Biodostupnost i antioksidacijski potencijal bioaktivnih komponenti iz pokožice grožđa u C57BL/6 miša

Fumić, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:395302

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016. Monika Fumić, 711/N

BIODOSTUPNOST I ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ POKOŽICE GROŽĐA U C57BL/6 MIŠA

Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta "Primjena inovativnih tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina". Projekt je sufinancirala Europska unija u okviru poziva RC.2.2.08 „Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj, Operativni program Regionalna konkurentnost 2007. -2013.

Rad je izrađen je u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ireni Landeka Jurčević koja mi je omogućila sudjelovanje na ovom izuzetnom eksperimentalnom radu koji mi je približio uvid u znanstvenu podlogu moje struke, te postao važnom smjernicom u daljnjem životu i radu. Neizmjerno sam zahvalna na utrošenom vremenu, trudu te konstantnoj susretljivosti tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, pomoći i savjetima tijekom pisanja te nesebično podijeljenom znanju koji je bio ključan za jasno razumijevanje problematike diplomskog rada. Stečeno iskustvo u radu sa mentoricom i kolegama će mi zauvijek ostati u iznimno lijepom sjećanju kao jedna od najvažnijih lekcija savladanih tijekom studiranja na ovom fakultetu.

Veliko hvala i dr. sc. Domagoju Đikiću, doc. na pruženoj pomoći, savjetima te susretljivosti tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada u Laboratoriju za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Zahvaljujem i svojim prijateljima, kolegicama i kolegama koji su mi bili velika podrška i nepresušan izvor pozitivne energije kroz čitavo vrijeme studiranja.

Na kraju, najveću zaslugu za sve što sam postigla i što ću postići pripisujem svojim roditeljima i sestri koji su moja najveća inspiracija i najdraži motiv. Njihova nesebična ljubav i razumijevanje je učinilo moje studentske dane ljepšim i lakšim, a stjecanje naziva magistra nutricionizma utoliko vrijednijim i posebnijim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

BIODOSTUPNOST I ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ POKOŽICE GROŽĐA U C57BL/6 MIŠA

Monika Fumić, 711/N

SAŽETAK: Biodostupnost bioaktivnih spojeva, prvenstveno antocijana, iz pokožice grožđa istražena je na modelu laboratorijskih životinja (C57BL/6 miš) kroz 30 dana tretmana. Eksperimentalne grupe su činile 2 grupe životinja (težine 30±2,51 g): grupa I- kontrolna grupa (0,2 mL fiziološke otopine) te grupa II- tretirana ekstraktom pokožice grožđa (GSE) (100 mg/kg⁄dan). Istraživani su i biomarkeri oksidacijskog stresa u homogenatu tkiva bubrega i jetre, malonildialdehid (MDA), karbonilirani proteini (PC), reducirani glutation (GSH), supeoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT). Rezultati pokazuju da je tretman s GSE statistički značajno (ANOVA, $p<0,05$) smanjio aktivnosti MDA i PC u bubregu i jetri miša u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što se može pripisati polifenolima prisutnim u ekstraktu pokožice grožđa, dok su ostale grupe ostale na razini kontrolne skupine. Koncentracije GSH, SOD i CAT u bubregu statistički su značajno (ANOVA, $p<0,05$) povećane u svim grupama miševa u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na antioksidacijski učinak pokožice grožđa na smanjenje oksidacijskog stresa.

Ključne riječi: biodostupnost, antioksidacijski potencijal, ekstakt pokožice grožđa (*Vitis Vinifera*)
Rad sadrži: 55 stranica, 19 slika, 2 tablice, 130 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević*
Pomoć pri izradi: *Izv. prof. dr. sc. Domagoj Đikić*
Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Red. prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Izv. prof. dr. sc. *Irena Landeka Jurčević*
3. Izv. prof. dr. sc. *Domagoj Đikić,* PMF, Zagreb
4. Izv. prof. dr. sc. *Ivana Kmetič,* (zamjena)

Datum obrane: 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

BIOAVAILABILITY AND ANTIOXIDATIVE POTENTIAL OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF GRAPE SKIN FROM C57BL/6 MOUSE

Monika Fumić, 711/N

ABSTRACT: Bioavailability of bioactive compounds, primarily anthocyanins, from grape skin extract has been investigated in laboratory animals (C57BL/6 mouse). The animals were treated for 30 days and divided into 2 experimental groups (weight 30±2,51 g): group I - control group (0,2 mL saline solution) and group II- treated with grape skin extract (100 mg/kg/day). Biomarkers of oxidative stress which were studied in kidney and liver tissue homogenates were malondialdehyde (MDA), carbonylated proteins (PC), reduced glutathione (GSH), superoksid dismutase (SOD) and catalase (CAT). The results show that GSE statistically significant (ANOVA, $p < 0.05$) reduced the activity of MDA and PC in the kidney and liver of a mouse which were compared with control group of animals. That effect can be attributed to the polyphenols present in the grape skin extract. The other groups were unchanged and close to the control group. The concentrations of GSH, SOD and CAT were statistically significant (ANOVA, $p < 0.05$) and increased in all groups of mouses compared to the control group, which indicates the antioxidant effect of GSE and potencial of reducing oxidative stress.

Key words: bioavailability, antioxidant potential, grape skin extract (*Vitis Vinifera*)
Thesis contains: : 55 pages, 19 figures, 2 tables, 130 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: *PhD. Irena Landeka Jurčević, Assistant Professor*
Technical support and assistance: *PhD. Domagoj Đikić, Assistant Professor*
Reviewers:
1. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
2. PhD. *Irena Landeka Jurčević*, Associate Professor
3. PhD. *Domagoj Đikić,* Associate Professor, PMF, Zagreb
4. PhD. *Ivana Kmetič*, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. TEORIJSKI DIO **3**
2.1. KLASIFIKACIJA POLIFENOLA 3
2.1.1. Antocijani 3
2.2. KEMIJSKI SASTAV POKOŽICE GROŽĐA 5
2.3. ZNAČAJ POKOŽICE GROŽĐA 7
2.4. METABOLIZAM I BIODOSTUPNOST POLIFENOLA 8
2.4.1. Metabolizam i biodostupnost antocijana 9
2.5. UTJECAJ NA ZDRAVLJE 12
2.5.1. Antioksidacijska aktivnost 12
2.5.2. Neuroprotektivni učinak 14
2.5.3. Utjecaj na dijabetes i pretilost 15
2.5.4. Antiupalna aktivnost 15
2.5.5. Antikancerogena aktivnost 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO **17**
3.1. *In vivo* ISTRAŽIVANJE UTJECAJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA POKOŽICE GROŽĐA NA AKTIVNOST MARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA 17
3.1.1. Eksperimentalne grupe životinja 17
3.1.2. Homogenizacija organa 18
3.2. MJERENJE MARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA 18
3.2.1. Određivanje proteina metodom po Lowry-u 18
3.2.2. Mjerenje lipidne peroksidacije (MDA) 19
3.2.3. Mjerenje aktivnosti reduciranog glutationa (GSH) 20
3.2.4. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) 20
3.2.5. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT) 21
3.2.6. Aktivnost karboniliranih proteina (PC) 21
3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 22
3.4. BIODOSTUPNOST BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ POKOŽICE GROŽĐA 23
3.4.1. Pokusne životinje 23
3.4.2. Priprema uzoraka seruma za enzimsku hidrolizu 23
3.4.3. Priprema uzoraka organa za enzimsku hidrolizu 23
3.4.4. Enzimska hidroliza uzoraka 24
3.4.5. Ekstrakcija 24
3.5. UPLC MS/MS (ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETER) 24

4. REZULTATI I RASPRAVA **27**
4.1. UTJECAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ POKOŽICE GROŽĐA NA AKTIVNOST MARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA U JETRI I BUBREGU C57BL/6 MIŠA 28
4.2. POSTOTAK PROMJENE OKSIDACIJSKIH ENZIMA (MDA, GSH, SOD, CAT I PC) U JETRI I BUBREGU U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU ŽIVOTINJA 35
4.3. BIODOSTUPNOST ANTOCIJANA 36

5. ZAKLJUČCI **48**

6. LITERATURA **49**

1. UVOD

Kroz posljednja dva desetljeća polifenoli privlače puno pozornosti zbog svojih izvanrednih antioksidacijskih sposobnosti. Polifenoli su biološki aktivne komponente prisutne u brojnim namirnicama zastupljenim u ljudskoj prehrani. Po kemijskoj strukturi, to su aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata. U prirodi ih rijetko nalazimo u slobodnom obliku, a najčešće su prisutni u esterificiranom ili pak konjugiranom obliku (Čović i sur., 2009).

Zahvaljujući antioksidacijskim sposobnostima koje posjeduju, imaju značajnu ulogu u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom, posebice kada je riječ o kardiovaskularnim i neurodegenerativnim bolestima te karcinomu. Sudjeluju i u regulaciji aktivnosti širokog spektra enzima i staničnih receptora (Middleton i sur., 2000).

Pozitivni učinci grožda i proizvoda od grožđa povezuju se upravo s bioaktivnim polifenolima koje sadrže. Posebno značajnu ulogu u skupini bioaktivnih polifenola imaju antocijani i katehini.

Antocijani strukturno pripadaju flavonima. Njihovo ime je izvedeno od grčke riječi *antho* što znači cvijet, i *kyanos* što znači plav. U biljnim vrstama su prisutni u vidu heterozida. Aglikoni antocijana poznati su kao antocijanidini. Antocijani su pigmenti koji su u stanici prisutni u vakuoli vezani za šećer (De Pascual i Sanchez, 2008). Štite biljke od UV zračenja, štetnih mikroorganizama i pomažu u oprašivanju i raznošenju sjemena privlačenjem insekata (Wrolstad, 2004).

Antocijani su pigmenti topljivi u vodi, pripadaju podskupini flavonoida te su odgovorni za plavu, ljubičastu, narančastu i crvenu boju raznog voća, cvijetova i lišća. Unatoč njihovoj slabijoj oralnoj biodostupnosti te relativno niskoj postprandijalnoj koncentraciji u plazmi, konzumacija namirnica bogatih ovim pigmentima usko je povezana sa smanjenim rizikom od nastanka nekoliko patoloških stanja, uključujući razvoj kardiovaskularnih bolesti (Jennings i sur., 2012) i karcinoma (Zamora-Ros i sur., 2012).

Biodostupnost ovih spojeva je relativno niska zbog slabe apsorpcije u probavnom sustavu te ovisi o vrsti spoja, kemijskoj strukturi, opsegu konjugacije te individualnosti crijevne mikrobiote (Shivashankara i Acharya, 2010).

Ipak, antocijani dijele zajedničke metaboličke reakcije s ostalim flavonoidima. Antocijani su kao i flavonoidi prisutni u hrani uglavnom kao glikozidi. Aglikonski dio je hidrofoban i lako prolazi kroz membrane pasivnom difuzijom. Difuzija hidrofilnog dijela

antocijana se ne odvija lako kroz membrane. Apsorpcija antocijana se odigrava aktivnim transportom tako što prvo dolazi do hidrolize. Mnoge kliničke studije ukazuju na to da se resorpcija antocijana odvija u malom intestinumu, iako još uvijek nije do kraja razjašnjeno kako ulaze u enterocite. Pretpostavlja se da se to odvija natrij-glikozidnim transportom ili pasivnom difuzijom aglikona koji se prije prolaska kroz membranu izdvojio iz glikozida poslije hidrolize laktat pilorizin hidrolazom (Wrolstad, 2004).

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti biodostupnost i antioksidacijski kapacitet bioaktivnih komponenti pokožice grožda, s naglaskom na antocijane, u serumu, jetri te bubregu C57BL/6 miša.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KLASIFIKACIJA POLIFENOLA

Polifenoli predstavljaju sekundarne metabolite biljaka koji su uključeni u obranu biljke od ultraljubičastog zračenja i patogena, te sudjeluju u njenom rastu i razmnožavanju (Manach i sur., 2004). Čine raznoliku skupinu spojeva, koje možemo, na temelju njihove strukture i sličnih kemijskih svojstava svrstati u nekoliko definiranih skupina. Svi polifenoli nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora šikiminske kiseline (Pandey i Rizvi, 2009).

Fenolni spojevi imaju najmanje jedan aromatski prsten s priključenom jednom ili više hidroksilnih skupina. Klasificiraju se s obzirom na broj fenolnih prstena koje sadrže i/ili supstituenata koji povezuju te prstene. Na temelju tih razlika dijelimo ih na flavonoide i ne-flavonoide (Del Rio i sur., 2013).

Skupini ne-flavonoida pripadaju fenolne kiseline, stilbeni i lignani. Flavonoidi imaju složeniju strukturu u odnosu na ne-flavonoide. Sadrže petnaest ugljikovih atoma raspoređenih unutar dva aromatska prstena povezanih s piranskim prstenom. Glavni podrazredi flavonoida su flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni i antocijanidini. Ostale grupe flavonoida koje su u hrani prisutne u vrlo malim količinama su halkoni, dihidrohalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auroni (Pandey i Rizvi, 2009; Manach i sur., 2004).

U sastavu komine grožđa (pokožica grožđa, sjemenke te peteljka) nalazimo brojne polifenole spojeve, i to u prvom redu flavonoide (antocijani, flavanoli, flavonoli) te u manjem udjelu neflavonoide (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te stilbene) (Rodríguez i sur., 2006). Njihov udio ovisi o različitim čimbenicima kao što su: sorta grožđa, klimatski i agro-tehnički uvjeti te sastav tla (Mazza i sur., 1999).

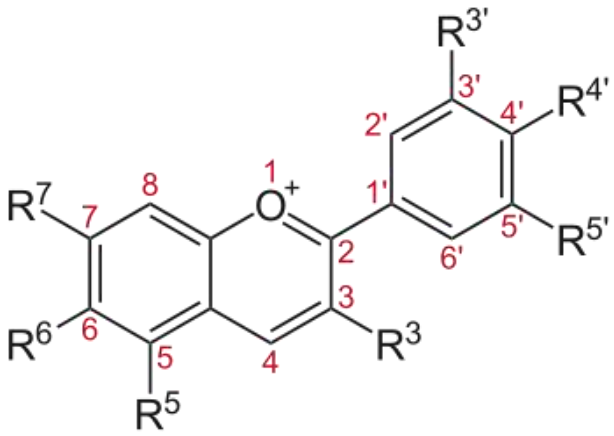
2.1.1. Antocijani

Antocijani su najvažnija skupina u vodi topljivih pigmenata u biljkama. Odgovorni su za crvenu, narančastu, ljubičastu i plavu boju mnogih biljaka a posebno voća, povrća i žitarica. U grožđu su smješteni u pokožici, te su odgovorni za njegovu crnu boju (Di Lecce i sur., 2014).

To su hranjive bioaktivne komponente koje imaju dvostruki značaj. Prvi je tehnološki, zbog njihovog utjecaja na senzorske karakteristike prehrambenih proizvoda, a drugi je biološki zbog utjecaja na zdravlje, među kojima je najvažniji kardioprotektivni učinak (De Pascual i Sanchez, 2008).

Po kemijskoj strukturi antocijani su glikozilirani, polihidroksi ili polimetoksi derivati 2-benzil-1-benzopirilium kationa (flavilium kationa) te sadrže dva fenolna prstena (A i B) koji su povezana preko centralnog piranskog prstena C. Kemijska struktura im varira ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena te ovisi o glikozilaciji s različitim šećerima (Tsao i McCallum, 2009). Također kemijska struktura im ovisi o položaju supstituenata, te prirodi i broju alifatskih i aromatskih kiselina vezanih za šećer (Ovando i sur., 2009).

Antocijanidini su osnova strukture antocijana. To su aglikonski djelovi na koje se mogu vezati šećeri ili organske kiseline, a u prirodi je do sad poznato 6 antocijanidina: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin (slika 1).



ANTOCIJANIDINI	$R_{3'}$	$R_{5'}$
Cijanidin	-OH	-H
Delfinidin	-OH	-OH
Pelargonidin	-H	-H
Malvidin	$-OCH_3$	$-OCH_3$
Peonidin	$-OCH_3$	-H
Petunidin	-OH	$-OCH_3$

Slika 1. Kemijska struktura antocijana (Tsao, 2010).

U sastavu grožđa, vina i komine prema broju i vrsti supstituiranih hidroksilnih i metilnih skupina razlikujemo 5 antocijanidina: delfinidin, cijanidin, peonidin, petunidin i malvidin. Relativno su nestabilni i lako oksidiraju. Pri nižim pH vrijednostima nalaze se u formi flavijevog kationa, dok su pri višim pH vrijednostima u kinoidalnoj formi (Garrido i Borges, 2013).

Prema istraživanjima, u pokožici grožđa najzastupljeniji antocijani su malvidin-3-O-glukozid te peonidin-3-O- glukozid, dok su ostali prisutni u manjim koncentracijama (Ky i sur., 2014).

2.2. KEMIJSKI SASTAV POKOŽICE GROŽĐA

Pokožica predstavlja vanjski omotač bobice koji se sastoji od 6 – 10 slojeva stanica koje su na vanjskom dijelu manje a prema unutrašnjosti veće s vrlo tankim pregradama (slika 2).



Slika 2. Pokožica grožđa (Anonymus, 2016)

Pokožica bobice grožđa (egzokarp) se sastoji od dvije anatomski različite regije. Vanjski dio pokožice čini epiderma, a unutarnji dio čini hipoderma. Epiderma sadrži jedan sloj spljoštenih stanica u obliku diska s nepravilno valovitim krajevima. To su ujedno i stanice u kojima se ne odvija fotosinteza već se u njihovim vakuolama nalaze kapljice ulja. Ovisno o

vrsti, mogu razviti zadebljanu ili lignificiranu stjenku. Na epidermi se nalazi nekolicina puči koje s vremenom tj. zrenjem gube funkciju, postaju plutaste i u njima se akumuliraju polifenoli. Većina stanica hipoderme također akumulira flavonoide dok su antocijani akumulirani u njenim krajnjim slojevima.

Po kemijskom sastavu pokožica je siromašna šećerom, 0,7–3,0 g 1000^{-1} bobica dok meso bobice sadrži od 140 do 175 g šećera. Bogata je celulozom (1/4 do 1/5 suhe težine), netopljivim pektinima i proteinima (10–15 %). Kemijski sastav pokožice prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav pokožice grožđa (Radovanović, 1986).

Pokožica grožđa	%
Voda	53-82
Pentoze i pentozani	1-1,2
Heksoze	malo
Celuloza	3,5
Pektin, smole i sluzi	0,9
Kiseline	0,13-0,67
Tanini	0,01-2,3
Tvari boje	1,0-15,4
Fermenti	malo
Vitamini	malo
Dušični spojevi	0,8-1,9
Masti	1,5
Pepeo	2,0-3,7

Pokožica grožđa je bogata polifenolima (kod crnih sorti duplo više), ali je količina još uvijek znatno manja nego u peteljci. Sadrži i taninske spojeve, čiju količinu u velikoj mjeri može smanjiti pojava plijesni na grožđu (*Botrytis cinerea* koja svojim enzimima razara taninske spojeve u kožici). Kod direktno osunčanih grozdova sadržaj antocijana je često viši, međutim, to nije uvijek tako. Direktno sunčevo osvjetljenje uz previsoku temperaturu zraka može utjecati na manji sadržaj antocijana. Do toga dolazi zbog tamne boje bobica u kojima temperatura u takvim uvjetima može biti i do preko 50 °C, što loše utječe na antocijane.

