



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Milica S. Milutinović

**HEMIJSKA ANALIZA I FARMAKOLOŠKI
EFEKTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA
ARONIJE, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Milica S. Milutinović

**CHEMICAL ANALYSIS AND
PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF
CHOKEBERRY FRUIT EXTRACTS AND
JUICE, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2020.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

Prof. dr Dušanka Kitić, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Nišu

Naslov:

**HEMIJSKA ANALIZA I FARMAKOLOŠKI EFEKTI
EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE, *Aronia melanocarpa*
(Michx.) Elliott**

Rezime:

Cilj istraživanja u okviru doktorske disertacije jeste definisanje hemijskog sastava i ispitivanje potencijalnih farmakoloških efekata ekstrakata i soka ploda biljne vrste *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott (aronija). Plodovi aronije poslednjih godina su u fokusu naučnih istraživanja zbog brojnih farmakoloških efekata koje ispoljavaju, a koji su posledica visokog sadržaja fenolnih jedinjenja, pre svega antocijana.

Za potrebe eksperimenta, pripremljena su tri različita uzorka, sok od aronije (AS), ekstrakt ploda aronije (AE), kao i ekstrakt plodova preostalih nakon ceđenja soka (AOE). Za ekstrakciju biljnog materijala korišćena je metoda maceracije sa 50% etanolom. Nakon ekstrahovanja, uzorci su liofilizovani, i hemijski okarakterisani primenom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC). Procenjivana je antioksidativna aktivnost pomoću dve *in vitro* metode, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) i β -karoten-linolna kiselina test. Antimikrobna aktivnost uzoraka ispitivana je na na tipskim laboratorijskim sojevima bakterija i gljiva pomoću mikrodilucione metode. Spazmolitička aktivnost ekstrakata i soka aronije ispitivana na spontanim i indukovanim kontrakcijama izolovanog ileuma, dok su vazorelaksantni efekti procenjivani na izolovanoj aorti pacova. Protektivni efekti preparata aronije kod cisplatinom indukovanih oštećenja bubrega i jetre pacova procenjivani su na osnovu vrednosti biohemijskih, antioksidativnih i inflamatornih parametara u krvi i tkivima, kao i histopatoloških analiza tkiva.

Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja i antocijana određen je u AOE. HPLC analiza je pokazala da je najzastupljeniji cijanidin-3-*O*-galaktozid. Ekstrakti i sok aronije bili su potentni antioksidansi *in vitro*. Ispitivani preparati ispoljili su inhibitornu aktivnost na rast korišćenih mikrobioloških sojeva. Gram (+) bakterije bile su nešto osetljivije u odnosu na Gram (-) bakterije i gljivu. Preparati su dozno-zavisno inhibirali spontane i indukovane kontrakcije ileuma i aorte pacova, sa značajnom razlikom u efektima ekstrakata i soka koja je posledica njihovog hemijskog sastava. Ispitivani preparati aronije mogu ublažiti oštećenja bubrega i jetre koja su posledica nefrotoksičnosti i hepatotoksičnosti cisplatina, a protektivni efekti su posledica antioksidativnog i antiinflamatornog efekta u plazmi i tkivima.

Rezultati istraživanja naučno su potvrdili lekovitost plodova aronije i njenu potencijanu primenu u savremenoj fitoterapiji. Ove farmakološke efekte neophodno je potvrditi relevantnim kliničkim studijama.

Naučna oblast:

Farmaceutske nauke

Naučna
disciplina:

Farmakognozija

Ključne reči:

Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott, ekstrakti, sok, fenoli, antocijani, proantocijanidini, flavonoidi, antioksidativna aktivnost, antimikrobna

aktivnost, spazmolitička aktivnost, vazorelaksantna aktivnost,
nefroprotektivna aktivnost, hepatoprotektivna aktivnost.

UDK: **634.74:615.322:543.6(043.3)**

CERIF
klasifikacija: **B 740**

Tip licence
Kreativne
zajednice: **CC BY-NC-ND**

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Dr. Dušanka Kitić, full professor, Faculty of Medicine, University of Niš

Title:

Chemical Analysis and Pharmacological Effects of Chokeberry Fruit Extracts and Juice, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott

Abstract:

The aim of the doctoral dissertation is to define the chemical composition and to examine the potential pharmacological effects of the chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) extracts and juice. In recent years, chokeberry fruits have been in the focus of scientific research because of their numerous pharmacological effects due to the high content of phenolic compounds, especially anthocyanins.

For the purpose of the experiment, three different samples were prepared, chokeberry juice (AS), fruit extract (AE), as well as a waste extract (AOE). A maceration method with 50% ethanol was used for the plant material extraction. After the extraction, the samples were lyophilized and chemically characterized using high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was evaluated using two *in vitro* methods, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and β -carotene-linoleic acid assay. The antimicrobial activity of the samples was tested against bacterial and fungal laboratory strains using a micro-dilution method. The spasmolytic activity of chokeberry extracts and juice were examined on spontaneous and induced contractions of the isolated ileum, while vasorelaxant effects were evaluated on the isolated rat aorta. The protective effects of the chokeberry preparation in the cisplatin-induced rat kidney and liver damage were evaluated by the values of biochemical, antioxidant and inflammatory parameters in blood and tissues, as well as by the histopathological analyses of the kidney and liver tissue.

The highest content of phenolic compounds and anthocyanins was determined in AOE. HPLC analysis showed that cyanidin-3-*O*-galactoside was the most abundant compound. Chokeberry extracts and juice were potent antioxidants *in vitro*. The investigated preparations exhibited inhibitory activity on the growth of the used microbial strains. Gram (+) bacteria were slightly more sensitive than Gram (-) bacteria and fungus. The preparations dose-dependently inhibited spontaneous and induced contractions of the rat ileum and aorta, with a significant difference in the effects of extracts and juice due to their chemical composition. The chokeberry preparations could alleviate the kidney and liver damage caused by the nephrotoxicity and hepatotoxicity of cisplatin, while the protective effects resulted from their antioxidant and anti-inflammatory activity in plasma and tissues.

The results of the research have scientifically confirmed the pharmacological use of the chokeberry fruit and its potential application in modern phytotherapy. These pharmacological effects need to be confirmed by relevant clinical studies.

Scientific Field:
Scientific
Discipline:

Pharmaceutical sciences

Pharmacognosy

Key Words:

Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott, extracts, juice, phenols, anthocyanins, proanthocyanidins, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, spasmolytic activity, vasorelaxant activity, nephroprotective activity, hepatoprotective activity.

UDC:

634.74:615.322:543.6(043.3)

CERIF
Classification:

B 740

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

ZAHVALNOST

Želela bih da izrazim svoju najiskreniju zahvalnost svima koji su na bilo koji način učestvovali i podržali izradu moje doktorske disertacije:

Prof. dr Dušanki Kitić, mentoru, zahvaljujem se na podršci i poverenju, korisnim profesionalnim savetima i sugestijama tokom dugogodišnjeg zajedničkog rada, bez kojih izrada doktorske disertacije ne bi bila moguća.

Prof. dr Tatjani Cvetković, za nesebičnu pomoć, poverenje i podršku, znanje i korisne savete tokom eksperimentalnog rada i biohemijskih analiza.

Prof. dr Suzani Branković, za sveobuhvatnu pomoć i korisne savete pri proceni spazmolitičkih aktivnosti.

Prof. dr Ljubinki Janković Veličković na velikoj pomoći oko patohistološke analize tkiva tokom eksperimentalnog rada.

Naučnom savetniku dr Katarini Šavikin, sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja "dr Josif Pančić", na podršci, saradnji i brojnim korisnim sugestijama tokom istraživanja.

Dr Nadi Čujić Nikolić, na nesebičnoj pomoći, podršci i korisnim sugestijama tokom izrade i karakterizacije ekstrakata i pisanja teze.

Dr spec. Ivani Đorđević, na prijateljstvu, podršci i neprocenjivoj pomoći oko patohistološke analize tkiva tokom eksperimentalnog rada.

Prof. dr Tatjani Mihajilov-Krstev, sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, za nesebičnu pomoć kod ispitivanja antimikrobne aktivnosti.

Prof. dr Bojanu Zlatkoviću, sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, na stručnoj pomoći vezanoj za botanički opis biljne vrste.

Prof. dr Stevi Najmanu, na znanju i korisnim savetima u radu sa eksperimentalnim životinjama.

Dragim kolegicama dr Milici Kostić, dr Bojani Miladinović, dr Dragani Pavlović i dr Jeleni Matejić, na pomoći, korisnim savetima, podršci i prijateljstvu.

Tanji Prokić, Dragani Janković i Vesni Krstić, na velikoj pomoći tokom eksperimentalnog rada.

Koleginici mr ph Ani Spasić, na nesebičnoj pomoći pri laboratorijskom radu.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama iz Vivarijuma Naučno - istraživačkog Centra za Biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, kao i svim sestrama i tehničarima iz Biohemijske laboratorije Klinike za nefrologiju KC Niš, na pomoći u eksperimentalnom i laboratorijskom radu.

Svojim prijateljima, na velikoj podršci.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, majci, ocu i bratu, zato što su verovali u mene, podržavali me i bili moj oslonac.

Sva istraživanja u okviru doktorske disertacije su finansijski podržana i realizovana zahvaljujući projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj III 46013 i III 41018.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	2
2. OPŠTI DEO	3
2.1. BOTANIČKE KARAKTERISTIKE BILJNE VRSTE <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliot	3
2.2. HEMIJSKI SASTAV PLODA ARONIJE.....	5
2.2.1. Polifenoli.....	5
2.2.2. Fenolne kiseline.....	9
2.2.3. Flavonoidi	10
2.2.4. Antocijani.....	15
2.2.5. Proantocijanidini	19
2.3. DOSADAŠNJA ISPITIVANJA FARMAKOLOŠKIH AKTIVNOSTI ARONIJE	21
2.3.1. Antioksidativna aktivnost	22
2.3.1.1. Oksidativni stres i antioksidanti	22
2.3.1.2. Antioksidativni efekti ploda aronije.....	25
2.3.2. Antiinflamatorna aktivnost.....	27
2.3.2.1. Inflamacija.....	27
2.3.2.2. Antiinflamatorni efekti ploda aronije.....	29
2.3.3. Antimikrobna aktivnost	30
2.3.3.1. Mikroorganizmi.....	30
2.3.3.2. Antimikrobno dejstvo ploda aronije.....	30
2.3.4. Kardioprotektivna aktivnost.....	32
2.3.5. Gastroprotektivna aktivnost	34
2.3.6. Antidijabetogena aktivnost.....	35
2.3.7. Antikancerogena aktivnost.....	36
2.4. CISPLATIN KAO CITOSTATSKI LEK	39
2.4.1. Nefrotoksičnost cisplatina.....	42
2.4.2. Hepatotoksičnost cisplatina.....	46
3. MATERIJALI I METODE	48
3.1. BILJNI MATERIJAL.....	48
3.1.1. Priprema ekstrakata i soka aronije.....	48
3.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE.....	49
3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	49
3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana	50
3.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih proantocijanidina	50
3.2.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	50
3.2.5. Kvantitativna analiza antocijana i flavonoida (HPLC analiza)	51
3.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE.....	52
3.3.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti u DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) sistemu..	52
3.3.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti u β -karoten-linolna kiselina sistemu	52
3.4. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE	53

3.4.1.	Mikrobiološki sojevi.....	53
3.4.2.	Mikrodiluciona metoda.....	54
3.5.	ISPITIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA	55
3.5.1.	Eksperimentalne životinje	55
3.5.2.	Izolovanje i priprema ileuma pacova	55
3.5.3.	Ispitivanje uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida na spontane kontrakcije ileuma pacova	56
3.5.4.	Ispitivanje uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova	56
3.5.5.	Ispitivanje uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida na KCl indukovane kontrakcije ileuma pacova	57
3.5.6.	Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na CaCl ₂ indukovane kontrakcije ileuma pacova	57
3.5.7.	Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na BaCl ₂ indukovane kontrakcije ileuma pacova	58
3.5.8.	Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova.....	58
3.5.9.	Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na kontrakcije ileuma pacova u prisustvu blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME).....	58
3.6.	ISPITIVANJE VAZORELAKSANTNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOJ AORTI PACOVA.....	59
3.6.1.	Eksperimentalne životinje	59
3.6.2.	Izolovanje i priprema torakalne aorte pacova	59
3.6.3.	Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka ploda aronije na kontraktilnost aorte pacova.....	60
3.7.	ISPITIVANJE PROTEKTIVNIH EFEKATA EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE KOD PACOVA SA AKUTNIM OŠTEĆENJEM BUBREGA I JETRE IZAZVANIM CISPLATINOM.....	60
3.7.1.	Biohemijske analize	62
3.7.1.1.	<i>Određivanje koncentracije TBARS u homogenatima tkiva bubrega i jetre</i>	<i>62</i>
3.7.1.2.	<i>Određivanje koncentracije TBARS u eritrocitima</i>	<i>63</i>
3.7.1.3.	<i>Određivanje aktivnosti katalaze u homogenatima tkiva bubrega i jetre</i>	<i>63</i>
3.7.1.4.	<i>Određivanje aktivnosti katalaze u plazmi</i>	<i>63</i>
3.7.1.5.	<i>Određivanje koncentracije redukovanog glutationa u homogenatima tkiva bubrega i jetre... ..</i>	<i>64</i>
3.7.1.6.	<i>Određivanje koncentracije interleukina-6, interleukina-1β i faktora nekroze tumora-α u plazmi i homogenatima tkiva bubrega i jetre.....</i>	<i>64</i>
3.7.2.	Histopatološke analize tkiva pacova	64
3.8.	STATISTIČKA ANALIZA.....	65
4.	REZULTATI	66
4.1.	PRINOSI EKSTRAKCIJE.....	66
4.2.	HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE.....	66
4.3.	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE.....	68
4.4.	ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE.....	69
4.5.	SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA.....	72
4.5.1.	Uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida na spontane kontrakcije ileuma pacova.....	72
4.5.2.	Uticaj ekstrakata, soka i cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova	73

4.5.3. Uticaj ekstrakata, soka i cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida na KCl indukovane kontrakcije ileuma pacova	76
4.5.4. Uticaj ekstrakata i soka na CaCl ₂ indukovane kontrakcije ileuma pacova	77
4.5.5. Uticaj ekstrakata i soka na BaCl ₂ indukovane kontrakcije ileuma pacova	79
4.5.6. Uticaj ekstrakata i soka na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova	81
4.5.7. Uticaj ekstrakata i soka na kontrakcije ileuma pacova u prisustvu blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME).....	83
4.6. VAZORELAKSANTNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE NA IZOLOVANOJ AORTI PACOVA.....	85
4.7. PROTEKTIVNI EFEKTI EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE KOD PACOVA SA SA AKUTNIM OŠTEĆENJEM BUBREGA I JETRE IZAZVANIM CISPLATINOM	90
4.7.1. Uticaj ekstrakata i soka aronije na biohemijske markere oštećenja bubrega i jetre u plazmi pacova	90
4.7.2. Uticaj ekstrakata i soka aronije na aktivnost katalaze u plazmi i koncentraciju TBARS u eritrocitima pacova.....	93
4.7.3. Uticaj ekstrakata i soka aronije na koncentraciju inflamatornih markera (TNF- α i IL-6) u plazmi pacova sa cisplatinom-indukovanim oštećenjima	94
4.7.4. Uticaj ekstrakata i soka aronije na markere oksidativnog oštećenja i lipiidne peroksidacije u tkivu bubrega pacova	95
4.7.5. Uticaj ekstrakata i soka aronije na koncentraciju inflamatornih markera (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) u tkivu bubrega pacova	97
4.7.6. Uticaj ekstrakata i soka aronije na markere oksidativnog oštećenja i lipiidne peroksidacije u tkivu jetre pacova	99
4.7.7. Uticaj ekstrakata i soka aronije na koncentraciju inflamatornih markera (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) u tkivu jetre pacova	101
4.7.8. Histopatološke analize tkiva pacova	103
5. DISKUSIJA	110
5.1. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE	110
5.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE	115
5.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE.....	118
5.4. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA.....	122
5.5. VAZORELAKSANTNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOJ AORTI PACOVA	129
5.6. PROTEKTIVNI EFEKTI EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE KOD PACOVA SA AKUTNIM OŠTEĆENJEM BUBREGA I JETRE IZAZVANIM CISPLATINOM	132
5.6.1. Nefrotoksičnost cisplatina – protektivni efekti ekstrakata i soka aronije	132
5.6.2. Hepatotoksičnost cisplatina – protektivni efekti ekstrakata i soka aronije	141
6. ZAKLJUČAK.....	146
7. LITERATURA	150
8. PRILOG.....	184
BIOGRAFIJA	187

LISTA SKRAĆENICA

ABI – akutna bubrežna insuficijencija	eNOS – eng. „endothelial nitric oxide synthase“ (endotelna azot oksid sinataza)
Ach – acetilholin	ER – endoplazmatski retikulum
AE – ekstrakt ploda aronije	FE - fenilefrin
AK – askorbinska kiselina	FDA – eng. „Food and Drug Administration“ (Uprava za hranu i lekove)
ANOVA – analiza varijanse	GAE – ekvivalent galne kiseline
ALT – alanin-amino-transferaza	GIT – gastrointestinalni trakt
AOE – ekstrakt ostatka ploda nakon ceđenja soka	GGT - γ -glutamil-transpeptidaze
AS – sok aronije	GSH –redukovani glutation
AST – aspartat-amino-transferaza	GPx – glutation-peroksidaza
ATCC – American type culture collection	GSSH – glutation-disulfid
ATP – adenzin trifosfat	GSR – glutation-reduktaza
BHA – butilhidroksianizol	HAT – hydrogen atom transfer
BHT – butilhidroksitoluen	HBI – hronična bubrežna insuficijencija
BKL – β -karoten/linolna kiselina	HbA1c – glikozilisani hemoglobin
BUN - eng. „blood urea nitrogen“	HDL – lipoprotein visoke gustine
cAMP – ciklični adenzin monofosfat	H&E – hematoksilin-eozinHPLC – eng. „high performance liquid chromatography“ (tečna hromatografija visokih performansi)
cGMP – ciklični guanozin monofosfat	IARC – eng. „International Agency for Research on Cancer“
CIS - cisplatin	IC ₅₀ – koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% slobodnih radikala
CIS-DDp – <i>cis</i> diamino dihlor platina	Ig – imunoglobulin
CFU – eng. „colony forming units“ (jedinica formiranja kolonija bakterija)	IL – interleukin
CLSI – eng. „Clinical & laboratory standards institute“	IP3 – inozitol trifosfat
Ctrl - bakar-transporter	IP3R – inozitol trifosfat receptor
CRE - kreatinin	KAT - katalaza
CYP - citohrom	KVS – kardiovaskularni sistem
DAD – "diode array" detektor	LD ₅₀ – srednja letalna doza
DG – diacilglicerol	LDL – lipoprotein niske gustine
DMSO – dimetilsulfoksid	L-NAME – N ω -nitro-L-arginin metil estar
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina	MAPS – mitogen-aktivirana protein kinaza
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil	MBC – minimalna bakterioidna koncentracija
DTNB - 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina	MDA – malonil-dialdehid
EC ₅₀ – efektivna koncentracija ekstrakta koja ispoljava 50% aktivnosti	
Na ₂ -EDTA – dinatrijum-etilendiamintetraacetat	
ELISA – eng. „enzyme-linked immunosorbent assay“	

MFC – minimalna fungicidna koncentracija
MHB – Mueller-Hinton bujon
MIC – minimalna inhibitorna koncentracija
MLC – miozin lakog lanca
MLCK – kinaza lakog lanca miozina
MRSA – meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF- κ B – nuklearni faktora *kap*B
NOS – azot oksid sinataza
OCT2 - organski katjonski transporter u bubrezima
OPC – oligomerni proantocijanidini
PAL – L-fenilalanin-amonijum-lijaza
PGE2 – prostaglandin E2
Ph. Eur. 9,0 – Deveta Evropska farmakopeja
Ph. Jug. IV – Četvrta Jugoslovenska farmakopeja
PAS - perjodna kiselina-Šifovo bojenje
PKA – protein kinaza A
PKC – protein kinaza C
PKG - protein kinaza G
PLC – fosfolipaza C
r – Pirsonov koeficijent korelacije
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne kiseonične vrste
SET – eng. „single electron transfer”
SDB – saburo-dekstrozni bujon
SOD –superoksid-dizmutaza
SR – sarkoplazmatski retikulum
SZO – Svetska Zdravstvena Organizacija
TBA – tiobarbiturna kiselina
TBARS – tiobarbiturna kiselina reaktivne supstance
TCA – trihlor sirćetna kiselina
TMC – eng. „transision metals chelation”
TNF- α – faktor tumorske nekroze *alfa*
TT – telesna težina
UV – ultraljubičast
UTI – infekcija mokraćnih puteva
v/v – volumen/volumen
 α -TOK – α -tokoferol

INDEKS SLIKA

Slika 1.1a.	Biljna vrsta <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott, opšti izgled i cvast	4
Slika 1.1b.	Plodovi <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott.....	4
Slika 2.2.	Hlorogenska i neohlorogenska kiselina – stukturne formule.....	10
Slika 2.3.	Osnovna hemijska struktura flavonoida.	10
Slika 2.4.	Metabolizam flavonoida (Thilakarathna i Rupasinge, 2013).	14
Slika 2.5.	Hemijaska formula kvercetina	15
Slika 2.6.	Osnovne strukture antocijanidina (preuzeto i adaptirano od Fang, 2014).....	16
Slika 2.7.	Potencijalni putevi apsorpcije, metabolizma i eliminacije antocijana u organizmu (NGLT – natrijum-glukoza transportni protein) (Cisowska i sar, 2011).....	18
Slika 2.8.	Hemijaska formula cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida	19
Slika 2.9.	Hemijaska formula (-) epikatehina i struktura proantocijanidina B-tipa	20
Slika 2.10.	Enzimski antioksidanti i njihovi reakcioni mehanizmi	24
Slika 2.11.	Hemijaska formula cisplatina	40
Slika 2.12.	Aktivacija cisplatina i indukcija oštećenja DNK. A) Proces aktiviranja cisplatina dešava se razmenom jednog ili dva molekula hlorida za molekule vode (monohidrat i dihidrat). B) Cisplatin može formirati kovalentne veze sa DNK. Procenti predstavljaju učestalost svake vrste oštećenja DNK izazvanih cisplatinom. Preuzeto i adaptirano od Rocha i sar, (2018).	41
Slika 3.1.	Liofilozovani uzorci dobijeni od plodova aronije (<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott), korišćeni u istraživanju.....	49
Slika 4.5.1.	Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a), cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida i papaverina (b) na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Svaka tačka predstavlja srednje procentualne vrednosti kontrakcija u odnosu na spontane kontrakcije ileuma u Tirodovom rastvoru (kontrola) ± SD, za šest segmenata. (Studentov t-test, *p<0,05, **p<0,01).....	73
Slika 4.5.2.	Relaksantni efekti AE (a), AOE (b), AS (c), cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida i atropina (d) na acetilholinom-indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima ± SD, za šest segmenata (Studentov t-test, *p<0,05, **p<0,01).	75
Slika 4.5.3.	Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a), cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozida i verapamila (b) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane KCl. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima ± SD, za šest segmenata (Studentov t-test, *p<0,05, **p<0,01).	76
Slika 4.5.4.	Relaksirantni efekti AE (a), AOE (b), AS (c) i verapamila (d) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izndukovane CaCl ₂ . Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora ± SD, za šest segmenata (Studentov t-test, *p<0,05, **p<0,01).....	78
Slika 4.5.5.	Relaksantni efekti AE (a), AOE (b) i AS (c) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane BaCl ₂ . Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u	

	procentima maksimalnog odgovora \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	80
Slika 4.5.6.	Relaksantni efekti AE (a), AOE (b) i AS (c) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovanih histaminom. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	82
Slika 4.5.7.	Uticaj AE (a), AOE (b) i AS (c) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova u prisustvu L-NAME. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD, za šest segmenata.	84
Slika 4.6.1.	Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a) i verapamila (b) na kontrakcije izolovane aorte pacova indukovane KCl. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	86
Slika 4.6.2.	Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a) i verapamila (b) na kontrakcije izolovane aorte pacova indukovane FE. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	87
Slika 4.6.2.	Relaksantni efekti AE (a), AOE (b), AS (c) na kontrakcije izolovane aorte pacova u prisustvu L-NAME. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).	89
Slika 4.7.1.	Koncentracije CRE, BUN, AST i ALT u plazmi pacova.	92
Slika 4.7.2.	Aktivnost KAT u plazmi i nivoi TBARS u eritrocitima pacova.	93
Slika 4.7.3.	Nivoi citokina (TNF- α i IL-6) u plazmi pacova.	94
Slika 4.7.4.	Nivoi TBARS, GSH i aktivnost KAT u tkivu bubrega pacova.	96
Slika 4.7.5.	Nivoi citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) u tkivu bubrega pacova.	98
Slika 4.7.6.	Nivoi TBARS, GSH i aktivnost KAT u tkivu jetre pacova.	100
Slika 4.7.7.	Nivoi citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) u tkivu jetre pacova.	102
Slika 4.7.8.1.	Morfološke promene u tkivu bubrega pacova (H&E, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).	104
Slika 4.7.8.2.	Morfološke promene u tkivu bubrega pacova (PAS, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).	105
Slika 4.7.8.3.	Morfološke promene u tkivu jetre pacova (H&E, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).	108

Slika 4.7.8.4.	Morfološke promene u tkivu jetre pacova (PAS, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).	109
Slika 5.4.	Kontrola funkcije gastrointestinalnog sistema (preuzeto i adaptirano od Sanders i saradnika, 2012).	126
Slika 5.5.	Kontrakcija glatkih mišića krvnih sudova (preuzeto i adaptirano od Palacios i saradnika, 2013)	131
Slika 8.1.	HPLC-DAD hromatogram ekstrakta AE (520 nm) – identifikacija pojedinačnih antocijana; 1- cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid; 2- cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid; 3- cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid.....	184
Slika 8.2.	HPLC-DAD hromatogram ekstrakta AE (350 nm) – identifikacija pojedinačnih flavonoida i hlorogenske kiseline; 1- hlorogenska hiselina; 2- rutin; 3- hiperozid; 4-izokvercitrin.	184
Slika 8.3.	HPLC-DAD hromatogram ekstrakta ostatka nakon ceđenja soka AOE (520 nm) – identifikacija pojedinačnih antocijana; 1 - cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid; 2- cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid; 3- cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid.	185
Slika 8.4.	HPLC-DAD hromatogram ekstrakta ostatka nakon ceđenja soka AOE (350 nm) – identifikacija pojedinačnih flavonoida i hlorogenske kiseline; 1- hlorogenska hiselina; 2- rutin; 3- hiperozid; 4-izokvercitrin.	185
Slika 8.5.	HPLC-DAD hromatogram soka AS (520 nm) – identifikacija pojedinačnih antocijana; 1 - cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid; 2- cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid; 3- cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid.....	186
Slika 8.6.	HPLC-DAD hromatogram soka AS (350 nm) – identifikacija pojedinačnih flavonoida i hlorogenske kiseline; 1- hlorogenska hiselina; 2- rutin; 3- hiperozid; 4-izokvercitrin.	186

INDEKS ŠEMA

Šema 2.1.	Podela antioksidanata (Carocho i sar, 2013)	25
Šema 2.2.	Patofiziološki mehanizmi kod cisplatinom indukovane nefrotoksičnosti (preuzeto i adaptorano od Pabla i Dong, 2008).	44

INDEKS TABELA

Tabela 2.1.	Klase biljnih fenola (Kostić, 2019; Atkinson, 2018; Edwards, 2014; Giada, 2013; Vermerris i Nicholson, 2008; Kovačević, 2002).	6
Tabela 2.2.	Podela flavonoida (preuzeto i adaptirano od Egert i sar, 2011).	11
Tabela 4.2.1.	Sadržaj ukupnih fenola, antocijana, flavonoida i proantocijanidina u ekstraktu (AE), ekstraktu ostatka (AOE) i soku (AS) ploda aronije.....	66
Tabela 4.2.2.	HPLC-DAD kvantifikacija jedinjenja u ekstraktu (AE), ekstrakt ostatka (AOE) i soku (AS) ploda aronije.	67

Tabela 4.3.1.	Antioksidativna aktivnost ekstrakta, ekstrakta ostatka i soka ploda aronije u 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) testu i β -karoten/linolna kiselina (BKL) testu.	68
Tabela 4.4.1.	Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije ekstrakata i soka aronije na bakterijske Gram (+) i Gram (-) sojeve i gljive.....	71
Table 4.5.1.	EC ₅₀ vrednosti spontanih i KCl-indukovanih kontrakcija za AE, AOE, AS cijanidin-3-O-galaktozid i papaverin/verapamil (pozitivna kontrola). Statistička značajnost utvrđena je ANOVA testom sa Tukey post-hoc analizom.	72
Table 4.6.1.	EC ₅₀ vrednosti KCl-indukovanih i FE-indukovanih kontrakcija za AE, AOE, AS i verapamil (pozitivna kontrola). Statistička značajnost utvrđena je ANOVA testom sa Tukey post-hoc analizom.	85
Tabela 4.7.8.1.	Morfološke promene u tkivu bubrega	103
Tabela 4.7.8.2.	Morfološke promene u tkivu jetre.....	107

1. UVOD

Terapijska svojstva biljaka od davnina su predmet proučavanja naučne i stručne javnosti u oblasti farmacije, medicine i njima srodnih nauka. Vekovima su ljudi različitih kultura širom sveta koristili proizvode na bazi lekovitog bilja za lečenje mnogih bolesti. Razvoj moderne farmaceutske industrije u prošlosti usko je povezan sa izolovanjem pojedinačnih aktivnih principa iz biljnog materijala, sa poznatim farmakološkim efektima, što je dovelo do razvoja brojnih lekova koji se i danas naširoko primenjuju u kliničkoj praksi (Li i Weng, 2017).

Prirodni proizvodi, koji se kao lekovita sredstva primenjuju milionima godina, odlikuju se jedinstvenom raznolikošću u hemijskom sastavu, što rezultira brojnim biološkim i farmakološkim aktivnostima koje ispoljavaju. Ovi proizvodi i danas predstavljaju veoma važne resurse za razvoj novih potentnih terapijskih supstanci (Yuan i sar, 2016).

Lekovi biljnog porekla u mnogim delovima sveta, a pre svega u nerazvijenim zemljama, imaju veliki terapijski značaj i samim tim su sve više u fokusu novijih farmaceutskih istraživanja. Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), 70 do 90% stanovništva zemalja u razvoju koristi biljne lekovite preparate u terapiji (Kostić, 2019).

Bobičasto voće predstavlja bogat izvor hranljivih materija i brojna epidemiološka istraživanja preporučuju korišćenje bobičastog voća u zdravoj (izbalansiranoj) ishrani. Sve se češće ovo voće naziva i „funkcionalnom hranom” jer je pokazano da može povoljno delovati na zdravlje i smanjiti rizik od nastanka brojnih hroničnih nezaraznih bolesti (Szajdek i Borowska, 2008). Smatra se da je bobičasto voće izvor bioaktivnih jedinjenja koja ispoljavaju brojna farmakološka dejstva, te se mogu primenjivati u prevenciji, ali i terapiji raznih bolesti. Poslednjih godina je povećana potrošnja ove vrste voća. Istraživanja ukazuju da povećani unos bobičastog voća može biti povezan sa smanjenom učestalošću poremećaja koji u svojoj patogenezi imaju oksidativni stres, uključujući kardiovaskularne poremećaje, karcinome i inflamatorne procese (Gomes-Rochette i sar, 2016; Olas, 2018).

Aronija (*Aronia melanocarpa*) se ubraja u grupu bobičastog voća, i ističe se svojim jakim antioksidativnim delovanjem. Antioksidativni efekti pripisuju se polifenolnim jedinjenjima koje aronija sadrži u visokom procentu, i smatra se da su ova jedinjenja u većoj ili manjoj meri odgovorna i za ostale farmakološke efekte koje ispoljava. Sa porastom incidence nastanka hroničnih nezaraznih bolesti i izloženošću ljudi brojnim prirodnim i sintetskim toksičnim materijama, veoma je važno pronaći efikasna sredstva za zaštitu

zdravlja. Do sada je pažnja naučnika, nutricionista i zdravstvenih profesionalaca bila usmerena na ulogu aronije i njenih proizvoda u promociji zdravlja. Mogućnost upotrebe aronije u prevenciji i smanjenju nastanka neželjenih efekata lekova i oštećenja izazvanih njihovom primenom malo je proučavana. Svakako je neophodno sprovesti detaljne eksperimentalne i kliničke studije u cilju potvrđivanja farmakoloških efekata i mogućnosti primene ploda aronije u terapiji i profilaksi (Borowska i Brzoska, 2016; Čujić, 2017). Danas su ova istraživanja veoma aktuelna.

1.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj planiranog istraživanja u okviru ove doktorske disertacije jeste definisanje hemijskog sastava i ispitivanje potencijalnih farmakoloških efekata ekstrakata i soka ploda biljne vrste *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott (aronija). Rezultati istraživanja naučno su potvrdili lekovitost plodova ove biljne vrste i potencijalnu primenu u terapiji i prevenciji. Ovim studijama razmatra se potencijalni doprinos aronije savremenoj fitoterapiji.

Specifični ciljevi doktorske disertacije bili su:

- ekstrakcija biljnog materijala i priprema soka plodova aronije
- određivanje ukupnih polifenola, flavonoida, antocijana i proantocijanidina u ekstraktima i soku
- hemijska karakterizacija ekstrakata i soka tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC)
- određivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata i soka
- određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i soka
- ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na spontane, acetilholinom, kalijum-hloridom, barijum-hloridom, kalcijum-hloridom i histaminom stimulisane kontrakcije glatke muskulature ileuma pacova
- ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na kontrakcije aorte pacova u prisustvu rastvora kalijum-hlorida, blokatora azot-oksida sinteze L-NG-Nitroarginin Metil Ester (L-NAME) i fenil-efrina
- ispitivanje protektivnih efekata ekstrakata i soka aronije kod pacova sa akutnim oštećenjem bubrega i jetre izazvanim citostatskim lekom cisplatinom.

2. OPŠTI DEO

2.1. BOTANIČKE KARAKTERISTIKE BILJNE VRSTE *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot

Aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, engl. *black chokeberry*, divlji ogrozd ili crna aronija) je biljna vrsta koja pripada porodici Rosaceae i potporodici Maloideae, a poreklom je iz istočnih delova Severne Amerike i Kanade (Seidemann, 1993). Porodica ruža (Rosaceae) obuhvata oko 3300 biljnih vrsta koje su rasprostranjene širom sveta, pre svega na severnoj zemljinoj hemisferi. Porodici Rosaceae pripadaju zeljaste biljke (jednogodišnje ili višegodišnje), žbunaste forme biljka i drveće (listopadno ili zimzeleno). Predstavnici ove porodice se karakterišu naizmeničnim, prostim ili složenim, listovima sa zaliscima, kao i cvetovima sa obično pentamerim perijantom. Odlikuju se horipetalnom i aktinomorfnom krunicom, andreceumom sa velikim brojem prašnika, i apokarpnim, sinkarpnim ili monokarpnim gineceumom. Takođe se odlikuju zbirnim plodom koji može biti koštunica ili pomum. Neke biljne vrste ove porodice imaju trnove formirane od izdanaka, ili one koji su nastali od epidermisa i subepidermalnog tkiva. U flori Republike Srbije zastupljeni su predstavnici iz 26 rodova (Jančić i Lakušić, 2017) porodice Rosaceae. Biljne vrste pomenute porodice značajne su kao voće, ukrasne ili lekovite biljke (ESCOP, 2003; Jančić i Lakušić, 2017). Porodica ruža obuhvata četiri potporodice: Spiraeoideae, Maloideae, Rosoideae i Prunoideae (Tatić i Blečić, 2002; Jančić i Lakušić, 2017). U skladu sa pojedinim sistemima klasifikacije navedene potporodice imaju status samostalnih porodica (Josifović, 1972).

Gajenje aronije u Evropi je počelo u prvoj polovini 20. veka, pre svega u Nemačkoj i Rusiji, a danas se plantažno gaji u Poljskoj, Češkoj, Slovačkoj, na severu Nemačke, Francuske i drugih zemalja. U zemljama Sovjetskog saveza, istočne Evrope i Skandinavije koristila se često za proizvodnju sokova, dzemova i vina, kao izvor prirodnih prehrambenih boja, ali i u biljnoj medicini kao prirodni antihipertenziv i anti-aterosklerotski lek (Jaroniewski, 1998; Domarew i sar, 2002). Osim toga, preparati aronije primenjivali su se u tretmanu ahlorhidrije (smanjenog lučenja hlorovodonične kiseline u želudcu), kod avitaminoza, kod pacijenata u rekonvalescentnom periodu i za lečenje hemoroida (Jaroniewski, 1998; Sarwa i Ciołkowska-Paluch, 1990).

Aronija je višegodišnja žbunasta biljka, visine 0,8 - 2 m sa tamnom golom ili skoro golom stabljikom prečnika oko 6 mm, sa 3 - 7 cm dugačkim objajastim glatkim listovima, abaksijalno (sa naličja) bledozelene boje, dok su adaksijalno (sa lica) listovi tamnozeleni i

sjajni, vremenom postaju grimizni. Cvetovi su sakupljeni u guste štitolike cvasti, slatkastog mirisa. Krunica se sastoji od 5 čašičnih listića, sa pet belih do rozikastih latica, žutih do purpurno crvenih antera. Semena su mnogobrojna, sitna, tamno braon boje. Plodovi su u slučaju crne aronije, tamno ljubičaste bobice, gole, kisele i nagorke, prečnika 1-1,5 cm. Biljka cveta u maju, dok plodovi sazrevaju rano, između jula i septembra (<http://www.efloras.org>; Kokotkiewicz i sar, 2010; Ara, 2002; Fan-Yung i Rechits, 1977).

Rod *Aronia* obuhvata dve biljne vrste, crna i crvena aronija, odnosno *A. melanocarpa* (eng. Black chokeberry, *Aronia noir*) i *A. arbutifolia* (L.) Persoon, (eng. Red chokeberry, *Aronia rouge*). *Aronia* × *prunifolia* (Marshall) Rehder je treća vrsta koja je hibridnog porekla, a smatra se da je nastala ukrštanjem dve prethodne vrste. U narodnoj medicine se najčešće koristi crna aronija upravo zbog visokog sadržaja biološki aktivnih jedinjenja i hranjivih sastojaka. Aronija se danas široko gaji pre svega zbog ploda koji se koristi u ishrani, kao svež ili prerađen, u blažim klimatskim uslovima. Karakteristično je da je ova biljka veoma otporna na hladnoću, može se prilagoditi uslovima koji nisu povoljni za gajenje drugog voća, čak i na i temperaturama do -45°C. Kod nas se može naći više od 50 godina, ali je tek poslednjih godina postala predmet interesovanja naučne i stručne javnosti i stoga se sve češće upotrebljava (Kokotkiewicz i sar, 2010; Čujić, 2017).



Slika 1.1a. Biljna vrsta *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, opšti izgled i cvast



Slika 1.1b. Plodovi *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott

2.2. HEMIJSKI SASTAV PLODA ARONIJE

Plodovi aronije bogati su polifenolnim jedinjenjima, među kojima su najzastupljeniji antocijani, proantocijanidini, fenolne kiseline i flavanoli (Ćujić, 2017; Bräunlich i sar, 2013a; Kulling i Rawel, 2008; Rugina i sar, 2012; Sueiro i sar, 2006). Osim polifenola, plodovi aronije sadrže i druga bioaktivna jedinjenja koje su zastupljene u manjem procentu: vitamini, minerali, karotenoidi, pektini, organske kiseline, proteini i ugljeni hidrati. Najznačajniji među ovim sastojcima jesu vitamini sa antioksidativnim delovanjem, vitamin C i E, karotenoidi i minerali kao što su jod, kalijum, kalcijum i magnezijum. Plodovi aronije takođe sadrže i dijetna vlakna (Borowska i Brzoska, 2016; Borycka and Stachowiak 2008; Borycka, 2012). Veoma visok sadržaj polifenola u plodovima aronije ukazuje na značajni antioksidativni potencijal ovog bobičastog voća. Hemijski sastav plodova aronije direktno je povezan sa njihovom biološkom aktivnošću i potencijalnom upotrebom u profilaksi i terapiji mnogih bolesti (Kulling i Rawel, 2008; Borowska i Brzoska, 2016).

2.2.1. Polifenoli

Značajnu grupu sekundarnih metabolita biljaka čine fenolna jedinjenja. Do sada je u različitim biljnim vrstama identifikovano više od 8000 fenolnih jedinjenja. Ova jedinjenja su izolovana u slobodnoj formi u manjoj meri, pretežno se izoluju kao suptituisani derivati, u formi konjugata, sa jednim ili više molekula šećera vezanih za hidroksilnu grupu, iako šećeri (mono i polisaharidi) mogu biti i direktno vezani za ugljenik aromatičnog prstena. Takođe se veoma često vezuju sa drugim jedinjenjima kao što su karboksilne i organske kiseline, amini, lipidi i drugi fenoli (Pietta, 2000; Pandey i Rizvi, 2009).

Fenolna jedinjenja mogu se na osnovu hemijske strukture definisati kao jedinjenja koja u svom sastavu sadrže aromatični prsten sa hidroksilnom grupom (fenoli) ili više hidroksilnih grupa (polifenoli), pri čemu mogu da sadrže i različite funkcionalne grupe u strukturi (glikozidi, estri, metil etri, itd.). Ovi sekundarni metaboliti biljaka najčešće se sintetizuju takozvanim putem šikimske kiseline (šikimsko-fenilpropanoidno-flavonoidnim putem), uglavnom iz cimetine kiseline koja se dobija iz fenilalanina u prisustvu L-fenilalanin amonijum-liaze (PAL) (benzoeva kiselina, acetofenoni, lignani, lignini) (Parr i Bolwell, 2000; Bruneton, 1999). Drugi mogući put biosinteze polifenolnih jedinjenja je acetogeninski-poliketidni put gde od acetata nastaju poli- β -ketoestari (poliketidi) koji ciklizacijom daju policiklična jedinjenja kao što su hromoni, izokumarini, orcinoli, depsidi, depsidoni, ksantoni i hinoni. Često fenolna jedinjenja nastaju kombinacijom šikimskog i acetanog puta pa se

može reći da imaju dualno biosintetsko poreklo (flavonoidi, stilbeni, pironi i ksantoni). Kombinacijom šikimskog i trećeg, mevalonskog puta nastaju furano- i piranokumarini, a kombinacijom acetatnog i mevalonskog puta kanabinoidi. U nastanak retinoida uključena su sva tri moguća puta biosinteze fenolnih jedinjenja, što je inače veoma retko (Bruneton, 1999).

Smatra se da fenolna jedinjenja imaju zaštitnu ulogu, štite biljku od patogena, nekih hemijskih agenasa ili UV zračenja. Oni takođe imaju važnu ulogu u metabolizmu biljaka, kao i rastu i reprodukciji određenih biljnih vrsti (Parr i Bolwell, 2000). Neka fenolna jedinjenja zaslužna su za karakterističan miris i boju biljaka (Alasalvar i sar, 2001). Obzirom da su prisutni u svim biljnim organima, polifenolna jedinjenja su sastavni deo svakodnevne ljudske ishrane. Smatra se da je prosečni dnevni unos polifenola kroz hranu oko 1 g na dan (Dai i Mumper, 2010; Scalbert i sar, 2002). U Tabeli 2.1. prikazana je podela fenolnih jedinjenja izolovanih iz biljaka prema njihovoj hemijskoj strukturi (Kostić, 2019; Atkinson, 2018; Edwards, 2014; Giada, 2013; Kovačević, 2002; Vermerris i Nicholson, 2008).

Tabela 2.1. Klase biljnih fenola (Kostić, 2019; Atkinson, 2018; Edwards, 2014; Giada, 2013; Vermerris i Nicholson, 2008; Kovačević, 2002).

KLASA	STRUKTURA	PRIMER
Prosti fenoli	C ₆	katehol
Benzoeve kiseline	C ₆ -C ₁	galna kiselina
Acetofenoni	C ₆ -C ₂	2-hidroksiacetofenon
Fenilsirćetne kiseline	C ₆ -C ₂	2-hidroksifenilsirćetna kiselina
Hidroksicimetne kiseline	C ₆ -C ₃	hlorogenska kiselina
Kumarini, Izokumarini	C ₆ -C ₃	eksuletin
Fenilpropeni	C ₆ -C ₃	estragol
Hromoni	C ₆ -C ₃	kelin
Naftohinoni	C ₆ -C ₄	plumbagin
Ksantoni	C ₆ -C ₁ -C ₆	gentizin
Stilbeni	C ₆ -C ₂ -C ₆	rezveratrol
Antrahinoni	C ₆ -C ₂ -C ₆	emodin
Flavonoli	flavonoidi C ₆ -C ₃ -C ₆	kvercetin
Dihidroflavonoli		dihidrokvercetin
Flavoni		luteolin
Halkoni		butein
Auroni		hispidol

Flavanoni		naringenin
Izoflavonoidi		daidzein
Antocijanidini		cijanidin
Flavan-3-oli		katehin
Flavan-3,4-dioli		leukocijanidin
Lignani i neolignani	$(C_6-C_3)_2$ dimeri ili oligomeri	pinorezinol
Betacijanini	C_{18}	betanidin
Biflavonoidi	C_{30}	amentoflavon
Lignini	$(C_6-C_3)_n$ polimeri	polimeri sinapilalkohola
Kondenzovani tanini (proantocijanidini)	tanini oligomeri i polimeri	procijanidin B-1
Hidrolizirajući tanini (galotanini, elagitanini)		eugenin
Mešoviti tanini		akutisimin A

Podela polifenolnih jedinjenja izvršena je na osnovu njihove hemijske strukture na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, lignane i tanine. Fenolne kiseline dele se na derivate hidroksi benzoeve (vanilinska, galna, elaginska i siringinska) i hidroksi cimetine kiseline (hloragenska kiselina kao najzastupljenija). Flavonoidi kao velika grupa biljnih polifenola, podeljeni su na više potklasa: halkoni, auron, flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoli i antocijani. Tanini se mogu podeliti na kondenzovane (proantocijanidini) hidrolizujuće tanine (estri galne i elaginske kiseline). Tanini su odgovorni za adstringentni ukus bobičestog voća, i često vezuju antocijane formirajući kopolimere, koji su u velikoj količini nađeni upravo u plodovima aronije (Scalbert i Williamson, 2000; Manach i sar, 2004; Haminiuk i sar, 2012; Del Rio i sar, 2013; Jimenez-Garcia i sar, 2013; Habauzit i sar, 2014).

Poslednjih godina, u fokusu najnovijih farmaceutskih istraživanja nalaze se ispitivanja bioloških aktivnosti polifenolnih jedinjenja poreklom iz biljaka. Literaturni podaci pokazuju da polifenolna jedinjenja mogu imati značajnu ulogu pre svega u profilaksi, a onda i terapiji hroničnih i degenerativnih bolesti kao što su karcinomi, kardiovaskularna oboljenja ili neurodegenerativne bolesti (Piccolella and Pacifico, 2015). Istraživanja su pokazala da polifenoli ispoljavaju antioksidativnu, kardioprotektivnu, anti-inflamatornu, antimikrobnu, antikancerogenu, nefroprotektivnu i neuroprotektivnu aktivnost. Takođe usporavaju starenje, štite od štetnosti UV-zračenja i mogu da preveniraju nastanak osteoporoze (Li i sar, 2014).

Navedeni efekti pre svega proističu iz izraženog antioksidativnog dejstva koje polifenoli ispoljavaju. Međutim, *in vivo* antioksidativni efekti nisu potpuno relevantni, s obzirom da ova jedinjenja u mnogim tkivima ne dostižu dovoljno visoke koncentracije neophodne za uklanjanje slobodnih radikala (Fraga, 2007; Fraga i sar, 2010). Mogući biohemijski i molekularni mehanizmi dejstva polifenola uključuju i uticaj na ćelijsku signalizaciju, među- i unutar-ćelijske signalne puteve, kao što je aktivacija nuklearnih transkripcionih faktora i regulisanje sinteze inflamatornih medijatora (citokina), kao i metabolizma masti (Kim i sar, 2014; Fraga i sar, 2018; Fraga i sar, 2019).

Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja zasniva se na njivoj sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, koji u većoj koncentraciji mogu izazvati oštećenje ćelija i tkiva. Hemijska struktura polifenolnih jedinjenja omogućuje im da doniraju vodonikov atom, odnosno elektron, jer poseduju veliki broj slobodnih hidroksilnih grupa i time ispoljavaju direktnu antioksidativnu aktivnost (uklanjanjem slobodnih radikala). Ova jedinjenja takođe mogu uticati na aktivnost antioksidativnih enzima kao što su glutation peroksidaza, superoksid dizmutaza i katalaza, a samim tim utiču i na mehanizme zaštite samog organizma od oksidativnih oštećenja (Rice-Evans i sar. 1997; Pandey i Rizvi, 2009; Shadidi i Ambigaipalan, 2015). Neka polifenolna jedinjenja mogu delovati kao katalizatori radikalskih reakcija tako što formiraju metalne komplekse sa bakrom i gvožđem, odnosno deluju kao helirajući agensi (Hider i sar, 2001).

Polifenoli su jedinjenja male bioraspoloživosti koja se veoma brzo metabolišu nakon *per os* primene (Brglez Mojzer i sar, 2016; Scalbert i sar, 2002). Obzirom da se najčešće nalaze u glikozilisanoj formi (jedan ili više molekula šećera vezanih za hidroksilnu grupu aromatičnog prstena, sa izuzetkom flavanola), njihova apsorbcija je niska samo u želudcu, u tankom crevu se apsorbuju aglikoni i pojedini glikozidi, ostali metaboliti se apsorbuju u debelom crevu (kolonu). U poređenju sa tankim crevom, u kolonu se apsorbcija ovih jedinjenja ne vrši lako i za to je potrebno duže vreme (oko 9h). Najčešće se apsorbcija vrši pasivnom difuzijom (Manach i sar, 2004).

Većina polifenola koji se unose hranom nalazi se u formi estra, glikozida ili polimera koji kao takvi ne mogu biti apsorbovani. Ova jedinjenja moraju biti hidrolizovana dejstvom intestinalnih enzima ili mikroflora kolona, pre apsorbcije. Obzirom da je uključena digestivna flora, efikasnost same apsorbcije je često smanjena jer mikroorganizmi dovode do degradacije aglikona i nastanka jednostavnijih aromatičnih kiselina. Tokom procesa apsorbcije dolazi do konjugacije polifenola u taknom crevu i kasnije jetri. Ovaj proces

najčešće uključuje metilaciju, sulfataciju i glukuronidaciju. Značaj konjugacije nije potpuno razjašnjen, zavisi od prirode supstrata i od unešene doze, i može biti povezan sa određenim biološkim aktivnostima polifenonih jedinjenja. Naziva se i proces metaboličke detoksikacije i veoma je čest kod mnogih supstanci koje se unose u organizam, kako bi se smanjila njihova potencijalna toksičnost i olakšalo izlučivanje putem žuči i urina povećanjem hidrofилности. Ovi konjugacioni mehanizmi veoma su efikasni, tako da se aglikoni ne nalaze slobodni u krvi ili se mogu retko naći u veoma niskim koncentracijama nakon primene nutritivnih doza. Polifenoli koji se mogu naći u cirkulaciji (krvi) su najčešće konjugovani derivati vezani u velikoj meri za albumine krvne plazme. Polifenolna jedinjenja penetriju u tkiva, posebno ona tkiva putem kojih se metabolišu, ali je njihova sposobnost akumulacije u tkivima nedovoljno ispitana. Polifenoli i njihovi derivati izlučuju se uglavnom preko jetre i bubrega. Sekretuju se bilijarnim putem u duodenum, gde su izloženi delovanju bakterijskih enzima, najčešće β -glukuronidazi u distalnim segmentima intestinuma, nakon čega mogu biti reapsorbovani što produžava njihovo prisustvo u organizmu (Manach i sar, 2004; Scalbert i Williamson, 2000).

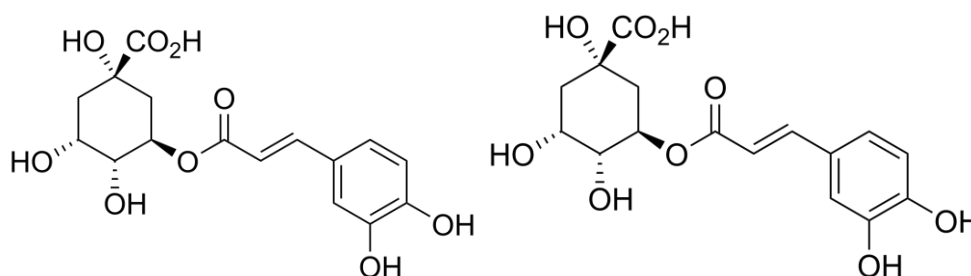
2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su organska jedinjenja koja sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu grupu. Fitohemijaska podela fenolnih kiselina prema mnogim autorima bila bi podela na benzoeve i cimetne kiseline. Prema literaturnim podacima, postoje autori koji u fenolne kiseline ubrajaju samo jedinjenja sa C6-C1 jedinicom u strukturi (benzoeve kiseline), dok se cimetne kiseline (C6-C3 jedinica) onda ubrajaju u veću grupu fenilpropanoide. C6-C1 fenolne kiseline predstavljaju hidroksilovane derivate benzoeve kiselina i pored toga što se nalaze u slobodnom stanju, mogu biti i u obliku estara, glikozida, depsida ili acetilovanih flavonoida. Salicilna kiselina jeste tipičan predstavnik ove grupe jedinjenja. Galna kiselina i dimer galne kiselina su gradivne jedinice hidrolizirajućih tanina, a u biljkama se mogu naći i aldehidi kiselina kao što je vanilin ili salicilaldehid (Bruneton, 1999; Kovačević, 2002).

Drugu grupu fenolnih kiselina čine one sa C6-C3 jedinicama u strukturi i to su derivati cimetne kiselina. Široko su rasprostanjene među biljkama, neke od njih jesu 4-kumarinska, ferulinska, kafena, sinapinska kiselina. Najčešće se mogu naći u obliku estara alifatičnih alkohola, (mono- i dikafeoiltartarna, feruloiltartarna i kafeoiljabučna kiselina) i

kao estri hina kiselina (npr. hlorogenska kiselina) i depsidi kiselina (ruzmarinska i litosperminska kiselina), retko kao slobodne (Bruneton, 1999).

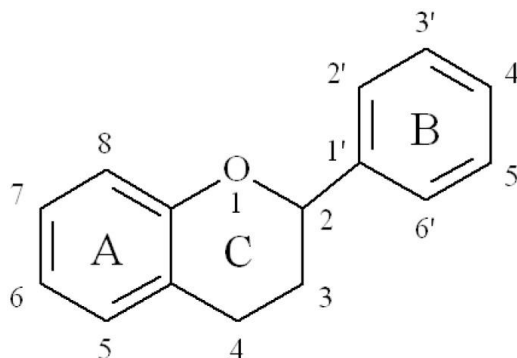
Fenolne kiseline predstavljaju aktivne metabolite mnogih biljnih droga. Odgovorne su mnoge za farmakološke efekte ovih droga. Smatra se da ispoljavaju značajnu antioksidativnu i antiinflamatornu aktivnost, a deluju i hepatoprotektivno. Takođe inhibiraju lipidnu peroksidazu (Kovačević, 2002). U plodovima aronije prema literaturnim podacima najzastupljenije su hlorogenska i neohlorogenska kiselina (slika 2.2) (Borowska i Brzoska, 2016).



Slika 2.2. Hlorogenska i neohlorogenska kiselina – sturkturine formule

2.2.3. Flavonoidi

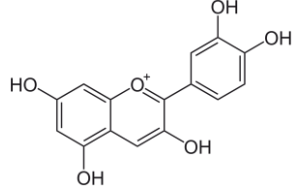
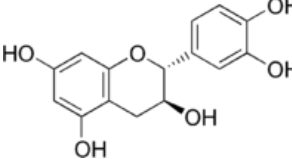
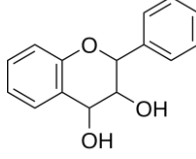
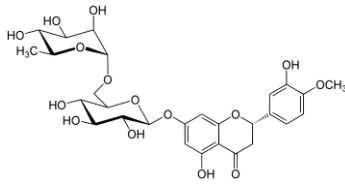
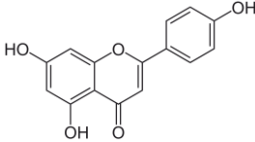
Flavonoidi predstavljaju najveću grupu biljnih polifenola. Do sada je otkriveno preko 7000 različitih flavonoida, a lista novootkrivenih i dalje raste (Beecher, 2003). Predstavljaju biljne pigmente rastvorne u vodi koji su odgovorni za boju cvetova, listova i plodova, a lokalizovani su u ćelijskom soku, vakuolama ćelija mezofila i epidermisa. U biljkama imaju zaštitnu ulogu, štite je od antioksidanasa, mikroorganizama i UV zračenja (Kovačević, 2002). Flavonoidi se karakterišu osnovnim skeletom koji se sastoji iz C6-C3-C6 jedinica, koji čine dva aromatična benzenova prstena koji su povezani preko tri ugljenikova atoma (C3 jedinice) iz heterocikličnog prstena koji sadrži kiseonik (slika 2.3).

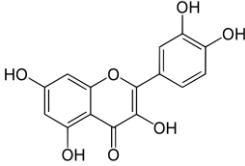
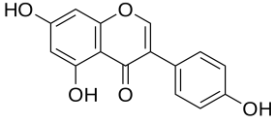
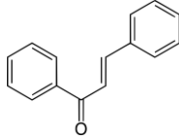
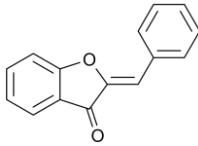


Slika 2.3. Osnovna hemijska struktura flavonoida.

Na osnovu piranovog prstena (C3 jedinice) koji podleže oksidaciji, flavonoidi se mogu podeliti u više različitih grupa među kojima su najzastupljeniji flavanoli, flavan-3-oli (hidrolizirajući i kondenzovani tanini), flavan-3,4-dioli, izoflavoni, flavanoni, flavoni, antocijani, halkoni i auron. Ova jedinjenja većinom se javljaju u formi glikozida (Beecher, 2003; Thilakarathna i Rupasinghe, 2013).

Tabela 2.2. Podela flavonoida (preuzeto i adaptirano od Egert i sar, 2011).

GRUPE FLAVONOIDA	PRIMERI	HEMIJSKE STRUKTURE
Antocijani	Cijanidin, Pelargonidin, Peonidin	 Cijanidin
Flavan-3-oli (Katehini)	Katehin Epikatehin	 Katehin
Flavan-3,4-dioli (Leukoantocijanidini)	Leukoantocijanidin	 Leukoantocijanidin
Flavanoni	Hesperidin, Naringenin	 Hesperidin
Flavoni	Apigenin, Luteolin	 Apigenin

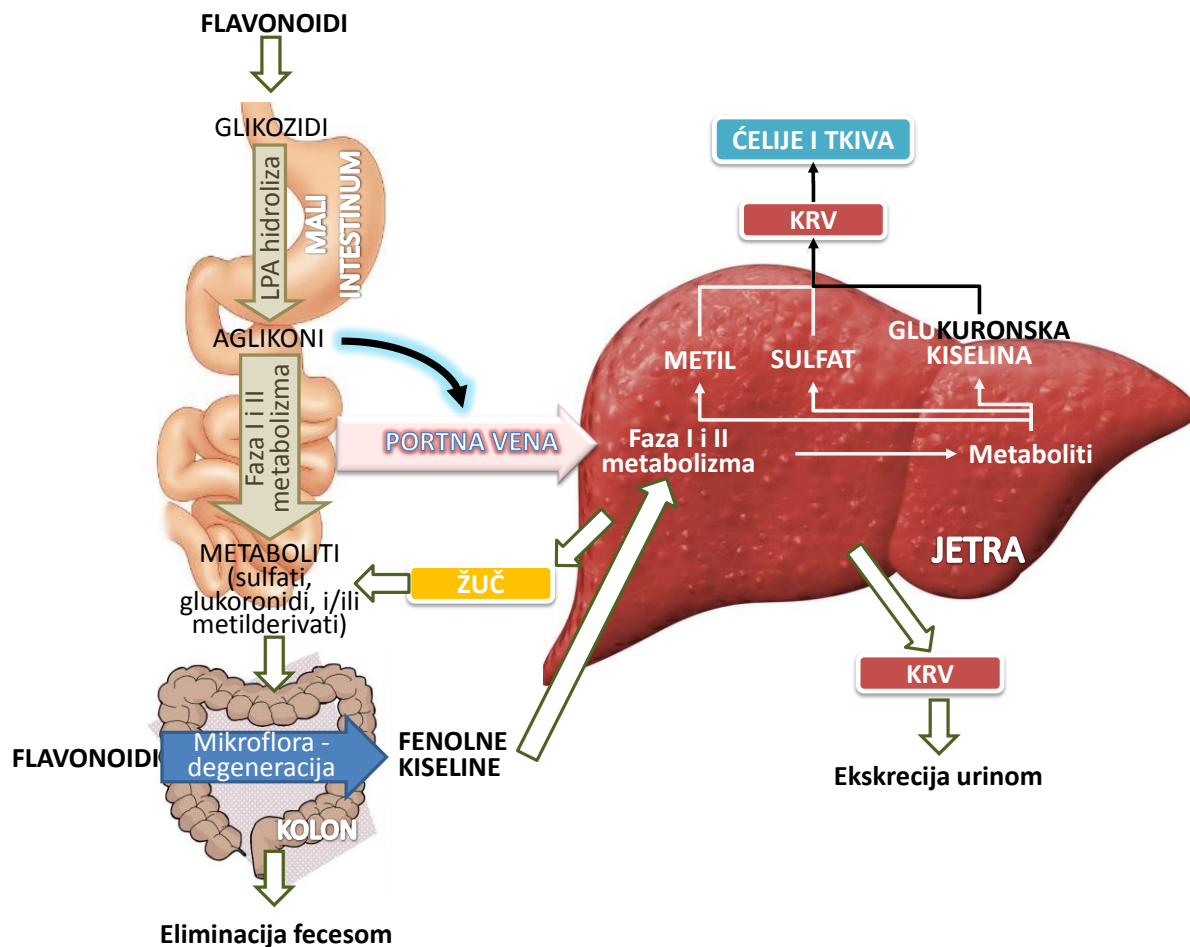
Flavonoli	Kvercetin, Miricetin, Kemferol	 Kvercetin
Izoflavoni	Genistein, Diadzein	 Genistein
Halkoni	Halkon	 Halkon
Auroni	Auron	 Auron

Među brojnim bioaktivnim jedinjenjima koja su izolovane iz biljnog materijala, može se reći da su flavonoidi detaljno istraživani zbog njihovog izraženog pozitivnog dejstva na ljudsko zdravlje (Egert i Rimbach, 2011). Brojna su istraživanja koja dokazuju opravdanost upotrebe ovih jedinjenja u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, kao i u nutritivne svrhe. Flavonoidi imaju izražena antioksidativna i anti-inflamatorna, kao i antimutagena i antikancerogena svojstva. Takođe mogu da utiču na aktivnost ključnih ćelijskih enzima i smatraju se potentnim inhibitorima enzima katin-oksidade, ciklooksigenaze, lipooksigenaze i fosfoinozimid-3-kinaze (Hayashi i sar., 1988; urak i Imen, 1999; Panche i sar., 2016). Antioksidativna aktivnost flavonoida ogleda se u njihovoj sposobnosti da vežu slobodne radikale nastale prilikom procesa anoksije ($O_2^{\cdot-}$), inflamacije ($O_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot}) ili lipidne autoksidacije (ROO^{\cdot} i RO^{\cdot}) (Bruneton, 1999). Nastali slobodni radikali dovode do ćelijskih i tkivnih oštećenja, a samim tim i nastanka različitih degenerativnih bolesti kao što su kardiovaskularna obiljenja (ateroskleroza, hipertenzija, srčana insuficijencija i koronarna srčana bolest), neurodegenerativne bolesti i kancer (Kardum i sar, 2015; Panche i sar., 2016). Brojna istraživanja su pokazala da flavonoidi smanjuju permeabilnost i krtoost krvnih sudova

tako što inhibiraju enzime elastazu i hijaluronidazu, kao i da dovode do usporavanja razgradnje elastina. Takođe inhibiraju oksidaciju lipoproteina male gustine (LDL), deluju hipotenzivno (vazodilatatorno) i povoljno utiču na stanje dislipidemije. Flavonoidne droge ili flavonoidna izolovana jedinjenja ispoljavaju i anti-inflamatorne efekte, kao i diuretska svojstva, hepatoprotektivnu i spazmolitičku aktivnost, i primenjuju se u tretmanu koronarne i crebralne insuficijencije (Kovačević, 2002; Mulvihill i Huff, 2010; Alzand i Mohamed, 2012).

Osim pozitivnih efekata flavonoida na ljudsko zdravlje, poznata je i činjenica da je njihova bioraspoloživost generalno niska i može se drastično razlikovati među različitim grupama, ili se čak razlikuje bioraspoloživost pojedinačnih jedinjenja. Na primer, relativna urinarna ekskrecija antocijana i daidzina bila je 0.3% i 43%, čime se može objasniti varijabilnost u bioraspoloživosti različitih flavonoida. Kada se radi o flavonoidima kompleksnih struktura i velikih molekulskih masa, bioraspoloživost može takođe biti smanjena (Scalbert i sar, 2002; Landete, 2012).

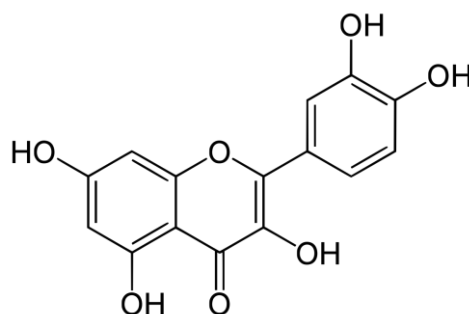
Flavonoidi se u tankom crevu, jetri i kolonu konjuguju i enzimski hidrolizuju gradeći *O*-glukuronide, sulfatne estre i *O*-metil ester, i veoma se retko slobodni aglikoni mogu naći u plazmi. Konjugacija flavonoida najpre započinje u tankom crevu i nastavlja se u jetri, gde se metabolišu, a nastali glukuronidi i sulfatni derivati lakše se izlučuju pomoću urina i žuči (Landete, 2012). Jedinjenja koja se nisu apsorbovala u crevima dospevaju do kolona (debelog creva) i tu podležu strukturnim modifikacijama od strane crevne mikroflore (Del Rio i sar, 2010). Flavonoidni glukuronidi koji ekskrecijom putem žuči ponovno dospevaju u enterohepatičnu cirkulaciju, hidrolizuju pomoću mikroflore do aglikona, koji dalje mogu biti katabolizovani do jedinjenja male molekulske mase koja se mnogo lakše apsorbuju (Scalbert i sar, 2002; Landete, 2012). Na slici 2.4 prikazan je metabolizam flavonoidnih jedinjenja.



Slika 2.4. Metabolizam flavonoida (Thilakarathna i Rupasinge, 2013).

Pored toga što se koriste u svakodnevnoj ishrani, sve je veći broj suplemenata sa flavonoidima kao aktivnim principima poslednjih godina (Espin i sar, 2007). Proizvođači ovih dijetetskih suplemenata preporučuju mnogo veći dnevni unos flavonoida nego što se to može postići samo ishranom bogatom flavonoidima. Primer je flavanol kvercetin koji se na tržištu prodaje kao dodatak ishrani (dijetetski suplement) sa preporučenim dnevnim unosom od najmanje 1 g (Harwood i sar, 2007), dok se hranom može dnevno uneti od 10 do 100 mg ovog jedinjenja (Scalbert i Williamson, 2000; Erdman i sar, 2007). Drugi primer mogu biti takozvani fitoestrogeni, izoflavoni koji ispoljavaju hormonalnu aktivnost (Kovačević, 2002). Sadržaj izoflavona u ekstraktima, tabletama ili kapsulama koje se mogu naći u prodaji varira od 50 do 500 mg i preporučene dnevne doze su različite (Espin i sar, 2007). Izoflavoni se mnogo više unose hranom u Azijskim zemljama, jer su najbogatiji izvor ovih jedinjenja proizvodi od soje (Egert i Rimbach, 2011). Istraživanja su pokazala da veoma visoke doze flavonoida dijetetskih suplemenata mogu dovesti i do neželjenih efekata, ili pak intereagovati sa drugim lekovima. Pokazalo se da izolovani flavonoidi u visokim dozama mogu uticati na

koncentraciju folata, vitamina C i drugih mikroelemenata, i ispoljavaju antitiroidnu i goitrogenu aktivnost (utiču na normalno funkcionisanje štitaste žlezde) (Egert i Rimbach, 2011; Cermak, 2008). Najbogatiji izvori flavonoida u ishrani jesu povrće, voće (crveno voće, bobičasto voće, citrusi, orašasto voće, jabuke), čokolada, kao i čajevi, pivo i vino (Kozłowska i Szostak-Wegierek, 2014; Bigović i sar, 2013). Među flavonoidima aronije, najzastupljeniji su glikozidi kvercetina (slika 2.5) (Kokotkiewicz i sar, 2010).



