

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU  
FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU**

**Komisiji za poslediplomsku nastavu – doktorske studije**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta održanoj 22.01.2015. godine, imenovani smo za članove Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije koja je prijavljena pod naslovom **“Uticaj soka ploda aronije na markere oksidativnog statusa i profil masnih kiselina kod zdravih osoba sa i bez faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti”**, kandidata mr farm. Nevene Kardum.

Posle pregledane disertacije podnosimo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

**I Z V E Š T A J**

**A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija je napisana na 118 strana, ima 17 tabela, 24 slike i 183 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (26 strana), Ciljevi istraživanja (2 strane), Materijali i metode (20 strana), Rezultati istraživanja (24 strane), Diskusija (18 strana), Zaključci (3 strane), Literatura i Prilozi (3 strane).

**Cilj doktorske disertacije** je ispitivanje uticaja soka ploda aronije, kao bogatog izvora polifenola na pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite kod zdravih osoba sa ili bez prisutnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Na osnovu ovoga definisani su sledeći zadaci istraživanja: 1. Odrediti nivo oksidativnog stresa, antioksidativni status i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod zdravih osoba ženskog pola bez prisutnih faktora rizika za nastanak KVB. 2. Odrediti nivo oksidativnog stresa, antioksidativni status i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod osoba ženskog pola sa prisutnom abdominalnom gojaznošću sa i bez pratećih faktora rizika za nastanak KVB. 3. Odrediti nivo oksidativnog stresa, antioksidativni status i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod osoba sa visokim-normalnim arterijskim krvnim pritiskom i arterijskom hipertenzijom stadijuma 1 sa i bez pratećih faktora rizika za nastanak KVB. 4. Ispitati uticaj dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima zdravih osoba ženskog pola bez prisutnih faktora rizika za nastanak KVB. 5. Ispitati uticaj dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa i profil masnih kiselina u serumu i eritrocitima kod osoba ženskog pola sa

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

U poglavlju **Materijali i metode** su dati podaci o ispitanicama i primenjenim metodama. U cilju ispitivanja uticaja dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na markere oksidativnog stresa i profil masnih kiselina, sprovedene su tri humane inteventne studije pri čemu su uključene tri grupe ispitanika i to: zdravi ispitanici bez prisutnih faktora rizika za nastanak KVB (Grupa I), ispitanici sa abdominalnom gojaznošću (Grupa II) i ispitanici sa visokim-normalnim krvnim pritiskom ili hipertenzijom stadijuma 1 (Grupa III).

Grupu I činilo je 29 zdravih osoba ženskog pola starosti od 25 do 49 godina bez prisutnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Kriterijum za uključivanje podrazumevao je žene sa ITM između 18,5 i 29,9 kg/m<sup>2</sup> i stabilnom telesnom masom. Protokol studije podrazumevao je dijetarnu intervenciju sokom od aronije u trajanju od 12 nedelja. Ispitanici su svakodnevno konzumirali 100 mL soka, po savetu uz veći obrok. Studija je podrazumevala tri studijske vizite, prva poseta označavala je početak studije, druga poseta bila je na sredini interventnog perioda, dok je treća poseta označavala završetak studije. Svaka studijska poseta podrazumevala je uzorkovanje krvi, određivanje osnovnih antropometrijskih parametara, kao i merenje krvnog pritiska.

Grupu II činilo je 20 osoba ženskog pola starosti od 46 do 65 godina. Glavni kriterijum za uključivanje u studiju bila je prisutna abdominalna gojaznost (obim struka  $\geq 88$  cm). Zdravstveni status ispitanika ocenjen je na osnovu anamnestičkih podataka, dok su analize pokazale da je veći deo učesnika imao prisutan još neki od faktora rizika za nastanak KVB. Protokol je podrazumevao svakodnevnu konzumaciju 100 mL soka u trajanju od 4 nedelje. Studija se sastojala iz dve studijske vizite, prvi dolazak na samom početku studije, a drugi dolazak posle 4 nedelje. Studijski dolazak obuhvatio je merenje antropometrijskih parametara i uzorkovanje krvi.