Zasjenjeni grozdovi uz manji prinos imaju isti sadržaj antocijana od onih izloženih direktnom svjetlu u najtoplijem dijelu dana. Visoke temperature (>35 °C) u fazi dozrijevanja grožđa utječu negativno, a optimalne su od 25-30 °C. Polifenolni sastav pokožice i sjemenki grožđa dakako ovisi o sorti grožđa, agro-klimatskim uvjetima, stupnju zrelosti pri berbi kao i vremenu maceracije. Sastav polifenola prisutnih u pokožici grožđa prikazan je tablicom 2.

Tablica 2. Sastav polifenola prisutnih u pokožici grožđa (Bourzeix, 1976).

Sastav polifenola	%
Ukupni polifenoli	12-61
Procijanidini	17-47
Taninski spojevi	14-50
Antocijani	100

Kod većine sorti, pokožica je jedino mjesto gdje se nalaze tvari boje. Antocijani su sakupljeni u pokožici i zauzimaju 3 – 4 sloja stanica ispod epiderme. Na njihovu stabilnost utječu brojni čimbenici poput pH, temperature, svjetla, prisutnosti drugih fenolnih spojeva, enzima, iona metala, šećera, askorbinske kiseline, kisika i sumporova dioksida (Ovando i sur., 2009).

2.3. ZNAČAJ POKOŽICE GROŽĐA

Na pokožicu grožđa otpada najveći postotak vinskog otpada, odnosno komine. Komina su fermentirani ili nefermentirani ostaci koji zaostaju nakon prešanja svježeg grožđa. Pokožica grožđa i sjemenke su posebno bogat izvor polifenola poput proantocijanidina, antocijanina, flavonola i flavan-3-ola koji posjeduju antibakterijska, antivirusna, antioksidacijska, protuupalna, anti-kancerogena i kardioprotektivna svojstva (Kallithraka i sur, 2005).

Povećanje svijesti potrošača o prehrani u svezi zdravstvenih problema, te rastuće nepovjerenje prema umjetnim aditivima osnovni su pokretači koji potiču znanstvenu zajednicu, kao i prehrambenu industriju da krenu u potragu za prirodnim prehrambenim aditivima koji bi zamijenili umjetne, potencijalno štetne po zdravlje.

Agro-industrijski otpad od voća i povrća sadrži značajni dio vrijednih spojeva (Das, 2001) čija je dostupnost, ekstrakcija i antioksidacijski kapacitet predmet znanstvenih istraživanja (Moure i sur., 2001).

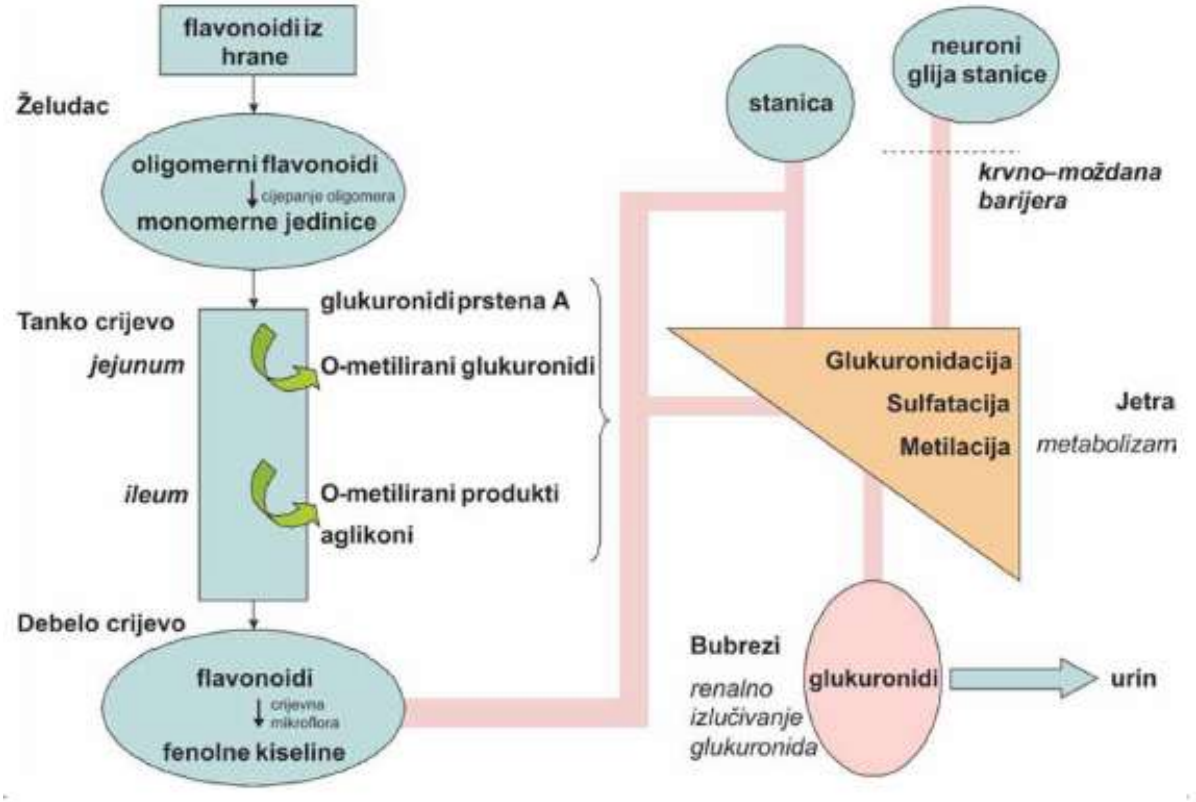
Zbog napretka industrijalizacije agro-industrijski otpad postaje rastući problem. Ovaj nusproizvod iznimno je bogat polifenolnim spojevima, što otvara mogućnost iskorištenja komine i stvaranja proizvoda dodane vrijednosti. Naime, tijekom prerade grožđa i proizvodnje vina čak 60-70 % bioaktivnih spojeva grožđa zaostaje u komini i ne prelazi u vino, što kominu čini bogatim, jeftinim i lako dostupnim izvorom bioaktivnih spojeva s primjenom u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Upravo iz tog razloga je istraživanje načina na koji se koncentrirani agro-industrijski otpad može reciklirati i asimilirati u prehrambenom ciklusu u obliku prirodnih dodataka prehrani od presudne važnosti.

2.4. METABOLIZAM I BIODOSTUPNOST POLIFENOLA

Kako bi se razumjela biodostupnost polifenola, potrebno je poznavati metaboličke procese kojima se podvrgavaju u organizmu. Vrlo mali broj polifenola unesenih prehranom se izlučuje u nepromijenjenom obliku. Zbog toga je za očekivati kako na djelovanje polifenola u organizmu ne utječu samo ishodišne molekule, već i biološke značajke metabolita koji nastaju tijekom njihove razgradnje.

U želucu se, pri niskim pH vrijednostima, odvija cijepanje oligomernih proantocijanidina u monomerne jedinice. Podskupine flavonoida podliježu intenzivnom metabolizmu u tankom crijevu, posebice u jejunumu i ileumu. Njihovi metaboliti se portalnom venom transportiraju do jetre gdje se dalje metaboliziraju. Mikroflora debelog crijeva razgrađuje flavonoide u manje fenolne kiseline koje se mogu apsorbirati. Metabolizam polifenola se odvija i u drugim različitim tipovima stanica, a najčešća sudbina velikog dijela metabolita je izlučivanje putem bubrega. Na slici 3. je prikazan nastanak flavonoidnih metabolita i konjugata u ljudskom organizmu (Spencer, 2003).

Biodostupnost je pojam definiran od strane FDA (*Food and Drug Administration*), a odnosi se brzinu apsorpcije i količinu aktivne tvari koja dospije u sistemsku cirkulaciju (Fang, 2014). Bioaktivne komponente iz biljnih izvora moraju imati određenu biodostupnost kako bi ispoljile bilo kakav učinak na organizam. Zbog toga, potrebno je široko znanje o njihovoj farmakokinetici kako bi se utvrdio stvaran utjecaj dnevnog unosa tih komponenata na zaštitu i poboljšanje zdravstvenog statusa.



Slika 3. Prikaz nastanka flavonoidnih metabolita i konjugata u ljudskom organizmu (Spencer, 2003).

2.4.1. Metabolizam i biodostupnost antocijana

Antocijane karakterizira kompleksnost u ispoljavanju njihovog kemijskog utjecaja *in vitro* te *in vivo* (McGhie i Walton, 2007), posebice kada je riječ o njihovoj apsorpciji, metabolizmu, distribuciji te ekskreciji (Cisowska i sur., 2011), što znatno utječe na stupanj njihovog povoljnog učinka na zdravlje. Slično drugim polifenolima, antocijani se hidroliziraju u crijevima, te se brzo apsorbiraju u probavnom traktu gdje ulaze u epitelne stanice pasivnom difuzijom ili pomoću specifičnih proteina nosača (Crozier i sur., 2009).

Antocijani se mogu apsorbirati netaknuti, bez obzira na razlike u veličini ili pak šećernim i aciliranim skupinama koje sadrže (Stalmach i sur., 2012). Na brzinu i stupanj apsorpcije antocijana utječu supstituenti, odnosno aglikonski i šećerni dio te acilirane skupine (Tian i sur., 2006). Stupanj apsorpcije može biti smanjen ukoliko se antocijani nalaze u formi kompleksa sa drugim spojevima (Kurilich i sur., 2005).

Nakon apsorpcije, antocijani se dalje metaboliziraju u enterocitima ili se izlučuju iz organizma putem urina i žuči ovisno o kemijskoj strukturi (Ichiyanagi i sur., 2006).

Kada dospiju u krvotok, metaboliti antocijana mogu biti podvrgnuti drugoj fazi metabolizma koja uključuje daljnje pretvorbe u jetri. Te pretvorbe su posredovane tzv. detoksikacijskim enzimima jetre, koji su također locirani u crijevnom epitelu te bubrezima. Putem tih metaboličkih pretvorba, antocijani podliježu biotransformacijama koje uključuju metilaciju, glukuronidizaciju i/ili sulfataciju što narušava njihovu strukturnu stabilnost (Galvano i sur., 2009).

Enzimi koji su uključeni u navedene pretvorbe su COMT, enzim tubularnih stanica bubrega koji je odgovoran za prijenos metilne skupine na aglikon flavonoida (Ichiyanagi i sur., 2005). Nadalje, 3'-O-metilacija je odgovorna za pretvorbu cijanidina u peonidin te delfinidina u petunidin, dok 5'-O-metilacijom petunidin prelazi u malvidin (Crozier i sur., 2009). Ne postoji puno dokaza o ovakvim pretvorbama u *in vivo* istraživanjima.

Tragovi petunidin-3-glukozida i malvidin-3-glukozida, nastali metilacijom delfinidin-3-glukozida (metabolita koji nastaje nakon ingestije cijanidin-3-glukozida), nađeni su u bubrezima, jetri, serumu te urinu štakora (Vanzo i sur., 2011). Kateholna struktura je od presudne važnosti za aktivnost COMT, pa zbog toga pelargonidin, peonidin, i malvidin nemaju metilirane metabolite.

Uridin difosfoglukoza glukuronozil transferaza te uridin difosfoglukoza dehidrogenaza (u jetri i crijevima) kataliziraju glukuronidaciju aglikonskog djela flavonoida (Yang i sur., 1998).

Na glukuronidaciju utječe aglikonska struktura: cijanidin, peonidin, izopeonidin, i pelargonidin su *in vivo* detektirani u formi monoglukuronidnih derivata (Kay i Mazza, 2005).

Fenol sulfotransferaza (SULT1) katalizira sulfataciju flavonoida (Scalbert i Williamson, 2000). Sulfokonjugati cijanidina te sulfokonjugati pelargonidina su pronađeni u urinu čovjeka nakon konzumacije kupina i jagoda (Felgines i sur., 2005).

U urinu čovjeka i štakora, koncentracija delfinidina je niža u odnosu na koncentraciju malvidina. Razlog tome je razlika u hidrofobnosti; malvidin ima manje slobodnih hidroksilnih skupina što ga čini hidrofobnijim, pa se lakše transportira u stanice i tkiva. Budući da je ekskrecija putem urina indikator apsorpcije, u istraživanju provedenom na štakorima, utvrđeno je da delfinidin glukozid ima viši stupanj apsorpcije u odnosu na malvidin glukozid (McGhie i sur., 2003). Ovo saznanje također podupire činjenica da je koncentracija delfinidina i cijanidina u plazmi znatno viša u odnosu na koncentraciju malvidina. U studijama provedenim na šakorima, prema modelu *in sito* ingestije, utvrđeno je kako je

stupanj apsorpcije antocijana varirao od 10.7% za malvidin-3-glukozid do 22.4% za cijanidin-3-glukozid (Talavèra i sur., 2004).

Talavèra i suradnici (2004) su utvrdili da je stupanj eliminacije cijanidin-3-glukozida iz crijeva štakora bio veći u odnosu na druge glukozide cijanidina. Iako su dostupni dokazi ograničeni, smatra se kako se ksilozidi i arabinozidi antocijana u većoj mjeri zadržavaju u sadržaju slijepog crijeva te fecesu u odnosu na galaktozide i glukozide.

Acilacija ili diglukozilacija doprinose stabilnosti antocijana što pak rezultira u sporijem metabolizmu te pojačanoj ekskreciji nativnih komponenata. Wu i suradnici (2005) su uočili kako cijanidin di-triglukozid ima viši stupanj rekuperacije. Antocijani koji u svojoj strukturi sadrže više od jednog šećera imaju veću otpornost na transformacije do kojih dolazi djelovanjem intestinalne mikrobiote (Prior i sur., 2006).

Rezultati istraživanja provedenih na antocijanima upućuju na njihovu slabu biodostupnost (Pojer i sur., 2013). Postoji nekoliko faktora koji su odgovorni za relativno nisku biodostupnost antocijana, uključujući i činjenicu da je značajan broj njihovih metabolita prisutan u koncentracijama koje se ne mogu analitički detektirati. Također, određene forme antocijana se mogu vezati u komplekse sa drugim komponentama te na taj način izbjeći detekciju (Mazza, 2007).

Antocijani dosežu maksimalnu koncentraciju u cirkulaciji tijekom 3h od unosa. Brza stopa apsorpcije uglavnom je vezana uz apsorpciju u želucu (Passamonti i sur., 2003). Nadalje, antocijani se brzo uklanjanju iz plazme jetrenim metabolizmom (Milbury i sur., 2002), a općenita biodostupnost je <2% (Ichiyanagi i sur., 2006).

Podaci dobiveni na temelju eksperimenata provedenih na životinjama upućuju na to da se antocijani efikasno apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu, međutim ne ulaze u sistemsku cirkulaciju već se razgrađuju djelovanjem mikroflore debelog crijeva (McGhie i Walton, 2007).

Glikozilirani i acilirani oblici antocijana imaju nižu biodostupnost. Glukozidaze gastrointestinalnog trakta mogu hidrolizirati antocijane formirajući na taj način odgovarajuće aglikone. U takvom obliku, antocijani imaju veću biodostupnost te veći biološki potencijal, ali nižu stabilnost. Brojne studije pokazuju kako vrijeme apsorpcije, transporta u gastrointestinalni trakt te eliminacije iz plazme ovisi o samoj strukturi antocijana. Stupanj apsorpcije aciliranih oblika je niži u odnosu na stupanj apsorpcije neaciliranih oblika antocijana. Acilirani oblici antocijana imaju kraće vrijeme poluživota, kada je riječ o gastrointestinalnoj apsorpciji, u odnosu na neacilirane oblike. Eliminacija neaciliranih oblika je sporija u odnosu na eliminaciju aciliranih oblika. U pokožici grožđa najviše su zastupljeni

malvidin-3-glukozid te cijanidin-3-glukozid. U studijama koje su se bavile proučavanjem farmakokinetike malvidina i cijanidina je ustanovljeno kako malvidin-3-glukozid i cijanidin-3-glukozid dosežu maksimalnu koncentraciju u plazmi 30-60 min nakon obroka (Vitaglione i sur., 2007). S obzirom na biodostupnost, cijanidin-3-glukozid te pelargonidin-3-glukozid imaju najviši stupanj sistemske biodostupnosti.

2.5. UTJECAJ NA ZDRAVLJE

Pozitivni učinci antocijana na zdravlje se odnose na njihove antioksidativne, anti-upalne, antimikrobne te antikancerogene značajke koje su potvrđene brojnim studijama. Imaju važnu ulogu u smanjenju rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti te određenih vrsta karcinoma, kao i u redukciji rizika za oboljenje od šećerne bolesti te kognitivnih poremećaja (Tsuda, 2012).

Antocijani ispoljavaju važne učinke koji imaju utjecaja na smanjenje pojave pretilosti, te djeluju kao neuroprotektivni agenti (Tsuda, 2012). Zbog svojih svojstava utječu na smanjenje upalnih procesa u organizmu te doprinose zaštiti kardiovaskularnog sustava (He i Giusti, 2010). Također, imaju ulogu u prevenciji i inhibiciji rasta kancerogenih stanica (Thomaset i sur., 2009). Utvrđeno je kako intravenoznim unosom cijanidin-3-glukozida dolazi do promjene u određenim staničnim metabolitima, kao što su kiseline, glutation i oksidirani glutation te nekih lipida prisutnih u krvi, bubrezima i jetri štakora (Vanzo i sur., 2013).

2.5.1. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijski potencijal antocijana ovisi o kemijskoj strukturi molekule, odnosno o fenolnoj strukturi od koje potječu antioksidacijske sposobnosti. Na antioksidacijsku sposobnost također utječe: (i) broj hidroksilnih skupina; (ii) kateholna skupina u prstenu B; (iii) oksonijev ion u prstenu C; (iv) stupanj hidroksilacije i metilacije; (v) stupanj acilacije; i (vi) stupanj glikozilacije (Yang i sur., 2011).

Glikozilacija antocijana utječe na smanjenu sposobnost ″hvatanja″ slobodnih radikala te na smanjenu sposobnost antocijanin radikala da delokalizira elektrone (Wang i Stoner, 2008). Doprinos supstituenata B prstena na stupanj antioksidativne aktivnosti je, od najvećeg prema najmanjem, $-OH > -OCH_3 >> -H$ (Rossetto i sur., 2007), a samim time je potencijal antioksidativne aktivnosti antocijanidina najveći za delfinidin, potom petunidin, malvidin koji ima jednaku aktivnost kao cijanidin te na kraju peonidin i pelargonidin (Rahman i sur., 2006).

Pozitivno nabijen kisikov atom daje molekuli antocijana veću potentnost u odnosu na oligomerne proantocijanidine i ostale flavonoide.

Antioksidacijska aktivnost antocijana može biti pojačana prisutnošću drugih fitokemikalija ili vitamina. Sa njima antocijani mogu stupati u interakciju sinergistički ili pak antagonistički. Na primjer, flavanoli prisutni u nekim namirnicima imaju sinergističko antioksidacijsko djelovanje antocijanima. Rossetto i suradnici (2002) su utvrdili kako na antioksidacijski potencijal malvidin-3-glukozida, koji je uključen u peroksidaciju linolenske kiseline u micelama, utječe prisutnost katehina koji ga povećavaju, budući da su katehini odgovorni za regeneraciju malvidin-3-glukozida. Taj mehanizam je specifičan za Mal-3-Glc i Peo-3-Glc. S druge pak strane, kvercetin inhibira apsorpciju Cy-3-Glc (Walton i sur., 2006).