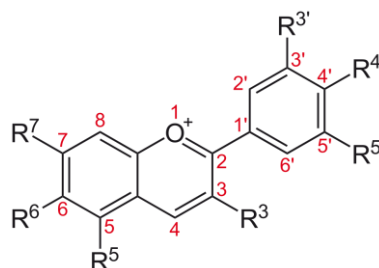
Slika 2.5. Hemijska formula kvercetina

2.2.4. Antocijani

Antocijani predstavljaju biljne pigmente koji su odgovorni za plavu, crvenu ili ljubičastu boju listova, cvetova i plodova. Pojam antocijan odnosi se na heterozide, dok je antocijanidin aglikonska komponenta. Antocijanidini su derivati 2-fenilbenzopirilijum-katjona ili drugačije nazvan flavilijum-katjon. Pripadaju grupi flavonoida, iako u strukturi imaju pozitivno naelektrisanje na atomu kiseonika "C" prstena bazične flavonoidne strukture (redukovani centralni γ -pironski ciklus) (slika 2.6). Na položaju C3 imaju hidroksilnu grupu i većinom su penta ili hekso supstituisani.

Antocijani su najčešće *O*-heterozidi. Molekuli šećera vezuju se na položaju C3, C5 i C7, i najčešći su oblici 3-monozida, 3,5-biozida, dok su trioziidi veoma retki. Ono što dodatno povećava raznovrsnost strukture ovih jedinjenja jeste mogućnost acetilovanja alkoholne grupe šećera. Stabilnost molekula antocijana zavisi od više faktora kao što su pH vrednost, temperatura, svetlost, prisustvo metalnih jona, enzima, antioksidanasa i složenost strukture (Kovačević, 2002, Laleh i sar, 2006; Khoo i sar, 2017). Svi antocijani reverzibilno menjaju boju, zavisno od pH sredine (npr. čelijskog soka). Rezonantna struktura flavilijum-katjona odgovorna je za intenzitet boje. U kiseljoj sredini, pri $\text{pH} < 3$ flavilijum katjon je stabilan i tada je crvene boje. Sa povećanjem pH vrednosti na 4 do 5, crvena boja flavilijum katjona prelazi u bezbojan hromenol. Daljim porastom pH vrednosti (6-7) boja postaje ljubičasta, zbog

nastanka kinoidalne anhidrobaze, dok pri pH vrednosti 7 i 8 zbog prisustva jonske anhidrobaze prelazi u tamno plavu. Jonska anhidro-baza se transformiše otvaranjem prstena kada se gradi halkon žute boje (Ćujić, 2017). Boja antocijana može biti u potpunosti stabilisana građenjem kompleksa sa flavonoidima i viševalentnim metalnim jonima, dok pri višim pH vrednostima dolazi do degradacije antocijanidina do aldehida i karboksilnih kiselina, preko hromenola i α -diketona (Ćujić, 2017; Beliz i sar. 2004).



IME	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
<i>PELARGONIDIN</i>	OH	OH	H	OH	H	OH	H
<i>CIJANIDIN</i>	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
<i>DELFINIDIN</i>	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
<i>PEONIDIN</i>	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
<i>PETUNIDIN</i>	OH	OH	H	OH	OH	OH	OCH ₃
<i>MALVIDIN</i>	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Slika 2.6. Osnovne strukture antocijanidina (preuzeto i adaptirano od Fang, 2014)

Antocijani obuhvataju oko 500 različitih jedinjenja. Najčešći aglikoni antocijana (antocijanidini) izolovanih iz voća i povrća jesu cijanidin (50%), delfinidin (12%), pelargonidin (12%), peonidin (12%), malvidin (7%) i petunidin (7%). Cijanidin je najzastupljeniji u bobičastom voću i to je karakterističan crveno-ljubičasti pigment odgovoran za njihovu boju (Castaneda-Ovando i sar, 2009; Seeram i sar, 2001a).

Antocijani poslednjih godina postali su veoma interesanti naučnoj i stručnoj javnosti pre svega zbog njihovih pozitivnih efekata na zdravlje ljudi. Neke od bioloških aktivnosti koje ispoljavaju jesu antioksidativna, antiinflamatorna, antimikrobna, antiedematozna, antikancerogena, antidijabetična. Takodje, literaturni podaci potvrđuju da antocijani mogu smanjiti rizik od nastanka koronarnih bolesti i da mogu poboljšati kognitivne sposobnosti, deluju neuroprotektivno. Pored toga deluju i hepatoprotektivno, radioprotektivno, antiulcerozno, imunomodulatorno, antibakterijski, inhibiraju herpes virus, virus influence, štite endotelne ćelije od oštećenja (Khoo i sar, 2017; Kong i sar, 2003; De Pascual i Sanchez, 2008; Wrolstadt, 2004; Croizer i sar, 2010). Smarta se da je prosečna potrošnja antocijana 3 –

215 mg/dan (Chun i sar, 2007). Evropska agencija za bezbednost hrane odredila je dozu od 36 mg antocijana kao bezbednu dnevnu dozu (Wrolstad, 2004).

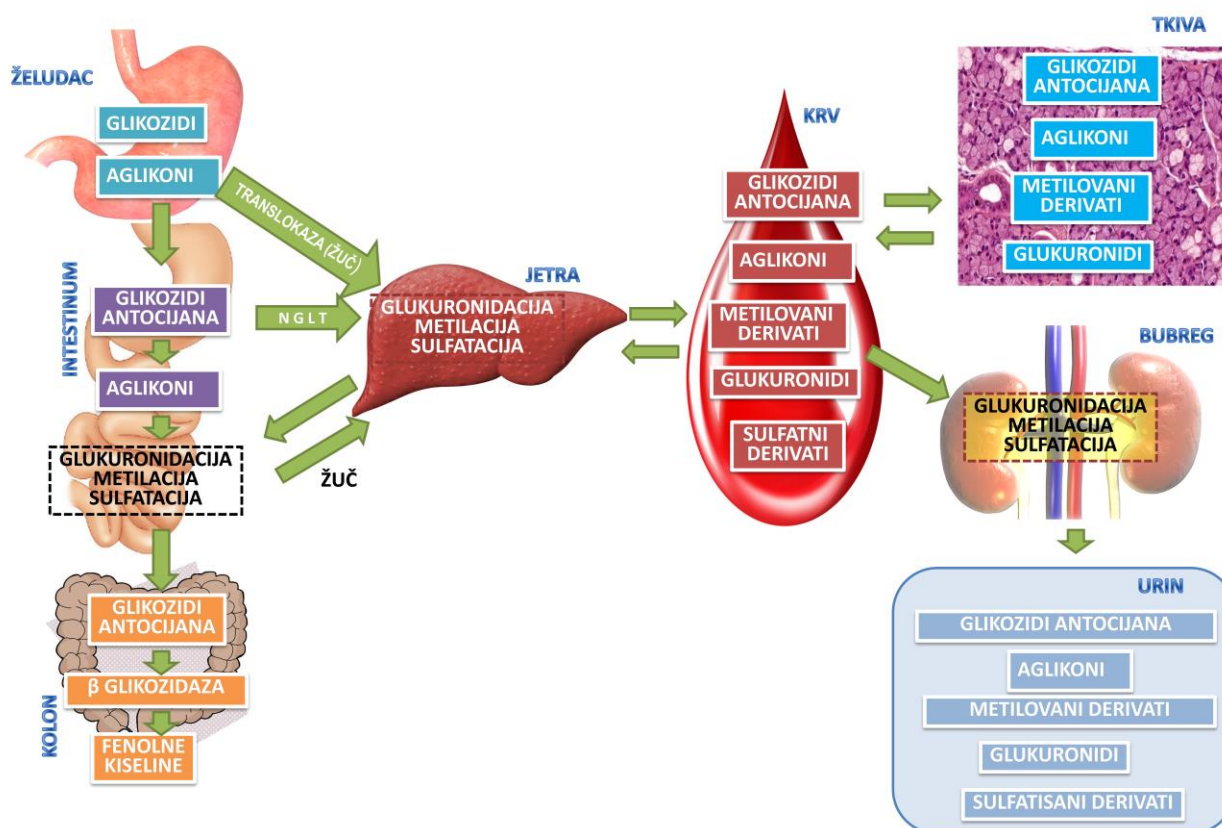
Uprkos efektima koje ispoljavaju, efikasnost antocijana u prevenciji i tretmanu mnogih bolesti umnogome zavisi od njihove bioraspoloživosti (Braga i sar, 2018; Faria i sar, 2014a). Pored toga, na biološku aktivnost antocijana utiče i niz drugih faktora kao što su glikozilacija i priroda aglikona i šećerne komponente (Correia i sar, 2012). Mikroflora u ljudskom organizmu poseduje enzimske mehanizme pomoću kojih se antocijani metabolišu i to može biti od ključnog značaja za nastanak jedinjenja sa različitom bioraspoloživošću i različitom biološkom aktivnošću (Avila i sar, 2009). Smatra se da hidroliza antocijana predstavlja prvi korak u njihovoj kasnijoj bakterijskoj razgradnji i formiranju aktivnih metabolita (Faria i sar, 2014b).

Plod aronije smatra se veoma bogatim izvorom antocijana. Na sadržaj antocijana utiču mnogi faktori među kojima se izdvajaju temperature i vreme (dužina) čuvanja plodova, kao i vreme cvetanja. Kod soka aronije, na sadržaj antocijana i polifenola može uticati i pH vrednost (Misiak i Irzyniec 2009; Howard i sar, 2013; Bolling i sar, 2015). U poređenju sa drugim bobičastim voćem, sadržaj antocijana u aroniji je vrlo jednoličan, plod sadrži glikozide cijanidina: cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-ksilozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid (Kuling i Rawel, 2008). Obzirom da su antocijani 25% ukupnih polifenolnih jedinjenja, i njihov sadržaj se kreće u opsegu od 5 do 10 grama sveže mase (Seeram i sar, 2008), smatra se da oni u najvećoj meri doprinose antioksidativnoj aktivnosti ploda i preparata aronije (Kuling i Rawel, 2008).

Antocijani se odlikuju veoma malom bioraspoloživošću i metabolizam im se razlikuje od metabolizma drugih flavonoida (Del Rio, 2010). Molekuli sa slabom resorpcijom, velike molekulske mase i dobre rastvorljivosti u vodi, antocijini se apsorbuju aktivnim transportom kroz membranu jer su hidrofilni, dok se samo aglikonske komponente apsorbuju pasivnom difuzijom (hidrofobni deo) (Scalbert i Williamson, 2000). Antocijani se slabo apsorbuju u tankom crevu, tako da velika količina prolazi u debelo crevo gde započinje bakterijska degradacija. Istraživanja su pokazala da se cijanidin gliozidi razgrađuju na šećernu komponentu i cijanidin, što je praćeno otvaranjem cijanidinskog prstena i produkcijom 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (Denev i sar, 2012).

Efekti koje antocijani ispoljavaju na zdravlje ljudi zavise od njihove apsorpcije, metabolizma, tkivne distribucije i eliminacije iz organizma (izlučivanja). Ovaj put antocijana kroz ljudski organizama prikazan je šematski na slici 2.7.

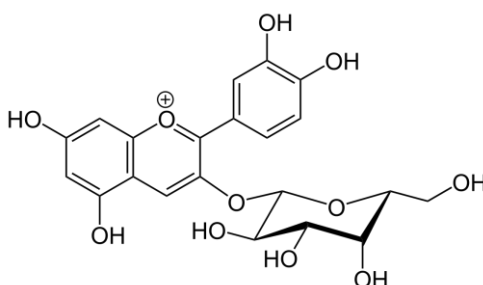
Kao jedinjenja slabe bioraspoloživosti, antocijani kako u obliku glikozida tako i kao metaboliti, veoma su slabo absorbovani i izlučeni urinom, čak i po unisu visokih doza (Galvano i sar, 2004; McGhie i Walton, 2007; Cisowska i sar, 2011). Koncentracije antocijana u urinu i plazmi dostižu veoma niske nanomolarne vrednosti. Većina dijetarnih antocijana pretrpi deglikozilaciju pre apsorpcije i naknadno se modifikuje tokom prve metaboličke transformacije. Glavni metabolite otkriveni u urinu jesu glukuronid-konjugati i metilovana jedinjenja. Prisurni su i sulfatni derivati, ali u niskim koncentracijama (Walle, 2004). Uprkos navedenim transformacijama, u plazmi i urinu pojavljuju se i nepromenjeni antocijani (Ichiyanagi i sar, 2008). Nekoliko farmakokinetičkih studija na životinjama potvrdilo je da se antocijani apsorbuju uglavnom u nepromenjenom obliku i prelaze u krvotok u roku od 15 do 120 minuta nakon unosa (Morazzoni i sar, 1991; Walle, 2004; Miyazawa i sar, 1999; Matsumoto i sar, 2001). Pojedine studije sprovedene na ljudima sugerišu da se antocijani ne metabolišu pre ulaska u sistemska cirkulaciju (Wu i sar, 2002; Felgines i sar, 2003; Kay i sar, 2004; Kay i sar, 2005).



Slika 2.7. Potencijalni putevi apsorpcije, metabolizma i eliminacije antocijana u organizmu (NGLT – natrijum-glukoza transportni protein) (Cisowska i sar, 2011)

Gastrointestinalni trakt (GIT) predstavlja mesto različitih pH vrednosti, stoga se i stabilnost antocijana menja. U želudcu je pH niska i tu su antocijani nastabilniji u obliku flavilijum katjona. Prelaskom u niže partije GIT-a, stabilnost se narušava jer pH vrednost raste i postaje alkalna. Manje stabilni antocijani ovde mogu biti metabolisani do glukuronida, metilovanih i sulfatnih formi. Glukuronid-konjugacija je najčešća metabolička konjugacija flavonoida i odvija se pretežno u jetri, intestinumu i bubrežima. Metilacija se smatra drugom najzastupljenijom konjugacijom kod metabolizma flavonoida (McDougall i sar, 2005a; McDougall i sar 2005b; Seeram i sar, 2001b). Na transformaciju antocijana pored pH vrednosti utiče i intestinalna mikroflora. Dejstvom bakterijskih enzima dolazi do deglikozilacije i demetilacije antocijana, a zatim aglikoni koji su nestabilni u alkalnoj sredini bivaju degradirani do fenolnih kiselina i aldehida (Keppler i Humpf, 2005).

Antocijani su prirodni biljni pigmenti, neškodljivi za zdravlje ljudi i u Evropskoj Uniji su derivati ovih jedinjenja klasifikovani kao E163 (Chun i sar, 2007). Veliko je interesovanje stručnjaka iz oblasti medicine i farmacije, ali i prehrambenih nauka, za ispitivanje antocijana pre svega zbog njihovog blagotvornog dejstva na zdravlje. Najčešći antocijani izolovani iz ploda aronije jesu cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-glikozid, cijanidin-3-*O*-arabinozid i cijanidin-3-*O*-ksilozid, a među njima najzastupljeniji je cijanidin-3-*O*-galaktozid (slika 2.8.) (Ćujić i sar, 2018).



Slika 2.8. Hemijska formula cijanidin-3-*O*-galaktozida

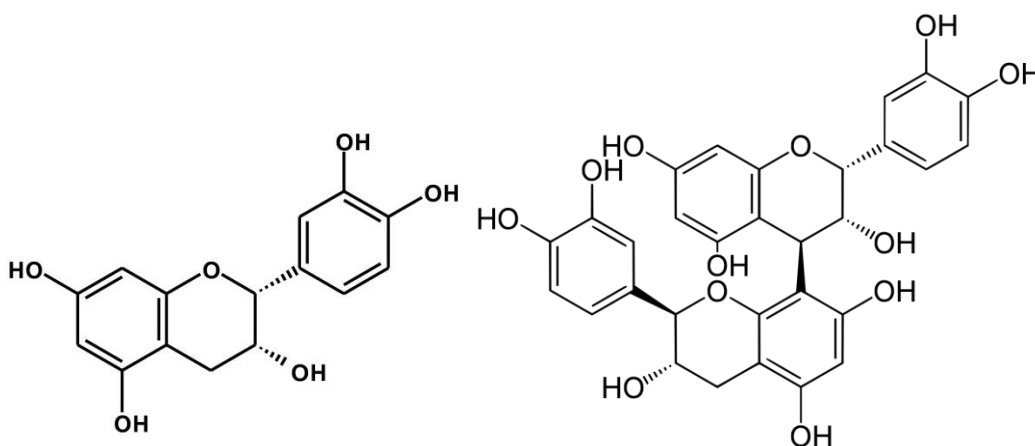
2.2.5. Proantocijanidini

Pored obojenih pigmenata antocijana, u plodu aronije se mogu naći i proantocijanidini koji predstavljaju nebojene oblike. Ova jedinjenja polimerizacijom grade tanine, a lako se oksiduju u kiseloj sredini i na temperature do obojenih antocijanidina (Ćujić i sar, 2018; Kovačević, 2002).

Pojedini flavonoidi kao što su flavan-3-ol-i, katehin i epikatehin polimerizacijom grade tanine. Tanini su sekundarni metaboliti biljaka koji mogu biti hidrolizirajući i

kondenzovani (Caballero i sar, 2016). Kondenzovani tanini poznatiji kao proantocijanidini, prisutni su u plodovima, cvetovima, semenima i drugim delovima biljaka i imaju zaštitnu ulogu. Njihov adstringentni ukus štiti biljku od raznih patogena i predatora. Predstavljaju oligomerne i polimerne produkte koji nastaju u toku biosinteze flavonoida, spajanjem monomernih jedinica katehina i epikatehina (Rauf i sar, 2019). Leukoantocijanidin-reduktaza katalizuje sintezu katehina, što predstavlja prvi korak u biosintezi proantocijanidina (Liu i sar, 2016).

Stepen polimerizacije proantocijanidina može varirati u opsegu od 3 do 11. Kod ovih polimera flavan-3-ola, monomerne jedinice povezane su C-C i povremeno C-O-C vezama. Oksidativna kondenzacija nastaje između heterocikličnog C4 ugljenika i ugljenika C6 ili C8. Proantocijanidini međusobno se razlikuju po konfiguraciji i poziciji veza građenih između monomernih jedinica. Plodovi aronije sadrže proantocijanidine B tipa (C4-C8 veza) kod kojih je (-)-epikatehin glavna monomerna subjedinica (slika 2.9) (Oszmianski i Wojdylo, 2005).



Slika 2.9. Hemijska formula (-) epikatehina i struktura proantocijanidina B-tipa

Najbolji izvori proantocijanidina jesu različite vrste voća, pre svega bobičasto voće. Borovnica, brusnica, crna aronija, crna ribizla samo su neke od jestivih vrsta bobičastog voća sa visokim sadržajem proantocijanidina (Krenn i sar, 2007). Prema studiji Hellstrom i saradnika (2009), najveći sadržaj proantocijanidina detektovan je u plodovima aronije (Hellstrom i sar, 2009). Procijanidini su jedinjenja koja mogu uticati na ukus voća, na adstringentnost, gorčinu, kiselost, slatkoću, a takođe mogu menjati viskozitet pljuvačke i uticati na aromu i boju. Smatra se da su antocijani manje adstringentni od proantocijanidina upravo zbog prisustva šećerne komponente (Aron, 2007; Rauf i sar, 2019).

Proantocijanidini se koriste kao aditivi u prehrambenoj industriji zbog svoje sposobnosti da smanje mikrobiološku, oksidativnu i temperaturnu degradaciju prehrambenih proizvoda. Pored toga, studije pokazuju imaju i pozitivno dejstvo na zdravlje. Ispoljavaju antioksidativno, imunostimulantno i antitumorsko dejstvo. Istraživanja ukazuju da pomažu kod poboljšanja fleksibilnosti u zglobovima, arterijama i tkivu srca. Poboljšavaju cirkulaciju jačanjem zidova krvnih sudova, mogu imati blagotvorne efekte kod poboljšanja vida i u zaštiti kože od sunčevog zračenja. Kompleks oligomernih proantocijanidina (OPC) takođe poseduje izražene biološke aktivnosti poput antioksidativne, antivirusne i antibakteriske, vazodilatatorne, antialergijske, antiinflamatorne i antikancerogene. Smatra se da ova jedinjenja mogu da inhibiraju lipidnu peroksidaciju, smanjuju permeabilnost kapilara i agregaciju trombocita. Proantocijanidini mogu uticati i na apoptozu, gensku ekspresiju i aktivaciju transkripcionih faktora poput NF -kB (Fine, 2000; Shi i sar, 2003; Cos i sar, 2004). Zahvaljući antioksidativnom i antiinflamatornom dejstvu, proantocijanidini deluju i antidijabetogeno, kardioprotektivno i antikancerogeno pa se mogu primenjivati kod kardiovaskularnih i metaboličkih oboljenja, kao i karcinoznih stanja (Bao i sar, 2015; Rauf i sar, 2019).

Iako su jedinjenja sa brojnim zdravstvenim benefitima, oni su direktno zavisni od metabolizma i apsorpcije prantocijanidina. Proantocijanidini koji imaju stepen polimerizacije preko 4 se ne apsoruju. Apsorpcija je moguća samo kod jedinjenja manje molekulske mase, monomera ili manjih oligomernih molekula proantocijanidina. Njihova depolimerizacija u digestivnom traktu je zanemarljiva i većina proantocijanidina u debelo crevo dospeva nepromenjena. Istraživanja pokazuju da se proantocijanidini metabolišu dejstvom crevne mikroflore kolona do fenilvalerolaktona i fenolne kiseline. Ovi metaboliti mogu doprineti efektima proantocijanidina *in vivo* (Ou i Gu, 2014; Rauf i sar, 2019).

2.3. DOSADAŠNJA ISPITIVANJA FARMAKOLOŠKIH AKTIVNOSTI ARONIJE

Aronia melanocarpa, kao vrsta bobičastog voća i može se reći funkcionalna hrana, došla je u fokus istraživača, pre svega zbog svog izraženog antioksidativnog delovanja. Ovo se pripisuje visokim sadržaju polifenolnih jedinjenja u plodu, naročito antocijana (cijanidin-3-*O*-galaktozida i cijanidin-3-*O*-arabinozida) i procijanidina ((-)-epikatehin jedinice). Sadržaj polifenola i precizan sastav prilično su promenljivi i zavise od kultivacije, nivoa zrelosti

ploda, lokaliteta uzgoja i klimatskih uslova. Iako je bioraspoloživost polifenola loša, njihova biotransformacija može izazvati metaboličku aktivaciju, stoga i metaboliti mogu imati pozitivan uticaj na zdravlje. Uzimajući u obzir sve ove činjenice, *A. melanocarpa* i njeni farmaceutski preparati mogu ispoljiti značajne efekte na zdravlje preko svojih bioloških aktivnosti: imunomodulatorna, antimikrobna, hepatoprotektivna, gastroprotektivna, kardioprotektivna, antidiabeteska, anti-inflamatorna i antikancerogena (Jurokova i sar, 2017; Borowska i Brzoska, 2016).

Porast incidence hroničnih nezaraznih bolesti uključujući dijabetes, kardiovaskularne bolesti, depresiju, neurodegenerativne bolesti, kancer i osteoporoza, predstavlja važan problem javnog zdravlja u razvijenim zemljama. Zato su učinjeni brojni napori kako bi se osigurala efikasna zaštita od ovih bolesti i njihovo lečenje. Poslednjih godina, sve veća pažnja je usmerena na mogućnost korišćenja aronije i njenih preparata u prevenciji i tretmanu ovih oboljenja (Borowska i Brzoska, 2016). Pored toga, postoje podaci koji upućuju mogućnost korišćenja aronije u prevenciji i lečenju drugih zdravstvenih problema, kao što su prehlada, neke inflamatorne bolesti kože i poremećaji reproduktivnog i nervnog sistema (Eftimov, 2018; Sonoda i sar, 2013; Kefer i sar, 2009; Borowska i Brzoska, 2016). Takođe postoje istraživanja koja ukazuju na to da se plodovi aronije i preparati mogu koristiti za izradu kozmetičkih preparata (Šavikin i sar, 2014).

Brojne su studije koje dokazuju da je upotreba ploda aronije i preparata bezbedna, bez pojave neželjenih dejstava ili toksičnih efekata. Međutim, neophodno je sprovesti detaljne eksperimentalne i kliničke studije u cilju određivanja efektivnih doza ovih preparata. Takođe je potrebno detaljnije ispitati upotrebu aronije zajedno sa lekovima usled mogućih interakcija. Iako se konzumiranje ploda aronije smatra bezbednim, mora se napomenuti da polifenolna jedinjenja aronije mogu graditi stabilne komplekse sa metalima poput gvoždja, bakra i cinka, što može rezultirati deficitom ovih esencijalnih metala usled nekontrolisane primene plodova i preparata aronije. Prema pojedinim studijama, aronija može biti veoma korisna u prevenciji toksičnih efekata ksenobiotika kao što su lekovi (Borowska i Brzoska, 2016).

2.3.1. Antioksidativna aktivnost

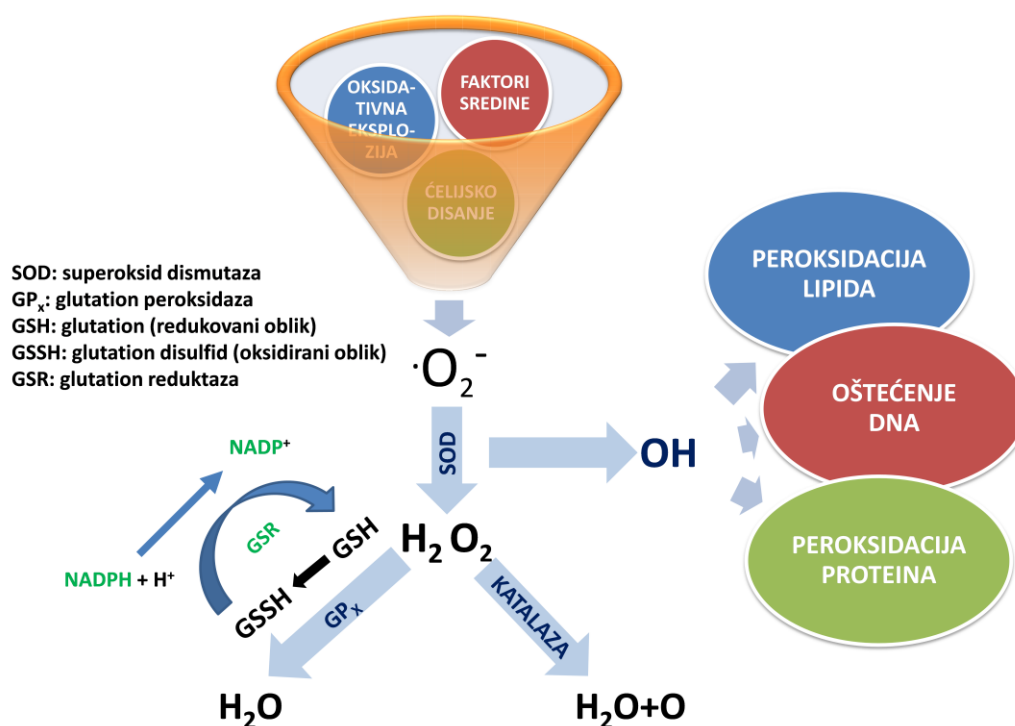
2.3.1.1. Oksidativni stres i antioksidanti

Oksidativni stres predstavlja stanje poremećene ravnoteže između oksidanasa i prooksidanasa u organizmu, što ima za posledicu oksidativno oštećenje esencijalnih

biomolekula. To je stanje poremećenih redoks-zavisnih signalnih puteva i procesa koji su njima kontrolisani (Sies, 1991; Halliwell i Gutteridge, 1999; Jones, 2006). Slobodni radikali koji nastaju prilikom procesa oksidacije predstavljaju visoko reaktivne molekule koji poseduju jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali (Carocho i Ferreira, 2013). U biološkim sistemima, slobodni radikali u strukturi sadrže kiseonik, azot ili sumpor, stoga se mogu podeliti na reaktivne vrste kiseonika (ROS, eng. „reactive oxygen species“), reaktivne vrste azota (RNS, eng. „reactive nitrogen species“) i reaktivne vrste sumpora (RSS, eng. „reactive sulfur species“) (Carocho i Ferreira, 2013; Lu i sar, 2010). Takođe u patogenezi oksidativnog stresa mogu učestvovati i neradikalska jedinjenja (koja za razliku od slobodnih radikala nemaju nesparen elektron), kao što su vodonik-peroksid (H_2O_2) i organski peroksidi, singletni kiseonik, hipohlorna kiselina, peroksi-nitrit jon, tiosulfonati i drugi (Đukić i sar, 2008). Slobodni radikali nastaju endogeno, unutar organizma, tokom fizioloških procesa u mitohondrijama, dejstvom enzima kao što je ksantin-oksidaza ili u toku inflamatornih procesa. Postoje i slobodni radikali koji nastaju usled dejstva nekih spoljašnjih faktora (egzogeno), kao što su duvanski dim, razni lekovi i različiti tipovi zračenja (Lobo i sar, 2010; Halliwell, 2011). Povećana produkcija slobodnih radikala (pre svega ROS) u organizmu, kao i narušena ravnoteža između delovanja ROS i antioksidantnih sistema zaštite, dovodi do pojave oboljenja koja u osnovi imaju oksidativni stres (kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, karcinomi, dijabetes i druge) (Carocho i Ferreira, 2013).

Antioksidanti su supstance koje mogu odložiti, prevenirati ili čak ukloniti oštećenja na molekulima koja su izazvana dejstvom slobodnih radikala (Halliwell, 2007). Suprotno delovanje imaju prooksidanti, supstance koje dovode do pojave oksidativnog stresa. Tokom evolucije, organizam je razvijao sisteme zaštite od oksidativnih oštećenja kako bi se održao balans između slobodnih radikala i razvoja oksidativnog stresa. Antioksidativna aktivnost može se ispoljiti na različite načine: inhibicijom reakcija oksidacije (preventivni antioksidanti) kada nastaju slobodni radikali, sprečavanjem faze propagacije autooksidacije, takozvanim „hvatanjem“ singlet-kiseonika, sinergističkim delovanjem antioksidanata, dejstvom redukcionih agenasa i prevođenjem hidrogen-peroksida u stabilna jedinjenja, dejstvom helirajućih agenasa koji prevode metalne prooksidante (jone gvožđa i bakra) u stabilne forme i inhibicijom prooksidativnih enzima (lipooksigenaza) (Carocho i Ferreira, 2013). Prema najznačajnijoj podeli, antioksidanti u organizmu (endogeni) se dele na enzimске i neenzimске. Enzimski antioksidantni sistemi mogu biti primarni i sekundarni i deluju tako što sprečavaju nastanak slobodnih radikala ili ih neutrališu. Tu se ubrajaju:

katalaza (KAT) – enzim koji katalizuje prevođenje vodonik-peroksida do vode i kiseonika; superoksid-dizmutaza (SOD) – enzim koji superoksid anjone konvertuje u vodonik-peroksid koji je supstrat za katalazu; glutation-peroksidaza (selenoprotein) koji redukuje perokside (Rahman, 2007). Sekundarni enzimski antioksidanti ne neutrališu slobodne radikale direktno, već pospešuju dejstvo drugih endogenih antioksidanasa. Tu spadaju glutation reduktaza, koja vrši redukciju oksidovanog glutationa, i glukozo-6-fosfat-dehidrogenaza, koja vrši regeneraciju NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat – koenzim u anaboličkim reakcijama) (slika 2.10) (Gamble i Burke, 1984; Ratnam i sar, 2006).

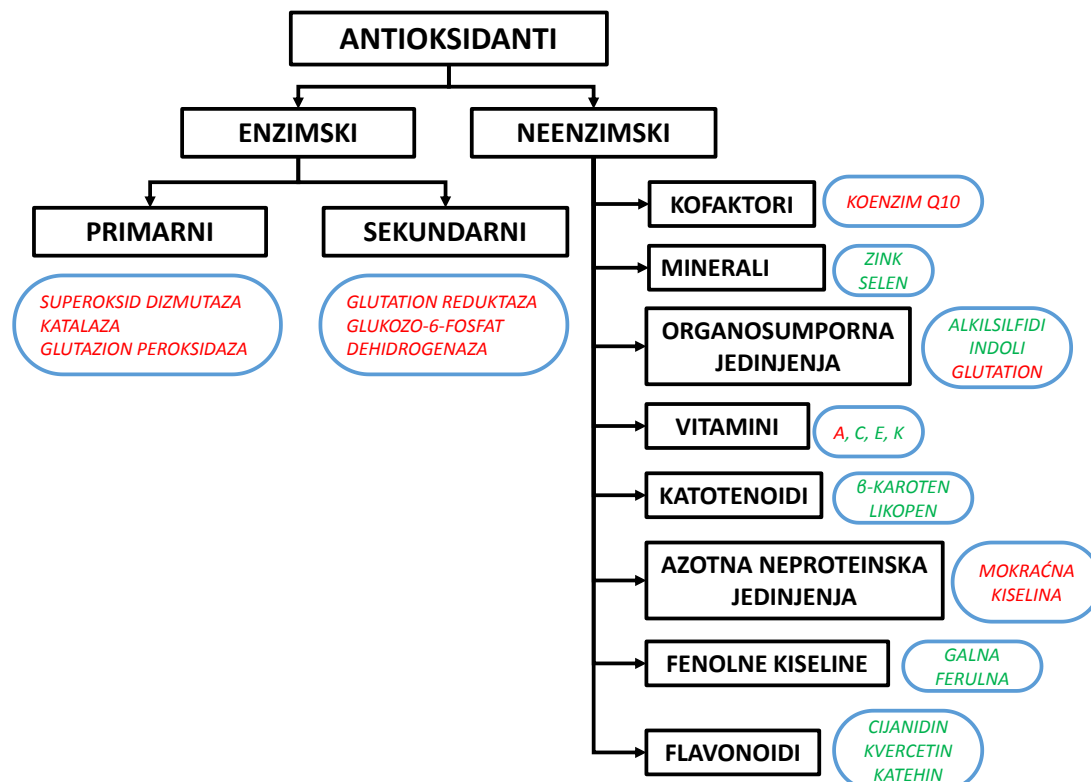


Slika 2.10. Enzimski antioksidanti i njihovi reakcioni mehanizmi

U neenzimske endogene antioksidante ubrajaju se vitamini (A, C, E), enzimski kofaktori – koenzimi Q10, azotna jedinjenja (mokraćna kiselina), peptidi (glutation), kao i proteini koji imaju sposobnost vezivanja metalnih jona (albumin, transferin, feritin, bilirubin, hemoglobin itd) (Carocho i Ferreira, 2013; Đukić, 2008) (šema 2.1).

Sa povećanom produkcijom slobodnih radikala usled dejstva mnogih faktora unutar organizma, ali i iz spoljašnje sredine, javlja se potreba za dodatnim antioksidantnim supstancama jer endogeni antioksidantni sistemi nisu dovoljni za njihovu neutralizaciju i uklanjanje. Stoga je veoma važna uloga egzogenih antioksidanata koji se u organizam unose

putem ishrane (ili suplementacijom). Egzogeni antioksidanti mogu se podeliti na prirodne (vitamini, fenolna jedinjenja) i sintetske (butilhidroksi toluen (BHT), butilhidroksi anizol (BHA) i dr.). Sintetski antioksidansi primenjuju se kako bi poboljšali kvalitet prehrambenih i kozmetičkih proizvoda, ali se u poslednje vreme sve češće dovodi u pitanje bezbednost njihove upotrebe (Brewer, 2011). Zbog toga se sve češće koriste prirodni antioksidanti, jedinjenja biljnog porekla među kojima se izdvajaju polifenoli (Carocho i sar, 2018).



Šema 2.1. Podela antioksidanata (Carocho i sar, 2013)

2.3.1.2. Antioksidativni efekti ploda aronije

Polifenolna jedinjenja svoje antioksidativne efekte ostvaruju kroz tri mehanizma: direktnim „hvatanjem“ slobodnih radikala (HAT, eng. „hydrogen atom transfer“), prenošenjem elektrona (SET, eng. „single electron transfer“) i heliranjem metalnih jona (TMC, eng. „transition metals chelation“) (Leopoldini i sar, 2011). Struktura polifenola, pre svega supstituenti aromatičnog prstena, mogu uticati na antioksidativno delovanje (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Pojedina istraživanja pokazala su da fenolna jedinjenja mogu delovati pooksidativno u uslovima koji pogoduju autooksidaciji (visok pH, visoka koncentracija jona prelaznih metala i kiseonika) (Cotores i sar, 2014). Fenolna jedinjenja sa manjom molekulskom masom (kvercetin ili galna kiselina) lako se oksiduju i ispoljavaju

pooksidantnu aktivnost, dok jedinjenja velike molekulske mase (tanini) imaju veoma malu ili nemaju pooksidantnu aktivnost (Hagerman i sar, 1998; Cotores i sar, 2014).

Plod aronije ispoljava snažno antioksidativno dejstvo koje se pripisuje vikokom sadržaju polifenolnih jedinjenja, posebno antocijana (Borowska i Brzoska, 2016). Antioksidativnoj aktivnosti pored fenolnih jedinjenja doprinose i vitamin C i E, β -karoten i minerali kao što su cink, bakar i selen (Velcheva-Kuzmanova i sar, 2007). Brojni *in vitro* i *in vivo* eksperimenti pokazali su da antioksidativni mehanizmi kojim aronija ostvaruje efekte pored tzv. „hvatanja“ slobodnih radikala, uključuju i inhibiciju stvaranja reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, inhibiciju pooksidativnih enzima, obnavljanje antioksidativnih enzima i uticaj na ćelijsku signalizaciju u regulaciji novoa antioksidativnih supstanci i enzima (Denev i sar, 2012). Graversen i saradnici (2008) pokazali su da su antocijani soka aronije (pre sveha cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid) efikasniji antioksidanti u poređenju sa polifenolnim jedinjenjima crnih ribizli i vitaminom C (Graversen i sar, 2008). Cijanidin-3-*O*-arabinozid poseduje najjača antioksidativna svojstva među antocijanima aronije (u smislu „hvatanja“ slobodnih radikala) i snažan je inhibitor prooksidativnih enzima poput lipooksigenaze i ksantin-oksidade (Braunlich i sar, 2013a). Polifenolna jedinjenja izolovana iz ploda aronije karakterišu je boljim antioksidativnim svojstvima u odnosu na polifenole drugog bobičastog voća (Jakobek i sar, 2007). Jaka antioksidativna aktivnost ukazuje na mogućnost primene ploda aronije i njenih preparata u tretmanu i prevenciji bolesti koje su uzrokovane oksidativnim stresom (hronične nezarazne bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih oboljenja, neurodegenerativnih bolesti i kancera) (Borowska i Brzoska, 2016).

Preparati aronije (sok, ekstrakti) ili sami plodovi ostvaruju pozitivne efekte na zdravlje preko antioksidativnog dejstva i uticaja na markere oksidativnog stresa. *In vitro* eksperimenti na ćelijskim kulturama često su korišćeni za procenu antioksidativnih ili antiproliferativnih svojstava ekstrakata aronije. Prednost korišćenja kulture ćelija je ta što se različiti oksidansi i ćelijske vrste, uključujući i modele za neke specifične bolesti, mogu koristiti za procenu antioksidativnog efekta. Ipak, zajedno sa prednostima, upotreba takvih *in vitro* sistema je praćena i nedostacima. Koncentracija antioksidansa dodatog u medijum kulture bi trebala biti jako pažljivo odabrana (Niki, 2010). Ispitivanja na ćelijskim kulturama često su vršena korišćenjem ekstrakata aronije koji sadrže polifenole u fiziološki nedostižnim koncentracijama. Pri fiziološkim koncentracijama, ova jedinjenja ne ispoljavaju zabeleženi efekat. Nakon ingestije, mnogi dijetarni polifenoli se pojavljuju u cirkulaciji u obliku svojih

metabolita, kao glukuronidi, metilovani i sulfatni derivati drugačije strukture. Stanisavljević i saradnici (2015) ispitali su uticaj matriksa hrane na bioraspoloživost fenolnih jedinjenja aronije, što je čest problem ekstrapolacije rezultata sa *in vitro* modela. Iako se pokazalo da se količina fenola aronije smanjuje u prisistvu matriksa hrane zbog kompleksnih mehanizama interakcije, ova jedinjenja i dalje su imala veliki antioksidativni i antiproliferativni potencijal (Stanisavljević i sar, 2015).

Pilaczynska-Szczesniak i saradnici (2005) u svom istraživanju pokazali su da upotreba soka aronije (150 ml dnevno) koji sadrži 23 mg antocijana/ 100 ml, kod veslača koji su fizički aktivni tokom mesec dana, smanjuje oksidativno oštećenje u eritrocitima (Pilaczynska-Szczesniak i sar, 2005). Studija koju su sprovedi Kardum i saradnici (2014a) pokazala je da upotreba soka aronije kod zdravih dobrovoljaca (100 ml tri puta dnevno, u toku tri meseca) dovodi do povećane aktivnosti antioksidativnih enzima eritrocita (SOD i GPx) i štiti ćelijske membrane od lipidne peroksidacije (Kardum i sar, 2014a). Takođe je utvrđeno da je dvanaestomesečna primena soka aronije kod zdravih žena smanjila nivoe markera lipidne peroksidacije (TBARS – tiobarbiturna kiselina- reagujuće supstance) i povećala aktivnost enzima paroksonaze-1 koji je odgovoran za antioksidativna svojstva HDL-a (lipoproteina velike gustine) (Kardum and others 2014b).

2.3.2. Antiinflamatorna aktivnost

2.3.2.1. Inflamacija

Inflamacija ili zapaljenje predstavlja deo nespecifičnog imunog odgovora na štetne nadražaje (patogeni mikroorganizmi, zračenje, toksini ili oštećene ćelije). To je lokalizovana zaštitna reakcija koja dovodi do uklanjanja štetnih stimulanasa i pokretanja procesa izlečenja. Tokom akutnih upalnih procesa, pokreću se ćelijski i molekularni mehanizmi koji efikasno ublažavaju predstojeće povrede tkiva ili infekciju i time doprinose obnovi homeostaze tkiva i eliminaciji akutne inflamacije. Nekontrolisana akutna inflamacija može prerasti u hroničnu, što dovodi do razvoja mnogih hroničnih inflamatornih oboljenja (Ferero-Miliani i sar, 2007; Medzhitov, 2010; Nathan i Ding, 2010; Chen i sar, 2017).

Inflamacija u tkivima karakteriše se crvenilom, otokom, povišenom temperaturom, bolom i gubitkom funkcije tkiva, koji su posledica lokalnog imunog, vaskularnog i inflamatornog ćelijskog odgovora na infekciju ili povredu tkiva (Takeuchi i Akira, 2010). Promene u mikrocirkulaciji tokom upalnog procesa uključuju promenu permeabilnosti krvnih

sudova, migraciju leukocita i oslobađanje medijatora zapaljenja (Ferero-Miliani i sar, 2007; Chertov i sar, 2000). Različiti patogeni faktori mogu uzrokovati tkivno oštećenje i izazvati zapaljensku reakciju. Prema etiologiji, inflamacija se deli da infektivnu i neinfektivnu. Kao odgovor na povredu tkiva, leukociti iz cirkulacije se nagomilavaju i aktiviraju kako bi produkovali citokine, medijatore inflamacije (Jabbour i sar, 2009).

Inflamatorni odgovor je posredovan aktivacijom signalnih puteva koji regulišu nivoe inflamatornih medijatora u ćelijama lokalnog tkiva i inflamatornih ćelija krvi (Lawrence, 2009). Inflamacija je česta u patogenezi mnogih hroničnih oboljenja, uključujući kardiovaskularne i digestive poremećaje, karcinome, dijabetes i artritis. Iako inflamatorni odgovori zavise od prirode inicijalnog stimulansa i njegove lokacije u organizmu, svi se odvijaju putem sledećeg mehanizma: receptori na površini ćelija prepoznaju štetne agense, aktiviraju se signalni putevi, otpuštaju inflamatorni medijatori i nagomilavaju se inflamatorne ćelije (Libby, 2007; Chen i sar, 2017). Produkti mikroorganizama i citokini poput interleukina-1 β (IL-1 β), interleukina-6 (IL-6) ili faktor nekroze tumora α (TNF- α), kao medijatori inflamacije, interreaguju sa receptorima („toll like receptor“ (TLR), IL-1 receptor (IL-1R), IL-6 receptor (IL-6R), i TNF receptor (TNFR)) čime se pokreću intracelularni signalni putevi (mitogen-aktivirana protein-kinaza (MAPK), nuklearni faktor kapa-B (NF- κ B) i Janus-kinaza (JAK) i aktivator transkripcije STAT) (Kaminska, 2005; Hendrayani i sar, 2016; Kyriakis i Avruch, 2001; Henríquez-Olguín i sar, 2015).

Markeri inflamacije koriste se u kliničkoj praksi kako bi razlikovali normalne od patogenih bioloških procesa i omogućili procenu uspešnosti terapije. Oni mogu ukazivati na razvoj neke od inflamatornih bolesti (npr. endotelna disfunkcija, infekcija), i u korelaciji su sa uzrokom i posledicama ovih oboljenja (Chen i sar, 2017). Stimulansi aktiviraju inflamatorne ćelije poput makrofaga i adipocita, i indukuju oslobađanje inflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α), inflamatornih proteina (C-reaktivni protein, fibrinogen) i enzima (SOD, GPx, ciklooksigenaza). Ovi molekuli mogu biti potencijalni biomarkeri koji se koriste za dijagnozu, prognozu i terapiju bolesti (Miller i sar, 2009; Shlipik i sar, 2003; Gupta i sar, 2012).

Produkti oksidativnog stresa takođe mogu biti korišćeni kao markeri inflamatornog odgovora. Oksidativni stres u organizmu dovodi do produkcije ROS, kao i malondialdehida (MDA) kao produkta lipidne peroksidacije, a oni takođe mogu da dovedu do aktivacije brojnih transkripcionih faktora, uključujući NF- κ B, STAT i druge (Reuter i sar, 2010; Chen i sar, 2017).

2.3.2.2. Antiinflamatorni efekti ploda aronije

Literaturni podaci pokazuju da ekstrakt i sok aronije imaju izražena antiinflamatorna svojstva koja su povezana sa inhibicijom oslobađanja pro-inflamatornih i antiinflamatornih citokina (IL-6, IL-8, TNF- α). Obzirom da se u osnovi mnogih bolesti, uključujući dijabetes, kardiovaskularne bolesti, kožna oboljenja, bolesti imunog sistema i druge, nalazi inflamacija, preparati aronije mogu biti efikasni u zaštiti od razvoja ovih oboljenja putem inhibicije inflamatornih procesa. Appel i saradnici (2015) pokazali su da sok aronije poboljšava funkciju imunog sistema tako što inhibira otpuštanje IL-6, IL-8 i TNF-a u perifernim humanim monocitima i aktivira NF-kB u makrofagima miša RAV264.7. Autori su otkrili da dodavanje selena u sok aronije povećava njegovo antiinflamatorno delovanje u perifernim monocitima i mišjim makrofagima RAV264.7 i to inhibicijom NF-kB aktivacije, oslobađanjem citokina i sintezom prostaglandina E2 (PGE2) (Appel i sar, 2015).

Ekstrakt ploda *A. melanocarpa*, zbog svojih protivupalnih i antioksidativnih svojstava, može se koristiti za zaštitu krvnih sudova. Zapolska-Dovnar i saradnici (2012) pokazali su u svom israživanju da ekstrakt aronije deluje protivupalno u humanim endotelnim ćelijama aorte inhibicijom ekspresije endotelnog međućelijskog adhezijskog molekula 1 i vaskularnog ćelijskog adhezionog molekula 1 (VCAM-1), kao i smanjenjem aktivacije NF-kB i formiranja unutarćelijskih reaktivnih kiseoničkih vrsta (ROS) *in vitro* (Zapolska-Dovnar i sar, 2012).

Ohgami i sar. (2005) su na životinjskom modelu pokazali da čvrst ekstrakt aronije ima antiinflamatorno dejstvo na oči pacova suzbijajući oslobađanje PGE2 i TNF- α , kao i blokiranjem ekspresije azot oksida sintetaze (NOS) i ciklooksigenaze 2 čime poboljšava oštrinu vida kod pacova. Nažalost, do sada ne postoje dokazi da preparati aronije mogu poboljšati vid kod ljudi, ali svakako mogu biti koristan dodatak ishrani.

Studija koju su sprovedli Amin i saradnici (2015) ukazuje na to da su metaboliti cijanidin-3-*O*-glukozida (ferulna kiselina, protokatehinska kiselina i njeni glukuronidi) u koncentracijama od 0,1 do 10 μ M doveli do većeg pada nivoa inflamatornih medijatora (IL-6 i VCAM-1) u humanim endotelnim ćelijama nego cijanidin-3-*O*-glukozid u nepromenjenoj formi. Ovi rezultati upućuju na to da biotransformacija antocijana u organizmu može povećati njihovu aktivnost (Amin i sar, 2015).

2.3.3. Antimikrobna aktivnost

2.3.3.1. Mikroorganizmi

Mikroorganizmi pripadaju velikoj i heterogenoj grupi organizama koju čine bakterije, virusi, mikrogljive, mikroalge, i protozoe. Karakterišu ih neke zajedničke osobine kao što su male dimenzije, velika brzina razmnožavanja i izražena sposobnost metaboličke adaptacije. Bakterije predstavljaju najbrojniju grupu mikroorganizama. To su kosmopolitski organizmi i mogu da nastanjuju zemljište, vodu, vazduh, kao i sredine nepovoljne za život drugih vrsta živih organizama (Mihajilov-Krstev, 2009; Kostić, 2019). Mikroorganizmi mogu pozitivno delovati na ljudski organizam pomoću produkata nekih metaboličkih procesa, sinteze nekih vitamina i aminokiselina, čišćenjem organizama od "nus" produkata, a takođe obezbeđuju nespecifičnu rezistenciju i štite organizam od drugih vrsta patogena. Negativni efekti koje mikroorganizmi ostvaruju na organizam čoveka danas su jedan od najvećih medicinskih problema. Veliki je broj mikroorganizama veoma štetan po čoveka i može izazivati ozbiljne infekcije (Karaklašević, 1977).

Patogeni mikroorganizmi se mogu podeliti na patogene parazite (ovi organizmi za ishranu koriste metabolite domaćina ili žive ćelije) i patogene saprofite (ovi organizmi žive u okolnoj sredini domaćina i u njega dospevaju preko rana, nekim pasivnim putem, kontaminacijom vode ili hrane i sl.) (Mihajilov-Krstev, 2009; Kostić, 2019). Bakterijska rezistencija predstavlja globalni zdravstveni problem, koji je potenciran prekomernom upotrebom antibiotičkih lekova (Rice, 2008). Stoga su veoma aktuelna istraživanja u oblasti novih potencijalnih antimikrobnih, pre svega antibakterijskih sredstava, među kojima se mogu izdvojiti antimikrobni agensi biljnog porekla (Mundy i sar, 2016).

2.3.3.2. Antimikrobno dejstvo ploda aronije

Antibakterijsko dejstvo aronije potvrđeno je protiv bakterija *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Braunlich i sar, 2013b; Liepina i sar, 2013). Uzimajući u obzir antiinflamatorna svojstva (Appel i sar, 2015) i antibakterijsko delovanje ekstrakta i soka ploda aronije (Braunlich i sar, 2013b; Liepina i sar, 2013; Handeland i sar, 2014), može se pretpostaviti da proizvodi od ploda aronije mogu biti korisni za zaštitu i lečenje bakterijskih infekcija (Borowska i Brzoska, 2016). Protivupalno delovanje aronije, u kombinaciji sa antimikrobnim dejstvom uglavnom se zasniva na prisustvu fenolnih jedinjenja, pre svega antocijana u plodu (Cisowska i sar, 2011; Jurikova i

sar, 2017; Joseph i sar, 2014). Antimikrobna aktivnost ploda verovatno se odvija kroz više mehanizama i sinergistički, jer sadrže i druga jedinjenja uključujući kao što su fenolne kiseline i organske kiseline (Borowska i Brzoska, 2016). Istraživanja Valcheva-Kuzmanova i Belcheva (2006) pokazala su *in vitro* bakteriostatsku aktivnost soka *Aronia melanocarpa* protiv *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Valcheva-Kuzmanova i Belcheva, 2006). Liepina i saradnici (2013) ispitivali su antimikrobno delovanje vodenih i etanolnih ekstrakata svežih, osušenih i smrznutih plodova crne aronije. Rezultati su pokazali da ekstrakti pokazuju antibakterijsko delovanje protiv Gram-pozitivnih bakterija *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*, bez antigljivičnog efekta. Ekstrakt je inhibirao i rast Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ali nije imao uticaja na *Escherichia coli*. (Liepina i sar, 2013). Braunlich i saradnici (2013b) ispitivali su sposobnost ekstrakta *Aronia melanocarpa* i njihovih jedinjenja da spreče stvaranje biofilma i *in vitro* inhibiraju rast bakterija *Escherichia coli* i *Bacillus cereus*. Etanolni ekstrakt ploda bio je najsnažniji inhibitor formiranja *B. cereus* biofilma, u poređenju sa dihlometanolnim i vodenim ekstraktima (Braunlich i sar, 2013b).

Upotreba soka aronije pokazala se efikasnom i kod infekcija mokraćnih puteva (UTI) lečenih antibioticima. Tokom perioda od šest meseci, sok (156 ml dnevno), za koji je bio karakterističan visok sadržaj ukupnih fenolnih, uključujući procijanidine tipa B, antocijane i hlorogensku kiselinu, primenjivan je kod pacijenata u staračkim domovima. Infekcija mokraćnih puteva činila je 55% svih medicinski lečenih infekcija tokom perioda ispitivanja. Rezultati nisu pokazali trenutno smanjenje frekvencije UTI-a niti ukupne upotrebe antibiotika; međutim, tokom perioda davanja soka, primećeno je smanjenje upotrebe antibiotika kod infekcija urinarnog trakta (Handeland i sar, 2014).

U studiji koju su sprovedi Park i saradnika (2013), ispitivana je efikasnost aronije pomoću virucidnog testa protiv sezonskog *Influenza* virusa različitih sojeva i *Influenza* virusa rezistentnih na antivirotik oseltamivir. Plod aronije pokazao je efikasnost *in vitro* i *in vivo* protiv različitih podtipova virusa *Influenza* (H1 / K09, H3 / PE16, B / BR60), uključujući soj otporan na oseltamivir (H1 / K2785 i HPAI rH5 / IS06). U niskim koncentracijama ekstrakta aronije, došlo je do inhibicije gotovo 70% plakova virusa H1 i H3, kao i soja H1 / K2785 rezistentnog na oseltamivir (Park i sar, 2013). Antivirusna aktivnost protiv virusa *Influenza* tipa A takođe je potvrđena drugim istraživanjima (Valcheva-Kuzmanova i Belcheva, 2006).

2.3.4. Kardioprotektivna aktivnost

Poremećaji kardiovaskularnog sistema su glavni uzrok smrti u razvijenim zemljama (Lloyd-Jones i sar, 2010). Podaci iz literature ukazuju na to da je upotreba antocijana, koji se mogu naći u aroniji, povezana sa smanjenjem rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti, uključujući i infarkt miokarda (Lippi i sar, 2010; Cassidy i sar, 2013). Pokazano je da ekstrakti i sok aronije mogu inhibirati razvoj oksidativnog stresa i inflamatornih procesa u krvnim sudovima koji doprinose razvoju poremećaja u kardiovaskularnom sistemu. Trebalo bi napomenuti da je protektivni efekat aronije na kardiovaskularni sistem rezultat njenih antioksidativnih i antiinflamatornih svojstava (Borowska i Brzoska, 2016).

Poznato je da hronični inflamatorni poremećaji mogu dovesti do kardiovaskularnih bolesti koje karakteriše povišen krvni pritisak, visok nivo serumskih triglicerida i LDL holesterola, kao i nizak nivo HDL holesterola u plazmi. Proizvodi ploda aronije mogu imati blagotvoran uticaj na nekoliko navedenih faktora rizika za kardiovaskularne bolesti (Skoczyńska i sar, 2007; Kowalczyk i sar, 2005; Kim i sar, 2013a; Zapolska-Downar i sar, 2012). Plodovi aronije svoje kardioprotektivne efekte ispoljavaju kroz više mehanizama dejstva: uticaj na metabolizam lipida, peroksidaciju, proces zapaljenja, koagulaciju i oksidaciju (Jurikova i sar, 2017).

Rezultati studija *in vitro* pokazuju uticaj ekstrakta *A. melanocarpa* na aktivnost trombocita, uključujući i trombocite čoveka. Ekstrakt aronije indukovao je smanjenu proizvodnju superoksid-anjon radikala u trombocitima pacijenata sa hipertenzijom, hiperholesterolemijom i dijabetes melitusom, kao i kod dugogodišnjih pušačima, za koje je poznato da imaju povećan rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (Ryszava i sar, 2006). Zaštitni efekat na humane trombocite *in vitro* ostvaruje se i inhibicijom oksidativnih i nitrativnih oštećenja indukovanih peroksinitritom (Olas i sar, 2008). Ekstrakt ploda *A. melanocarpa* sprečava povećanje lize fibrina u plazmi *in vitro* na modelu indukovane hiperhomocisteinemije, pokazano je u istraživanju Malinowske i saradnika (2013). Takođe, produžava vreme agregacije trombocita i polimerizaciju fibrinogena izazvanu trombinom i smanjuje maksimalnu brzinu fibrinske polimerizacije i stabilizuje formiranje fibrina u plazmi zdravih dobrovoljaca *in vitro* (Bijak i sar, 2011; Bijak i sar, 2013a). *In vitro* studija otkriveno je da ekstrakt aronije ispoljava zaštitni efekat na peroksinitritna oštećenja fibrinogena u humanoj plazmi (Bijas i sar, 2013b). Zapolska-Downar i saradnici (2008) utvrdili su da ekstrakt aronije štiti od apoptoze endotelnih ćelija umbilikalne vene koje su tretirane 7 β -hidroksiholeserolom, što može ukazati na to da ekstrakt *A. melanocarpa* može biti efikasan u

prevenciji i lečenju ateroskleroze i oštećenja krvnih sudova indukovanih depozitima holesterola (Zapolska-Downar i sar, 2008).

Literaturni podaci pokazuju da upotreba ekstrakta ploda aronije može biti efikasna u prevenciji poremećaja praćenih metaboličkim sindromom i hiperholesterolemijom, kao i u sprečavanju daljeg napretka ovih poremećaja (Kowalczyk i sar, 2005; Broncel i sar, 2007; Duchnowicz i sar, 2012; Sikora i sar, 2012; Kardum i sar, 2015). Sikora i saradnici (2012) pokazali su da upotreba 100 mg standardizovanog ekstrakta aronije u obliku tableta kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, tri puta dnevno u periodu od jednog do dva meseca, dovodi do poboljšanja lipidnog statusa i normalizacije parametara hemostaze kao što su nivo fibrinogena, vreme koagulacije, vreme stabilizacije krvnog ugruška, vreme fibrinolize, vreme generisanja trombina, ukupni potencijal koagulacije (Sikora i sar, 2012). Ovi efekti se mogu objasniti antioksidativnim delovanjem ekstrakta (Zapolska-Downar i sar, 2008; Borowska i Brzoska, 2016). Prema istraživanju Duchnowicz i saradnika (2012), suplementacija 100 mg ekstrakta aronije, tri puta dnevno, kod pacijenata sa hiperholesterolemijom smanjila je koncentraciju holesterola u krvi i ispoljila zaštitni efekat od infarkta miokarda sprečavajući stvaranje plaka u krvnim sudovima (Duchnowicz i sar, 2012).

In vitro i *in vivo* studije na životinjskim modelima i ljudima dokazale su da konzumacija plodova *A. melanocarpa* u različitim oblicima normalizuje krvni pritisak i poboljšava lipidni status (Naruszewicz i sar, 2007; Skoczynska i sar, 2007; Park i Park, 2011; Valcheva-Kuzmanova i sar, 2007a,b; Sikora i sar, 2012; Kim i sar, 2013b; Kardum and others 2015; Čujić i sar, 2018). Uticaj ekstrakta aronije na krvni pritisak je, između ostalog, posledica njegove sposobnosti da inhibira aktivnost angiotenzina i konvertujućeg enzima (Hellstrom i sar, 2010; Sikora i sar, 2014). Ovi efekti takođe mogu biti posledica zaštitnog efekta na koronarne arterije i srčani mišić od slobodnih kiseoničnih radikala (ROS). Korišćenje proizvoda od ploda aronije može smanjiti nivo proinflammatoryh citokina, oksidovanog oblika lipoproteina male gustine (ok-LDL) u serumu i krvni pritisak što upućuje na njihovu potencijalnu upotrebu u prevenciji nastanka infarkta miokarda (Naruszewicz i sar, 2007).

Sok i ekstrakt aronije mogu poboljšati lipidni profil i regulisati nivo glukoze u krvi pacijenata sa hiperholesterolemijom i metaboličkim sindromom, a ovi efekti mogu se pripisati hlorogenskoj kiselini koja je aktivni metabolit (Broncel i sar, 2007; Skoczynska i sar, 2007). Dnevna potrošnja 200 ml soka aronije u vremenskom periodu od 4 nedelja, kod 23 pacijenta sa hipertenzijom prvog stepena dovodi do smanjenja njihovog sistolnog i dijastolnog

krvnog pritiska i poboljšanja serumskog lipidnog statusa (Kardum i sar, 2015). Basu i saradnici (2010) u svojoj studiji pokazali su da plodovi bobičastog voća bogati polifenolnim jedinjenjima, poput brusnice, borovnice i aronije, mogu biti koristan dodatak ishrani kod osoba koje pate od kardiovaskularnih bolesti (Basu i sar, 2010).

2.3.5. *Gastroprotektivna aktivnost*

Bolesti gastrointestinalnog trakta predstavljaju veoma čest problem današnjice i sve je veće interesovanje za prirodne proizvode koji se mogu koristiti kako u prevenciji, tako i u lečenju ovih poremećaja (Martinez-Pérez i sar, 2018). Studije pokazuju da preparati plodova *A. melanocarpa* mogu delovati protektivno kod vrlo čestog poremećaja digestivnog trakta kao što je nealkoholna masna jetra. Pozitivni uticaj ekstrakta i soka aronije na digestivni sistem rezultat je njihovih antioksidativnih svojstava (Boncheva i sar, 2013; Valcheva-Kuzmanova i sar, 2005; Wang i sar, 2015). *In vitro* ispitivanje rađeno na HepG2 ćelijama (ćelije hepatocelularnog karcinoma) sa ekstraktom aronije, u kojima su promene specifične za poremećaj nealkoholne masne jetre izazvane oleinskom kiselinom, rezultiralo je smanjenjem formiranja ROS i smanjenjem akumulacije triglicerida u ovim ćelijama. Navedeni efekti verovatno su povezani sa dejstvom cijanidin-3-*O*-glukozida koji poseduje orto-hidroksilnu grupu (-OH) u svom prstenu B, koja verovatno može intereagovati sa molekulima triglicerida, vezati ih i smanjiti njihovu akumulaciju u hepatocitima (Wang i sar, 2015). Istraživanja sprovedena na životinjskim modelima pokazuju da upotreba soka aronije može smanjiti incidencu nastanka čira na želucu (Valcheva-Kuzmanova i sar, 2005; Wroblewska i sar, 2008). Valcheva- Kuzmanova i saradnici (2005) su pokazali da je sok plodova aronije smanjio nivo malondialdehida (MDA), biomarkera lipidne peroksidacije, u plazmi i želudačnoj sluzokoži i uticao na smanjenje veličine želudačnog ulkusa. Sok aronije koji je davan kao dodatak ishrani pacovima u periodu od 4 nedelja, u dozama koje odgovaraju dnevnom unosu kod ljudi od oko 0,5, 1 i 2 litra, povećao je pH u želucu, i takođe štitio od razvoja peptičkog ulkusa, a doveo i do smanjenja koncentracije triglicerida i ukupnog holesterola u serumu, čime se može smanjiti rizik od pojave ciroze jetre (Wroblewska i sar, 2008). Park and saradnici (2016) otkrili su da se primenom ploda aronije u prahu (u koncentraciji od 0,5% i 1%) kod miševa sa visokim udelom masti u ishrani (koja sadrži 41% energije) u periodu od 8 nedelja može smanjiti ekspresija gena za sintezu masnih kiselina, sterol regulatorni vezujući protein i acetyl-CoA karboksilazu u jetri (Park and sar, 2016). Povećana ekspresija ovih gena doprinosi razvoju nealkoholne masne jetre (Nagaya i sar,

2015). Sprašeni plod aronije smanjio je koncentraciju triglicerida i veličinu kapljica masti u hepatocitima (Park i sar, 2016). Boncheva i saradnici (2013) su otkrili da je upotreba 200 ml soka *A. melanocarpa* (podeljena na 3 doze - svaka od njih je primenjivana 20 min pri obroka) u toku šezdeset dana, kod pacijenata sa masnom jetrom, kao i prihvatanje zdravih životnih navika dovelo do značajnog poboljšanja funkcije jetre (procenjena na osnovu aktivnosti enzima markera jetre u serumu), metabolizama ugljenih hidrata (uključujući glukozu u krvi, bazalni insulin i HbA1c) i parametara lipida u serumu (ukupni holesterol, HDL i LDL holesterol, trigliceridi, apolipoprotein A1 i apolipoprotein B). Efekti aronije i njenih preparata nisu dovoljno ispitivani kod inflamatornih bolesti creva (Borowska i Brzoska, 2016; Boncheva i sar, 2013).

2.3.6. Antidijabetogena aktivnost

Dijabetes melitus predstavlja opšti problem javnog zdravlja u razvijenim zemljama. Predviđeno je da će do 2025. godine broj ljudi kojima je dijagnostifikovan dijabetes porasti na najmanje 300 miliona (Narayan i sar, 2000). Zbog toga je neophodno raditi na prevenciji dijabetesa i eliminaciji faktora rizika. Ovo se može postići poboljšanjem ishrane i neadekvatne fizičke aktivnosti, koji doprinose boljem kvalitetu života. Jedan od glavnih faktora rizika koji dovodi do razvoja dijabetesa tipa 2 (insulin-nezavisni dijabetes) jeste razvoj metaboličkog sindroma (Broncel i sar, 2010). Etiologija ovog tipa dijabetesa je povezana sa smanjenom produkcijom insulina i smanjenom osetljivošću tkiva i organa na ovaj hormon. Oksidativni stres i inflamatorni procesi su uključeni u patološke mehanizme dijabetesa i dovode do razvoja metaboličkog sindroma. Ovaj sindrom je hronični inflamatorni poremećaj koji se karakteriše povišenim krvnim pritiskom, visokom koncentracijom glukoze u plazmi, visokim koncentracijama triglicerida u serumu i smanjenim nivoom lipoproteina visoke gustine (HDL) u plazmi. Istraživanja su pokazala da korišćenje ploda aronije u ishrani znatno smanjuje rizik od dijabetesa i povećava efikasnost insulina poboljšanjem metabolizma glukoze (Borowska i Brzoska, 2016; Valcheva-Kuzmanova i sar, 2007c; Jurgonski i sar, 2008; Qin i Anderso, 2012; Zhu i sar, 2012; Badescu i sar, 2015).

Pozitivni uticaj ekstrakta aronije u prevenciji i terapiji dijabetesa je upravo rezultat njegovih antioksidativnih i antiinflamatornih dejstava (Borowska i Brzoska, 2016). Efikasnost soka i ekstrakta aronije u prevenciji i terapiji dijabetesa može biti povezana je sa prosustvom i aktivnošću cijanidin-3-*O*-arabinozida koji inhibira aktivnost α -glukozidaze, enzima uključenog u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata i razvoja dijabetesa (Braunlich i

sar, 2013a). Prema literaturi, hlorogenska kiselina takođe učestvuje u metabolizmu glukoze i lipida, a ona je jedan od sastojaka preparata aronije (Meng i sar, 2013).

Studije na životinjskim modelima pokazuju da jedinjenja iz soka i ekstrakta aronije indirektno utiču na povećanu osetljivost ćelija na insulin (Qin i Anderson, 2012) i smanjuju aktivnost maltaze u sluzokoži tankog creva (Jurgonski i sar, 2008). Qin i Anderson (2012) su objavili da ekstrakt smanjuje prekomerno povećanje telesne mase i akumulaciju masti, kao koncentraciju glukoze i povećava koncentraciju insulina u plazmi pacova. Nakon primene ekstrakta zapaženo je da je došlo do povišenja koncentracije adiponektina u plazmi (hormon koji povećava osetljivost na insulin), smanjenja koncentracije TNF-a i IL-6 citokina u plazmi i modulacije ekspresije gena koji su uključeni u procese adipogeneze, inflamacije i insulinske signalizacije (Qin i Anderson, 2012).

Dnevna konzumacija 200 ml soka od aronije u periodu od 3 meseca kod pacijenata sa insulin-nezavisnim tipom dijabetesa ukazuje na smanjenje koncentracije glukoze u krvi i smanjenje koncentracije lipida, ukupnog holesterola i glikozilisanog hemoglobina (HbA1c) (Simeonov i sar, 2002). Studije pokazuju da ekstrakt aronije uspešno umanjuje simptome metaboličkog sindroma. U dnevnoj dozi od 100 mg kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, ekstrakt aronije izaziva smanjenje krvnog pritiska, serumske koncentracije endotelina-1 i serumskog nivoa lipida i TBARS-a, i dovodi do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima (Broncel i sar, 2010).