Grupu III činile su 23 osobe sa visokim-normalnim arterijskim krvnim pritiskom (sistolni krvni pritisak 130–139 mmHg i/ili dijastolni 85–89 mmHg), ili hipertenzijom stadijuma 1 (sistolni krvni pritisak 140–159 mmHg i/ili dijastolni 90–99 mmHg), u skladu sa podelom preporučenom od strane Evropskog udruženja za hipertenziju. Uključeno je 23 ispitanika (11 žena i 12 muškaraca) starosti od 33 do 67 godina. Osnovni kriterijum za uključivanje u studiju bio je prisustvo navedenih vrednosti krvnog pritiska bez redovne upotrebe antihipertenzivnih lekova. Dijetarna intervencija podrazumevala je svakodnevnu konzumaciju 200 mL soka ( po savetu u dve doze, 2x100 mL) u trajanju od 4 nedelje. Ispitanici su imali zakazana dva dolaska (pre početka i po završetku perioda intervencije) kada im je uzimana krv i merene vrednosti krvnog pritiska. Arterijski krvni pritisak meren je ambulatorno, odnosno pomoću prenosivog uređaja koji je registrovao pritisak na svakih 15 minuta u toku 24 h. Praćenje je vršeno pre početka i nakon 4 nedelje redovne konzumacije soka, da bi se ustanovio eventualni uticaj intervencije na prosečne vrednosti krvnog pritiska kako u toku celog dana, tako i na prosečne vrednosti u budnom, odnosno stanju sna.

U interventnim studijama su korišćena dva soka ploda aronije: sok A koji su uzimale Grupa I i Grupa III i sok B koji je uzimala Grupa II. Sok A je matični sok od aronije, komercijalno dostupan, domaćeg proizvođača Conimex trade doo. Sok je dobijen hladnim ceđenjem zrelih plodova aronije, konzervisan isključivo pasterizacijom i pakovan bez dodatka aditiva. Za potrebe studija korišćen je sok iz jedne šarže, odnosno dobijen iz homogene sirovine i samim tim ujednačenog hemijskog sastava. Sok B je takođe matični sok od aronije, komercijalno dostupan, domaćeg proizvođača Nutrika doo, Srbija. Sok je proizveden mehaničkom preradom (homogenizacijom i presovanjem) zdravih tehnološki zrelih plodova aronije, konzervisan kratkotrajnom pasterizacijom u trajanju od nekoliko sekundi na 90 °C i filtriran u cilju dobijanja bistrog soka. Sok B je obogaćen dodatkom dijetarnih vlakana (Luralean<sup>®</sup>, Shimitzu, Japan), koji pripadaju grupi glukomanana i očišćeni su od svih enzima koji u drugim proizvodima ove vrste izazivaju izuzetnu nestabilnost proizvoda. Na ovaj način razvijen je proizvod koji je namenjen osobama sa povećanim ITM, kakvi su bili ispitanici Grupe II. Oba soka su proizvedena u skladu sa važećim pravilnicima o kvalitetu proizvoda od voća.

Sok A i sok B su okarakterisani u pogledu sadržaja ukupnih polifenola i sadržaja antocijana, a takođe je određen i sadržaj rastvorljive suve materije, kao i pH vrednost soka. U cilju utvrđivanja antiradikalske aktivnosti primenjen je DPPH test.

Kod sve tri grupe ispitanika i u svim studijskim dolascima krv je uzorkovana na tašte, nakon najmanje 12h gladovanja, u ranim jutarnjim časovima (8-9h). Krv je uzorkovana u epruvetama bez antikoagulansa, odakle je izolovan serum, i epruvetama sa etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom, iz kojih su izolovani eritrociti. Biohemijske analize su urađene odmah po odvajanju seruma, a ostatak seruma je podeljen u zapremine od 500 µL i zamrznut na -80°C za kasnije analize markera oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite. Za izolovanje eritrocita najpre je odvojena plazma iz epruveta sa EDTA, nakon toga eritrociti su isprani tri puta u fiziološkom rastvoru, potom podeljeni u zapremine od 500 µL i zamrznuti na -80°C da bi dalje bili korišćeni za analize antioksidativnih enzima i profil masnih kiselina.

Kod ispitanika su zabeleženi sledeći antropometrijski podaci: starost, visina, težina i indeks telesne mase. U uzorcima seruma, plazme i eritrocita izolovanim iz krvi ispitanika određeni su parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kao i profil masnih kiselina.

Od parametara oksidativnog stresa određene se supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) spektrofotometrijskom metodom koju je opisao Giroti (1), ukupni oksidativni status (TOS) metodom po Erelu (2) i prooksidativna-antioksidativna ravnoteža (PAB), kao parametar koji objedinjuje činioce oksidativnog oštećenja i antioksidativne zaštite, modifikovanom Alamdarijevom (3) metodom. Od parametara antioksidativne zaštite određen je ukupni antioksidativni status (TAS, 4) koncentracija ukupnih sulfidrilnih grupa metodom po Ellmanu (5), kao i aktivnost paraoksonaze (PON1), koja je merena kinetički uz učešće dva supstrata (6).