Mogući mehanizmi putem kojih antocijani ispoljavaju svoje antioksidacijske učinke uključuju direktne i indirektne metaboličke puteve. Imaju izravan kapacitet ″hvatanja″ slobodnih radikala zahvaljujući mogućnosti doniranja vodikovog atoma (Borkowski i sur., 2005), koji se može vezati na reaktivne kisikove vrste (ROS) kao što su super-oksid (O_2^-), kisikov radikal ($^{\cdot}O_2$), peroksid (ROO^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal (OH). Pretjerana produkcija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) može oštetiti stanice, što pak u konačnici može dovesti do razvoja i progresije kardiovaskularnih bolesti, karcinoma te ostalih degenerativnih bolesti (Allen i Tresini, 2000).

Antocijani indirektno pospješuju endogenu antioksidacijsku obranu organizma kroz brojne mehanizme kao što su: (i) obnavljanje ili povećanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) te glutation peroksidaze (Toufeksian i sur., 2008); (ii) aktivacija gena koji kodiraju za te enzime (Shih i sur., 2005); te (iii) redukcija oksidacijskih komponenata u DNA i endogenih ROS putem inhibicije NADPH oksidaze i ksantin oksidaze, ili modifikacijom mitohondrijske respiracije i metabolizma arahidonske kiseline (Steffen i sur., 2008).

Redukcijom željeza u plazmi ustanovljeno je kako 3-glukozidi delfinidina, petunidina, i malvidina, imaju 2 do 2,5 puta veću antioksidacijsku aktivnost od askorbinske kiseline (Garcia-Alonso i sur., 2004).

Upotrebom ORAC metode (*Trolox equivalent antioxidant capacity or oxygen radical-absorbing capacity*) utvrđen je 3 do 6 puta veći antioksidacijski kapacitet antocijana uz standardni Trolox (analog u vodi topljivog vitamina E). S obzirom na te podatke, možemo zaključiti kako su antocijani puno bolji antioksidansi u odnosu na klasične antioksidanse, kao što je primjerice α-tokoferol (Fukumoto i Mazza, 2000).

Antioksidacijske sposobnosti antocijana su također dokazane u *in vivo* studijama provedenim na životinjama. Kod štakora čija je prehrana bila obogaćena antocijanima uočen

je visoki antioksidacijski kapacitet u plazmi te niža razina 8-hidroksi-2-deoksigvanozida jetre, u odnosu na kontrolnu skupinu (Ramirez-Tortosa i Andersen, 2001).

Epidemiološke studije sugeriraju kako unos antocijana prehranom može umanjiti određene rizične parametre oksidacijskog stresa. Kod pojedinaca koji su konzumirali voćne sokove bogate antocijanima i fenolnim spojevima uočeno je smanjenje oksidacijskog oštećenja DNA te značajno poboljšanje razine reduciranog glutationa u odnosu na kontrolnu skupinu (Weisel i sur., 2006).

Cao i suradnici (1998) su proučavali utjecaj konzumacije crvenog vina i jagoda na povećanje antioksidacijskog kapaciteta u serumu. Odnos između konzumacije grožda i crvenoga vina te utjecaja na smanjenje rizika od koronarnih srčanih oboljenja je uglavnom vezan uz prisutstvo antocijana.

Kardioprotektivni učinak antocijana je vezan uz njihov utjecaj na povećanje antioksidacijskog kapaciteta seruma, zaštitu od LDL oksidacije te anti-upalnu aktivnost (Erlund i sur., 2008).

Mnoge studije ističu kako se povoljni učinci antocijana na zdravlje posebice ogledaju na endotelnoj razini gdje doprinose homeostazi krvožilnog sustava, te kontroliraju angiogenezu, upalu i agregaciju trombocita. Dokazano je kako antocijani imaju važnu ulogu u prevenciji endotelne disfunkcije uzrokovane djelovanjem peroksinitrita u endotelnim stanicama zahvaljujući njihovom utjecaju na regulaciju ekspresije i aktivnosti nekoliko enzima uključenih u metabolizam dušikovih oksida.

U studiji Youdim i sur. (2000) je utvrđeno kako endotelne stanice krvnih žila mogu inkorporirati antocijane u membranu i citosol, što omogućuje značajan protektivni učinak od oksidativnih oštećenja, te očuvanje endotelne funkcije i prevenciju krvožilnih bolesti.

2.5.2. Neuroprotektivni učinak

Pregledni članak autora Rendeira i suradnika (2012) je pokušao objasniti utjecaj flavonoidima bogate prehrane, s naglaskom na sadržaj antocijana, na modulaciju neuroloških funkcija. Prehrana bogata antocijanima ima pozitivne i blagotovorne učinke u borbi protiv kognitivnih disfunkcija te neurodegenerativnih stanja povezanih sa starenjem (Tsuda, 2012).

U studijama koje su provedene na životinjama, utvrđeno je kako ekstrakti antocijana imaju utjecaj na odgodu pada neuralne funkcije te poboljšavaju kognitivne i motorne funkcije (Shukitt-Hale i sur., 2009), inhibicijom neuralnih upala te modulacijom prijenosa signala.

Jedan od također mogućih mehanizama je i poboljšanje cerebralne cirkulacije (Spencer, 2010).

2.5.3. Utjecaj na dijabetes i pretilost

Dijabetes tipa 2 je povezan sa inzulinskom rezistencijom te poremećajem u lučenju inzulina. Karakterizira ga visoka postprandijalna razina glukoze u krvi. Pretilost je vezana uz neravnotežu prehrambenog unosa i potrošnje, te ju karakterizira prekomjerna akumulacija adipoznog tkiva. Oba stanja se smatraju metaboličkim poremećajem te metaboličkim sindromom.

Biološki aktivne komponente prisutne u prehrani mogu utjecati na regulaciju glukoze u krvi ili pak lučenje inzulina putem β-stanica gušterače u osoba oboljelih od šećerne bolesti tipa 2. Jedna od tih komponenata su i antocijani koji povoljno djeluju na funkciju adipocita, te sprječavaju razvoj pretilosti i metaboličkog sindroma (Tsuda, 2008). Antocijani ulaze u interakciju sa adiponektinom, jednim od najvažnijih adipocitokina. Kod pretilosti i inzulinske rezistencije, razina adiponektina je povećana, međutim antocijani djeluju na smanjenje razine adiponektina u cilju sprječavanja razvoja šećerne bolesti i pretilosti.

2.5.4. Antiupalna aktivnost

Upala predstavlja kompleksni biološki odgovor krvožilnog sustava na ozljede, iritacije ili stimulanse te se povezuje sa inicijacijom, razvojem i progresijom tumorskih stanica. Do procesa upale dolazi zbog enzima ciklooksigenaze (COX) koji katalizira pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandine. *In vitro*, antocijani imaju sposobnost inhibicije mRNA i/ili ekspresije proteina COX-2, NF-kβ, te mnogobrojnih interleukina, u raznim tipovima stanica (Boivin i sur., 2007).

Antocijani i njihovi aglikoni mogu inhibirati aktivnost enzima prostaglandin sintaze. Utvrđeno je kako delfinidin i cijanidin mogu inhibirati ekspresiju enzima COX-2, dok pelargonidin, peonidin i malvidin nemaju tu sposobnost. Delfinidin reprimira aktivaciju protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) koja je uključena u direktan stanični odgovor na široki spektar stimulansa kao što su mitogeni i proupalni citokini (Hou i sur., 2005).

2.5.5. Antikancerogena aktivnost

Antikancerogena aktivnost antocijana je svojstvo koje je opsežno proučavano od strane mnogobrojnih autora, međutim još uvijek ne postoje dovoljno čvrsti dokazi u o takvom djelovanju u ljudskom organizmu. Antikancerogena svojstva antocijana su uglavnom bazirana na *in vitro* dokazima (He i Giusti, 2010) te su povezana sa nekoliko mehanizama. Ti mehanizmi uključuju slijedeće: (i) antocijani zaustavljaju stanični ciklus preko inaktivacije ili inhibicije G1/G0 i G2/M faza; (ii) induciraju apoptozu i antiangiogenezu; (iii) inhibiraju oksidacijska oštećenja DNA; (iv) aktiviraju enzime faze 2 potrebne za detoksikaciju; (v) imaju antimutagen efekt te inhibiraju karcinogene; (vi) inhibiraju aktivnost COX-2 enzima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. *In vivo* ISTRAŽIVANJE UTJECAJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA POKOŽICE GROŽĐA NA AKTIVNOST MARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA

Pokusi su provedeni na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su C57BL/6 miševi, u dobi od tri mjeseca. Životinje su hranjene tijekom 60 dana. Po pet životinja je bilo smješteno u kavezu, na temperaturi od 22°C, uz neograničen pristup hrani i vodi.

Životinje su hranjene komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Životinje su držane u slijedećim uvjetima: 12 sati svijetla i 12 sati tame pri 22 ºC i 60% vlažnosti. Hrana kojom su hranjeni miševi je standardna hrana za miševe 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.

Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123.

3.1.1. Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe su činile 2 grupe životinja (težine 30±2,51 g):

- KO – Kontrolna grupa (0,2 mL fiziološke otopine)
- GSE – Ekstrakt pokožice grožđa (100 mg/kg/dan)

Životinje su žrtvovane 60.-ti dan pokusa te su uzeti organi jetre i bubrega za daljnju analizu. Životinje su anestezirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Bubrezi i jetre su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi. Izvagani su, zabilježena je masa i potom su pohranjeni na -80ºC za daljnju analizu. Analize vezane uz organe nakon ovog koraka radili smo isključivo na ledu i u roku od tjedan dana nakon što su prikupljeni uzorci.

3.1.2. Homogenizacija organa

Organe smo izolirali iz životinja odmah nakon što smo sakupili uzorke krvi, te smo ih izvagali, zabilježili masu i potom pohranili na -80ºC za daljnju analizu. Analize vezane uz organe nakon ovog koraka radili smo isključivo na ledu.

Svježe tkivo organa homogenizirali smo u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 u omjeru 1 : 10 (w/v). Organe smo homogenizirali 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 organa potom je potrebno centrifugirati pri 20 000 x g tijekom 15 min na 4^{o}C.

3.2. MJERENJE MARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina po Lowry-u

Sadržaj proteina u homogenatima bubrega i jetre određen je metodom po Lowryju (1951), a izražen je u miligramima proteina po mililitru (mg mL^{-1}). Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza sa ionima bakra (Cu^{2+}) u alkalnoj sredini (biuretska reakcija) i redukciji fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline (Folin-Ciocalteau reagens) sa aromatičnim aminokiselinama proteina.

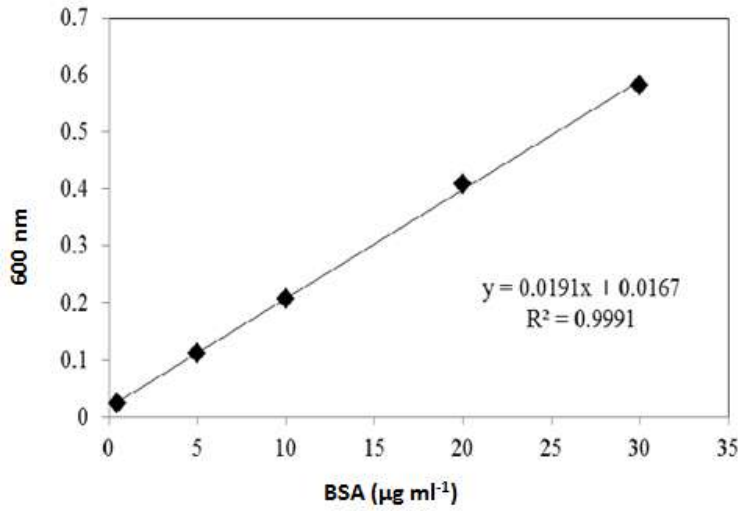
Reagens A: 2% Na_2CO_3 u 0.1 M NaOH; reagens B: 0.5 % $CuSO_4$ x $5H_2O$ u 1% K,Na–tartaratu; reagens C: 50 ml reagensa A + 1 ml reagensa B; Folin-Ciocalteu reagens: komercijalni reagens razrijeđen sa destiliranom vodom u omjeru 1:2.

Kako bi se mogla odrediti koncentracija nekog proteina ili smjese proteina u otopini, potrebno je prethodno konstruirati baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. Prema niže opisanom postupku provest će se mjerenje sa različitim koncentracijama proteina u rasponu od 5 do 35 mg mL^{-1}.

U epruvete dodati 0,1 mL otopine proteina BSA - bovine serum albumin (za svaki uzorak proteina napraviti smo 3 paralelne probe, a za cijelu seriju mjerenja još i tzv. “slijepu probu” koja umjesto otopine proteina sadrži 0,4 mL destilirane vode) sa 2 mL reagensa C i promiješati protresivanjem, inkubirati na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta, naglo dodati 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa uz snažno miješanje (vortex) i inkubirati na sobnoj temperaturi 40 do 60 minuta. Slijepa proba umjesto otopine proteina sadrži 0,1 mL destilirane vode.

Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancije kod 600 nm, konstruira se dijagram ovisnosti A=600 nm o koncentraciji proteina u otopini. Nakon što se provede isti postupak s uzorkom otopine kojoj želimo odrediti koncentraciju proteina (homogenati uzoraka jetre, bubrega), pomoću baždarnog dijagrama očita se koncentracija proteina u uzorku.

Baždarni dijagram:



3.2.2. Mjerenje lipidne peroksidacije (MDA)

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

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

200 µL supernatanta pomiješati 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 potom zagrijavali 60 minuta pri temperaturi od 95 ºC.

Ohlađenim uzorcima izmjeriti smo apsorbanciju pri 532 nm i 600 nm

spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo).

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

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

gdje ε iznosi $1{,}56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$, a duljina kivete *l* iznosi 1 cm. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao nmol MDA mg^{-1} proteina.

3.2.3. Mjerenje aktivnosti reduciranog glutationa (GSH)

Određivanje 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 izračunati prema formuli:

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

gdje ε (DTNB) iznosi 8,22 $mM^{-1}cm^{-1}$, a duljina kivete *l* iznosi 0,6 cm. Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) izrazili smo kao mU mg^{-1} proteina (nmol/min/mg proteina).

3.2.4. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

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_2.

Aktivnost SOD-a odredili smo u supernatantima homogenata tkiva inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i Ötting (1984). U staklenu kivetu s 1,45 mL otopine A dodali smo 25 µL uzorka (po potrebi razrijeđenog fosfatnim puferom pH=7.8 bez EDTA-e) i reakcija se započne dodatkom 25 µL otopine B. Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute na valnoj duljini 550 nm. Svaki uzorak

termostatiran je na 25ºC. 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^{-1} proteina.

3.2.5. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Osnovna uloga katalaze je razgradnja vodikovog peroksida (H_2O_2). Katalazna aktivnost očituje se tek pri većim koncentracijama H_2O_2, što nam govori da je katalaza isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa. Katalazna aktivnost u supernatantu bubrega i jetre određuje se spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984).

U kvarcnu kivetu doda se 2 mL već razrijeđenog uzorka i 1 mL fosfatnog pufera, što predstavlja slijepu probu. U sljedeću kvarcnu kivetu dodali smo 2 mL već razrijeđenog uzorka i 1 mL supstrata (30 mM H_2O_2), čime započinje enzimska reakcija.

Aktivnost enzima mjerili smo pri valnoj duljini 240 nm. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena je mjera katalazne aktivnosti definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1 μmol H_2O_2 u jedinici vremena (min) kod pH 7,0 pri 25°C, gdje koncentracija pada od 10,3 do 9,2 mM. Koncentraciju smo izračunali prema formuli:

$$C = \Delta A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg\ mL^{-1}) \quad [3]$$

gdje ε (H_2O_2) iznosi 43.6 M^{-1} cm^{-1}, a duljina kivete *l* iznosi 1 cm. Aktivnost katalaze je izražena u mU mg^{-1} proteina.

3.2.6. Aktivnost karboniliranih proteina (PC)

Za utvrđivanje količine oštećenja proteina korištena je metoda po Levine i suradnicima (1994), a određuje se kao sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku. Karbonilne skupine proteinskog lanca reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u, te daju 2,4-dinitrofenilhidrazon.

Volumenu od 200 µL homogenata uzorka dodano je 300 µL 10 mM DNPH u 2M HCl. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su precipitirani sa 10% (w/v) TCA na -20°C tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani na 4°C pri 12000 *g* 10 minuta.

Supernatant je bačen, a precipitat resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima.

Postupak ispiranja peleta je ponovljen sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga, precipitat je otopljen u 6M gvanidin HCl u kupelji na 35°C. Dobivena otopina je korištena za mjerenje apsorbancije na 370 nm.

Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je izračunata korištenjem molarnog ekstincijskog koeficijenta ε = 0,022 $mM^{-1}cm^{-1}$, te prikazana kao omjer količine karbonila i koncentracije proteina i izražena kao nmol mg^{-1} proteina.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

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

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i \qquad [4]$$

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

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \qquad [5]$$

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 ± 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 kako bismo ustanovili razlike između pokusnih grupa.

3.4. BIODOSTUPNOST BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ POKOŽICE GROŽĐA

3.4.1. Pokusne životinje

Pokusne životinje bile su C57BL/6 miševi, u dobi od tri mjeseca. Po šest životinja je bilo smješteno u kavezu. Životinje su intragastričnom sondom tretirane sa 0,2 mL fiziološke otopine - kontrolna grupa (KO); odnosno 0,2 mL ekstrakta pokožice grožđa (GSE grupa).

Životinje su anestezirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa nakon 15 min., 30 min., 1 h, 2 h, 3h i 4 h.

Bubrezi i jetre su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi. Izvagani su, zabilježena je masa i potom su pohranjeni na -80ºC za daljnju analizu. Analize vezane uz organe nakon ovog koraka rađene su isključivo na ledu i odmah nakon što su prikupljeni uzorci.

3.4.2. Priprema uzoraka seruma za enzimsku hidrolizu

Krv je centrifugirana na 2000 g kroz 10 minuta na +4^{o}C. Nakon centrifugiranja krvi, odvojen je serum koji je pomiješan sa 1⁄10-om volumena otopine - 20% askorbinska kiselina i 0.05% Na_2EDTA otopljena u 0.4 M fosfatnom puferu (finalni pH 6,5), te je pohranjen na -80^{o}C.

3.4.3. Priprema uzoraka organa za enzimsku hidrolizu

0,5 g tkiva (bubreg, jetra) se homogenizira u 1 mL 0,4 M fosfatnog pufera koji sadrži 6 mg askorbinske kiseline i 0.5 mg Na_2EDTA (final pH 6.5).

Nakon centrifugiranja uzoraka na 16000 g ⁄ 5 min, supernatante smo za analizu ekstrakta pokožice grožđa pospremiti na -80^{o}C.

3.4.4. Enzimska hidroliza uzoraka

200 µL uzorka (serum ⁄ homogenizirani uzorci jetre i bubrega) se pomiješa sa 10 µL mix enzima (250 U β-glukuronidaze i 20 U sulfataze). Potom se enzimska hidroliza provede tako što se smjesa uzoraka i enzima inkubira 45 minuta na 37^{o}C.