Smatra se da ishrana bogata bobičastim voćem može imati uticaj na lečenje, ali i prevenciju metaboličkih bolesti. Vlachoannis i saradnici (2015) proučavali su minimalne preporučene doze antocijana u ekstraktu aronije za lečenje poremećaja metaboličkog sindroma. Istraživali su proizvode koji sadrže plodove aronije zbog njihove potencijane upotrebe kao funkcionalne hrane. Minimalna doza antocijana za lečenje poremećaja metaboličkog sindroma procenjena je na 110 mg dnevno (Vlachoannis i sar, 2015).

2.3.7. Antikancerogena aktivnost

Studije sprovedene na životinjama i *in vitro* modelima pokazuju da ekstrakt aronije i drugi proizvodi ploda aronije mogu biti efikasni u prevenciji malignih oboljenja, što se povezuje, pre svega sa njihovom izraženom antioksidativnom, ali i antiinflamatornom aktivnošću (Borowska i Brzoska, 2016; Jurikova i sar, 2017). Antikancerogeno dejstvo preparata aronije zasniva se na antioksidativnim svojstvima polifenolnih jedinjenja koji štite zdrave ćelije od oksidativnog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima (Shih i sar,

2007), ispoljavaju pro-apoptotsko dejstvo koje omogućava smrt malignih ćelija (Rugina i sar, 2012; Sharif i sar, 2012) i imaju sposobnost da zaustave ćelijski ciklus malignih ćelija (Malik i sar, 2003; Zhao i sar, 2004; Bermudez-Soto i sar, 2007a,b; Sharif i sar, 2012).

In vitro eksperimentalne studije dokazuju efekte *A. melanocarpa* plodova na rast ćelijskih linija tumora dojke, leukemije, debelog creva i grlića materice (Jurikova i sar, 2017). Stanisavljević i saradnici (2015) sugerišu da, iako se veliki deo fenolnih jedinjenja plodova aronije podvrgava transformaciji tokom metabolizma u organizmu, ona i dalje deluju kao snažni antioksidanti i antiproliferativni agensi (Stanisavljević i sar, 2015).

Gasiorovski i saradnici (1997) utvrdili su da ekstrakt antocijana izolovanih iz plodova *A. melanocarpa* inhibira mutagenu aktivnost benzo[a]pirena i 2-amino-fluorena. Ova jedinjenja takođe suprimiraju stvaranje i oslobađanje superoksid-anjon radikala u humanim granulocitima. Rezultati sugerišu da se antimutageni efekat antocijana odvija uglavnom putem uklanjanja slobodnih radikala, kao i inhibicijom enzima koji aktiviraju promutagene i pretvaraju mutagene u DNK-reaktivne derivate. Ekstrakt crne aronije i drugi proizvodi mogu smanjiti oksidativni stres kod pacijenata sa karcinomom dojke, pre i posle operacije i tokom različitih faza onkološkog lečenja. U *in vitro* modelu, komercijalni ekstrakt plodova *A. melanocarpa* je zahvaljujući antioksidativnom delovanju značajno smanjio oksidativni/nitrativni stres u trombocitima kod pacijenata sa invazivnim karcinomom dojke nakon operacije (Olas i sar, 2010; Gasiorovski i sar, 1997).

Sharif i saradnici (2013) potvrdili su antikancerogeni efekat soka aronije koji sadrži 7,15 g/l polifenola, u ćelijskoj liniji akutne limfoblastne leukemije. Rezultati eksperimenta pokazali su da sok inhibira proliferaciju ćelija, koja je povezana sa zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u fazi G(2)/M i indukuje apoptozu (Sharif i sar, 2013). Malik i saradnici (2003) pokazali su da 24-satna izloženost humanih kancerskih ćelija kolona monomernim antocijanima (50 µg/ml ekstrakta aronije) rezultira njihovom inhibicijom rasta od 60%. Kod tretiranih ćelija primećena je blokada G1/G0 i G2/M faza ćelijskog ciklusa (Malik i sar, 2003). U studiji koju su sprovedi Zhao i saradnici (2004), ekstrakt antocijanima bogate aronije takođe je ispitivan zbog njegovog potencijalnog hemopreventivnog delovanja protiv karcinoma kolona (debelog creva). Praćen je rast tumorskih i ne-tumorskih ćelija debelog creva izloženih ekstraktu (10–75 mg monomernih antocijana/ml). Rast ćelija raka debelog creva je inhibiran za 50% nakon 48 h inkubiranja sa ekstraktom u dozi od 25 µg/ml (Zhao i sar, 2004).

Zanimljivo je uporediti i aktivnost inhibicije različitih polifenolnih jedinjenja prisutnih u plodu aronije. Rugina i saradnici (2012) proučavali su polifenolne frakcije sorti *Aronia melanocarpa* Viking i Aron, i *Aronia prunifolia* u odnosu na njihovo antikancerogeno delovanje. Ekstrahovane su antocijanska i ne-antocijanska jedinjenja. Rezultati eksperimenta pokazali su da cijanidin-glikozidi značajno inhibiraju proliferaciju humanih ćelija raka grlića materice (HeLa ćelije) i povećavaju stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika nakon 48 sati tretmana (Rugina i sar, 2012). Antikancerogena aktivnost ekstrakta zavisila je od metode ekstrakcije. Inhibicija rasta HeLa ćelija bila je značajno veća pri primeni 50% etanolnog ekstrakta nego vodenog i 50% metanolnog ekstrakta aronije (Park i Hong, 2014).

Dostupni rezultati eksperimentalnih studija ukazuju i na to da polifenolna jedinjenja aronije mogu sprečiti razvoj kancera kože (Li i sar, 2014; Pratheeshkumar i sar, 2014). Li i saradnici (2014) su otkrili da hlorogenska kiselina *in vitro* usporava melanogenezu u B16 ćelijama melanoma (Li i sar, 2014). Istraživanje sprovedeno na životinjskim modelima (SKH-1 miševima) pokazalo je da polifenoli ploda aronije štite od oksidativnog oštećenja na koži koje je indukovano ultravioletnim zračenjem (UVB zračenjem) (Pratheeshkumar i sar, 2014).

Treba napomenuti i da ekstrakt aronije potencira dejstvo antikancerskih lekova koji se koriste u lečenju nekih vrsta karcinoma. Na primer, Thani i saradnici (2014) otkrili su da je ekstrakt aronije povećao efikasnost gemcitabina protiv rasta pankreasnih ćelijskih linija *in vitro* (AsPC-1 ćelijska linija) (Thani i sar, 2014).

Na osnovu raspoloživih podataka, može se zaključiti da upotreba proizvoda aronije može biti efikasna u zaštiti od neželjenih dejstava lekova koji se koriste u hemoterapiji (kao što je npr. cisplatin). Zaštitni antioksidativni efekat ekstrakta i soka aronije prema zdravim ćelijama primećen je tokom i nakon hemoterapije (Olas i sar, 2010; Kedzierska i sar, 2012, 2013a,b; Valcheva-Kuzmanova i sar, 2013). Valcheva-Kuzmanova i saradnici (2013) svojom studijom potvrdili su citoprotektivni efekat soka plodova *A. melanocarpa* u humanim embrionalnim ćelijama bubrega koje su tretirane cisplatinom (Valcheva-Kuzmanova i sar, 2013). Ekstrakt aronije u koncentraciji od 50 mg/ml smanjio je nivo oksidativnog stresa *ex vivo* u trombocitima pacijenata sa invazivnim rakom dojke tokom hemoterapije bez neoplastičnih promena i značajno je smanjio intenzitet oksidativnog stresa *ex vivo* i promene hemostaze u plazmi pacijenata sa rakom dojke nakon operacije i različitih faza hemoterapije. Međutim, ekstrakt nije imao uticaja na aktivnost antioksidativnih enzima u plazmi kod ovih

pacijenata tokom različitih faza hemoterapije (Olas i sar, 2010; Kedzierska i sar, 2012, 2013a,b).

2.4. CISPLATIN KAO CITOSTATSKI LEK

Cisplatin, takođe poznat pod nazivima cisplatina, *cis*-diaminodihloroplatina (II) ili *cis*-DDP, pripada grupi hemoterapijskih (citostatskih) lekova. Hemijski, to je neorgansko jedinjenje platine sa kvadratnom planarnom geometrijom, atom platine koji je u centru okružen je sa dva atoma hlora i dve amonijum grupe. Cisplatin je stabilno jedinjenje, mada sa promenom temperature i pritiska može preći u svoj *trans* izomer (IARC 1981).

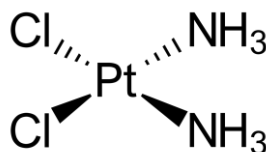
Cisplatin je prvi sintetisao M. Peyrone 1844. godine, a njegovu hemijsku strukturu prvi je objasnio Alfred Verner 1893. godine. Međutim, tek šezdesetih godina prošlog veka postaje intrigantno jedinjenje za naučnike, kada su Rosenberg i saradnici (1965) istakli da određeni produkti elektrolize platinske elektrode imaju sposobnost da inhibiraju deobu ćelija bakterije *Escherichia coli*, što je uzrokovalo veliko interesovanje za njihovu moguću upotrebu u hemoterapiji carcinoma (Rosenberg i sar, 1965). Otkad je identifikovan *cis*-DDP (cisplatin) kao agens odgovoran za citostatsku aktivnost, pojavilo se i veliko interesovanje za upotrebu kompleksa platine, paladijuma i drugih plemenitih metala u lečenju raka (Frezza i sar, 2010). Cisplatin je prvo jedinjenje koje je 1978. godine Američka asocijacija za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration - FDA) odobrila za lečenje karcinoma glave, vrata, jednjaka, bešike, cerviksa, jajnika i testisa (Lebwohl i sar, 1998; Kelland, 2007).

Klinički je dokazano terapijsko dejstvo cisplatina kod različitih vrsta karcinoma, uključujući cervikalni karcinom (maligni tumor grlića materice), karcinom endometrijuma (maligni tumor na materici), karcinom testisa, karcinom ovarijuma (maligni tumor na jajnicima), različite vrste karcinoma pluća, karcinom ezofagusa (jednjaka), karcinomi u predelu glave i vrata, karcinom mokraćne bešike, osteosarkom (vrsta tumora na kostima) (Dasari i Tchounwou, 2014). Cisplatin se može upotrebiti kao monoterapija, ali je često deo kombinovanih terapijskih protokola kada se primenjuje u kombinaciji sa drugim antiproliferativnim lekovima. Kombinovana terapija cisplatina i drugih citostatika ima za cilj smanjenje toksičnosti cisplatina i rezistencije koja se može javiti nakon dugotrajne upotrebe (Goodsell, 2006; Dasari i Tchounwou, 2014).

Mehanizam dejstva cisplatina povezan je sa njegovom sposobnošću da se kovalentno vezuje zamolekule DNK (umrežavanje sa purinskim bazama DNK molekula), čime se

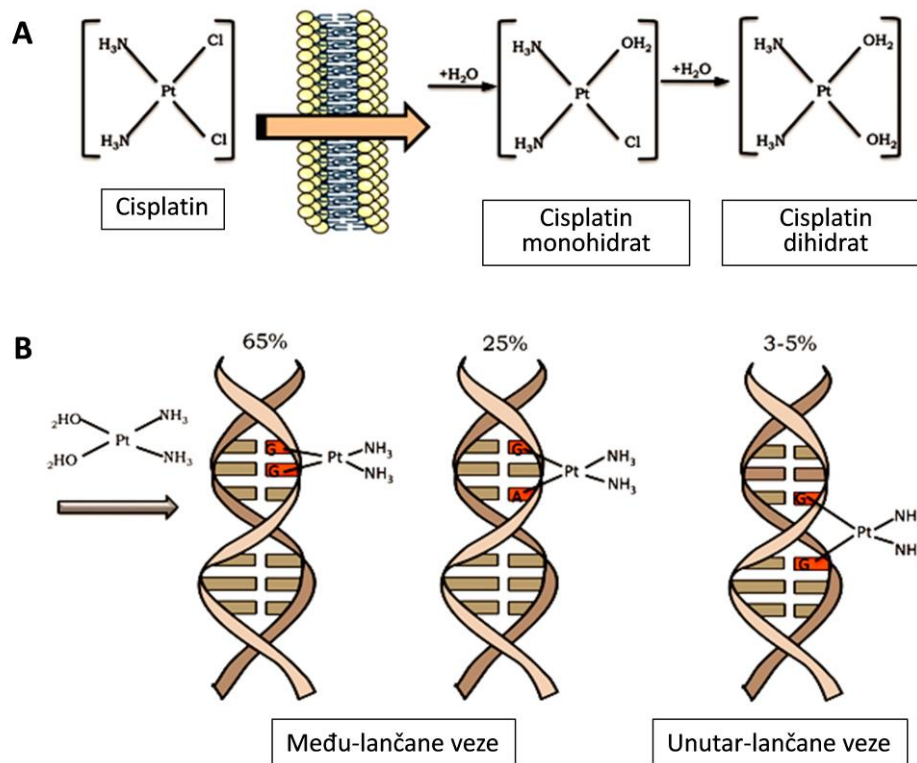
onemogućuje dalje obnavljanje DNK. Kompleks DNK-cisplatin se dalje vezuje za proteine koji učestvuju u sintezi DNK, RNK i drugih proteinskih molekula čime se onemogućava dalji razvoj tumorskih ćelija i indukuje njihova apoptoza (Goodsell, 2006).

Antitumorska aktivnost cisplatina uslovljena je upravo njegovom strukturom. Sa malom promenom strukture molekula može doći do velikih razlika u biološkoj aktivnosti. To je mali molekul, koji se sastoji od jona platine okruženog sa četiri liganda raspoređenih u kvadrat (dva amina i dva hlorida) (slika 2.11). Ustanovljeno je da promena mesta ligandima daje jedinjenje koje nema nikakvu biološku aktivnost.



Slika 2.11. Hemijska formula cisplatina

Razlog za ovu razliku postaje očigledan kada pogledate ćelijsku metu cisplatina. Unutar ćelije cisplatin gubi svoja dva hloridna jona, stvarajući reaktivan molekul koji formira veze sa DNK bazama. Zbog *cis* geometrije, cisplatin lako formira umrežene veze između baza. Većina ovih umreženih veza formirana je na mestima gde su guanin i adenin jedan pored drugog na istom lancu. Ove unakrsne veze uzrokuju ozbiljne probleme pri replikaciji DNK. Hloridni joni u cisplatinu su posebno važni za njegovu efektivnost kao leka. Oni su relativno stabilni kada je lek izvan ćelije, gde je koncentracija hlorida normalno visoka. Ali kada lek uđe u ćeliju i koncentracija hlorida padne, cisplatin gubi svoja dva hlorida i zamenjuje ih molekulama vode. Ovi molekuli vode nisu čvrsto vezani pa se lako odvajaju i omogućuju platini da napada druge molekule, poput DNK (slika 2.12). Detaljan mehanizam kojim cisplatin ispoljava citotoksičnu aktivnost još uvek se aktivno proučava, ali se smatra da apoptoza ima centralnu ulogu (Goodsell, 2006; Dasari i Tchounwou, 2014).



Slika 2.12. Aktivacija cisplatina i indukcija oštećenja DNK. A) Proces aktiviranja cisplatina dešava se razmenom jednog ili dva molekula hlorida za molekule vode (monohidrat i dihidrat). B) Cisplatin može formirati kovalentne veze sa DNK. Procenti predstavljaju učestalost svake vrste oštećenja DNK izazvanih cisplatinom. Preuzeto i adaptirano od Rocha i sar, (2018).

Terapija cisplatinom ima značajna ograničenja. Lečenje cisplatinom izaziva ozbiljne neželjene efekte poput ototoksičnosti, gastrotoksičnosti, mijelosupresije, i alergijskih reakcija (Hartmann i sar, 2000; Hartmann i sar, 2003), ali glavni dozno-zavisni neželjeni efekat cisplatina jeste nefrotoksičnost (Hanigan i Devarajan, 2003; Arany i sar, 2003), kao i hepatotoksičnost (Cavalli i sar, 1978; Pollera i sar, 1987). U mnogim studijama ispitivani su mehanizmi toksičnosti cisplatina, a neki od spomenutih jesu oksidativni stres, inflamacija, apoptoza, mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK) i p53 signalni put (Rashtchizadeh i sar, 2019).

Rezistencija je takođe značajan problem u liječenju jer ćelije koriste sopstvene mehanizme kako bi umanjile ili modifikovale dejstvo cisplatina (Goodsell, 2006; Dasari i Tchounwou, 2014). Za postizanje optimalnog terapijskog efekta, uz minimalna neželjene efekte, doza leka mora se bazirati na kliničkom i biohemijskom statusu pacijenata. Cisplatin se primenjuje intravenski, široko se distribuira u tkivima i telesnim tečnostima i uglavnom se eliminiše putem bubrega (Ilić, 2017).

2.4.1. Nefrotoksičnost cisplatina

Nefrotoksičnost predstavlja jedno od najčešćih neželjenih dejstava koje se javlja pri primeni cisplatina kao antitumorskog leka. Danas je poznato da 20-30% pacijenata razvije akutnu bubrežnu insuficijenciju (ABI) nakon lečenja cisplatinom, uprkos poboljšanim terapijskim protokolima. Pacijenti koji razviju ABI imaju povećan rizik od smrtnosti i veća je verovatnoća da će razviti hroničnu bubrežnu insuficijenciju (HBI) (Uccelli i sar, 2008; Chawla i sar, 2014). Nefrotoksičnost cisplatina manifestuje se na više različitih načina: ABI (20–30%), hipomagnezijemija (40–100%), Fankonijev sindrom (distalna bubrežna tubularna acidoza), hipokalcemija, hiponatrijemija, hiperurikemija, prolazna proteinurija, manjak eritropoetina, trombotska mikroangiopatija, HBI (Miller i sar, 2010).

Prvi izveštaj o nefrotoksičnosti cisplatina dala je studija na životinjama 1971. godine (Kociba i Sleight, 1971), koja je pokazala histopatološke promene akutne tubularne nekroze, zajedno sa uremijom. Ranija klinička ispitivanja pokazuju dozno-zavisnu cisplatinom indukovanu ABI kod 24 do 100% pacijenata, dok novija ispitivanja ukazuju na razvoj bubrežne insuficijencije kod 20 do 30% bolesnika (Miller i sar, 2010). Početak bubrežne insuficijencije počinje nekoliko dana nakon doze cisplatina, što je pokazano povećanjem koncentracije uree (BUN, eng. „blood urea nitrogen“) i kreatinina u serumu. Diureza je obično očuvana (ne-oligurična), a urin može sadržati glukozu i male količine proteina, što ukazuje na disfunkciju proksimalnih tubula. Hipomagnenezijemija je takođe česta, naročito nakon ponovljenih doza cisplatina, čak i ako nema smanjenja glomerularne filtracije. Oporavak bubrežne funkcije obično se javlja u periodu od 2–4 nedelje, mada može biti i duži, ili može izostati (Santoso i sar, 2003; Taguchi i sar, 2005). Nefrotoksičnost cisplatina zavisi od primenjene doze ovog citostatika i učestalosti upotrebe (Madias i Harrington, 1978). Identifikovani su brojni faktori rizika za nefrotoksičnost indukovanu cisplatinom, kao što su pored doze i frekvencije upotrebe i ženski pol, hipoalbuminemija, pušenje, starije osobe i pacijenti sa već razvijenom ABI. U nešto manjem riziku su i dijabetičari i pacijenti koji imaju polimorfizam OCT2 gena koji reguliše transport platine u ćelije bubrega. Cisplatin se eliminiše putem bubrega i glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom. Koncentracije cisplatina u bubrežnom tkivu nadmašuju one u krvi, što ukazuje na aktivnu akumulaciju leka u parenhimskim ćelijama bubrega.

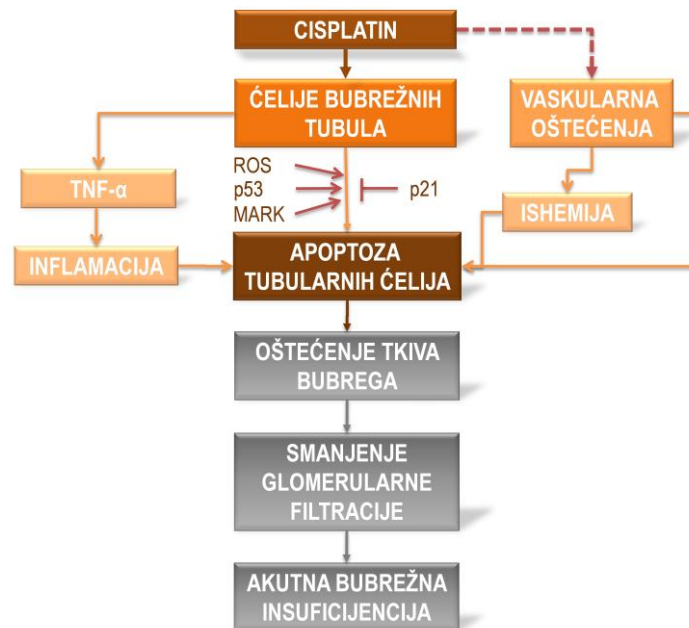
Kako bi se razjasnili kompleksni mehanizmi razvoja ABI uzrokovane cisplatinom, razvijeni su animalni eksperimentalni modeli koji su naširoko primenjivani za testiranje metabolizma cisplatina i molekularnih mehanizama njegove toksičnosti (Perše i Večerić-

Haler, 2018). Studije na pacovima i miševima pokazuju da cisplatin biva podvrgnut metaboličkoj aktivaciji u bubregu do još potentnijeg toksičnog agensa. Ovaj proces započinje formiranjem konjugata glutaciona u cirkulaciji, i verovatno je posredovan dejstvom glutathion-S-transferaze. Kako konjugati glutaciona prolaze kroz bubreg, oni se razlažu do konjugata cisteinil-glicina dejstvom γ -glutamyl-transpeptidaze (GGT) koja je eksprimirana na površini ćelija proksimalnih tubula. Konjugati cisteinil-glicina se dalje metabolišu u cistein-konjugate aminodipeptidazama, takođe eksprimiranim na površini ćelija proksimalnih tubula. Konjugati cisteina se transportuju u ćelije proksimalnih tubula, gde se dalje metabolišu pomoću cistein-S-konjugovane β -liaze do visoko reaktivnih molekula tiola (Townsend i sar, 2009; Sadzuka i sar, 1994; Townsend i sar, 2003; Townsend i Hanigan, 2002; Zhang i Hanigan, 2003; Miller i sar, 2010).

Ranijim studijama identifikovano je više različitih membranskih transportera koji su odgovorni za transport cisplatina u ćelije, a najznačajniji su Ctr1 (bakar-transporter) i OCT2 (organski katjonski transporter u bubrezima) (Miller i sar, 2010; Perše i Večerić-Haler, 2018). Takođe se transport može odvijati i pasivnom difuzijom kroz lipidne kanale membrane epitelnih ćelija proksimalnih tubula. U renalnim epitelnim ćelijama cisplatin podleže metaboličkoj aktivaciji do visoko reaktivnih molekula koji utiču na ćelijske antioksidativne sisteme (oksidativni i nitrozativni status) (Perše i Večerić-Haler, 2018. Promene koje se javljaju manifestuju se smanjenom aktivnošću superoksidizmutaze (SOD), katalaze (KAT), glutathion peroksidaze (GPx) i smanjenjem koncentracije glutaciona (GSH), glutathion-disulfida (GSSG) i nikotinamid adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH). Ove promene utiču na različite ćelijske komponente i makro-molekule uzrokujući funkcionalna i strukturna oštećenja proteina, lipida (povećan nivo malondialdehida (MDA)), i ćelijskih organela kao što su mitohondrije i endoplazmatski retikulum (Santos i sar, 2007; Gordon i Gattone, 1986; Singh, 1989).

Nefrotoksičnost cisplatina dovodi do promene broja i veličine lizozoma i mitohondrija, poremećaja ćelijskog integriteta i polarnosti, oštećenja "brush border", delokalizacije membranskih proteina kao što je K/Na ATP-aza, smanjena broja akvaporina, koji su odgovorni za promene pri koncentrisanju urina (Dobyan i sar, 1980; Singh, 1989; Kishore i sar, 2000; Lee i sar, 2006). Zavisno od doze, cisplatin može izazvati oštećenje ćelije ili ćelijsku smrt, tj. autofagiju, apoptozu i nekrozu. Kao odgovor na cisplatinom izazvana oštećenja, povećava se broj citokina (medijatora inflamacije); povećan je broj leukocita i dolazi do aktivacije različitih receptora što dovodi do inflamatornih procesa. Upala

bubrežnog intersticijuma dodatno doprinosi oštećenju (šema 2.2) (Yang i sar, 2008; Price i sar, 2009; Daugaard i sar, 1987; Pabla i Dong, 2008).



Šema 2.2. Patofiziološki mehanizmi kod cisplatinom indukovane nefrotoksičnosti (preuzeto i adaptorano od Pabla i Dong, 2008).

Patofiziologija nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom proučavana je poslednjih decenija i ustanovljeno je da oštećenja koja su nastala usled primene ovog citostatskog leka možemo podeliti na oštećenja tubula, glomerula, vaskularna oštećenja malih i srednjih arterija, i oštećenja intersticijuma. Oštećenja tubula rezultiraju poremećajem bilansa vode i elektrolita i nekrozom tubula koja dovodi do ABI. Vaskularna oštećenja dovode do smanjenog protoka krvi kroz bubrež, dok oštećeni glomerul dovodi do pojave proteinurije, hematurije i nefrotskog sindroma. Pri dugotrajnoj primeni može doći do oštećenja intersticijuma koja vode u HBI (Ilić, 2017).

Istraživanja su pokazala da je oksidativni stres važan faktor koji učestvuje u razvoju cisplatinom izazvane nefrotoksičnosti (Baliga i sar, 1999). Tokom tretmana cisplatinom, primećen je porast reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u kulturi renalnih tubularnih ćelija, tkivu bubrežna i *in vivo* na životinjama. Porast ROS objašnjen je pomoću tri različita mehanizma. Prvo objašnjenje bilo je da se cisplatin ulaskom u ćelije prevodi u visoko reaktivan oblik koji može intereagovati sa glutationom, koji je ćelijski antioksidans. Time se iscrpljuju rezerve glutaciona i on se inaktivira, dolazi do poremećaja ćelijskog redoks statusa i nagomilavanja endogenih ROS i nastanka oksidativnog stresa u ćelijama (Arany i Safirstein,

2003; Siddik, 2003). Takođe se smatra da cisplatin može indukovati disfunkciju mitohondrija, a promene u respiratornom lancu dovode do povećanja produkcije ROS (Kruidering i sar, 1997). Formiranje ROS u mitohondrijama u toku cisplatinskog oštećenja dovodi do povećane ekspresije antioksidativnih enzima kao što su mangan-zavisna superoksid-dizmutaza (MnSOD) i katalaza (KAT) i pokazalo se da MnSOD ima citoprotektivnu aktivnost u cisplatinskom oštećenju, dok KAT nije ispoljila ove efekte. Ovi rezultati upućuju na to da superoksid radikal, ne i hidrogen-peroksid, može biti glavna vrsta oksidanasa u mitohondrijama koji dovode do oštećenja (Davis i sar, 2001). Sa druge strane, istraživanje Ma i saradnika (2007) pokazalo je da katalaza ne samo da ublažava cisplatinom indukovanu nefrotoksičnost, već poboljšava efekte cisplatina protiv nekih tumora (Ma i sar, 2007). Pokazano je da cisplatin može indukovati generisanje ROS u mikrozomima preko citohrom P450 (CYP) sistema (Liu i Baliga, 2003; Baliga i sar, 1998).

Akutno oštećenje bubrega uslovljava veoma jak inflamatorni odgovor (Ramesh i Reeves, 2004; Lu i sar, 2007). Usled nefrotoksičnosti koja je indukovana cisplatinom, dolazi do oslobađanja velikog broja proinflamatornih citokina i hemokina. Inflamacija doprinosi nastanku renalnog oštećenja i razvoju bubrežnih oboljenja. Deng i saradnici (2004) pokazali su da antiinflamatorni citokin IL-10 poboljšava cisplatinom indukovano oštećenje bubrežnog tkiva i apoptozu tubularnih ćelija (Deng i sar, 2004). Uloga inflamacije u cisplatinskoj nefrotoksičnosti objašnjena je različitim farmakološkim i genetskim istraživanjima usmerenim na produkciju i ulogu faktora nekroze timora alfa (TNF- α) (Ramesh i Reeves, 2004; Ramesh i Reeves, 2002).

U inflamatornom odgovoru izazvanim cisplatinom, pokazalo se da je TNF- α ključni regulatorni citokin. Ramesh i Reeves (2002) pokazali su da farmakološki inhibitori i antitela protiv TNF- α izrazito suzbijaju produkciju drugih citokina kod cisplatinske nefrotoksičnosti. Inhibitorni efekti su pokazani kod miševa sa nedostatkom TNF- α . Pokazano je da je inhibicija TNF- α povezana sa smanjenjem oštećenja bubrega uzrokovanih cisplatinom. Studije su pokazale ključnu ulogu za TNF- α u regulisanju inflamatornog odgovora tokom cisplatinske nefrotoksičnosti i nastalog oštećenja bubrega i ABI (Ramesh i Reeves, 2002; Zang i sar, 2007; Dong i Atherton, 2007).

Nedavna istraživanja ispitivala su mehanizam indukcije TNF- α tokom cisplatinske nefrotoksičnosti. Posebno se ističe uloga ćelija bubrežnih tubula (Dong i Atherton, 2007). Zhang i saradnici (2007) ukazuju na to da se TNF- α proizvodi tokom oštećenja bubrega uglavnom od strane ćelija bubrega i neinfiltriranjem inflamatornih ćelija (Zhang i sar, 2007).

Pojedina istraživanja su pokazala da cisplatin indukuje TNF- α -produkciju u ćelijama proksimalnih tubula bubrega putem transkripcije gena i stabilizacije mRNA. Ono što se može primetiti, u prisustvu endotoksina, TNF- α -indukcija cisplatinom je znatno povećana. Ovi rezultati ukazuju na to da ćelije bubrežnih tubula značajno doprinose proizvodnji TNF- α tokom cisplatinog oštećenja i sa tim povezanim patološkim stanjima (Ramesh i sar, 2007).

Povećana koncentracija TNF- α u cisplatinom oštećenju bubrega obično je praćena i značajnim porastom koncentracija IL-8, IL-1 β i IL-18 u ćelijama bubrežnog parenhima cisplatinom tretiranih životinja. Visoke renalne koncentracije ovih citokina dodatno podstiču TNF- α -indukovanu inflamaciju i cisplatinom indukovano oštećenje bubrega (Peres i da Cunha, 2013; Volarević i sar, 2019).

Pored IL-10, IL-6 se takođe smatrao važnim anti-inflamatornim citokinom koji može zaštititi od nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom. Primena cisplatina izazvala je povećanu produkciju IL-6 u oštećenim bubrezima. Pojačana ekspresija IL-6 rezultirala je povećanjem regulacije anti-oksidativnih enzima u upaljenom bubrežnom parenhimu što je sprečilo razvoj bubrežne disfunkcije. Analogno tome, genetska delecija IL-6 značajno je smanjila aktivnost SOD i povećala ekspresiju markera oksidativnog stresa u bubrezima oštećenim cisplatinom (Mitazaki i sar, 2011; Volarić i sar, 2019).

Eksperimentalne studije pokazale su da upotreba antioksidantnih supstanci može umanjiti oštećenja bubrega izazvanih cisplatinom (Naziroglu i sar, 2004; Dickey i sar, 2005; Tsuruya i sar, 2003; Sener i sar, 2000;). Protektivni efekti na pacijentima nisu dovoljno ispitani. Važno je napomenuti da prirodni antioksidanti mogu smanjiti produkciju ROS u bubrezima i biti potencijalni protektivni agensi kod cisplatinog nefrotoksičnosti, bez umanjenja citostatskog efekta ovog leka (Pabla i Dong, 2008).

2.4.2. Hepatotoksičnost cisplatina

Hepatotoksičnost je manje poznat aspekt lečenja cisplatinom i malo je informacija o osnovnom mehanizmu toksičnosti. Nedavne studije sugerišu da oksidativni stres takođe igra važnu ulogu u hepatotoksičnosti izazvanoj primenom cisplatina (Nakshbandi i sar, 2012). Karakterizacija ćelijskih i molekularnih mehanizama koji su uključeni u hepatotoksičnost izazvanu cisplatinom, posebno uloga mitohondrija, predstavlja još uvek izazov za nauku. Defekti u mitohondrijama u vezi sa oksidativnim oštećenjima verovatno imaju ključnu ulogu u ćelijskoj smrti izazvanoj cisplatinom (Birsen i sar, 2006; Rodrigues i sar, 2011). Utvrđena je direktna veza između disfunkcije mitohondrija i toksičnih efekata antikancerogenih lekova

(Burgeiro i sar, 2011). Takođe su zabeležene interakcije između antitumorskih lekova i transfera elektrona u mitohondrijama (Rohlena i sar, 2011).

Studije hepatotoksičnosti cisplatina sugerišu da povećana produkcij ROS, sa posledičnim oštećenjem funkcije i strukture mitohondrija, može uticati na oštećenje jetre. Studija Waseem i sar. (2015) na izolovanim hepatocitima pacova koji su tretirani cisplatinom ukazuje na indukovanje metaboličkih procesa u mitohondrijama, porast oksidativnog stresa koji je uzrokovan izmenjenim aktivnostima respiratornih enzima u jetri i toksične efekte cisplatina na hepatocitima. Postoje studije koje dokazuju da je hepatotoksičnost cisplatina dozno zavisna, da može doći do porasta serumskih vrednosti enzima jetre, aspartat-amonptransferaza (AST) i alanin-aminotransferaza (ALT), kao i nastanka steatoze i holestaze u većim dozama (Cavalli i sar, 1978; Hill i sar, 1975).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Tokom istraživanja korišćeni su plodovi biljne vrste *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott (aronija). Plodovi su sakupljeni u trećoj godini uzgoja, u periodu pune zrelosti, sa eksperimentalnih polja sertifikovanih za organsku proizvodnju, koja se nalaze u okolini grada Šapca u Srbiji, tokom avgusta 2018. godine. Plod aronije je ljubazno obezbeđen od strane firme Conimex trade d.o.o. Nadmorska visina područja na kome je uzgajana aronija korišćena tokom eksperimentalnog rada iznosi 68 m, sa koordinatama 44,75° severne geografske širine i 19,69° istočne geografske dužine, a karakteriše se umereno-kontinentalnim klimatskim uslovima. Prosečni prečnik i težina plodova iznosili su 7,2 mm, odnosno 1,2 g.

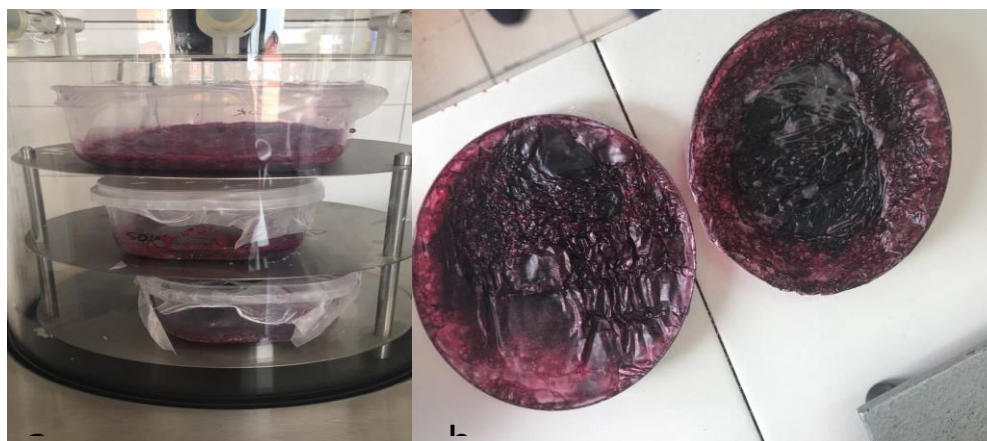
3.1.1. Priprema ekstrakata i soka aronije

Za potrebe eksperimenta, pripremljena su tri različita uzorka, sok od aronije (AS), ekstrakt ploda aronije (AE), kao i ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE). Najpre je, za proizvodnju soka od aronije, svež plod presovan u presi specijalizovanoj za ceđenje voća (Bucher Vaslin, Francuska), u fabrici "Vino Župa" u Aleksandrovcu. Tako isceden i dobijen sok je zamrznut i sačuvan do narednih eksperimenata. Druga dva uzorka su pripremana tako što su ceo plod aronije, kao i ostatak nakon ceđenja, tzv. otpadni materijal (eng. *waste*), sušeni u trajanju od 48 h u laboratorijskoj sušnici (Instrumentaria ST 01/02, Zagreb, Hrvatska) na 40°C, a zatim usitnjeni u industrijskom mlinu (UMČ-20, Biljotehnika), u proizvodnom pogonu Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić, u Pančevu. Usitnjen biljni materijal je prosejan pomoću sita prema propisima Pete Jugoslovenske farmakopeje (Yugoslavian Pharmacopoeia - Ph Yug V, 2000), kako bi se dobila frakcija od 0,75 do 2 mm. Ovako dobijen biljni material skladišten je i čuvan na sobnoj temperaturi do ekstrakcije.

Za ekstrakciju biljnog materijala (uzorci ploda aronije i ostatka ploda nakon ceđenja soka) korišćena je tradicionalna metoda ekstrakcije, maceracija. U erlenmajeru zapremine 100 ml vršeno je mešanje na laboratorijskom šejkeru (Unimax 1010, Heidolph, Germany), uz rotaciju od 170 rpm/min) tokom 60 minuta, na sobnoj temperaturi. Za ekstrakciju je korišćen 50% etanol i odnos droga rastvarač 1:20. Ovakvi ekstrakcioni uslovi ranije su odabrani kao

optimalni za ekstrakciju najveće količine aktivnih principa iz ploda aronije (Ćujić i sar, 2016).

Nakon postupka ekstrakcije, etanol je uparen pomoću rotacionog vakuum uparivača (Büchi CH, Switzerland), i tako dobijeni uzorci su korišćeni za liofilizaciju. Uzorci uparenih ekstrakata su zamrznuti na -80° , a zatim liofilizovani na -60°C (pri pritisku 0,011 mbar) tokom 24 sata i na -60°C (pri pritisku od 0,0012 mbar) tokom dodatnih sat vremena, kako bi se uklonili kapilarni ostaci vode (Beta 1-8 Freeze Drier, Martin Christ, GmbH, Osterode am Harz, Nemačka). Dobijeni liofilizovani ekstrakti označeni su kao AE (ekstrakt ploda) i AOE (ekstrakt ostatka ploda nakon ceđenja soka). Sok od aronije, pomenut na početku teksta je takođe liofilizovan pod istim uslovima i označen kao AS.



Slika 3.1. Liofilizovani uzorci dobijeni od plodova aronije (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), korišćeni u istraživanju

3.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Modifikovana Folin-Ciocalteu metoda korišćena je za određivanje sadržaja ukupnih fenola u liofilizovanim ekstraktima i soku (Waterman i Mole, 1994). Ukratko, 200 μl uzorka (u odgovarajućim razblaženjima) dodato je u 1 ml razblaženog Folin-Ciocalteu reagensa (1:10). Nakon 4 min, dodato je 800 μl natrijum-karbonata (75 g/l). Nakon 2 sata inkubacije na sobnoj temperaturi, u mraku, apsorbancija je izmerena na 765 nm korišćenjem spektrofotometra (Hewlett Packard, 400N). Kao standard za kalibraciju korišćena je galna kiselina (0–100 mg/l). Količina ukupnih fenolnih jedinjenja izražena je kao miligram

ekvivalenta galne kiseline po gramu liofilizovanih ekstrakata i soka (mg GAE/g) (Waterman i Mole, 1994). Sve analize rađene su u tri ponavljanja i rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.2.2. *Određivanje sadržaja ukupnih antocijana*

Sadržaj ukupnih antocijana u liofilizovanim ekstraktima i soku određivan je spektrofotometrijski, prema prethodno opisanom postupku u Evropskoj farmakopeji 9.0. (2017), sa malim izmenama. Apsorbanca rastvora je izmerena na 528 nm, koristeći 0,1% (v/v) rastvor hlorovodonične kiseline u metanolu kao slepu probu. Sadržaj antocijana u liofilizovanim uzorcima, izražen je preko cijanidin-3-*O*-glukozida, a korišćena je formula:

$$A \times 5000 / 718 \times m,$$

gde je A-apsorbanca na 528 nm; 718-specifični apsorbcioni koeficijent cijanidin-3-*O*-glukozida na 528 nm; m-masa liofilizovanog uzorka koji se ispituje, u gramima. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta cijanidin-3-*O*-glukozida po gramu liofilizovanih ekstrakata ili soka (European Pharmacopoeia 9.0, 2017). Sve analize rađene su u tri ponavljanja i rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.2.3. *Određivanje sadržaja ukupnih proantocijanidina*

Sadržaj ukupnih proantocijanidina određivan je korišćenjem *p*-dimetilaminocinamaldehyd (*p*-DMACA) reagensa, spektrofotometrijskom metodom, uz male modifikacije (Li i sar, 1996). 100 ml liofilizovanog uzorka pomešano je sa 80 ml reagensa *p*-DMACA, 2 ml metanola i jednom kapi glicerola. Nakon 7 min, apsorbanca se određivala na 640 nm. Sadržaj ukupnih proantocijanidina u uzorcima izražen je kao miligram ekvivalenta katehina po gramu liofilizovanog uzorka (Li i sar, 1996). Sve analize rađene su u tri ponavljanja i rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.2.4. *Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida*

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim uzorcima određivan je spektrofotometrijski prema Loizzo i saradnika (2012), sa malim modifikacijama. Metoda određivanja je zasnovana na formiranju kompleksa flavonoid-aluminijum. Reakciona smeša je pripremljena sa 200 μ l rastvora uzoraka, 800 μ l destilovane vode i 60 μ l 5% (m/v) natrijum-nitrita. Nakon 5 minuta, smeši je dodato 60 μ l 10% (v/v) aluminijum-hlorida, zatim nakon 6 min 400 μ l 1M

natrijum-hidroksida, a zatim destilovana voda kako bi se dobila ukupna zapremina od 2 ml. Posle centrifugiranja od 3000 rpm/min u trajanju od 5 min, apsorbancija je očitana odmah na 510 nm. Kvercetin je korišćen kao standard, a sadržaj ukupnih flavonoida izražen je kao miligram ekvivalenta kvercetina po gramu liofilizovanih uzoraka (Loizzo i sar, 2012). Sve analize rađene su u tri ponavljanja i rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.2.5. Kvantitativna analiza antocijana i flavonoida (HPLC analiza)

Kvantitativna analiza pojedinačnih antocijana i flavonoida u liofilizovanim uzorcima vršena je korišćenjem tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC analiza) na Agilent series 1200 RR HPLC aparatu (Agilent, Waldbronn, Germany), sa DAD detektorom, na reverzno-faznoj koloni Lichrospher RP-18 (Agilent, 250 x 4 mm, sa veličinom pora od 5 μ m). Antocijani su izdvojeni korišćenjem mobilne faze koja se sastojala od rastvarača A (10% rastvor of mravlje kiseline u vodi) i rastvarača B (acetonitril). Razdvajanje je vršeno sledećim gradijentom: 1% B 0-0.5 min; 1-7% B 0.5-1 min; 7% B 1-4 min; 7-10% B 4-7.5 min; 10-14% B 7.5-11.5 min; 14-25% B 11.5-15.5 min; 25-40% B 15.5-18.5 min; 40-75% B 18.5-22 min; 75% B 22-25 min. Protok je podešen na 1 ml/min, a detekcija vršena na 290, 350 and 520 nm. Na osnovu kalibracionih kriva standarda antocijana, cijanidin-3-*O*-galaktozida, cijanidin-3-*O*-glukozida i cijanidin-3-*O*-arabinozida, izračunat je sadržaj antocijana (Ćujić i sar, 2018).

Flavonoidi su razdvojeni pod sledećim uslovima: mobilna faza se sastojala od rastvarača A (1% rastvor ortofosforne kiseline u vodi) i mobilne faze B (acetonitrila). Razdvajanje je vršeno gradijentom prema sledećoj šemi: 90-80% A 0-5 min, 80% 5-20 min, 80-40% A 20-30 min, 40-0% A 30-35 min. Detekcione talasne dužine su podešene na 260 i 350 nm, a protok je bio 1 ml/min. Kvantitativna analiza pojedinačnih flavonoida, rutina, hiperozida i izokercitrina urađena je pomoću kalibracionih krivi pomenutih standarda (Ćujić i sar, 2018).

Sadržaji antocijana i flavonoida predstavljeni su u miligramima po gramu suve materije (mg/g suve materije). Sve analize rađene su u tri ponavljanja i rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

3.3.1. *Određivanje antioksidativne aktivnosti u DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) sistemu*

Antioksidativna aktivnost ekstrakata i soka aronije ispitivana je u DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) sistemu na osnovu njihove sposobnosti da "hvataju" i neutrališu slobodne radikale, prema metodi opisanoj od strane Kostić i saradnika (2015). Određivanje antioksidativne aktivnosti u DPPH sistemu zasnovano je na redukciji DPPH· radikala u DPPH-H, pri čemu se boja rastvora menja iz ljubičaste u žutu. U udubljenja mikrotitarske ploče dodaje se po 120 µl metanola i 40 µl ispitivanog rastvorenog uzorka u rastućim koncentracijama. Zatim se dodaje po 40 µl metanalnog rastvora DPPH reagensa (0,2 mg/ml), sadržaj se kratko pomeša na laboratorijskom šejkeru i ostavi na tamnom mestu 30 minuta. Apsorbance dobijenih rastvora mere se na 550 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland).

Procenat inhibicije stvaranja DPPH slobodnih radikala izračunat je na osnovu sledeće formule:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = [(AK-AA)/(AK-AS)] \times 100,$$

gde je A- apsorbanca kontrolnog reagensa (rastvarač + rastvor DPPH), AA- apsorbanca rastvora analiziranog ekstrakta ili soka, AS- apsorbanca slepe probe tj. čistog rastvarača. Na osnovu dobijenih procenata inhibicije i koncentracije ispitivanog uzorka konstruisane su prave pomoću kojih su definisane IC₅₀ vrednosti (koncentracija uzorka koja neutrališe 50% slobodnih radikala). Kao standard za poređenje korišćena su jedinjenja sa visokom i potvrđenom antioksidativnom aktivnošću kao što su α-tokoferol, askorbinska kiselina, butil hidroksitoluol (BHT) ili butil hidroksianizol (BHA) (Kostić i sar, 2015). Sve analize rađene su u tri ponavljanja i rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

3.3.2. *Određivanje antioksidativne aktivnosti u β-karoten-linolna kiselina sistemu*

Određivanje antioksidativne aktivnosti u β-karoten-linolna kiselina sistemu vršeno je prema metodi Kostić i saradnika (2015). Ovom metodom procenjuje se sposobnost ispitivanog uzorka da inhibira lipidnu peroksidaciju i zaštiti molekul linolne kiseline, pri čemu dolazi do smanjenja "trošenja" β-karotena koji bi u odsustvu ekstrakta ili soka imao ulogu antioksidansa. Kao posledica toga, zadržava se žute boja sistema koja potiče od β-

karotena. Rastvor β -karotena u hloroformu (2 mg u 10 ml) prenosi se u balon i uparava na vakuum uparivaču na 40°C, zajedno sa linolnom kiselinom (50 μ l) i emulgatorom Tween 20 (360 mg). Nakon potpune evaporacije hloroforma, u balon se dodaje 100 ml oksigenisane destilovane vode uz jače mešanje kako bi se formirala emulzija. Slepu probu predstavlja emulzija u odsustvu β -karotena. 200 μ l vodene emulzije prenosi se u mikrotitarsku ploču i meša sa 25 μ l rastućih razblaženja ispitivanih uzoraka. Mikrotitarske ploče se inkubiraju 120 minuta na 55°C, a apsorbanca rastvora se mere na 450 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland). Procenat inhibicije računat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{120}/A_0) \times 100\%,$$

gde je A_0 – apsorbanca pre inkubiranja i A_{120} – apsorbanca nakon 120 minuta inkubacije.

Koncentracija uzorka koja štiti 50% β -karotena (IC_{50}) izračunata je iz odnosa koncentracije ispitivanog uzorka i procenta inhibicije. Kao pozitivna kontrola korišćena su jedinjenja sa visokom i potvrđenom antioksidativnom aktivnošću kao što su α -tokoferol, askorbinska kiselina, butil hidroksitoluol (BHT) ili butil hidroksianizol (BHA) (Kostić i sar, 2015). Sve analize rađene su u tri ponavljanja i rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.4. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

3.4.1. Mikrobiološki sojevi

In vitro antimikrobna aktivnost ekstrakta i soka plodova biljne vrste *A. melanocarpa* ispitivana je na tipskim laboratorijskim sojevima bakterija i gljiva proizvedenim od strane American Type Culture Collection (ATCC). Korišćene Gram (+) bakterije bile su: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 10876 i *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Predstavnici Gram (-) bakterija bili su: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Proteus mirabilis* ATCC 12453. *Candida albicans* ATCC 15313 korišćena je za procenu antifungalne aktivnosti ekstrakata i soka.

3.4.2. Mikrodiluciona metoda

Antibakterijska i antifungalna aktivnost ekstrakata i soka ploda aronije određivana je mikrodilucionom metodom opisanom od strane CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) (2005). Ispitivani sojevi mikroorganizama uzgajani su na hranljivom i saburo-dekstroznom agaru i od tih kultura napravljena je suspenzija u sterilnom fiziološkom rastvoru turbiditeta 0,5 McFarlanda koja sadrži $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (CFU, eng “colony forming units”) za bakterije i $1,5 \times 10^7$ CFU/ml za kvasce. Odgovarajuće podloge za bakterije – Mueller-Hinton bujon (MHB) i za kvasac – saburo-dekstrozni bujon (SDB) su pripremljene, sterilisane i razlivene u sterilne epruvete (10 ml), a zatim inokulisane sa po 133 μ l suspenzije mikroorganizama, kako bi se dobio konačan broj od 2×10^6 CFU/ml. Serija razblaženja uzoraka (ekstrakta i soka) napravljena je korišćenjem 10% vodenog rastvora dimetil sulfoksida (DMSO). U mikrotitarske ploče pipetirana je inokulisana podloga i serija duplih razblaženja uzoraka, u rasponu od 0,1–100 μ l/ml. Ukupna zapremina u udubljenju ploče isnosila je 100 μ l, dok je gustina suspenzije 2×10^6 CFU/ml za bakterije i 2×10^5 CFU/ml za kvasac. Inkubacija mikrotitarskih ploča vršena je 24h na 37°C za bakterije i 48h na 25°C za gljive (CLSI, 2005; Kostić, 2019). Eksperiment je radjen u triplikatu.

Doksiciklin i nistatin korišćeni su kao pozitivne kontrole, u opsegu koncentracija od 0,008 do 16 μ g/ml. Inokulisana MHB ili SDB podloga predstavljala je jednu negativnu kontrolu rasta, dok je druga kontrola bila inokulisana hranljiva podloga sa serijom dvostrukih razblaženja rastvarača u opsegu od 0,004 do 15 μ l/ml. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) predstavlja najnižu koncentraciju gde nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama. Dodavanjem po 20 μ l 0,5% vodenog rastvora 2,3,5-trifenil-tetrazolijum-hlorida (TTC) vršena je detekcija mikrobiološkog testa obzirom da TTC vrši bojenje živih, poraslih kolonija u crveno (Sartoratto i sar, 2004). Kako bi se odredila minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija (MBC) sadržaj iz svih udubljenja u kojima nije došlo do razvijanja crvene boje, prenešen je na Petrijeve ploče sa Mueller-Hinton agarom koje se inkubiraju 24h na 37°C za bakterije, tj. sa saburo-dekstroznim agarom inkubirane 48h na 25°C za gljive. Nakon inkubacije kolonije mikroorganizama su izbrojane i određena MBC/MFC (najniža koncentracija uzorka pri kojoj je ubijeno 99,9% inokulisanih mikroorganizama) (CLSI, 2005).

3.5. ISPITIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA

Spazmolitička aktivnost ekstrakata i soka ploda aronije ispitivana je na segmentima ileuma pacova *Wistar* soja. Uticaj ekstrakta (AE), ekstrakta ostatka ploda nakon ceđenja (AOE) i soka (AS) aronije praćen je na spontanim i indukovanim (stimulisanim) kontrakcijama izolovanog ileuma. Kontrakcije su stimulisane acetilholinom, kalijum-hloridom, barijum-hloridom, kalcijum-hloridom i histaminom. Takođe je vršena primena blokatora azot-oksida sintetaze, N ω -nitro-L-arginin metil estra (L-NAME). Praćeni su i efekti najzastupljenijeg antocijana u ekstraktima i soku, cijanidin-3-*O*-galaktozida, na spontanim, acetilholinom i kalijum-hloridom indukovanim kontrakcijama. Ekstrakti, sok i cijanidin-3-*O*-galaktozid aplikovani su u obliku 10% vodenog rastvora. Svi eksperimenti su rađeni u šest ponavljanja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). EC₅₀ vrednosti predstavljaju koncentraciju ispitivanog uzorka koja je izazvala 50% maksimalnog odgovora (računato regresionom analizom).

3.5.1. Eksperimentalne životinje

Sve eksperimentalne procedure sa životinjama odobrene su od strane Etičkog komiteta i u skladu su sa Evropskom Direktivom 2010/63/EU za eksperimente na životinjama (dozvola Etičkog komiteta Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprave za veterinu, rešenje broj 323-07-04034/2018-05/2).

U istraživanju su korišćeni *Wistar* albino pacovi (180 - 220 g), muškog pola, koji su uzgajani u vivarijumu Naučno-istraživačkog centra za biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Životinje su bile smeštene u žičanim kavezima od nerđajućeg čelika i čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura prostorije u granicama od 20-24°C, 12-časovni dnevni režim). U svakom trenutku imale su pristup hrani i vodi, pri čemu im se 24 časa pre početka eksperimenta ukidala hrana.

3.5.2. Izolovanje i priprema ileuma pacova

Ekperimentalna procedura na ileumu pacova predhodno je opisana u istraživanjima Bigović i saradnika (2010) i Branković i saradnika (2011). Nakon otvaranja trbušne duplje izolovani su segmenti ileuma i odvojeni od mezenterijuma. Pripremljeni segmenti ileuma pacova dužine 2 cm postavljani su u kupatilo za izolovane organe zapremine 20 ml koje

sadrži Tirodov rastvor, temperature 37°C. U kupatilo se konstantno uvodila smeša kionika (95%) i ugljendioksida (5%). Tirodov rastvor bio je sledećeg sastava: 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2,00 mM, MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0,4 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM CaCl₂ i 5,5 mM glukoze. Fragmenti ileuma su bili rastegnuti i uravnoteženi najmanje 30 min pre započinjanja eksperimenata. Nakon svakog ispitivanja, tkivo je isprano svežim rastvorom i uravnoteženo tokom 10 minuta (Miladinović i sar, 2018; Bigović i sar, 2010; Branković i sar, 2011). Promena crevne kontraktilnosti zabeležene su korišćenjem transdjusera (Transducer-TSZ-04-E, Experimetria doo, Budimpešta, Mađarska), i analizirane SPEL Advanced ISOSIS sistemom za prikupljanje podataka (Ekperimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska).

3.5.3. Ispitivanje uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3-O-galaktozida na spontane kontrakcije ileuma pacova

Prva serija eksperimenta bila je ispitivanje efekta AE, AOE i AS (0,005 – 1,5 mg/ml) i cijanidin-3-O-galaktozida (0,15 – 0,5 mg/ml), na spontane kontrakcije ileuma pacova. Ekstrakti, sok i cijanidin-3-O-galaktozid kumulativno su dodavani u kupatilo za izolovane organe i dobijene su krive koje pokazuju dozno-zavistan odgovor. Rezultati su dobijeni iz razlike površina ispod kriva pre i nakon dodavanja preparata i jedinjenja. Papaverin (alkaloid sa spazmolitičkim delovanjem) je korišćen kao pozitivna kontrola (Miladinović i sar, 2018; Bigović i sar, 2010; Branković i sar, 2011).

3.5.4. Ispitivanje uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3-O-galaktozida na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

Drugi eksperimentalni set obuhvatao je ispitivanje efekata AE, AOE, AS i cijanidin-3-O-galaktozida na kontrakcije izolovanog ileuma indukovane acetilholinom. Acetilholin je u kupatilo dodavan u rastućim koncentracijama (5, 15, 50, 150, 500 i 1500 nM) i na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je kontrolna kriva zavisnosti koncentracija – efekat (kontrakcija). Zatim su segmenti ileuma isprani Tirodovim radi stabilizacije i uspostavljanja spontanih kontrakcija. Nakon toga, u kupatilo je dodavan ispitivani uzorak u koncentraciji od 0,5 mg/ml i 5 minuta kasnije acetilholin u pomenutim koncentracijama. Formirana je nova kriva kontrakcija indukovanih acetilholinom u prisutvu ekstrakata, soka ili dominantnog antocijana. Ovaj postupak je ponovljen i sa ekstraktima i sokom u većoj koncentraciji (1,5 mg/ml). Opuštanje segmenata ileuma koji su prethodno kontrahovani acetilholinom izraženo je u procentima kontrolnog odgovora ovog agonista (spazmolitički efekti u prisustvu i

odsustvu preparata aronije porede se sa efektima samog acetilholina). Atropin (140 nM) je korišćen kao kontrola (neselektivni blokator muskarinskih receptora) (Miladinović i sar, 2018; Bigović i sar, 2010; Branković i sar, 2011).

3.5.5. Ispitivanje uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3-O-galaktozida na KCl indukovane kontrakcije ileuma pacova

Treći set eksperimenta usmeren je na ispitivanje uticaja preparata aronije i cijanidin-3-O-galaktozida na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Za stimulisanje kontrakcija korišćen je 80 mM kalijum hlorid (KCl). Ove kontrakcije inhibisane su dodavanjem AE, AOE i AS (0,005 – 1,5 mg/ml) i cijanidin-3-O-galaktozida (0,15 – 0,5 mg/ml). Na isti način dodavan je i verapamil kao pozitivna kontrola (antagonist kalcijumovih kanala) u koncentracijama 0,015 do 1,5 µg/ml. Relaksantni efekti preparata aronije na ileumu pacova, prekontrahovanim dodatkom KCl, izraženi su u procentima inhibicije efekta kalijuma (Miladinović i sar, 2018; Bigović i sar, 2010; Branković i sar, 2011).

3.5.6. Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na CaCl₂ indukovane kontrakcije ileuma pacova

Kako bi ispitali da li je spazmolitička aktivnost preparata ploda aronije posredovana blokadom kalcijumovih kanala, ispitivan je uticaj AE, AOE i AS na kontraktilnost ileuma pacova koja je indukovana kumulativnim dozama kalcijum-hlorida (0,01 - 3 mM). Segmenti ileuma su primarno stabilisani u medijumu bez Ca²⁺ jona. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je kontrolna kriva zavisnosti koncentracija – efekat (kontrakcija). Koncentracijski zavisna kriva dobijena je u prisustvu i u odsustvu ispitivanih preparata. Prvo je u kupatilo dodavan ispitivani uzorak u koncentraciji od 0,5 mg/ml i 5 minuta kasnije CaCl₂ u pomenutim koncentracijama. Formirana je nova kriva kontrakcija indukovanih CaCl₂ u prisutvu ekstrakata ili soka aronije. Ovaj postupak je ponovljen i sa ekstraktima i sokom u većoj koncentraciji (1,5 mg/ml). Opuštanje segmenata ileuma koji su prethodno kontrahovani dodatkom CaCl₂ izraženo je u procentima kontrolnog odgovora CaCl₂ (spazmolitički efekti u prisustvu i odsustvu preparata aronije porede se sa efektima kontrakcije indukovane dodatkom CaCl₂). Verapamil je korišćen kao pozitivna kontrola (Miladinović i sar, 2018; Bigović i sar, 2010; Branković i sar, 2011).

3.5.7. Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na $BaCl_2$ indukovane kontrakcije ileuma pacova

Naredni eksperimentalni set obuhvatao je ispitivanje efekata AE, AOE i AS na kontrakcije izolovanog ileuma indukovane dodatkom barijum-hlorida ($BaCl_2$). $BaCl_2$ je u kupatilo dodavan u rastućim koncentracijama (3 – 900 μM) i na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je kontrolna kriva zavisnosti koncentracija – efekat (kontrakcija). Zatim su segmenti ileuma isprani Tirodovim rastvorom i stabilisani u kupatilu kako bi se uspostavile spontane kontrakcije. Nakon toga, u kupatilo je dodavan ispitivani uzorak u koncentracijama od 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml, a 5 minuta kasnije $BaCl_2$ u pomenutim koncentracijama. Formirana je kriva kontrakcija indukovanih dodatkom $BaCl_2$ u prisutvu ekstrakata. Spazmolitički efekti u prisustvu i odsustvu preparata aronije porede se sa efektima koje izaziva sam $BaCl_2$ i izražavaju se u procentima kontrolnog odgovora $BaCl_2$ (Branković i sar, 2011).

3.5.8. Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova

Ispitivanje efekata AE, AOE i AS na kontrakcije izolovanog ileuma indukovane dodatkom histamina (5 - 1500 nM) vršeno je u narednom delu eksperimenta, po istom principu kao i kod kontrakcija indukovanih jonima Ba^{2+} i Ca^{2+} . Formiraju se krive kontrakcija u prisustvu i odsustvu preparata aronije i ovi efekti se porede sa efektima samog histamina (Bigović i sar, 2010).

3.5.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka na kontrakcije ileuma pacova u prisustvu blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME)

U poslednjem setu eksperimenta ispitivan je uticaj preparata aronije na kontrakcije ileuma u prisustvu blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME) (Sedighi i sar, 2014). Rastvori ekstrakata i soka aronije dodati su u kumulativnim koncentracijama u kupatilo za izolovane organe (0,005 - 1,5 mg/ml) i konstruisane su krive koje pokazuju procenat izazvane kontrakcije (kontrolne krive). Nakon toga u kupatilo je pre primene ekstrakata i soka u navedenim koncentracijama dodat rastvor L-NAME (100 μM). Efekti ispitivanih preparata izračunati su na osnovu razlike površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije kontraktilnosti (Sedighi i sar, 2014).

3.6. ISPITIVANJE VAZORELAKSANTNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOJ AORTI PACOVA

Vazorelaksanta aktivnost ekstrakata i soka ploda aronije ispitivana je na izolovanoj torakalnoj aorti pacova *Wistar* soja. Uticaj ekstrakta (AE), ekstrakta ostatka ploda nakon ceđenja soka (AOE) i soka (AS) aronije praćen je na indukovanim (stimulisanim) kontrakcijama izolovane aorte. Uticaj ekstrakata i soka aronije na kontraktilnost izolovane aorte pacova praćen je u prirustvu KCl, L-NAME i fenilefrina (FE). Kao pozitivna kontrola korišćen je verapamil (blokator kalcijumskih kanala). Svi eksperimenti su rađeni u šest ponavljanja.

3.6.1. Eksperimentalne životinje

Sve eksperimentalne procedure sa životinjama odobrene su od strane Etičkog komiteta i u skladu su sa Evropskom Direktivom 2010/63/EU za eksperimente na životinjama (dozvola Etičkog komiteta Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprave za veterinu, rešenje broj 323-07-04034/2018-05/2).

U istraživanju su korišćeni *Wistar albino* pacovi (180 - 220 g), muškog pola, koji su uzgajani u vivarijumu Naučno-istraživačkog centra za biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Životinje su bile smeštene u žičanim kavezima od nerđajućeg čelika i čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura prostorije u granicama od 20-24°C, 12-časovni dnevni režim). U svakom trenutku imale su pristup hrani i vodi, pri čemu im se 24 časa pre početka eksperimenta ukidala hrana.

3.6.2. Izolovanje i priprema torakalne aorte pacova

Ekperimentalna procedura na aorti pacova predhodno je opisana od strane Wu i saradnika (2006) i Branković i saradnika (2016). Nakon otvaranja grudnog koša izolovana je torakalna aorta pacova. Segmenti aorte brzo su preneti u oksigenisani Krebsov rastvor temperature 4°C, gde su pažljivo očišćeni od okolnog tkiva i isečeni su prstenovi dužine 3-5 mm. Aortni prstenovi postavljeni su u kupatilo za izolovane organe (20 ml) i uravnoteženi najmanje 30 min pre započinjanja eksperimenata. Krebsov rastvor bio je sledećeg sastava: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂·2H₂O, 2,6 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ i 5,5 mM glukoze; pH 7,4; konstantna temperatura od 37°C i kontinuirano uviđenje smeše kiseonika i ugljen-dioksida (5% CO₂ u O₂). Promene aortne kontraktilnosti

zabeležene su korišćenjem transdjusera (Transducer-TSZ-04-E, Experimetria doo, Budimpešta, Mađarska), i analizirane SPEL Advanced ISOSIS sistemom za prikupljanje podataka (Ekperimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska) (Wu i sar, 2015).

3.6.3. Ispitivanje uticaja ekstrakata i soka ploda aronije na kontraktilnost aorte pacova

Da bi se ispitao uticaj preparata aronije na kontraktilnost izolovane aorte, aortni segmenti dužine 3-5 mm pojedinačno su postavljeni u kupatilo za izolovane organe. Kontrakcije izolovane aorte izazvane su kalijum-hloridom (K^+ , 80 mM) i fenilefrinom (FE, 1 μ M). Vazodilatatorni efekti AE, AOE i AS ispitivani su na endotel-intaktnim segmentima izolovane aorte. Efekti preparata aronije procenjivani su i u prisustvu blokatora azot-oksida sinteze (L-NAME, 0,1 mM), nakon indukovane kontrakcije dodatkom FE. Za farmakološku proveru integriteta endotelnog sloja korišćen je acetilholin. Ekstrakti i sok dodavani su u kumulativnim dozama (0,001 – 1 mg/ml) i rezultati su prikazani u procentima kontrolnog odgovora K^+ ili FE (vazorelaksantni efekti u prisustvu preparata aronije pored se sa efektima kontrakcije indukovane dodatkom K^+ ili FE). Verapamil (1 μ M) je korišćen kao pozitivna kontrola. Efekti ispitivanih preparata izračunati su na osnovu razlike površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije efekta (Ghayur i sar, 2012; Jabeen i sar, 2009).

3.7. ISPITIVANJE PROTEKTIVNIH EFEKATA EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE KOD PACOVA SA AKUTNIM OŠTEĆENJEM BUBREGA I JETRE IZAZVANIM CISPLATINOM

Eksperimentalna studija obuhvatala je 64 pacova *Wistar* soja, muškog pola, prosečne telesne mase 250 grama. Životinje su čuvane pod strogo kontrolisanim uslovima spoljašnje sredine, u Vivarijumu Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Sve eksperimentalne procedure sa životinjama su odobrene od strane Etičkog komiteta i u skladu su sa Evropskom Direktivom 2010/63/EU za eksperimente na životinjama (dozvole Etičkog komiteta Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprave za veterinu, rešenje broj 323-07-01762/2019-05/1).

Pacovi su smeštani u čiste, polikarbonske kaveze uz dvanaestočasovni dnevno-noćni ciklus. Temperatura prostorija bila je 20 ± 2 °C. Voda i komercijalna hrana specijalno prilagođena pacovima, bile su životinjama dostupne *ad libitum*. Nakon perioda adaptacije od sedam dana, sve eksperimentalne životinje su podeljene u osam grupa, gde je svaku grupu

činilo po osam pacova. Pacovima su intraperitonealno ili oralno (putem intragastrične sonde) aplikovani cisplatin (komercijalno dostupan lek, koncentrat za infuzioni rastvor koncentracije 1mg/ml, proizvođač - Pfizer (Perth) PTY. Limited), fiziološki rastvor i preparati aronije u sledećim dozama:

- Prva grupa (grupa AE) bila je grupa pacova kojima je oralno aplikovan ekstrakt aronije (AE) u dozi od 100 mg/kg TT putem intragastrične sonde tokom deset dana;
- Druga grupa (grupa AOE) bila je grupa pacova kojima je oralno aplikovan ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE) u dozi od 100 mg/kg TT putem intragastrične sonde tokom deset dana;
- Treća grupa (grupa AS) bila je grupa pacova kojima je oralno aplikovan sok aronije (AS) u dozi od 1,7 ml/kg TT putem intragastrične sonde tokom deset dana;
- Četvrta grupa (grupa AE+CIS) bila je grupa pacova kojima je oralno aplikovan AE u dozi od 100 mg/kg TT putem intragastrične sonde tokom deset dana i trećeg dana eksperimenta intraperitonealno cisplatin (jednokratno) u dozi od 8 mg/kg TT.
- Peta grupa (grupa AOE+CIS) bila je grupa pacova kojima je oralno aplikovan AOE u dozi od 100 mg/kg TT putem intragastrične sonde tokom deset dana i trećeg dana eksperimenta intraperitonealno cisplatin (jednokratno) u dozi od 8 mg/kg TT.
- Šesta grupa (grupa AS+CIS) bila je grupa pacova kojima je oralno aplikovan AS u dozi od 1,7 ml/kg TT putem intragastrične sonde tokom deset dana i trećeg dana eksperimenta intraperitonealno cisplatin (jednokratno) u dozi od 8 mg/kg TT.
- Sedma grupa (grupa K) bila je negativna kontrolna grupa, pacovima je aplikovan 1 ml fiziološkog rastvora jednom dnevno tokom deset dana;
- Osma grupa (grupa CIS) bila je pozitivna kontrolna grupa, pacovima je trećeg dana eksperimenta intraperitonealno aplikovan cisplatin (jednokratno) u dozi od 8 mg/kg TT.