Takođe, u hemolizatu eritrocita određena je aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD), glutation-peroksidaze (GPx) i katalaze (CAT). Aktivnost enzima je izražena po gramu hemoglobina, koji je određen spektrofotometrijski uz pomoć Drabkin-ovog reagensa. Za određivanje aktivnosti ovih enzima korišćeni su komercijalni testovi.

Za analizu masnih kiselina u fosfolipidima eritrocita korišćena je metoda gasno-tečne hromatografije uz prethodnu izolaciju ukupnih lipida, njihovo razdvajanje tankoslojnom hromatografijom i esterifikaciju masnih kiselina. Sadržaji pojedinačnih masnih kiselina izraženi su u procentima od ukupno detektovanih masnih kiselina na osnovu površine pikova (7, 8).

## **B. OPIS DOBIJENIH REZULTATA**

U poglavlju Rezultati, prvo su prikazani rezultati dobijeni u interventnoj studiji koja je sprovedena sa Grupom I, a koju je činilo je 29 zdravih osoba ženskog pola starosti od 25 do 49 godina bez prisutnih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Kriterijum za uključivanje podrazumevao je žene sa ITM između 18,5 i 29,9 kg/m<sup>2</sup> i stabilnom telesnom masom. Protokol studije podrazumevao je dijetarnu intervenciju sa 100 mL soka od aronije u trajanju od 12 nedelja. Krv je uzorkovana na početku studije, posle 6 nedelja i na kraju studije posle 12 nedelja.

Konzumacija soka od aronije u trajanju od 12 nedelja nije uticala na biohemijske parametre ispitanike ove grupe, što je i bilo očekivano s obzirom da se radilo o zdravim ispitanicima kod kojih su pre početka intervencije, kao i po završetku biohemijski pokazatelji bili u referentnom intervalima.

Uticaj konzumacije Soka A u Grupi I na parametre oksidativnog stresa, praćen je na početku intervencije i potom nakon 6 i 12 nedelja. Zabeleženo je statistički značajno smanjenje TBARS nakon 6 i 12 nedelja konzumacije Soka A u odnosu na bazalni status. Takođe, intervencija je rezultovala i smanjenjem PAB, pri čemu je ovo smanjenje bilo statistički značajno nakon 6 nedelja, a na kraju interventnog perioda vrednost PAB bila je niža u odnosu na bazalni status, ali ta razlika nije bila statistički značajna. Ukupni oksidativni status (TOS) je takođe značajno smanjen nakon 6 nedelja, ali su vrednosti TOS porasle do kraja intervencije tako da se nisu razlikovale u odnosu na bazalni status. Među činiocima antioksidativne zaštite, zabeleženo je značajno smanjenje sadržaja SH grupa nakon 6 nedelja, što je bilo praćeno smanjenjem vrednosti TAS, koje su na kraju interventnog perioda bile značajno niže u odnosu na vrednosti nakon 6 nedelja, kao i u odnosu na bazalni status.

Aktivnosti PON1 prema diazoksonu kao supstratu nakon 12 nedelja konzumacije soka bila je statistički značajno veća u odnosu na bazalnu aktivnost, kao i aktivnost izmerenu na sredini interventnog perioda. Aktivnost PON1 prema paraoksonu bila je statistički značajno niža nakon 6 nedelja konzumacije soka u odnosu na početnu vrednost, da bi se do kraja intervencije vratila na nivo koji nije bio statistički značajno različit od bazalne aktivnosti.

Tokom interventnog perioda zabeležena je stimulacija aktivnosti antioksidativnih enzima eritrocita kod ispitanika grupe I, koja je rezultovala statistički značajno većom aktivnošću SOD na kraju studije u odnosu na početak intervencije, ali i u odnosu na aktivnost nakon 6 nedelja konzumacije soka. Zabeležen je i porast aktivnosti enzima GPx koja posle 12 nedelja bila značajno viša u odnosu na aktivnost pre početka intervencije. Aktivnost katalaze nije bila značajno promenjena.

Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi I određivan je pre početka intervencije, kao i nakon 6, odnosno 12 nedelja redovne konzumacije soka. U slučaju zastupljenosti ukupnih polinezasićenih masnih kiselina, PUFA, čiji je relativni sadržaj praćen kao pokazatelj nivoa oksidativnog oštećenja lipida, zabeležen je porast, koji je bio statistički značajan nakon 12 nedelja. Indeks nezasićenosti, koji predstavlja prosečni sadržaj nezasićenih veza, bio je značajno viši na kraju interventnog perioda u odnosu na vrednost pre početka konzumacije soka.