3.4.5. Ekstrakcija

Nakon inkubacije uzorci su dva puta ekstrahirali sa etil-acetatom te centrifugirani 5 min⁄12000 rpm⁄+4^{o}C.

Nakon ekstrakcije u supernatant se doda etil acetat koji sadrži 10 µL 20% askorbinske kiseline i uzorci se upare do suha (*vacuum centrifuge concentrator* - 30^{o}C, 40 min). Nakon uparavanja talozi se otope u 100 µL 10% vodene otopine acetonitrila te centrifugiraju 5 min⁄16000 rpm pri sobnoj temperaturi.

3.5. UPLC MS/MS (ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETER)

Ispitane su različite metode i uvjeti određivanja bioaktivnih spojeva (BAS) u uzorcima seruma i organa te je provedena validacija metode i izrađeni su baždarni pravci (Serra i sur., 2011).

Flavanoli, procijanidini i antocijani u ekstraktima dobivenih iz bioloških uzoraka analizirani su UPLC-MS/MS metodom (Trostruki kvadropol, 6430, Agilent, USA) opremljenim sučeljem za elektrosprej ionizaciju (ESI). Za desolvataciju i u kolizijskoj ćeliji koristio se dušik.

Maseni spektrometar je spojen na sustav za tekućinsku kromatografiju (serija 1290 Infinity, Agilent, USA). Sustav se sastoji od visokotlačne binarne pumpe, automatskog injektora, odzračivaća i termostata za kolonu. Kolona za razdvajanje komponenata je Zorbax C18 100×2.1×1.8 (Agilent, USA).

Flavanoli i procijanidini se razdvajaju s mobilnim fazama koje sadrže 0,2% octene kiseline u H_2O (A) i ACN (B), a antocijani s 10% HAc u H_2O (A) i ACN (B).

Protok je 0,4 mL/min, a elucijski gradijent je iznosio:

t (min)	Otapalo A(%)	Otapalo B(%)
0	100	5
10	75	35
10,10	50	80
11	20	80
11,10	100	5
12	100	5

Flavanoli i procijanidini se analiziraju u negativnom, a antocijani u pozitivnom ionskom modu pri slijedećim uvjetima:

- protok plina: 11 L/min
- temperatura: 300 °C
- nebulizer: 400 psi
- voltaža na kapilari: ± 4000 V

Uvjeti optimizacije traženih spojeva:

Standard	R_t (min)	Prekursor ion > produkt ion	Fragmentor voltaža (V)	Energija kolizijske ćelije (eV)
Malvidin-3-klorid	4,636	331 > 315 331 > 287	135	27 27
Delfinidn-3-klorid	1,878	303 > 257 303 > 228	135	27 29
Peonidin-3-glukozid	2,071	463 > 301,1	135	15
Cijanidin-3-klorid	2,951	287 > 136,8 287 > 213	135	19 19
Pelargonidin-3-klorid	3,979	271 > 121	135	19
Katehin	3,129	291 > 138,9	110	10
Epikatehin	4,135	289 > 245,1	135	10

Procijanidin B2	3,710	579,1 > 291 579,1 > 427,1	135	5 5

Baždarni pravci:

Standardi pojedinih spojeva otopljeni su u čistom metanolu (katehin, epikatehin) i metanolu koji sadrži 0,1% mravlje kiseline (svi antocijani).

Početne koncentracije flavanola i procijandina bile su 100 mg L^{-1} koje su pomiješane u odnosu 1:1 tako da je početna koncentracija u stock otopini iznosila 50 mg L^{-1}. Iz stock otopine napravljena su još 4 razrjeđenja za izradu baždarnih krivulja.

Početne koncentracije antocijana su bile 200 mg L^{-1} i pomiješane su u odnosu 1:1:1:1:1 tako da je koncentracije svakog antocijana u stock otopini iznosila 40 mg L^{-1}. Iz stock otopine antocijana napravljena su još 4 razrjeđenja za izradu baždarnih krivulja.

Standard	Jednadžba pravca	Koeficijent determinacije R^2
Malvidin-3-klorid	Y = 10064,74 x	0,9902
Delfinidn-3-klorid	Y = 9301,069 x	0,9985
Peonidin-3-glukozid	Y = 132387,6 x	0,9986
Cijanidin-3-klorid	Y = 2127,99 x	0,9975
Pelargonidin-3-klorid	Y = 2820,93 x	0,9979

Na temelju masenih spektara provedena je identifikacija, a na temelju jednadžbi baždarnih pravaca kvantifikacija BAS u uzorcima provedenih *in vivo* istraživanjima**.**

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovo istraživanje je provedeno kako bi se procijenili učinci bioaktivnih spojeva izoliranih iz pokožice grožđa na različite markere oksidacijskog stresa u bubregu i jetri, kao i biodostupnost prvenstveno antocijana na modelu C57BL/6 miša u serumu, jetri i bubregu.

Zainteresiranost za antocijane je posebno porasla posljednjih godina zbog njihovih pozitivnih učinaka na zdravlje. Antocijani mogu djelovati antioksidacijski, antiinflamatorno, antitumorno, antidijabetično, antiedematozno, imaju efekt na permeabilnost kapilara, djeluju hepatoprotektivno, antiagregacijski, antiulcerozno, antibakterijski, radioprotektivno, imunomodulatorno, inhibiraju herpes virus, virus influence, djeluju protektivno na endotelne stanice u odnosu na razne stresne agense. Oni su zajedno s ostalim flavonoidima važni nutritivni sastojci zbog svojih antioksidacijskih sposobnosti, što ukazuje na njihovu potencijalnu primjenu u prevenciji bolesti koje su povezane s oksidacijskim stresom (Crozier i sur., 2010).

Dnevna potrošnja antocijana je procijenjena na 3-215 mg $danu^{-1}$ (Chun i sur., 2007). Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane, siguran unos hranom je 36 mg antocijana dnevno.

Oksidacijski stres karakterizira promjena ravnoteže oksidacijsko-antioksidacijskog sustava organizma u korist oksidacijskog stanja, što dovodi do potencijalnog oštećenja tkiva i organa. Spojevi koji se lakše oksidiraju su često najbolji antioksidanti, jer njihove molekule mogu donirati slobodan elektron. Antocijanidini i antocijani su sposobni da uhvate slobodne radikale doniranjem vodika iz fenolnih grupa. Ono što je još primijećeno je da postoji linearana korelacija između antioksidacijskog kapaciteta i sadržaja antocijana.

Djelovanje polifenola izoliranih iz pokožice grožđa istraženo je na laboratorijskim životinjama kroz 60 dana tretmana. Istraživani biomarkeri oksidacijskog stresa u homogenatu tkiva bubrega i jetre bili su malonildialdehid (MDA), karbonilirani proteini (PC), reducirani glutation (GSH), superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT).

Biodostupnost antocijana na modelu C57BL/6 miša u serumu, jetri i bubregu određena je pomoću *Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer* (UPLC MS/MS).

4.1. UTJECAJ BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ POKOŽICE GROŽĐA NA AKTIVNOST MARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA U JETRI I BUBREGU C57BL/6 MIŠA

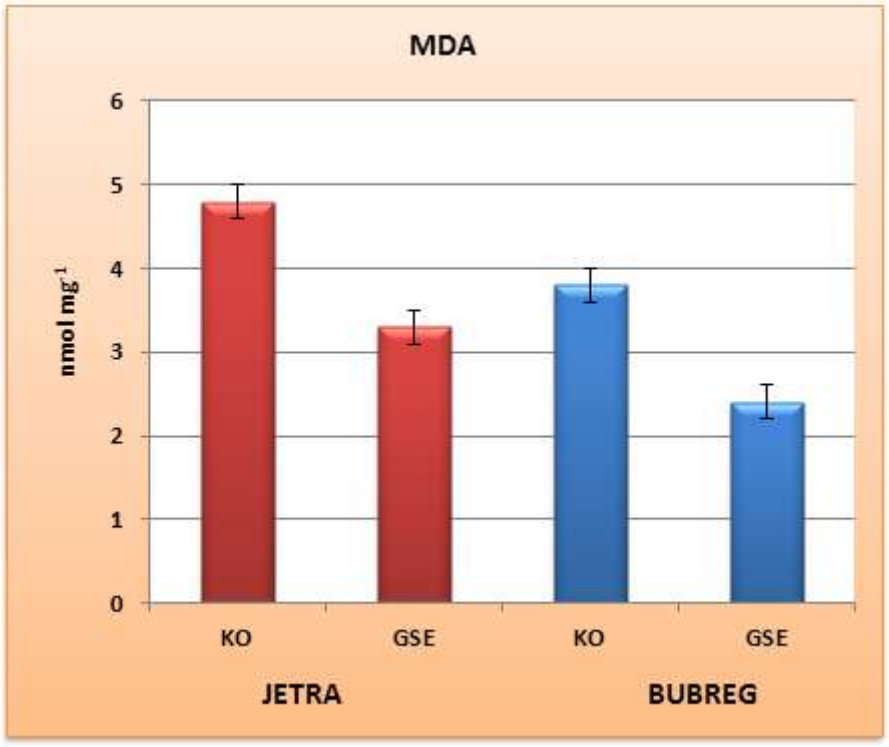
Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), nezarazne kronične bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti (KVB), pretilost, dijabetes, hipertenziju i neke tipove karcinoma, postaju sve značajniji uzročnik invaliditeta i preuranjene smrtnosti u svijetu, i to kako u razvijenim tako i zemljama u razvoju. Gotovo polovina 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.

Prema Dotan i sur. (2004) različita patološka stanja povezana su sa različitim tipovima oksidacijskog stresa, odnosno praćena su izmijenjenim vrijednostima različitih markera prooksidacijskog/antioksidacijskog balansa. Otuda i potreba da se oksidacijski status procjenjuje različitim metodama.

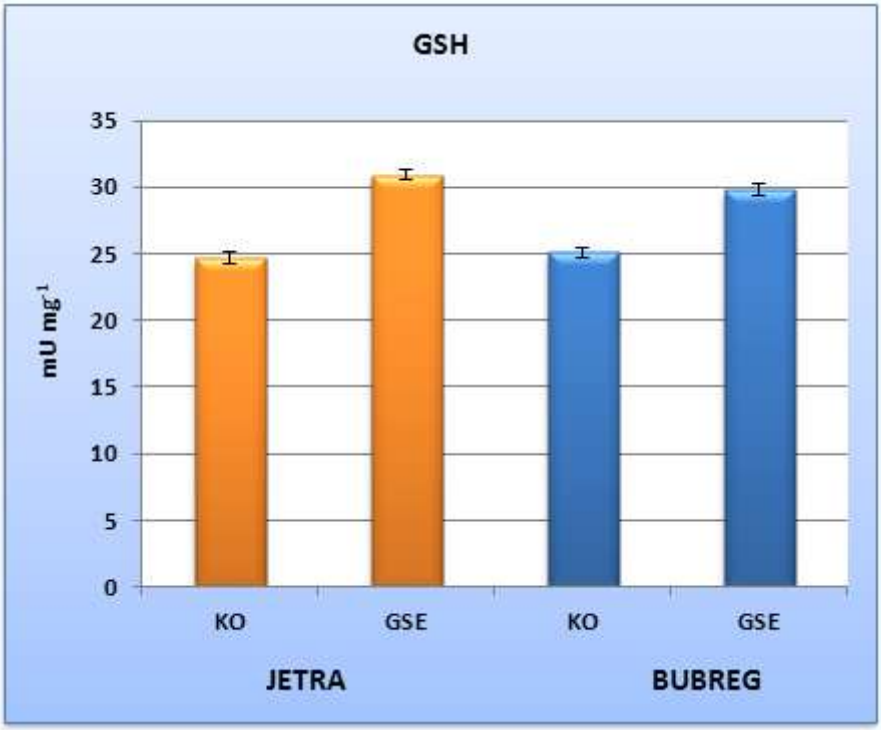
Slobodni radikali izazivaju oksidacijski stres u stanicama. Sve stanice su zaštićene od takvog oštećenja antioksidacijskim sustavom koji provodi detoksikaciju reaktivnih tvari. Oni uključuju ne-enzimske antioksidanse reducirani glutation (GSH) i enzimske antioksidanse kao što su superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT). Bilo koji spoj, prirodni ili sintetički sa antioksidacijskim svojstvima može pridonijeti djelomičnom ili potpunom ublažavanju štete izazvane slobodnim radikalima. Lipidi koji su prisutni u membrani stanice sadrže veliki broj polinezasićenih masnih kiselina koje su sklone lipidnoj peroksidaciji.

Način prehrane se smatra najznačajnijom promjenljivom determinantom kroničnih bolesti, te se stoga adekvatna dijeta ističe kao važan faktor u prevenciji kardiovaskularnih i drugih kroničnih bolesti. Pokazana je korelacija 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).

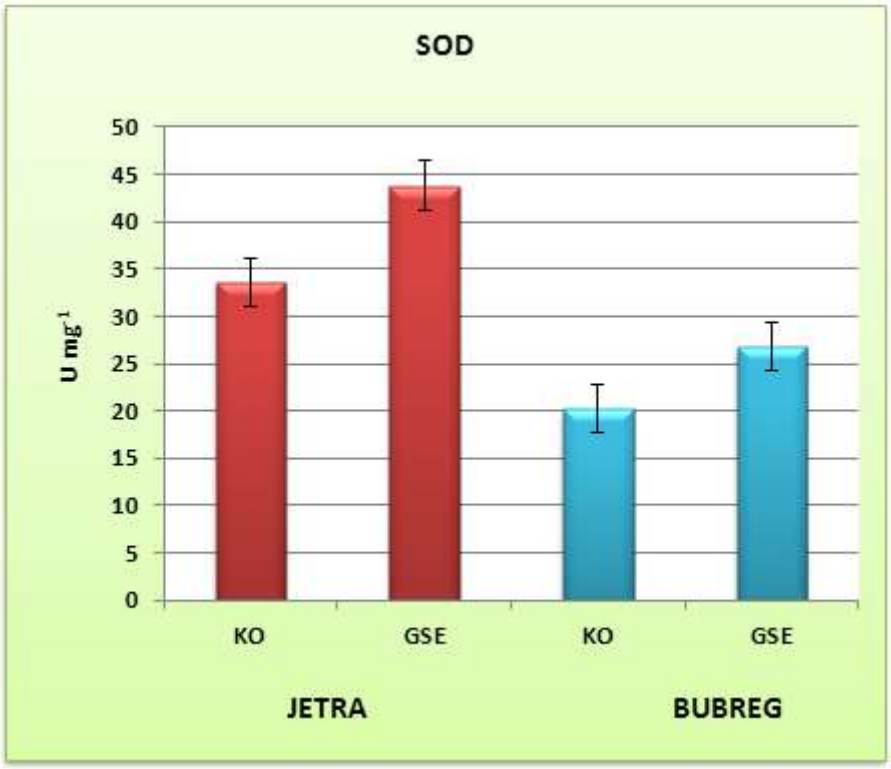
Uloga namirnica biljnog porijekla u prevenciji kardiovaskularnih bolesti pripisuje se ne samo njihovim nutritivnim sastojcima, već i biološki aktivnim sekundarnim metabolitima biljaka, polifenolima. Polifenoli predstavljaju najznačajnije antioksidanse s obzirom da su visoko zastupljeni u namirnicama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



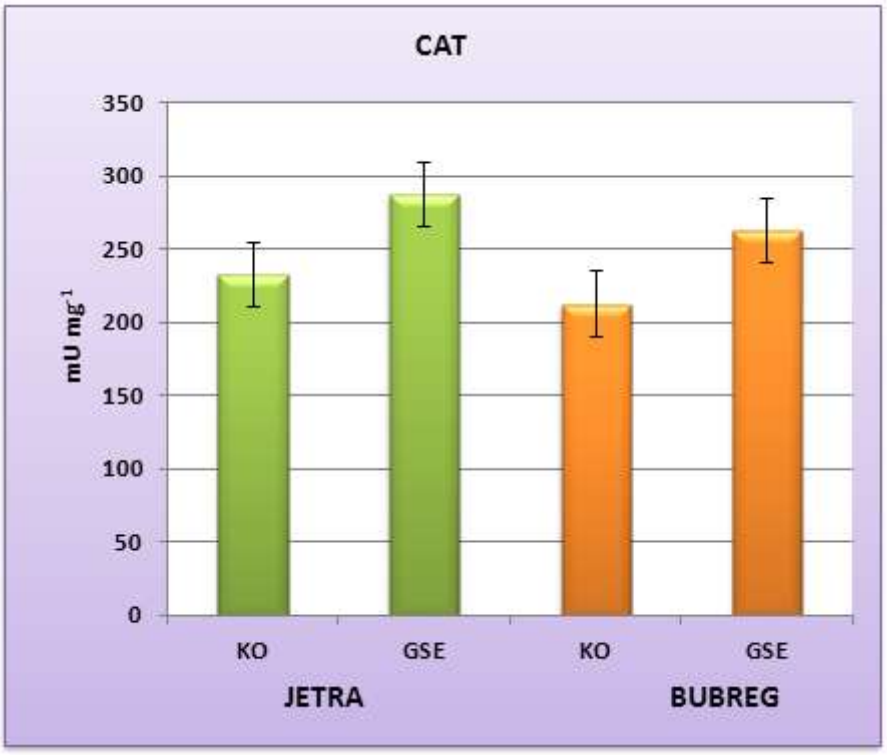
Slika 4. Utjecaj ekstrakta pokožice grožđa na aktivnost MDA u jetri i bubregu kontrolne i tretirane skupina životinja u odnosu na kontrolu. $p<0.05$ (ANOVA)



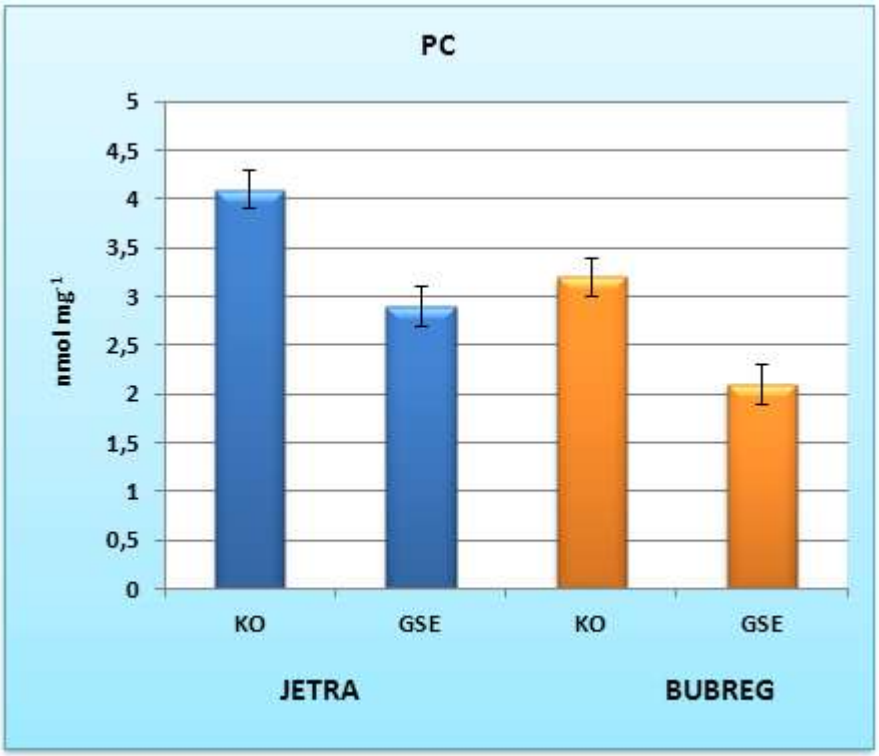
Slika 5. Utjecaj ekstrakta pokožice grožđa na aktivnost GSH u jetri i bubregu kontrolne i tretirane skupine životinja u odnosu na kontrolu. $p<0.05$ (ANOVA)



Slika 6. Utjecaj ekstrakta pokožice grožđa na aktivnost SOD u jetri i bubregu kontrolne i tretirane skupine životinja u odnosu na kontrolu. $p<0.05$ (ANOVA)



Slika 7. Utjecaj ekstrakta pokožice grožđa na aktivnost CAT u jetri i bubregu kontrolne i tretirane skupine životinja u odnosu na kontrolu. $p<0.05$ (ANOVA)



Slika 8. Utjecaj ekstrakta pokožice grožđa na aktivnost PC u jetri i bubregu kontrolne i tretirane skupine životinja u odnosu na kontrolu. $p<0.05$ (ANOVA)

Hassan i suradnici su pokazali kako ekstrakt sjemenki grožđa ublažava nefrotoksične nuspojave kemoterapeutika cisplatina smanjujući nastalo oksidacijsko oštećenje. Vrijednosti GSH i SOD u bubregu su značajno opale u grupi tretiranoj cisplatinom u usporedbi s kontrolnom grupom. Unos ekstrakta sjemenki grožđa je značajno povećao vrijednosti spomenutih antioksidansa. Cisplatin je inducirao oksidacijski stres putem povećane sinteze MDA, H_2O_2 i NO. No, predtretman ekstraktom značajno je snizio spomenute biomarkere oksidacije u usporedbi s cisplatin grupom (Hassan i sur., 2014).