Nakon završetka eksperimenta životinje su žrtvovane prekomernom dozom anestetika (Ketamidol 10%, Richter Pharma AG, Wels, Austria). Neposredno nakon žrtvovanja uzeto je po 2 ml krvi iz aorte za biohemijske analize. Tkivo bubrega i jetre svake eksperimentalne životinje je izolovano i podeljeno na dva dela, deo za patohistološke i deo za biohemijske analize (fiksacija u formalinu i homogenizacija).

3.7.1. Biohemijske analize

Biohemijske analize krvi životinja urađene su u laboratoriji Klinike za nefrologiju i hemodijalizu Kliničkog centra u Nišu. Biohemijske analize vršene su na automatskom analizatoru ERBA XL – 600 (ERBA Diagnostics Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Određivane su koncentracije kreatinina (CRE) i ureje (BUN) u plazmi kao pokazatelji akutnog bubrežnog oštećenja, aktivnost enzima aspartat-aminotransferaze (AST) i alanin-aminotransferaze (ALT) kao pokazatelj oštećenja jetre.

Parametri oksidativnog stresa određivani su u tkivnim homogenatima, plazmi i eritrocitima. Tkivo bubrega i jetre sečeno je na sitne komadiće i homogenizovano uz pomoć tkivnog homogenizatora (Xenox, Carl Roth GmbH, Nemačka) kako bi se pripremili 10% homogenati. Homogenati (10% w/v) su pripremani koristeći ledenu dejonizovanu vodu, a potom centrifugirani na 1500 x g, 10 minuta na 4°C. Prebačeni su u sterilne ependorf epruvete i čuvani na -80°C do korišćenja. U tkivnim homogenatima su određivani sledeći parametri pokazatelji oksidativnog stresa: nivo tiobarbiturna kiselina (TBA) reaktivnih supstanci (TBARS), nivo redukovanog glutationa (GSH) i aktivnost enzima katalaze (KAT). U plazmi je određivana aktivnost enzima KAT, a u eritrocitima je merena koncentracija TBARS. Parametri inflamacije određivani su u plazmi i tkivnim homogenatima (interleukin-6, interleukin-1 β i faktor nekroze tumora- α) korišćenjem komercijalnih ELISA kitova (R&D Systems® Quantikine® ELISA Kit). Deo izolovanog tkiva bubrega i jetre je korišćen za patohistološku analizu.

Koncentracija proteina u homogenatima tkiva bubrega i jetre određivana je metodom po Lowry-ju (Lowry, 1951) uz upotrebu goveđeg serumskog albumina kao standarda.

3.7.1.1. Određivanje koncentracije TBARS u homogenatima tkiva bubrega i jetre

Koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS), kao pokazatelj inteziteta lipidne peroksidacije, merena je spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malondialdehidom (MDA), kao krajnjim produktom lipidne peroksidacije, u kiseloj sredini na visokoj temperaturi. Tokom ove reakcije stvara se obojeni kondenzacioni proizvod – hromogen, koji sadrži jedan molekul MDA i dva molekula TBA. Apsorpcija nastalog obojenog produkta merena je na 532 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland), koncentracija TBARS preračunata je preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta 1,56 x 10⁵M⁻¹ cm⁻¹, a koncentracija je izražena u nmol po mg protein (Anreeva i sar, 1988).

3.7.1.2. *Određivanje koncentracije TBARS u eritrocitima*

Određivanje sadržaja TBARS u eritrocitima vršeno je po metodi Jain i saradnika (1990). Oprani eritrociti su resuspendovani 0,1 M fosfatnom puferu (pH=7,4) i nakon dodatka 30 % trihlorsirćetne kiseline (TCA) držani su na ledu 1 sat. Nakon centrifugiranja na 4000 rpm, na povišenoj temperature i u prisustvu TBA, apsorbanca nastalog obojenog jedinjenja čitana je na 532 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labystems, Finland). Dobijene vrednosti TBARS izražene su u nmoL po ml eritrocita (Jain i sar, 1990).

3.7.1.3. *Određivanje aktivnosti katalaze u homogenatima tkiva bubrega i jetre*

Aktivnost katalaze (KAT) u homogenatima tkiva pacova određivana je prema spektrofotometrijskoj metodi Goth i saradnika (1991). Metoda je bazirana na formiranju žutog stabilnog obojenog kompleksa H_2O_2 sa solima molibdena (amonijum – molibdatom). 100 μ l 10% homogenata pomešano je sa 2 ml H_2O_2 , nakon čega je smeša inkubirana na 37°C tokom 10 min. Nakon inkubacije izdvojeno je po 200 μ l supernatanta i pomešano sa 100 μ l amonijum–molibdata. Apsorbanca nastalog kompleksa čitana je na 410 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labystems, Finland), čime se posredno određuje sadržaj H_2O_2 . Aktivnost KAT izražava se kao količina enzima neophodna da razloži 1 μ mol H_2O_2 u jedinici vremena pod primenjenim uslovima. Standard predstavlja smešu H_2O_2 i amonijum–molibdata (bez ispitivanog uzorka). Razlika u apsorbancama standarda i uzorka jeste mera katalazne aktivnosti. Aktivnost enzima izražena je u mmol po mg proteina (Goth i sar, 1991).

3.7.1.4. *Određivanje aktivnosti katalaze u plazmi*

Aktivnost katalaze (KAT) u plazmi pacova određivana je prema već navedenoj spektrofotometrijskoj metodi Goth i saradnika (1991). 100 μ l plazme pacova pomešano je sa 2 ml H_2O_2 , nakon čega je smeša inkubirana na 37°C tokom 10 min. Nakon toga, dodat je 1 ml 10% trihlorsirćetne kiseline (TCA) i ponovo centrifugirana smeša na 3000 rpm tokom 10 minuta. Zatim je izdvojeno po 200 μ l supernatanta i pomešano sa 100 μ l amonijum–molibdata. Apsorbanca nastalog žutog kompleksa meri se na 410 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labystems, Finland), a aktivnost KAT izražava kao količina enzima neophodna da razloži 1 μ mol H_2O_2 u jedinici vremena pod primenjenim uslovima. Aktivnost enzima izražena je u katalitičkim jedinicama po litru plazme (U/L) (Goth i sar, 1991).

3.7.1.5. *Određivanje koncentracije redukovanog glutationa u homogenatima tkiva bubrega i jetre*

Koncentracija glutationa u homogenatima tkiva pacova određivana je prema metodi Tietze i saradnika (1969). Nivo redukovanog glutationa određivan je pomoću Elmanovog reagensa (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina, DTNB). Glutation je određivan u 10% homogenatima koji se dobijaju rastvaranjem isečaka tkiva u 0,02M Na₂EDTA puferu, a apsorbance obojenih produkata nastalih posle dodavanja DTNB-a očitavana je posle 3 minuta na 412 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland). Vrednost koncentracije glutationa je izražena nmol po mg proteina (Tietze i sar, 1969).

3.7.1.6. *Određivanje koncentracije interleukina-6, interleukina-1 β i faktora nekroze tumora- α u plazmi i homogenatima tkiva bubrega i jetre*

Koncentracije TNF- α , IL-6 i IL-1 β određivane su u plazmi i u supernatantima 2%-homogenata svežeg tkiva jetre i bubrega. Za određivanje koncentracije TNF alfa i IL-6 u plazmi i homogenatima tkiva i IL-1 β u homogenatima tkiva pacova korišćeni su komercijalni ELISA kitovi (Enzyme linked immunosorbent assay) specifični za biološki materijal pacova, u skladu sa uputstvima koje je dao proizvođač (R&D Systems[®] Quantikine[®] ELISA Kit). Apsorbance je očitana na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska) na 450 nm, vrednosti koncentracija parametara inflamacije u plazmi i tkivima računane su iz standardne krive, a rezultati su prikazani kao pg TNF- α , IL-6 i IL-1 β po ml plazme ili mg protein u tkivu bubrega i jetre pacova.

3.7.2. *Histopatološke analize tkiva pacova*

Tkivo bubrega i jetre svih eksperimentalnih grupa je fiksirano u 10% puferisanom rastvoru formaldehida (v/v; pH = 7,4) odmah nakon izolovanja u trajanju od 24h. Isečci debljine 5 mm su rutinski obrađeni u autotehnikonu (Leica Microsystems, Reuil-Malmaison, Francuska) u Centru za patologiju i patološku anatomiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Nakon izrade parafinskih kalupa, na mikrotomu (Leica Biosystems RM2245, Nemačka) su dobijeni isečci debljine 4 μ m koji su bojeni standardnom hematoksilin i eozin (H&E) tehnikom i perjodnom kiselinom-Šifovo bojenje (PAS). Semikvantitativna analiza uzoraka vršena je na svetlosnom mikroskopu Olympus BKS50 (Olimpus, Japan) opremljenim digitalnim fotoaparatom Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Nemačka) na različitim uvećanjima od strane dva sertifikovana patologa (LJV, ID). H&E bojenje je korišćeno za

analizu morfoloških promena u tkivima bubrega i jetre, dok je PAS bojenje korišćeno za analizu bazalne membrane kapilarnih petlji glomerula i tubulske bazalne membrane i procenu sadržaja glikogena u jetri. Semikvantitativna analiza oštećenja tkiva bubrega i jetre izvršena je prema unapred utvrđenoj skali: stepen oštećenja do 25% (-), od 25 do 50% (+), od 50 do 75% (++) i veći od 75% (+++).

3.8. STATISTIČKA ANALIZA

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni u statističkom paketu SPSS (verzija 20.0 SPSS, Inc., Chicago, IL). Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički. Kontinualne varijable prikazane su u vidu aritmetičke sredine i standardne devijacije. Normalnost raspodele kontinualnih varijabli utvrđena je Shapiro-Wilk testom. Poređenje vrednosti varijabli između dve grupe vršeno je Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka, ako je raspored normalan, ili Mann-Whitney testom, ukoliko raspodela odstupa od normalne. Za poređenje varijabli između više grupa korišćena je analiza varijanse ANOVA, ako je raspodela normalna, ili Kruskal-Wallis test, ukoliko raspodela odstupa od normalne. U slučaju ANOVA analize rađena je i odgovarajuća Post Hoc analiza kojom su se poredile varijable ponaosob između svakog modaliteta iste kategorijske varijable sa svakim. U korelacionoj analizi korišćen je Pirsonov koeficijent linearne korelacije. Statistički značajnim smatra se nivo značajnosti od $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. PRINOSI EKSTRAKCIJE

Ekstrahovanjem suvih plodova aronije koji su korišćeni za pripremu 50% etanolnog ekstrakta (AE), od počeno korišćenih 200 g suve droge dobijeno je 120 g liofilizovanog ekstrakta (prinos 60%). Ostatak dobijen nakon ceđenja soka osušen je i korišćen za pripremu 50% etanolnog ekstrakta označenog kao AOE. Od početnih 200 g droge, dobijeno je 90 g liofilizovanog AOE (prinos 45%). Liofilizacijom soka aronije (AS) (1700 ml) dobijeno je 192 g liofilizata.

4.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

Ekstrakti i sok ploda aronije karakterišu se visokim sadržajem fenolnih jedinjenja, među kojima su najzastupljeniji antocijani. U Tabeli 4.2.1. prikazan je sadržaj ukupnih fenola, antocijana, flavonoida i proantocijanidina u ispitivanim uzorcima aronije.

Tabela 4.2.1. Sadržaj ukupnih fenola, antocijana, flavonoida i proantocijanidina u ekstraktu (AE), ekstraktu ostatka (AOE) i soku (AS) ploda aronije.

	AE	AOE	AS
Jedinjenja	Količina		
Ukupni fenoli*	364,91 ± 66,44 ^a	702,77 ± 95,30 ^b	577,85 ± 82,71 ^b
Ukupni antocijani**	122,24 ± 25,66 ^a	456,82 ± 12,36 ^b	132,24 ± 18,96 ^a
Ukupni flavonoidi***	49,36 ± 6,88 ^a	31,95 ± 3,34 ^b	34,3 ± 5,54 ^b
Ukupni proantocijanidini****	107,05 ± 4,52 ^a	140,18 ± 8,07 ^b	120,44 ± 1,00 ^c

Sve vrednosti predstavljene su kao srednja vrednost (n=3) ± standardna devijacija. Različita slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju aktivnih jedinjenja između AE, AOE i AS (Tukey test, p<0,05). * mg GAE/g AE, AOE ili AS; ** mg cijanidin-3-O-glukozid ekvivalenata/g AE, AOE ili AS; *** mg katehina/g AE, AOE ili AS; **** mg katehin ekvivalenata/g AE, AOE ili AS.

Rezultati pokazuju da je najveća količina ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina detektovana u ekstraktu ostatka ploda nakon ceđenja soka (AOE) (702,77 ± 95,30, 456,82 ± 12,36 i 140,18 ± 8,07 mg GAE/g). AS je sadržao nešto manju količinu ukupnih fenola (577,85 ± 82,71 mg GAE/g) u poređenju sa AOE, dok je kod AE detektovana značajno manja količina ovih aktivnih principa (p<0,05). Antocijani kao najzastupljeniji među fenolima, bili su u približno istoj koncentraciji u AE i AS (122,24 ± 25,66 i 132,24 ± 18,96 mg cijanidin-3-O-glukozid ekvivalenata/g), koja se statistički značajno razlikovala od

koncentracije antocijana u AOE ($p < 0,05$). Sadržaj proantocijanidina bio je najveći u ekstraktu ostatka (AOE), nešto manji u soku (AS), dok je ekstrakt (AE) sadržao najmanju količinu ovih jedinjenja ($p < 0,05$). Što se tiče ukupnih flavonoida, pokazalo se da je AE znatno bogatiji flavonoidnim jedinjenjima ($49,36 \pm 6,88$ mg katehina/g), u poređenju sa AOE i AS ($p < 0,05$).

U Tabeli 4.2.2. prikazana je HPLC-DAD kvantifikacija jedinjenja u ekstraktima i soku ploda aronije. Određivan je sadržaj pojedinačnih antocijana i flavonoida (glikozidi cijanidina i kvercetina) u preparatima, kao i hlorogenske kiseline. Na snimljenim hromatogramima (Prilog 8) može se uočiti da je među cijanidin-glikozidima najzastupljeniji cijanidin-3-*O*-galaktozid u svim preparatima, a najveći sadržaj istog određen je u AOE ($6,63 \pm 0,3$ mg/g, $p < 0,05$). Cijanidin -3-*O*-arabinozid i cijanidin -3-*O*-glukozid očekivano su bili u AOE u najvećoj koncentraciji, obzirom da je u ovom preparatu detektovan i najveći sadržaj ukupnih antocijana. U soku aronije sadržaj pojedinačnih antocijana bio je neznatno veći nego u ekstraktu, bez statistički značajne razlike. Flavonoidima je bio najbogatiji ekstrakt aronije, pa je najveća količina pojedinačnih flavonoidnih jedinjenja i detektovana u AE ($p < 0,05$). Najzastupljeniji među flavonoidima u ekstraktu aronije bio je hiperozid ($0,31 \pm 0,09$ mg/g), koji se u ostala dva ispitivana preparata nalazio u veoma maloj količini (tragovima). AOE je u poređenju sa ekstraktom i sokom sadržao značajno manju količinu flavonoidnih jedinjenja. Najveći sadržaj hlorogenske kiseline kvantifikovan je u AOE ($4,89 \pm 0,09$ mg/g, $p < 0,05$).

Tabela 4.2.2. HPLC-DAD kvantifikacija jedinjenja u ekstraktu (AE), ekstrakt ostatka (AOE) i soku (AS) ploda aronije.

	AE	AOE	AS
Jedinjenja	Količina		
Hlorogenska kiselina	$3,53 \pm 0,32^a$	$4,89 \pm 0,09^b$	$3,12 \pm 0,29^a$
Cijanidin-3-<i>O</i>-galaktozid	$1,09 \pm 0,14^a$	$6,63 \pm 0,23^b$	$1,40 \pm 0,08^a$
Cijanidin -3-<i>O</i>-arabinozid	$0,43 \pm 0,08^a$	$2,69 \pm 0,16^b$	$0,49 \pm 0,03^a$
Cijanidin -3-<i>O</i>-glukozid	$0,15 \pm 0,05^a$	$0,88 \pm 0,06^b$	$0,18 \pm 0,01^a$
Kvercetin-3-<i>O</i>-rutinozid (rutin)	$0,28 \pm 0,04^a$	$0,07 \pm 0,01^b$	$0,16 \pm 0,01^c$
Kvercetin -3-<i>O</i>- galaktozid (hiperozid)	$0,31 \pm 0,09^a$	Tragovi	$0,03 \pm 0,02^b$
Kvercetin -3-<i>O</i>-glukozid (izokvercitrin)	$0,15 \pm 0,06^a$	Tragovi	$0,01 \pm 0,01^b$

Sve vrednosti predstavljene su kao srednja vrednost ($n=3$) \pm standardna devijacija i izražene kao mg/g AE, AOE ili AS.. Različita slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju aktivnih jedinjenja između AE, AOE i AS (Tukey test, $p < 0,05$).

4.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

U Tabeli 4.3.1. prikazani su rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti ispitivanih preparata ploda aronije. Pokazalo se da je najbolju antioksidativnu aktivnost u 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) sistemu ispoljio ekstrakt ostatka ploda nakon ceđenja soka (AOE) ($IC_{50} = 0,14 \pm 0,01$ mg/ml, $p < 0,001$), dok je preparat sa najslabijom aktivnošću bio ekstrakt aronije (AE) ($IC_{50} = 0,53 \pm 0,02$ mg/ml, $p < 0,001$). Sok aronije (AS) ispoljio je nešto slabiju aktivnost u DPPH sistemu u poređenju sa AOE ($p < 0,001$).

Suprotno rezultatima ispitivanja antioksidativne aktivnosti u DPPH sistemu, u β -karoten/linolna kiselina (BKL) testu preparat za najslabijom antioksidativnom aktivnošću bio je AOE ($IC_{50} = 0,68 \pm 0,11$ mg/ml, $p < 0,001$). AE ispoljio je nešto bolju aktivnost, dok se AS pokazao kao najpotentniji antioksidant ($IC_{50} = 0,17 \pm 0,01$ mg/ml, $p < 0,001$).

Standardi za poređenje antioksidativne aktivnosti, sintetski antioksidanti poput BHA – butil-hidroksianizola; BHT – butil-hidroksitoluena; α -TOK – alfa-tokoferola; AK – askorbinske kiseline, bili su očekivano potentniji antioksidanti od preparata aronije, u dva ispitivana test sistema (DPPH i BKL) *in vitro* ($p < 0,001$).

Tabela 4.3.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakta, ekstrakta ostatka i soka ploda aronije u 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) testu i β -karoten/linolna kiselina (BKL) testu.

	DPPH	BKL
	IC_{50} (mg/ml)	
AE	$0,53 \pm 0,02^a$	$0,41 \pm 0,02^a$
AOE	$0,14 \pm 0,01^b$	$0,68 \pm 0,11^b$
AS	$0,20 \pm 0,02^c$	$0,17 \pm 0,01^c$
	IC_{50} (μ g/ml)	
BHA	$2,44 \pm 0,09^d$	$0,04 \pm 0,01^d$
BHT	$22,82 \pm 2,07^e$	$0,03 \pm 0,00^e$
α -TOK	$10,40 \pm 1,73^f$	$0,15 \pm 0,00^f$
AK	$4,74 \pm 0,34^g$	$22,95 \pm 1,52^g$

IC_{50} =koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% slobodnih radikala; sve vrednosti predstavljene su kao srednja vrednost ($n=3$) \pm standardna devijacija. Različita slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u antioksidativnoj aktivnosti između ekstrakta (AE), ekstrakta ostatka (AOE) i soka (AS) aronije (Tukey test, $p < 0,05$). BHA – butil hidroksianizol; BHT – butil hidroksitoluen; α -TOK – alfa-tokoferol; AK – askorbinska kiselina.

Korelaciona analiza pokazuje povezanost IC_{50} vrednosti i sadržaja aktivnih komponenti, bilo pojedinačnih jedinjenja ili ukupnih fenola, antocijana, flavonoida i proantocijanidina. Povezanost je značajna ukoliko je koeficijent korelacije negativnog smera,

a njegova veličina pokazuje jačinu povezanosti. Rezultati ukazuju na jaku korelaciju DPPH antiradikalske aktivnosti preparata i sadržaja ukupnih fenola ($r=-0,874$, $p<0,01$) i proantocijanidina ($r=-0,819$, $p<0,01$), dok povezanost ukupnih antocijana i DPPH antioksidativne aktivnosti nije bila statistički značajna. Flavonoidi su sa antiradikalnom aktivnošću korelirali jako pozitivno ($r=0,904$, $p<0,01$), što bi značilo da oni ne doprinose ovoj aktivnosti. Najznačajni doprinos antiradikalnoj DPPH aktivnosti dao je najzastupljeniji antocijan, cijanidin-3-*O*-galaktozid ($r=-0,650$, $p<0,05$).

Kada je u pitanju ispitivanje antioksidativne aktivnosti u BKL sistemu, pokazalo se da korelacija sadržaja ukupnih fenola i proantocijanidina i ove antioksidativne aktivnosti nije statistički značajna, dok je u slučaju ukupnih antocijana ona bila jaka pozitivna ($r=0,845$, $p<0,01$), pa se može zaključiti da antocijani ovoj aktivnosti ne doprinose. Rezultati ispitivanja povezanosti pojedinačnih jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću u BKL sistemu pokazali su značajnu korelaciju sa antocijanima i hlorogenskom kiselinom, ali je ona bila pozitivnog smera i ukazivala da ova jedinjenja ne utiču na antioksidativnu aktivnost u BKL sistemu. Korelaciona analiza BKL antioksidativne aktivnosti i flavonoida daje koeficijente korelacije negativnog smera, ali bez statističke značajnosti.

4.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

Antimikrobna aktivnost preparata aronije ispitivana je na mikroorganizmima specifičnim za gastrointestinalni trakt. Korišćeni su sojevi Gram - pozitivnih i Gram – negativnih bakterija, kao i jedan fungalni soj. Rezultati su pokazali da je baktericidna aktivnost ekstrakata i soka aronije potpuno izostala (>100 mg/ml). Ispitivani preparati ispoljili su inhibitornu aktivnost na rast korišćenih mikrobioloških sojeva. Gram (+) bakterije bile su nešto osjetljivije na delovanje ekstrakata i soka aronije u odnosu na Gram (-) bakterije i kvasce. Najbolji antibakterijski efekat preparati su ispoljili prema Gram (+) bakteriji *Enterococcus faecalis* sa minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIC) od 1,56 mg/ml. Ispitivani ekstrakti i sok ispoljili su dobro antibakterijsko dejstvo i na *Staphylococcus aureus* (MIC = 6,25 mg/ml), dok je nešto slabija aktivnost bila prema *Bacillus cereus* (MIC = 12,5 mg/ml), sa izuzetkom ekstrakta ostatka nakon ceđenja soka (AOE) koji je imao bolju baktericidnu aktivnost u odnosu na druga dva preparata (MIC = 6,25 mg/ml). Nešto slabiju

aktivnost preparati su ispoljili prema bakteriji *Listeria monocytogenes* sa minimalnom inhibitornom koncentracijom koja je iznosila 12,5 mg/ml.

Među Gram (-) bakterijama, najosetljivija na dejstvo ekstrakata i soka aronije bila je *Enterobacter aerogenes* (MIC = 1,56 mg/ml). Preparati su dobre antibakterijske efekte ispoljili i prema bakteriji *Salmonella enteritidis* sa minimalnim inhibitornim koncentracijama od 12,5 mg/ml. Nešto slabije antibakterijsko dejstvo ekstrakti i sok aronije ispoljili su prema G (-) bakterijama kao što su *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis* (MIC = 50 mg/ml). *Pseudomonas aeruginosa* bila je osetljivija na dejstvo ekstrakata u poređenju sa sokom. Ekstrakti su u ovom slučaju imali izraženije antibakterijsko dejstvo (MIC = 25 mg/ml), dok je sok aronije bio slabijeg delovanja (MIC = 50 mg/ml).

Efekti prema gljivi *Candida albicans* bili su umereni, minimalna inhibitorna koncentracija za sva tri ispitivana preparata iznosila je 25 mg/ml. Rezultati pokazuju da je fungicidna aktivnost potpuno izostala (> 100 mg/ml).

U Tabeli 4.4.1. prikazani su rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata i soka aronije. Kao standardi za poređenje korišćeni su doksiciklin (antibiotik širokog spectra iz grupe tetraciklina) i nistatin (antifungalni lek). 10% dimetilsulfoksid (DMSO) korišćen je kao rastvarač i njegova antimikrobna aktivnost u navedenoj koncentraciji je izostala (pokazano je da antimikrobne efekte ispoljava tek u koncentraciji 12,5%).

Tabela 4.4.1. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije ekstrakata i soka aronije na bakterijske Gram (+) i Gram (-) sojeve i gljive.

MIC/MBC ili MIC/MFC (mg/ml)	MIKROBIOLOŠKI SOJEVI (ATCC IZVOR)									
	Gram (-) bakterije					Gram (+) bakterije				Fungalni soj
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	<i>Candida albicans</i> ATCC 15313
AS	50/>100	50/>100	1,56/>100	12,5/>100	50/>100	6,25/>100	1,56/>100	12,5/>100	12,5/>100	25/>100
AE	25/>100	50/>100	1,56/>100	12,50/>100	50/>100	6,25/>100	1,56/>100	12,5/>100	12,5/>100	25/>100
AOE	25/>100	50/>100	1,56/>100	12,50/>100	50/>100	6,25/100	1,56/>100	6,25/>100	12,5/>100	25/>100
DMSO (%)	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/12,5
Doksiciklin (MIC/MBC (µg/ml))	15,61/15,61	15,61/15,61	7,81/15,61	0,90/1,90	7,81/15,61	7,81/15,61	0,90/1,90	0,90/15,61	7,81/15,61	/
Nistatin (MIC/MFC (µg/ml))	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3,91/7,81

AS – sok aronije; AE – ekstrakt aronije; AOE – ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka; DMSO – dimetilsulfoksid.

4.5. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA

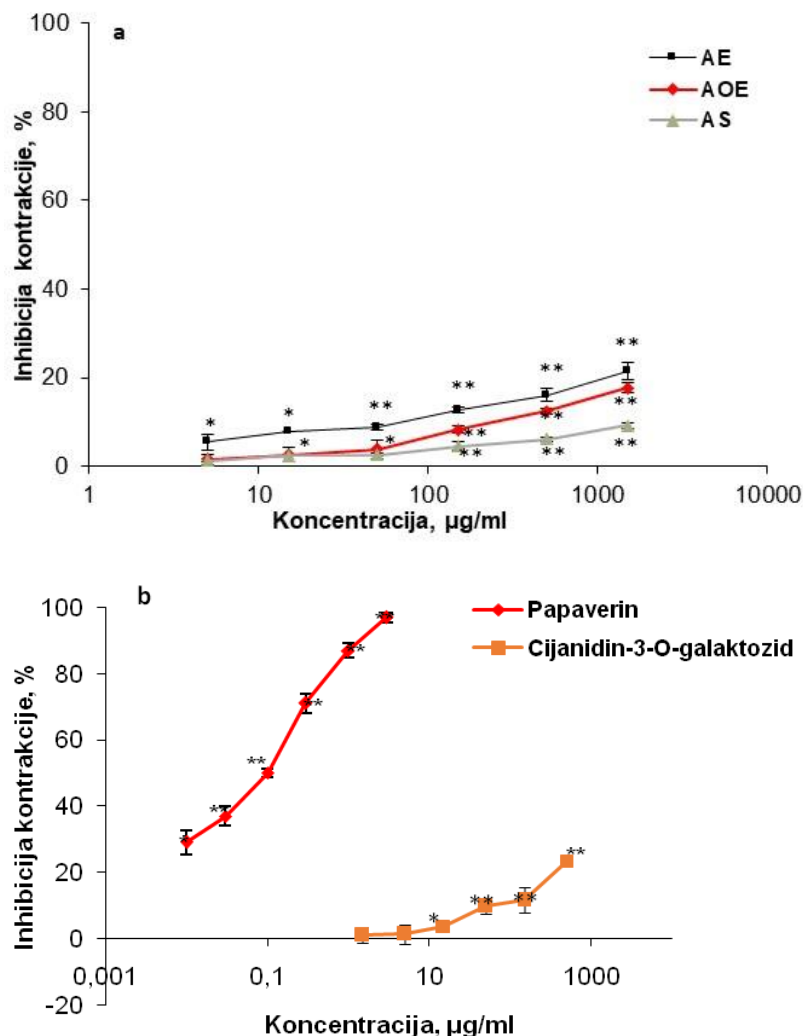
4.5.1. Uticaja ekstrakata, soka i cijanidin-3-O-galaktozida na spontane kontrakcije ileuma pacova

Obzirom da se ileum pacova spontano ritmički kontrahuje, efekti preparata aronije primarno su ispitivani bez upotrebe agonista. Ekstrakt aronije (AE) sa koncentracijama od 0,005 - 1,5 mg/ml, koncentracijski-zavisno je inhibirao spontane kontrakcije ileuma pacova (Slika 4.5.1.) sa $EC_{50} = 4,55 \pm 0,12$ mg/ml ($p < 0,01$). AOE i AS takođe su ublažili spontane kontrakcije u crevima, što je i u ovom slučaju bilo zavisno od koncentracije uzorka (0,005 - 1,5 mg/ml). Vrednosti EC_{50} iznosile su $4,58 \pm 2,05$ mg/ml za AOE i $10,05 \pm 0,89$ mg/ml, za AS. Glavno jedinjenje aronije, cijanidin-3-O-galaktozid (0,005 - 1,5 mg/ml) izazvalo je spazmolitički efekat smanjujući spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova, zavisno od koncentracije, $EC_{50} = 1,11 \pm 0,09$ mg/ml. Kao što se očekivalo, papaverin (0,015 - 1,5 μ g/ml), korišćen kao pozitivna kontrola, relaksirao je glatku muskulaturu ileuma ($EC_{50} = 0,12 \pm 0,01$ μ g/ml; $p < 0,01$). Statistička analiza pokazala je značajnu razliku između EC_{50} vrednosti ekstrakata, soka, glavnog antocijana i papaverina ($p < 0,01$). Poređenjem EC_{50} vrednosti AE i AOE nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) (Tabela 4.5.1.).

Table 4.5.1. EC_{50} vrednosti spontanih i KCl-indukovanih kontrakcija za AE, AOE, AS cijanidin-3-O-galaktozid i papaverin/verapamil (pozitivna kontrola). Statistička značajnost utvrđena je ANOVA testom sa Tukey post-hoc analizom.

	EC_{50} vrednosti za spontane kontrakcije (mg/ml)	EC_{50} vrednosti za KCl-indukovane kontrakcije (mg/ml)
AE	4.45 ± 0.12^a	1.85 ± 0.25^a
AOE	4.58 ± 0.20^a	2.98 ± 0.20^b
AS	10.05 ± 0.89^b	3.30 ± 0.16^c
Cijanidin-3-O-galaktozid	1.11 ± 0.09^c	1.05 ± 0.10^d
Papaverin / Verapamil	0.12 ± 0.01^d μ g/ml	0.63 ± 0.048^e μ g/ml

Različita slova u kolonama ukazuju na statistički značajnu razliku u EC_{50} vrednostima (Tukey test; $p < 0.01$). AE – ekstrakt ploda aronije; AOE – ekstrakt ostatka ploda nakon ceđenja soka; AS – sok aronije.

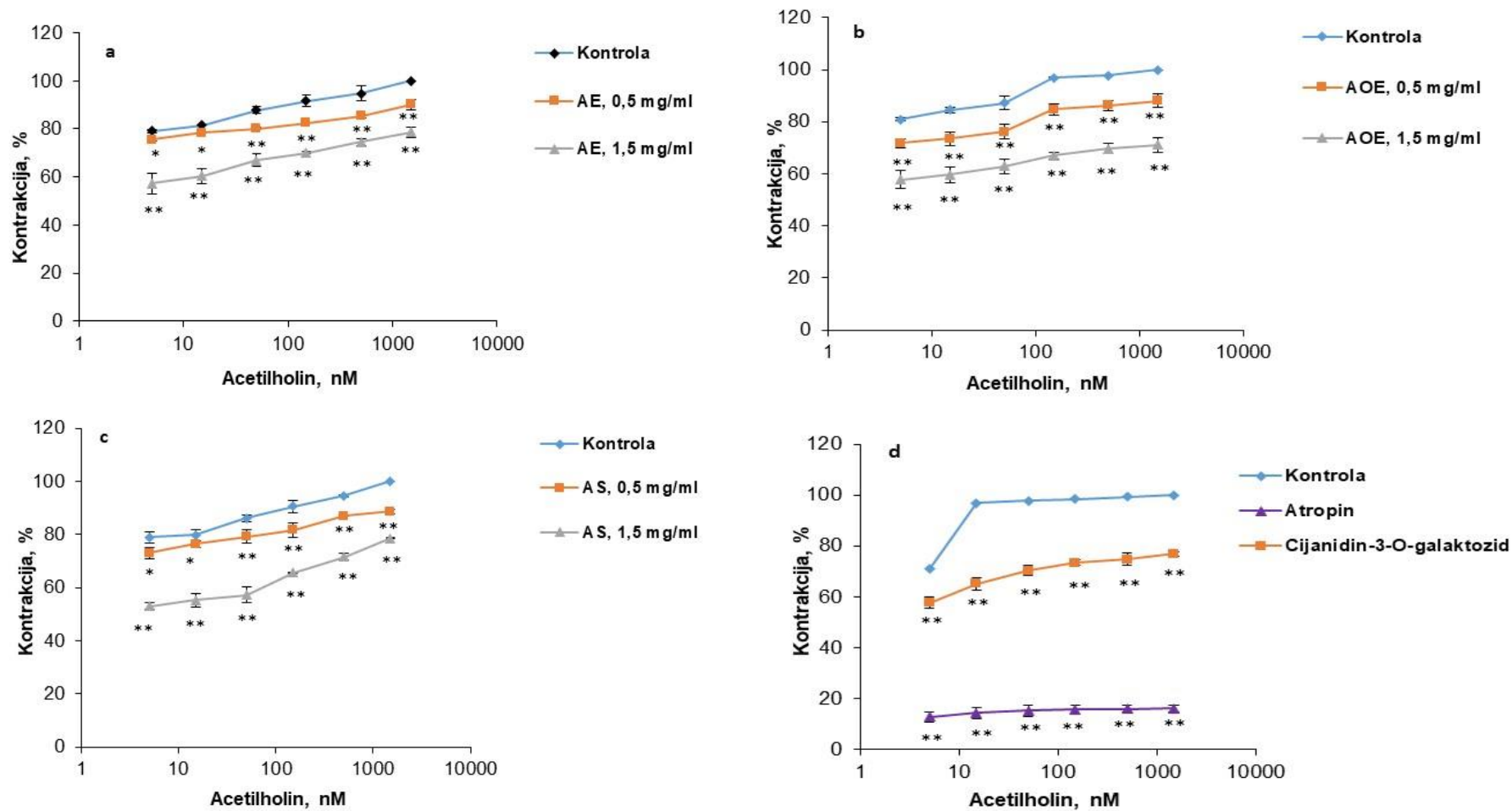


Slika 4.5.1. Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a), cijanidin-3-*O*-galaktozida i papaverina (b) na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Svaka tačka predstavlja srednje procentualne vrednosti kontrakcija u odnosu na spontane kontrakcije ileuma u Tirodovom rastvoru (kontrola) \pm SD, za šest segmenata. (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

4.5.2. Uticaj ekstrakata, soka i cijanidin-3-*O*-galaktozida na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

U drugoj eksperimentalnoj seriji ispitan je uticaj preparata aronije (AE, AOE, AS) i dominantnog antocijana cijanidin-3-*O*-galaktozida na acetilholinom (5 - 1500 nM) stimulisane kontrakcije izolovanog ileuma pacova (Slika 4.5.2.). AE i AOE u koncentracijama od 0,5 do 1,5 mg/ml inhibirali su kontrakcije ileuma indukovane acetilholinom, zavisno od koncentracije. AE i AOE uzrokovali su modifikaciju EC_{50} vrednosti samog acetilholina sa $0,09 \pm 0,001$ nM i $0,08 \pm 0,002$ nM (u odsustvu ekstrakata) na $1,11 \pm 0,03$ nM, odnosno $0,66 \pm 0,02$ nM, u koncentraciji od 1,5 mg/ml ($p < 0,01$).

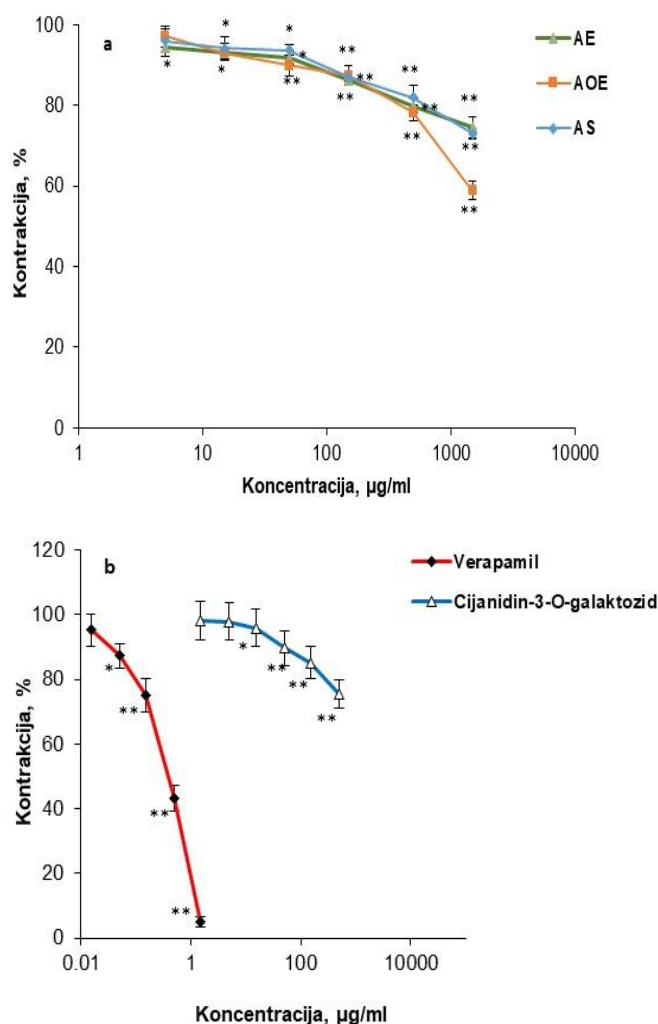
Inhibitorna aktivnost soka aronije (0,5 - 1,5 mg/ml) i cijanidin-3-*O*-galaktozida (0,15 - 0,5 mg/ml) takođe je dokazana kod kontrakcija indukovanih acetilholinom. Promena EC₅₀ vrednosti acetilholina (0,11 ± 0,01 nM i 0,22 ± 0,02 nM) dodatkom soka aronije iznosila je 0,46 ± 0,09 nM, dok je dodatkom cijanidin-3-*O*-galaktozida ona bila 0,48 ± 0,03 nM (p<0,01). Atropin, antagonist muskarinskih receptora (140 nM) blokirao je odgovor na acetilholin. EC₅₀ vrednost acetilholina od 0,1 ± 0,001 nM (u odsustvu atropina) promenjena je na 18261,96 ± 958,32 nM u prisustvu atropina (p<0,01).



Slika 4.5.2. Relaksantni efekti AE (a), AOE (b), AS (c), cijanidin-3-*O*-galaktozida i atropina (d) na acetilholinom-indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.5.3. Uticaj ekstrakata, soka i cijanidin-3-O-galaktozida na KCl indukovane kontrakcije ileuma pacova

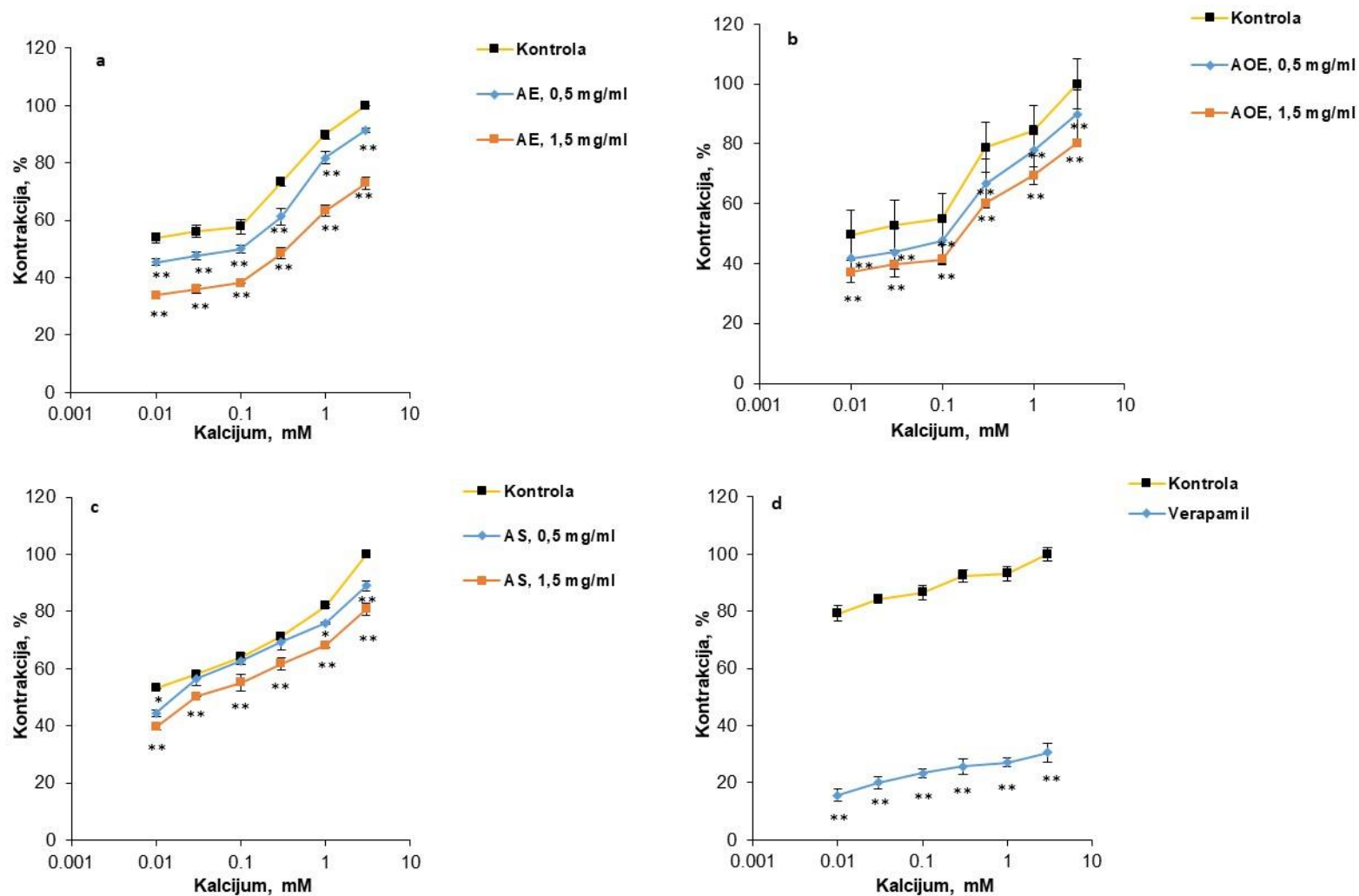
Dodavanje KCl (80 mM) u kupatilo za izolovane organe uzrokovalo je kontrakciju glatkih mišića ileuma pacova. AE i AOE (0,005 - 1,5 mg/ml) inhibirali su kontrakciju izazvanu KCl, koncentracijski zavisno, sa EC_{50} vrednostima $1,86 \pm 0,25$ mg/ml i $2,09 \pm 0,20$ mg/ml ($p < 0,01$). Sok aronije i cijanidin-3-O-galaktozid takođe su inhibirali kontrakcije indukovane dodatkom KCl. Srednje EC_{50} vrednosti za AS i cijanidin-3-O-galaktozid iznosile su $3,30 \pm 0,16$ mg/ml i $1,05 \pm 0,10$ mg/ml ($p < 0,01$). Verapamil (pozitivna kontrola) takođe je ublažio kontrakcije izazvane kalijum-hloridom. Vrednost EC_{50} bila je $0,63 \pm 0,048$ μ g/ml (Slika 4.5.3.). Statistička analiza pokazala je značajnu razliku između EC_{50} vrednosti ekstrakata, soka, glavnog antocijana i papaverina ($p < 0,01$) (Tabela 4.5.1.).



Slika 4.5.3. Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a), cijanidin-3-O-galaktozida i verapamila (b) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane KCl. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.5.4. Uticaj ekstrakata i soka na CaCl_2 indukovane kontrakcije ileuma pacova

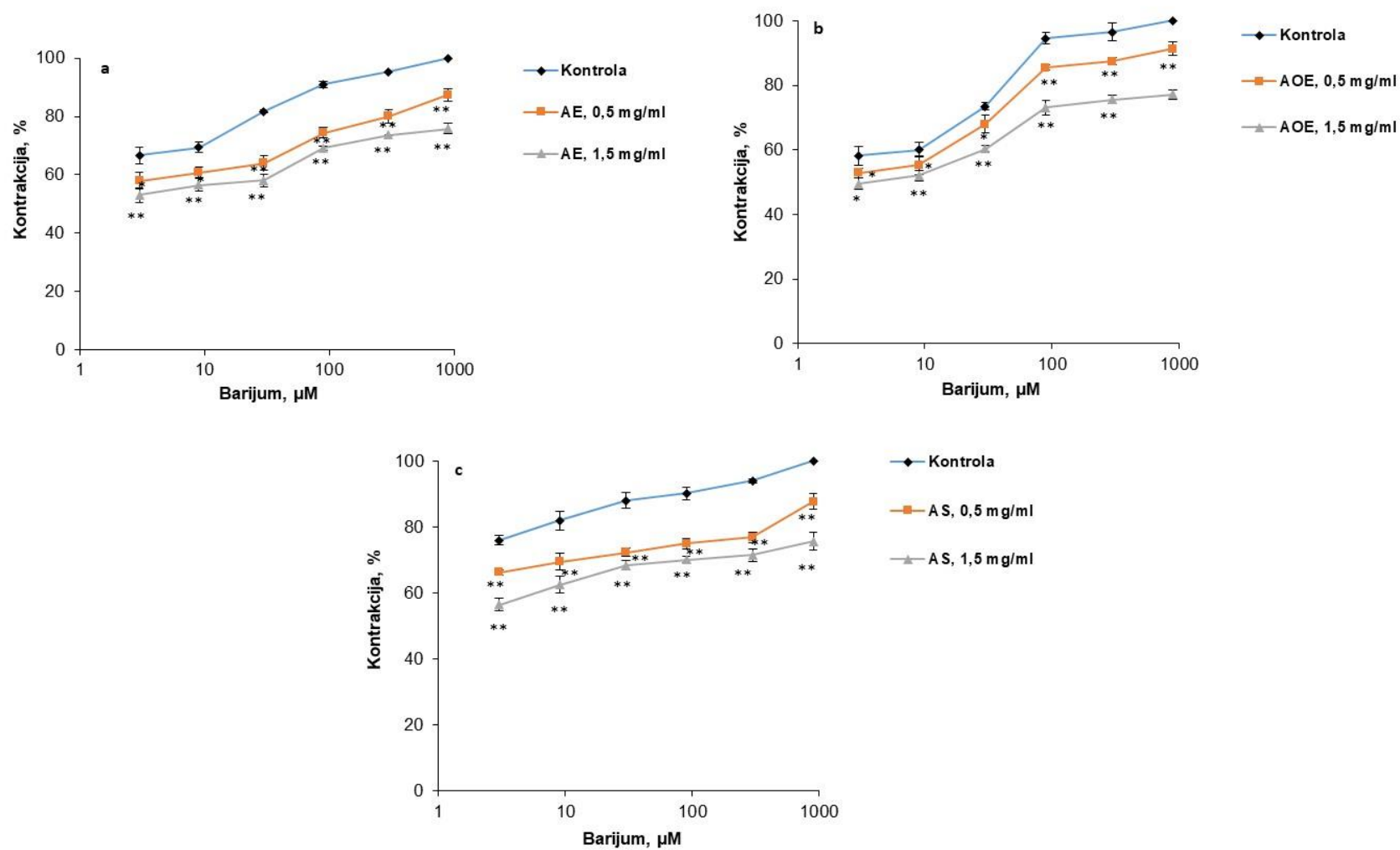
Na Slici 4.5.4. prikazani su efekti ekstrakta aronije (a), ekstrakta ostatka (b), soka (c) i verapamila (d) na kumulativne kalcijum hloridom (CaCl_2 ; 0,01 - 3 mM) indukovane kontrakcije u medijumu osobođenom Ca_2^+ jona, sa visokom konecentracijom K^+ jona. AE i AOE u koncentraciji 0,5 - 1,5 mg/ml, dozno zavisno su inhibirali kontrakcije indukovane CaCl_2 ($p < 0,01$). Vrednosti EC_{50} za kalcijumove jone koji indukuju kontrakciju bile su $0,009 \pm 0,0003$ mM i $0,011 \pm 0,0005$ mM. U prisustvu ekstrakata u koncentraciji od 1,5 mg/ml, EC_{50} vrednosti promenjene su i iznosile su $0,35 \pm 0,07$ mM za AE, odnosno $0,25 \pm 0,01$ mM za AOE. Sok aronije, takođe na način zavisian od doze, inhibirao je CaCl_2 indukovane kontrakcije ($p < 0,01$) sa promenom vrednosti EC_{50} kalcijumovih jona sa $0,011 \pm 0,009$ mM na $0,03 \pm 0,005$ mM, u prisutvu AS. Verapamil, blokator kalcijumovih kanala, izazvao je inhibiciju kontrakcija ileuma izazvanih kalcijumovim jonima. Vrednost EC_{50} za jone kalcijuma ($0,61 \pm 0,09$ mM) povećana je u prisustvu verapamila ($8,16 \pm 0,61$ mM).



Slika 4.5.4. Relaksirantni efekti AE (a), AOE (b), AS (c) i verapamila (d) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izdukovane CaCl_2 . Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.5.5. Uticaj ekstrakata i soka na BaCl₂ indukovane kontrakcije ileuma pacova

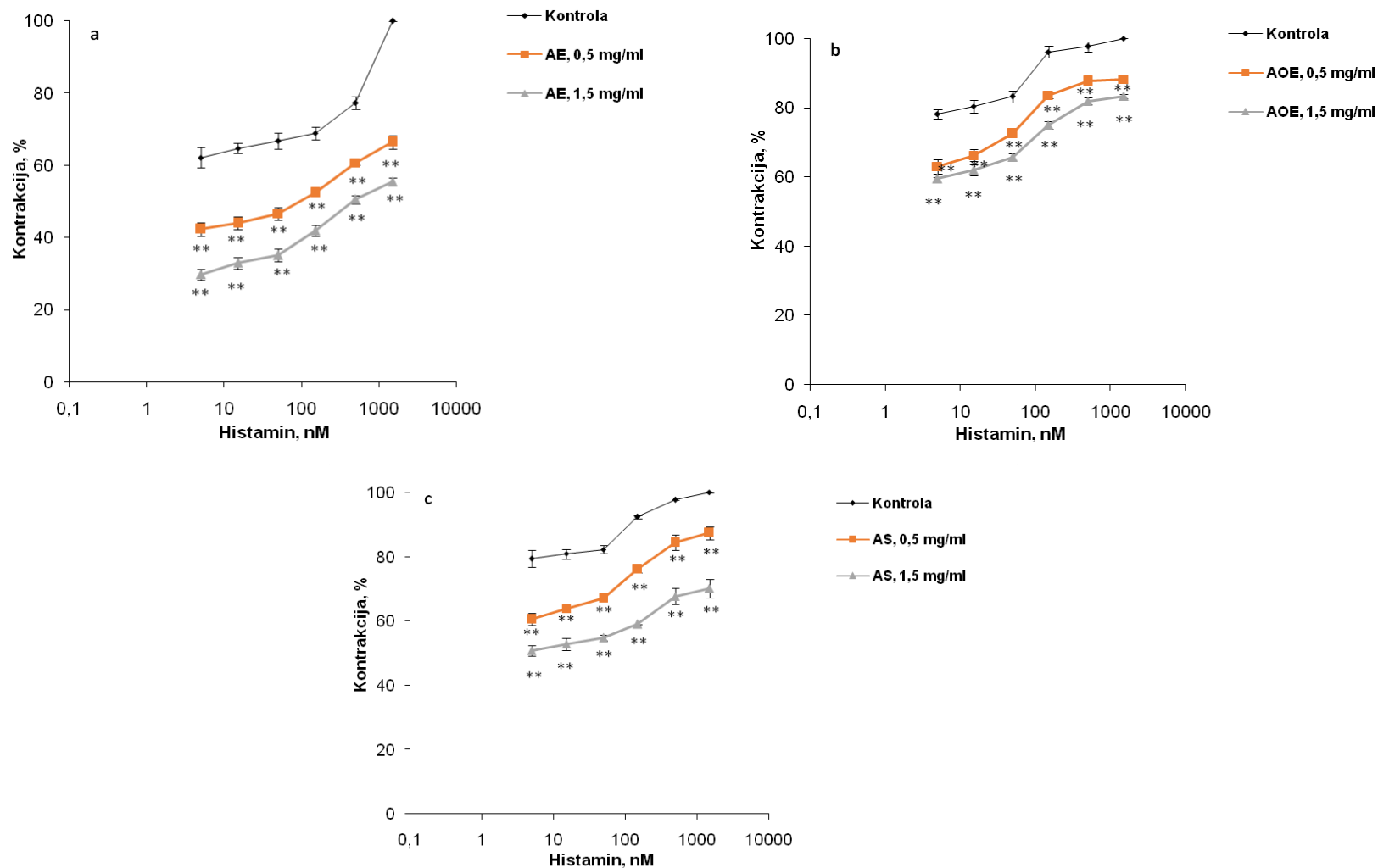
Efekti AE, AOE i AS na kontrakcije izazvane BaCl₂ (3 - 900 μM/ml) prikazani su na Slici 4.5.5. Inhibicija kontrakcija indukovanih dodatkom BaCl₂ preparatima aronije (500 - 1500 μg/ml) bila je dozno zavisna i statistički značajna ($p < 0,01$). EC₅₀ vrednosti BaCl₂ ($2,41 \pm 0,18 \mu\text{M}$ i $1,89 \pm 0,15 \mu\text{M}$), promenjene su na $19,97 \pm 0,98 \mu\text{M}$, u prisustvu AE u koncentraciji od 1500 μg/ml i $4,85 \pm 0,35 \mu\text{M}$, u prisustvu AOE u istoj koncentraciji ($p < 0,01$). Sok aronije je takođe smanjio kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane BaCl₂, dozno zavisno. Vrednost EC₅₀ za BaCl₂ ($1,93 \pm 0,18 \mu\text{M}$) povećana je na $2,29 \pm 0,28 \mu\text{M}$ u prisustvu AS (1500 μg/ml).



Slika 4.5.5. Relaksantni efekti AE (a), AOE (b) i AS (c) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane BaCl_2 . Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.5.6. Uticaj ekstrakata i soka na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova

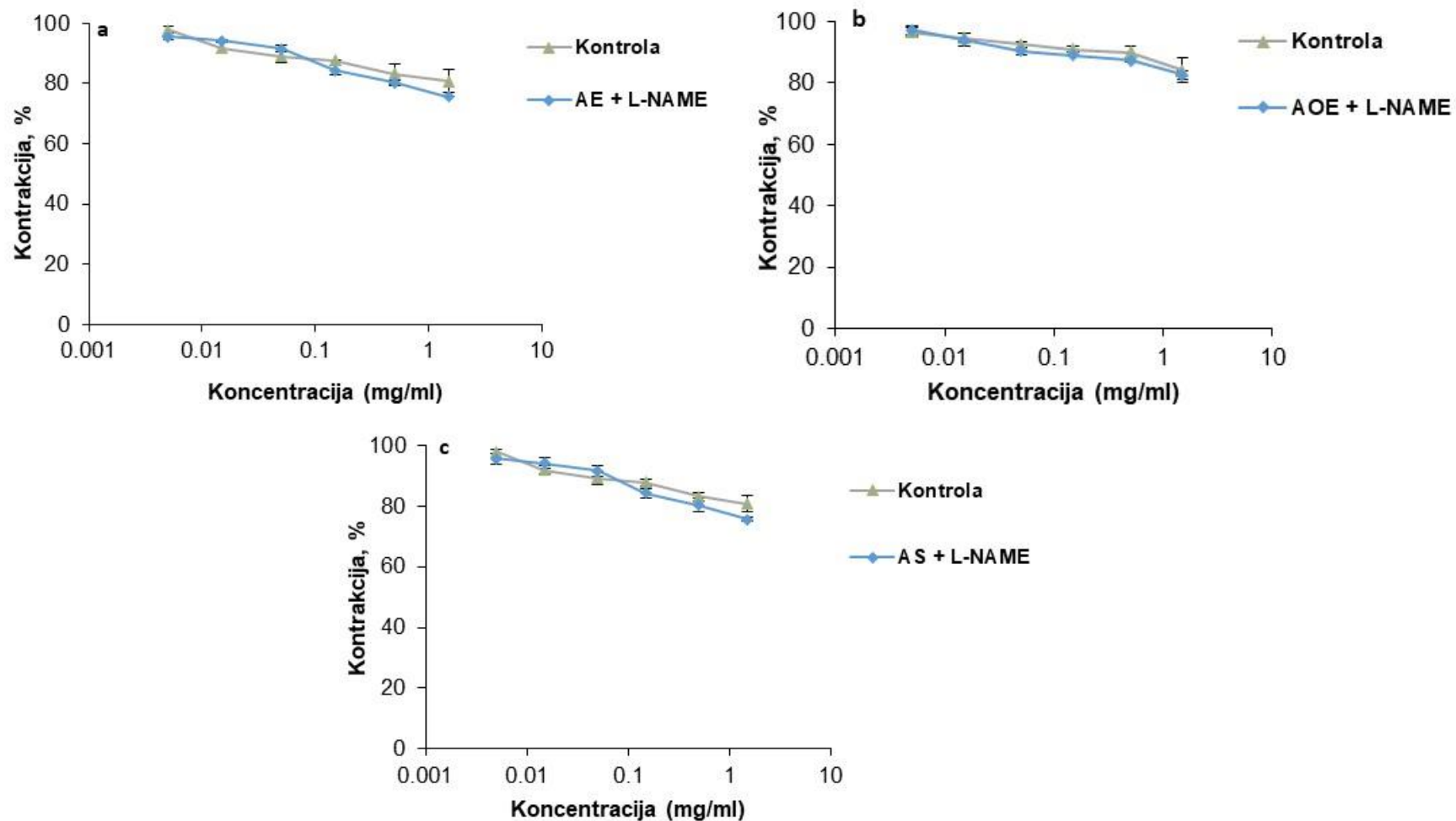
Histamin (5 - 1500 nM) je stimulisao kontraktilnu aktivnost izolovanog ileuma pacova. AE, AOE i AS (500 - 1500 $\mu\text{g/ml}$) značajno smanjuju kontrakcije indukovane histaminom, dozno zavisno ($p < 0,01$). EC_{50} vrednosti histamina ($2,43 \pm 0,35$ nM i $2,07 \pm 0,21$ nM) modifikovane su dodatkom AE i AOE u koncentraciji 1500 $\mu\text{g/ml}$ (EC_{50} za AE iznosila je $465,19 \pm 31,36$ nM, dok je za AOE bila $5,82 \pm 0,47$ nM), (Slika 4.5.6.). Vrednost EC_{50} za histamin ($2,01 \pm 0,15$ nM) povećana je na $3,86 \pm 0,18$ nM u prisustvu AS (1500 $\mu\text{g/ml}$).



Slika 4.5.6. Relaksantni efekti AE (a), AOE (b) i AS (c) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovanih histaminom. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.5.7. Uticaj ekstrakata i soka na kontrakcije ileuma pacova indukovane blokatorom azot-oksida sintetaze (L-NAME)

Azot oksid (NO) izaziva opuštanje glatkih mišića u gastrointestinalnom traktu i verovatno je da ispitivani preparati aronije nisu ispoljili spazmolitički efekat posredovan NO ili supstancama koja on oslobađa. U prisustvu L-NAME (100 μ M), selektivnog inhibitora sintaze azot-oksida, AE, AOE i AS uzrokovali su inhibiciju kontrakcije ileuma pacova (Slika 4.5.7.). Nije bilo značajne razlike u spazmolitičkoj aktivnosti preparata aronije u prisustvu i odsustvu L-NAME. Ovi relaksantni efekti preparata aronije uklonjeni su ispiranjem izolovanog ileuma pacova Tirodovim rastvorom, što ukazuje na to da je inhibitorna aktivnost reverzibilna.



Slika 4.5.7. Uticaj AE (a), AOE (b) i AS (c) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova u prisustvu L-NAME. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD, za šest segmenata.

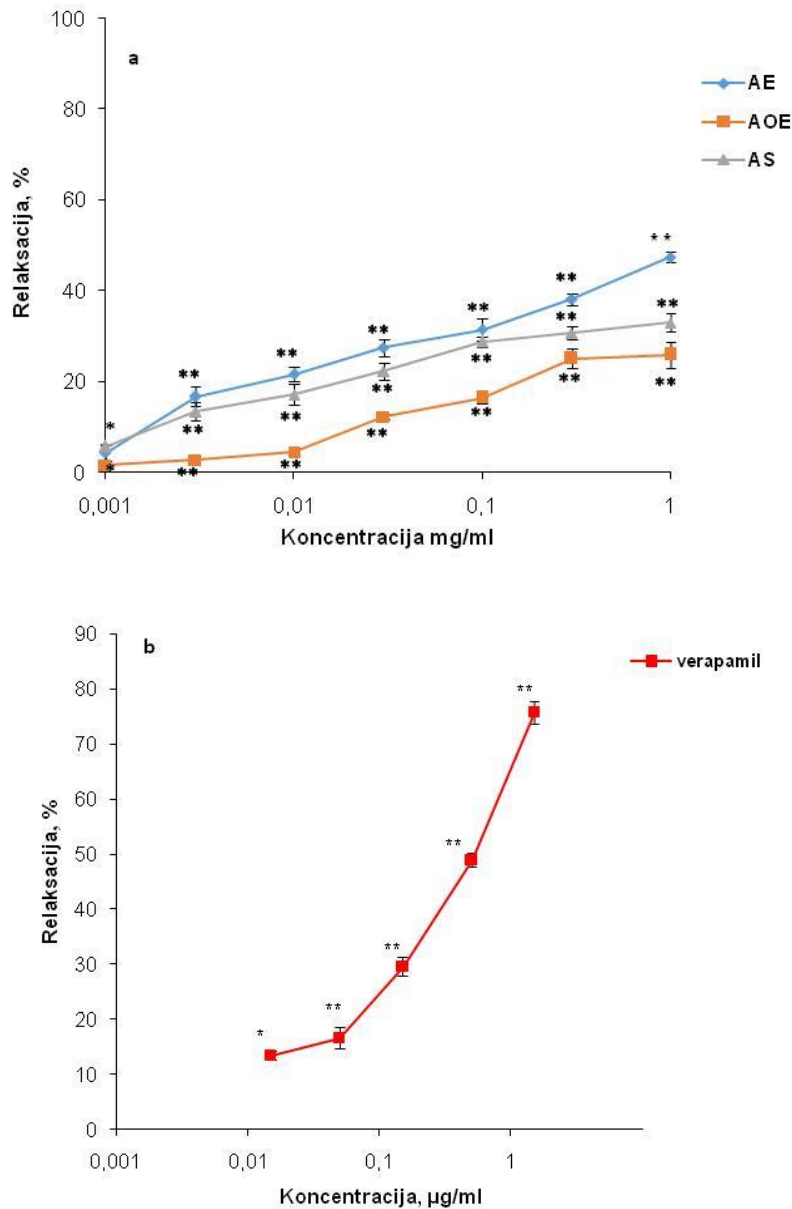
4.6. VAZORELAKSANTNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOJ AORTI PACOVA

Efekti ekstrakata i soka aronije na relaksaciju izolovane aorte pacova ispitivani su u prisustvu K^+ jona (80 mM) u prvoj eksperimentalnoj seriji (slika 4.6.1.) Dodavanjem KCl u kupatilo za izolovane organe izazvana je kontrakcija glatkih mišića aorte, koja je inhibirana dodatkom preparata aronije u kumulativnim koncentracijama (0,001 – 1 mg/ml). AE je pokazao najbolju aktivnost, sa EC_{50} vrednošću koja je iznosila $0,97 \pm 0,02$ mg/ml, i u najvećem procentu značajno relaksirao glatku muskulaturu aorte ($p < 0,01$). AOE ispoljio je najslabiju vazorelaksantnu aktivnost na KCl-indukovanim kontrakcijama aorte pacova ($EC_{50} = 1,95 \pm 0,12$ mg/ml). Sok je imao neznatno bolju aktivnost od AOE, sa EC_{50} vrednošću od $1,74 \pm 0,08$ mg/ml. Verapamil koji je korišćen kao pozitivna kontrola (1 μ M) relaksirao je glatke mišiće aorte ($EC_{50} = 0,77 \pm 0,01$ μ g/ml) ($p < 0,01$). ANOVA testom testirana je statistička značajnost razlika između EC_{50} vrednosti KCl-indukovanih kontrakcija za AE, AOE, AS i verapamil (Tabela 4.6.1.).

Table 4.6.1. EC_{50} vrednosti KCl-indukovanih i FE-indukovanih kontrakcija za AE, AOE, AS i verapamil (pozitivna kontrola). Statistička značajnost utvrđena je ANOVA testom sa Tukey post-hoc analizom.

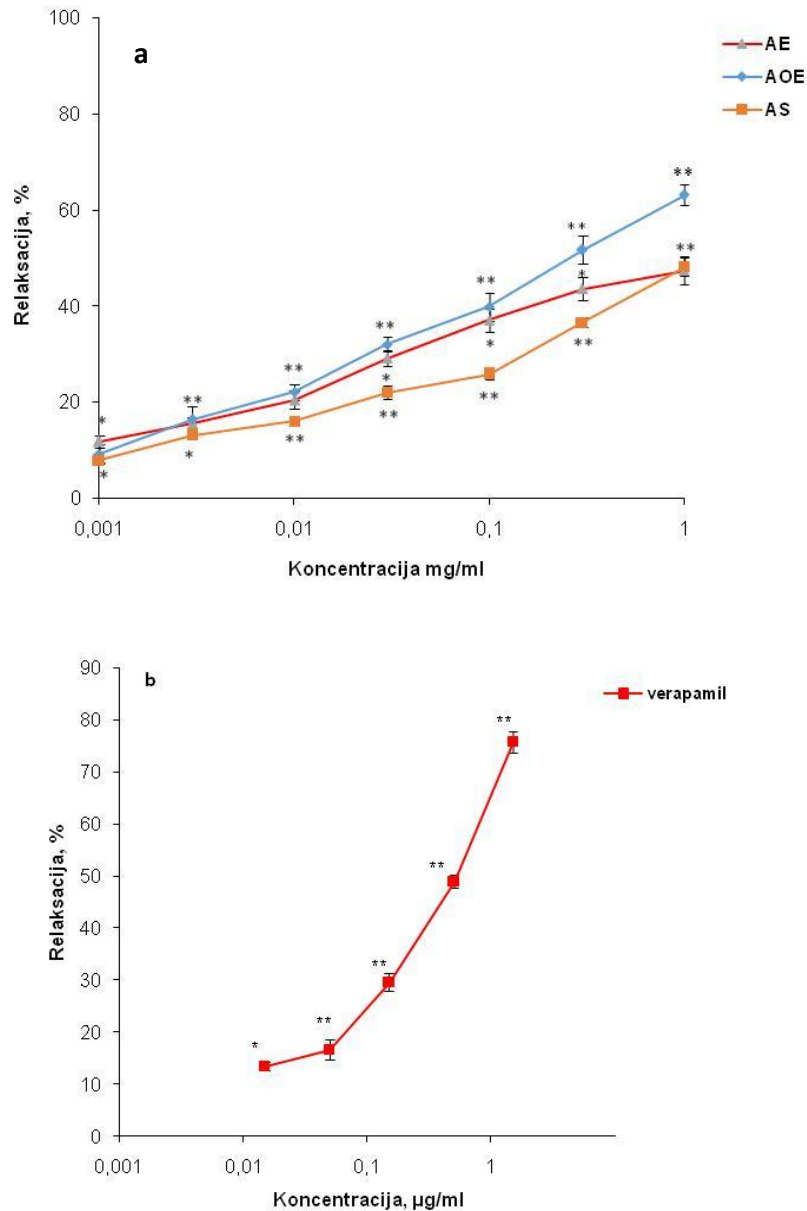
	EC_{50} vrednosti za KCl-indukovane kontrakcije (mg/ml)	EC_{50} vrednosti za FE-indukovane kontrakcije (mg/ml)
AE	$0,97 \pm 0,02^a$	$1,27 \pm 0,11^a$
AOE	$1,95 \pm 0,12^b$	$0,58 \pm 0,07^b$
AS	$1,74 \pm 0,08^b$	$0,96 \pm 0,06^c$
Verapamil	$0,77 \pm 0,01^c$ μ g/ml	

Različita slova u kolonama ukazuju na statistički značajnu razliku u EC_{50} vrednostima (Tukey test; $p < 0.01$). AE – ekstrakt ploda aronije; AOE – ekstrakt ostatka ploda nakon ceđenja soka; AS – sok aronije; FE – fenilefrin.