Statistički značajno smanjenje zabeleženo je u sadržaju oleinske kiseline (C18:1n-9), što je praćeno smanjenjem i ukupnih mononezasićenih masnih kiselina (MUFA). Takođe, značajno je smanjen i odnos n-6/n-3 masnih kiselina zbog značajnog porasta sadržaja ukupnih n-3 masnih kiselina. Sa druge strane, sadržaj ukupnih, kao i pojedinačnih n-6 masnih kiselina nije se statistički značajno menjao, osim u slučaju C18:2n-6, čiji je sadržaj značajno porastao na kraju intervencije u odnosu na sadržaj zabeležen nakon 6 nedelja.

Pojedini autori predlažu sumu relativnih sadržaja eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske masne kiseline (DHA) u eritrocitima kao potencijalni marker i prediktor nastanka koronarne bolesti, zasnovano na činjenici da membrana eritrocita reflektuje sadržaj n-3 masnih kiselina u membranama kardiocita. Stoga je praćen uticaj konzumacije Soka A i na ovaj parametar, koji se naziva omega-3 indeks. Kao rezultat uočen je statistički značajan porast i to nakon 6, kao i nakon 12 nedelja redovne konzumacije Soka A.

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

Efekti svakodnevne konzumacije Soka B na vrednosti biohemijskih parametara ukazali su na tendenciju smanjenja vrednosti holesterola, kako ukupnog tako i LDL i HDL holesterola, a vrednost je bila statistički značajno niža na kraju interventnog perioda samo za HDL holesterol. Takođe, zabeleženo je statistički značajno sniženje sistolnog krvnog pritiska. Redovna konzumacija soka B u trajanju od 4 nedelje rezultovala je u statistički značajnom smanjenju obima struka i ITM. Smanjenje telesne mase praćeno je i smanjenjem mase masti, iako % masti nije statistički značajno smanjen. Sa druge strane, % vode u organizmu je značajno smanjen.

Kod markera oksidativnog stresa u Grupi II uočeno je značajno smanjenje vrednosti PAB, kao i značajno povećanje vrednosti TAS. Ostali serumski pokazatelji oksidativnog oštećenja, odnosno antioksidativne zaštite nisu se značajno razlikovali na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalni status. Uporedo sa praćenjem uticaja konzumacije Soka B na markere oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi II, ispitanik je i uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima. Slično rezultatima prikazanim za prethodnu grupu ispitanika, i u Grupi II konzumacija Soka B dovela je do statistički značajnog porasta aktivnosti glutation-peroksidaze, ali nije uticala na aktivnost katalaze. Takođe, aktivnost superoksid-

dismutaze nije se promenila, što je takođe bilo u skladu sa rezultatima zabeleženim u Grupi I, gde konzumacija soka u trajanju od 6 nedelja nije uticala na aktivnost ovog enzima.

Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita analiziran je i kod ispitanika u Grupi II pre početka intervencije i posle 4 nedelje konzumacije soka B. Zabeleženo je statistički značajno povećanje sadržaja ukupnih n-3 masnih kiselina, uslovljeno porastom najzastupljenije n-3 masne kiseline, DHA. Kao i u slučaju prve grupe ispitanika, i u Grupi II praćen je uticaj konzumacije Soka B na omega-3 indeks, odnosno zbir sadržaja EPA i DHA. Nakon perioda konzumacije vrednost ovog indeksa je bila statistički značajno viša.

U skladu sa porastom sadržaja n-3 masnih kiselina, dobijeno je i statistički značajno smanjenje odnosa n-6 i n-3 masnih kiselina. Takođe, zabeležen je porast ukupnih PUFA, ali on nije bio statistički značajan. U skladu sa tim, dobijeno je povećanje indeksa nezasićenosti koje je bilo na samoj granici statističke značajnosti. Statistički značajna promena zabeležena je i u sadržaju ukupnih MUFA, odnosno najzastupljenije mononezasićene masne kiseline, C18:1n-9. U ovom slučaju vrednosti su bile značajno niže na kraju interventnog perioda, u odnosu na vrednosti pre početka intervencije.

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

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

Takođe, statistički značajno nije bio promenjen nijedan ispitivani pokazatelj oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu na kraju interventnog perioda od 4 nedelje u odnosu na početne vrednosti. Za razliku od markera oksidativnog stresa u serumu, aktivnost antioksidativnih enzima eritrocita se statistički značajni promenila, odnosno aktivnost SOD, GPx i CAT na kraju interventnog perioda bila je statistički značajno viša u odnosu na bazalnu aktivnost.

Profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita ispitanika u Grupi III određivan je pre početka studije i posle 4 nedelje redovne konzumacije Soka A. Kao posledica redovne konzumacije Soka A u trajanju od 4 nedelje uočen je porast sadržaja ukupnih n-3 masnih kiselina, koji je bio statistički značajan. Takođe, iako ne statistički značajno porastao je i sadržaj C20:5n-3 (EPA) koja je pored DHA najznačajnija pojedinačna n-3 masna kiselina. Za razliku od prethodne dve grupe ispitanika, u Grupi III nije zabeležen statistički značajan porast sadržaja DHA nakon perioda konzumacije. Zbir relativnih sadržaja EPA i DHA (omega-3 indeks) bio je viša posle 4 nedelje konzumacije Soka A u odnosu na početnu vrednost.

Sadržaj ukupnih PUFA imao je tendenciju porasta, ali ova promena nije dostigla statističku značajnost. U skladu sa porastom PUFA, dobijeno je i povećanje prosečnog sadržaja nezasićenih

veza, odnosno indeksa nezasićenosti, ali takođe bez statističke značajnosti. Za razliku od promene u prethodne dve grupe, u slučaju Grupe III svakodnevna konzumacija Soka A u trajanju od 4 nedelje nije značajno uticala na odnos sadržaja n-6 i n-3 masnih kiselina. Takođe, ova grupa se izdvaja po porastu relativnog sadržaja pojedinačne n-6 masne kiseline C20:3n-6.

Kod Grupe III praćen je uticaj konzumacije Soka A na vrednosti arterijskog krvnog pritiska. Ovo je podrazumevalo ambulatorno merenje krvnog pritiska, odnosno nošenje prenosivog uređaja koji je registrovao vrednosti krvnog pritiska na svakih 15 minuta u toku 24 h. Merenje je vršeno pre početka studije i posle 4 nedelje redovne konzumacije Soka A. Na ovaj način praćene su prosečne vrednosti pritiska u toku 24 h, odnosno u toku dana (u budnom stanju) i u toku noći (u stanju sna), kao i njihove varijacije. Svakodnevna konzumacija 200 mL soka A rezultovala je statistički značajnim smanjenjem prosečnog krvnog pritiska u toku 24h, i to sistolnog za 7,3 mmHg, a dijastolnog za 4,0 mmHg. Ovakav efekat zabeležen je i za prosečne vrednosti pritiska u toku dana, a smanjenja sistolnog, odnosno dijastolnog pritiska su iznosila redom 7,8 mmHg i 4,7 mmHg ( $p < 0,05$ ). U slučaju vrednosti u toku sna, nije bilo većih promena. Statistički značajno smanjena je standardna devijacija, odnosno variranje sistolnog krvnog pritiska u toku dana, kao i pulsni pritisak u toku 24 h.

### C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Oksidativni stres, kao stanje poremećene ravnoteže između stvaranja ROS i sposobnosti antioksidanasa da ih neutrališu, ima za posledicu nastanak oksidativno oštećenih proteina, lipida i DNK. Kao posledica, dolazi do promena u ćelijskoj strukturi i funkciji, što doprinosi razvoju kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, kancera i drugih patoloških stanja. Gotovo polovina od ukupne smrtnosti usled hroničnih bolesti pripisuje se KVB, a rastući trend dovodi se, između ostalog, u vezu sa neadekvatnom ishranom, nedovoljnom fizičkom aktivnošću i pušenjem. Način ishrane se smatra najznačajnijom promenljivom determinantom hroničnih bolesti, te se stoga adekvatna dijeta ističe kao važan faktor u prevenciji kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti. Uloga namirnica biljnog porekla u prevenciji kardiovaskularnih i drugih nezaraznih hroničnih bolesti pripisuje se ne samo njihovim nutritivnim sastojcima, već i biološki aktivnim sekundarnim metabolitima biljaka, kakvi su polifenoli. Polifenoli predstavljaju najznačajnije dijetarne antioksidanse s obzirom da su visoko zastupljeni u namirnicama biljnog porekla i da imaju visok antioksidativni kapacitet. Zaštitno delovanje polifenola u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja upravo se pripisuje njihovoj antioksidantnoj aktivnosti.