Ekstrakt pokožice i sjemenki grožđa također štiti od akutne toksičnosti kemoterapije izazvane doksorubicinom na eritrocite i plazmu štakora. Tretman doksorubicinom je povećao MDA, slobodno željezo, H_2O_2 i karbonilirane proteine. S druge su se strane smanjile razine SOD, CAT i peroksidaza te kalcija. Istovremeni tretman ekstraktom poništio je gotovo sve štetne učinke izazvane doksorubicinom (Mokni i sur., 2012).

El-Adawi i suradnici su istraživali zaštitni učinak ekstrakta sjemenki grožđa na hepatotoksičnost i nefrotoksičnost u štakora izazvanu fumonizinom (FB1). FB1 je mikotoksin, produkt određenih *Fusarium* vrsta. Mikotoksin je hepato- i nefrotoksičan. Osim povećanja vrijednosti jetrenih enzima, zabilježen je drastični pad vrijednosti GPx za 48%. Predtretman ekstraktom sjemenki grožđa je pad ublažio za 31%. Vrijednost MDA je porasla

za 137% u skupini tretiranoj isključivo s FB1. Predtretman ispitanim ekstraktom je ublažio porast MDA za 37%. (El-Adawi i sur., 2011).

Ekstrakt pokožice i sjemenki grožđa je blagotovorno djelovao na eritrocite u kojima je oksidacijski stres induciran visokom koncentracijom ekstrakta češnjaka. Ekstrakt češnjaka u velikim količinama djeluje prooksidativno. Štakori su intraperitonalno dobivali 5 g kg^{-1} tjelesne mase ekstrakta češnjaka ili 500 mg kg^{-1} tj. mase ekstrakta pokožice ili kombinaciju tijekom mjesec dana. Visoka koncentracija ekstrakta češnjaka potakla je anemiju i oksidacijski stres unutar eritrocita. Naime, zabilježene su više vrijednosti MDA, karboniliranih proteina, SOD, CAT i perokisdaza te H_2O_2 i slobodnog kationa željeza koji reagiraju u Fentonovoj reakciji. Unos ekstrakta pokožice i sjemenki grožđa je suzbilo gotovo sva negativna prooksidacijska djelovanja ekstrakta češnjaka (Hamlaoui-Gasmi i sur., 2012).

Dugotrajna primjena kemoterapeutika doksorubicina izaziva kardiomiopatiju. Ispitana je hipoteza može li ekstrakt sjemenki i pokožice grožđa svojim antioksidacijskim djelovanjem ublažiti toksičnost izazvanu doksorubicinom. Ispitani ekstrakt je suzbio doksorubicinom izazvane negativne promjene hemodinamskih parametara i značajno ublažio oksidacijski stres što je utvrđeno normalizacijom razine željeza i kalcija te povećanom aktivnosti SOD (Mokni i sur., 2012).

Chidambara Murthy je sa svojim suradnicima ispitao antioksidacijski učinak vinske komine *in vitro* i *in vivo*. Tretiranje albino štakora s jednokratnom dozom 1,25 mL kg^{-1} tjelesne mase CCl_4, rezultiralo je smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima CAT, SOD i GPx za 81, 49 i 89%, dok se vrijednost MDA trostruko povećala. Predtretman štakora metanolnim ekstraktom vinske komine (50 mg kg^{-1} tjelesne mase) uzrokovalo je obnavljanje aktivnosti CAT, SOD i GPx za 43,6, 73,2, i 54% u usporedbi s kontrolnom grupom. Uz to, markeri lipidne peroskidacije su ponovno poprimili vrijednosti sukladne kontrolnoj grupi (Chidambara Murthy i sur., 2002).

Istraživanje Kadrija i suradnika je za cilj imalo utvrditi utjecaj kratkoročne, sedmodnevne primjene ekstrakta pokožice i sjemenki grožđa na životinjskom modelu inducirane ishemije. Ishemija potiče značajan oksidacijski stres popraćen lipidnom peroksidacijom, oksidacijom proteina, padom obrane enzimskih antioksidansa, rastom vrijednosti slobodnog željeza, dok se smanjuje razina bakra, cinka i mangana (kofaktori SOD-a). Pokazalo se da su gotovo svi spomenuti poremećaji oksido-redukcijske ravnoteže spriječeni u slučaju predtretmana ekstraktom pokožice i sjemenki grožđa (Kadri i sur., 2015).

U skladu s prethodnim istraživanjima, u ovom istraživanju, značajan pad lipidne peroksidacije (MDA) u grupi životinja koja je tretirana ekstraktom pokožice grožđa (GSE)

(3,3±0,24 nmol mg^{-1} u jetri; 2,4±0,22 nmol mg^{-1} u bubregu) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (4,8±0,32 nmol mg^{-1} u jetri; 3,8±0,28 nmol mg^{-1} u bubregu) pokazuje antioksidacijski učinak GSE (Slike 4, 9 i 10). Ovi se rezultati mogu objasniti činjenicom da polifenoli štite stanice od lipidne peroksidacije, ne samo u situacijama oksidacijskog stresa, nego i u normalnim uvjetima.

Sličan pad MDA u jetri pronađen je i kod zdravih štakora koji su tretirani prehranom bogatom polifenolima iz voća poput jagoda ili šljiva u usporedbi s kontrolnom grupom životinjama (Mateos i sur., 2005). U istraživanjima kada je MDA mjeren kao biomarker lipidne peroksidacije prije i nakon konzumacije praha pokožice crnog grožđa, prah je uzrokovao značajan pad aktivnosti MDA što ukazuje na značajno smanjenje lipidne peroksidacije.

Kako bi se dodatno istražio potencijalni utjecaj antioksidansa *in vivo* i iz razloga što je jetra glavni organ koji je uključen u metabolizam lipida i tako sklon potencijalnom oksidacijskom oštećenju u uvjetima hiperlipidemije, izmjerili smo razine reduciranog glutationa (GSH) kao glavnog intracelularnog antioksidansa. Reducirani glutation je jedan od najzastupljenijih antioksidansa u stanici te sudjeluje u degradaciji vodikovog preoksida uz pomoć glutation peroksidaze. Tom reakcijom dolazi do njegove oksidacije (GSSG), nakon čega se uz pomoć glutation reduktaze ponovno vraća u svoj oksidirani oblik. Omjer reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) indikator je staničnog zdravlja. Zdrava, normalna stanica, sadrži gotovo 98% glutationa u reduciranom obliku (Owen i Butterfield, 2010).

Koncentracije GSH izražene preko aktivnosti reduciranog glutationa (GSH) u jetri i bubregu statistički su značajno povećane u grupi miševa koji su tretirani sa ekstraktom pokožice grožđa (GSE) (30,9±0,44 mU mg^{-1} u jetri; 29,8±0,48 mU mg^{-1} u bubregu) u odnosu na kontrolnu grupu miševa (24,7±041 mU mg^{-1} u jetri; 25,1±0,44 mU mg^{-1} u bubregu) (Slike 5, 9 i 10), što ukazuje na antioksidacijski učinak GSE. U našim istraživanjima uočena je razlika u aktivnosti GSH između kontrolne grupe životinja i grupe koja je tretirana GSE, što se poklapa sa dosadašnjim istraživanjima u kojima je dokazano da polifenoli potiču stvaranje jetrene GSH (Yeh i Yen, 2006).

Enzimski antioksidacijski sustav čini enzimska kaskada čija aktivnost mora biti vrlo dobro regulirana i usklađena, kako bi se postigao osnovni cilj – sprječavanje oksidacijskih oštećenja. U ovoj kaskadi ključan enzim je superoksid dismutaza (SOD) koja svojom

aktivnošću uklanja superoksidni radikal, prevodeći ga u vodikov peroksid, koji se potom može eliminirati djelovanjem katalaze i glutation peroksidaze (Zarić i sur., 2011).

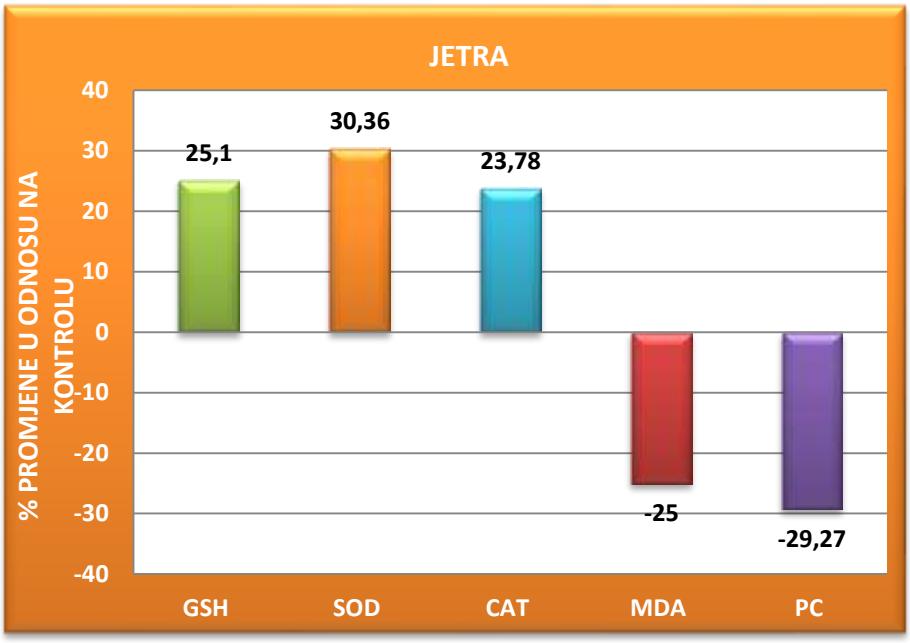
U ovom istraživanju, statistički značajan (ANOVA, $p<0,05$) porast aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u odnosu na kontrolnu skupinu, primijećen je kod grupe životinja koja je tretirana sa GSE u jetri i bubrezima (43,8±2,7 U mg^{-1}; 26,8±2,1 U mg^{-1}) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (33,6±2,8 U mg^{-1} u jetri; 20,2±1,8 U mg^{-1} u bubregu) (Slike 6, 9 i 10).

Osnovna uloga katalaze (CAT) je razgradnja vodikovog peroksida (H_2O_2). Katalazna aktivnost očituje se tek pri većim koncentracijama H_2O_2, što nam govori da je katalaza isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa. Statistički značajno (ANOVA, $p<0,05$) povećanje aktivnosti CAT kod tretmana GSE (287,8±26,8 mU mg^{-1} u jetri; 262,8±22,8 mU mg^{-1} u bubregu) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (232,5±26,2 mU mg^{-1} u jetri; 212,6±22,2 mU mg^{-1} u bubregu) pripisujemo bioaktivnim spojevima u ekstraktu pokožice grožđa (Slike 7, 9 i 10).

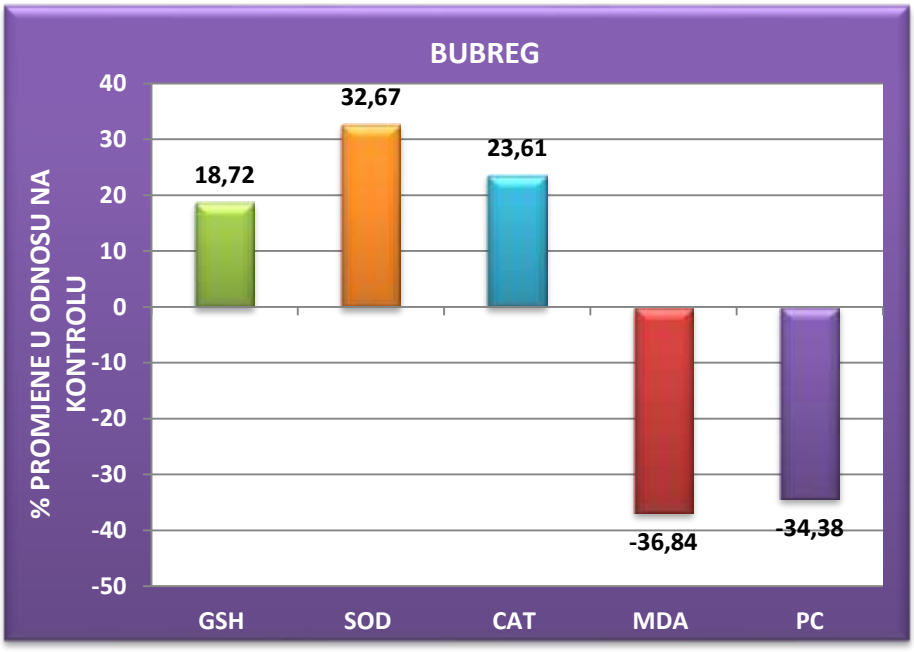
Peti istraživani biomarker oksidacijskog stresa bio je sadržaj karbonil proteina. U ovom istraživanju, statistički značajno (ANOVA, $p<0,05$) smanjenje aktivnosti karbonil proteina (PC) primijećeno je kod grupe životinja koja je tretirana sa GSE u jetri i bubrezima (2,9±0,18 nmol mg^{-1}; 2,1±0,26 nmol mg^{-1}) u odnosu na kontrolnu grupe životinja (4,1±0,22 nmol mg^{-1} u jetri; 3,2±0,22 nmol mg^{-1} u bubregu) (Slike 8, 9 i 10).

Uvođenje karbonilnih grupa u proteine može biti potaknutno različitim ROS ili sekundarnim produktima oksidacijskog stresa te može nastati na različitim mjestima i različitim mehanizmima. Brojne aminokiseline, naročito arginin, histidin, lizin i prolin imaju slobodne karbonilne grupe koje inhibiraju ili mijenjaju aktivnost samog proteina. Karbonilacija nastaje kao direktna oksidacija aminokiselinskog bočnog lanca. Reaktivni kisik oduzima atom vodika iz aminokiselinskog ostatka te tako nastaju radikali koji se mogu međusobno povezivati. Karbonile je relativno teško inducirati te stoga mogu biti indikator snažnog oksidacijskog stresa (Dalle-Donne i sur., 2003).

4.2. POSTOTAK PROMJENE OKSIDACIJSKIH ENZIMA (MDA, GSH, SOD, CAT I PC) U JETRI I BUBREGU U ODNOSU NA KONTROLNU GRUPU ŽIVOTINJA



Slika 9. Utjecaj ekstrakta pokožice grožđa na aktivnost MDA, GSH, SOD, CAT i PC u jetri glavnih faktora rizika od kardiovaskularnih bolesti (KVB).



Slika 10. Utjecaj ekstrakta pokožice grožđa na aktivnost MDA, GSH, SOD, CAT i PC u bubregu mužjaka glavnih faktora rizika od kardiovaskularnih bolesti (KVB).

Na slikama 9 i 10 prikazani su ukupni utjecaji ekstrakta pokožice grožđa (prikazani kao % promjene u odnosu na kontrolu) na aktivnost MDA, GSH, SOD, CAT i PC u jetri i bubregu kod C57BL/6 miša kao glavnih faktora rizika od kardiovaskularnih bolesti (KVB).

Iz gore navedenog zaključujemo da je došlo do povećane aktivnosti antioksidacijskih enzima kao rezultat unosa polifenola (Young i sur., 2000), što ukazuje na poboljšanu zaštitu promatranih organa od oksidacijskog stresa (Slike 9 i 10). Promatrani promjenjivi učinci eksperimentalnih dijeta na aktivnosti enzima pokazuju da antioksidansi uključeni u obranu od ROS-a u jetri i bubregu uvelike ovise o enzimima, porijeklu oksidacijskog stresa i izvoru antioksidanata. Dublje znanje o mehanizmima koji reguliraju ove enzime potrebno je za razumijevanje fizioloških implikacija kao odgovor na oksidacijski stres.

Zbog njihovog pozitivnog efekta na zdravlje, bioaktivni spojevi ekstrakta pokožice grožđa mogu predstavljati osnovu za dijetetske suplemente značajne naročito za ljude sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti ili metaboličkog sindroma. Također, konzumacija proizvoda koji sadrže polifenole, s obzirom na njihov visok antioksidacijski potencijal, može imati i pozitivne efekte u prevenciji drugih oboljenja što otvara nova polja istraživanja bioaktivnih spojeva koji bi se inače smatrali otpadom vinske industrije.

4.3. BIODOSTUPNOST ANTOCIJANA

Zainteresiranost za antocijane je posebno porasla posljednjih godina zbog njihovih pozitivnih učinaka na zdravlje (smanjenje rizika od nastanka koronarnih bolesti srca, srčanog udara, kancerogenih bolesti, kod inflamatornih stanja, poboljšanje vida pri slabijem osvjetljenju i poboljšanje kognitivnih sposobnosti).

Antocijani se slabo resorbiraju i ne metaboliziraju se u istom stupnju kao drugi flavonoidi. Zbog toga se smatra da antocijani imaju malu biodostupnost. Ipak antocijani dijele zajedničke metaboličke reakcije sa ostalim flavonoidima. Antocijani su kao i flavonoidi prisutni u hrani uglavnom kao glikozidi. Aglikonski dio je hidrofoban i lako prolazi kroz membrane pasivnom difuzijom. Difuzija hidrofilnog dijela antocijana se ne odvija lako kroz membrane. Apsorpcija antocijana se odigrava aktivnim transportom tako što prvo dolazi do hidrolize. Mnoge kliničke studije ukazuju na to da se resorpcija antocijana odvija u malom intestinumu, mada još uvijek do kraja nije razjašnjeno kako ulaze u enterocite. Pretpostavlja se da se to odvija natrij-glikozidnim transportom ili pasivnom difuzijom aglikona koji se prije prolaska kroz membranu izdvojio iz glikozida poslije hidrolize laktat pilorizin hidrolazom (Wrolstad, 2004).