Slika 4.6.1. Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a) i verapamila (b) na kontrakcije izolovane aorte pacova indukovane KCl. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

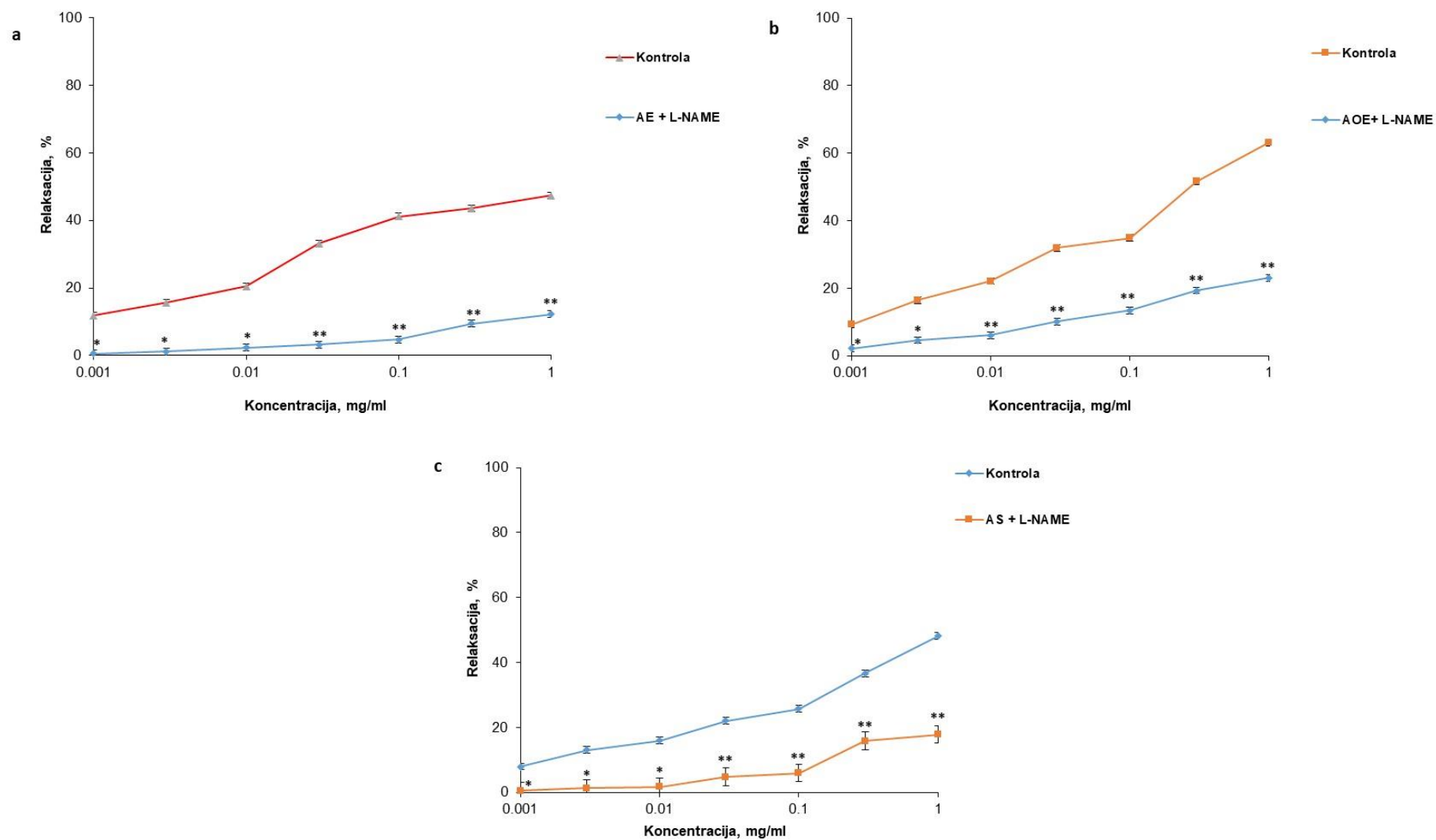
U drugoj eksperimentalnoj seriji aorta je prekontrahovana dodatkom fenilefrina (FE; 1 μ M) u kupatilo za izolovane organe. Verapamil je i ovde korišćen kao pozitivna kontrola (1 μ M). Najbolju vazorelaksantnu aktivnost na FE-indukovane kontrakcije aorte pacova ispoljio je AOE, sa najnižom EC_{50} vrednošću koja je iznosila $0,58 \pm 0,07$ mg/ml ($p < 0,01$). Ekstrakt aronije (AE) slabije je opuštao glatku muskulaturu aorte ($EC_{50} = 1,27 \pm 0,11$ mg/ml), dok je sok bio efektivniji ($EC_{50} = 0,96 \pm 0,06$ mg/ml). U Tabeli 4.6.1. dato je poređenje EC_{50} vrednosti ekstrakata, soka i verapamila kod FE-indukovanih kontrakcija aorte.



Slika 4.6.2. Relaksantni efekti AE, AOE, AS (a) i verapamila (b) na kontrakcije izolovane aorte pacova indukovane FE. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti maksimalnog odgovora u procentima \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Vazorelaksantni efekti AE, AOE i AS ispitivani su i u prisustvu blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME, 0,1 mM), koji je dodat nakon FE-indukovane kontrakcije, kako bi se ispitao da li je relaksantni efekat posredovan NO ili supstancama koja on oslobađa. Prisutni NO i sam vrši vazodilataciju krvnih sudova, koja je samo pojačana u prisustvu ekstrakata i soka aronije. Blokadom sinteze NO relaksantni efekti ispitivanih preparata se smanjuju. Rezultati ukazuju da je relaksantna aktivnost AE, AOE i AS posredovana oslobađanjem NO (Slika 4.6.2.). Najbolju relaksantnu aktivnost u prisustvu FE ispoljio je AOE sa EC_{50}

vrednošću od $0,59 \pm 0,03$ mg/ml. EC_{50} vrednost AOE povećana je na $2,37 \pm 0,01$ mg/ml dodatkom L-NAME ($p < 0,01$). AE i AS takođe su relaksantne efekte ostvarili putem oslobađanja NO. EC_{50} vrednosti za AE i AS u poređenju sa kontrolom bile su povećane kada je blokirana sinteza NO dodatkom L-NAME ($4,38 \pm 0,05$ mg/ml i $2,78 \pm 0,03$ mg/ml). Vrednosti EC_{50} u prisustvu FE za AE i AS bile su značajno manje ($0,92 \pm 0,01$ mg/ml i $0,95 \pm 0,02$ mg/ml; $p < 0,01$).



Slika 4.6.2. Relaksantni efekti AE (a), AOE (b), AS (c) na kontrakcije izolovane aorte pacova u prisustvu L-NAME. Svaka tačka predstavlja srednje vrednosti u procentima maksimalnog odgovora \pm SD, za šest segmenata (Studentov t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.7. PROTEKTIVNI EFEKTI EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE KOD PACOVA SA SA AKUTNIM OŠTEĆENJEM BUBREGA I JETRE IZAZVANIM CISPLATINOM

4.7.1. Uticaj ekstrakata i soka aronije na biohemijske markere oštećenja bubrega i jetre u plazmi pacova

Kako bi se procenili protektivni efekti ispitivanih preparata aronije (AE, AOE i AS) kod cisplatinom indukovanih oštećenja (jednokratna doza 8 mg/kg TT, i.p.), određivane su koncentracije kreatinina (CRE) i ureje (BUN) u plazmi kao pokazatelji akutnog bubrežnog oštećenja, i aktivnost enzima aspartat-aminotransferaze (AST) i alanin-aminotransferaze (ALT) kao pokazatelji oštećenja jetre (Slika 4.7.1.). Svi određivani biohemijski parametri bili su u porastu kod grupa pacova koje su primale intraperitonealno cisplatin (grupa CIS) trećeg dana eksperimenta, što ukazuje na nastala oštećenja bubrega i jetre usled dejstva citostatika. Kod svih ispitivanih parametara utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima između grupe CIS i grupe K (kontrolna grupa zdravih životinja) ($p < 0,001$). Koncentracije biohemijskih parametara u plazmi pacova kojima su oralno aplikovani samo preparati aronije (grupe AE, AOE i AS) bile su približno iste kao koncentracije u kontrolnoj grupi.

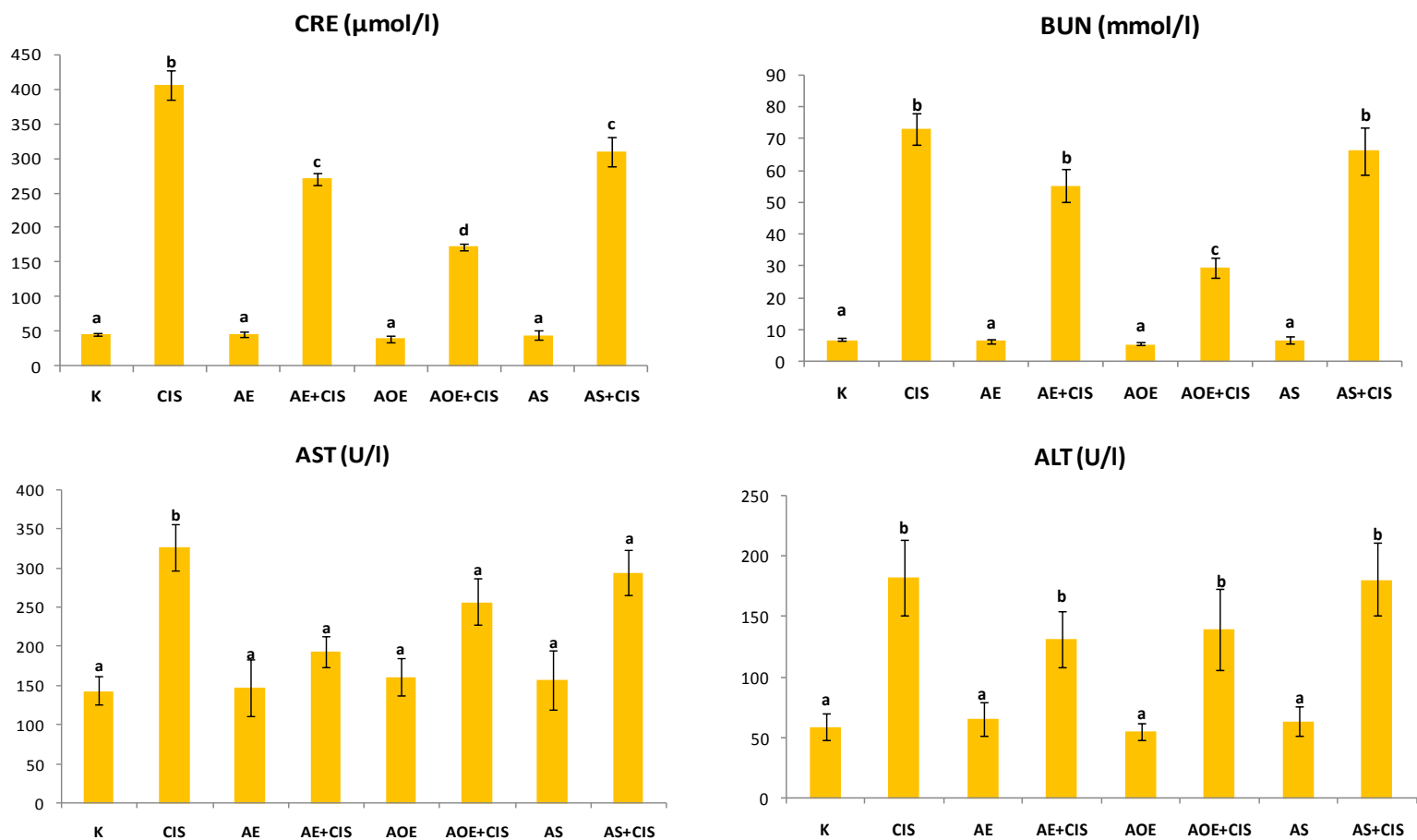
Koncentracija CRE bila je značajno povećana kod pacova koji su primili cisplatin u kombinaciji sa ekstraktima ili sokom aronije ($p < 0,001$), dok je u poređenju sa prosečnim vrednostima CRE kod pacova CIS grupe ($405,87 \pm 21,18 \mu\text{mol/l}$) ona bila značajno smanjena ($p < 0,001$). Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u efektima tri ispitivana preparata, među kojima je ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE) imao bolje efekte u odnosu na ekstrakt ploda (AE) i sok (AS) ($p < 0,001$). U grupi AOE+CIS utvrđen je najmanji porast vrednosti CRE ($172,12 \pm 4,12 \mu\text{mol/l}$), u odnosu na zdrave pacove ($45,12 \pm 1,96 \mu\text{mol/l}$). Prosečna vrednost koncentracije CRE u grupi AE+CIS bila je $270,71 \pm 9,23 \mu\text{mol/l}$, što se nije značajno razlikovalo od prosečnih vrednosti CRE u grupi AS+CIS ($310,12 \pm 20,77 \mu\text{mol/l}$).

Kada je u pitanju koncentracija ureje u plazmi (BUN) može se zaključiti da preparati aronije smanjuju nive BUN u plazmi pacova sa cisplatinom indukovanim oštećenjima u poređenju sa pozitivnom kontrolom (grupa CIS), ali je to smanjenje značajno samo u slučaju primene AOE ($p < 0,001$). AOE je i u ovom slučaju imao najbolje protektivno dejstvo, u poređenju sa ostalim ispitivanim preparatima. Srednja vrednost koncentracije BUN kod CIS

grupe pacova iznosila je $72,85 \pm 4,92$ mmol/l, dok je kod zdravih životinja ona bila značajno niža, $6,93 \pm 0,42$ mmol/l. U grupi koja je dobijala AOE u kombinaciji sa cisplatinom vrednosti BUN značajno su manje ($29,56 \pm 3,15$ mmol/l) nego kod pacova grupe CIS, ali značajno veće u poređenju sa zdravom kontrolom ($p < 0,001$).

Akutno oštećenje jetre izazvano dejstvom cisplatina potvrđeno je porastom aktivnosti jetrinih enzima (AST i ALT) u CIS grupi ($326,85 \pm 28,98$ U/l i $182,37 \pm 31,7$ U/l). Ova promena je značajna u odnosu na zdrave pacove ($p < 0,001$). Preparati aronije u kombinaciji sa cisplatinom doveli su do smanjenja aktivnosti ovih enzima u plazmi u poređenju sa grupom koja je primala samo citostatik, a ovo smanjenje je bilo značajno samo u slučaju aktivnosti AST ($p < 0,001$). Može se uočiti da se prosečne vrednosti merenja aktivnosti AST značajno razlikuju od vrednosti pozitivne kontrolne grupe CIS, dok razlika sa zdravim životinjama nije utvrđena (grupa K). AE je imao najbolje efekte, obzirom da je u grupi AE+CIS porast aktivnosti AST najmanji ($193,62 \pm 20,35$ U/l) i najpribližniji aktivnosti u kontrolnoj grupi K ($144 \pm 17,67$ U/l).

Uticaj preparata na aktivnost ALT enzima bio je po rezultatima nešto slabiji. Aktivnost ALT bila je značajno povećana u CIS grupi, i u grupama koje su dobijale preparate aronije u kombinaciji sa citostatikom, u odnosu na zdravu kontrolu ($p < 0,001$). Efekti preparata mogu se uočiti u grupama AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS gde je došlo do neznatnog smanjenja aktivnosti ALT u poređenju sa vrednostima grupe CIS, ali smnajnje nije bilo statistički značajno. I u ovom slučaju, AE je imao najbolje efekte, u poređenju sa druga dva ispitivana preparata ($131,71 \pm 23,22$ U/l).



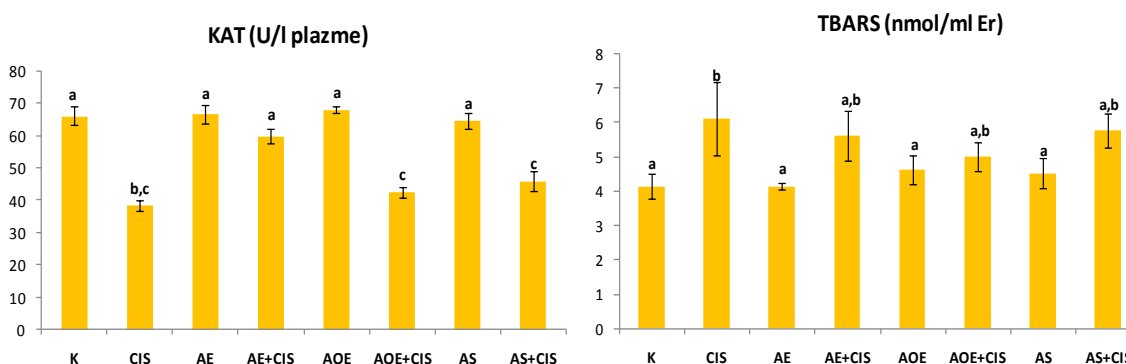
Grupa K – kontrolna grupa zdravih pacova kojima je aplikovan fiziološki rastvor; **Grupa CIS** – kontrolna grupa bolesnih pacova kojima je i.p. jednokratno aplikovan cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; **Grupe AE, AOE i AS** – grupe pacova kojima su oralno aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT tokom 10 dana; **Grupe AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS** – grupe pacova kojima su oralno tokom 10 dana aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT i trećeg dana eksperimenta i.p. jednokratno cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; Vrednosti prikazuju srednju vrednost \pm standardnu devijaciju (N=8). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova iznad stubova pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji biohemijskih parametara između grupa ($p < 0,001$; Tukey test).

Slika 4.7.1. Koncentracije CRE, BUN, AST i ALT u plazmi pacova.

4.7.2. Uticaj ekstrakata i soka aronije na aktivnost katalaze u plazmi i koncentraciju TBARS u eritrocitima pacova

U plazmi je procenjivana aktivnost enzima katalaze (KAT) kao pokazatelj nastalog oksidativnog stresa, a u eritrocitima koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS) kao pokazatelj lipidne peroksidacije. Uticaj AE, AOE i AS na aktivnost pomenutih parametara prikazan je na Slici 4.7.2. Aktivnost KAT u plazmi pacova bila je značajno smanjena usled štetnih efekata cisplatina ($p < 0,01$). AE u kombinaciji sa cisplatinom (grupa AE+CIS) značajno je uticao na porast aktivnosti enzima u plazmi u poređenju sa CIS grupom ($p < 0,01$), a vrednosti se nisu značajno razlikovale od aktivnosti KAT u kontrolnoj grupi zdravih životinja. U grupama koje su primale AOE i AS u kombinaciji sa cisplatinom pokazalo se da je aktivnost KAT u plazmi smanjena i da preparati nisu značajno uticali na efekte koje je izazvao citostatik.

Procenom nivoa TBARS utvrđeno je da postoji značajna porast intenziteta lipidne peroksidacije u eritrocitima životinja tretiranih cisplatinom ($p < 0,01$). Razlika u nivou TBARS kod ispitivanih protektivnih efekata preparata nije bila značajna u odnosu na CIS grupu, iako je nivo lipidne peroksidacije u eritrocitima bio smanjen. AOE je najviše uticao na smanjenje koncentracije TBARS u eritrocitima, u poređenju sa ostala dva preparata.



Grupa K – kontrolna grupa zdravih pacova kojima je aplikovan fiziološki rastvor; **Grupa CIS** – kontrolna grupa bolesnih pacova kojima je i.p. jednokratno aplikovan cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; **Grupe AE, AOE i AS** – grupe pacova kojima su oralno aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT tokom tokom 10 dana; **Grupe AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS** – grupe pacova kojima su oralno tokom 10 dana aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT i trećeg dana eksperimenta i.p. jednokratno cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; Vrednosti prikazuju srednju vrednost \pm standardnu devijaciju (N=8). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova iznad stubova pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji biohemijskih parametara između grupa ($p < 0,01$; Tukey test).

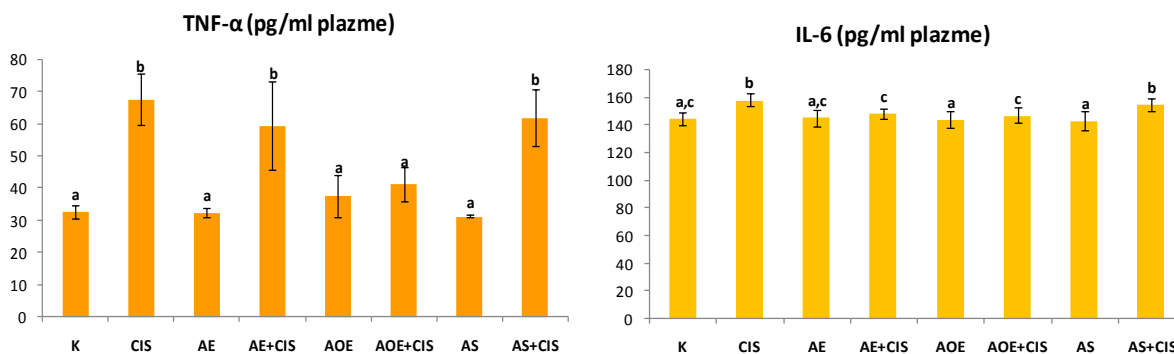
Slika 4.7.2. Aktivnost KAT u plazmi i nivoi TBARS u eritrocitima pacova.

4.7.3. Uticaj ekstrakata i soka aronije na koncentraciju inflamatornih markera (TNF- α i IL-6) u plazmi pacova sa cisplatinom-indukovanim oštećenjima

U plazmi pacova određivana je koncentracija markera inflamacije (citokina TNF- α i IL-6) kako bi se utvrdio uticaj ispitivanih preparata aronije na nastalu inflamaciju koja se javlja kao posledica primene cisplatina. Efekti AE, AOE i AS prikazani su na Slici 4.7.3.

Nivoi citokina u plazmi pacova grupe tretirane cisplatinom bili su značajno veći u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih pacova ($p < 0,01$). Koncentracija TNF- α bila je povećana u grupama koje su dobijale ekstrakt (AE) i sok (AS) aronije u kombinaciji sa cisplatinom u odnosu na kontrolu (K) ($p < 0,01$), a neznatno smanjena u poređenju sa koncentracijom u cisplatinom tretiranoj grupi (CIS). Statistički značajno smanjenje koncentracije TNF- α u odnosu na koncentraciju u CIS grupi, utvrđeno je samo kod pacova AOE+CIS grupe ($p < 0,01$).

Ekstrakti aronije doveli su do značajnog smanjenja nivoa IL-6 u grupama tretiranim cisplatinom, u poređenju sa nivoima u kontrolnoj cisplatinom tretiranoj grupi ($p < 0,01$). Koncentracije se nisu statistički značajno razlikovale od onih u kontrolnoj grupi K, što ukazuje na izražene protektivne efekte ekstrakata, posebno AOE. Sok aronije nije pokazao značajno smanjenje nivoa citokina u odnosu na koncentraciju u CIS grupi.



Grupa K – kontrolna grupa zdravih pacova kojima je aplikovan fiziološki rastvor; **Grupa CIS** – kontrolna grupa bolesnih pacova kojima je i.p. jednokratno aplikovan cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; **Grupe AE, AOE i AS** – grupe pacova kojima su oralno aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT tokom tokom 10 dana; **Grupe AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS** – grupe pacova kojima su oralno tokom 10 dana aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT i trećeg dana eksperimenta i.p. jednokratno cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; Vrednosti prikazuju srednju vrednost \pm standardnu devijaciju (N=8). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova iznad stubova pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji biohemijskih parametara između grupa ($p < 0,01$; Tukey test).

Slika 4.7.3. Nivoi citokina (TNF- α i IL-6) u plazmi pacova.

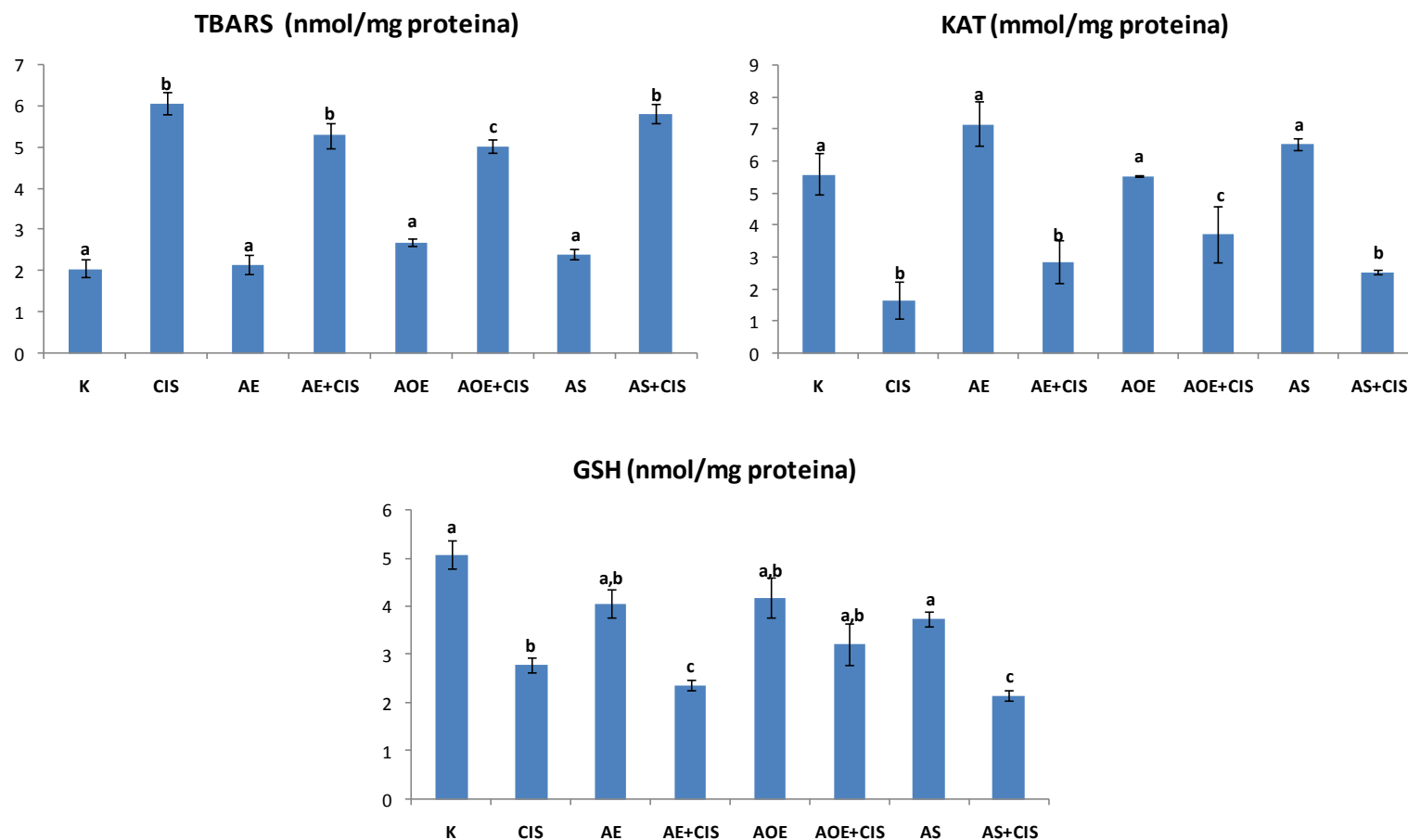
4.7.4. Uticaj ekstrakata i soka aronije markere oksidativnog oštećenja i lipidne peroksidacije u tkivu bubrega pacova

Efekti AE, AOE i AS na aktivnost KAT, koncentraciju redukovano glutationa (GSH) i novoe TBARS u tkivu bubrega pacova sa cisplatinom-indukovanim oštećenjem prikazani su na Slici 4.7.4.

Nivoi TBARS pokazuju da je cisplatin doveo do porasta lipidne peroksidacije u tkivu bubrega ($p < 0,01$). Porast je utvrđen i kod pacova u grupama koje su dobijale preparate aronije u kombinaciji sa citostatikom, ali je on u poređenju sa vrednostima TBARS u CIS grupi bio nešto niži. Kod grupe koja je primala cisplatin i AOE tokom deset dana eksperimenta utvrđena je statistički značajna razlika u nivoima TBARS sa kontrolnim grupama zdravih i bolesnih pacova ($p < 0,01$).

Aktivnost katalaze u tkivu bubrega kao pokazatelj nivoa antioksidativne zaštite u tkivima, bila je značajno smanjena usled efekta citostatika ($p < 0,01$). Preparati aronije u kombinaciji sa cisplatinom utiču na neznatno povećanje aktivnosti KAT, u odnosu na CIS grupu, iako je aktivnost enzima značajno smanjenja u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,01$). Rezultati pokazuju porast aktivnosti KAT u tkivu bubrega pacova grupe koja je tretirana ekstraktom aronije (AE), što bi moglo ukazivati na to da i sam ekstrakt pojačava antioksidativnu zaštitu u tkivima.

Koncentracija redukovano glutationa (GSH) u tkivu bubrega, kao neenzimskog antioksidanta, bila je značajno smanjenja kod pacova koji su tretirani cisplatinom ($p < 0,01$). Preparati aronije nisu imali značajan uticaj na nivoe GSH, što se može uočiti iz priloženih rezultata. Koncentracija GSH kod pacova koji su dobijali AE ili AS u kombinaciji sa citostatikom značajno je snižena u poređenju sa kontrolnim grupama zdravih i bolesnih pacova ($p < 0,01$).

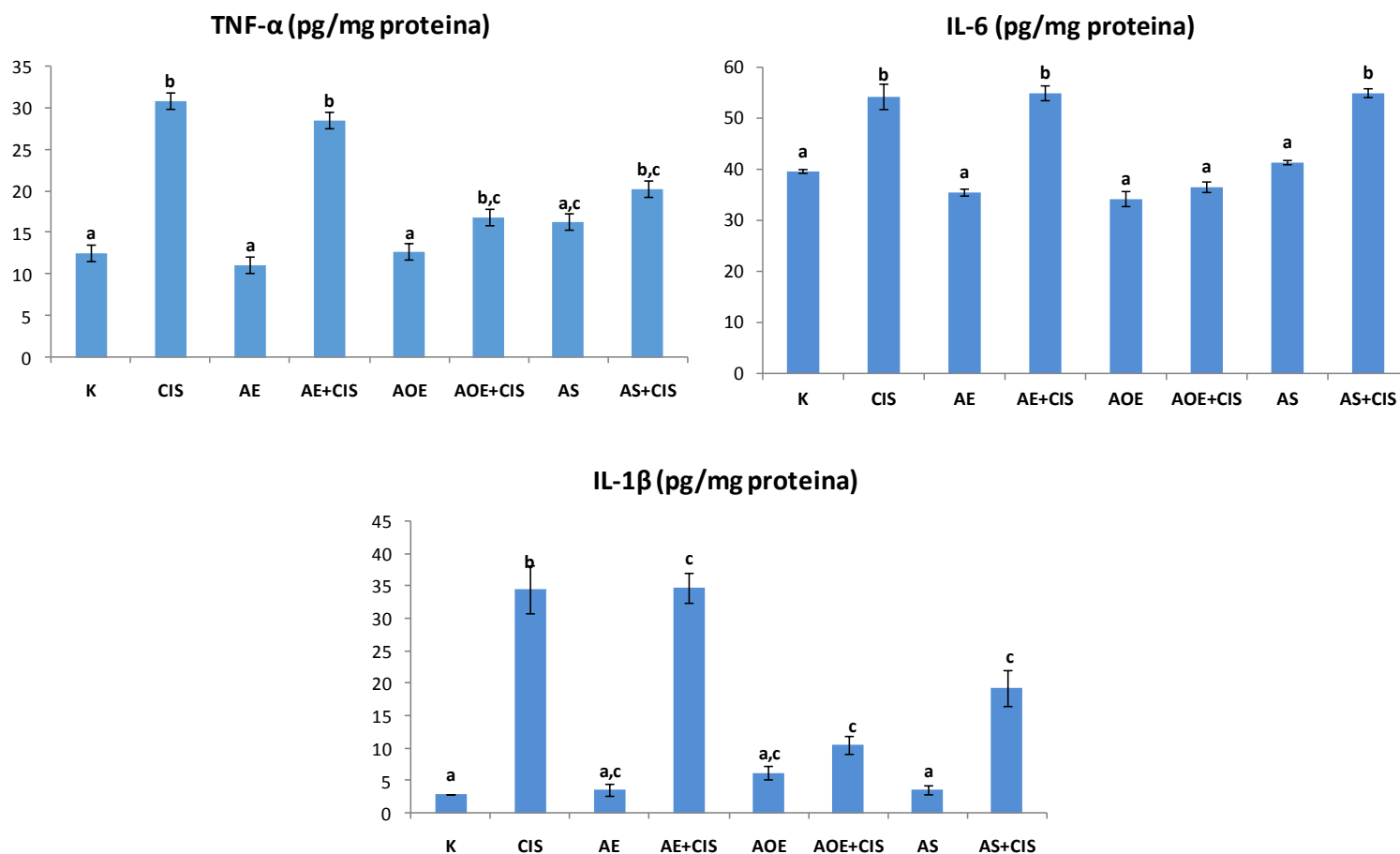


Grupa K – kontrolna grupa zdravih pacova kojima je aplikovan fiziološki rastvor; **Grupa CIS** – kontrolna grupa bolesnih pacova kojima je i.p. jednokratno aplikovan cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; **Grupe AE, AOE i AS** – grupe pacova kojima su oralno aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT tokom tokom 10 dana; **Grupe AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS** – grupe pacova kojima su oralno tokom 10 dana aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT i trećeg dana eksperimenta i.p. jednokratno cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; Vrednosti prikazuju srednju vrednost ± standardnu devijaciju (N=8). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova iznad stubova pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji biohemijskih parametara između grupa ($p < 0,01$; Tukey test).

Slika 4.7.4. Nivoi TBARS, GSH i aktivnost KAT u tkivu bubrega pacova.

4.7.5. Uticaj ekstrakata i soka aronije na koncentraciju inflamatornih markera ($TNF-\alpha$, $IL-6$ i $IL-1\beta$) u tkivu bubrega pacova

Koncentracije citokina $TNF-\alpha$, $IL-6$ i $IL-1\beta$ određivane u tkivu bubrega pacova i uticaj ispitivanih preparata na oštećenja indukovana cisplatinom prokazani su na Slici 4.7.5. Koncentracija inflamatornih citokina značajno je povećana kod pacova tretiranih cisplatinom ($p < 0,01$), sa najvećim porastom koncentracije $IL-1\beta$. Preparati aronije uticali su na smanjenje inflamacije nastale kao posledica cisplatinom izazvanog oštećenja u bubregu. Nivoi svih merenih citokina bili su sniženi u odnosu na novoe izmerene kod pacova u CIS grupi. AOE i AS imali su vidno izraženije protektivno dejstvo u poređenju sa AE.



Grupa K – kontrolna grupa zdravih pacova kojima je aplikovan fiziološki rastvor; **Grupa CIS** – kontrolna grupa bolesnih pacova kojima je i.p. jednokratno aplikovan cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; **Grupe AE, AOE i AS** – grupe pacova kojima su oralno aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT tokom tokom 10 dana; **Grupe AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS** – grupe pacova kojima su oralno tokom 10 dana aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT i trećeg dana eksperimenta i.p. jednokratno cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; Vrednosti prikazuju srednju vrednost ± standardnu devijaciju (N=8). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova iznad stubova pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji biohemijskih parametara između grupa ($p < 0,01$; Tukey test).

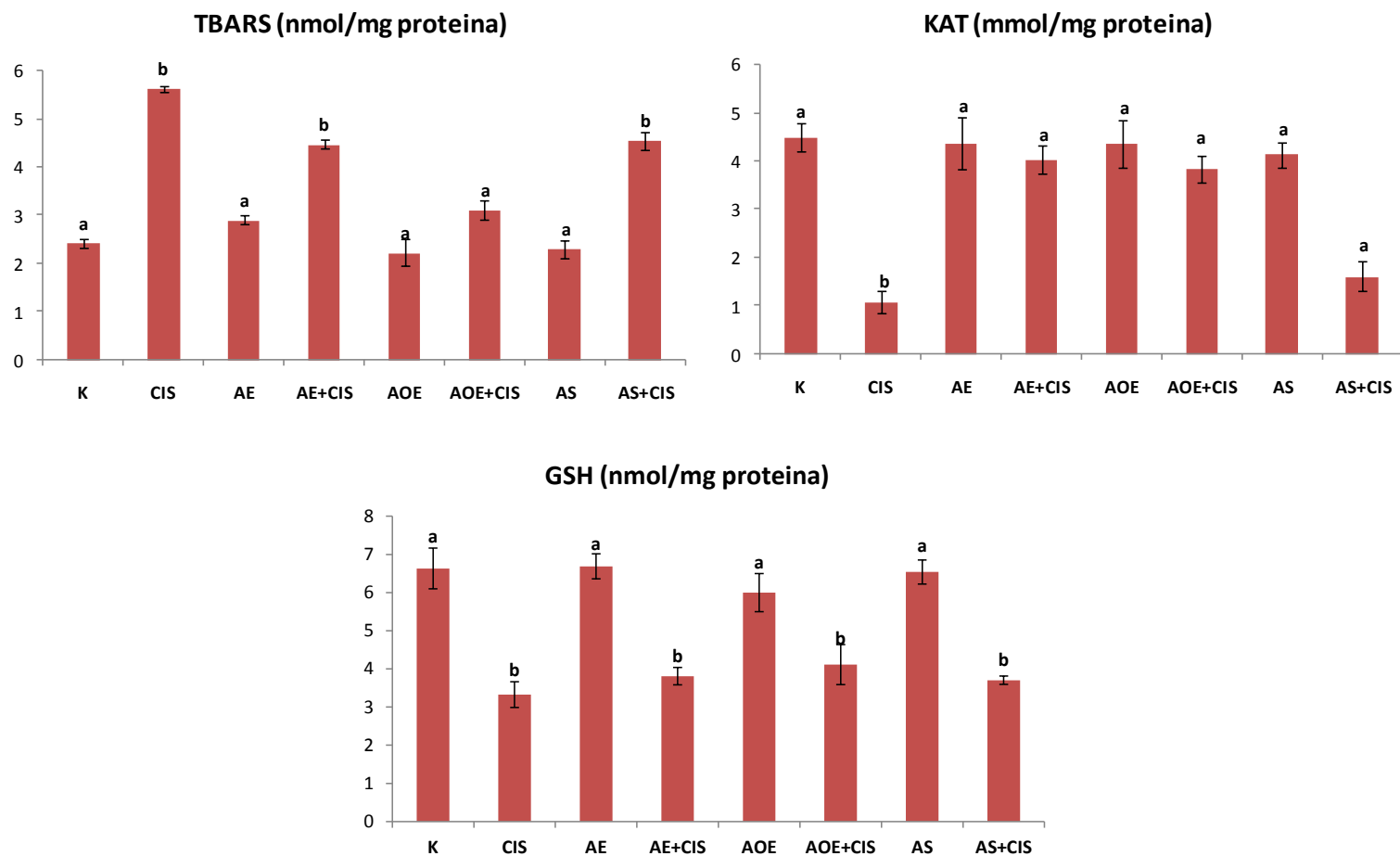
Slika 4.7.5. Nivoi citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) u tkivu bubrega pacova.

4.7.6. Uticaj ekstrakata i soka aronije markere oksidativnog oštećenja i lipidne peroksidacije u tkivu jetre pacova

Aktivnost KAT, novoi GSH i TBARS kao pokazatelja lipidne peroksidacije u tkivu jetre pacova i uticaj različitih preparata aronije (AE, AOE i AS) prikazani su na Slici 4.7.6. Koncentracije TBARS u homogenatima tkiva ukazuju na porast intenziteta lipidne peroksidacije u grupama pacova tretiranih cisplatinom ($p < 0,01$). Efekti preparata aronije mogu se uočiti kroz smanjenje nivoa TBARS u grupama koje su dobijale kombinaciju preparata i cisplatina. Najizraženiji bili su efekti AOE, kada se nivoi TBARS statistički značajno ne razlikuju od onih u kontrolnoj grupi zdravih životinja ($p > 0,05$).

Efekti koje su prouzrokovali preparati aronije vezani za porast aktivnosti KAT u tkivu jetre u poređenju sa efektima samog cisplatina bili su značajni ($p < 0,01$). Uočeno je da je došlo da smanjenja aktivnosti KAT u jetri nakon primene citostatika, a ovo smanjenje je bilo mnogo manje kada su se koristili preparati aronije u kombinaciji sa cisplatinom, naročito u slučaju primene ekstrakata.

Nivoi GSH u tkivu jetre bili su značajno smanjeni u grupama koje su primale cisplatin ($p < 0,01$). Preparati aronije izazvali su neznatno povećanje nivoa GSH u poređenju sa izmerenim koncentracijama kod pacova CIS grupe, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

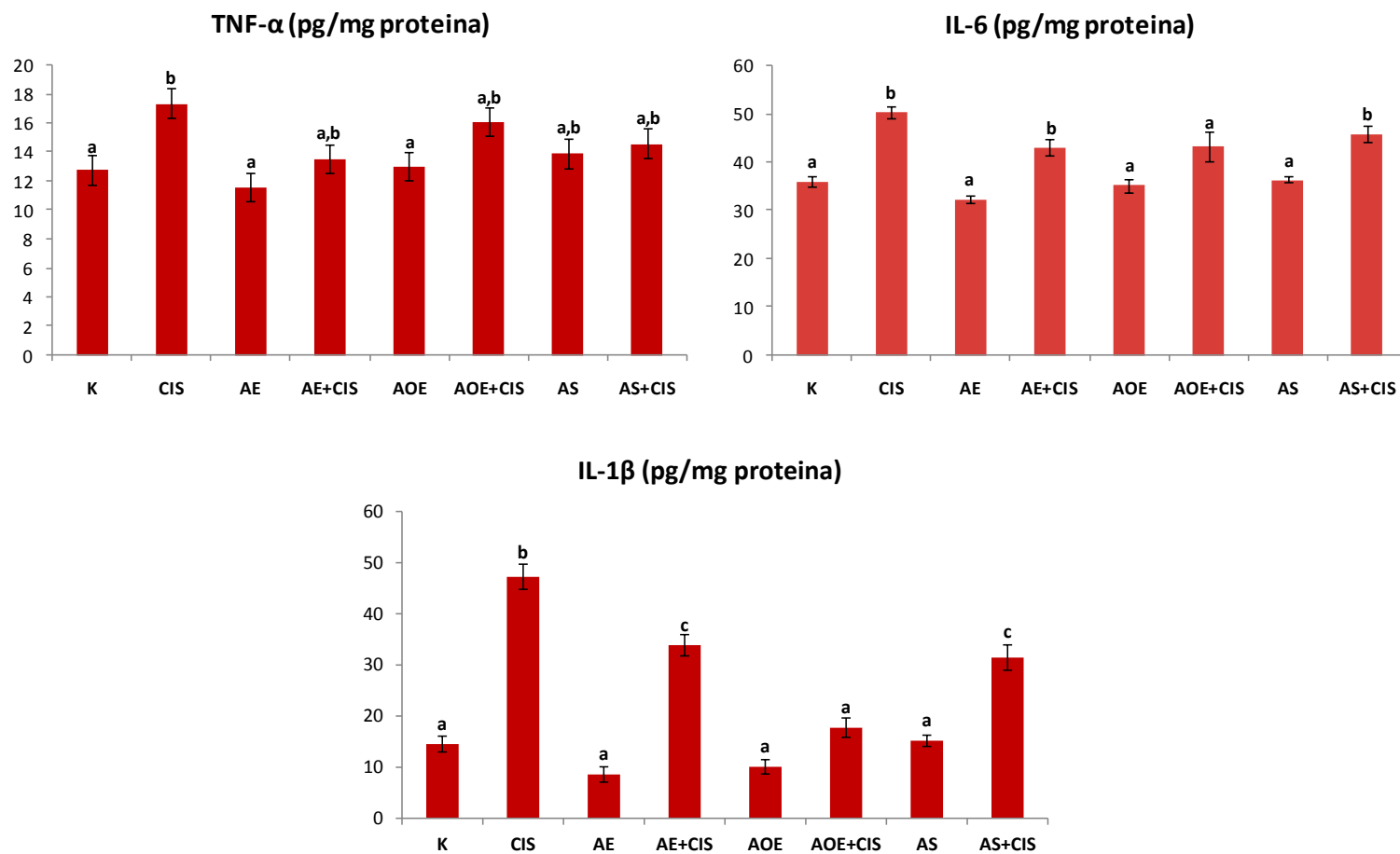


Grupa K – kontrolna grupa zdravih pacova kojima je aplikovan fiziološki rastvor; **Grupa CIS** – kontrolna grupa bolesnih pacova kojima je i.p. jednokratno aplikovan cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; **Grupe AE, AOE i AS** – grupe pacova kojima su oralno aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT tokom tokom 10 dana; **Grupe AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS** – grupe pacova kojima su oralno tokom 10 dana aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT i trećeg dana eksperimenta i.p. jednokratno cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; Vrednosti prikazuju srednju vrednost \pm standardnu devijaciju (N=8). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova iznad stubova pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji biohemijskih parametara između grupa ($p < 0,01$; Tukey test).

Slika 4.7.6. Nivoi TBARS, GSH i aktivnost KAT u tkivu jetre pacova.

4.7.7. Uticaj ekstrakata i soka aronije na koncentraciju inflamatornih markera (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) u tkivu jetre pacova

Na Slici 4.7.7. prikazane su koncentracije inflamatornih citokina u tkivu jetre pacova sa cisplatinom indukovanim oštećenjima i uticaj ispitivanih preparata aronije (AE, AOE i AS) na nivoe inflamatornih markera. Rezultati pokazuju prisutnu inflamaciju u tkivu jetre, uočljiv je značajan porast koncentracija ispitivanih citokina ($p < 0,01$). Preparati aronije korišćeni su kombinaciji sa citostatikom, doveli su do manjeg porasta koncentracije inflamatornih citokina u tkivu jetre, a ovi efekti bili su najizraženiji kod IL-1 β .



Grupa K – kontrolna grupa zdravih pacova kojima je aplikovan fiziološki rastvor; **Grupa CIS** – kontrolna grupa bolesnih pacova kojima je i.p. jednokratno aplikovan cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; **Grupe AE, AOE i AS** – grupe pacova kojima su oralno aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT tokom tokom 10 dana; **Grupe AE+CIS, AOE+CIS i AS+CIS** – grupe pacova kojima su oralno tokom 10 dana aplikovani AE i AOE u dozi od 100 mg/kg TT i AS u dozi od 1,7 ml/kg TT i trećeg dana eksperimenta i.p. jednokratno cisplatin u dozi od 8 mg/kg TT; Vrednosti prikazuju srednju vrednost ± standardnu devijaciju (N=8). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova iznad stubova pokazuju statistički značajnu razliku u koncentraciji biohemijskih parametara između grupa ($p < 0,01$; Tukey test).

Slika 4.7.7. Nivoi citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) u tkivu jetre pacova.

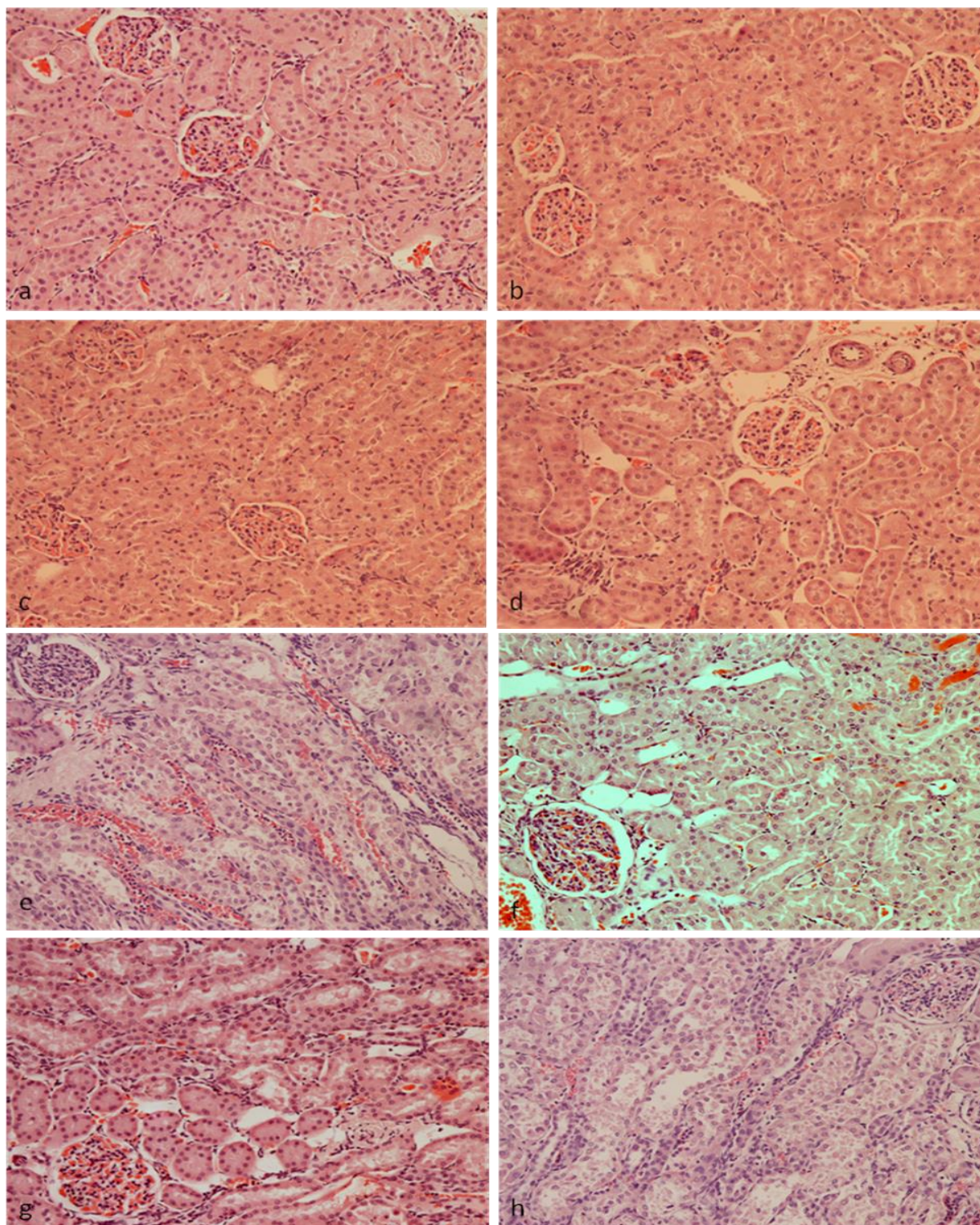
4.7.8. Histopatološke analize tkiva pacova

U Tabeli 4.7.8.1. prikazan je stepen oštećenja bubrega kod pacova različitih grupa po unapred utvrđenoj skali: do 25% (-), od 25 do 50% (+), od 50 do 75% (++) i veći od 75% (+++). Histopatološka analiza tkiva bubrega (Slika 4.7.8.1. i 4.7.8.2.) kontrolne grupe pacova (a), kao i pacova koji su tretirani ekstraktima i sokom aronije (b-d) ukazuje na nepromenjenu morfologiju bubrega, sa glomerulima i tubulima normalnog izgleda. U grupi pacova koji su tretirani cisplatinom jednokratno u dozi od 8 mg/kg, uočena je izmenjena morfologija tkiva bubrega sa jako izraženom vakuolarnom i masnom degeneracijom, kao i deskvamacijom tubulskog epitela i oštećenjem četkastog pokrova (“brush border”) proksimalnih tubula. Prisutna je kongestija intertubularnih kapilara sa umerenim zapaljenskim infiltratom. U pojedinim proksimalnim i distalnim tubulima je uočena fokalna nekroza. Takođe, primećeno smanjenje dijametra pojedinih glomerula i kongestija kapilara glomerula. Perjodna kiselina-Šifovo (PAS) bojenje preparata je korišćeno za detekciju oštećenja bazalne membrane i citoplazme tubulskog epitela.

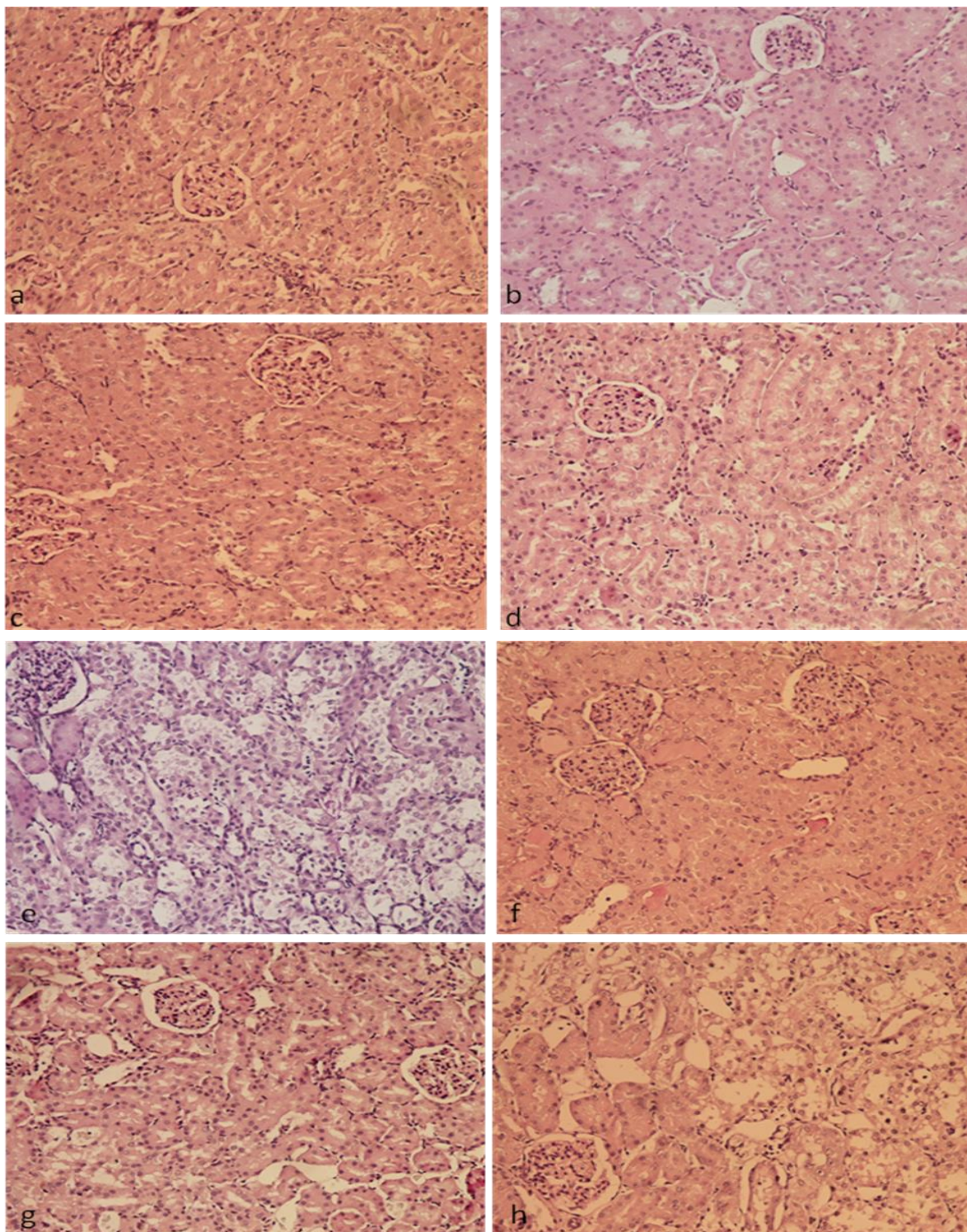
Tabela 4.7.8.1. Morfološke promene u tkivu bubrega

MORFOLOŠKE PROMENE U TKIVU BUBREGA	GRUPA								
	K	AE	AOE	ES	AE+CIS	AOE+CIS	AS+CIS	CIS	
Deskvamacija epitela tubula	-	-	-	-	-	++	++	+++	
Fokalna nekroza proksimalnih tubula	-	-	-	-	-	+	+	+	
Fokalna nekroza distalnih tubula					-	+	+	+	
Oštećenje četkastog pokrova	-	-	-	-	+	++	+++	+++	
Vakuolarna degeneracija tubulskog epitela	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	
Masna degeneracija tubulskog epitela	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	
Kongestija glomerula	-	-	-	-	+	++	++	++	
Kongestija intertubularnih kapilara	+/-	+/-	+/-	+/-	+	++	+++	+++	
Zapaljenski infiltrat	-	-	-	-	-	++	++	++	
Smanjenje dijametra glomerula	-	-	-	-	-	+	+	+	

K – kontrolna grupa zdravih pacova; AE, AOE, AS – kontrolne grupe zdravih pacova koji su dobijali ekstrakt (AE), ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE) i sok (AS) aronije oralno, tokom 10 dana; CIS - efekti cisplatina (8 mg/kg, i.p.); AE+CIS, AOE+CIS, AS+CIS – protektivni efekti ekstrakta (AE+CIS), ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS) i soka (AS+CIS) aronije kod cisplatinom-indukovane nefrotoksičnosti. Stepen oštećenja do 25% (-), od 25 do 50% (+), od 50 do 75% (++) i veći od 75% (+++).



Slika 4.7.8.1. Morfološke promene u tkivu bubrega pacova (H&E, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).



Slika 4.7.8.2. Morfološke promene u tkivu bubrega pacova (PAS, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).

Histopatološki nalaz tkiva bubrega pacova iz grupa koje su tretirane cisplatinom i preparatima aronije pokazuje manje izražene promene u odnosu na grupu tretiranu samo citostatikom, što ukazuje na protektivne efekte ovih preparata. U Tabeli 4.7.8.1. se može se videti da je naizraženiji protektivni efekat ekstrakta aronije (AE), kojim su tretirani pacovi nakon jednokratne doze cisplatina (8 mg/kg TT) (Slika 4.7.8.1. i 4.7.8.2, f), u poređenju sa efektima koje ispoljavaju AOE i AS. Pokazalo se da je ekstrakt aronije značajno smanjio deskvamaciju i oštećenje četkastog pokrova epitela proksimalnih tubula, koja je izražena kod grupe pacove tretiranih samo cisplatinom. Ekstrakt aronije je uticao i na smanjenje nekroze proksimalnih i distalnih tubula bubrega, koja je uočena kod cisplatinom tretirane grupe, kao i vakuolarne i masne degeneracije tubulskog epitela. Kongestija glomerula i intertubularnih kapilara je bila primetno smanjena u poređenju sa oštećenjima koje je uzrokovao cisplatin (Slika 4.7.8.1. i 4.7.8.2, e). Zapaljenski infiltrat je bio prisutan kod grupa koje su tretirane AOE i AS u kombinaciji sa citostatikom, dok je izostao kod grupe koja je tretirana AE i cisplatinom. Kod grupe pacova koji su tretirani AOE u kombinaciji sa citostatikom, došlo je do manjih poboljšanja u smislu deskvamacije tubulskog epitela, oštećenje četkastog pokrova i kongestije intertubulskih kapilara (Slika 4.7.8.1. i 4.7.8.2, g). Sok aronije je pokazao najslabije protektivno dejstvo, koje se može uočiti samo kao smanjenje deskvamacije epitela bubrežnih tubula (Slika 4.7.8.1. i 4.7.8.2, h). Smanjenje dijametra glomerula, koje je primećeno kod grupe pacova tretiranih cisplatinom je bilo manje izraženo samo kod pacova tretiranih ekstraktom, dok ostala dva preparata nisu prevenirala ovo oštećenje.

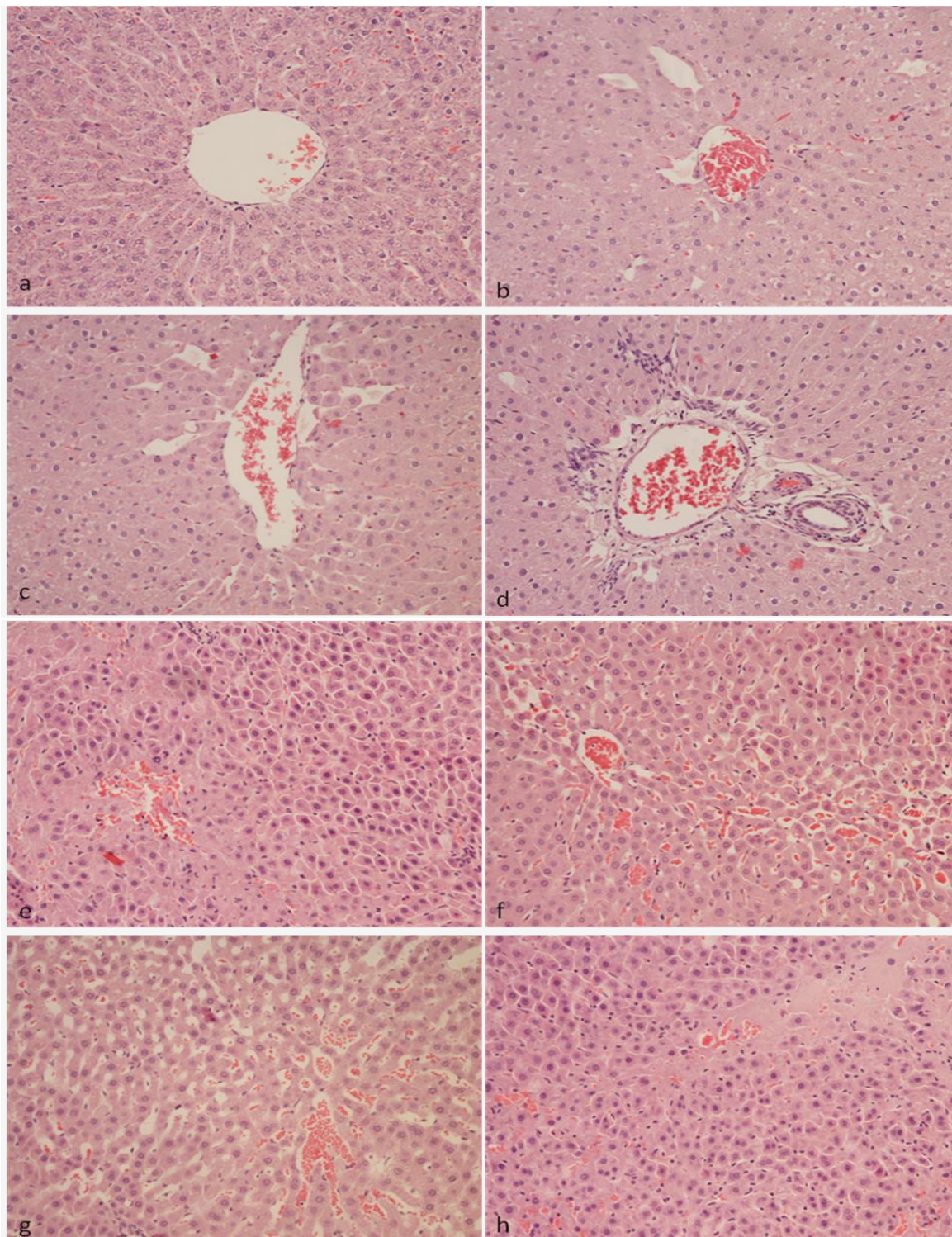
U Tabeli 4.7.8.2. prikazan je stepen oštećenja jetre kod pacova različitih grupa, po unapred utvrđenoj skali do 25% (-), od 25 do 50% (+), od 50 do 75% (++) i veći od 75% (+++). Histopatološka analiza tkiva jetre (Slika 4.7.8.3. i 4.7.8.4.) kontrolne grupe pacova (a), kao i pacova koji su tretirani ekstraktima i sokom aronije (b-d) ukazuje na nepromenjenu morfologiju jetre, sa hepatocitima koji su raspoređeni u trabekulama radijalno od centralne venule i razdvojeni sinusoidima sa Kupferovim ćelijama. U kontrolnim preparatima, hepatociti su poligonalni, sa eozinofilnom i granuliranom citoplazmom i sa jednim ili dva jedra. U grupi pacova koji su tretirani cisplatinom (Slika 4.7.8.3. i 4.7.8.4, e) jednokratno u dozi od 8 mg/kg uočena je izmenjena morfologija tkiva jetre sa nekrozom hepatocita. Pored toga, primećen je i povećan broj Kupferovih ćelija, izražena dezorganizacija trabekula i kongestija centralne venule. Prisutna je i perivenularna sinusoidna dilatacija sa kongestijom sinusoida, kao i vakuolarna

degeneracija hepatocita. Mestimično se može uočiti i fibroza portnih prostora. Kod grupa pacova tretiranih preparatima aronije u kombinaciji sa cisplatinom može se uočiti smanjenje nekroze hepatocita izazvane ovim citostatikom, koja je čak i izostala kod grupe pacova tretirane ekstraktom aronije. Vakuolarna degeneracija i kongestija sinusoida takođe su smanjenje usled protektivnih efekata preparata aronije. Kod grupe tretirane ekstraktom aronije i cisplatinom uočeno je manje povećanje broja Kupferovih ćelija u poređenju sa cisplatin-kontrolom. PAS bojenjem uočen je značajan gubitak glikogenskih depoa hepatocita kod grupa koje su tretirane cisplatinom (Slika 4.7.8.4, e,f,g,h). Gubitak glikogena je bio manje izražen primenom ekstrakata aronije.

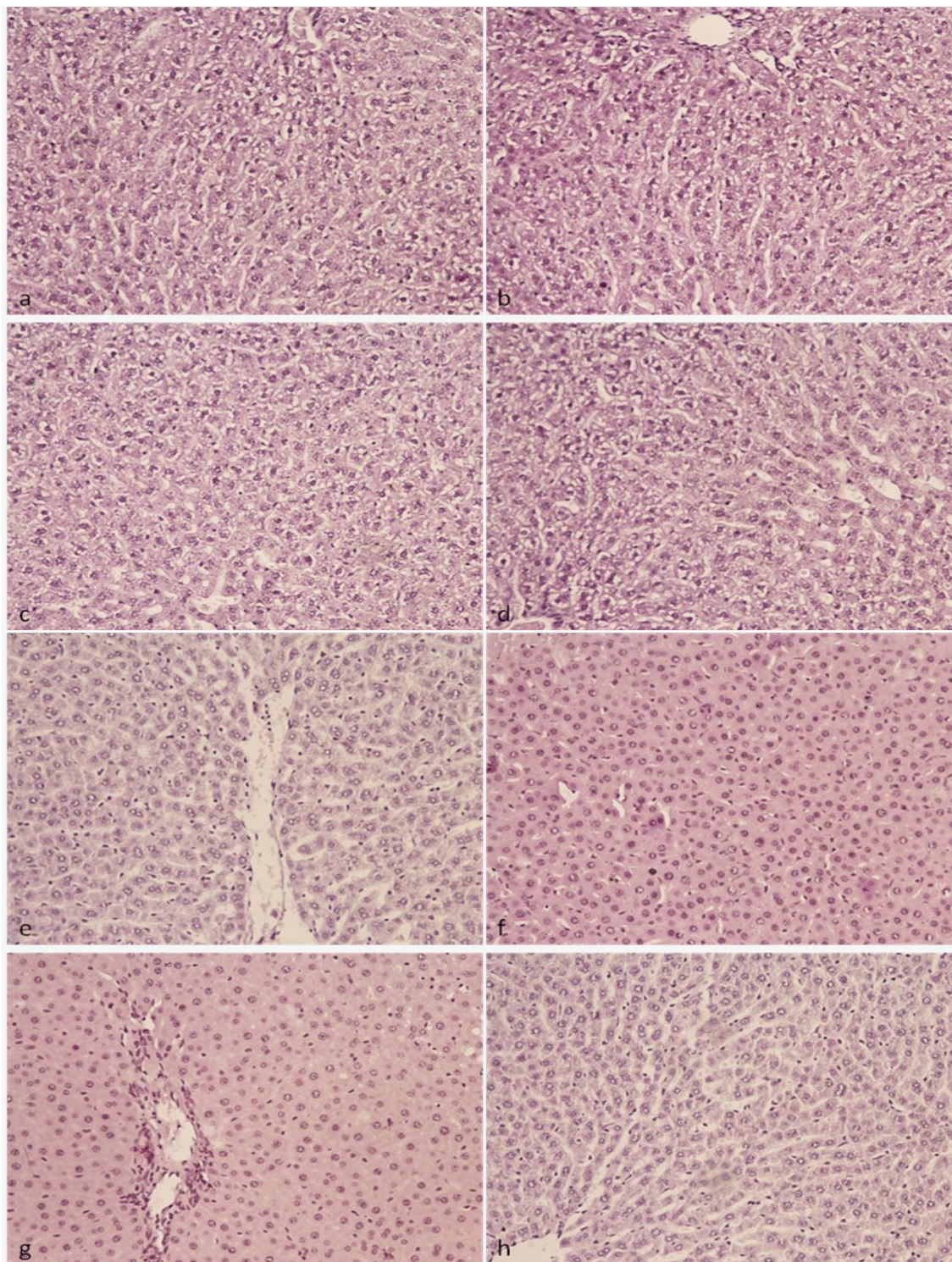
Tabela 4.7.8.2. Morfološke promene u tkivu jetre

MORFOLOŠKE PROMENE U TKIVU JETRE	GRUPA							
	K	AE	AOE	ES	AE+CIS	AOE+CIS	AS+CIS	CIS
Nekroza hepatocita	-	-	-	-	-	+	++	+++
Vakuolarna degeneracija	-	-	-	-	++	++	++	+++
Kongestija sinusoida					++	++	++	+++
Perivenularna sinusoidalna dilatacija	-	-	-	-	++	++	+++	+++
Povećan broj Kupferovih ćelija	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
Dezorganizacija trabekula	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
Kongestija centralne venule	-	-	-	-	++	++	++	++
Smanjenje depoa glikogena	-	-	-	-	++	++	+++	+++

K – kontrolna grupa zdravih pacova; AE, AOE, AS – kontrolne grupe zdravih pacova koji su dobijali ekstrakt (AE), ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE) i sok (AS) aronije oralno, tokom 10 dana; CIS - efekti cisplatina (8 mg/kg, i.p.); AE+CIS, AOE+CIS, AS+CIS – protektivni efekti ekstrakta (AE+CIS), ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS) i soka (AS+CIS) aronije kod cisplatinom-indukovane nefrotoksičnosti. Step en oštećenja do 25% (-), od 25 do 50% (+), od 50 do 75% (++) i veći od 75% (+++).



