J Exp Med*. **197**, 119-124.
- Pilaczynska-Szczesniak, L., Skarpanska-Steinborn, A., Deskur, E., Basta, P., Horoszkiewicz-Hassan, M. (2005) 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*. **15**, 48-58.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **45**, 287–306.
- Scott, RW., Skirvin, RM. (2007) Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Minchx.): a semi-edible fruit with no pests. *J Am Pomol Soc*. **61**:135-137.
- Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D. (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem*. **56**, 1415-1422.
- Sies, H., Jones, D. (2007) Encyclopedia of Stress. 2 izdanje. Academic Press.
- Simeonov, S.B., Botushanov, N.P., Karahanian, E.B., Pavlova, M.B., Husianitis, H.K., Troev, D.M. (2002) Effects of Aronia melanocarpa juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)*. **44**, 20-23.
- Skoczynska, A., Jedrychowska, I., Poreba, R., Affelska-Jercha, A., Turczyn, B., Wojakowska, A., Andrzejak, R. (2007) Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep*. **59**, 177–182.
- Soriano Sancho, R. A., Pastore, G. M. (2012) Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Res. Int*. **46**, 378.-386.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.L., Rémésy, C. (2004) Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J Nutr*. **134**, 2275-2279.
- Tanaka, T., Tanaka, A. (2001) Chemical components and characteristics of black chokeberry. *J Jpn Soc Food Sci Technol*. **48**, 606–610.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Borisova, P., Galunska, B., Krasnaliev, I., Belcheva, A. (2004) Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from Aronia melanocarpa on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Exp Toxicol Pathol*. **56**, 195–201

- 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.* **62**, 19-24.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Kuzmanov, K., Tancheva, S., Belcheva, A. (2007) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **29**, 101–5.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Marazova, K., Krasnaliev, I., Galunska B., Borisova, P., Belcheva, A. (2005) Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. *Exp Toxicol Pathol.* **56**, 385-392.
- Wawer, I. (2006) *The power of nature: Aronia melanocarpa*, Nature's Print Ltd., UK.
- Wiczowski, W., Romaszko, E., Piskula, M.K. (2010) Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans. *J Agric Food Chem.* **58**, 12130-12136.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., McKay, S. (2004) Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7846.-7856.
- Yin, D. (1996) Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med.* **21**, 871-888.
- Zamora-Ros, R., Serafini, M., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., Martínez-González, M.A., Salas-Salvadó, J., Fiol, M., Lapetra, J., Arós, F., Covas, M.I., Andres-Lacueva, C. (2013) 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.* **23**, 1167-1174.
- Zheng, W., Wang, S.Y. (2003) Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem.* **51**, 502-509.
- Zlatanov, M.D. (1999) Lipid composition of Bulgarian chokeberry, black currants and rose hip seed oil. *J Sci Food Agric.* **79**, 1620-1624.