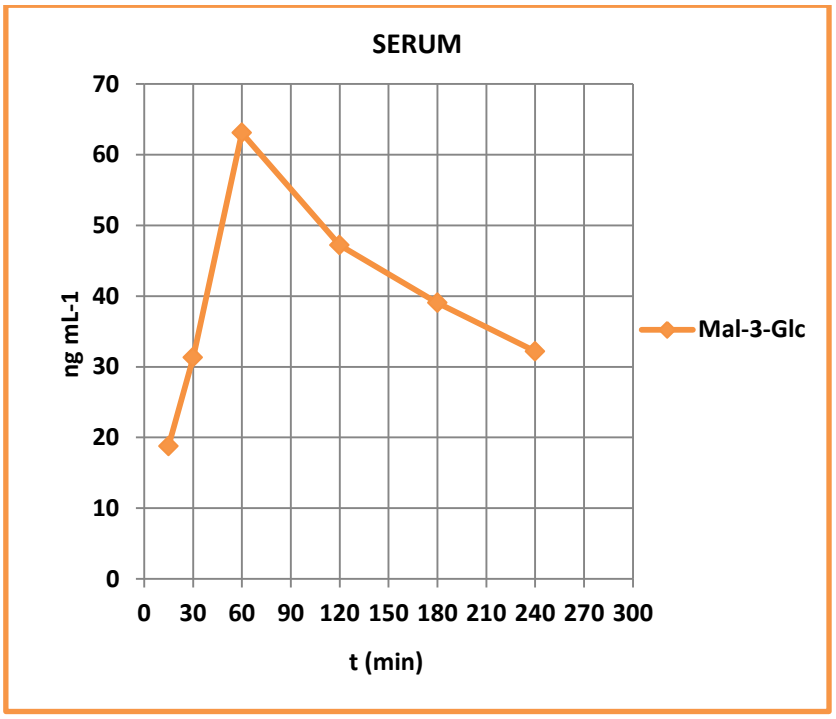
Biokinetika ili raspodjela jest pojam koji služi za opis puta ksenobiotika u organizmu te se definira složenim reakcijama koje uključuju apsorpciju, distribuciju, biotransformacije i eliminaciju. Bioaktivnost supstance je direktno ovisna o koncentraciji u kojoj je prisutna u organizmu. Biokinetika određuje koncentraciju bioaktivne komponente na mjestu djelovanja iste. Kako bi uopće došlo do apsorpcije, distribucije, biotransformacije i u konačnici eliminacije, supstanca mora posjedovati sposobnost prolaska kroz membranu. Sposobnost prolaska kroz membranu je određena fizikalno-kemijskim karakteristikama kao što su veličina, topljivost u vodi i lipidima ili pKa. U gastrointestinalnom traktu na transport kroz membranu može utjecati i pH vrijednost, probavni enzimi, žućne kiseline, mikrobiota te motilitet i permeabilnost membrana.

Prolazak kroz gastrointestinalni trakt je posebno važan za apsorpciju antocijana zbog njihove složene kemijske strukture, koja ih čini relativno nestabilnima, što u konačnici ima utjecaj na njihovu biokinetiku i biodostupnost. Zbog strukture antocijana koja je osjetljiva na pH vrijednosti, oni u lužnatim uvjetima postaju nestabilni (McGhie i Walton, 2007).

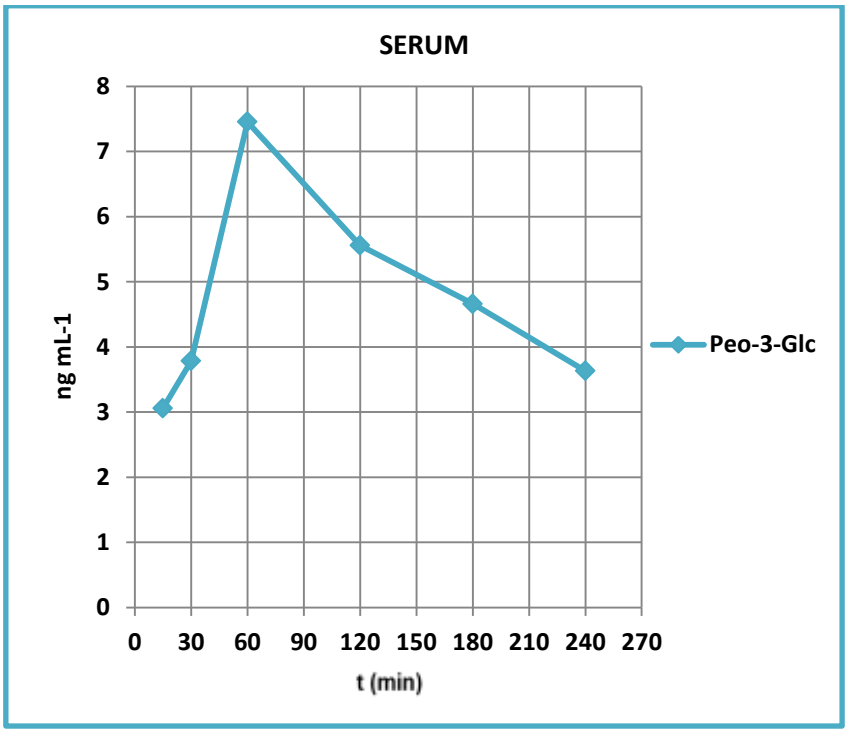
Još jedan važan faktor koji može imati utjecaja na biodostupnost antocijana je njihova potencijalna ingestija kao pigmenata (derivati antocijana), posebice kada je riječ o konzumaciji vina. Adukti piruvinske kiseline antocijana mogu dospijeti u plazmu štakora 15 minuta nakon oralne ingestije 400 mg kg^{-1} (~21.1 nM kg μmol^{-1} i ~28.8 nM kg μmol^{-1}, malvidin-3-glukozid piruvinske kiseline i malvidin-3-glukozida) (Faria i sur., 2009).

Biodostupnost fenolnih komponenata je ovisna o stukturi hrane u kojoj su prisutni. Lipofilnija struktura može ubrzati topljivost i apsorpciju flavnonoida. Prisutnost etanola može utjecati na stupanj apsorpcije antocijana (Faria i sur., 2009) te njihov transport kroz epitel crijeva. Sljedeći faktor koji je potrebno uzeti u obzir kada je riječ o biodostupnosti antocijana je interakcija između polifenolnih komponenata i ostalih komponenata prisutnih u hrani (polifenolne komponente imaju sposobnost interakcije sa proteinima prisutnim u hrani) (Brás i sur., 2010). Te interakcije mogu imati utjecaja na modifikaciju njihove biološke funkcije i ograničenje apsorpcije. Učestalost konzumacije antocijana također je bio predmet istraživanja. Ustanovljeno je kako stanice postaju sklonije transportu antocijana kada su dugotrajnije izložene njihovom unosu (Faria i sur., 2009).

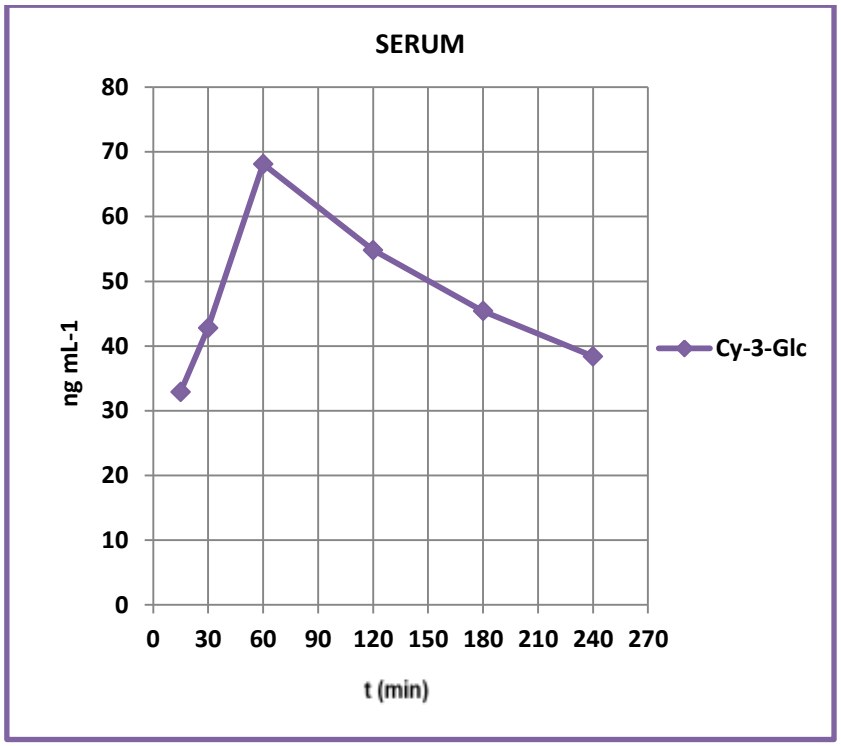
Nakon ingestije, antocijani se brzo detektiraju u plazmi u nativnim oblicima, vjerojatno kao rezultat njihove apsorpcije kroz želučanu stjenku (Milbury i sur., 2002).



Slika 11. Srednja vrijednost koncentracije Mal-3-Glc u ovisnosti o vremenu u serumu C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.



Slika 12. Srednja vrijednost koncentracije Peo-3-Glc u ovisnosti o vremenu u serumu C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.



Slika 13. Srednja vrijednost koncentracije Cy-3-Glc u ovisnosti o vremenu u serumu C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.

Ispitivanje biodostupnosti antocijana uglavnom je istraživano na životinjama. Ispitivanje bioraspoloživosti, koje je provedeno na štakorima koji su bili tretirani sa 400 mg kg^{-1} antocijana, pokazalo je da se poslije jedne oralne aplikacije antocijani detektiraju u plazmi nakon 15 minuta te dosežu maksimalnu koncentraciju od 2-3 μg mL^{-1} poslije 1,5 h. Koncentracija antocijana je naglo opala nakon 2 h. Antocijani se izlučuju putem urina u obliku glukozida i to 0,018-0,37% od unesene doze (Manach i sur., 2005).

Maksimalna koncentracija antocijana u plazmi se postiže unutar 0,5-2 h nakon konzumacije hrane bogate antocijanima. Sustavna biodostupnost antocijana se procjenjuje na otprilike 0,26-1,8% u studijama provedenim na životinjama (Borges i sur., 2007; Marczylo i sur., 2009). Maksimalna koncentracija ukupnih antocijana u plazmi iznosi 1-100 nmol L^{-1} nakon konzumacije bobičastog voća i grožđa kod zdravih pojedinaca (Prior i Wu, 2006). Apsorbirani antocijani se brzo eliminiraju iz sistemske cirkulacije.

Što se tiče unosa Mal-3-Glc, u ljudskoj plazmi i urinu su detektirani samo metabolizirani oblici (Bub i sur., 2001).

Naši rezultati se slažu sa gore navedenim rezultatima ako se uzme u obzir da su životinje tretirane sa 100 mg kg^{-1} ekstrakta pokožice grožđa. Nakon jedne intragastrične

aplikacije antocijanidini su detektirani u serumu nakon 15 minuta i dostigli su maksimalnu koncentraciju od 63,092 ng mL^{-1} za Mal-3-Glc; 68,111 ng mL^{-1} za Cy-3-Glc i 7,455 ng mL^{-1} Peo-3-Glc 1 h nakon intragastrične aplikacije. Koncentracija antocijana je naglo opala nakon 2 h u serumu (Slike 11-13) .

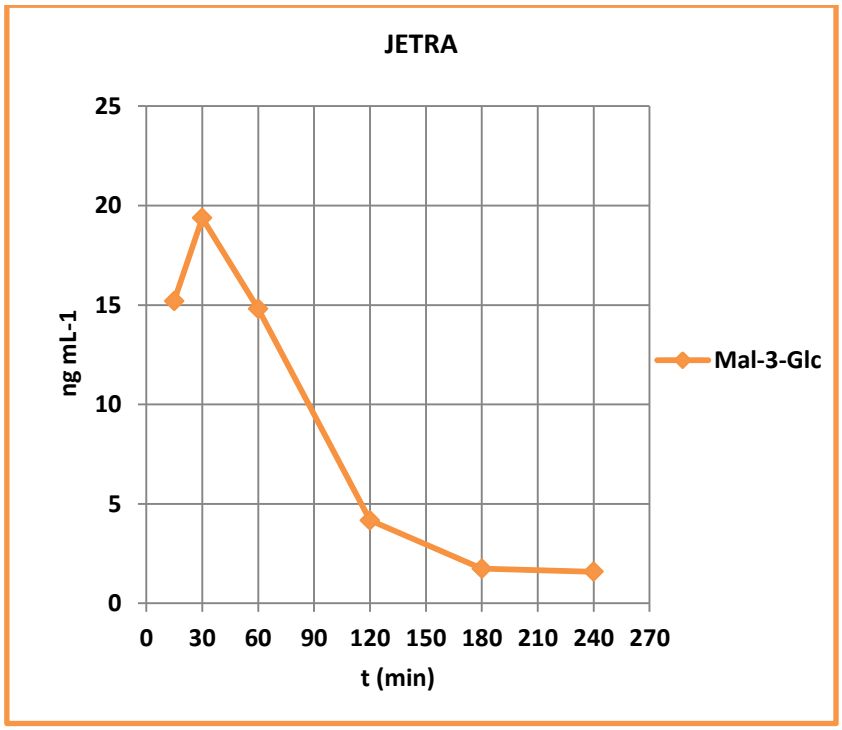
Antocijani grožđanog soka imaju viši stupanj apsorpcije u odnosu na antocijane vina, što je potvrđeno na zdravim pojedincima. Razlog tomu je viši sadržaj šećera u grožđanom soku (Bitsch i sur., 2004). Antocijani su u uzorcima plazme i urina bili uglavnom prisutni u formi glukozida. Nakon unosa grožđanog soka, maksimalna koncentracija Cy-3-Glc je iznosila 0,42 ng mL^{-1}, koncentracija Mal-3-Glc 48,8 ng mL^{-1} te Peo-3-Glc 27,3 ng mL-1 kroz 30 minuta. Nakon unosa crvenog vina nije detektirana prisutnost Cy-3-Glc, dok je maksimalna koncentracija Mal-3-Glc iznosila 18,5 ng mL^{-1}, a Peo-3-Glc 12,6 ng mL^{-1} kroz 90 minuta. Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih antocijana prisutnih u plazmi nakon unosa oba pića. Jedina razlika je utvrđena za koncentraciju cijanidina i delfinidina koja je bila veća u slučaju unosa grožđanog soka.

U istraživanju provedenom na štakorima, na apsorpciju Cy-3-Glc nije utjecala prisutnost glukoze (Felgines i sur., 2008). U našoj studiji biodostupnosti antocijana iz pokožice grožđa također nije došlo do utjecaja glukoze na apsorpciju Cy-3-Glc u serumu što je vidljivo iz rezultata prikazanih na slici 13.

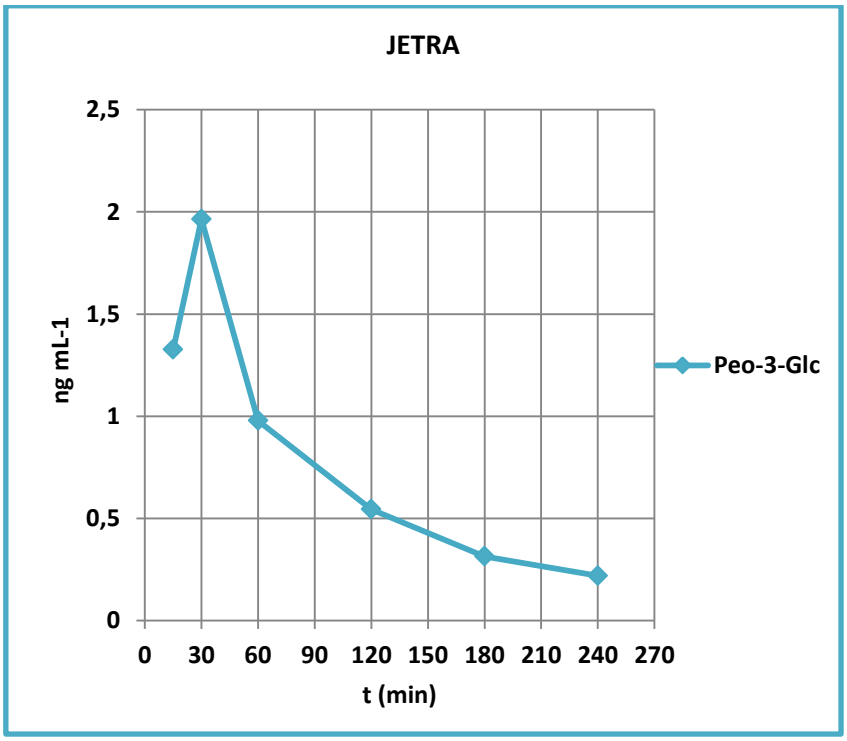
Kod oralnog unosa Pg-3-Glc u nativnom obliku, u uzorcima krvne plazme i urina štakora, identificiran je jedan pelargonidin monoglukuronid i tri Pg-3-Glc monoglukuronida, zajedno sa netaknutim Pg-3-Glc (Ichiyanagi i sur., 2013).

De-3-Glc, Pt-3-Glc i Mal-3-Glc su pronađeni u nativnom obliku u uzorcima krvi i urina nakon unosa grožđanog soka u čovjeka (Stalmach i sur., 2012).

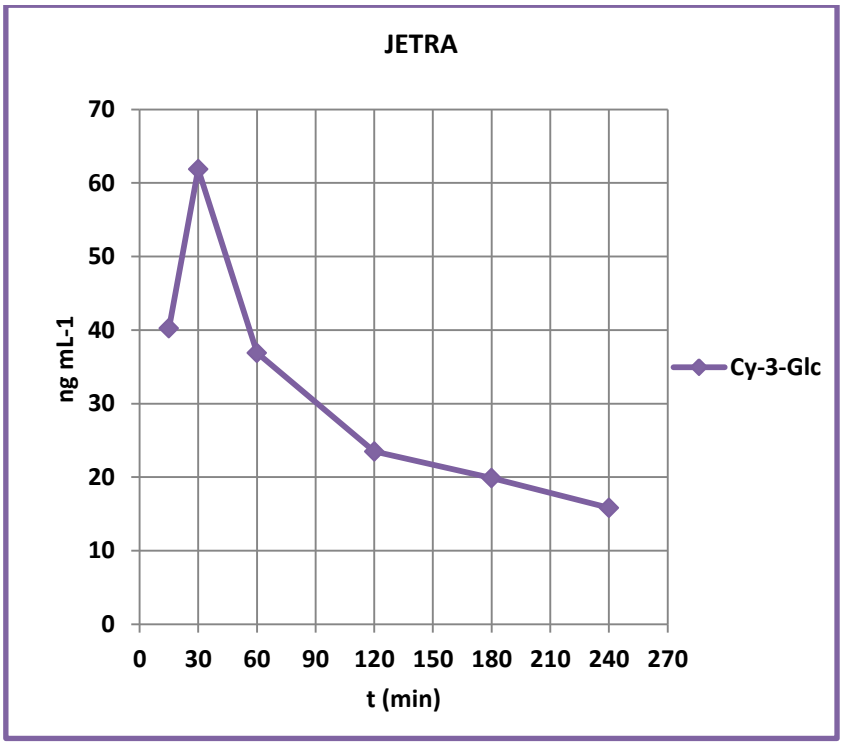
Otprilike 30-44% konzumiranog Cy-3-Glc je pronađeno u ljudskoj plazmi u obliku PCA nakon konzumacije soka od naranče (Vitaglione i sur., 2007) te kupina (Chen i sur., 2012). Maksimalna koncentracija PCA je iznosila 0.5 μM nakon ingestije 71 mg Cy-3-Glc u zdravih pojedinaca. Maksimalna koncentracija Cy-3-Glc je iznosila 1,9 nM (Vitaglione i sur., 2007).