Slika 4.7.8.3. Morfološke promene u tkivu jetre pacova (H&E, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).



Slika 4.7.8.4. Morfološke promene u tkivu jetre pacova (PAS, 200X); a – kontrola (K); b - ekstrakt aronije (AE); c- ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka aronije (AOE); d - sok aronije (AS); e – cisplatin (CIS); f - cisplatin + ekstrakt aronije (AE+CIS); g – cisplatin + ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE+CIS); h - cisplatin + sok aronije (AS+CIS).

5. DISKUSIJA

5.1. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

Ekstrakti predstavljaju najznačajniju grupu koncentrovanih biljnih preparata. Prema konzistenciji, mogu se podeliti na tečne, polučvrste ili čvrste ekstrakte, a za njihovo dobijanje se koriste droge biljnog ili animalnog porekla. Biljne droge se predhodno pripremaju prema unapred utvrđenim uslovima u Farmakopejama ili drugim relevantnim propisima, ili ako droga nije oficinalana prema opštim propisima definisanim ekstrakcionom tehnikom koja može biti maceracija, perkolacija, ultrazvučna ekstrakcija, digestija i drugo (Kovačević, 2002; Jovanović, 2004; Savić, 2014). Kao jedan od najčešće primenjivanih biljnih preparata, smatra se da ekstrakti ispoljavaju bolje farmakološko dejstvo od drugih biljnih preparata, ali i od izolovanih supstanci pojedinačno. Ovo se može objasniti prisustvom više različitih jedinjenja (aktivnih supstanci) u ekstraktima koji sinergistički ostvaruju dejstvo (Evropska Farmakopeja 9.0, 2017; Peta Jugoslovenska farmakopeja, 2000; Vuleta i sar. 2012; Čujić, 2017).

Postoji mnogo različitih faktora koji mogu uticati na efikasnost same ekstrakcije: metoda ekstrakcije, izbor/tip rastvarača koji je korišćen, stepen usitnjenosti biljnog materijala, temperature i trajanje ekstrakcionog postupka, pH vrednost ekstragensa (Čujić i sar, 2015; Stalikas, 2007). Odabir rastvarača veoma je važan parametar za uspešnost ekstrakcije. Veoma je važno odabrati rastvarač prema hemijskim karakteristikama aktivnih principa koje želimo da ekstrahujemo (Stalikas, 2007).

Pored hranljivih materija koje se nalaze u voću i povrću, poput esencijalnih vitamina i minerala, postoje brojna jedinjenja koja potiču iz biljaka, uključujući polifenolna jedinjenja, biljna vlakna, karotenoide ili fitosterole, koja aktivno učestvuju u promociji zdravlja (Fraga i sar, 2019). Najčešće primenjene metode ekstrakcije polifenolnih jedinjenja kao rastvarač koriste vodu u kombinaciji sa organskim rastvaračima (aceton, etanol, metanol, etil acetat), zavisno od vrste polifenola prisutnih u biljnom materijalu (Sultana i sar, 2007). Neki od autora pokazali su da povećanje temperature ekstrakcije može biti povezano sa povećanom efikasnošću (Chew i sar, 2011). Vreme trajanja ekstrakcije takođe je važan faktor koji može uticati na proces oksidacije

polifenola, čime je moguće smanjiti efikasnost samog postupka i ekstrahovanih jedinjenja (Dai i Mumper, 2010). Korišćenje smeše metanola, etanola i acetona kao ekstragensa utiče na ekstrahovanje i drugih nefenolnih jedinjenja (polisaharidi, proteini) iz biljnog materijala, pa je potrebno takve ekstrakte naknadno prečistiti. U farmaceutskoj industriji najčešće se kao rastvarač za ekstrakciju koristi etanol, pre svega zbog bezbednosti u odnosu na metanol koji je toksičan. Etanol spada u grupu bezbednih rastvarača-GRAS status (engl. *Generally recognized as safe*) (Casteneda-Ovando i sar, 2009; Čujić, 2017). Zbog toga je za izradu ekstrakata korišćenih u našem istraživanju, etanol kao rastvarač bio prvi izbor. Ekstrakcioni uslovi primenjeni u toku ekstrakcije definisani su od strane Čujić i sar (2016), koji su pod tim uslovima dobili ekstrakte aronije sa najvećim sadržajem aktivnih principa (sito 0,75, rastvarač 50% etanol, odnos droga rastvarač 1:20, ekstrakciona tehnika maceracija).

Poslednjih godina veoma se ističe značaj fenolnih jedinjenja u prirodnim proizvodima zbog njihovih bioloških aktivnosti (Balasundram i sar, 2016). Sadržaj polifenola usko je povezan sa nutritivnim i senzornim karakteristikama voća i povrća (Rinaldo i sar, 2010); Ames i sar, 1993). Na fenolni sastav i biološka svojstva plodova različitih biljnih vrsta mogu uticati određeni faktori kao što su sorta, klimatski faktori, vreme žetve, kao i procesi nakon žetve poput sušenja, sečenja, skladištenja, pakovanja, fermentacije i obrade (Patthamakanokporn i sar, 2008; Rodrigues i sar, 2009). Da bi se očuvale hranljive komponente voća (poput vitamina i karotenoida), obično se preporučuje sušenje proizvoda liofilizacijom (sušenje zamrzavanjem). Metoda liofilizacije efikasna metoda koja se koristi za očuvanje proteina, mikroorganizama, tkiva i plazme, proizvodnju komercijalnih proizvoda (farmaceutskih preparata, prirodnih aditiva i konzervansa za prehrambenu industriju), kao i za produženje roka čuvanja hrane sprečavanjem rasta mikroorganizama, inhibicijom enzimske razgradnje i usporavanjem oksidacije lipida (Franks, 1998; Abdelwahed i sar, 2006; Pérez-Gregorio i sar, 2011; Chang i sar, 2006).

Preparati aronije korišćeni u istraživanju bili su liofilizovani u cilju očuvanja nestabilnih aktivnih principa, posebno antocijana, što je potvrđenom istraživanjem Čujić i sar (2017). Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem predstavlja često primenjivanu metodu sušenja u industriji, koja se koristi kako bi se očuvali termolabilni aktivni principi i njihove nutritivne i zdravstvene vrednosti. Iako je process liofilizacije u ekonomskom smislu skuplji i vremenski zametan proces, u poređenju sa konvencionalnim metodama sušenja (sušenje u sušnicama) ima dosta značajnih prednosti. Konvencionalne metode uključuju korišćenje visokih temperatura što

dovodi do dehidracije materijala, utiču na količinu aktivnih principa i kvalitet biljnih ekstrakata ili preparata. Često se mogu uočiti i promene organoleptičkih karakteristika što može ograničiti njihovu upotrebu u farmaceutskoj industriji (Ćujić i sar, 2017). Istraživanje u kome je vršeno ispitivanje uticaja različitih načina sušenja uzoraka (sušenje u sušnici, raspršivanjem i liofilizacija) na očuvanje sadržaja polifenola u soku aronije pokazalo je da je sušenje liofilizacijom dovelo do najvećeg očuvanja aktivnih jedinjenja (Aizpurua-Olaizola i sar, 2016). S druge strane, postoje i istraživanja koja pokazuju da tokom procesa liofilizacije može doći do smanjenja antioksidativnih svojstava proizvoda voća i povrća uzrokovanih razgradnjom određenih bioaktivnih jedinjenja (kao što su fenolna jedinjenja i askorbinska kiselina) (Shofian i sar, 2011; Marques i sar, 2006).

Opšte je poznato da se deo od 25% do 50% hrane u nekom trenutku tokom proizvodnje i konzumiranja odbaci (Boland i sar, 2013). Udeo ostataka koji zaostaju nakon industrijske prerade sokova različitog voća kreće se od otprilike 15% za grožđe do 50% za agrume (citrusne) (Oreopoulou i Tzia, 2007). Ovaj otpadni materijal često je veoma bogat izvor hranjivih materija. Za smanjenje količine otpadnih produkata tokom i nakon prerade voća, potrebno je povećati svest proizvođača o proizvodima koji se do sada smatraju otpadom i izgraditi sistematske strategije za razvoj novih proizvoda koji bi se dobijali koristeći otpadne produkte (npr. ostatke plodova aronije koji zaostaju nakon ceđenja soka). Zajedno sa svešću kako proizvođača, tako i potrošača, korišćenje prerađenih ostataka bobičastog voća može doprineti održivijoj upotrebi hrane i povećati ukupni profit u prehrambenoj, ali i farmaceutskoj industriji (Rohm i sar, 2015). Raspodela polifenola u plodovima bobičastog voća je neujednačena: samo 10% ukupnih polifenola nalazi se u pulpi bobica, 28–35% - u spoljašnjem delu (ovojnici ili koži) bobica, a preostalih 60–70% - u semenkama bobica (Heinonen, 2007). Ostaci plodova nakon ceđenja (presovanja) koji sadrže ovojnicu i seme, predstavljaju odličan izvor fenolnih jedinjenja i mogu se koristiti kao materijal bogat aktivnim polifenolima (Klavins i sar, 2018). Postoje istraživanja koja su ispitivala ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz nusproizvoda hrane, i to za jabuku (Pingret i sar, 2012), otpadne produkte aronije (d'Alessandro i sar, 2014), ili ostaci nakon presovanja borovnica (Kerbstadt i sar, 2015). Značajno je napomenuti da sastav i distribucija fenolnih supstanci u biljnom materijalu zavisi od biljne vrste, pa uslovi njihove ekstrakcije moraju biti tome prilagođeni (Klavins i sar, 2018).

Ostatak koji zaostaje nakon prerade plodova aronije bogat je izvor aktivnih jedinjenja, dijetnih vlakana i pektina, i kao takav može biti upotrebljen za izradu ekstrakata u cilju koncentrisanja ovih aktivnih principa. U istraživanju Kapci i saradnika (2013) pokazano je da je među različitim proizvodima aronije, polifenolima i antocijanima najbogatiji upravo ekstrakt dobijen od materijala koji sadrži ovojnicu ploda i seme (Kapci i sar, 2013). d'Alessandro i saradnici (2014) ispitivali su optimalne uslove ekstrakcije polifenola iz otpadnih produkata aronije i pokazali da su ekstrakti dobijeni od ovog materijala veoma bogati aktivnim polifenolima (d'Alessandro i sar, 2014).

Rezultati analiza hemijskog sastava ispitivanih preparata ploda aronije pokazali su da je sadržaj fenolnih jedinjenja i antocijana kao najzastupljenijih bio značajno veći u ekstraktu ostatka nakon ceđenja soka (AOE) nego u soku (AS) i ekstraktu ploda (AE). Sadržaj proantocijanidina takođe je bio najveći u ovom ekstraktu. Očekivano je i HPLC analiza aktivnih jedinjenja pokazala značajno veću koncentraciju pojedinačnih antocijana u AOE, što ukazuje da odbacivanjem ovog zaostalog materijala nakon ceđenja soka odbacujemo material koji može biti, po rezultatima hemijskih ispitivanja, izvor najveće količine farmakološki aktivnih jedinjenja. Antocijani su skoncentrisani upravo u omotaču ploda, a oni u velikoj meri utiču na biološku aktivnost aronije. Suprotno antocijanima, najveća količina flavonoida bila je detektovana u ekstraktu celog ploda aronije (AE), koji je u poređenju sa ostala dva ispitivana preparata sadržao najmanju količinu ukupnih polifenola.

Studija koju su sproveli Čujić i saradnici (2018) pokazala da je ekstrakt ploda aronije, iako su uslovi ekstrakcije bili isti, sadržao značajno manju količinu aktivnih principa, u poređenju sa količinom ukupnih fenola, antocijana i proantocijanidina u ispitivanim preparatima (Čujić i sar, 2018). Ovo može biti posledica različitosti u staništu i godini uzgoja, što uslovljava i različito zemljište, klimatske uslove i temperature (plodovi aronije korišćeni u našem istraživanju sakupljeni su u fazi pune zrelosti, na poljima sertifikovanim za organsku proizvodnju u okolini Šabca). Takođe na procenat aktivnih jedinjenja mogu uticati i uslovi čuvanja i skladištenja plodova. Preparati koje smo ispitivali izrađivani su veoma brzo nakon sakupljanja plodova, kako bi se izbegao mogući uticaj pomenutih faktora na količinu biološki aktivnih principa i smanjenje nutritivne vrednosti ploda.

Dosadašnji literaturni podaci pokazuju da je sadržaj polifenolnih jedinjenja u različitim preparatima plodova aronije varijabilan. Naime, sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima aronije

varira od 192 do 714,1 mg/g suve materije, dok je u soku o opsegu od 13.32 do 37.29 mg/g sveže materije (Oszmianski i Wojdylo, 2005; Jurgonski i sar, 2008; Bijak i sar, 2013a,b; Adamska i sar, 2014; Hwang i sar, 2014; Brzoska i sar, 2015b, Borowska i Brzoska, 2016). Pregledom literature utvrđeno je da je sadržaj antocijana u ekstraktima u opsegu od 5,9 do 404,5 mg/g suve materije (Ryszawa i sar, 2006; Jurgonski i sar, 2008; Bijak i sar, 2013a, 2013b; Brzoska i sar, 2015b; Vlachoianis i sar, 2015), dok je u soku od 5,93 do 11,8 mg/100ml (Handeland i sar, 2014). Pored antocijana koji su identifikovani u našem istraživanju HPLC analizom, u literature se mogu pronaći i podaci o drugim antocijanima koji su prisutni u plodu aronije, kao što je cijanidin-3-*O*-ksilozid (Borowska i Brzoska, 2016). Kim i saradnici (2013) dokazali su i prisustvo glikozida pelargonidina (Kim i sar, 2013). Hellstrom i saradnici (2010) su takođe pronašli cijanidin-3-*O*-galaktozid kao najzastupljeniji u liofilizovanom soku aronije (Hellstrom i sar, 2010). Ekstrakt koji su opisali Čujić i saradnici (2018) kao i Ciocoiu i saradnici (2013) sadrže rutin, hiperozid i kvercetin kao dominantne flavonoide, slično našim uzorcima (Čujić i sar, 2018; Ciocoiu i sar, 2013). Pokazano je da postoji razlika u aktivnosti i potencijalnim zdravstvenim koristima između izolovanog trimernog procijanidina C1 i dimernih procijanidina B2 i B5 iz plodova *Aronia melanocarpa*. Na aktivnost mogu uticati jedinice šećera povezane sa antocijanidinom. Brojna istraživanja su potvrdila da potencijalne zdravstvene koristi i fiziološki efekti antocijana i proantocijanidina zavise direktno od strukture ovih jedinjenja (Bräunlich i sar, 2013).

Poslednjih godina interesovanje nauke bilo je usmereno na istraživanje bobičastog voća, njihovih hranljivih vrednosti i mogućih terapijskih efekata (Canadanovic-Brunet i sar, 2019). Aronija (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) od davnina se koristi kao bogat izvor bioaktivnih jedinjenja, uglavnom polifenola. Brojnim studijama su ispitavi hemijski sastav i nutritivna vrednost *A. melanocarpa* ploda. Polifenoli kao što su antocijanini, proantocijanidini, fenolne kiseline, flavanoni i flavonoli su jedinjenja koja se najčešće nalaze u plodovima aronije (Benvenuti i sar, 2004; Slimestad i sar, 2005). Antocijanini su dominantna flavonoidna jedinjenja u plodovima i predstavljaju oko 25% ukupnih polifenola. Plodovi sadrže uglavnom cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-ksilozid i cijanidin-3-*O*-glukozid (Oszmianski i Sapis, 1088; Gasiorowski i sar, 1997; Čujić i sar, 2018). Ostatak ploda aronije koji zaostaje kao otpadni materijal nakon ceđenja soka dobija sve veću pažnju naučnika poslednjih

godina, upravo zbog veoma visokog sadržaja fenolnih supstanci (Steyn, 2009; Galvan i sar, 2014; Laroze i sar, 2010).

5.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

Plodovi *A. melanocarpa* veoma su bogati aktivnim jedinjenjima koja uslovljavaju njihovu biološku aktivnost. Visok sadržaj fenolnih jedinjenja, posebno antocijana, korelira sa sa njihovim izrazitim antioksidativnim delovanjem (Denev i sar, 2012). Pregledom literature utvrđeno je mnoštvo farmakoloških aktivnosti aronije *in vivo* i *in vitro*. Dokazano je da sok i ekstrakt ploda aronije ima gastroprotektivno, antidijabetičko, hepatoprotektivno, protivupalno, antioksidativno, antivirusno, antimutageno, antikancerogeno i radioprotektivno delovanje. Studije su takođe potvrdile hipotenzivne, kardioprotektivne i antiaterogene efekte soka od aronije (Wu i sar, 2004; Borowska i Brzoska, 2016; Kulling i Rawel, 2008; Kokotkiewicz i sar, 2010; Milutinović i sar, 2019). Smatra se da je mehanizam ostvarivanja ovih bioloških aktivnosti aronije direktno povezan sa antioksidativnim svojstvima ovih plodova. Literaturni podaci ukazuju na mogućnost primene preparata aronije u prevenciji i lečenju bolesti koje su posledica oksidativnog stresa, objašnjavajući *in vitro* i *in vivo* mehanizme kojima se ostvaruju antioksidativni efekti. Evidentno je da se *in vivo* antioksidativni mehanizmi uključuju ne samo uklanjanje nastalih slobodnih radikala, već i suzbijanje stvaranja reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, inhibiciju prooksidantnih enzima, obnavljanje antioksidativnih enzima i verovatno uticaj na ćelijsku signalizaciju kojom se regulišu antioksidantni mehanizmi u organizmu (Denev i sar, 2012).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata i soka ploda aronije ispitivana je pomoću dva *in vitro* testa, koja procenjuju antioksidativne efekte ispitivanih preparata ostvarene kroz dva različita mehanizma. DPPH test koristi se za procenu antioradikalske aktivnosti ekstrakata i soka, kroz mehanizam neurtlizacije (“hvatanja”) DPPH· radikala. Naime, slobodni DPPH· radikal (ljubičasta boja) reaguje sa fenolnim ili drugim jedinjenjima prisutnim u ekstraktima i soku, čime se prevodi u redukovanu formu (žuta boja) primajući jedan proton (metoda transfera elektrona) (Molyneux, 2003; Huang i sar, 2005). BKL testom ispituje se antilipoperoksidna aktivnost ekstrakata i soka aronije, kroz mehanizam kompetitivnog obezbojavanja β -karotena.

Karotenoid (β -karoten) kao efikasan antioksidans sprečava oksidaciju linolne kiseline i nastanak lipidnih peroksida u prisustvu kiseonika, tako što se i sam oksiduje (slabi intenzitet žute boje, obezbojava se). Dodatkom supstanci koje ispoljavaju antioksidativno dejstvo, razgradnja β -karotena se usporava i boja sistema ostaje žuta (Rogunsky i Lissi, 2005).

DPPH test iako veoma brz i lak za izvođenje, ima i nekih ograničenja. Često antioksidanti, koji brzo reaguju sa peroksil radikalima reaguju veoma sporo sa DPPH radikalom. Takođe je pokazano da DPPH reaguje reverzibilno sa nekim polifenolnim jedinjenjima što rezultira izmenjenim rezultatima (Huang i sar, 2005).

Antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja određuje nekoliko strukturnih karakteristika: broj i raspored hidroksidnih grupa, prisustvo 3-OH grupe i orto-dihidroksi supstitucija u B prstenu flavonoida, kao i drugih jedinjenja. Dvostruka veza na položaju 2 ili 3 u kombinaciji sa kiseonikom na položaju 4 u C prstenu takođe je preduslov za dobro antioksidativno delovanje (Bors i sar, 1990; Salah i sar, 1995; Rice-Evans i sar, 1996).

Među polifenolima koji su prisutni u aroniji, kvercetin poseduje mnoge strukturne karakteristike neophodne za antioksidativno delovanje, i on se smatra najsnažnijim antioksidansom među monomerima fenola aronije, praćen glikozidima cijanidina i hlorogenskom kiselinom (Denev i sar, 2012). Zheng i Vang (2003) su procenili da antocijani, flavonoli i hidroksicimetne kiseline doprinose oko 59,4% ukupnom antioksidativnom delovanju plodova aronije ne uzimajući u obzir mogući sinergizam ili antagonizam između pojedinih antioksidanata. To bi značilo da se oko 40% antioksidativne aktivnosti aronije može pripisati proantocijanidinima što ih prema ovom istraživanju klasifikuje kao jedinjenja koja najviše doprinose antioksidativnom dejstvu plodova aronije (Zheng i Vang, 2003). Ranija istraživanja takođe pokazuju da antioksidativno dejstvo aronije može usloviti i sadržaj vitamina (vitamin C i E), karotenoida i mineral (cink, bakar i selen) u plodovima (Valcheva-Kuzmanova i sar, 2007). Takođe je potvrđeno da polifenoli učestvuju u regeneraciji vitamina C i E (Dai i sar, 2008; Graversen i sar, 2008).

Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata i soka ploda aronije utvrđeno je da su u DPPH test sistemu svi ispitivani preparati ispoljili značajno antioksidativno dejstvo, sa posebnim osvrtom na ekstrakt ostatka ploda nakon ceđenja soka (AOE) koji je bio najefikasniji. DPPH antiradikalska aktivnost u korelaciji je sa sadržajem ukupnih fenola i proantocijanidina u ekstraktima i soku ($r=-0,874$ i $r=-0,819$, $p<0,01$), što može ukazivati na značajan doprinos ovih

jedinjenja antioksidativnoj aktivnosti preparata. Hemijskom analizom potvrđeno je da AOE sadrži i najveću količinu ukupnih fenola i proantocijanidina, u poređenju sa druga dva ispitivana preparata. Najslabiju antioksidativnu aktivnost ispoljio je ekstrakt (AE), koji je i u pogledu sadržaja ukupnih fenola i proantocijanidina bio najsiromašniji među preparatima. Treba pomenuti i povezanost antiradikalske aktivnosti sa sadržajem ukupnih antocijana, iako ona nije bila statistički značajna. Flavonoidi, prema podacima iz našeg istraživanja, ne doprinose antioksidativnoj aktivnosti određivanoj u DPPH sistemu, obzirom da je koeficijent korelacije pozitivnog smera ($r=0,904$, $p<0,01$). AE je sadržao najveću količinu flavonoidnih jedinjenja, stoga je i njegova antioksidativna aktivnost u skladu sa ovih rezultatima, najslabija.

Ispitivanjem koje je vršeno pomoću BKL test sistema može se utvrditi da su rezultati merenja antioksidativne aktivnosti ekstrakata i soka aronije u suprotnosti sa rezultatima prethodnog testa. Naime, u BKL sistemu najpotentniji antioksidans bio je sok (AS) sa najnižom IC_{50} vrednošću. AOE se ovde pokazao kao najslabiji, dok je AE ispoljio sličnu antioksidativnu aktivnost u dva korišćena test sistema, s tim što je bolje efekte pokazao u BKL testu (niža IC_{50} vrednost). Zanimljivo je da je analiza pokazala jaku pozitivnu korelaciju sa ukupnim antocijanima ($r=0,845$, $p<0,01$), što bi značilo da oni ne doprinose ovoj aktivnosti (koeficijent korelacije je pozitivnog smera). Time se može objasniti i slabija antioksidativna aktivnost AOE, obzirom da je ovaj ekstrakt sadržao najveću količinu ukupnih antocijana. Jedino su flavonoidi doprinosili ovoj aktivnosti (koeficijent korelacije negativnog smera), ali taj doprinos se nije pokazao statistički značajnim. Sok aronije kao najpotentniji antioksidant u BKL test sistemu, sadržao je takođe veliku količinu polifenola i antocijana, ali verovatno i druga jedinjenja koja su doprinela antioksidativnoj aktivnosti (vitamin, minerali i drugo).

Jakobek i saradnici (2007) ispitivali su antioksidativni kapacitet različitih vrsta bobičastog voća (ploda maline, kupine, jagode i aronije) gajenih na području Slovenije i pokazali da su ekstrakti ploda aronije najpotentniji antioksidanti u DPPH test sistemu, sa najvećim sadržajem polifenola (Jakobek i sar, 2007). Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja *in vivo* uslovljena je mnogim faktorima, pre svega njihovom bioraspoloživošću. Kako bi aronija ispoljila *in vitro* dokazanu antioksidativnu aktivnost, biološki aktivna jedinjenja moraju biti apsorbovana, transportovana i distribuirana u tkivima, ćelijama i biološkim tečnostima.

Kapacitet i efikasnost antioksidanata *in vivo* može se tačno proceniti pomoću nivoa oksidacije u biološkim tečnostima i tkivima, kao što su plazma, eritrociti, urin i cerebrospinalna

tečnost ljudi ili eksperimentalnih životinja. Istraživanje bioraspoloživosti polifenola omogućava nam da povežemo unos polifenola sa jednom ili više preciznih mera njihove bioraspoloživost (poput koncentracije ključnih bioaktivnih metabolita u plazmi i tkivima) i sa njihovim potencijalnim uticajem na zdravlje kroz sprovođenje epidemioloških studija (Manach i sar, 2004).

Biološka raspoloživost različitih polifenolnih jedinjenja značajno se razlikuje. Metabolizam antioksidanata predstavlja još jedan faktor koji značajno utiče na njihovu bioraspoloživost. Obično su nakon apsorpcije polifenoli podvrgnuti konjugacijama: metilaciji, sulfatiji ili glukuronidaciji. Zanimljivo je da za razliku od drugih flavonoida koji se apsorbuju i izlučuju, većina antocijana ne podleže ekstenzivnom metabolizmu antocijanidina do glukuronida, sulfata, ili metil derivata (Miyazava i sar, 1999; McGhie i sar, 2003; Ichianagi i sar, 2005). Struktura nastalih metabolita može biti potpuno drugačija od strukture početnog jedinjenja, što bi značilo da metabolit ne mora ispoljiti iste efekte. Merenje koncentracija metabolita u plazmi predstavlja dobre markere bioraspoloživosti, ali i one mogu varirati u skladu sa prirodom fenolnog jedinjenja i mogu biti veoma niske (obično su nanomolarne do niskih mikromolarnih) (Hollman i sar, 1997; Graefe i sar, 2001). Od polifenola prisutnih u plodu aronije, katehin i kvercetin se efikasnije apsorbuju nego antocijani, koji se u plazmi pojavljuju u vrlo niskim koncentracijama (Miyazava i sar, 1999; Cao i sar, 2001; Matsumoto i sar, 2001).

5.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE

Polifenoli različitih biljnih vrsta ispoljavaju značajnu antimikrobnu aktivnost i prirustvo ovih jedinjenja u ekstraktima upravo doprinosi inhibiciji rasta i uništavanju mikroorganizama (Rauha i sar, 2000). Antimikrobna aktivnost aronije dokumentovana je brojnim ranijim istraživanjima. Pregledom literature može se uočiti da je antimikrobno dejstvo aronije i njenih preparata uglavnom posledica delovanja proantocijanidina (Denev i sar, 2019). Iako je toksičnost taninskih jedinjenja prema mikroorganizmima dobro dokumentovana, Denev i saradnici (2019) po prvi put ukazuju na to da su kondenzovani tanini aronije glavnodelujući antimikrobni agensi ovih plodova (Denev i sar, 2019). Do sada predloženi različiti mehanizmi za objašnjenje antimikrobne aktivnosti tanina uključuju inhibiciju ekstracelularnih mikrobioloških enzima,

uklanjanje supstrata potrebnih za rast mikroba ili direktno dejstvo na metabolizam mikroorganizama putem inhibicije oksidativne fosforilacije (Scalbert, 1991). Studija Taguri i saradnika (2004) pokazala je da su različite vrste polifenola, uključujući katehin i njihove proizvode oksidacije - proantocijanidine i tanine koji podležu hidrolizi, dobri antibakterijski agensi protiv četiri grupe bakterija poreklom iz hrane. Autori su zaključili da osetljivost bakterija na polifenole zavisi od bakterijskih vrsta i strukture polifenola i pokazali su važnost 3,4,5-trihidroksifenil grupa za ispitivano antimikrobno delovanje (Taguri i sar, 2004). Denev i saradnici (2019) u svom istraživanju pokazali su proantocijanidini efikasni protiv bakterije *Proteus vulgaris*, ali sa 25 puta većim koncentracijama u poređenju sa antibiotikom (Denev i sar, 2019).

Treba napomenuti da ne postoje dokazi da su polifenolna jedinjenja aronije, naročito proantocijanidini, toksični ili da imaju štetne efekte karakteristične za antibiotike. Zbog toga, kondenzovani tanini iz plodova aronije mogu da ispoljavaju svoja antimikrobna svojstva protiv sojeva *Staphilococcus aureus* i *Proteus vulgaris* G u gastrointestinalnom traktu (GIT-u), zavisno od njihove koncentracije (Scalbert i Villiamson, 2000). Mnoga polifenola jedinjenja se u maloj meri ili uopšte ne apsorbuju u GIT-u. Antocijani koji su široko rasprostranjeni u mnogim biljkama slabo se apsorbuju iz tankog creva. Pojavljuju se u krvi i urinu u nanomolarnim koncentracijama, pa značajne količine verovatno prelaze u kolon gde dolazi do bakterijske razgradnje. Slično antocijanima, i proantocijanidini, koji su jaki antioksidanti *in vitro*, imaju veoma ograničenu apsorpciju u GIT-u. Oligomeri veći od trimera verovatno se neće apsorbovati iz tankog creva u nepromenjenim oblicima (Denev i sar, 2012).

Istraživanja su pokazala da su antocijanini aktivni protiv različitih mikroorganizama, međutim Gram (+) bakterije su obično osjetljivije na djelovanje antocijana od G (-). Mehanizmi koji su u osnovi antimikrobne aktivnosti antocijana uključuju i membranske i unutarćelijske interakcije ovih jedinjenja (Cisowska i sar, 2010). Iako se pojedini flavonoidi dobro apsorbuju iz GIT-a, maksimalne koncentracije u plazmi su im vrlo niske, delom zbog brzog metabolizma u tkivima ili bakterijske razgradnje u kolonu (Hallivell i sar, 2005). Pošto je apsorpcija fenolnih jedinjenja nepotpuna, većina prolazi kroz GIT i kao takva dolazi u debelo crevo. Njihovo lokalno delovanje ipak može biti veoma važno jer je debelo crevo posebno izloženo oksidativnim i inflamatornim procesima, čiji su uzročnici veoma često prisutni mikroorganizmi.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata i soka ploda aronije pokazala su da ovi preparati mogu biti efikasni u odbrani od različitih patogenih bakterija koje se mogu naći u GIT-u. Ovi preparati vrše inhibiciju rasta bakterija i gljiva, bez ispoljene baktericidne aktivnosti u ispitivanim koncentracijama. Stoga mogu biti efikasno sredstvo u prevenciji gastrointestinalnih infekcija, kao i dobro pomoćno lekovito sredstvo pri antibiotskoj terapiji. Nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti između tri ispitivana preparata (AE, AOE i AS), sa izuzetkom bolje aktivnosti AOE protiv *Bacillus cereus* soja (MIC = 6,25 mg/ml), kao i slabijeg antimikrobnog dejstva soka prema *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 50 mg/ml). Ekstrakti i sok ispoljili su jaču aktivnost prema korišćenim G (+) sojevima, u poređenju sa G (-) i fungalnim sojem.

Najbolji efekti primećeni su kod *Enterococcus faecalis* i *Enterobacter aerogenes*, a efekti su bili istovetni za sva tri preparata sa MIC koje su iznosile 1,56 mg/ml. *E. faecalis* je G (+) anaerobna bakterija i može biti veoma često uzrok lokalnih ili sistemskih nozokomijalnih infekcija. To su infekcije koje najčešće zahvataju urinarni trakt, ali mogu uzrokovati i abdominalne infekcije, bakterijemije, infekcije rana i endokarditis kao najozbiljniji oblik.

E. faecalis je otporna bakterija na ekstremne temperature i razne druge faktore sredine, ali i rezistentna na mnoge antibiotike što je čini ozbiljnim zrdavstvenim problemom današnjice (Murray, 1998; Kostić, 2019). Zbog enterokokne multirezistentnosti na mnoge antibiotike kao što su aminoglikozidi, cefalosporini, penicilin, pa čak i vankomicin i teikoplanin, lečenje ovih infekcija je veoma komplikovano (Gilmore, 2002).

Enterobacter aerogenes jeste anaerobna G (-) bakterija koja se može naći u hrani, mlečnim proizvodima, vodi, ali i GIT-u ljudi i životinja (Gayet i sar, 2003). Čest je uzročnik intrahospitalnih infekcija, respiratornih, gastrointestinalnih i urinarnih infekcija (cistis) (Brooks i sar, 2007; Janda i Abbott, 2006; Mihajilov-Krstev, 2009). I ova bakterija pripada multirezistentnim bakterijama, naročito prema penicilinima i cefalosporinima, a mnogi sojevi otporni su i na tetracikline, streptomycin, fluorohinolone, hloramfenikol, kao i na druge aminoglikozide (Greenwood i sar, 2002; Kostić, 2019). *E. aerogenes* sposobna je da razvije rezistenciju na antibiotike pre nego on dostigne potrebnu koncentraciju za njeno uništenje, tako da to dodatno stvara terapijski problem (Chevalier i sar, 2004).

Ekstrakti i sok aronije bili su vrlo efikasni *in vitro* protiv *E. faecalis* i *E. aerogenes* bakterijskog soja, što ih čini dobrim pomoćnim sredstvima u odbrani od ovih infekcija ili pak

dobrim polaznim supstancama za sintezu novih antimikrobnih lekova. Nešto slabiju aktivnost, ali značajnu, preparati aronije ispoljili su prema soju *Staphylococcus aureus* (MIC = 6,25 mg/ml). *S. aureus* pripada velikoj grupi stafilokoka koje su veoma otporne na povišene temperature i uslove sredine, a nalaze se u spoljašnjoj sredini, vodi, vazduhu, hrani i normalan su deo flore nosne sluzokože (Mihajilov-Krstev, 2009). *S. aureus* ili drugačije nazvan zlatni stafilokok jeste anaerobna G (+) bakterija koja je veoma patogena i uzrokuje mnoge infekcije (kožne infekcije, rinitis, laringitis, pneumoniju, ali i artritis, meningitis, endokarditis, gastroenteritis i druge) (Kostić, 2019). Otporna je na dejstvo penicilinskih antibiotika, a postoji i multirezistentni soj – MRSA (metilicilin rezistentni *Staphylococcus aureus*) koji izaziva veoma teške infekcije koje su najčešće hospitalne. U lečenju ovih infekcija koriste se antibiotici sa glikopetidnom strukturom npr. vankomicin, kojih je danas veoma malo (Boucher i Corey, 2008; Foster, 1996; Taylor i Unakal, 2017).

Dobre antibakterijske efekte ispitivani preparati ispoljili su na bakterijskim sojevima *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella enteritidis*, sa MIC = 12,5 mg/ml. AOE je imao najbolje efekte prema soju *B.cereus* (MIC = 6,25 mg/ml), što bi se moglo objasniti najvećim sadržajem polifenolnih jedinjenja u ovom ekstraktu. Bakterije iz roda *Bacillus* pripadaju aerobnim ili fakultativno anaerobnim bakterijama veoma otporim na dejstvo temperature, zamrzavanja, sušenja, kao i procese zračenja. Ove bakterije rezistentne su i na process pasterizacije hrane, tako da se veoma često hranom mogu prenositi ili u njoj perzistirati (FDA, 2012). Simptomi infekcije ovom bakterijom obično se javljaju kao GIT poremećaji, vodenaste stolice, mučnina, povraćanje, bolovi u stomaku ili grčevi, nakon uzimanja kontaminirane hrane. Bakterije su otporne na dejstvo penicilina i cefalosporina, tako da se u terapiji nastalih infekcija koriste drugi antibiotici poput aminoglikozida, eritromicina, tetraciklina i dr. (FDA, 2012; Bottone, 2010). Obzirom na *in vitro* antibakterijsku aktivnost, možemo pretpostaviti da se preparati aronije mogu koristiti kako u lečenju, tako i u prevenciji infekcija uzrokovanih ovom bakterijom. Takođe bi se mogli dodavati hrani, uz pretpostavku da tu mogu ispoljiti svoje antimikrobno dejstvo i inhibirati rast *B. cereus*. u kontaminiranim namirnicama.

Listerioze, infekcije izazvane bakterijskim sojem *Listeria monocytogenes*, veoma su teške infekcije koje se manifestuju kroz dve forme: invazivna i neinvazivna. Invazivna forma je ozbiljna infekcija sa dužim periodom inkubacije, koja može završiti letalno i pojavom meningitisa ili sepse. Neinvazivna infekcija je blaža forma, koja se manifestuje kao GIT

infekcija (febrilni gastroenteritis) čiji simptomi traju samo par dana. Infekcije *L. monocytogenes* leče se beta-laktamskim antibioticima, penicilinima, osim kod pacijenata koji su alergični pa se kod njih mora primeniti trimethoprim-sulfametoksazol (Kostić, 2019).

Salmonella enteritidis je fakultativno anaerobna G (-) bakterija koja je slabo otporna u spoljašnjoj sredini i primarni je crevni patogen kod ljudi i životinja (Jovanović i sar, 1999). Sa umerenom aktivnošću protiv ovih bakterija, preparati aronije mogu biti dobra antimirobna sredstva u prevenciji ili pomoćna lekovita sredstva u tretmanu ovih bakterijemija, mada je neophodno sprovesti i *in vivo* ispitivanja koja bi potvrdila efekte. Najslabiju aktivnost preparati su ispoljili prema sojevima *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis*, iako inhibicija rasta ovih bakterija nije u potpunosti izostala (MIC = 50 mg/ml). Na ispitivanom fungalnemu soju, *Candida albicans*, preparati su ispoljili umerenu antigungalnu aktivnost sa MIC od 25 mg/ml.

Podaci iz literature dokazuju antibakterijske efekte aronije protiv bakterija *Escherichia coli* (Braunlich i sar, 2013b), *Bacillus cereus* (Braunlich i sar, 2013b; Liepina i sar, 2013), *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Liepina i sar, 2013), kao i protiv bakterija odgovoranih za razvoj infekcija urinarnog trakta (Handeland i sar, 2014). Uzimajući u obzir i antiinflamatorna svojstva (Appel i sar, 2015) i antibakterijsko delovanje ekstrakata i soka aronije (Braunlich i drugi 2013b; Liepina i drugi 2013; Handeland i drugi 2014), može se pretpostaviti da proizvodi ploda aronije mogu biti korisni u prevenciji i lečenju bakterijskih infekcija, kao dopuna antibiotskoj terapiji.

5.4. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA

Funkcionalni gastrointestinalni (GIT) i poremećaji pokretljivosti creva smatraju se najčešćim GIT poremećajima među ljudskom populacijom. Glavni simptomi se javljaju u srednjem ili donjem delu GIT-a i obično uključuju spazam, mučninu, nadutost, bol u trbuhu i niz drugih simptoma poremećaja defekacije (Parkman i sar, 2006; Drossman i sar, 2000). Patofiziološki mehanizmi funkcionalnih poremećaja GI nisu u potpunosti razjašnjeni i konvencionalna medicina nije uvek efikasna u njihovom lečenju, pa se veoma često pacijenti okreću komplementarnoj i alternativnoj medicini (American College of Gastroenterology Functional Gastrointestinal Disorders Task Force i sar, 2009).

Gastrointestinalni sistem ima tri osnovne funkcije u organizmu a to su unos, razgradnja i apsorpcija hranjivih materija, kao i eliminacija produkata metabolizma i varenja hrane. Digestivni sistem se sastoji od niza međusobno povezanih organa specifične građe i svojstvene funkcije, sa pojedinim zajedničkim anatomskim karakteristikama kao što su prisustvo seroznog, mišićnog, submukoznog i mukoznog sloja (Kostić, 2019). Mišićni sloj gastrointestinalnih organa građen je od glatkih mišića koji mogu da budu cirkularni (unutrašnji) i longitudinalni (spoljašnji). Između ovih mišićnih slojeva nalazi se mijenterički (Auerbahov) nervni pleksus koji omogućava stalni prenos akcionog potencijala i Kajlove (inersticijske) ćelije koje ostvaruju osnovni ritam prenosom električnog stimulansa poroznim vezama na mišićni sloj. U ćelijama glatkih mišića nalaze se spori kalcijumsko – natrijumski kanali koji omogućavaju ulazak jona kalcijuma (Ca^{2+}) i natrijuma (Na^+) čime se generiše akcioni potencijal glatkih mišića. Glatki mišići GIT-a mogu proizvesti spore talase (spontana električna aktivnost) koji obično ne dovode do kontrakcije već samo do promene membranskog potencijala i pojačane aktivnosti natrijumskih kanala. Drugi vid električne aktivnosti glatkih mišića digestivnog trakta jesu šiljati akcioni potencijali (šiljci) koji dovode do pojave kontrakcija (Branković i sar, 2016, Kostić, 2019).

U zdravom organizmu, proces kontrakcije ćelija glatkih mišića reguliše se uglavnom receptorskom i mehničkom (istezanjem) aktivacijom kontraktilnih proteina miozina i aktina. Promena membranskog potencijala, izazvana nastankom akcionog potencijala može izazvati kontrakciju. Da bi došlo do kontrakcije, kinaza lakog lanca miozina (MLC kinaza) mora fosforilisati laki lanac miozina, omogućavajući molekularnu interakciju miozina i aktina. Energija oslobođena iz ATP-a miozinskom aktivnošću ATP-aze rezultira ciklizacijom miozinskih poprečnih mostova sa aktinom uzrokujući kontrakciju. Kontraktilna aktivnost u glatkim mišićima određena je prevashodno stanjem fosforilacije lakog lanca miozina što je regulisan proces (Webb, 2003).

Kontrakciju glatkih mišića pokreće kalcijumom posredovana promena u ćelijama. Kao odgovor na specifične nadražaje u ćelijama glatkih mišića, unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} jona se povećavaju, i dolazi do građenja proteinskog kompleksa kalcijum-kalmodulin. Ovaj kompleks vrši aktivaciju MLC kinaze za fosforilaciju lakog lanca miozina. Koncentracija Ca^{2+} u citozolu povećava se otpuštanjem iz unutarćelijskih skladišta kao što je sarkoplazmatski retikulum, kao i ulaskom iz vanćelijskog prostora preko kalcijumovih kanala (receptorski kanali za Ca^{2+}).

Agonisti (norepinefrin, angiotenzin II, endotelin i dr.) se vezuju za receptore, spajaju sa heterotrimernim G proteinom čime stimulišu aktivnost fosfolipaze C. Ovaj enzim je specifičan za membranski lipidni fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat koji katalizuje stvaranje dve potentna sekundarna glasnika: inozitol trisfosfat (IP3) i diacilglicerol (DG). Vezivanje IP3 za receptore sarkoplazmatskog retikuluma rezultira oslobađanjem Ca^{2+} u citozol. DG, zajedno sa Ca^{2+} aktivira protein kinazu C (PKC), koja fosforiliše specifične ciljne proteine. U većini glatkih mišića, PKC ima efekte koji podstiču kontrakciju, kao što je fosforilacija Ca^{2+} kanala ili drugih proteina koji regulišu formiranje poprečnih aktin-miozin mostova. Joni Ca^{2+} vezuju se za kalmodulin, što dovodi do aktivacije miozinske kinaze lakog lanca (MLC kinaza). Ova kinaza vrši fosforilaciju lakih lanaca miozina, pa se u kombinaciji sa aktinom pojavljuje ciklički poprečni most, što inicira skraćenje ćelije glatkog mišića (Webb, 2003).

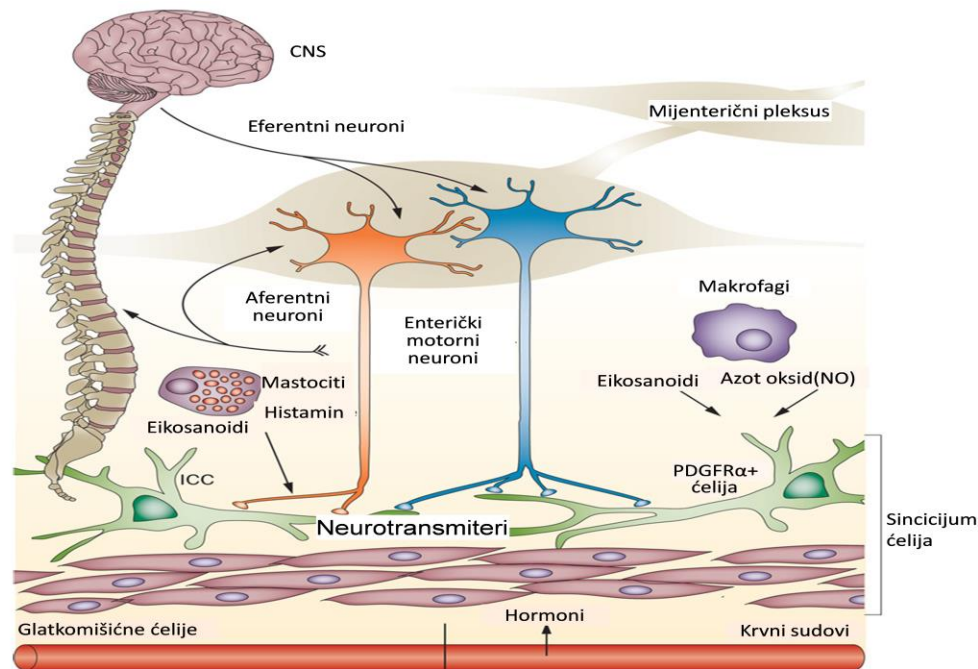
Opuštanje (relaksacija) glatkih mišića nastaje ili kao rezultat uklanjanja kontraktilnog nadražaja ili direktnim delovanjem supstanci koje izazivaju inhibiciju kontraktilnog mehanizma. Proces relaksacije zahteva smanjenu koncentraciju Ca^{2+} jona unutar ćelije i povećanu aktivnost MLC fosfataze. Sarkoplazmatski retikulum i ćelijska membrana sadrže kalcijum-magnezijum-ATP-aze koje uklanjaju Ca^{2+} iz citozola. Na ćelijskoj membrani se takođe nalaze $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanali. Tokom relaksacije zatvaraju se voltažno zavisni kalcijumovi kanali u membrani, što rezultira smanjenim ulaskom Ca^{2+} u ćeliju (Webb, 2003).

Gastrointestinalni trakt čini niz cevastih organa koji obrađuju progutanu hranu, apsorbuju vodu i hranjive materije i eliminišu otpadne produkte metabolizma. Spoljni slojevi zida creva su mišićna tkiva (*tunica muscularis*) koja obezbeđuju sile potrebne za mešanje crevnog sadržaja i premeštanje hrane, vode i otpadnih materija kroz digestivni sistem. U ljudskom gastrointestinalnom traktu, mišići u proksimalnim delovima dve trećine jednjaka i u spoljnjem analnom sfinkteru su poprečno prugasti; ostatak *tunice muscularis* sadrži ćelije glatkih mišića. Gastrointestinalni mišići su autonomni - stvaraju spontanu električnu ritmičnost i kontrakcije uslovljene unutrašnjim Ca^{2+} -osetljivim mehanizmima. Glatkomišićne ćelije GIT-a koje se samostalno kontrahuju nisu u stanju da proizvedu korisne pokrete; međutim, električni i mehanički spojevi formirani sa susednim ćelijama stvaraju sincicijum koji olakšava koordinaciju kontrakcija hiljada ćelija. Ovaj nivo kontrahovanja još uvek nije dovoljan za stvaranje pokretljivosti gastrointestinalnog sistema i pokretanje luminalnog sadržaja. Više nivoa regulatornih ćelija i mehanizama, uključujući intersticijske ćelije, motorne neurone, hormone,

parakrine supstance i medijatore zapaljenja, uključeno je u mišićnu aktivnost da bi se stvorile kontrakcije. Takođe, treba napomenuti da tkiva glatkih mišića gastrointestinalnog trakta nisu homogena. Razlike postoje u funkciji kružnih i uzdužnih mišića. Takođe, postoje važne razlike u električnim i mehaničkim aktivnostima u različitim regionima organa i u sfinkterima koji razdvajaju organe (Sanders i sar, 2012).

Funkcija gastrointestinalnog sistema regulisana je pomoću brojnih složenih mehanizama koji obuhvataju nervne, parakrine i hormonske. Nervna regulacija ćelija gastrointestinalnog sistema obuhvata spoljašnju (autonomni nervni sistem) i unutrašnju inervaciju (enterički nervni sistem) (Branković, 2016; Kostić, 2019). Endokrina kontrola GI sistema obuhvata delovanje gastrointestinalnih hormona iz endokrinih ćelija, koji putem cirkulacije dospevaju do ciljnih ćelija i tu se vezuju za odgovarajuće receptore (gastrin, grelin, gastrični inhibitorni peptid, holecistokinin, motilin, sekretin, i glukagonu sličan peptid 1) (Track, 1980; Kostić, 2018). Parakrina kontrola funkcije GI trakta zasniva se na sekreciji supstanci od strane ćelija GI sistema u međućelijski prostor (endokrina funkcija GIT-a) koje utiču na susedne ćelije (histamin, somatostatin i serotonin) (Branković, 2016; Kostić, 2019).

Digestivni sistem kontrolisan je parasimpatičkim i simpatičkim nervnim sistemom. Preganglijska parasimpatička vlakna koja polaze iz moždanog stable (*nervus vagus*) i sakralnog dela kičmene moždine završavaju se u zidovima organa GIT-a, dok postganglijska parasimpatička vlakna pripadaju enteričkom nervnom sistemu i na svojim završecima oslobađaju acetilholin. Simpatička preganglijska vlakna koja polaze iz kičmene moždine, završavaju se na simpatičkim prevertebralnim i paravertebralnim ganglijama, dok su postganglijska vlakna zadužena za inervaciju glatke muskulature GIT-a i na njihovim završetcima oslobađa se noradrenalin. Noradrenalin se vezuje za adrenergičke receptore i time dovodi do smanjenje pokretljivosti creva, dok se acetilholin vezuje za muskarinske receptore i stimuliše motilitet creva (Slika 5.4) (Branković, 2016; Kostić, 2019).



Slika 5.4. Kontrola funkcije gastrointestinalnog sistema (preuzeto i adaptirano od Sanders i saradnika, 2012).

Biljni preparati imaju dugu istoriju upotrebe kao spazmolitička sredstva. Nedavne studije su dokazale spazmolitičke efekte farmakološki aktivnih jedinjenja u brojnim biljnim vrstama. Spazmolitička aktivnost obično se postiže modulacijom neurotransmiterske aktivnosti, utičući na kalijumske i kalcijumske kanale ili delimično blokirajući oslobađanje kalcijumovih jona iz sarkoplazmatskog retikuluma (Martinez-Pérez i sar, 2018; Gočmanac Ignjatović i sar, 2017).

Fiziološki efekti ekstrakta i soka aronije na aktivnost glatkih mišića gastrointestinalnog trakta ispitivani su kod eksperimentalnih životinja (pacova). Podaci o ulozi preparata aronije u lečenju funkcionalnih poremećaja gastrointestinalnog sistema i motiliteta creva nisu do sada objavljeni. Rezultati su pokazali da ekstrakti i sok aronije mogu ublažiti kontrakcije glatkih mišića ileuma pacova i mogu biti korisni u lečenju spomenutih poremećaja.

Podaci iz literature pokazuju da su flavonoidi izazvali *in vitro* i *in vivo* spazmolitičke efekte na ileumu, materici i bronhijama pacova (Meli i sar, 1990; Di Carlo i sar, 1994; Hammad i Abdalla, 1997; Revuelta i sar, 1997; Rotondo i sar, 2009). Takođe je otkriveno da kvercetin može izazvati inhibiciju spontanijih kontrakcija dvanaestopalačnog creva (Santos Fragundes i sar, 2015). Morales i saradnici (1994) su pokazali inhibicijske efekte kvercetina na K^+ indukovane

kontrakcije izolovanog ileuma zamorca, kao i kalcijum-antagonističke efekte i inhibiciju crevnih kontrakcija glatkih mišića indukovanih Ca^{2+} jonima (Morales i sar, 1994).

Kontraktilnost gastrointestinalnog sistema regulisana je brojnim fiziološkim mehanizmima i posrednicima (Goyal i Hirano, 1996; Gilani i sar, 2008). Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da biljni ekstrakti, sokovi plodova i etarska ulja relaksiraju glatku muskulaturu uglavnom putem uticaja na influks Ca^{2+} jona (Pavlović i sar, 2017; Branković i sar, 2015; Omara i sar, 2016). Da bi smo potvrdili da su preparati aronije delovali na ovaj način, istražen je mogući mehanizam delovanja na kontraktilnost ileuma pacova. Da bi se to postiglo, ispitivano je kako različiti preparati mogu uticati na spontanu, acetilholinom, histaminom, kalcijum hloridom, barijum hloridom i kalijum hloridom indukovane kontrakcije glatkih mišića, kao i na kontrakcije u prisustvu inhibitora azotoksid sintaze (L-NAME).

Pregledom literature utvrđeno je da biljni ekstrakti i njihovi aktivni metaboliti ispoljavaju spazmolitičke efekte kroz inhibiciju spontanih kontrakcija izolovanog ileuma pacova (Branković i sar, 2011; Kitić i sar, 2012). Spontane ritmičke kontrakcije i opuštanje glatkih mišića creva regulisani su nervnim i humoralnim faktorima, ili brojnim neurotransmiterima enteričkog nervnog sistema (Walsh i Singer, 1980). Rezultati istraživanja pokazuju da su preparati aronije znatno smanjili kontraktilnost glatkih mišića ileuma. Ekstrakt aronije (AE) i ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE) pokazali su se boljim inhibitorima spontanih kontrakcija ileuma pacova od soka (AS). Glavni antocijan, cijanidin-3-*O*-galaktozid, takođe je inhibirao spontanu kontrakciju, zavisno od koncentracije. Spazmolitički efekat je bio reverzibilan nakon ispiranja tkiva Tirodovim rastvorom.

Gastrointestinalna kontraktilnost regulisana je pomoću više fizioloških medijatora. Oslobođanje acetilholina iz ekscitacijskih holinergičnih neurona i aktiviranje muskarinskih receptora u crevnim ćelijama glatkih mišića igraju važnu ulogu u stimulaciji mišićnih kontrakcija (Hu i sar, 2010; Hu i sar, 2012). Naši rezultati pokazali su da su preparati aronije izazvali koncentracijski zavisnu inhibiciju kontrakcije indukovane acetilholinom. Međutim, potpuna relaksacija nije postignuta. Primećeni su bolji spazmolitički efekti ekstrakta ploda aronije, u poređenju sa druga dva ispitivana preparata, i to u koncentraciji od 1,5 mg/ml. U prisustvu acetilholina, indukovane kontrakcije inhibirane su dodatkom cijanidin-3-*O*-galaktozida.

Visoka koncentracija K^{+} jona uzrokuje kontrakcije glatkih mišića otvaranjem voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala, omogućavajući kretanje vanćelijskog kalcijuma ka unutrašnjosti

što rezultuje depolarizacijom i toničkom kontrakcijom. Voltažno-zavisni kalcijumovi kanali regulišu peristaltičke pokrete creva (Karak i Wies, 1983). Rezultati su pokazali da preparati aronije i najzastupljeniji antocijan značajno dozno-zavisno inhibiraju kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane dodatkom rastvora KCl (80 mM).

Ekstrakti i sok aronije inhibiraju kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane CaCl₂ u medijumu oslobođenom od Ca²⁺ jona. Spazmolitički efekti aronije na inhibiciju Ca²⁺ indukovane kontrakcije ukazuju na moguće prisustvo aktivnih jedinjenja koja mogu inhibirati kalcijumske kanale (Godfraind i sar, 1986).

Još jedan od mogućih mehanizama kontraktilnosti creva uključuje barijumove jone (Ba²⁺) koji mogu da indukuju kontrakciju glatkih mišića depolarizacijom membrane i otvaranjem voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala (Karak i sar, 1986). Literaturni podaci ukazuju na to da je BaCl₂ neselektivni blokator kalijumovih kanala (Liu i sar, 2001). Blokodom K⁺ kanala dolazi do depolarizacije membrane ćelija glatkih mišića ileuma i indukovanja kontrakcije. Verovatno je da BaCl₂ svoje efekte ostvaruje mobilizacijom intracelularnog Ca²⁺ i povećanjem koncentracije kalcijumovih jona. Ispitivani preparati aronije indukovali su statistički značajnu inhibiciju kontrakcija izazvanih BaCl₂.

Histamin je induktor kontraktilnosti glatkih mišića GIT-a, putem depolarizacije membrane, što dovodi do povećane ekscitabilnosti (Hemming i sar, 2000; Matsumoto i sar, 2004). Ekstrakti i sok aronije koncentracijski zavisno su inhibirali kontrakcije indukovane histaminom.

L-NAME se koristi kako bi inhibirao sintezu azot oksida. U ileumu pacova, prethodno dodavanje L-NAME nije uticalo na relaksantni efekat preparata aronije. Rezultati sugerišu da NO nije uključen u relaksantne mehanizme ekstrakata i soka. Stoga se može zaključiti da je relaksantna aktivnost ovih preparata uglavnom posledica njihovog uticaja na kalcijumove kanale i influks Ca²⁺ jona. Treba napomenuti da su sva tri ispitivana preparata pokazala odlične spazmolitičke efekte. Ekstrakti su ispoljili nešto bolje efekte od soka.

Literaturni podaci ukazuju na moguću gastroprotektivnu aktivnost bobičastog voća. Istraživanje koje su sprovedeli Matsumoto i saradnici (2004) pokazalo je da metanolni ekstrakt crne čokolade ima zaštitni efekat u suzbijanju oštećenja želudačne sluzokože izazvanih primenom etanola (Matsumoto i sar, 2004). Metanolni ekstrakt *Rubus fruticosus* inhibirao je spontane i KCl-indukovane kontrakcije u izolovanom jejunumu kunića (Ali i sar, 2013).

Spazmolitička aktivnost soka ploda *Ribes nigrum* demonstrirana je u istraživanju Miladinović i saradnika (2018), gde je dokazano značajno smanjenje crevne kontraktilnosti i inhibicija kontrakcija glatkih mišića putem različitih mehanizama (Miladinović i sar, 2018). Naše istraživanje pokazalo je da dominantni antocijan ploda aronije, cijanidin-3-*O*-galaktozid, inhibira spontane, acetilholinom i kalijum-hloridom izazivane kontrakcije u izolovanom ileumu pacova. Spazmolitički efekti ispitivanih ekstrakata i soka mogli bi biti posredovani aktivnošću dominantnog jedinjenja. Spazmolitički efekat aronije verovatno je posledica sinergističke aktivnosti cijanidin-3-*O*-galaktozida i drugih prisutnih aktivnih jedinjenja. Rezultati ukazuju na mogućnost primene ploda aronije i preparata u kontroli pokretljivosti creva, ali se ovi podaci moraju potvrditi kliničkim studijama.

5.5. VAZORELAKSANTNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE NA IZOLOVANOJ AORTI PACOVA

Povišeni krvni pritisak predstavlja veoma značajan faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti i moždanog udara. Procenjeno je da bi smanjenje sistolnog krvnog pritiska za 3 mmHg kod ljudi smanjilo smrtnost od moždanog udara (za 8%) i koronarnih bolesti srca (za oko 5%) (Stamler, 1991). Kod odraslih starosne dobi između 40 i 89 godina utvrđena je direktna veza između krvnog pritiska i rizika od smrtnosti usled kardiovaskularnih oboljenja i moždanog udara (Lewington i sar, 2002). Zbog toga bi održavanje niskog krvnog pritiska tokom života trebalo da bude prioritet, a samim tim je i identifikacija i karakterizacija supstanci i preparata koji mogu uticati na sniženje krvnog pritiska od ogromnog značaja. Pored toga, upotreba nutritivnih smernica u ranoj fazi hipertenzije može odložiti početak antihipertenzivne terapije (Appel, 2009). Iz tih razloga istraživanje efekata lekovitih prirodnih proizvoda koji se mogu upotrebljavati u ishrani na zdravom vaskularnom tkivu, od velikog je interesa (Sacks i Kass, 1988).

Postoje studije koje su proučavale efekte plodova različitog voća ili voćnih sokova na sniženje krvnog pritiska. Pokazano je da plodovi bobičastog voća poput crne ribizle i brusnice mogu uticati na smanjenje krvnog pritiska (Iwasaki-Kurashige i sar, 2006; Maher i sar, 2000; Miladinović, 2015). Crne ribizle takođe ispoljavaju snažna vazorelaksantna svojstva (Iwasaki-Kurashige i sar, 2006).

Naši rezultati pokazuju da ekstrakti i sok aronije imaju visok antioksidativni kapacitet i bogati su polifenolnim jedinjenjima, što upućuje na to da bi mogli biti korisni u lečenju poremećaja koji u osnovi ima oksidativni stres. Kada je u pitanju vaskularna funkcija, postoje dokazi da se oksidativni stres može uticati na razvoj hipertenzije i inhibicija nastanka reaktivnih vrsta kiseonika može da uzrokuje sniženje krvnog pritiska (Gonenc i sar, 2012; Wu i sar, 2012).

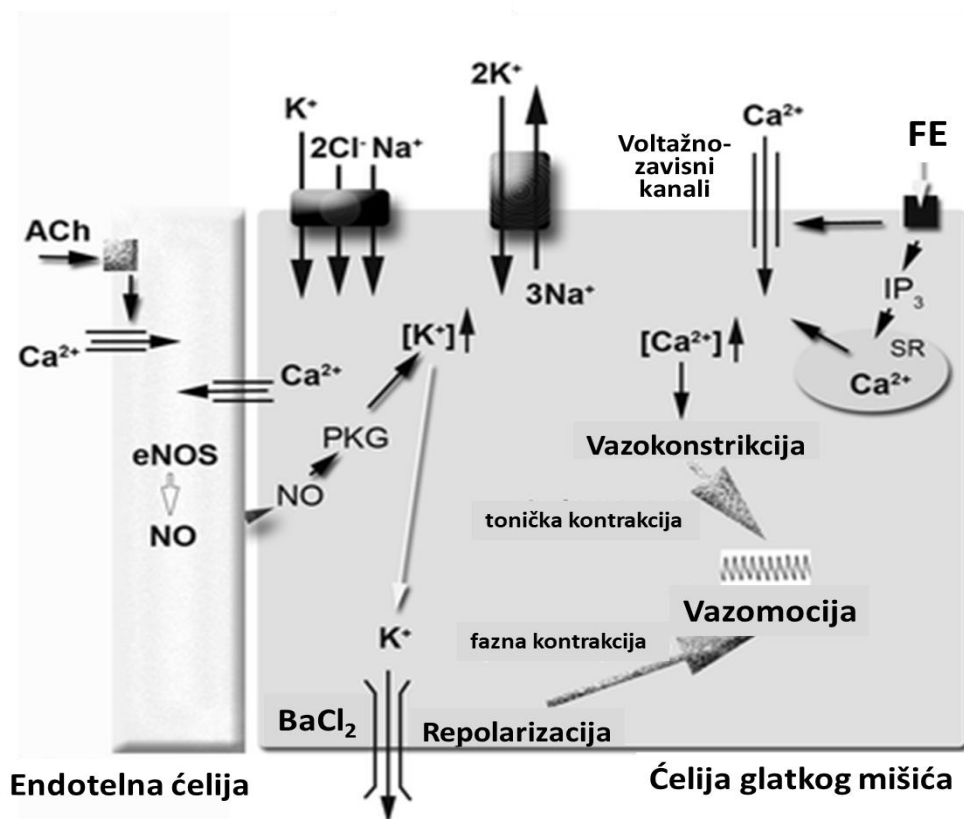
Epidemiološki podaci sugerišu da je konzumiranje proizvoda koji sadrže antocijane povezan sa nižim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, uključujući infarkt miokarda (Szmitko i Verma 2005; Lippi i drugi 2010; Cassidi i drugi 2013). Proizvodi od aronije (ekstrakti i sokovi) dovode do inhibicije oksidativnog stresa i upalnih procesa u krvnim sudovima, koji doprinose razvoju poremećaja kardiovaskularnog sistema. Posebno je naglašeno da je zaštitna uloga aronije na kardiovaskularni sistem rezultat njenih antioksidativnih i antiinflamatornih svojstava (Naruszevicz i drugi 2003, 2007; Kovalczik i drugi 2005; Bell and Gochenaur 2006; Broncel i drugi 2007, 2010; Olas i drugi 2008a; Zapolska-Dovnar i drugi 2008; 2012; Kedzierska i drugi 2011; Duchnovicz and drugi 2012; Bijak i drugi 2013a).

Što se tiče mehanizma delovanja u vaskularnom tkivu, većinom se vazorelaksantni efekti pripisuju povećanom otpuštanju azot(II)oksida (NO) iz endotela (Nakashima i sar, 2011; Edirisinghe i sar, 2011). Međutim, neke studije dokazale su ulogu K^+ kanala u posredovanju vazorelaksantnih efekata polifenola (Byun i sar, 2012; Matsui i sar, 2009; Iwasaki-Kurashige i sar, 2006). S obzirom na veoma važnu ulogu kalijumskih kanala u kontrakciji vaskularnog glatkog mišića (Ko i sar, 2008), pretpostavka je da bilo koji efekat ekstrakata i soka aronije na vaskularnom endotelu može biti posredovan, barem jednim delom, aktiviranjem K^+ kanala. Jonski kanali u membranama ćelija kardiovaskularnog sistema predstavljaju značajna mesta preko kojih polifenolna jedinjenja ostvaruju svoje efekte u vaskularnom tkivu. Studije upućuju na to da se efekti vazorelaksacije polifenola ostvaruju inhibicijom Ca^{2+} kanala i/ili aktiviranjem K^+ kanala u ćelijama krvnih sudova (Protić, 2013).

Pokazano je da se ritmičke kontrakcije glatkih mišića krvnih sudova *in vitro* javljaju ili kao odgovor na agonist ili spontano (Hill i sar, 1999; Haddock i Hill, 2005). Ritmičkim kontrakcijama prethodi stanje hiperpolarizacije ćelijske membrane što je uzrokovano otvaranjem K^+ kanala aktiviranih kalcijumom (Jackson, 1988; Okazaki i sar, 2003). Na primer, ritmičke kontrakcije kao odgovor na fenilefrin (FE) nastaju depolarizacijom ćelijske membrane, a prilikom

Ca^{2+} jona posledica je otvaranja voltažno zavisnih Ca^{2+} kanala (Haddock i Hill, 2005; Oishi i sar, 2002).

Dodatkom FE dolazi do stimulacije alfa-adrenergičkih receptora što dovodi do depolarizacije membrane ćelija glatkih mišića, što rezultira vazokonstrikcijom i povećanjem koncentracije Ca^{2+} unutar ćelije. Istovremeno, azot-oxid endotelna-sintetaza (eNOS) stimulisana intracelularnim Ca^{2+} iz vaskularnih ćelija glatkih mišića oslobađa NO i indukuje povećani izlazak K^+ putem protein kinaze G koja vrši repolarizaciju vaskularnih ćelija glatkih mišića otvaranjem K^+ kanala (Slika 5.5) (Palacios i sar, 2013).