Prema Dotanu i sar. (9), različita patološka stanja povezana su sa različitim tipovima oksidativnog stresa, odnosno praćena su izmenjenim vrednostima različitih markera prooksidativnog/antioksidativnog balansa. Otuda i potreba da se oksidativni status procenjuje različitim metodama. Dalje ovi autori navode da su samo u najozbiljnijim patološkim stanjima svi indeksi oksidativnog stresa povišeni i u međusobnoj su korelaciji. Iako se veća efikasnost dijetarnih antioksidanasa očekuje kod ljudi sa prisutnim faktorima rizika ili već razvijenim

bolestima, njihova dugotrajna konzumacija može ispoljiti povoljne efekte na pojedine markere oksidativnog stresa i u slučaju zdravih ispitanika (10). Uzimajući u obzir navedeno, u ovoj tezi ispitan je uticaj dugotrajne konzumacije soka ploda aronije na različite markere oksidativnog stresa u serumu i eritrocitima ispitanika sa ili bez faktora rizika za nastanak KVB.

Kao posledica konzumacije Soka A u grupi zdravih ispitanika bez faktora rizika za KVB (Grupa I), zabeleženo je smanjenje nivoa TBARS, pokazatelja lipidne peroksidacije u serumu. Ovaj efekat bio je statistički značajan nakon 6 i 12 nedelja svakodnevne konzumacije Soka A u odnosu na bazalni status. Pozitivni efekti aronije i njenih proizvoda na markere oksidativnog stresa ispitanici su u malom broju dijetarnih interventnih studija kod ljudi. Rezultati tih studija potencijalno antioksidativno delovanje baziraju upravo na smanjenju nivoa TBARS. Značajna smanjenje nivoa TBARS u serumu pokazano je nakon 8 nedelja konzumacije ekstrakta aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom (11), kao i kod veslača koji su konzumirali sok od aronije pre izvođenja ergometar testa (12).

S obzirom na aditivnu prirodu oksidativnih efekata različitih molekula, koncentracija različitih oksidativnih vrsta u serumu, stvorenih endogeno ili unesenih iz spoljašnje sredine, može se određivati zbirno. Na ovaj način određuje se ukupni oksidativni status organizma, TOS. Ovde prikazani rezultati za Grupu I ispitanika, pokazuju da nije bilo promene u TOS na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalni status. Slično TOS-u koji objedinjuje činioce oksidativnog oštećenja, totalni antioksidativni status, skraćeno TAS, objedinjuje neenzimske komponente antioksidativnog sistema organizma. Rezultati u ovoj disertaciji pokazali su neočekivani pad vrednosti TAS, te je vrednost na kraju interventnog perioda bila statistički značajno niža u odnosu na bazalnu vrednost i vrednost nakon 6 nedelja konzumacije Soka A. Pojedini autori navode da antocijani, kao glavni aktivni principi aronije, mogu da ispolje prooksidativnu aktivnost u sredini sa niskom koncentracijom oksidativnih vrsta, kakva se očekuje kod zdravih ispitanika (13). Porast TAS pokazana je u *in vitro* uslovima nakon tretiranja plazme ekstraktom aronije (14). Ipak nema podataka u literaturi koji potvrđuju efekat u humanim interventnim studijama.

Prema literaturnim podacima, ukupne tiolne (-SH) grupe značajno doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu organizma i iznose čak i do 50 % od TAS-a kod zdravih ispitanika (15). Iako je konzumacija napitaka bogatih polifenolima pokazala porast nivoa -SH grupa, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji kod zdravih ispitanika Grupe I pokazali su njihov pad, koji je bio statistički značajan nakon 6 nedelja konzumacije soka od aronije. Ovakav rezultat je u skladu sa zabeleženim padom vrednosti TAS. Ipak, vrednost na kraju interventnog perioda od 12 nedelja nije se značajno razlikovala u odnosu na početnu kao i na vrednost zabeleženu posle 6 nedelja redovne konzumacije Soka A. U nedavno sprovedenoj studiji, suplementacija ekstraktom aronije u trajanju od dva meseca nije pokazala značajan uticaj na nivo tiolnih grupa (16). Takođe, ekstrakt aronije nije pokazao efekat ni u *in vitro* uslovima, u plazmi izolovanoj od zdravih ispitanika (17).

Iako su zabeleženi donekle neočekivani efekti na pojedine markere oksidativnog stresa u serumu ispitanika u Grupi I, može se reći da je ustanovljena fina modulacija pojedinih markera prooksidativnog/antioksidativnog statusa na nivou 12 nedelja konzumacije Soka A. Ovo upućuje



na potencijalno antioksidativno delovanje aronije i njenih proizvoda, ali i na potrebu da mehanizam tog delovanja bude dalje razjašnjen.