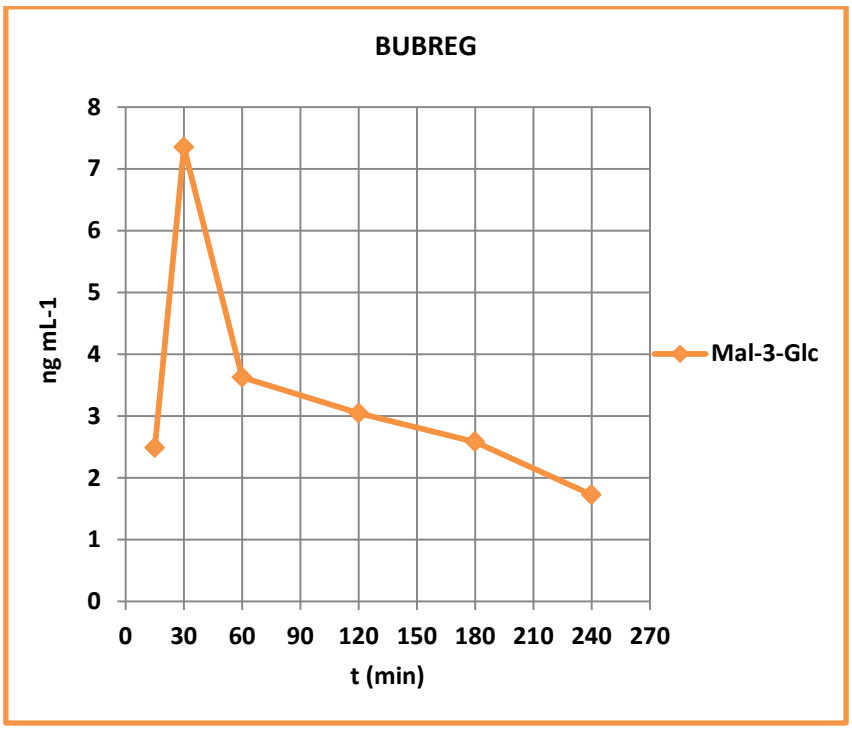
Slika 14. Srednja vrijednost koncentracije Mal-3-Glc u ovisnosti o vremenu u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.



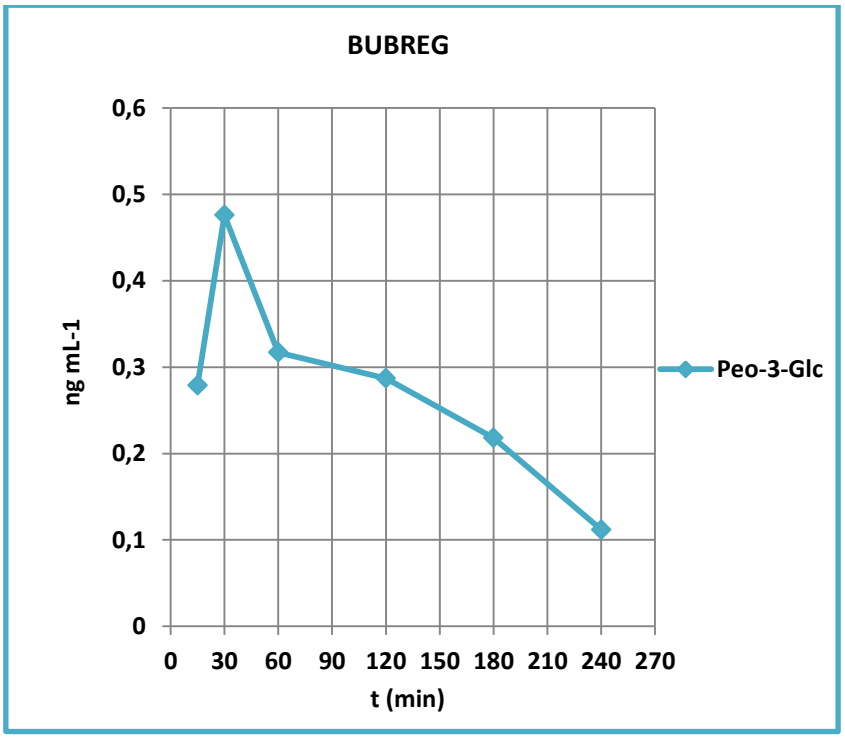
Slika 15. Srednja vrijednost koncentracije Peo-3-Glc u ovisnosti o vremenu u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.



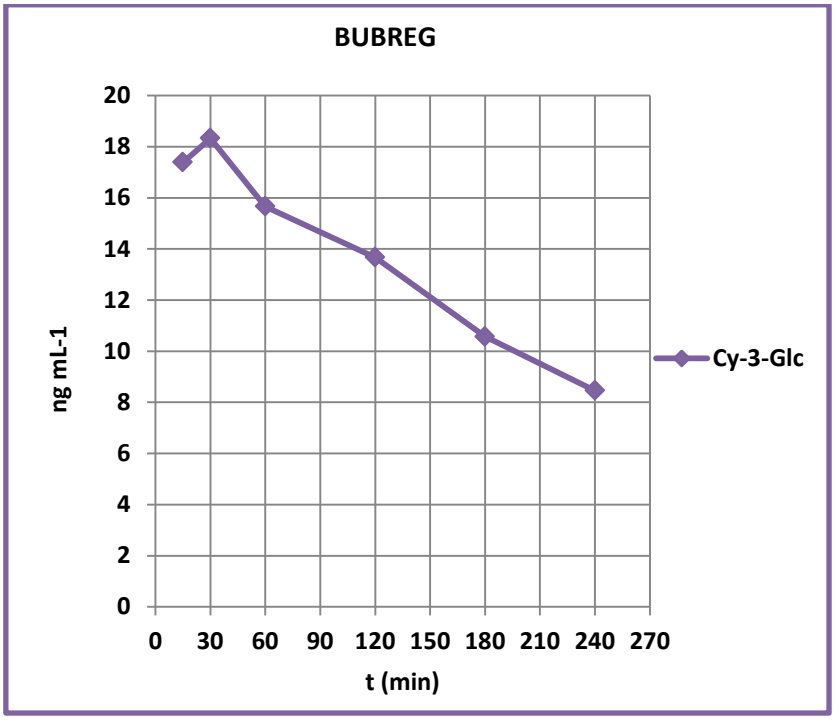
Slika 16. Srednja vrijednost koncentracije Cy-3-Glc u ovisnosti o vremenu u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.



Slika 17. Srednja vrijednost koncentracije Mal-3-Glc u ovisnosti o vremenu u bubregu C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.



Slika 18. Srednja vrijednost koncentracije Peo-3-Glc u ovisnosti o vremenu u bubregu C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.



Slika 19. Srednja vrijednost koncentracije Cy-3-Glc u ovisnosti o vremenu u bubregu C57BL/6 miša nakon intragastrične ingestije ekstrakta pokožice grožđa u dozi od 100 mg kg^{-1} tjelesne težine.

Gastrointestinalni trakt je karakterističan kao regija sa različitom pH vrijednostima i različitom mikroflorom, a oba ova faktora mogu modificirati antocijanske komponente. pH u želucu je nizak (oko 1-2), tako da su antocijani uglavnom prisutni u vidu flavijum iona koji je najstabilnija forma antocijana. Stabilnost antocijana u uvjetima sličnim onima u GIT-u je potvrđena različitim *in vivo* studijama. U suprotnosti sa želucem, okruženje malog i velikog intestinuma je većinom u neutralnom pH području gdje će višemolekulske forme antocijana biti prisutne i gdje će antocijani biti manje stabilni. Aglikonski dio je nestabilan u neutralnoj pH sredini i vrlo brzo se razgrađuje na fenolne kiseline i aldehide (Wu i sur., 2006).

Nakon jedne intragastrične ingestije antocijani su kvantitativno detektirani u jetri i bubregu UPLC MS/MS. Maksimalna koncentracija je postignuta 30 minuta nakon intragastrične aplikacije. Postignute vrijednosti u jetri su iznosile: 19,381 ng mL^{-1} za Mal-3-Glc, 61,874 ng mL^{-1} za Cy-3-Glc i 1,964 ng mL^{-1} za Peo-3-Glc; odnosno u bubregu, 7,352 ng mL^{-1} za Mal-3-Glc, 18,327 ng mL^{-1} za Cy-3-Glc i 0,476 ng mL^{-1} za Peo-3-Glc (Slike 14-19). Apsorpcija različitih metabolita antocijana u gastrointestinalnom traktu nakon jedne doze ekstrakta pokožice grožđa mogu se objasniti biokemijskim čimbenicima kao što su razlike u ekspresiji ili aktivnosti enzima koji su uključeni u metabolizam antocijana.

U cilju utvrđivanja koncentracije antocijana u tkivima, prikupljeni su rezultati nekoliko studija koje su nedavno provedene. Utvrđeno je kako su antocijani u želudcu prisutni u nativnoj formi, dok su u drugim organima (jejunum, jetra i bubrezi) prisutni u nativnoj, ali i u metiliranoj te konjugiranoj formi (Talavéra i sur., 2005).

U istraživanju provedenom na svinjama, čija je prehrana kroz četiri tjedna bila obogaćena borovnicama, nije utvrđena prisutnost antocijana u plazmi i urinu, međutim u jetri, sluznici oka, kori mozga te malom mozgu je utvrđena prisutnost u nativnoj formi. Ti rezultati sugeriraju kako se antocijani mogu nakupljati u tkivima. Utvrđena je i akumulacija u tkivima koja ne posjeduju krvno-moždanu barijeru (Kalt i sur., 2008).

Prisutnost metabolita antocijana (metilirani i glukurono-konjugirani derivati) identificirana je u brojnim organima (mokraćni mjehur, prostata, testisi, srce i adipozno tkivo) štakora čija je prehrana bila obogaćena antocijanima borovnice u trajanju od 12 dana. Koncentracija metabolita antocijana bila je najveća u mokraćnom mjehuru. U prostati, testisma te srcu su uglavnom identificirani glukozidi cijanidina, te u manjoj koncentraciji cijanidin monoglukuronidi. U adipoznom pak tkivu su detektirani cijanidin-3-glukozidi te metilirani derivati (Felgines i sur., 2009).

Passamonti i njegovi suradnici (2003) su proveli *in vivo* istraživanje na štakorima iz kojeg su zaključili kako antocijani imaju sposobnost prolaska kroz mukoznu membranu

želudca. Talavéra je potom, zajedno sa svojim suradnicima (2003), proširio njihovo istraživanje te utvrdio kako se glukozidi antocijana brzo i efikasno apsorbiraju u želudcu (otprilike 25%). Međutim, znatan utjecaj na stupanj apsorpcije ima kemijska struktura antocijana. Isti autori su 2005. godine proveli istraživanje vezano uz metabolizam i distribuciju antocijana u organima štakora (želudac, jejunum, jetra, bubrezi i mozak). Jedino novo saznanje je bilo to da želudac nema sposobnost metaboliziranja antocijana, budući da u njemu nije utvrđena prisutnost njihovih metabolita.

U istraživanju provedenom na štakorima, utvrđen je kako se pelargonidin-3-glukozid brzo i efikasno apsorbira iz želudca (23%) (Felgines i sur., 2007).

Podaci vezani uz kinetički tok antocijana u gastrointestinalnom traktu su važni za razumijevanje njihovog stupnja apsorpcije. Kod štakora koji su bili hranjeni ekstraktom kupine kroz gastrostomu, utvrđen je linearan pad sadržaja antocijana u lumenu želudca tijekom 180 min (He i sur., 2009). Očekivano vrijeme iskorištenja polovice sadržaja antocijana u lumenu želudca štakora iznosi otprilike 120 min. Ovi podaci navode na zaključak da se minimalne koncentracije antocijana zadržavaju u želudcu i nakon 4 sata od ingestije. Dodatni faktor koji može imati utjecaja na apsorpciju antocijana u želudcu je i vezanje antocijana na zasad neidentificirani protein u tkivu želudca. Zbog vezanja na taj protein, nije moguće odrediti slobodne antocijane upotrebom HPLC metode. Vezanje može biti posljedica nespecifičnog ili pak specifičnog vezanja na neki transportni protein.

Nadalje, pretjerana suplementacija antocijanima, znatno viša u odnosu na uobičajen prehrambeni unos, može za posljedicu imati smanjenje stupnja apsorpcije i transporta te doprinjeti slabijoj biodostupnosti (Talavéra i sur., 2003).

Također, ne smije se zanemariti doprinos mukoze želudca u vidu metabolizma antocijana. Mukoza želudca posjeduje konjugativnu enzimsku aktivnost (UDP glukuronoziltransferaza, sulfotransferaza, katehol-O-metiltransferaza) (Harris i sur., 2000).

Frakcije antocijana koje nisu apsorbirane u želucu dospijevaju u tanko crijevo. Budući da su u tankom crijevu lužnatiji uvjeti, antocijani dominiraju u obliku karbinol pseudobaze. Za razliku od ostalih flavonoida čiji se glikozidi hidroliziraju, glikozidi antocijana se brzo i efikasno apsorbiraju u tankom crijevu (Talavéra i sur., 2004).

Antocijani se brzo metaboliziraju te dospijevaju u sistemsku cirkulaciju ili se izlučuju putem žući ili urina u netaknutom i metaboliziranom obliku (glukuronidirani, sulfatirani i metilirani derivati) (Ichiyanagi i sur., 2005).

Potencijalni mehanizam apsorpcije glikozida antocijana u tankom crijevu vjerojatno uključuje specifični transporter glukoze, kao primjerice SGLT1, što je prethodno sugerirano i

za druge flavonoide (Hollman i sur., 1999). Novija studija upućuje na pretpostavljeno sudjelovanje GLUT2 transportera u apsorpciji antocijana na intestinalnoj razini (Faria i sur., 2009).

Neapsorbirane frakcije antocijana dospijevaju u kolon gdje podliježu značajnim strukturalnim modifikacijama. Te modifikacije su najvjerojatnije posljedica spontane degradacije uzrokovane fiziološkim uvjetima (Woodward i sur., 2009) ili pak djelovanjem mikrobnog metabolizma. Mikrobiota kolona sadrži enzime koji kataliziraju hidrolizu glikozida u aglikone, te degradaciju u jednostavne fenolne kiseline.

Osnovni metabolit cijanidin-3-glukozida u čovjeka je PCA (protokatehinska kiselina) (Vitaglione i sur., 2007). Na PCA otpada otprilike 73% prehranom unesenih antocijana. Ovaj metabolit je identificiran u plazmi 2 h nakon ingestije soka od naranče, što upućuje na mogućnost formiranja PCA kao posljedice kemijske degradacije u fiziološkim uvjetima sistemske cirkulacije ili djelovanjem intestinalne mikrobiote. Također, ovaj metabolit je pronađen u uzorcima fecesa, što upućuje na ekstenzivan metabolizam antocijana u gastrointestinalnom traktu (Riso i sur., 2005).

Antocijani u gastrointestinalnom traktu mogu doseći µM koncentracije slične onima korištenim u *in vitro* ispitivanjima biomedicinskog djelovanja antocijana (Chen i Chen, 2013).

Apsorpcija antocijana je također bila učinkovita u slučaju *in sito* perfuzije jejunuma i ileuma štakora. Kemijska struktura je imala utjecaja na apsorpciju te je varirala od 10,7% za Mal-3-Glc do 22,4% za Cy-3-Glc. Najviša koncentracija antocijana je utvrđena u tkivu jejunuma miša (55,3±7,6%). Manji stupanj aspsorpcije je utvrđen za tkivo duodenuma (10,4 ±7,6%), te nije zabilježena apsorpcija u tkivu ileuma i kolona (Talavéra i sur., 2004).

U istraživanju provedenom na štakorima, čija je prehrana kroz 15 dana bila obogaćena antocijanima, koncentracija Cy-3-Glc te njegovih metiliranih i glukurono-konjugiranih metabolita u jejunumu je iznosila 605 nmol g tkiva^{-1} (Talavéra i sur., 2005).

U *in vivo* studiji provedenoj na jejunumu miša, ustanovljeno je kako flavonoid kvercetin-3-glukozid može značajno inhibirati apsorpciju Cy-3-Glc (Walton i sur., 2006).

U studiji koja je provedena na pacijentima sa ileostomom utvrđivana je koncentracija polifenola u kolonu nakon ingestije borovnica i soka od jabuke. Koncentracija glukozida antocijana zaostalih u tekućini ileuma, izražena u postocima, je iznosila, 42,8% za Mal-3-Glc te 28,3% za Cy-3-Glc (Kahle i sur., 2006).

Količina Cy-3-Glc koja dospije u debelo crijevo je slična količini izlučenoj putem fecesa. Svega 5,9% do 28,3% unesenog Cy-3-Glc je pronađeno u sokovima ileuma nakon unosa borovnica, grožđa i kupina kroz ileostomu (Stalmach i sur., 2012).

U drugim studijama je u uzorcima fecesa pronađeno 32,1% i 44,5% od ukupnog unosa Cy-3-Glc u čovjeka (Czank i sur., 2013), te miša (Felgines i sur., 2010). To navodi na zaključak kako se Cy-3-Glc koji dospije u debelo crijevo u najvećoj se koncentraciji izlučuje putem fecesa.

Metabolizam antocijana uključuje metilaciju, sulfataciju i konjugaciju sa glukuronskom kiselinom te degradaciju glikozidnih kompleksa i heterocikličkih oblika antocijana (Slimestad i sur., 2007). Za navedene pretvorbe potrebno je djelovanje enzima β-D-glukozidaze, β-D-glukuronidaze i α-L-ramnozidaze koji su odgovorni za otpuštanje aglikona iz glikozidnih ili glukuronidnih oblika (Selma i sur., 2009).

Pozitivni učinci na zdravlje se mogu povezati sa sporim i kontinuiranim otpuštanjem fenolnih komponenti u krvotok. Bez obzira na njihovu naočigled slabu biodostupnost, utvrđeno je kako su koncentracije antocijana u plazmi dovoljno visoke da induciraju pozitivne promjene u prijenosu signala te genskoj ekspresiji *in vivo* (DeFuria i sur., 2009). Poznato je da flavonoidi mogu ulaziti u direktne interakcije sa lipidima membrane, utječući na taj način na fiziološka svojstva membrane, interakcije između liganda i receptora, modulaciju prijenosa signala, transport kroz membranu i enzimsku aktivnost (Verstraeten i sur., 2010).