FE – fenilefrin; Ach – acetilholin; eNOS – endotelna azotoksid sintetaza; PKG – protein kinaza G; SR – sarkoplazmatski retikulum; IP3 – inozitol-3-fosfat.

Slika 5.5. Kontrakcija glatkih mišića krvnih sudova (preuzeto i adaptirano od Palacios i saradnika, 2013)

Rezultati su pokazali dobru vazorelaksantnu aktivnost preparata aronije na modelu izolovane aorte pacova. Relaksacija je bila uslovljena otpuštanjem NO, što je pokazano dodatkom L-NAME (blokatorom azot-oxid sintaze) kada je došlo do smanjenja relaksacije aorte usled blokiranja sinteze NO. Relaksacija je bila procentualno veća kod FE-indukovanih

kontrakcija u poređenju sa KCl-indukovanim kontrakcijama, ali je u oba slučaja došlo do relaksiranja glatke muskulature aorte u prisustvu AE, AOE i AS. Može se zaključiti da bi preparati aronije mogli biti efikasni u kontroli krvnog pritiska ili dobro pomoćno sredstvo pri antihipertenzivnoj terapiji, ali je svakako neophodno potvrditi ova dejstva kliničkim ispitivanjima.

5.6. PROTEKTIVNI EFEKTI EKSTRAKATA I SOKA ARONIJE KOD PACOVA SA AKUTNIM OŠTEĆENJEM BUBREGA I JETRE IZAZVANIM CISPLATINOM

Kancer (rak) smatra se jednim od najčešćih uzroka smrti u celom svetu. Sve veća učestalost pojave malignih tumora među populacijom različite starosne dobi uslovljava povećanu upotrebu hemoterapijskih lekova. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) u 2012. godini prijavljeno je oko 14 miliona novoobolelih pacijenata i 8,2 miliona umrlih od posledica ove bolesti, stoga se rana dijagnoza i adekvatno lečenje smatraju jednim od najvažnijih mera za smanjenje smrtnosti (SZO, 2015). Mnoga trenutno dostupna hemoterapijska sredstva koja se koriste u lečenju različitih vrsta malignih tumora ispoljavaju brojne kratkotrajne i/ili dugoročne neželjene efekte, što uslovljava njihovu ograničenu terapijsku upotrebu (Glezerman i Jaimes, 2016).

5.6.1. Nefrotoksičnost cisplatina – protektivni efekti ekstrakata i soka aronije

Bubreg je najosetljiviji organ podložan toksičnim efektima mnogih lekova, upravo zbog njegove uloge u metabolizmu i izlučivanju. Faktori koji povećavaju nefrotoksičnost lekova su brojni. Protok krvi kroz bubrege omogućuje transport lekova do tkiva bubrega gde visoka metabolička aktivnost ćelija povećava rizik od njihove nefrotoksičnosti. Bubrežni tubuli, naročito proksimalni segment tubula, putem endocitoze ili transportnih proteina omogućavaju unos lekova ili toksičnih supstanci, a velika brzina transporta rezultira njihovom visokom unutarćelijskom koncentracijom gde se zatim podvrgavaju ekstenzivnom metabolizmu, što dovodi do stvaranja potencijalno toksičnih metabolita i reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Bubrežna biotransformacija lekova u toksične metabolite i nastanak ROS-a nadvladava lokalne antioksidativne mehanizme. Povećana koncentracija lekova u meduli i intersticijumu dovodi do nefrotoksičnosti. Konačno, apikalni unos određenih lekova (aminoglikozidi) i bazolateralni

transport lekova pomoću organskih anjonskih (tenofovir) i katjonskih transportera (cisplatin) povećavaju toksičnost u bubrezima. Mnogi hemoterapijski lekovi dovode do nefrotoksičnosti, uključujući razvoj tubulo-intersticijskih oštećenja, oštećenja glomerula, disbalans elektrolita, hipertenziju i proteinuriju (Perazella, 2009).

Cisplatin, koordinacioni kompleks platine, predstavlja efikasno hemoterapijsko sredstvo protiv širokog spektra tumora kao što su karcinom testisa, glave i vrata, jajnika, pluća, grlića materice i mokraćne bešike. Toksičnost cisplatina, posebno nefrotoksičnost, jeste faktor koji ograničava njegovu primenu u adekvatnim dozama. Cisplatin indukuje proizvodnju ROS-a i inhibira nekoliko antioksidativnih enzima, što dovodi do pojave oksidativnog stresa i posledičnih oštećenja tkiva. Poznato je da on povećava bubrežnu ekspresiju faktora nekroze tumora alfa (TNF- α), što dovodi do apoptoze tubulskih ćelija. Cisplatin se izlučuje i koncentriše u bubregu ulazeći u ćelije bubrežnih tubula putem organskih katjonskih transportera 2, specifičnih za bubrege (Yao i sar, 2007).

Početna renalna toksičnost manifestuje se smanjenjem bubrežnog protoka krvi, što je praćeno smanjenom glomerularnom filtracijom i ona se javlja u prvim satima nakon primene. Ove promene su verovatno posledica povećanja vaskularne rezistencije nakon tubularno-glomerulskih oštećenja i povećanog transporta jona natrijuma i jona hlora u makula densu. Pokazalo se da smanjenje glomerularne filtracije zavisi od doze cisplatina (Mayer i Madias, 1994). Akutna tubularna toksičnost izaziva disfunkciju mitohondrija, smanjenu aktivnost adenozin trifosfata (ATP), poremećen transport tečnosti i katjonski balans. Kao rezultat toga, smanjuje se reapsorpcija natrijuma i vode i povećava njihovo izlučivanje, što dovodi do poliurije (Yao i sar, 2007; Glezerman i Jaimes, 2016). Cisplatin takođe dovodi do gubitka magnezijuma, zavisno od doze. Tubulo-intersticijska oštećenja su dominantna na patohistološkim preparatima tkiva ljudskih bubrega. Zahvaćeni su i proksimalni i distalni tubuli, a kod pacijenata sa akutnom bubrežnom insuficijencijom (ABI) obično se javlja i akutna tubularna nekroza. Dugotrajna izloženost cisplatinu takođe može izazvati stvaranje cisti i intersticijsku fibrozu (Yao i sar, 2007; Glezerman i Jaimes, 2016).

Kod pacijenata sa znacima toksičnosti izazvane cisplatinom obično je prisutna progresivna azotemija i minimalna proteinurija. Iako se funkcija bubrega poboljšava kod većine bolesnika nakon prestanka terapije, kod jedne grupe pacijenata razvija se trajno oštećenje bubrega. Hipomagnezijemija je čest simptom toksičnosti kod 42% do 100% pacijenata, u

zavisnosti od ukupne doze cisplatina i dužine trajanja terapije. Hipomagnezijemija i gubitak magnezijuma putem bubrega mogu da se javljaju i do 6 godina nakon primarne doze (Layer i Daugaard, 1999; Glezerman i Jaimes, 2016). Sindrom trošenja bubrežnih soli zabeležen je kod 10% pacijenata, manifestujući se kao hiponatrijemija i jaka ortostatska hipotenzija u uslovima visoke koncentracije natrijuma u urinu. Ovaj sindrom može biti prisutan 2 do 4 meseca nakon početka terapije cisplatinom (Hutchison i sar, 1998). Zabeleženi su i retki slučajevi trombotske mikroangiopatije kod pacijenata koji su primali bleomicin u kombinaciji sa cisplatinom (Mayer i Madias, 1994). Snažna hidratacija može ublažiti toksičnost cisplatina i smanjiti učestalost pojave ABI kod pacijenata. Manitol i diuretici Henelove petlje korišćeni su za ublažavanje toksičnosti, međutim, randomizirane kontrolisane studije nisu pokazale značajno smanjenje toksičnosti usled njihove upotrebe (Launay-Vacher i sar, 2008).

Brojna jedinjenja proučavana su kao potencijalni agensi koji bi sprečili ili ublažili nefrotoksičnost cisplatina, ali je samo amifostin odobren od strane Američke administracije za hranu i lekove (FDA), za zaštitu od kumulativne nefrotoksičnosti tokom terapije ovim citostatikom. Amifostin dovodi do smanjenog vezivanja ROS-a za tiolne grupe čime se one inaktiviraju. Međutim, neželjena dejstva, povećani troškovi i mogućnost smanjenja antitumorskih efekata cisplatina ograničili su njegovu upotrebu u kliničkoj praksi (Yao i sar, 2007). Nedavno istraživanje na miševima pokazalo je da dodatak magnezijuma tokom terapije cisplatinom može umanjiti oštećenje bubrega (Solanki i sar, 2014).

Biljni preparati (najčešće ekstrakti) i njihovi aktivni metaboliti (jedinjenja) poslednjih godina se sve više ispituju kao potencijana sredstva za smanjenje cisplatinom indukovane nefrotoksičnosti. Veliki je broj istraživanja potvrdio *in vivo* efekte ekstrakata određenih biljnih vrsta na životinjskim modelima, kao i protektivno dejstvo jedinjenja koja se mogu naći u ovim preparatima. Ekstrakti, kao i njihovi aktivni metaboliti, karakterisali su se, pre svega, dobrim antioksidativnim svojstvima. Mehanizam kojim biljne supstance smanjuju nefrotoksičnost cisplatina samo je delimično istražen (Heidari-Soreshjani i sar, 2017).

Ćelije bubrežnih tubula su posebno podložne dejstvu toksina. Bubrežna oštećenja uglavnom nastaju zbog prevelikog izlaganja ovih ćelija toksičnim supstancama iz cirkulacije i njihovog transfera u ćelije, što dovodi do povećane koncentracije unutarćelijskih toksina. Hemijska jedinjenja ili njihovi metaboliti izazivaju toksičnost tako što grade kovalentne ili nekovalentne veze u makromolekulama, kao i putem sposobnosti generisanja slobodnih radikala

(Schnellman i Kelly, 1999). Nekoliko je mehanizama verovatno odgovorno za nastalu nefrotoksičnost, uključujući direktno oštećenje DNK i indukciju oksidativnog stresa usled nakupljanja lekova (toksina) u bubrežnim ćelijama što može direktno ili indirektno izazvati porast ROS-a, disfunkciju mitohondrija, nekrozu i apoptozu renalnih ćelija, kao i nastanak upalnih procesa (Heidari-Soreshjani i sar, 2017).

U većini sprovedenih studija, cisplatin, kao jedan od najvažnijih citostatskih lekova, izazivao je bubrežna oštećenja. Ovaj lek ulazi u ćelije epitela bubrega i uzrokuje oštećenje DNK i endotelnu disfunkciju. Zatim dolazi do apoptoze i nekroze koje nastaju usled proizvodnje ROS-a i aktiviranja mitohondrijalnih ili nemitohondrijalnih apoptotičkih puteva. Pored toga, apoptoza i ćelijska smrt pokreću jak inflamatorni odgovor koji takođe može izazvati nefrotoksičnost i oštećenje bubrega (Yao i sar, 2007; Miller i sar, 2010).

Tokom toksinima izazvanih promena u bubrežnim ćelijama, zahvaćeni su proteini i lipidi u membranama, nukleusima, lizosomima, mitohondrijama i citozolu. U slučaju oksidativnog stresa dolazi do peroksidacije lipida i oksidacije proteina, što pogoršava oštećenje ćelija. U mnogim slučajevima mitohondrije su važna meta, a nedostatak adenosin trifosfata (ATP) dovodi do ćelijskog oštećenja jer su bubrežne funkcije zavisne od aerobnog metabolizma. Nedostatak ATP-a izaziva i određene poremećaje u genima, što konačno dovodi do ćelijske smrti. Pored toga, oksidativni stres doprinosi ćelijskoj smrti stimulišući proizvodnju cistein-proteaze (Jin i sar, 2015). Razvoj bubrežnih oštećenja, posebno akutnih, koja nastaju usled dejstva hemijskih supstanci mogu izazvati povećanje ureje i kreatinina u serumu i smanjenje bubrežne funkcije. Pored toga, smanjenje perfuzije bubrega, hematurija, proteinurija, pojava cilindara u mokraći i oligurija su neki od simptoma bubrežnog oštećenja koji nastaju usled inflamacije i lize renalnih ćelija (Falagas i Kasiakou, 2006; Kim i Moon, 2012; Finlay i sar, 2013).

Pregledom literature utvrđeni su protektivni efekti biološki aktivnih jedinjenja kod nefrotoksičnosti koja je posledica primene cisplatina. Katehin, epigalokatehin-galat i epigalokatehin, polifenolna jedinjenja, bila su efikasna u zaštiti od nefrotoksičnosti (Hisamura i sar, 2006). Ispitivanje rađeno na miševima koji su tretirani cisplatinom pokazalo je da prethodni tretman polifenolima (epigalokatehin-galat i epigalokatehin) smanjuje toksičnost i neželjene efekte i poboljšava funkciju bubrega kod tretiranih miševa (Ahn i sar, 2014).

Proantocijanidini mogu inhibirati apoptozu i nekrozu ćelija i prevenirati toksičnost antikancerskih lekova (Bagchi i sar, 2002). Studija je pokazala da proantocijanidini semenki

grožđa dovode do smanjenja nefrotoksičnosti izazvane lekovima, posebno hemoterapeuticima. Pokazano je da ova jedinjenja mogu sprečiti oksidativni stres, narušeni genomski integritet i ćelijsku smrt (Bagchi i sar, 2014). Takođe je utvrđeno da proantocijanidini mogu prevenirati cisplatinom izazvane neželjene efekte u bubregu modifikujući ekspresiju proteina povezanih sa apoptozom i antioksidativnim statusom (Hassan i sar, 2015). Proantocijanidini su fenolna jedinjenja čiji su efekti zavisni od doze i koja uzrokuju poboljšanje bubrežne funkcije uglavnom zahvaljujući antioksidativnim osobinama (Sayed, 2009). Naši rezultati ukazuju na visok sadržaj polifenolnih jedinjenja, antocijana i proantocijanidina u ispitivanim ekstraktima i soku aronije.

Istraživanja takođe pokazuju protektivne efekte flavonoida kvercetina na eksperimentalnom modelu cisplatinom indukovane nefrotoksičnosti kod pacova (Almaghrabi, 2014). Kvercetin ublažava nefrotoksičnost smanjenjem oksidativnog stresa, inflamacije i ćelijske apoptoze. Konkretno, kvercetinom je smanjena peroksidacija lipida u bubrezima, aktivacija MAPK i NF κ B signalnih puteva, ekspresija proinflamatornih citokina i aktivacija kaspaze (Coletta i sar, 2004; Behling i sar, 2006). Ekstrakti i sok aronije predstavljaju dobar izvor flavonoidnih jedinjenja, što se može videti iz priloženih rezultata ispitivanja hemijskog sastava.

Kako bi se utvrdili protektivni efekti ispitivanih ekstrakata i soka aronije kod nefrotoksičnosti koja je posledica primene cisplatina, određivani su biohemijski parametri u plazmi pacova svake navedene grupe i srednje vrednosti merenja korišćene su za komparaciju. Vrednosti kreatinina (CRE) i ureje (BUN) u plazmi pacova ukazivale su na akutno bubrežno oštećenje nakon jednokratne doze cisplatina (8 mg/kg). Ekstrakti i sok aronije, koji su oralno aplikovani tokom deset dana, ispoljavaju protektivne efekte kod cisplatinom izazvanog oštećenja bubrega. Porast CRE i BUN kod pacova iz grupa koje su primale preparate aronije bio je značajno manji u odnosu na porast koji se javio kod pacova kojima je aplikovan samo cisplatin intraperitonealno. Poređenjem efekata tri ispitivana preparata (AE, AOE i AS), može se zaključiti da je ekstrakt ostatka nakon ceđenja soka (AOE) ispoljio najbolje protektivno dejstvo, u pogledu porasta koncentracije CRE i BUN. Porast koncentracije CRE bio je značajno manji kod grupe koja je oralno primala AOE, pre i nakon jednokratne doze cisplatina. Protektivne efekte ispoljili su i AE i AS, ali su oni bili nešto slabiji. Koncentracije biohemijskih parametara u plazmi pacova kojima su oralno aplikovani samo preparati aronije (grupe AE, AOE i AS) bile su približno iste kao koncentracije u kontrolnoj grupi, čime je potvrđeno da ekstrakti i sok aronije

nemaju uticaja na ispitivane parametre kod zdravih životinja, a samim tim ni neželjene efekte koji bi doveli do oštećenja bubrega.

Oštećenje bubrega potvrđeno je i histopatološkom analizom tkiva, koja je pokazala izmenjenu morfologiju tkiva bubrega. Na preparatim je uočena izražena vakuolarna i masna degeneracija, a u proksimalnim bubrežnim tubulima mogla se uočiti deskvamacija epitela i oštećenje “brush border”. Takođe je primećen i umereni zapaljenski infiltrat i kongestija intertubularnih kapilara. Glomeruli su imali smanjen dijametar, sa kongestijom kapilara. Takođe je uočljiva fokalna nekroza tubula.

Rezultati histopatoloških analiza prethodnih studija potvrđuju cisplatinom indukovane promene u morfologiji bubrega. Ranija istraživanja ukazuju na degeneraciju i nekrozu bubrežnih tubula usled dejstva cisplatina, što je u skladu sa našim rezultatima (Ekinci Akdemir i sar, 2017). Sahu i saradnici (2013) dokazali su promene u tkivu bubrega pacova uzrokovane jednokratnom dozom cisplatina od 7.5 mg/kg TT, koje su opisali kao izraženu degeneraciju, infiltraciju inflamatornih ćelija, vakuolarizaciju i narušen izgled samih tubula (Sahu i sar, 2013). Naši rezultati pokazali su da ekstrakt aronije ispoljava najizraženije protektivne efekte kod cisplatinom indukovanih morfoloških promena u tkivu bubrega, u poredjenju sa druga dva ispitivana preparata. Promene su bile pretežno lokalizovane u tubulima bubrega, pa se i protektivni efekti koje ostvaruju preparati tu uočavaju.

Predpostavlja se da mehanizmi pomoću kojih cisplatin izaziva oštećenje bubrega uključuju oksidativni stres (Atessahin i sar, 2005; Mora Lde i sar, 2003; Shirwaikar i sar, 2004). Cisplatin je antikancerski lek koji izaziva prevashodno oštećenja epitelijalnih ćelija bubrežnih tubula. Nefrotoksičnost predstavlja glavni ograničavajući faktor kod pacijenata koji primaju cisplatin kao hemoterapijsko sredstvo (Peres i Cunha Junior, 2013; Ozkok i Edelstein, 2014). Mnoga stanja poput hroničnog pijelonefritisa, refluksne nefropatije, glomerulonefritisa i opstruktivne uropatije pospešuju nefrotoksičnost cisplatina. Antikancerogena aktivnost cisplatina uključuje složene mehanizme koji obuhvataju aktivaciju inflamatornih citokina, proizvodnju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta zajedno sa aktivacijom nekoliko signalnih puteva, uključujući p53 protein koji je uključen u aktivaciju apoptoze (Mahgoub i sar, 2017). Prvenstveno, proizvodnja ROS tokom terapije cisplatinom učestvuje u patogenezi nefrotoksičnosti (Park i sar, 2000). Dodatni dokazi potvrđuju da se cisplatin povezuje sa nuklearnom i mitohondrijalnom DNK što dovodi do stvaranja toksičnih produkata, remećenja

transkripcije gena i inhibicije sinteze nefroprotektivnih proteina (Hagar i sar, 2015; Miller i sar, 2010). Akumulacija visokih koncentracija cisplatina u bubregu i naknadna ekskrecija u urinu aktivnim izlučivanjem takođe doprinosi cisplatinskoj nefrotoksičnosti (Anusuya i sar, 2013; Yokoo i sar, 2007). Cisplatin inicira apoptozu i nekrozu ćelija epitelnih tubula u unutrašnjem korteksu, što je primarno mesto njegove akumulacije. Cisplatin posebno oštećuje S3 segment proksimalnih tubula (Kokura i sar, 2016; Peres i Cunha Junior, 2013).

Pokazalo se da mnogi antioksidanti štite od nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom i njihova primena može značajno umanjiti oštećenja bubrega (Naziroglu i sar, 2004; Shimeda i sar, 2005). Studije sugeriše da jednokratna primena cisplatina u dozama od 5-10 mg/kg telesne mase kod pacova izaziva izrazito smanjenje brzine glomerularne filtracije, praćeno povećanjem nivoa kreatinina u serumu, na taj način ukazuje na indukciju akutnog oštećenja bubrega (Mohan i sar, 2006; Mora Lde i sar, 2003).

Protektivni efekti ispitivanih preparata mogu se povezati sa sadržajem aktivnih jedinjenja. AOE je bio najbogatiji polifenolnim jedinjenjima, pre svega antocijanima, pa se efekti mogu pripisati sadržaju ovih jedinjenja sa antioksidantnim svojstvima. Takođe je pri određivanju antioksidativne aktivnosti, u jednom od dva korišćena test sistema – DPPH sistem, AOE ispoljio najbolju aktivnost, pa protektivni efekti mogu biti posledica smanjenja oksidativnih oštećenja u bubrezima. AE i AS takođe su doveli do smanjenja koncentracije markera oštećenja bubrega u plazmi kao što su CRE i BUN, ali sa nešto slabijim protektivnim svojstvima. AE je ispoljio bolje efekte, iako je AS sadržao veću količinu ukupnih polifenolnih jedinjenja. Flavonoidne komponente bile su najzastupljenije u ekstraktu (AE), pa se može pretpostaviti da je bolja aktivnost posledica efekata ovih jedinjenja. Poznato je da su flavonoidna jedinjenja fenolni antioksidanti koji mogu biti efikasni u uklanjanju slobodnih radikala, kao helatorska sredstva ili mogu modifikovati različite enzimske i biološke reakcije (Khanduja i sar, 1999). Istraživanje Hassan i saradnika (2017) je pokazalo da je davanje cisplatina miševima izazvalo značajno povišenje serumskog kreatinina i ureje u krvi (biomarkeri bubrežne funkcije). Aplikacijom flavonoidnih jedinjenja pre injektovanja cisplatina, apigenina i miricetina, došlo je do značajnog smanjenja nivoa kreatinina i ureje u krvi, što ukazuje na poboljšanje bubrežnih funkcija i protektivne efekte flavonoida (Hassan i sar, 2017).

Aktivnost KAT pokazatelj je efikasnog učešća ovog enzima u uklanjanju vodonik-peroksida, što zauzvrat štiti organe od oksidativnog oštećenja (Oral i sar, 2000). Aktivnost ovog

enzima ispitivana je u plazmi pacova, kao i u tkivu bubrega. U oba slučaja, aktivnost katalaze bila je značajno smanjena u grupi pacova koji su tretirani citostatikom, što dokazuje da je antioksidativna zaštita u krvi i tkivu bubrega smanjena. Ovo upućuje na opravdanu upotrebu antioksidativnih supstanci kako bi se ublažili ovi neželjeni efekti. Prethodna istraživanja takođe su dokazala učešće oksidativnog stresa u patogenezi nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom (Pabla i Dong, 2008). Stoga se može pretpostaviti da pojačana antioksidativna zaštita bubrežnog tkiva pomoću egzogenih antioksidativnih agenasa koji imaju protivupalna i citoprotektivna svojstva može biti strategija očuvanja bubrega od oksidativnog oštećenja (Pan i sar, 2009).

Ranije je pokazano da nastali slobodni radikali, kao nus-produkti oksidativnog metabolizma, često prouzrokuju povrede ćelijskih makromolekula poput DNK, lipida i proteina, što dovodi do peroksidacije lipida i modifikacije proteina (Chirino i sar, 2008). Nivoi tiobarbiturna kiselina reaktivnih supstanci (TBARS) smatraju se pokazateljima nastale lipidne peroksidacije. Pored toga, posledica modifikacije proteina biće inaktivacija enzima što će rezultirati padom aktivnosti antioksidativnih enzima kao što je katalaza (Rong i sar, 2012). Drugi pokazatelj ravnoteže između antioksidanata i slobodnih radikala je iscrpljivanje redukovanog glutationa (GSH) i proteinskih tiola upravo zbog njihove reakcije sa reaktivnim kiseoničnim vrstama. Glutation predstavlja esencijalni unutarćelijski reduktivni agens koji pomaže u očuvanju tiolnih grupa na unutarćelijskim proteinima i antioksidativnim molekulama u živim organizmima (Peterson i Cummings, 2005).

U našem istraživanju, nakupljanje ROS-a u bubregu bilo je veće kod pacova koji su bili izloženi cisplatinu nego kod onih koji su bili zaštićeni upotrebom preparata aronije. Cisplatin je značajno povećao nivo TBARS u eritrocitima, a prethodni tretman ekstraktima i sokom aronije uticao je na neznatno smanjenje ovih produkata. Raniji rezultati pokazali su da tretman flavonoidnim jedinjenjima dovodi do inhibicije peroksidacije lipida i oštećenja tkiva sprečavajući stvaranje slobodnih radikala (Lee i Choi, 2008; Vang i sar, 2014; Hassan i sar, 2017; Ilić, 2017). Pored toga, aplikacija cisplatina rezultirala je značajnim smanjenjem, aktivnosti enzimskih antioksidanasa poput katalaze koji predstavljaju prvu liniju odbrane od oksidativnih oštećenja. Predtretman preparatima aronije stvorio je zaštitu od promena izazvanih upotrebom ovog citostatika, što je bilo u skladu sa nekim ranijim istraživanjima (Sahu i Greia, 1996). Druga linija odbrane, GSH, štiti od ćelijskih povreda prouzrokovanih oksidativnim stresom bilo pretvaranjem toksičnih radikala u netoksične krajnje proizvode, bilo uklanjanjem

slobodnih radikala. Otkriveno je da cisplatin izaziva iscrpljivanje i GSH i proteinskih tiola (Rodrigues i sar, 2011). Naši rezultati potvrdili su da je cisplatin značajno smanjio nivo GSH u tkivu bubrega u poređenju sa normalnom kontrolnom grupom. Štaviše, prethodni tretman preparatima aronije uticao je na neznatno povećanje nivoa GSH u bubregu, ali samo u slučaju primene AOE. AOE je takođe ispoljio najizraženije efekte u pogledu zaštite od lipidne peroksidacije, u poređenju sa druga dva preparata. Ovi efekti mogli bi se objasniti najvećom koncentracijom aktivnih jedinjenja u ekstraktu koji je dobijen od ostatka ploda nakon ceđenja soka.

Citokini imaju važnu ulogu u normalnoj fiziologiji ćelija. Povezani su sa imunološkim odgovorom, upalom i povredama ili popravkom tkiva. Cisplatin dovodi do aktivacije inflamatornih ćelija i do povećanja inflamatornog odgovora otpuštanjem različitih citokina kao što su TNF- α ili IL-6, što dovodi do oštećenja bubrega (Ramesh i Reeves, 2004). Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je predhodni tretman preparatima aronije značajno smanjio nivo TNF- α , IL-6 i IL-1 β u tkivu bubrega pacova. Najbolje efekte ispoljio je AOE, dok je sam ekstrakt aronije (AE) u ovom slučaju bio najmanje efikasan. Stoga se može sugerisati da ekstrakti i sok aronije mogu ublažiti oštećenje bubrega uzrokovano cisplatinom suzbijanjem inflamatornog odgovora.

Zbog svega navedenog, primena antioksidanasa može biti nov i mogući pristup u lečenju nefrotoksičnosti izazvane lekovima (Mukhopadhyay i sar, 2012). Naime, lekovi koji se koriste u terapiji raznih vrsta karcinoma imaju ozbiljne neželjene efekte, a nastanak oksidativnog stresa, inflamatorni procesi i apoptoza ćelija značajno doprinose tim efektima. Uloga antioksidanasa i antiinflamatornih supstanci prisutnih u biljnim lekovitim preparatima kod cisplatinom indukovane nefrotoksičnosti potvrđena je mnogim studijama (Heidari-Soreshjani i sar, 2017). Preporuka je svakako ove preparate primenjivati uz kontinuirani lekarski nadzor, obzirom da postoje neke kontroverze oko upotrebe antioksidanasa u kombinaciji sa antikancerogenim lekovima, jer je pokazano da njihova prekomerna upotreba može uticati na efikasnost hemoterapije i lečenja (Lawenda i sar, 2008).

5.6.2. Hepatotoksičnost cisplatina – protektivni efekti ekstrakata i soka aronije

Toksična oštećenja jetre mogu obuhvatiti gotovo svaki poznati vid oštećenja, uključujući nekrozu, steatozu, fibrozu, holestazu i vaskularna oštećenja. Oštećenje jetre tokom hemoterapije ne mora uvek odražavati hepatotoksičnost antikancerskih lekova; mora se razmotriti uticaj ostalih lekova koje pacijent koristi, poput antibiotika, analgetika, antiemetika i drugih. Takođe su od velikog značaja pored upotrebe hemoterapijskih lekova, imunosupresija, infekcije, nutritivni nedostaci ili potpuna parenteralna ishrana, koje dodatno mogu oštetiti funkciju ili pacijenta učiniti podložnim za oštećenje jetre. Zbog toga je veoma teško oštećenje jetre sa sigurnošću pripisati toksičnosti cisplatina ili drugih hemoterapijskih lekova (King i Pery, 2001).

Tokom agresivnih terapijskih protokola, veće doze cisplatina koje su neophodne za efikasnu supresiju tumora mogu dovesti do hepatotoksičnosti, što se takođe često dešava tokom ponavljane terapije sa manjim dozama. Hepatotoksičnost je manje poznat i istraživan neželjeni efekat cisplatina i malo je informacija o osnovnom mehanizmu. Neke nedavne studije sugerišu da oksidativni stres takođe ima važnu ulogu u hepatotoksičnosti izazvanoj cisplatinom (Nakshbandi i sar, 2012). Karakterizacija ćelijskih i molekularnih mehanizama koji su uključeni u cisplatinom indukovanu hepatotoksičnost, posebno uloga mitohondrija, primarni su cilj ispitivanja. Oštećenje mitohondrija u kombinaciji sa oksidativnim oštećenjima ima značajnu ulogu u ćelijskoj smrti koja je uzrokovana ovim citostatikom (Birsen i sar, 2006; Rodrigues i sar, 2011). Pokazano je da postoji povezanost između disfunkcije mitohondrija i toksičnosti antikancerskih lekova (Burgeiro i sar, 2011). Interakcije između hemoterapeutika i transporta elektrona u mitohondrijama takođe su potvrđene ranijim istraživanjima (Rohlen i sar, 2011).

Studije hepatotoksičnosti cisplatina sugerišu da je pojačano stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), sa posledičnim narušavanjem funkcije i strukture mitohondrija, takođe mogući mehanizam. Istraživanje koje su sproveli Waseem i saradnici (2015) ispitala je mogući toksični efekat cisplatina na nastali oksidativni stres u mitohondrijama i put transporta elektrona na izolovanim mitohondrijama jetre pacova. Rezultati su pokazali da postoji porast metaboličkog stresa u izolovanim mitohondrijama hepatocita. Takođe je pokazano da pojačan oksidativni stres u mitohondrijama uzrokuje izmenjene aktivnosti respiratornih enzima u jetri usled toksičnih efekata cisplatina (Waseem i sar, 2015).

U našem istraživanju je hepatotoksičnost izazvana cisplatinom prepoznata je izmenama u nivoima biohemijskih i histoloških parametara. Biohemijske promene uključuju povećanje nivoa jetrinih enzima, uključujući AST i ALT, porast nivoa TBARS, smanjenje aktivnosti KAT, kao i smanjenje koncentracije GSH. Takođe je dokazana nastala inflamacija u tkivu jetre, porastom nivoa proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1 β). Histološke promene obuhvatale su izmenjenu morfologiju tkiva jetre sa nekrozom hepatocita. Primećen je povećan broj Kupferovih ćelija, izražena dezorganizacija trabekula, kongestija centralne venule, perivenularna sinusoidna dilatacija sa kongestijom sinusoida, kao i vakuolarna degeneracija hepatocita. Mestimično je uočljiva fibroza portnih prostora. Rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima koja su ukazivala na nekrozu i vakuolarnu degeneraciju hepatocita, s tim što na našim preparatima nije bila uočljiva masna degeneracija (Karale i Kamath, 2017). Istraživanjima je potvrđeno da se usled primene cisplatina povećava broj Kupferovih ćelija (Bilgic i sar, 2018), što je potvrđeno i našim rezultatima.

Postojanje lipidne peroksidacije u jetri indukuje poremećaj funkcije i integriteta membrane ćelija (Etsuo, 2009). Štaviše, smanjena aktivnost enzimskih i neenzimskih antioksidanata dovela je do nastanka oksidativnog stresa i povećane akumulacije ROS-a u tkivima. Ranije studija pokazuju da je oksidativni stres umešan u patogenezu hepatotoksičnosti izazvane cisplatinom (Liao i sar, 2008).

Kako bi se ispitali protektivni efekti ispitivanih ekstrakata i soka aronije kod hepatotoksičnosti koja je posledica primene cisplatina, određivani su biohemijski parametri u plazmi pacova svake navedene grupe koji ukazuju na prisutno oštećenje jetre. Kao pokazatelji ovog oštećenja korišćene su aktivnosti enzima jetre u plazmi pacova, AST i ALT. Oštećenje jetre potvrđeno je i histopatološkom analizom tkiva. Iz priloženih rezultata može se zaključiti da ekstrakti i sok aronije, koji su oralno aplikovani tokom deset dana, ispoljavaju protektivne efekte kod cisplatinom izazvanog oštećenja jetre. Porast AST i ALT kod pacova iz grupa koje su primale preparate aronije bio je značajno manji u odnosu na porast koji se javio kod pacova kojima je aplikovan samo cisplatin intraperitonealno. Poređenjem efekata tri ispitivana preparata (AE, AOE i AS), može se zaključiti da je ekstrakt aronije (AE) ispoljio najbolje protektivno dejstvo, ako posmatramo jetrine enzime u plazmi. Porast aktivnosti AST i ALT bio je značajno manji kod grupe koja je oralno primala AE, pre i nakon jednokratne doze cisplatina. Protektivne efekte ispoljili su i AOE i AS, ali su oni bili nešto slabiji. Aktivnost AST i ALT u plazmi pacova

kojima su oralno aplikovani samo preparati aronije (grupe AE, AOE i AS) bile su približno iste kao aktivnost u kontrolnoj grupi, čime je potvrđeno da ekstrakti i sok aronije nemaju uticaja na ispitivane parametre kod zdravih životinja, a samim tim ni neželjene efekte koji bi doveli do oštećenja jetre.

Pokazano je da preparati aronije poboljšavaju antioksidativna svojstva plazme i smanjuju peroksidaciju lipida u eritrocitima i koncentraciju inflamatornih markera u plazmi. Kao i u tkivu bubrega, rezultati su pokazali protektivne efekte ovih preparata i u jetri. Do najvećeg smanjenja lipidne peroksidacije došlo u slučaju primene AOE. Aktivnost KAT u jetri gotovo je vraćena na fiziološki nivo primenom ekstrakata aronije u kombinaciji sa cisplatinom, što se povezuje sa veoma izraženim antioksidativnim efektima ovih preparata. Sok je imao slabiju aktivnost, iako je po sastavu aktivnih jedinjenja veoma sličan ekstraktima, ali je verovatno da je u toku metabolizma došlo do pojačane modifikacije i inaktivacije polifenola iz soka. Nivoi GSH u jetri bili su sniženi nakon primene cisplatina, a preparati aronije nisu ispoljili značajne efekte na porast koncentracije ovog neenzimskog antioksidanta u tkivu jetre, kao u slučaju aktivnosti katalaze. Dokazano je da molekul cisplatina reaguje sa GSH molekulom čime se smanjuje njegova aktivnost i koncentracija u tkivima (Lippert, 1999).

Smatra se da inicijalno oštećenje jetre usled dejstva cisplatina može biti posledica prekomerene produkcije ROS-a i nemogućnosti njihovog uklanjanja usled poremećenih sistema antioksidativne zaštite (smanjenja aktivnost katalaze ili koncentracija GSH). Progresija oštećenja jetre uzrokovana je nastalom inflamacijom usled aktivacije Kupferovih ćelija iz kojih se oslobađaju citotoksični medijatori kao što su citokini, hemokini ili ROS. Nakon oslobađanja hemokina dolazi do aktivacije neutrofila i njihove migracije iz vaskularnog u parasinusoidni prostor što dovodi do narušavanja struktura jetrinog parenhima. Promene usled nekroze praćene su oslobađanjem proteaza i ROS-a. Hemokini koji indukuju ovo oštećenje osim iz Kupferovih ćelija mogu biti oslobođeni i iz hepatocita (Jaeschke i sar, 2002).

Utvrđeno je da visoke doze cisplatina mogu dovesti do prekomernog stvaranja ROS-a, što doprinosi razvoju oksidativnog stresa i njegovih komplikacija poput inflamacije, koja se karakteriše prekomernom proizvodnjom citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) i aktiviranjem kaskade upalnih signalnih puteva (Dkhil i sar, 2013; Ingawale i sar, 2014). Povišeni nivoi slobodnih radikala i proinflamatornih citokina sa istovremenim padom egzogenih i endogenih antioksidanata mogu prouzrokovati oštećenje ćelijskih organela u jetri. Dokazano je da je uzrok

apoptoze hepatocita povećanje ROS-a i nivoa proinflamatornih citokina u jetri (Hoek i sar, 2002). Faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) oslobađa se iz aktiviranih makrofaga. Povećana proizvodnja ROS-a može uticati na povećanu ekspresiju NF- κ B i proinflamatornih citokina kao što su TNF- α i IL-6, koji bi mogli povećati citotoksične efekte cisplatina u tkivu jetre (Shaw i sar, 2013). Prethodno istraživanje pokazalo je TNF- α inhibitor štiti jetru od hepatotoksičnosti izazvane cisplatinom, na šta je ukazivalo sniženje povišenog nivoa AST, ALT i TNF- α (Shaw i sar, 2011).

Naši rezultati ukazuju na neznatno sniženje koncentracije citokina u tkivu jetre, u uslovima primene preparata aronije. Najbolji efekti postignuti su u smanjenju koncentracije IL-1 β , sa ponovnim osvrtom na protektivnu aktivnost AOE. Kod koncentracije TNF- α i IL-6, efekti su bili manje izraženi, mada je primećen smanjen porast nivoa ovih citokina u jetri u slučaju primene ekstrakata i soka aronije. Neznatno bolje protektivne efekte poređenjem sva tri ispitivana preparata je u ovom slučaju imao je AE.

Pokazano je da polifenolna jedinjenja aronije mogu uspešno prevenirati toksičnost izazvanu teškim metalima, što se objašnjava velikim brojem hidroksilnih grupa u njihovoj strukturi koje omogućavaju heliranje jona metala čime se smanjuje njihova apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta i ubrzava izlučivanje (Borowska i sar, 2018). Može se pretpostaviti da ova jedinjenja mogu reagovati i sa molekulom cisplatina i time umanjiti njegovu akumulaciju u tkivima. Iako je poželjno smanjenje toksičnosti cisplatina, ovi efekti bi se mogli odraziti na njegovu terapijsku efikasnost. Nakon primene, lek cirkuliše u krvi, pre svega vezan za hloridne jone. U krvi se mogu odvijati i reakcije sa proteinima plazme ili nekim drugim zaštitnim molekulima. Posle prolaska kroz ćelijski zid (bilo aktivno ili pasivno), odvijaju se intracelularne reakcije sa peptidima i proteinima, nakon čega sledi transfer do nukleinskih kiselina (Lippert, 1999).

Preparati aronije ne mogu u potpunosti prevenirati oštećenja bubrega i jetre usled nefrotoksičnosti i hepatotoksičnosti izazvane primenom cisplatina, ali ih svakako mogu ublažiti. Protektivni efekti koje ispoljavaju ekstrakti i sok aronije najverovatnije su posledica jako izraženog antioksidativnog delovanja ovih preparata, čime se umanjuje produkcija i akumulacija ROS u tkivima i plazmi, a samim tim i oštećenja koja oni mogu prouzrokovati poput peroksidacije lipida, oštećenja proteina i inaktivacije unutarćelijskih mehanizama zaštite. Takođe, preparati aronije ispoljavaju antiinflamatorna svojstva, što je pokazano kod smanjenja

produkcije proinflammatoryh citokina u plazmi i tkivima, čime se takođe mogu objasniti njihovi protektivni efekti kod oštećenja izazvanih cisplatinom.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja hemijskog sastava i farmakoloških aktivnosti ekstrakata i soka ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott može se zaključiti sledeće:

➤ U ekstraktu ploda (AE), ekstraktu ostatka ploda nakon ceđenja soka (AOE) i soku aronije (AS) kvantifikovana je značajna količina ukupnih fenola. Najveća količina ovih jedinjenja kvantifikovana je u ekstraktu ostatka ploda nakon ceđenja soka (AOE).

➤ Antocijani su najzastupljenija fenolna jedinjenja u ekstraktima i soku aronije. Najbogatiji antocijanima bio je AOE.

➤ U ispitivanim preparatima kvantifikovana je značajna količina ukupnih flavonoida. Najveća količina flavonoidnih jedinjenja određena je u ekstraktu ploda (AE).

➤ Sadržaj ukupnih proantocijanidina bio je najveći u ekstraktu ostatka ploda nakon ceđenja soka (AOE).

➤ Metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) utvrđeno da je u ispitivanim preparatima aronije među cijanidin-glikozidima najzastupljeniji cijanidin-3-*O*-galaktozid u svim preparatima, a najveći sadržaj istog određen je u AOE.

➤ Metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) utvrđeno da je najzastupljeniji među flavonoidima u preparatima aronije bio je hiperozid, koji je u najvećoj količini detektovan u ekstraktu (AE).

➤ Metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) utvrđeno da je hlorogenska kiselina bila najzastupljenija u ekstraktu ostatka ploda (AOE).

➤ Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti pokazuju da sva tri preparata ploda aronije ispoljavaju izraženu antioksidativnu aktivnost u dva ispitivana test sistema (DPPH i BKL).

➤ Najizraženiju antioksidativnu aktivnost u 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) sistemu ispoljio AOE. Sok aronije (AS) ispoljio je nešto slabiju aktivnost u DPPH sistemu, dok je AE imao znatno slabiju aktivnost u poređenju sa AOE ($p < 0,001$).

➤ Rezultati pokazuju jaku korelaciju DPPH antiradikalske aktivnosti preparata i sadržaja ukupnih fenola ($r = -0,874$, $p < 0,01$) i proantocijanidina ($r = -0,819$, $p < 0,01$), dok povezanost ukupnih antocijana i DPPH antioksidativne aktivnosti nije bila statistički značajna. Flavonoidi su sa antiradikalnom aktivnošću korelirali jako pozitivno ($r = 0,904$, $p < 0,01$), što bi značilo da oni ne doprinose ovoj aktivnosti. Najznačajni doprinos antiradikalnoj DPPH aktivnosti dao je najzastupljeniji antocijan, cijanidin-3-*O*-galaktozid ($r = -0,650$, $p < 0,05$).

➤ U β -karoten/linolna kiselina (BKL) testu preparat za najslabijom antioksidativnom aktivnošću bio je AOE. AE ispoljio je nešto bolju aktivnost, dok se AS pokazao kao najpotentniji antioksidant.

➤ Korelacija sadržaja ukupnih fenola i proantocijanidina i antioksidativne aktivnosti u BKL sistemu nije statistički značajna, dok je u slučaju ukupnih antocijana ona bila jaka pozitivna ($r=0,845$, $p<0,01$), pa se može zaključiti da antocijani ovoj aktivnosti ne doprinose. Rezultati ispitivanja pokazali su i značajnu korelaciju između antioksidativne aktivnosti u BKL sistemu i antocijana i hlorogenske kiseline, ali je ona bila pozitivnog smera, što bi značilo da ova jedinjenja ne utiču na antioksidativnu aktivnost u BKL sistemu. Korelaciona analiza BKL antioksidativne aktivnosti i flavonoida daje koeficijente korelacije negativnog smera, ali njihova povezanost nije bila statistički značajna.

➤ Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti su pokazali da je baktericidna aktivnost ekstrakata i soka aronije potpuno izostala. Ispitivani preparati ispoljili su inhibitornu aktivnost na rast korišćenih mikrobioloških sojeva. Gram (+) bakterije bile su nešto osjetljivije na delovanje ekstrakata i soka aronije u odnosu na Gram (-) bakterije i *Candida albicans*.

➤ Najbolji antibakterijski efekat preparati su ispoljili prema Gram (+) bakteriji *Enterococcus faecalis*. Među Gram (-) bakterijama, najosetljivija na dejstvo ekstrakata i soka aronije bila je *Enterobacter aerogenes*.

➤ Efekti prema gljivi *Candida albicans* bili su umereni. Rezultati pokazuju da je fungicidna aktivnost potpuno izostala.

➤ Ispitivani preparati aronije i cijanidin-3-*O*-galaktozid dozno-zavisno su inhibirali spontane, acetilholiom i kalijum-hloridom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Ekstrakti su bili efikasniji inhibitori u poređenju sa sokom aronije, a cijanidin-3-*O*-galaktozid takođe ispoljio značajne inhibitorne efekte, zavisne od koncentracije.

➤ Statistička analiza pokazala je značajnu razliku između EC_{50} vrednosti ekstrakata, soka, glavnog antocijana i papaverina kod spontanih, odnosno verapamila kod KCl-indukovanih kontrakcija ($p<0,01$).

➤ Kontrakcije indukovane kalcijum-hloridom, barijum-hloridom i histaminom bile su inhibirane u prisustvu preparata aronije, dozno – zavisno.

➤ Spazmolitički efekti ispitivanih preparata na ileumu pacova nisu bili posredovani azot-monoksidom. Kontrakcije ileuma pacova smanjivale su se dodatkom ispitivanih preparata aronije i u prisustvu blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME).

➤ Ekstrakti i sok aronije ispoljili su značajne vazorelaksantne efekte na izolovanoj aorti pacova, u prisustvu kalijumovih jona (KCl) i fenil-efrina (FE). AE je pokazao najbolju aktivnost kod KCl - indukovanih kontrakcija, dok je najbolju vazorelaksantnu aktivnost kod FE-indukovanih kontrakcija aorte pacova ispoljio je AOE.

➤ Statistička analiza pokazala je značajnu razliku između EC_{50} vrednosti ekstrakata, soka i verapamila kod KCl i FE-indukovanih kontrakcija aorte pacova ($p < 0,01$).

➤ Blokodom sinteze NO relaksantni efekti ispitivanih preparata se smanjuju. Rezultati ukazuju da je relaksantna aktivnost AE, AOE i AS na izolovanoj aorti pacova posredovana oslobađanjem NO. Najbolje efekte ispoljio je AOE.

➤ Primena cisplatina u jednokratnoj dozi od 8 mg/kg TT kod pacova indukovala je oštećenje bubrega i jetre, što dokazuju povećene vrednosti biohemijskih parametara u plazmi (CRE, BUN, AST, ALT) i morfološke promene u tkivu jetre i bubrega potvrđene histopatološkim analizama.

➤ Morfološke promene u tkivu bubrega grupa pacova tretiranih cisplatinom karakterišu se jako izraženom vakuolarnom i masnom degeneracijom, kao i deskvamacijom epitela tubula i oštećenjem četkastog pokrova ("brush border") proksimalnih tubula. Prisutna je kongestija intertubularnih kapilara sa umerenim zapaljenskim infiltratom, fokalna nekroza proksimalnih i distalnih tubula, smanjenje dijametra glomerula i kongestija kapilara glomerula.

➤ Izmenjena morfologija tkiva jetre ukazuje na prisutnu nekrozu hepatocita, povećan broj Kupferovih ćelija, izražena dezorganizacija trabekula i kongestija centralne venule. Prisutna je i perivenularna sinusoidna dilatacija sa kongestijom sinusoida, kao i vakuolarna degeneracija hepatocita, mestimična fibroza portnih prostora i gubitak glikogenskih depoa.

➤ Oksidativni stres i inflamacija učestvuju u patogenezi oštećenja bubrega i jetre usled dejstva cisplatina. Oksidativni stres je potvrđen porastom lipidne peroksidacije u eritrocitima i tkivima, smanjenjem aktivnosti enzima kalaze u plazmi i tkivima, kao i smanjenjem koncentracije redukovano glutaciona u tkivima bubrega i jetre. Porast nivoa proinflamatornih citokina u plazmi i tkivima (TNF- α , IL-6 i IL-1 β) pokazatelj je nastale inflamacije usled primene cisplatina.

➤ Preparati aronije (AE, AOE i AS) ispoljavaju antiinflamatorna svojstva, što je pokazano smanjenjem produkcije proinflamatornih citokina u plazmi i tkivima, čime se takođe mogu objasniti njihovi protektivni protektivni efekti kod oštećenja izazvanih cisplatinom.

➤ Poređenjem tri ispitivana preparata može se zaključiti da su ekstrakti ispoljili bolje protektivne efekte od soka aronije, koji se mogu videti kod smanjenja lipidne peroksidacije, povećanja aktivnosti KAT i koncentracije GSH. Takođe su bili efikasniji u smanjenju produkcije proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-6 i IL-1 β).

➤ Morfološke promene u tkivima jetre i bubrega znatno su redukovane primenom ekstrakata (AE i AOE), dok sok aronije (AS) nije ispoljio značajne protektivne efekte. Poređenjem preprata, AE je u najvećoj meru uticao na poboljšanje morfologije tkiva bubrega i jetre.

➤ Ispitivani preparati aronije (AE, AOE i AS) mogu ublažiti oštećenja bubrega i jetre koja su posledica nefrotoksičnosti i hepatotoksičnosti cisplatina. Protektivni efekti su posledica njihovog antioksidativnog i antiinflamatornog delovanja, čime se umanjuje produkcija i akumulacija ROS-a u tkivima i plazmi, a samim tim i oštećenja koja oni mogu prouzrokovati poput peroksidacije lipida, smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima i neenzimskih antioksidanasa.

➤ Na osnovu hemijske analize i ispitanih farmakoloških efekata zaključuje se da su liofilizovani ekstrakti i sok ploda aronije (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) izvori značajnih farmakološki aktivnih jedinjenja i mogu biti potencijalna terapijska sredstva zahvaljujući antioksidativnim, antimikrobnim, spazmolitičkim, vazorelaksantnim, kao i protektivnim efektima kod cisplatinom indukovanih oštećenja bubrega i jetre. S tim u vezi, neophodno je sprovesti dodatne *in vivo* i kliničke studije kako bi njihova terapijska primena bila u potpunosti opravdana.

7. LITERATURA

- Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58:1688–713.
- Adamska T, Ewertowska M, Ignatowicz E, Kujawska M, Kido'n M, Matuszewska A, i sar. Effects of long-term administration of freeze-dried chokeberry juice to rats. *J Pharm Nutr Sci* 2014; 4:154–61.
- Ahn TG, Kim HK, Park SW, Kim SA, Lee BR, Han SJ. Protective effects of green tea polyphenol against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Obstet Gynecol Sci* 2014; 57(6):464-70.
- Aizpurua-Olaizola O, Navarro P, Vallejo A, Olivares M, Etxebarria N, Usobiaga A. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food chem* 2016; 190:614-21.
- Alasalvar C, Grigor JM, Zhang D, Quantick PC, Shahidi F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J Agric Food Chem* 2001; 49:1410–6.
- Ali N, Aleem U, Ali Shah SW, Shah I, Junaid M, Ahmed G, i sar. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity, anthelmintic and relaxant potentials of fruits of *Rubus fruticosus* Agg, *BMC Complem Altern Med* 2013; 13:138-49.
- Almaghrabi OA. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi J Biol Sci* 2015; 22(2):227-31.
- Alzand KI, Mohamed MA. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and antioxidant activity. *J Pharm Res* 2012; 5(8):4013-20.
- American College of Gastroenterology Functional Gastrointestinal Disorders Task Force, Brandt LJ, Chey WD, Foxx-Orenstein AE, Schiller LR, Schoenfeld PS, Spiegel BM, i sar. An evidence-based position on the management of irritable bowel syndrome in North America. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:S1–S5.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(17):7915–22.
- Amin HP, Czank C, Raheem S, Zhang Q, Botting NP, Cassidy A, i sar. Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59:1095–106.
- Andreeva IL, Kožemjakin AL, Kiškun AA. Modification of the method of measurement of lipid peroxides in test with thiobarbituric acid. (in Russian). *Lab Delo* 1988; 11:41-3.
- Anusuya N, Durgadevi P, Dhinek A, Mythily S. Nephroprotective effect of ethanolic extract of garlic (*Allium Sativum*) on cisplatin induced nephrotoxicity in male Wistar Rats. *Asian J Pharmaceut Clin Res* 2013; 6:97-100.

- Appel LJ. ASH position paper: dietary approaches to lower blood pressure. *J Am Soc Hypertens* 2009; 3(5):321–31.
- Appel K, Meiser P, Millan E, Collado JA, Rose T, Gras CC, i sar. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF- κ B and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Fitoterapia* 2015; 105:73–82.
- Ara V. Schwarzfruchtige Aronia: Gesund – und bald “in aller Munde”. *Flüssiges Obst* 2002; 10: 653–8.
- Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; 23:460–4.
- Aron PM. Composition of Flavonoid Phenolic Polymers Isolated From Red Wine During Maceration and Significance of Flavan-3-Ols in Foods Pertaining to Biological Activity. Doctoral dissertation. Oregon State University; 2007.
- Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005; 212:116–23.
- Atkinson RG. Phenylpropenes: Occurrence, distribution, and biosynthesis in fruit. *J Agric Food Chem* 2016; 66(10):2259–72.
- Ávila M, Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, Pelaez C, Requena T, de Pascual-Teresa S. Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus. *Food Res Int* 2009; 42:1453–61.
- Badescu M, Badulescu O, Badescu L, Ciocoiu M. Sambucus nigra and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus. *Pharm Biol* 2015; 53:533–9.36:57–64.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 957:260–70.
- Bagchi D, Swaroop A, Preuss HG, Bagchi M. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. *Mutat Res* 2014; 768:69–73.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006; 99:191–203.
- Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 1998; 54:1562–9.
- Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 1999; 31:971–97.
- Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev* 2010; 68:168–77.
- Bao L, Zhang Z, Dai X, Ding Y, Jiang Y, Li Y, i sar. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on renal injury in type 2 diabetic rats. *Mol Med Rep* 2015; 11:645–52.

- Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr* 2003; 133(10):3248S–54S.
- Behling EB, Sendao MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Costa RS, Bianchi Mde L. Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacol Rep* 2006; 58(4):526–32.
- Beliz HD, Grosch W, Scheberle P. *Food Chemistry*. 3rd Edition. Berlin Heidelberg: Springer – Verlag; 2004.
- Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *J Food Sci*. 2004; 69(3):FCT164–FCT169.
- Bermúdez-Soto MJ, Larrosa M, Garcia-Cantalejo JM, Espin JC, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT.. Transcriptional changes in human Caco-2 colon cancer cells following exposure to a recurrent non-toxic dose of polyphenol-rich chokeberry juice. *Genes Nutr* 2007a; 2:111–3.
- Bermúdez-Soto MJ, Larrosa M, Garcia-Cantalejo JM, Espin JC, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT. Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *J Nutr Biochem* 2007b;18:259–71.
- Bigovic D, Brankovic S, Kitic D, Radenkovic M, Jankovic T, Savikin K, et al. Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. *Molecules*. 2010; 15:3391-401.
- Bijak M, Bobrowski M, Borowiecka M, Podsedek A, Golanski J, Nowak P. Anticoagulant effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia* 2011; 82:811–7.
- Bijak M, Saluk J, Antosik A, Ponczek MB, Zbikowska HM, Borowiecka M, i sar. *Aronia melanocarpa* as a protector against nitration of fibrinogen. *Intern J Biol Macromol* 2013a; 55:264–8.
- Bijak M, Saluk J, Ponczek MB, Nowak P. Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Phytother Res* 2013b; 27:71–6.
- Bilgic Y, Akbulut S, Aksungur Z, Erdemli ME, Ozhan O, Parlakpinar H, i sar. Protective effect of dexpanthenol against cisplatin-induced hepatotoxicity. *Exp Ther Med* 2018; 16(5):4049-57.
- Birsen O, Mukaddes G, Huseyin O, Ekici F, Atis O, Akbas A. The effect of antioxidant caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on some enzyme activities in cisplatin-induced neurotoxicity in rats. *Eur J Gen Med* 2006; 3:167–72.
- Boland MJ, Rae AN, Vereijken JM, Meuwissen MPM, Fischer ARH, van Boekel MAJS, i sar. The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends Food Sci Technol* 2013; 29:62–73.

- Boncheva M, Georgiev G, Shishov V. Effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in improving medical test results and creating a feeling of health in patients with non-alcoholic fatty liver disease – NAFLD (steatosis). *J Gen Med Bulgaria* 2013; 2:21–30.
- Borowska S, Brzóska MM. Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and their products as a possible means for the prevention and treatment of noncommunicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016; 15:982–1017.
- Borowska S, Brzoska MM, Tomczyk M. Complexation of bioelements and toxic metals by polyphenolic compounds – implications for health. *Curr Drug Targets* 2018; 19(14):1612-38.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Method Enzymol* 1990; 186:343–55.
- Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008; 6(Suppl 5):S344-9.
- Borycka B. Frakcje włókna pokarmowego z wyłokow aroniowych wrelacjach z jonami Pb i Cd oraz Ca i Mg. *ZNTJ* 2012; 6:31–40.
- Borycka B, Stachowiak J. Relations between cadmium and magnesium and aronia fractional dietary fibre. *Food Chem* 2008; 107:44–8.
- Broncel M, Koziróg-Kołacinska M, Andrykowski G, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Owczarczyk A, i sar. Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on blood pressure, concentration of endothelin-1 and lipids in patients with metabolic syndrome. *Pol Merkur Lek* 2007; 23:116–9.
- Broncel M, Koziróg M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, ChojnowskaJeziarska J. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monitor* 2010; 16:CR28–34.
- Braga ARC, Murador DC, de Souza Mesquita LM, de Rosso VV. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *J Food Compos Anal* 2018; 68:31–40.
- Branković S. Fiziologija gastrointestinalnog sisitema. U: Veljković S, Radenković M. urednici. *Medicinska fiziologija*, Niš: Medicinski fakultet u Nišu; 2016.
- Branković S, Miladinović B, Radenković M, Gočmanac Ignjatović M, Kostić M, Šavikin K, Kitić D. Hypotensive, cardiodepressant, and vasorelaxant activities of black currant (*Ribes nigrum* 'Ben Sarek') juice. *Can J Physiol Pharmacol* 2016; 94(10):1102-5.
- Branković S, Gočmanac Ignjatović M, Kostić M, Veljković M, Miladinović B, Milutinović M, i sar. Spasmolytic activity of the aqueous and ethanol celery leaves (*Apium graveolens* L.) extracts on the contraction of isolated rat ileum. *Acta Med Median* 2015; 54:11–6.
- Brankovic S, Kitic D, Radenkovic M, Veljkovic S, Jankovic T, Savikin K, i sar. Spasmolytic activity of the ethanol extract of *Sideritis raeseri* spp. *raeseri* Boiss. & Heldr. on the isolated rat ileum contractions. *J Med Food* 2011; 14:495-8.

- Bräunlich M, Slimestad R, Wangensteen H, Brede C, Malterud K, Barsett H. Extracts, Anthocyanins and Procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients* 2013a; 5:663-78.
- Bräunlich M, Økstad OA, Slimestad R, Wangensteen H, Malterud KE, Barsett H. Effects of *Aronia melanocarpa* constituents on biofilm formation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. *Molecules* 2013b; 18(12):14989-99.
- Brewer MS. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci F* 2011; 10(4):221-47.
- Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* 2016; 21:901.
- Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse AS. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th Edition. New York: McGraw Hill; 2007.
- Bruneton J. Pharmacognosy – Phytochemistry Medicinal Plants. 2nd edition. Pariz: Lavoisier Publishers; 1999.
- Brzoska MM, Rogalska J, Gałażyn-Sidorczuk M, Jurczuk M, Roszczenko A, Tomczyk M. Protective effect of *Aronia melanocarpa* polyphenols against cadmium-induced disorders in bone metabolism. A study in a rat model of lifetime human exposure to this heavy metal. *Chem Biol Interact* 2015b; 229:132–46.
- Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(2):382-98.
- Burgeiro A, Gajate C, Dakir el H, Villa-Pulgarín JA, Oliveira PJ, Mollinedo F. Involvement of mitochondrial and B-RAF/ERK signaling pathways in berberine-induced apoptosis in human melanoma cells. *Anticancer Drugs* 2011; 22(6):507-18.
- Byun EB, Korematsu S, Ishikawa T, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T, i sar. Apple procyanidins induce hyperpolarization of rat aorta endothelial cells via activation of K⁺ channels. *J Nutr Biochem* 2012; 23(3):278–86.
- Caballero B, Finglas PM, Toldrá F. Editori. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press; 2016. pp. 247-255.
- Canadanovic-Brunet J, Tumbas Saponjac V, Stajcic S, Cetkovic G, Canadanovic V, Cebovic T, et al. Polyphenolic composition, antiradical and hepatoprotective activities of bilberry and blackberry pomace extracts. *J Berry Res* 2019; Pre-press: 1-14.
- Cao G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:920–6.
- Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2013; 51:15-25.
- Carocho M, Morales P, Ferreira IC. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends Food Sci Technol* 2018; 71:107–20.

- Cassidy A, Mukamal KJ, Liu L, Franz M, Eliassen AH, Rimm EB. High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation* 2013; 127:188–96.
- Castañeda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández E, Rodríguez J A, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem* 2009; 113(4):859–71.
- Cavalli F, Tschopp L, Sonntag RW, Zimmermann A. A case of liver toxicity following cis-diammine dichloroplatinum (II) treatment. *Cancer Treat Rep* 1978; 62:2125-6.
- Cermak R. Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4(1):17-35.
- Ciociu M, Badescu L, Miron A, Badescu M. The involvement of a polyphenols rich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 912769.
- Cisowska A, Wojnicz D, Hendrich AB. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat Prod Commun* 2011; 6(1):149-56.
- Chang CH, Lin HY, Chang CY, Liu YC. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *J. Food Eng* 2006; 77:478–85.
- Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Eng J Med* 2014; 371(1):58–66.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, i sar. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2017; 9(6):7204-18.
- Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*; 177:68-78.
- Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A, Mallea M, Barbe J, Pages J. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(3):1043-6.
- Chew K, Khoo M, Ng S, Thoo Y, Aida WW, Ho C. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Int Food Res J* 2011; 18:1427.
- Chirino YI, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Pedraza-Chaverri J. Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* 2008; 245(1-2):18–23.
- Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *Jour Nutr* 2007; 137:1244–52.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement, M100-S15. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

- Correia RT, Borges KC, Medeiros MF, Genovese MI. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Sci Technol Int* 2012; 18:539–47.
- Cos P, Bruyne TD, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck A. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem* 2004; 11:1345–59.
- Cotoras M, Vinaco H, Melo R, Aguirre M, Silva E, Mendoza L. In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules* 2014; 19:21154–67.
- Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds- Review. *Mol Aspects Med* 2010; 31:446-67.
- Ćujić N. Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem. Doktorska disertacija. Beograd: Farmaceutski fakultet. Univerzitet u Beogradu; 2017
- Ćujić N, Šavikin K, Jankovic T, Pljevljakusic D, Zdunic G, Ibric S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem* 2016; 194: 135–142.
- Ćujić N, Šavikin K, Miloradović Z, Ivanov M, Vajić U, Karanović D, i sar. Characterization of dried chokeberry fruit extract and its chronic effects on blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *J Funct Foods* 2018; 44:330-9.
- Dai F, Chen WF, Zhou B. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with alpha-tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie* 2008; 90:1499–505.
- Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; 15(10):7313-52.
- d'Alessandro LG, Dimitrov K, Vauchel, Nikov I. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chem Eng Res Des* 2014; 92:1818-26.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740:364-78.
- Daugaard G, Abildgaard U, Larsen S. Holstein-Rathlou NH, Amtorp O, Olesen HP, i sar. Functional and histopathological changes in dog kidneys after administration of cisplatin. *Ren Physiol.* 1987; 10(1):54–64.
- Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2683–90.
- Del Rio D, Borges G, Crozier A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br J Nut.* 2010; 104(3):S67-90.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(14):1818-92.

- Denev P, Kratchanov CG, Ciz M, Lojek AM, Kratchanova M. Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidences and possible mechanisms of action: a review. *Compr Rev Food Sci* 2012; 11(5):471–89.
- Denev P, Číž M, Kratchanova M, Blazheva D. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chem* 2019; 284:108-17.
- Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, i sar. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* 2001; 60: 2118–28.
- De Pascual T, Sanchez BS. Anthocyanins, from plant to health. *Phytochem* 2008; 7:281–99.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A, Capasso F, Autore G. Effects of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytother Res* 1994; 8:42–5. Hammad H, Abdalla S. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: Structure-activity relationship. *Gen Pharmacol* 1997; 28:767-71.
- Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and *in vivo* levels. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314:1052–8.
- Dkhil MA, Al-Quraishy S, Aref AM, Othman MS, El-Deib KM, Abdel Moneim AE. The potential role of *Azadirachta indica* treatment on cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in female rats. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:741817.
- Dobyan DC, Levi J, Jacobs C, Kosek J, Weiner MW. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 213(3):551–6.
- Domarew CA, Holt RR, Goodman-Snitkoff G. A study of Russian phytomedicine and commonly used herbal remedies. *J Herb Pharmacother* 2002; 2:31–48.
- Dong Z, Atherton SS. Tumor necrosis factor-alpha in cisplatin nephrotoxicity: a homebred foe? *Kidney Int* 2007; 72:5–7.
- Drossman DA, Corazziari E, Talley JN, Grant Thompson W, Whitehead WE. Rome II. The functional gastrointestinal disorders, 2nd ed. McLean (VA, USA): Degnon Associates; 2000.
- Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M. *In vivo* influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monitor* 2012; 18:CR569-74
- Đukić MM. Oksidativni stres - slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. Beograd: Mono i Manjana; 2008.
- Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *J Med Biochem* 2008; 27(4):409-25.
- Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, McCarthy D, Burton-Freeman BM. Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) *in vitro* in human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 2011; 59(16):8616–24.

- Edwards AM. Chromones. *Chem Immunol Allergy* 2014; 100:317-22.
- Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Investigation of *Aronia melanocarpa* fruit juice for sedative-hypnotic effects in rats. *J Biomed Clin Res* 2018; 11:77-82.
- Egert S, Rimbach G. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements?. *Adv Nutr* 2011; 2(1):8–14. Burak M & Imen Y (1999) Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klin Tip Bil Derg* 19, 296–304.
- Ekinci Akdemir FN, Albayrak M, Çalik M, Bayir Y, Gülçin İ. The protective effects of p-coumaric acid on acute liver and kidney damages induced by cisplatin. *Biomedicines* 2017; 5(2):18.
- Erdman JW, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, i sar. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr* 2007;137:S718–37.
- ESCOP Monographs. 2nd edition. Thieme: European Scientific Cooperative On Phytotherapy; 2003.
- Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 2007; 68:2986–3008.
- Etsuo N. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(5):469–84.
- European Pharmacopoeia (Ph Eur) 9.0 edition. Strasbourg: European Directorate for the quality of medicines and healthcare. Council of Europe; 2017.
- Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care* 2006;10(1):R27.
- Fang J. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab Rev* 2014; 46(4):508–20.
- Fan-Yung AF, Rechits MA. Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von Apfelbeeren während der Lagerung und Verarbeitung; Nachrichten höhere Lehranstalten Krasnodar. *Izv Vyssh Uchebn Zaved, Pishchen Technologie* 1977; 1:76-8.
- Faria A, Meireles M, Fernandes I, Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, i sar. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chem* 2014a; 149:190–6.
- Faria A, Fernandes I, Norberto S, Mateus N, Calhau C. Interplay between Anthocyanins and Gut Microbiota. *J Agric Food Chem* 2014b; 62:6898–902.
- FDA – Food and drug administration. Bad Bug Book. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Second edition. Silver Spring: Center for food safety and applied nutrition (CFSAN) of the Food and drug administration (FDA), U.S. Department of health and human services; 2012.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(2):227-35.

- Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern Med Rev* 2000; 5:144–51.
- Finlay S, Bray B, Lewington A, Hunter-Rowe C, Banerjee A, Atkinson J, i sar. Identification of risk factors associated with acute kidney injury in patients admitted to acute medical units. *Clin Med* 2013; 13(3):233-8.
- Felgines C, Talavera S, Gonthier MP, Texier O, Scalbert A, Lamaison JL, i sar. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr* 2003, 133:1296-301.
- Foster T. *Staphylococcus*. U: Baron S, urednik. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- Fraga CG. Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life* 2007; 59:308–15.
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 2010; 31:435–45.
- Fraga CG, Oteiza P I, Galleano M. Plant bioactives and redox signaling: (-)-Epicatechin as a paradigm. *Mol Aspects Med* 2018; 61:31-40.
- Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* 2019; 10(2):514-28.
- Francescato HD, Coimbra TM, Costa RS, Bianchi Mde L. Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27(3):148–58.
- Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 45:221–9.
- Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, i sar. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2010; 16:1813–25.
- Galván A, Dimitrov K, Vauchel P, Nikov I. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chem Eng Res Des*. 2014; 92:1818–26.
- Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, i sar. Cyanidins: metabolism and biological properties. *J Nutri Biochem* 2004; 15:2-11.
- Gamble PE, Burke JJ. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. *Plant Physiol* 1984; 76:615–21.
- Gasiorowski K, Szyba K, Brokos B, Kolaczynska B, Jankowiak-Włodarczyk M, Oszmianski J. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Lett* 1997; 119:37-46.