Što se tiče uticaja konzumacije Soka B na parametre antioksidativne zaštite, za razliku od Grupe I, zabeležen je statistički značajan porast u vrednosti TAS. U studiji koja je evaluirala antioksidativni status preko 3 hiljade ispitanika, pokazana je značajna korelacija između smanjenog ukupnog antioksidativnog kapaciteta i abdominalne gojaznosti i gojaznosti uopšte (18). Dodatno, ova asocijacija bila je nezavisna od godina, pušenja, fizičke aktivnosti i različitih metaboličkih varijabli. Na osnovu toga, autori su predložili promenu načina života i povećan unos antioksidanasa kao potencijalni pristup prevenciji stanja povezanih sa gojaznošću, kao što su metabolički sindrom i dijabetes tip 2, ateroskleroza i druge KVB (18). Inicijacija i propagacija razvoja kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti kod gojaznih osoba uzrokovana je izraženom inflamacijom, povišenim vrednostima lipida i šećera u krvi i smanjenom osetljivošću na insulin. Pokazano je da je ovakav efekat dramatičniji u slučaju niskog antioksidativnog kapaciteta organizma kao i niskog egzogenog unosa antioksidanasa (19). Stoga je pokazani porast TAS u Grupi II od izuzetnog značaja u prevenciji bolesti i stanja povezanih sa gojaznošću. S obzirom da je utvrđena nezavisna asocijacija TAS-a kako sa ITM tako i obimom struka (18), kao indikatorom centralne gojaznosti, zabeleženi porast TAS mogao bi se dovesti u vezu sa statistički značajnim smanjenjem telesne težine, odnosno ITM i obima struka u Grupi II. Podaci o eventualnom delovanju aronije i njenih proizvoda na regulaciju telesne mase kod ljudi su ograničeni. Ipak, pojedini autori navode da bi konzumacija namirnica bogatih polifenolima mogla biti od značaja u postizanju idealne telesne mase. Oni ističu povoljno delovanje polifenola i antocijana na insulinski odgovor, adipogenezu, ekspresiju gena specifičnih za adipocite i inflamatorne signalne puteve (20).

Kod Grupe III, koju su činili ispitanici sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1, nije uočen statistički značajan uticaj konzumacije Soka A na markere oksidativnog stresa u serumu. U Grupi III uočen je najizraženiji uticaj konzumacije soka ploda aronije na antioksidativnu aktivnost enzima eritrocita. Tako je na kraju interventnog perioda u trajanju od 4 nedelje zabeležen statistički značajan porast u aktivnosti sva tri ispitivana enzima, odnosno SOD, GPx i CAT, dok je u Grupi II statistički značajno porasla samo aktivnost GPx. U Grupi I zabeležen je porast aktivnosti GPx koji je bio statistički značajan nakon 12 nedelja konzumacije Soka A u odnosu na bazalni status, kao i aktivnosti SOD koja je bila statistički značajno veća u 12-oj nedelji u odnosu na bazalnu, ali i aktivnost nakon 6 nedelja konzumacije Soka A. Ovi rezultati bili su u skladu sa literaturnim podacima. Broncel i saradnici (11) pokazali su porast aktivnosti SOD i GPx posle 2 meseca suplementacije ekstraktom aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom. Sa druge strane, aktivnost katalaze je u ovoj grupi ispitanika statistički značajno opala. Porast aktivnosti GPx pokazan je i kod ispitanika sa hiperholesterolemijom koji su konzumirali ekstrakt izolovanih antocijana aronije u trajanju od mesec dana (21).

U cilju daljeg ispitivanja antioksidativnog delovanja soka od aronije i boljeg razumevanja istog, analizirana je povezanost između efekata na aktivnost antioksidativnih enzima eritrocita i profil masnih kiselina u njihovim membranama. Lipidi, odnosno masne kiseline sa većim brojem

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

U Grupi I, nakon 12 nedelje redovne konzumacije Soka A zabeležen je statistički značajan porast u relativnom sadržaju ukupnih PUFA, što je bilo praćeno povećanjem indeksa nezasićenosti. Ovakav rezultat svedoči o zaštitnom delovanju aronije i njenih proizvoda na oksidativno oštećenje ćelijske membrane, odnosno membranskih lipida. Imajući u vidu ranije objavljene negativne asocijacije između sadržaja PUFA u membrani eritrocita i rizika za hipertenziju, pokazani efekat upućuje i na potencijalno kardioprotektivno delovanje aronije (41). Porast je uočen i u slučaju n-3 PUFA, pri čemu je statistički značajna razlika postignuta kako nakon 12, tako i nakon 6 nedelja konzumacije Soka A u odnosu na bazalni status. Ovaj efekat je od posebnog interesa sa aspekta delovanje na kardiovaskularno zdravlje, s obzirom na pokazanu negativnu korelaciju između sadržaja n-3 masnih kiselina u membranama eritrocita i rizika za nastanak KVB (22).