Rezultati velikog broja istraživanja su uniformni u zaključku da, iako postoje određene varijacije u vrijednostima biokinetičkih parametara, antocijani se brzo apsorbiraju i eliminiraju iz organizma.

S obzirom na rezultate navedenih istraživanja, možemo zaključiti kako ove biološki aktivne komponente mogu proći kroz gastrointestinalni trakt te dospjeti u sistemsku cirkulaciju u svojoj nativnoj ili metaboliziranoj formi. Zajednički zaključak većine autora jest da su antocijani prisutni u visokim koncentracijama u želudcu, međutim sam mehanizam gastričke apsorpcije nije u potpunosti razjašnjen.

Veliki utjecaj na biodostupnost antocijana imaju slijedeći parametri: (i) varijacije u unosu; (ii) kemijska struktura u različitim prehrambenim izvorima; (iii) način procesiranja i struktura hrane i pića u kojima su prisutni; (iv) dob i spol pojedinaca; (v) upotrijebljena analitička metoda.

5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je tretman s ekstraktom pokožice grožđa (GSE) statistički značajno (ANOVA, $p<0,05$) smanjio aktivnosti MDA i PC u jetri i bubregu miša u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što ukazuje na antioksidacijski potencijal polifenola iz pokožice grožđa. Koncentracije GSH, SOD i CAT u ispitivanim uzorcima jetre i bubrega statistički su značajno (ANOVA, $p<0,05$) povećane u odnosu na kontrolnu grupu, što kazuje na antioksidacijski učinak GSE i smanjenje oksidacijskog stresa.
2. Apsorpcija, metabolizam i biodostupnost antocijana ovise o strukturi. Antocijani su kao i flavonoidi prisutni u hrani uglavnom kao glikozidi. Aglikonski dio je hidrofoban i lako prolazi kroz membrane pasivnom difuzijom. Difuzija hidrofilnog dijela antocijana se ne odvija lako kroz membrane. U ovom istraživanju maksimalne koncentracije antocijana postignute su 1 h nakon aplikacije u serumu, odnosno nakon 30 minuta u jetri i bubrezima.
3. Antocijani zbog pozitivnog efekta na zdravlje mogu predstavljati osnovu za dijetetske suplemente značajne naročito za ljude sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti ili metaboličkog sindroma. Također, konzumacija proizvoda koji sadrže antocijane, s obzirom na njihov visok antioksidacijski potencijal, može imati potencijalnu primjenu u prevenciji bolesti koje su povezane sa oksidacijskim stresom.

6. LITERATURA

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol*. **105**, 121-126.

Allen, R.G., Tresini, M. (2000) Oxidative status and gene regulation. *Free Radical. Bio. Med.* **28**, 463–499.

Anonymous (2016) Pokožica grožđa. http://trinknitty.blogspot.hr/2012/09/grapes-again.html. Pristupljeno 26. lipnja 2016.

Bitsch, R., Netzel, M., Frank, T., Strass, G., Bitsch, I. (2004) Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. *J. Biomed. Biotechnol.* **5**, 293–298.

Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., Béliveau, R. (2007) Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NF kappa B by edible berry juice. *Anticancer Res.* **27**, 937–948.

Borges, G., Roowi, S., Rovanet, J.M. (2007) The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 714-725.

Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczyńska-Rwigło, A., Rietjens, I.M.C.M., Tyrakowska, B. (2005) Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5526–5534.

Bourzeix, M. (1976) Les composes phenoliques des raisins et du vin. Leurs effets sur la qualite. *Rev. Frank. Oenol.* **63**, 53-69.

Brás, N.F., Gonçalves, R., Mateus, N., Fernandes, P.A., Ramos, M.J., De Freitas, V. (2010) Inhibition of Pancreatic Elastase by Polyphenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10668–10676.

Bub, A., Watzl, B., Heeb, D. (2001) Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur. J. Nutr*. **40**, 113-120.

Cao, G., Russell, R., Lischner, N. (1998) Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr*. **128**, 2383–2390.

Chen, A.Y., Chen, Y.C. (2013) A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem.* **138**, 2099-2107.

Chen, W., Wang, D., Wang, L.S. (2012) Pharmacokinetics of protocatechuic acid in mouse and its quantification in human plasma using LC-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogn. B*. **908**, 39-44.

Chidambara Murthy, K.N. , Singh, R.P., Jayaprakasha, G.K (2002) Antioxidant Activities of Grape (Vitis vinifera) Pomace Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5909–5914.

Chun, O.K., Chung, S.J., Song, W.O. (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J. Nutr*. **137**, 1244–1252.

Cisowska, A., Wojnicz, D., Hendrich, A.B. (2011) Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat. Prod. Commun.* **6**, 149-156.

Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M.N. (2010) Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol. Aspects Med.* **31**, 446-467.

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1001-1043.

Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q. (2013) Human metabolism and elimination of the anthocyanin, Cyd-3-Glc: A (13) C-tracer study. *Am. J. Clin. Nutr.* **97**, 995-1003.

Čović, D., Bojić, M., Medić-Šarić, M. (2009) Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farm. glas.* **65**, 693-704.

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani A. (2003) Protein carbonylation in human diseases, *Trends Mol. Med.* **9**, 169–176.

Das, H. (2001) Protein and amino acids from cellulosic wastes of agricultural and food industry – a review. *Indian Food Packer*. **55**, 57-65.

De Furia, J., Bennett, G., Strissel, K.J., Perfield, J.W., Milbury, P.E., Greenberg, A.S., Obin, M.S. (2009) Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *J. Nutr.* **139**, 1510-1516.

De Pascual, T., Sanchez, B.S. (2008) Anthocyanins, from plant to health. *Phytochem. Rev.* **7**, 281–299.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal*. **18**, 1818-1891.

Di Lecce, G., Arranz, S., Jáuregui, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., Lamuela-Raventós, R.M. (2014) Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem*. **145**, 874-882.

Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* **43**, 200–227.

El-Adawi, H., El-Azhary, D., Abd El-Wahab, A., El-Shafeey, M., Abdel-Mohsen, M. (2011) Protective effect of milk thistle and grape seed extracts on fumonisin B1 induced hepato- and nephro-toxicity in rats. *J. Med. Plants Stud.* **5**, 6316-6327.

Erlund, I., Koli, R., Alfthan, G., Marniemi, J. (2008) Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 323–331.

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.

Fang, J. (2014) Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* **46**, 508-520.

Faria, A., Pestana, D., Azevedo, J. (2009) Absorption of anthocyanins through epithelial cells- Putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 1430-1437.

Felgines, C., Krisa, S., Mauray, A. (2010) Radiolabelled cyaniding-3-O-glucoside is poorly absorbed in the mouse. *Br. J. Nutr.* **103**, 1738-1745.

Felgines, C., Talavéra, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.L., Remesy, C. (2005) Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7721–7727.

Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lyan, B., Lamaison, J.L., Scalbert A. (2007) Strawberry pelargonidin glycosides are excreted in urine as intact glycosides and glucuronidated pelargonidin derivatives in rats. *Br. J. Nutr.* **98**, 1126-1131.

Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Vitaglione, P., Lamaison, J.L., Fogliano, V., Scalbert, A., Vanella, L., Galvano, F. (2008) Influence of glucose on cyaniding-3-glucoside absorption in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 959-964.

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, L., Otting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Method. Enzymol*. **105**, 93-104.

Fukumoto, L.R., Mazza, G. (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3597–3604.

Galvano, F., Frigiola, A., Gazzolo, D., Biondi, A., Malaguarnera, M., Li Volti, G. (2009) Endothelial protective effects of anthocyanins: the underestimated role of their metabolites. *Ann. Nutr. Metab.* **54**, 158–159.

García-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C., De Pascual-Teresa, S. (2004) Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A—studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3378–3384.

Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Res. Int.* **54**, 1844-1858.

Hamlaoui-Gasmi, S., Mokni, M., Limam, N., Limam, F., Amri, M., Aouani, E., Marzouki, L. (2012) Effect of garlic's mode of administration on erythrocytes and plasma parameters in Wistar rat. *Afr. J. Biotechnol.* **33**, 8259-8263.

Harris, R.M., Picton, R., Singh, S., Waring, R.H. (2000) Activity of phenolsulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Life Sci.* **67**, 2051-2057.

Hassan, H.A., Edrees, G.M., El-Gamel, E.M., El-sayed, E.A. (2014) Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by grape seed extract and fish oil is mediated by lowering oxidative stress and DNA damage. *Cytotechnology* **66**, 419–429.

He, J., Giusti, M.M. (2010) Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **1**, 163-187.

He, J., Wallace, T.C., Keatley, K.E., Failla, M.L., Giusti, M.M. (2009) Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat. *J. Agric. Food Chem*. **57**, 3141-3148.

Hollman, P.C., Bijsman, M.N., van Gamersen, Y., Cnossen, E.P., de Vries, J.H., Katan, M.B. (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Res.* **31**, 569-573.

Hou, D.X., Yanagita, T., Uto, T., Masuzaki, S., Fujii, M. (2005) Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem. Pharmacol*. **70**, 417–425.

Ichiyanagi, T., Kashiwada, Y., Shida, Y. (2013) Structural elucidation and biological fate of two glucuronyl metabolites of pelargonidin-3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *J. Agr. Food Chem.* **61**, 569-578.

Ichiyanagi, T., Shida, Y., Rahman, M.M., Hatano, Y., Konishi, T. (2005) Extended glucuronidation is another major path of cyanidin 3-O-beta-D-glucopyranoside metabolism in rats. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7312–7319.

Ichiyanagi, T., Shilda, Y., Rahman, M.M., Hatano, Y., Konishi, T. (2006) Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (Vaccinium myrtillus L.) extract in rats. *J. Agric. Food Chem*. **54**, 6578-6587.

Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2008) Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chem. Biol. Interact*. **176**, 108-120.

Jennings, A., Welch, A.A., Fairweather-Tait, S.J., Kay, C., Minihane, A.M., Chowienczyk, P., Jiang, B., Cecelja, M., Spector, T., Macgregor, A., Cassidy, A. (2012) Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women. *Am. J. Clin. Nutr*.**96**, 781-788.

Kadri , S., Smine, S., Elayed, M., Limam, F. Cosette, P., Amri, M., Aouani, E., Mokni, M. (2015) Protective effect of grape seed and skin extract on cerebral ischemia in rat: implication of transition metals. *Int. J. Stroke* **10**, 415–424.

Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W. (2006) Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do polyphenols reach colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 418-423.

Kallithraka, S., Mohdaly, AA., Makris DP., Kefalas, P. (2005) Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*vitis vinifera spp.*): association with antiradical efficiency. *J. Food Comp. Anal.* **18**, 375–386.

Kalt, W., Blumberg, J.B., McDOnald, J.E. (2008) Identification of anthocyanins in the live, eye and brain of blueberry-fed pigs. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 705-712.

Kay, C., Mazza, G. (2005) Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J. Nutr.* **135**, 2582–2588.

Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Simon, P.W., Novotny, J.A. (2005) Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6537–6542.

Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., Teissedre, P.L. (2014) Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules* **19**, 482-506.

Levine, R.L., Williams J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.* **233**, 346-357.

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 Health Study. *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.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr*. **81**, 230–242.

Marczylo, T.H., Cooke, D., Brown, K. (2009) Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**, 1261-1268.

Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L., Bravo, L. (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J. Chromatogr. B* **827**, 76–82.

Mazza, G. (2007) Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanità* **43**, 369–374.

Mazza, G., Fukomoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewet, B. (1999) Anthocyanins, phenolics and colour of Cabarnet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4009-4017.

McGhie, T.K., Ainge, G.D., Barnett, L.E., Cooney, J.M., Jensen, D.J. (2003) Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4539–4548.

McGhie, T.K., Walton, M.C. (2007) The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 702-713.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673–751.

Milbury, P.E., Cao, G., Prior, R.L., Blumberg, J. (2002) Bioavailablility of elderberry anthocyanins. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 997–1006.

Mokni, M., Hamlaoui-Guesmi, S., Amri, M., Marzouki, L., Limam, F., Aouani, E. (2012) Grape Seed and Skin Extract Protects against Acute Chemotherapy Toxicity induced by Doxorubicin in Rat Heart. *Cardiovasc. Toxicol.* **12**, 158-165.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*. **72**, 145-171.

Ovando, A.C., Hernandez, L.P., Hernandez, E.P., Rodriguez, J.A., Galan-Vidal, C.A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113**, 859-871.

Owen, J.B., Butterfield, D.A. (2010) Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. U: *Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging,* 2.izd. (Bross, P., Gregersen, N., ured.), Humana Press, 269-277.

Padney, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidans in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* **2**, 270-278.

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. (2003) The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett* **544**, 210–213.

Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., Stockley, C.S. (2013) The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**, 483–508.

Prior, R.L., Wu, X. (2006) Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Res.* **40**, 1014–1028.

Radovanović, V. (1986) *Tehnologija vina*, **2.** izd. Građevinska knjiga, Beograd.

Rahman, M.M., Ichiyanagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y., Konishi, T. (2006) Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radical Res.* **40**, 993–1002.

Ramirez-Tortosa, C., Andersen, Ø.M. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical. Bio.* **31**, 1033–1037.

Rendeiro, C., Guerreiro, J.D.T., Williams, C.M., Spencer, J.P.E. (2012) Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. *Proc. Nutr. Soc.* **71**, 246–262.

Riso, P., Visoli, F., Gardana, C., Grande, S., Brusamolino, A., Galvano, F. (2005) Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 941-947.

Rodriguez, M.R., Romero Peces, R., Chacon Vozmediano, J.L., Martinez Gascuena, J., Garcia Romero, E. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis Vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687-693.

Rossetto, M., Vanzani, P., Lunelli, M., Scarpa, M., Mattivi, F., Rigo, A. (2007) Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates. *Free Radical Res.* **41**, 854–859.

Rossetto, M., Vanzani, P., Mattivi, F., Lunelli, M., Scarpa, M., Rigo, A. (2002) Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Arch. Biochem. Biophys.* **408**, 239–245.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005) Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 287-306.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**, 2073–2085.

Selma, M.V., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *J.Agr. Food Chem.* **57**, 6485-6501.

Serra, A., Maciŕa, A., Romero, M.P., Pinol, C., Motilv M.J. (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **879**, 1519–1528.

Shih, P.H., Yeh, C.T., Yen, G.C. (2005) Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 1557–1566.

Shivashankara, K.S., Acharya, S.N. (2010) Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. *Open Nutraceuticals J.* **3**, 227-241.

Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Carey, A.N., Vinqvist-Tymchuk, M., McDonald, J., Joseph, J.A. (2009) Plum juice, but not dried plum powder, is effective in mitigating cognitive deficits in aged rats. *Nutrition* **25**, 567–573.

Slimestad, R., Fossen, T., Vagen, I.M. (2007) Onions: A source of unique dietary flavonoids. *J.Agr. Food Chem.* **55**, 10067-10080.

Spencer, J.P. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **133**, 3255-3261.

Spencer, J.P. (2010) The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br. J. Nutr.* **104**, 40–47.

Stalmach, A., Edwards, C.A., Wightman, J.D., Crozier, A.(2012) Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly)phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 497-509.

Steffen, Y., Gruber, C., Schewe, T., Sies, H. (2008) Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **469**, 209–219.

Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O. (2003) Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* **133**, 4178-4182.

Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O. (2005) Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney and brain. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3902-3908.

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.

Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D.P., Steward, W.P., Gescher, A.J. (2009) Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**, 201–211.

Tian, O.G., Giusti, M.M., Stoner, G.D., Schwartz, S.J. (2006) Urinary excretion of black raspberry (Rubus occidentalis) anthocyanins and their metabolites. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 1467-1472.

Toufektsian, M., Lorgeril, M.D., Nagy, N. (2008) Chronic dietary intake of plant derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J. Nutr.* **138**, 747–752.

Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.

Tsao, R., McCallum, J. (2009) Chemistry of flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability (De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzales-Aguilar, G., ured.), *Blackwell Publishing*, Ames, 131-153.

Tsuda, T. (2008) Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 642–646.

Tsuda, T. (2012) Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 159–170.

Vanzo, A., Scholz, M., Gasperotti, M., Tramer, F., Passamonti, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F. (2013) Metabonomic investigation of rat tissues following intravenous administration of cyanidin 3-glucoside at a physiologically relevant dose. *Metabolomics* **9**, 88–100.

Vanzo, A., Vrhovsek, U., Tramer, F., Mattivi, F., Passamonti, S. (2011) Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. *J. Natl. Prod.* **74**, 1049–54.

Verstraeten, S., Fraga, C., Oteiza, P. (2010) Flavonoids-membrane interactions: Consequences for biological actions. U: *Plant phenolics and human health* (Fraga, C., ured.), John Wiley & Sons Inc., 107-136.

Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., Fogliano, V. (2007) Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J. Nutr.* **137**, 2043–2048.

Walton, M.C., McGhie, T.K., Reynolds, G.W., Hendriks, W.H. (2006) The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4913–4920.

Wang, L.S., Stoner, G.D. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* **269**, 281-290.

Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G. (2006) An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy proband. *Biotechnol. J.* **1**, 388–397.

Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A., Kay, C. (2009) Anthocyanin stability and recover: Implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 5271-5278.

Wrolstad, R.E. (2004) Anthocyanin Pigments - Bioactivity and Coloring Properties *J. Food Sci.* **69**, 419-425.

Wu, X.L., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2006) Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4069–4075.

Wu, X.L., Pittman, H.E., Mckay, S., Prior, R.L. (2005) Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *J. Nutr.* **135**, 2417-2424.

Yang, C., Chen, L., Lee, M., Balentine, D. (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Biomarkers Prevent.* **7**, 351–354.

Yang, M., Koo, S.I., Song, W.O., Chun, O.K. (2011) Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Curr. Med. Chem.* **18**, 291–300.

Yeh, C.T., Yen, G.C. (2006) Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistanceassociated protein 3 mRNA expression. *J. Nutr*. **139**, 11–15.

Youdim, K.A., Martin, A., Joseph, J.A. (2000) Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 51–60.

Young, J.F., Dragsted L.O., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Hansen M., Sandstrom B. (2000) The effect of grape-skin extract on oxidative status. *Br. J. Nutr*. **84**, 505–13.

Zamora-Ros, R., Agudo, A., Lujan-Barroso, L., Romieu, I., Ferrari, P., Knaze, V., Bueno-de-Mesquita, H.B., Leenders, M., Travis, R.C., Navarro, C., Sánchez-Cantalejo, E., Slimani, N., Scalbert, A., Fedirko, V., Hjartåker, A., Engeset, D., Skeie, G., Boeing, H., Förster, J., Li, K., Teucher, B., Agnoli, C., Tumino, R., Mattiello, A., Saieva, C., Johansson, I., Stenling, R., Redondo, M.L., Wallström, P., Ericson, U., Khaw, K., Mulligan, A., Trichopoulou, A., Dilis, V., Katsoulis, M., Peeters, P.H.M., Igali, L., Tjønneland, A., Halkjær, J., Touillaud, M., Perquier, F., Fagherazzi, G., Amiano, P., Ardanaz, E., Bredsdorff, L., Overvad, K., Ricceri, F., Riboli, E., González, C. (2012) Dietary flavonoid and lignin intake and gastric adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 1398-1408.

Zarić, M., Mitrović, M., Nikolić, I., Popović, S., Đurđević, P., Baskić, D., Zelen, I. (2011) Ispitivanje aktivnosti superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze u plazmi i lizatima limfocita oboljelih od kronične limfocitne leukemije. *Med. čas.* **45**, 9-16.