- Gayet S, Chollet R, Molle G, Pages JM, Chevalier J. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(5):1555–9.
- Ghayur MN, Gilani HA, Janssen LJ. Intestinal, Airway, and Cardiovascular Relaxant Activities of Thymoquinone. *Evid-Based Compl Alt Med* 2012; 2012:305319.
- Giada MD. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. U: Morales-Gonzalez, urednik. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants*. London: In Tech Open; 2013.
- Gilani A, Khan A, Raoof M, Ghayur M, Siddiqui B, Vohra W, et al. Gastrointestinal, selective airways and urinary bladder relaxant effect of *Hyoscyamus niger* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca₂⁺ channels. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22:87-99.
- Gilmore MS, urednik. *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington: American Society for Microbiology Press; 2002.
- Glezerman IG, Jaimes AE. American society of nephrology onco-nephrology curriculum. Chemotherapy and kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:1275–83.
- Gočmanac Ignjatović M, Kitić D, Radenkovic M, Kostić M, Milutinović M, Nedin Ranković G, i sar. The effect of the aqueous and methanol fennel stem extracts (*Foeniculum vulgare* Miller) on isolated rat ileum contractility. *Vojnosanit Pregl* 2017; 75(8):809-14.
- Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev* 1986; 38:321–416.
- Gomes-Rochette NF, Da Silveira Vasconcelos M, Nabavi SM, Mota EF, Nunes-Pinheiro DC, Daglia M, i sar. Fruit as Potent Natural Antioxidants and Their Biological Effects. *Curr Pharm Biotechnol* 2016; 17(11):986-93.
- Gonenc A, Hacisevki A, Tavil Y, Cengel A, Torun M. Oxidative stress in patients with essential hypertension: a comparison of dippers and non-dippers. *Eur J Intern Med* 2013; 24(2):139-44.
- Goodsell DS. The molecular perspective: Cisplatin. *Stem Cells* 2006; 24(3):514-5.
- Gordon JA, Gattone VH. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 1986; 250(6Pt2):F991–F998.
- Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 1996; 334:1106-15.
- Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-51.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, i sar. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 2001; 41:492–9.
- Greenwood D, Slack RCB, Peuthere JF. *Medical microbiology, a guide to microbial infections: pathogens, immunity, laboratory diagnosis and control*. 16. izdanje. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.

- Graversen HB, Becker EM, Skibsted LH, Andersen ML. Antioxidant synergism between fruit juice and α -tocopherol. A comparison between high-phenolic black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and high-ascorbic blackcurrant (*Ribes nigrum*). Eur Food Res Technol 2008; 226:737–43.
- Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, i sar. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. Clin J Am Soc Nephrol 2012; 7:1938–46.
- Habauzit V, Milenkovic D, Morand C. Vascular protective effects of fruit polyphenols. U: Polyphenols in human health and disease. London: Elsevier; 2014. p.875-93.
- Haddock RE, Hill CE. Rhythmicity in arterial smooth muscle. J Physiol 2005; 566(Pt 3):645–56.
- Hagar H, Medany AE, Salam R, Medany GE, Nayal OA. Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. Exp Toxicol Pathol 2015; 67(2):133-41.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, i sar. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. J Agric Food Chem 1998; 46:1887–92.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, UK: Oxford University Press, 1999. pp.81.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans 2007; 35:1147– 50.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis?. Trends Pharmacol Sci 2011; 32(3):125–30.
- Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects? Antioxidant or not? Am J Clin Nutr 2005; 81(1):268S–276S.
- Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits – an overview. Int Jour Food Sci Technol 2012; 47:2023–44.
- Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. Cancer Ther 2003; 1:47-61.
- Handeland M, Grude N, Torp T, Slimestad R. Black chokeberry juice (*Aronia melanocarpa*) reduces incidences of urinary tract infection among nursing home residents in the long term – a pilot study. Nutr Res 2014; 34:518–25.
- Handeland M, Grude N, Torp T, Slimestad R. Black chokeberry juice (*Aronia melanocarpa*) reduces incidences of urinary tract infection among nursing home residents in the long term - a pilot study. Nutr Res 2014; 34(6):518-25.
- Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. Expert Opin Pharmacother 2003; 4(6):889-901.

- Hartmann JT, Fels LM, Knop S, Stolt H, Kanz L, Bokemeyer C. A randomized trial comparing the nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based combination chemotherapy with or without amifostine in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 2000; 18(3):281-9.
- Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:2179–205.
- Hassan HA, Edrees GM, El-Gamel EM, El-Sayed EA. Proanthocyanidin and fish oil potent activity against cisplatin-induced renal cell cycle arrest and apoptosis in rats. *Ren Fail* 2015; 37(8):1356-62.
- Hassana MS, Khalafb MM, Sadekc AS, Abo-Youssefb AM. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Pharm biol* 2017; 55(1):766–74.
- Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* 1988; 51:345–8.
- Heidari-Soreshjani S, Asadi-Samani M, Yang Q, Saedi-Boroujeni A. Phytotherapy of nephrotoxicity-induced by cancer drugs: an updated review. *J Nephropathol* 2017; 6(3):254-63.
- Heinonen M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective. *Mol Nutr Food Res*; 51(6):684-91.
- Hellström K, Torronen AR, Mattila PH. Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *J Agric Food Chem* 2009; 57:7899–906.
- Hellström JK, Shikov AN, Makarova MN, Pihlanto AM, Pozharitskaya ON, Ryhänen EL, i sar. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mithurinii*, var. Viking). *J Funct Food* 2010; 2:163–9.
- Hemming JM, Guarraci FA, Firth TA, Jennings LJ, Nelson MT, Mawe GM. Actions of histamine on muscle and ganglia of the guinea pig gallbladder. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:G622-G630.
- Hendrayani SF, Al-Harbi B, Al-Ansari MM, Silva G, Aboussekhra A. The inflammatory/cancer-related IL-6/ STAT3/NF-κB positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget* 2016; 7:41974–85.
- Henríquez-Olguín C, Altamirano F, Valladares D, López JR, Allen PD, Jaimovich E. Altered ROS production, NFκB activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *BBA-Mol Basis Disc* 2015; 1852:1410–9.
- Hider RC, Liu ZD, Khodr H. Metal chelating of polyphenols. *Methods enzymol* 2001; 335:190-203.

- Hill JM, Loeb E, MacLellan A, Hill NO, Khan A, King JJ. Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant diseases. *Cancer Chemother Rep* 1975; 59:647-59.
- Hill CE, Eade J, Sandow SL. Mechanisms underlying spontaneous rhythmical contractions in irideal arterioles of the rat. *J Physiol* 1999; 521(Pt 2):507-16.
- Hisamura F, Kojima-Yuasa A, Kennedy DO, Matsui Yuasa I. Protective effect of green tea extract and tea polyphenols against FK506-induced cytotoxicity in renal cells. *Basic Clin Pharm Toxicol* 2006; 98(2):192-6.
- Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002; 27:63-8.
- Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP, van der Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM, i sar. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 1997; 418:152-6.
- Hu J, Gao WY, Gao Y, Ling NS, Huang LQ, Liu CX. M3 muscarinic receptor- and Ca_2^+ influx-mediated muscle contractions induced by croton oil in isolated rabbit jejunum. *J Ethnopharmacol* 2010; 129:377-80.
- Hu J, Gao WY, Ma L, Man SL, Huang LQ, Liu CX. Activation of M3 muscarinic receptor and Ca_2^+ influx by crude fraction from *Crotonis fructus* in isolated rabbit jejunum. *J Ethnopharmacol* 2012; 139:136-41.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1841-56.
- Hutchison FN, Perez EA, Gandara DR, Lawrence HJ, Kaysen GA. Renal salt wasting in patients treated with cisplatin. *Ann Intern Med* 1988; 108:21-25.
- Hwang SJ, Yoon WB, Lee OH, Cha SJ, Kim JD. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem* 2014; 146:71-7.
- IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 26. Cisplatin. U: Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1981. pp. 151-64.
- Ichihyanagi T, Shida Y, Mamunur RM, Sekiya M, Hatano Y, Matsumoto H, i sar. Effect on both aglycone and sugar moiety towards phase II metabolism of anthocyanins. *Food Chem* 2008; 110:493-500.
- Ichihyanagi T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, Konishi T. Extended glucuronidation is another major path of cyanidin 3-O-b-Dglucopyranoside metabolism in rats. *J Agric Food Chem* 2005; 53:7312-9.
- Ilić S. Protektivni efekti kvercetina i aminogvanidina kod pacova sa akutnom bubrežnom insuficijencijom izazvanom cisplatinom. Doktorska disertacija. Niš: Medicinski fakultet. Univerzitet u Nišu; 2017.

- Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37:118-33.
- Iwasaki-Kurashige K, Loyaga-Rendon RY, Matsumoto H, Tokunaga T, Azuma H. Possible mediators involved in decreasing peripheral vascular resistance with blackcurrant concentrate (BC) in hind-limb perfusion model of the rat. *Vasc Pharmacol* 2006; 44(4):215–23.
- Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* 2009; 138(6):903-19.
- Jabeena Q, Bashir S, Lyoussi B, Gilani HA. Coriander fruit exhibits gut modulatory, blood pressure lowering and diuretic activities. *J Ethnopharmacol* 2009; 122:123–30.
- Jain SK, Levine NS, Duett J, Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990; 39(9): 971- 75.
- Jackson WF. Oscillations in active tension in hamster aortas: role of the endothelium. *Blood Vessels* 1988; 25(3):144–56.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002; 65:166-76.
- Jakobek L, Seruga M, Medvidovic-Kosanovic M, Novak I. Antioxidant activity and polyphenols of Aronia in comparison to other berry species. *Agric Conspec Sci* 2007; 72:301–6.
- Janda JM, Abbott SL. *The Enterobacteria*. Second edition. Washington: ASM press; 2006.
- Jančić R, Lakušić B. *Botanika farmaceutika, drugo izdanje*. Beograd: LENTO; 2017.
- Jaroniewski W. Aronia czarnoowocowa w lecznictwie i diete-tyce. *Wiad Zielar* 1998; 40:20.
- Jimenez Garcia SN, Guevara Gonzalez RG, Miranda Lopez R, Feregrino Perez AA, Torres Pacheco I, Vazquez Cruz MA. Functional properties and quality Literatura 167 characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Res Int* 2013; 54:1195–207.
- Jin J, Li M, Zhao Z, Sun X, Li J, Wang W, i sar. Protective effect of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) against cisplatin-induced nephrotoxicity via Nrf2-mediated defense response. *Phytomedicine* 2015; 22(5):528-35.
- Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(9-10):1865-79.
- Joseph SV, Edirisinghe I, Burton-Freeman BM. Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *J Agric Food Chem*. 2014; 62(18):3886-903.
- Josifović M. *Flora SR Srbije IV*. Beograd: SANU; 1972.
- Jovanović M. *Praktikum iz farmaceutske tehnologije sa biofarmacijom I deo*. Drugo izdanje. Beograd; Nijansa, Zemun: 2004.
- Jovanović M, Berger-Jekić O. *Specijalna bakteriologija, udžbenik za studente medicine*. Beograd: Savremena administracija; 1997.

- Jugoslovenska farmakopeja (Ph. Jug. V). Prilagođeni prevod Evropske farmakopeje. Peto izdanje. Beograd: Savremena administracija; 2000.
- Jurgoński A, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z. Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant Food Hum Nutr* 2008; 63:176–82.
- Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, i sar. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules* 2017; 22(6):944.
- Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *BBA* 2005; 1754:253–62.
- Kapci B, Neradová E, Čížková H, Voldřich M, Rajchl A, Capanoglu E. Investigating the antioxidant potential of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *J Food Nutr Res* 2013; 52(4):219–29.
- Karaki H, Wies G. Mini-review: Calcium release in smooth muscles. *Life Sci* 1983; 13:111-2.
- Karaki H, Satake N, Shibata S. Mechanism of barium-induced contraction in the vascular smooth muscle of rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 1986; 88:821-6.
- Karakašević B. Mikrobiologija i parazitologija. Beograd–Zagreb: Medicinska knjiga; 1977.
- Kardum N, Takic M, Savikin K, Zec M, Zdunic G, Spasic S, i sar.. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J Funct Food* 2014a; 9:89–97.
- Kardum N, Konic-Ristic A, Savikin K, Spasic S, Stefanovic A, Ivanisevic J, Milikovic M. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on antioxidant/pro-oxidant status in healthy subjects. *J Med Food* 2014b. 17:869–74.
- Kardum N, Milovanović B, Šavikin K, Zdunić G, Mutavdzin S, Gligorijevic T, Singh RB. Beneficial effects of polyphenol-rich chokeberry juice consumption on blood pressure level and lipid status in hypertensive subjects. *J Med Food* 2015; 18:1231-8.
- Karale S, Kamath JV. Effect of daidzein on cisplatin - induced hematotoxicity and hepatotoxicity in experimental rats. *Indian J Pharmacol* 2017; 49(1):49-54.
- Kay CD, Mazza G, Holub BJ, Wang J. Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br J Nutr* 2004; 91:933-42.
- Kay CD, Mazza G, Holub BJ. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *J Nutr* 2005; 135:2582-8.
- Kedzierska M, Malinowska J, Kontek B, Kołodziejczyk-Czepas J, Czernek U, Potemski P, i sar. Chemotherapy modulates the biological activity of breast cancer patients plasma: the protective properties of black chokeberry extract. *Food Chem Toxicol* 2013; 53:126–32.
- Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol* 2009; 16:449–57.

- Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:573–84.
- Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem* 2005; 13:5195-205.
- Kerbstadt S, Eliasson L, Mustafa A, Ahrne L. Effect of novel drying techniques on the extraction of anthocyanins from bilberry press cake using supercritical carbon dioxide. *Innov Food Sci & Emerg Technol* 2015; 29:209-14.
- Kim B, Ku CS, Pham TX, Park Y, Martin DA, Xie L, i sar. *Aronia melanocarpa* (chokeberry) polyphenol-rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. *Nutr Res* 2013; 33:406–13.
- Kim B, Park Y, Wegner CJ, Bolling BW, Lee J. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(9):1564-70.
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* 2014; 2:187–95.
- Kim SY, Moon A. Drug-induced nephrotoxicity and its biomarkers. *Biomol Ther* 2012; 20(3):268-72.
- King PD, Perry MC. Hepatotoxicity of chemotherapy. *Oncologist* 2001; 6(2):162-76.
- Kishore BK, Krane CM, Di Iulio D, Menon AG, Cacini W. Expression of renal aquaporins 1, 2, and 3 in a rat model of cisplatin-induced polyuria. *Kidney Int* 2000; 58(2):701–11.
- Kitic D, Brankovic S, Radenkovic M, Savikin K, Zdunic G, Kocic B, i sar. Hypotensive, vasorelaxant and cardiodepressant activities of the ethanol extract of *Sideritis raeseri* spp. *raeseri* boiss & heldr. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63:531-5.
- Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:313–8.
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res* 2017; 61(1):1361779.
- Klavins L, Kviesis J, Nakurte I, Klavins M. Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: Extraction optimisation and analysis. *LWT – Food Sci Technol* 2018; 93:583-91.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 2008; 44(2):65–81.
- Kociba RJ, Sleight SD. Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat. *Cancer Chemother Rep* 1971; 55(1):1–8.

- Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Łuczkiwicz M. Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *J Med Food* 2010; 13: 255-69.
- Kokura K, Kuromi Y, Endo T, Anzai N, Kazuki Y, Oshimura M, i sar. A kidney injury molecule-1 (Kim-1) gene reporter in a mouse artificial chromosome: the responsiveness to cisplatin toxicity in immortalized mouse kidney S3 cells. *J Gene Med* 2016; 18(10):273-81.
- Kong JM, Chia LS, Chia TF, Goh NK, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem* 2003; 64(5):923-33.
- Kostić M, Zlatković B, Miladinović B, Živanović S, Mihajilov-Krstev T, Pavlović D, i sar. Rosmarinic acid levels, phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activities of the extracts from *Salvia verbenaca* L. obtained with different solvents and procedures. *J Food Biochem* 2015;
- Kostić M. Hemijski sastav i farmakološki profil ekstrakata *Salvia sclarea* L. Doktorska disertacija. Niš: Medicinski fakultet. Univerzitet u Nišu; 2019.
- Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga; 2002.
- Kowalczyk E, Fijałkowski P, Kura M, Krześciński P, Błaszczak J, Kowalski J, i sar. The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 19(113):651-3.
- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids - food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2014; 65(2):79-85.
- Krenn L, Steitz M, Schlicht C, Kurth H, Gaedcke F. Anthocyanin-and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements—analysis with problems. *Die Pharmazie - Int J Pharm Sci* 2007; 62:803-12.
- Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280:638-49.
- Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* 2008; 74:1625-34.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807-69.
- Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat Rev* 1999; 25:47-58.
- Laleh GH, Frydoonfar H, Heidary R, Jamei R, Zare S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four *Berberis* species. *Pak J Nutr* 2006; 5(1):90-21.
- Landete JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012; 52(10):936-48.

- Laroze LE, Díaz-Reinoso B, Moure A, Zúñiga ME, Domínguez H. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *Eur Food Res Technol*. 2010; 231:669–77.
- Launay-Vacher V, Rey JB, Isnard-Bagnis C, Deray G, Daouphars M. Prevention of cisplatin nephrotoxicity: State of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61:903–9.
- Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A, Blumberg JB. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(11):77383.
- Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(6):a001651.
- Lee KH, Choi EM. Myricetin, a naturally occurring flavonoid, prevents 2-deoxy-d-ribose induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Eur J Pharmacol* 2008; 591(1-3):1–6.
- Lee S, Kim W, Moon S, Jeong SM, Kim DH, Kang KP. Rosiglitazone ameliorates cisplatin-induced renal injury in mice. *Nephrol Dial Transpl* 2006; 21(8):2096–105.
- Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 1998; 34(10):1522–34.
- Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem* 2011; 125:288–306.
- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360(9349):1903–13.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* 2014; 6(12):6020–47.
- Li HR, Habasi M, Xie LZ, Aisa HA. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells. *Molecules* 2014; 19:12940–8.
- Li FS, Weng JK. Demystifying traditional herbal medicine with modern approaches. *Nat Plants* 2017; 3:17109.
- Li YG, Tanner G, Larkin P. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *J Sci Food Agric* 1996; 70(1): 89–101.
- Liao Y, Lu X, Lu C, Li G, Jin Y, Tang H. Selection of agents for prevention of cisplatin induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res* 200; 57(2):125–31.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007; 65(12 Pt 2):S140-6.

- Liepiņa I, Nikolajeva V, Jākobsone I. Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *Environ Exp Biol* 2013; 11:195–9.
- Lippert B, urednik. Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Zürich, Switzerland: Verlag Helvetica Chimica Acta; 1999.
- Lippi G, Franchini M, Falavaro EJ, Targner G. Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the “French paradox”. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36:59–70.
- Liu S, Hu HZ, Ren J, Gao C, Gao N, Lin Z, Xia Y, Wood JP. Pre- and postsynaptic inhibition by nociceptin in guinea pig small intestinal myenteric plexus *in vitro*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G237-G246.
- Liu H, Baliga R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney Int* 2003;63:1687–96.
- Liu C, Wang X, Shulaev V, Dixon RA. A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins. *Nat Plants* 2016; 2:16182.
- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. 2010. Heart disease and stroke statistics-2010 update. A report from the American Heart Association. *Circulation* 2010; 121:e46–215.
- Lobo V, Phatak A, Chandra N. Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4:118–26.
- Loizzo RM, Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Mastellone V, Avallone L, et al. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *J Food Compos Anal* 2012; 25(2): 179-184.
- Lowry H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Estimation with Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193, 265.
- Lu CY, Hartono J, Senitko M, Chen J. The inflammatory response to ischemic acute kidney injury: a result of the ‘right stuff’ in the ‘wrong place’? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16:83–9.
- Lü J, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mod Med* 2010; 14:840–60.
- Ma SF, Nishikawa M, Hyoudou K et al. Combining cisplatin with cationized catalase decreases nephrotoxicity while improving antitumor activity. *Kidney Int* 2007; 72:1474–82.
- Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med* 1978; 65:307–14.
- Maher MA, Mataczynski H, Stefaniak HM, Wilson T. Cranberry juice induces nitric oxide-dependent vasodilation *in vitro* and its infusion transiently reduces blood pressure in anesthetized rats. *J Med Food* 2000; 3(3):141–7.

- Mahgoub E, Kumaraswamy SM, Kader KH, Venkataraman B, Ojha S, Adeghate E, i sar. Genipin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by counteracting oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2017; 93:1083-97.
- Malik M, Zhao C, Schoene N, Guisti MM, Moyer MP, Magnuson BA. Anthocyanin-rich extract from *Aronia meloncarpa* e. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr Cancer* 2003; 46:186–96.
- Malinowska J, Oleszek W, Stochmal A, Olas B. The polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds impair changes in the platelet adhesion and aggregation induced by a model of hyperhomocystenemia. *Eur J Nutr* 2013; 52:1049–57.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am Jour Clin Nutr* 2004; 79:727–47.
- Martinez-Pérez FE, Juárez NZ, Hernández RL, Bach H. Natural antispasmodics: source, stereochemical configuration, and biological activity. *Biomed Res Int* 2018; 3819714.
- Marques LG, Silveira AM, Freire JT. Freeze-drying characteristics of tropical fruits. *Dry Technol* 2006; 24:457–63.
- Matsui T, Korematsu S, Byun EB, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T. Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(10):2246–51.
- Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem* 2001; 49:1546-51.
- Matsumoto T, Horiuchi M, Kamata K, Seyama Y. Effects of *Bidens pilosa* L. var. radiata SCHERFF treated with enzyme on histamine-induced contraction of guinea pig ileum and on histamine release from mast cells. *J Smooth Muscle Res* 2004; 45:75-86.
- McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *J Agric Food Chem* 2005a; 53:5896-904.
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red wine – their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochem* 2005b; 66:2540-8.
- McGhie TK, Walton MC. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51:702-13.
- McGhie TK, Aingie GD, Barnet LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolised by both humans and rats. *J Agric Food Chem* 2003; 51:4539–48.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010; 140(6):771-6.
- Meli R, Autore G, Di Carlo G, Capasso F. Inhibitory action of quercetin on intestinal transit in mice. *Phytother Res* 1990; 4:201–2.

- Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013:801457.
- Meyer KB, Madias NE. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20:201–13.
- Mihajilov-Krstev T. Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta rosa Satureja L. Doktorska disertacija. Novi Sad: Prirodno-matematički fakultet. Univerzitet u Novom Sadu; 2009.
- Miladinović B. Potencijalna upotreba sokova i ekstrakta biljnih sorti crne ribizle (*Ribes nigrum* L.) kao funkcionalne hrane. Doktorska disertacija. Niš: Medicinski fakultet. Univerzitet u Nišu; 2015.
- Miladinovic B, Brankovic S, Kostic M, Milutinovic M, Kitic N, Šavikin K, i sar. Antispasmodic effect of black currant (*Ribes nigrum* L.) juice and its potential use as functional food in gastrointestinal disorders. *Med Princ Pract* 2018; 27:179-85.
- Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* 2010; 2(11):2490-518.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psych* 2009; 65:732–41.
- Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)* 2010; 2(11): 2490–518.
- Milutinovic M, Brankovic S, Savikin K, Zdunic G, Kostic M, Miladinovic B, et al. Hypotensive and antioxidant effects induced by polyphenol rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliott) juice. *Acta Med Median.* 2019; 58(2): 70-6.
- Mitazaki S, Honma S, Suto M, Kato N, Hiraiwa K, Yoshida M, i sar. Interleukin-6 plays a protective role in development of cisplatin-induced acute renal failure through upregulation of anti-oxidative stress factors. *Life Sci* 2011; 88(25–26):1142–8.
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem* 1999; 47:1083-91.
- Mohan IK, Khan M, Shobha JC et al. Protection against cisplatininduced nephrotoxicity by Spirulina in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58:802–8.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J Sci Technol* 2004; 26(2):211-9.
- Mora Lde O, Antunes LM, Francescato HD, Bianchi Mde L. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003; 47:517–22.
- Morales MA, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Arch Med Res* 1994; 25:17- 21.

- Morazzoni P, Livio S, Scilingo A, Malandrino S. Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats. *Drug Res* 1991; 41:128-31.
- Mukhopadhyay P, Horvath B, Zsengeller Z, Zielonka J, Tanchian G, Holovac E, i sar. Mitochondrial targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(2):497-506.
- Mulvihill EE, Huff MW. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Can Jour Cardiol* 2010; 26:17-21.
- Mundy L, Pedry B, Rahman M. Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine. *J herbal med* 2016; 6(2):53-58.
- Murray BE. Diversity among the multidrug-resistant *Enterococci*. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(1):37-47.
- Nagaya T, Tanaka N, Kimura T, Kitabatake H, Fujimori N, Komatsu M, i sar. Mechanism of the development of nonalcoholic steatohepatitis after pancreaticoduodenectomy. *BBA Clinical* 2015; 3:168–74.
- Nakashima M, Shigekuni Y, Obi T, Shiraishi M, Miyamoto A, Yamasaki H, i sar. Nitric oxidedependent hypotensive effects of wax gourd juice. *J Ethnopharmacol* 2011; 138(2):404–7.
- Naqshbandi A, Khan W, Rizwan S Khan F. Studies on the protective effect of flaxseed oil on cisplatin-induced hepatotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31:364–75.
- Narayan KM, Gregg EW, Fagot-Campagna A, Engelgau MM, Vinicor F. Diabetes – a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 50(Suppl):S77–84.
- Naruszewicz M, Łaniewska I, Millo B, Dłużniewska M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infarction (MI). *Atherosclerosis* 2007; 194:e179–84.
- Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010; 140(6):871-82.
- Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004; 195:221–30.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biol Med* 2010; 49:503–15.
- Oishi H, Schuster A, Lambole M, Stergiopulos N, Meister JJ, Beny JL. Role of membrane potential in vasomotion of isolated pressurized rat arteries. *Life Sci* 2002; 71(19):2239–48.
- Okazaki K, Seki S, Kanaya N, Hattori J, Tohse N, Namiki A. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in phenylephrine-induced oscillatory vasomotion in rat small mesenteric artery. *Anesthesiology* 2003; 98(5):1164–71.

- Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin XH, Yoshida K, i sar. Anti-inflammatory effects of Aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:275–81.
- Olas B, Wachowicz B, Nowak P, Kędzierska M, Tomczak A, Stochmal A, i sar. Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* in blood platelets. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59:823–35.
- Olas B, Kedzierska M, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W, Jeziorski A, i sar. Effect of Aronia on thiol levels in plasma of breast cancer patients. *Open Life Sci* 2010; 5:38–46.
- Olas B. Berry Phenolic Antioxidants - Implications for Human Health?. *Front Pharmacol* 2018; 9:78.
- Omara E, Pavlovic I, Drobac M, Radenkovic M, Brankovic S, Kovacevic N. Chemical composition and spasmolytic activity of *Cymbopogon nervatus* (Hochst.) Chiov. (Poaceae) essential oil. *Ind Crops Prod* 2016; 91:249–54.
- Oral HB, George AJT, Haskard DO. Prevention of hydrogen peroxide and cisplatin induced apoptosis by intracellular catalase overexpression. *Turk J Biol* 2000; 24:685–96.
- Oreopoulou V, Tzia C. Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. In: Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry; Oreopoulou V, Russ W. Eds. New York, NY, USA: Springer; 2007; pp. 209–32.
- Oszmianski J, Wojdylo A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* 2005; 221:809–13.
- Oszmianski J, Sapis JC. Anthocyanins in fruits of *Aronia Melanocarpa* (chokeberry). *J Food Sci* 1988; 53(4):1241-2.
- Ou K, Gu L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *J Funct Foods* 2014; 7:43–53.
- Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int* 2014; 2014:967826.
- Özyurt B, Güleç M, Özyurt H, Ekici F, Atış Ö, Akbaş A. The effect of antioxidant caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on some enzyme activities in cisplatin-induced neurotoxicity in rats. *Eur J Gen Med* 2006; 3(4):167-72.
- Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73:994–1007.
- Palacios J, Vega JL, Paredes A, Cifuentes F. Effect of phenylephrine and endothelium on vasomotion in rat aorta involves potassium uptake. *J Physiol Sci* 2013; 63(2):103-11.
- Pan H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Patel V, Mukhopadhyay B, Gao B, i sar. Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328(3):708-14.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 2016; 5:e47.

- Pandey BK, Rizvi IS. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2(5):270-8.
- Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric* 2000; 80:985–1012.
- Park S, Kim JI, Lee I, Lee S, Hwang MW, Bae JY, i sar. Aronia melanocarpa and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440(1):14-9.
- Park JM, Park JB. The preventive and therapeutic effects of Aronox extract on metabolic abnormality and hypertension. *J Korean Soc Hyper* 2011; 17:95–102.
- Park HM, Hong JH. Physiological activities of *Aronia melanocarpa* extracts on extraction solvents. *Korean J Food Preserv* 2014; 21:718–26.
- Park H, Liu Y, Kim HS, Shin JH. Chokeberry attenuates the expression of genes related to de novo lipogenesis in the hepatocytes of mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Res* 2016; 36(1):57-64.
- Park SA, Choi KS, Bang JH, Huh K, Kim SU. Cisplatin-induced apoptotic cell death in mouse hybrid neurons is blocked by antioxidants through suppression of cisplatin-mediated accumulation of p53 but not of Fas/Fas ligand. *J Neurochem* 2000; 75(3):946-53.
- Parkman HP, Doma S. Importance of gastrointestinal motility disorders. *Pract Gastroenterol* 2006; 30:23–40.
- Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwal PP. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Compos Anal* 2008; 21:241–8.
- Pavlovic RD, Veljkovic M, Stojanovic MN, Gocmanac-Ignjatovic M, Mihajilov- Krstev T, Brankovic S, i sar. Influence of different wild garlic (*Allium ursinum*) extracts on the gastrointestinal system: spasmolytic, antimicrobial and antioxidant properties. *J Pharm Pharmacol* 2017; 69:1208-18.
- Perazella MA. Renal Vulnerability to Drug Toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(7):1275-83.
- Peres LA, da Cunha AD Jr. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. *J Bras Nefrol* 2013; 35(4):332–40.
- Pérez-Gregorio M.R, Regueiro J, González-Barreiro C, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. *Food Control* 2011; 22:1108–13.
- Perše M, Večerić-Haler Ž. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *Bio Med Research International* 2018; 2018:1462802.
- Peterson LA, Cummings ME. Identification of a cis-2-butene-1, 4-dialderived glutathione conjugate in the urine of furan-treated rats. *Drug Metab Dispos* 200; 33(10):1453–8.

- Piccolella S, Pacifico S. Plant-Derived Polyphenols. *Adv Mol Toxicol* 2015; 9:161–214.
- Pilaczynska-Szczesniak L, Skarpanska-Steinborn A, Deskur A, Basta P, Horoszkiewicz-Hassan M. The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *Intern J Sport Nutr Exerc Metab* 2005; 14:48–58.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63:1035-42.
- Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Le Bourvellec C, Renard CM, Chemat F. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *J Food Eng* 2012; 111(1):73-81.
- Pratheeshkumar P, Son YO, Wang X, Divya SP, Joseph B, Hiltron JA, i sar. Cyanidin 3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF- κ B signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 280:127–37.
- Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int* 2009; 76(6):604–13.
- Protić D. Uloga kalijumovih kanala u efektima rezveratrola i naringenina na izolovanim venskim krvnim sudovima čoveka i pacova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu: Medicinski fakultet. Beograd; 2013.
- Qin B, Anderson RA. An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Brit J Nutr* 2012; 108:581–7.
- Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002; 110:835–42.
- Ramesh G, Reeves WB. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl* 2004; 66:S56–S61.
- Ramesh G, Kimball SR, Jefferson LS, Reeves WB. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF-alpha production by renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292:F812–9.
- Ramesh G, Reeves WB. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor-alpha. *Kidney Int* 2004; 65:490–499.
- Rashtchizadeh N, Hassan A, Ghorbanihaghjo A, Sanajou D, Hosseini V, Dastmalchi S, i sar. AMPK: A promising molecular target for combating cisplatin toxicities. *Biochem Pharmacol* 2019; 163:94-100.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar NMVR. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113:189–207.
- Rauf A, Imran M, Abu-Izneid T, Iahisham-Ul-Haq, Patel S, Pan X, i sar. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 2019; 116:108999.

- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, i sar. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 2000; 56(1):3-12.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biol Med* 2010; 49:1603–16.
- Revuelta M, Cantabrana B, Hidalgo A. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl₂. *Gen Pharmacol* 1997; 29:847-57.
- Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 2008;197:1079-81
- Rice-Evans C, Miller M, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci* 1997; 2(4):152-9.
- Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 1996; 20:933–56.
- Rinaldo D, Mbéguié-A-Mbéguié D, Fils-Lycaon B. Advances on polyphenols and their metabolism in sub-tropical and tropical fruits. *Trends Food Sci Technol* 2010; 21:599–606.
- Rocha CRR1, Silva MM1, Quinet A1, Cabral-Neto JB2, Menck CFM DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics* 2018; 73(1):e478s.
- Rodrigues MA, Rodrigues JL, Martins NM, Barbosa F, Curti C, Santos NA, i sar. Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Chem Biol Interact* 2011; 189:45–51.
- Rodrigues AS, Pérez-Gregorio MR, García-Falcón MS, Simal-Gándara J. Effect of curing and cooking on flavonols and anthocyanins in traditional varieties of onion bulbs. *Food Res Int* 2009; 42:1331–6.
- Rohlena J, Dong LF, Ralph SJ, Neuzil J. Anticancer drugs targeting the mitochondrial electron transport chain. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15:2951–74.
- Rohm H, Brennan C, Turner C, Günther E, Campbell G, Hernando I, i sar. Adding value to fruit processing waste: innovative ways to incorporate fibers from berry pomace in baked and extruded cereal-based foods—a SUSFOOD project. *Foods* 2015; 4:690-7.
- Rong S, Zhao Y, Bao W, Xiao X, Wang D. Curcumin prevents chronic alcohol-induced liver disease involving decreasing ROS generation and enhancing antioxidative capacity. *Phytomedicine* 2012; 19(6):545–50.
- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205:698–9.
- Rotondo A, Serio R, Mule F. Gastric relaxation induced by apigenin and quercetin: Analysis of the mechanism of action. *Life Sci* 2009; 85:85-90.

- Rugina D, Sconta Z, Leopold L, Pinteá A, Bunea A, Socaciu C. Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells. *Jour Medic Food* 2012; 15:700-6.
- Ryszawa N, Kawczyńska-Dróždź A, Pryjma J, Czesnikiewicz-Guzik M, Adamek-Guzik M, Naruszewicz M, i sar.. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57:611–26.
- Sacks FM, Kass EH. Low blood pressure in vegetarians: effects of specific foods and nutrients, *Am J Clin Nutr* 1988; 48(3):795–800.
- Sadzuka Y, Shimizu Y, Takino Y, Hirota S. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:453–9.
- Sahu BD, Kuncha M, Putcha UK, Sistla R. Effect of metformin against cisplatin induced acute renal injury in rats: a biochemical and histoarchitectural evaluation. *Exp Toxicol Pathol* 2013; 65(6):933-40.
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1995; 322:339–46.
- Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility--insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9(11):633–45.
- Santoso JT, Lucci JA, Coleman RL, Schafer I, Hannigan EV. Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: A randomized trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 52:13–8.
- Santos NA G, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi MLP, Santos A.C. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol* 2007; 81(7):495–504.
- Santos-Fagundes D, Grasa L, Gonzalo S, Valero MS, Castro M, Arruebo MP, i sar. Different mechanisms of actions of genistein and quercetin on spontaneous contractions of rabbit duodenum. *Rev Esp Enferm Dig* 2015; 107:413-6.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35(4):275-80.
- Sarwa A, Ciołkowska-Paluch G. Aronia czarnoowocowa. *Wiad Zielar* 1990; 9:22–23.
- Savić L. Metode ekstrakcije biljnih materijala: Uopredna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lek Sirov* 2014; 34:93-103.
- Sayed AA. Proanthocyanidin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Phytother Res* 2009; 23(12):173841.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 1991; 30(12):3875–83.

- Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 2002; 56(6):276-82.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000; 130(8S):2073S-85S.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45(4):287-306.
- Sedighi M, Rafieian-Kopaei M, Noori-Ahmadabadi M, Godarzi I, Baradaran A. *In vitro* impact of hydro-alcoholic extract of *Rosa damascena* Mill. on rat ileum contractions and the mechanisms involved. *Int J Prev Med* 2014; 5(6):767-75.
- Seidemann J. Chokeberries a fruit little-known till now. *Dtsch Lebens- mitt Rundsch* 1993; 89: 149–51.
- Seeram NP, Bourquin LD, Nair MG. Degradation prod cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J Agric Food Chem* 2001a; 49:4924-9.
- Seeram NP, Momin RA, Nair MG, Bourquin LD. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine* 2001; 8(5):362–9.
- Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem* 2008; 56(3):627-9.
- Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F, i sar. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14:553–60.
- Schnellmann RG, Kelly KJ. Pathophysiology of nephrotoxic acute renal failure. Philadelphia, Pa: Blackwell Science; 1999:1-14.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. *Jour Funct Food* 2015; 18:820-97.
- Sharif T, Alhosin M, Auger C, Minker C, Kim JH, Etienne-Selloum N, i sar. *Aronia melanocarpa* juice induces a redox-sensitive p73-related caspase 3-dependent apoptosis in human leukemia cells. *PLoS One* 2012; 7:e32526
- Sharif T, Stambouli M, Burrus B, Emhemmed F, Dandache I, Auger C, i sar. The polyphenolic-rich *Aronia melanocarpa* juice kills teratocarcinoma cancer stem-like cells, but not their differentiated counterparts. *J Funct Foods* 2013; 5:1244–52.
- Shaw J, Chen B, Lee AR, Media J, Valeriote FA. The smallmolecule TNF- α inhibitor, UTL-5g, delays deaths and increases survival rates for mice treated with high doses of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72:703-07.
- Shaw J, Chen B, Huang WH, Lee AR, Media J, Valeriote FA. The small-molecule TNF-alpha modulator, UTL-5g, reduces side effects induced by cisplatin and enhances the therapeutic effect of cisplatin *in vivo*. *J Exp Ther Oncol* 2011; 9:129-37.
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds - biochemistry and functionality. *J Med Food* 2003; 6:291–9.

- Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem* 2007; 55:9427–35.
- Shimeda Y, Hirotsu Y, Akimoto Y et al. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1635–8.
- Shirwaikar A, Issac D, Malini S. Effect of *Aerva lanata* on cisplatin and gentamicin models of acute renal failure. *J Ethnopharmacol* 2004; 90:81–6.
- Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003; 107:87–92.
- Shofian NM, Hamid AA, Osman A, Saari N, Anwar F, Pak Dek MS, Hairuddin MR. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *Int J Mol Sci* 2011; 12:4678–92.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22:7265–79.
- Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91(3): S31-S38.
- Sikora J, Broncel M, Markowicz M, Chałubinski M, Wojdan K, Mikiciuk-Olasik E. Short-term supplementation with *Aronia melanocarpa* extract improves platelet aggregation, clotting, and fibrinolysis in patients with metabolic syndrome. *Eur J Nutr* 2012; 51:549–56.
- Sikora J, Broncel M, Mikiciuk-Olasik E. *Aronia melanocarpa* Elliot reduces the activity of angiotensin I-converting enzyme – *in vitro* and *ex vivo* studies. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014:739721.
- Simić MV. Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije (*Aronia melanocarpa* L.). Doktorska disertacija. Leskovac: Tehnološki fakultet. Univerzitet u Nišu; 2018.
- Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)* 2002; 44:20–3.
- Singh G. A possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol* 1989; 58(1):71–80.
- Skoczyńska A, Jędrychowska I, Poręba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, et al. Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep* 2007; 59:177–82.
- Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland H, Johannessen T, Giske N. Flavonoids from black chokeberries *Aronia melanocarpa*. *J Food Compos Anal* 2005; 18:61-8.
- Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 2007; 30:3268-95.

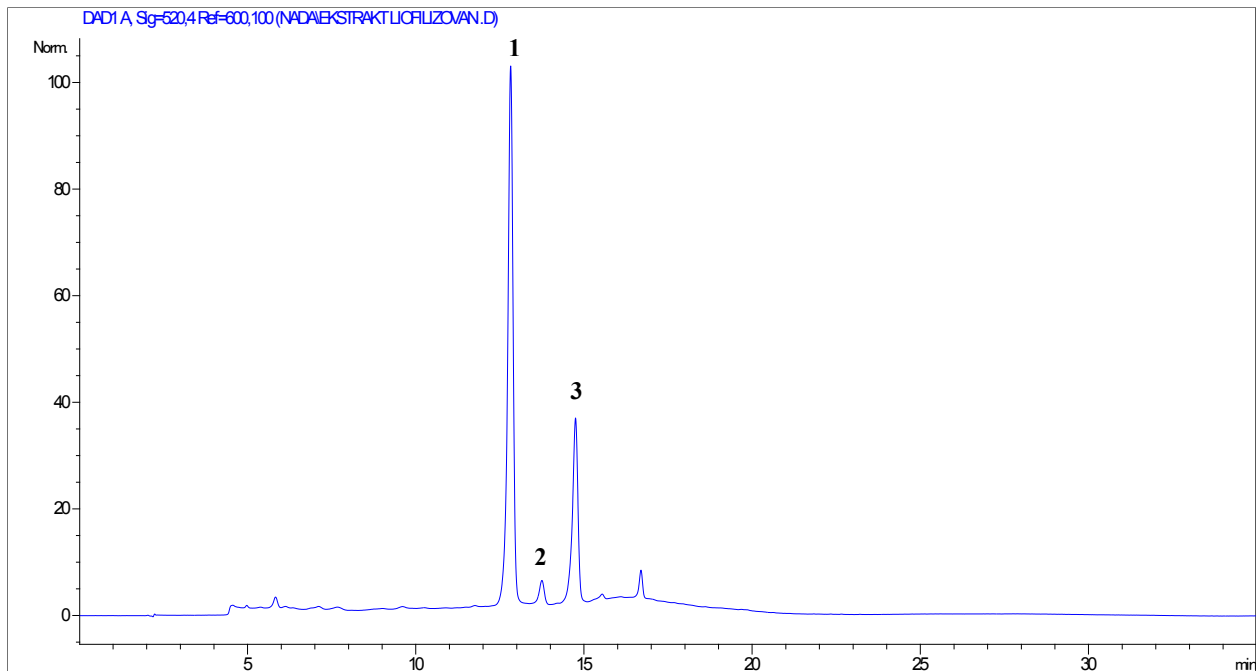
- Stamler R. Implications of the INTERSALT study. *Hypertension* 1991; 17(1):116–120.
- Stanisavljević N, Samardžić J, Janković T, Šavikin K, Mojsin M, Topalović V, i sar. Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chem* 2015; 175:516–22.
- Steyn WJ. Prevalence and functions of anthocyanins in fruits. In: Gould K, Davies K, Winefield C, editors. *Anthocyanins, biosynthesis, functions, and applications*. New York: Springer; 2009.
- Solanki MH, Chatterjee PK, Gupta M, Xue X, Plagov A, Metz MH, i sar. Magnesium protects against cisplatin induced acute kidney injury by regulating platinum accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307:F369–F384.
- Sonoda K, Aoi W, Iwata T, Li Y. Anthocyanin-rich *Aronia melanocarpa* extract improves body temperature maintenance in healthy women with a cold constitution. *SpringerPlus* 2013; 2:626.
- Sueiro L, Yousef GG, Seigler D, De Mejia EG, Grace MH, Lila MA. Chemopreventive potential of flavonoids extracts from plantation-bred and wild *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) fruits. *Jour Food Sci* 2006; 71:480–8.
- Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* trees. *Food Chem* 2007; 104:1106–14.
- Szajdek A, Borowska EJ. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods Hum Nutr* 2008; 63:147–56.
- Szmitko PE, Verma S. Red wine and your heart. *Circulation* 2005; 111:10–1.
- Šavikin K, Menković N, Zdunić G, Pljevljakušić D, Spasić S, Kardum M, i sar. Dietary supplementation with polyphenol-rich chokeberry juice improves skin morphology in cellulite. *J Med Food* 2014; 17:582–7.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140(6):805–20.
- Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol* 2005; 148:107–21.
- Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biola Pharm Bull* 2004; 27(12):1965–9.
- Tatić V, Blečić V. *Sistematika i filogenija viših biljaka*, drugo izdanje. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2002.
- Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus*. NCBI. StatPearls publishing; 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Thani NAA, Keshavarz S, Lwaleed BA, Cooper AJ, Roopnai HK. Cytotoxicity of gemcitabine enhanced by polyphenolics from *Aronia melanocarpa* in pancreatic cancer cell line AsPC-1. *J Clin Pathol* 2014; 67:949–54.

- Thilakarathna SH, Rupasinghe HP. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients* 2013; 5(9):3367–87.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27:502–22.
- Townsend DM, Hanigan MH. Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:142–8.
- Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lopus MG, Hanigan MH. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1–10.
- Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH. Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2009; 63:79–85.
- Track NS. The gastrointestinal endocrine system. *Can Med Assoc J* 1980; 122(3):287-92.
- Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, et al. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F208–18.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(9):726–36.
- Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules* 2016; 21(5):559.
- Valcheva-Kuzmanova S, Marazova K, Krasnaliev I, Galunska B, Borisova P, Belcheva A. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 56:385–92.
- Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)*. 2006; 48(2):11-7.
- Valcheva-Kuzmanova S, Gadjeva V, Ivanova D, Belcheva A. Antioxidant activity of *Aronia melanocarpa* fruit juice *in vitro*. *Acta Aliment* 2007a. 36:425–8.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Mihova V, Krasnaliev I, Borisova P, Belcheva A. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Food Human Nutr* 2007b; 62:19–24.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S, Belcheva A. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozocin-induced diabetic rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007c; 29:101–5.
- Valcheva-Kuzmanova S, Beronova AB, Momekor GT. Protective effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in a model of cisplatin-induced cytotoxicity *in vitro*. *Folia Medica (Plovdiv)* 2013; 55:76–9.

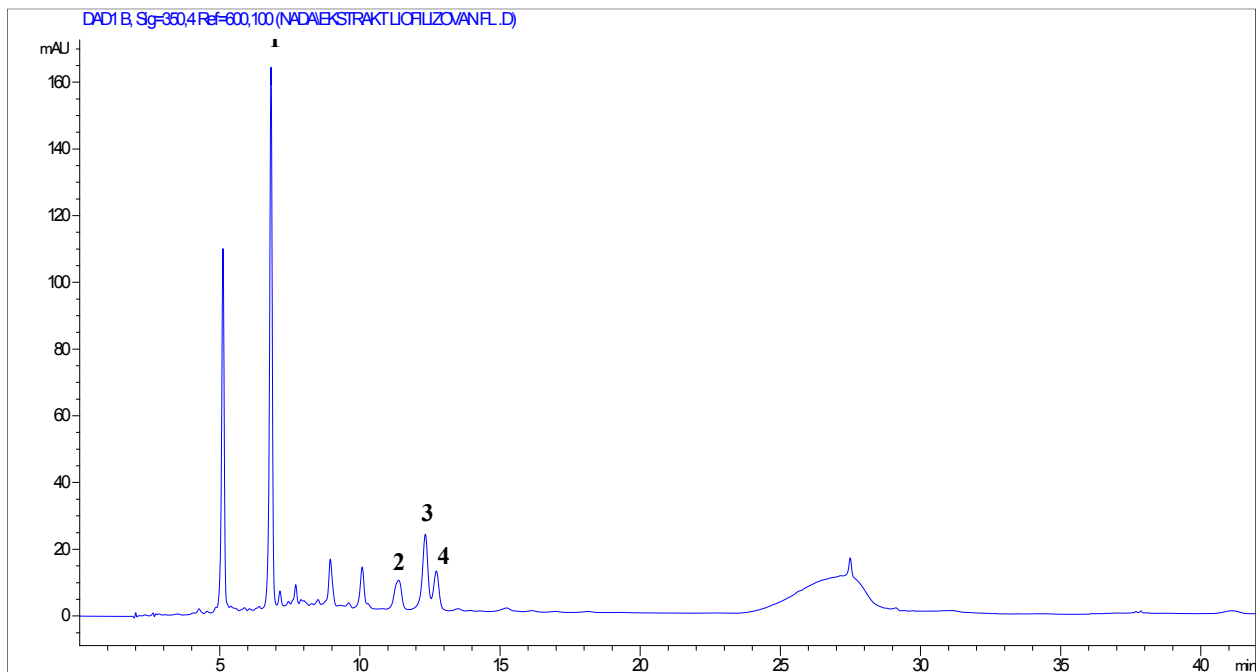
- Vermerris W, Nicholson R. Families of phenolic compounds and means of classification. U: Phenolic compound biochemistry. Dordrecht: Springer; 2008.
- Vlachojannis C, Zimmermann BF, Chrubasik-Hausmann S. Quantification of anthocyanins in elderberry and chokeberry dietary supplements. *Phytother Res.* 2015; 29(4):561-5.
- Volarevic V, Djokovic B, Gazdic Jankovic M, Randall Harrell C, Fellabaum C, Djonov V, i sar. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *J Biomed Sci* 2019; 26:25.
- Vuleta G, Primorac M, Milić J, Savić S. Farmaceutska tehnologija I. Beograd: Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2012.
- Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 2004; 36:829-37.
- Walsh JV, Singer JJ. Calcium action potentials in single freshly isolated smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1980; 239:C162-C174.
- Wang J, Liu YT, Xiao L, Zhu L, Wang Q, Yan T. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF- κ B pathway. *Inflammation* 2014; 37(6):2085–90.
- Wang Y, Zhao L, Wang D, Huo Y, Ji B. Anthocyanin-rich extracts from blackberry, wild blueberry, strawberry, and chokeberry: antioxidant activity and inhibitory effect on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. *J Food Sci Agric* 2015. 2016; 96(7):2494-503.
- Waseem M, Pandey P, Tomar B, Raisuddin S, Parvez S. Ameliorative action of curcumin in cisplatin-mediated hepatotoxicity: an in vivo study in Wistar rats. *Arch Med Res* 2014; 45(6):462-8.
- Waseem M, Bhardwaj M, Tabassum H, Raisuddin S, Parvez S. Cisplatin hepatotoxicity mediated by mitochondrial stress. *Drug Chem Toxicol* 2015; 38(4):452-9.
- Waterman PG, Mole S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publication. Oxford, 1994.
- Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 2003; 27:201–6.
- Wróblewska M, Juśkiewicz J, Frejnagel S, Oszmiański J, Zduńczyk Z. Physiological influence of chokeberry phenolics in model diet. *Acta Aliment* 2008; 37:221–32.
- Wrolstad RE. Anthocyanin Pigments- Bioactivity and Coloring Properties. *J Food Sci* 2004; 69:419-25.
- World Health Organization. Cancer: Fact sheet N°297. WHO; 2015 [cited 2016/8]. Dostupno na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 2004; 52:7846–56.

- Wu TC, Chao CY, Lin SJ, Chen JW. Low-dose dextromethorphan, a NADPH oxidase inhibitor, reduces blood pressure and enhances vascular protection in experimental hypertension. *PLoS One* 2012; 7(9):e46067.
- Wu X, Cao G, Prior RL. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr* 2002; 132:1865-71.
- Wu XL, Wang YY, Cheng J, Zhao YY. Calcium channel blocking activity of calycosin, a major active component of *Astragalus Radix*, on rat aorta. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(8):1007-12.
- Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol-Renal* 2008; 294(4):F777–F787.
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 2007; 334:115–24.
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 2007; 334(2):11524.
- Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K. Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2007; 74(3):477-87.
- Yugoslav Pharmacopoeia 2000 (Ph. Jug. V) – Adjusted translation of European Pharmacopoeia 1997 (Ph. Eur. III) Pharmacopoeia (5th ed.), editor: M. Kovac, publisher: Federal Institute for Health Protection and Improvement. Belgrade, 2001.
- Zapolska-Downar D, Bryk D, Malecki M, Hajdukiewicz K, Sitkiewicz D. *Aronia melanocarpa* fruit extract exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Eur J Nutr* 2012; 51:563–72.
- Zhang L, Hanigan MH. Role of cysteine S-conjugate β -lyase in the metabolism of cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306:988–94.
- Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- α produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int* 2007; 72:37–44.
- Zhao C, Giusti MM, Malik M, Moyer MP, Magnuson BA. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem* 2004; 52:6122–8.
- Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem* 2003; 51:502–9.
- Zhu W, Jia Q, Wang Y, Zhang Y, Xia M. The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of cAMP-PKA-dependent signalling pathway. *Free Radic Biol Med* 2012; 52:314–27.
- <http://www.efloras.org> (pristupljeno 11.01.2019)

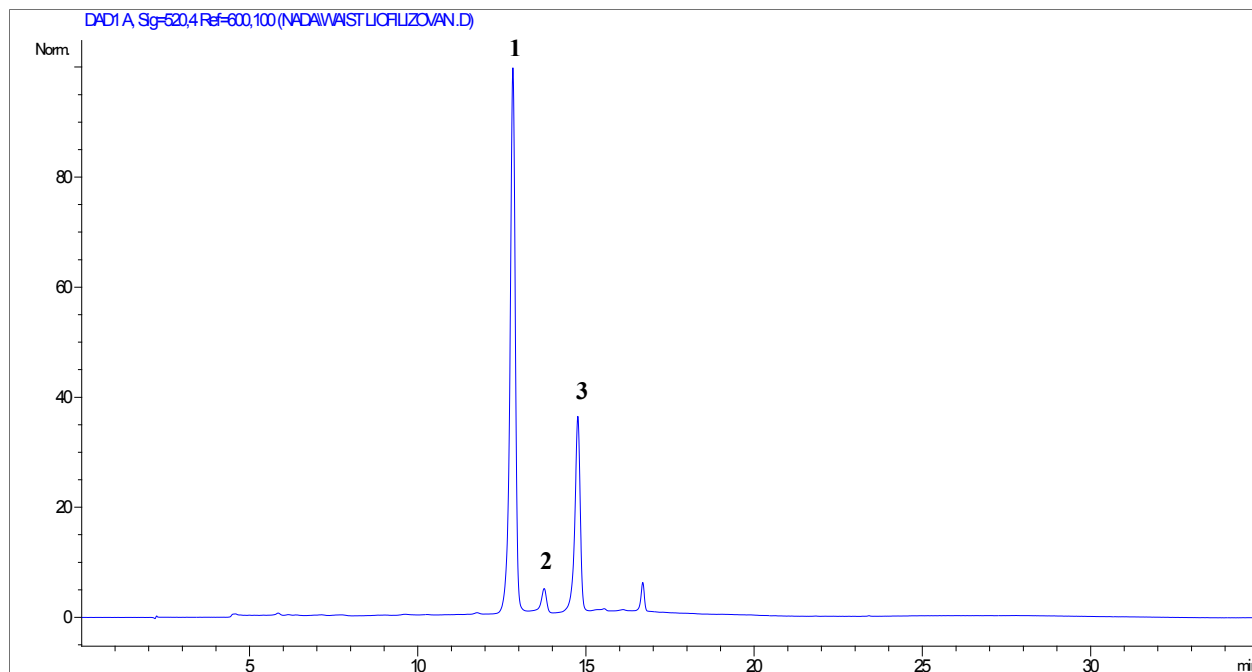
8. PRILOG



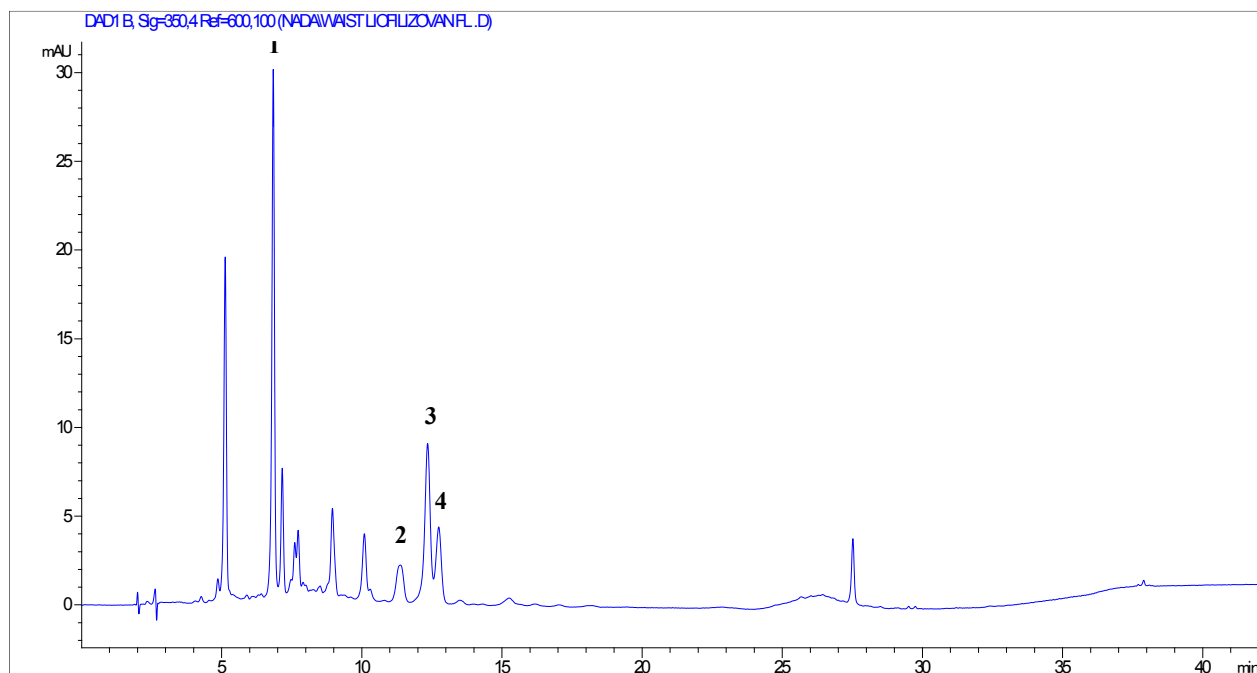
Slika 8.1. HPLC-DAD hromatogram ekstrakta AE (520 nm) – identifikacija pojedinačnih antocijana; 1- cijanidin-3-*O*-galaktozid; 2- cijanidin-3-*O*-glukozid; 3- cijanidin-3-*O*-arabinozid.



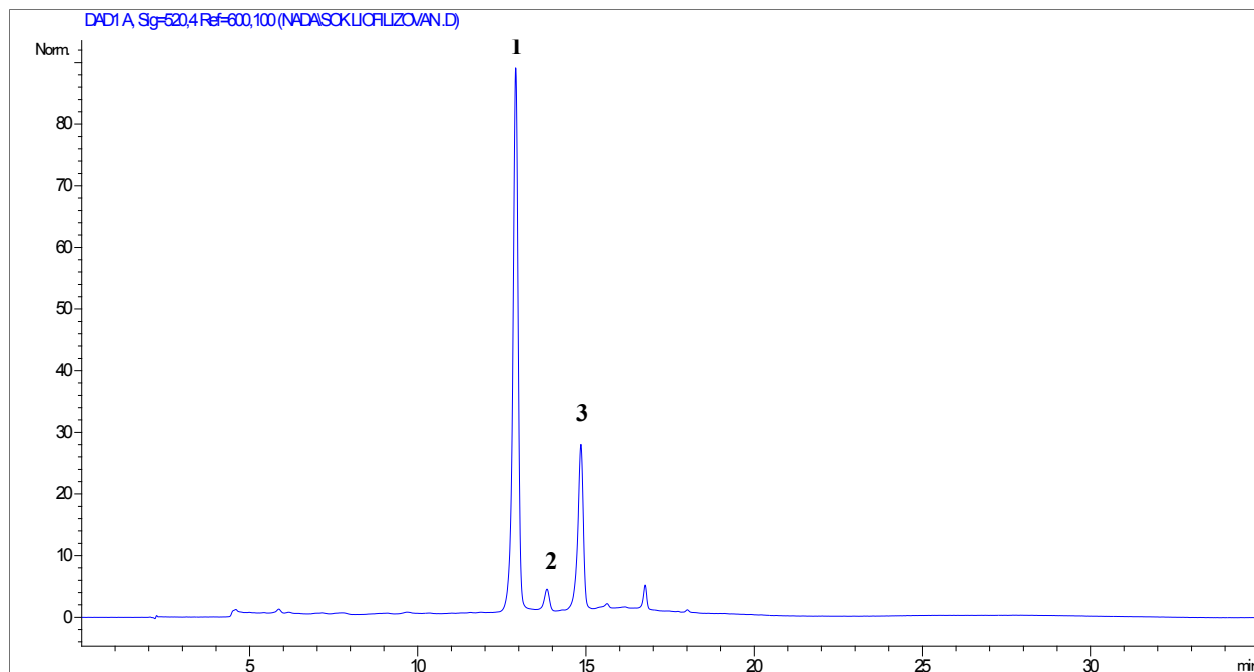
Slika 8.2. HPLC-DAD hromatogram ekstrakta AE (350 nm) – identifikacija pojedinačnih flavonoida i hlorogenske kiseline; 1- hlorogenska hiselina; 2- rutin; 3- hiperozid; 4- izokvercitrin.



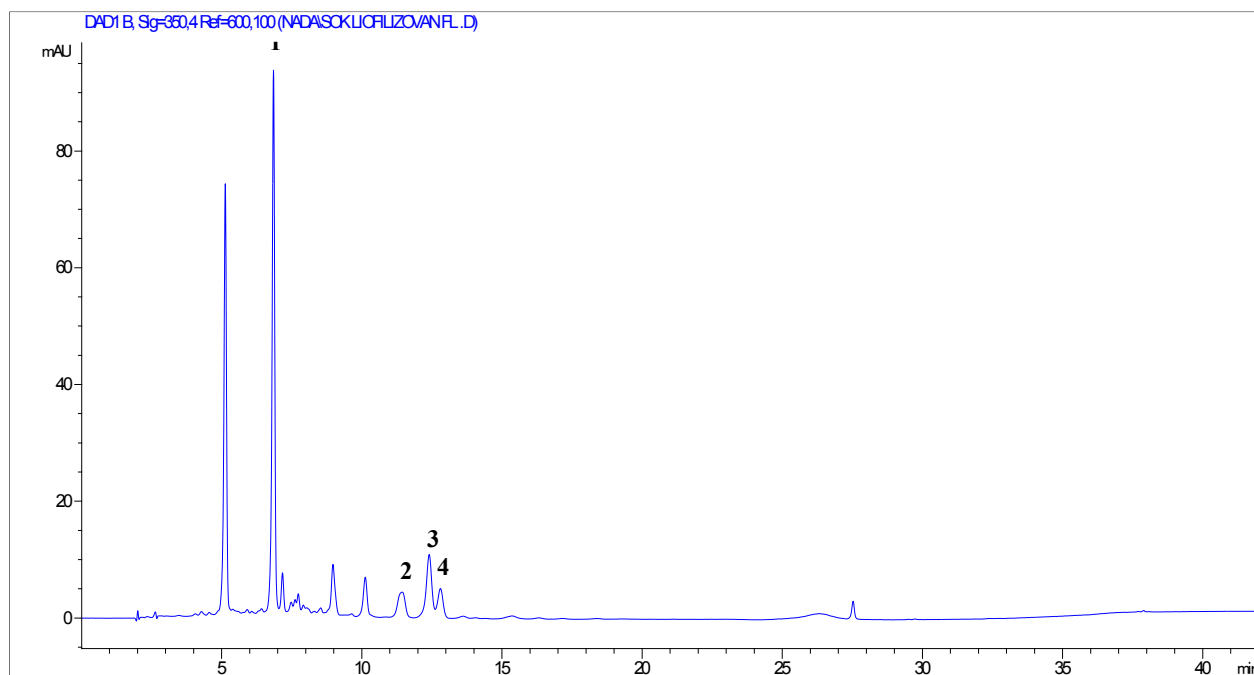
Slika 8.3. HPLC-DAD hromatofram ekstrakta ostatka nakon ceđenja soka AOE (520 nm) – identifikacija pojedinačnih antocijana; 1 - cijanidin-3-*O*-galaktozid; 2- cijanidin-3-*O*-glukoizid; 3- cijanidin-3-*O*-arabinozid.



Slika 8.4. HPLC-DAD hromatofram ekstrakta ostatka nakon ceđenja soka AOE (350 nm) – identifikacija pojedinačnih flavonoida i hlorogenske kiseline; 1- hlorogenska hiselina; 2- rutin; 3- hiperozid; 4- izokvercitrin.



Slika 8.5. HPLC-DAD hromatofram soka AS (520 nm) – identifikacija pojedinačnih antocijana; 1 - cijanidin-3-*O*-galaktozid; 2- cijanidin-3-*O*-glukozid; 3- cijanidin-3-*O*-arabinozid.



Slika 8.6. HPLC-DAD hromatofram soka AS (350 nm) – identifikacija pojedinačnih flavonoida i hlorogenske kiseline; 1- hlorogenska hiselina; 2- rutin; 3- hiperozid; 4-izokvercitrin.

BIOGRAFIJA

Milica Milutinović je rođena 24. juna 1986. godine u Nišu. Osnovnu školu „Učitelj Tasa“ i Gimnaziju „Svetozar Marković“ završila je u Nišu sa odličnim uspehom. Školske 2005/2006. godine upisala je Medicinski fakultet u Nišu - odsek Farmacija. Diplomski rad iz oblasti Farmakognozije odbranila 2011. godine i time stekla zvanje diplomiranog farmaceuta.

Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu, odsek Toksikologije, upisala je školske 2011/2012. godine, gde je položila sve ispite predviđene programom studija. Po akreditaciji studijskog programa Doktorskih akademskih studija – Farmaceutske nauke, školske 2013/2014. postala je student doktorskih studija novoakreditovanog studijskog programa, zbog užeg usavršavanja iz oblasti Farmakognozije i Fitoterapije, gde je takođe položila sve ispite predviđene programom studija sa prosečnom ocenom 9,93.

Pripravnički staž obavila je u Zdravstvenoj ustanovi "Apoteka Neven", nakon čega je položila stručni ispit za diplomiranog farmaceuta u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije. Od 2012. godine je u radnom odnosu na Medicinskom fakultetu u Nišu, u zvanju istraživač pripravnik. Izabrana je u zvanje asistenta 2015. godine, za užu naučnu oblast Farmacija – Farmakognozija na Medicinskom fakultetu u Nišu, gde je angažovana na izvođenju praktične nastave na predmetima Farmakognozija 1, Farmakognozija 2, Fitoterapija i Osnovi farmaceutskog menadžmenta. Istraživač je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije čiji je nosilac Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu, evidencioni broj III 46013, pod nazivom „Tradicionalni i novi proizvodi od plodova gajenih i samoniklih vrsta voćaka i vinove loze i nus-produkata u preradi, sa posebnim osvrtom na autohtone sorte: hemijska karakterizacija i biološki profil“, rukovodioca dr Katarine Šavikin.

U periodu od 01.10.2016. do 31.03.2017. godine u okviru *Erasmus Mundus* programa akademske mobilnosti (ERAWEB projekat), kao student doktorskih studija boravila je u Austriji na jednom od partnerskih univerziteta (UMIT - University for Health Sciences, Medical Informatics and Technology). Učestvovala je na brojnim stručnim edukacijama i skupovima. Autor je i koautor brojnih radova publikovanih u časopisima nacionalnog i međunarodnog značaja. Pored angažovanja u nastavi, učestvovala je u realizaciji više studentskih projekata, kao predavač i moderator radionica i mentor više studentskih radova.

IZJAVAO AUTORSTVU

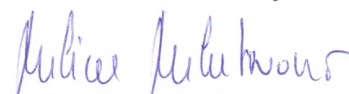
Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom **HEMIJSKA ANALIZA I FARMAKOLOŠKI EFEKTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott** koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivala na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredila autorska prava, niti zloupotrebila intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



Milica S. Milutinović


**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ELEKTRONSKOG I ŠTAMPANOG OBLIKA
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Naslov disertacije: **HEMIJSKA ANALIZA I FARMAKOLOŠKI EFEKTI EKSTRAKATA
I SOKA PLODA ARONIJE, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predala za unošenje u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, istovetan štampanom obliku.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



Milica S. Milutinović

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Nikola Tesla" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom: **HEMIJSKA ANALIZA I FARMAKOLOŠKI EFEKTI EKSTRAKATA I SOKA PLODA ARONIJE, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott.**

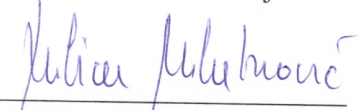
Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo(CCBY)
2. Autorstvo– nekomercijalno(CCBY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade(CCBY-NC-ND)
4. Autorstvo– nekomercijalno– delitipodistimuslovima(CCBY-NC-SA)
5. Autorstvo– bez prerade(CCBY-ND)
6. Autorstvo– delitipodistimuslovima(CCBY-SA)

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



Milica S. Milutinović