U Grupi II, odnosno kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću nakon 4 nedelje konzumacije Soka B zabeležen je porast u sadržaju PUFA. Iako promena nije dostigla statističku značajnost u slučaju ukupnih PUFA, sadržaj n-3 PUFA i DHA značajno su bili viši na kraju interventnog perioda u odnosu na bazalne vrednosti. Posledično, uočen je porast u indeksu nezasićenosti koji je bio na granici statističke značajnosti, kao i pad u n-6/n-3 odnosu. Dobijeni rezultati od značaja su ne samo zato što potvrđuju antioksidativno delovanje Soka B koje je pokazano i kroz uticaj na PAB, TAS i GPx, već svedoče i o potencijalno kardioprotektivnom delovanju njegove dugotrajne konzumacije kod ispitanika sa abdominalnom gojaznošću. U fosfolipidima membrane eritrocita gojaznih žena pokazan je značajno niži sadržaj n-3 PUFA i indeks nezasićenosti, kao i značajno viši odnos n-6/n-3 PUFA u odnosu na žene sa normalnim ITM (23). Slične rezultate su dobili Cordero i sar. (24) koji su pratili status masnih kiselina u membranama eritrocita i markere inflamacije kod adolescenata sa normalnom i prekomernom telesnom masom.

Slično efektima konzumacije soka od aronije u Grupama I i II, i u Grupi III ispitanika zabeležen je porast sadržaja nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima membrana eritrocita. Iako vrednost ukupnih PUFA nije bila statistički značajno viša na kraju interventnog perioda u odnosu na početnu vrednost, ovaj rezultat je od značaja jer upućuje na smanjenje oksidativnog oštećenja membranskih lipida. Pokazano je da je patogeneza arterijske hipertenzije povezana sa modifikovanim profilom masnih kiselina u membranskom lipidnom matriksu. Smatra se da upravo ova modifikacija, pre svega smanjen sadržaj PUFA, deluje stimulatивно na sintezu proinflamatornih eikozanoida i čini mišićne ćelije u arterijskom zidu osetljivijim na uticaj

vazokonstriktora. Zajedno sa povećanom membranskom viskoznošću, ovo doprinosi nastanku hipertenzije. Pored pokazane inverzne asocijacije između sadržaja PUFA u membranama i rizika za nastanak hipertenzije, masnokiselinski profil membrana od značaja je u određivanju ukupnog kardiovaskularnog rizika. Studija koja je evaluirala sadržaj n-3 masnih kiselina u membranama eritrocita kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom, anginom pektoris ili infarktom miokarda, ustanovila je negativnu asocijaciju između sadržaja EPA i DHA i rizika za ove kardiovaskularne događaje (25).

Rezultati ispitivanja uticaja svakodnevne konzumacije 200 mL Soka A na vrednosti krvnog pritiska u Grupi III upućuju na potencijalno hipotenzivno delovanje aronije. U skladu sa rezultatima dobijenim u Grupi III, bilo je zabeleženo smanjenje krvnog pritiska i u Grupi II koje je bilo na granici statističke značajnosti za vrednost sistolnog pritiska. Povoljno delovanje proizvoda od aronije na krvni pritisak pokazano je i u drugim humanim interventnim studijama. Statistički značajno smanjenje krvnog pritiska, kako sistolnog tako i dijastolnog, zabeleženo je kod ispitanika sa metaboličkim sindromom nakon redovne konzumacije polifenolima bogatog ekstrakta aronije u trajanju od 2 meseca (11). Slično je pokazano i kod osoba sa blagom hiperholesterolemijom kod kojih je 6 nedelja duga konzumacija soka od aronije rezultovala smanjenjem krvnog pritiska, koje je bilo statistički značajno za DBP (26).

Imajući u vidu utvrđenu asocijaciju između oksidativnog stresa i patogeneze hroničnih bolesti, u cilju smanjenja učestalosti njihovog nastanka i kardiovaskularnog rizika, predloženo je uključivanje dijetarnih antioksidanasa u svakodnevnu ishranu (27). Među komponentama prisutnim u biljnoj hrani, kao najpotentniji antioksidansi izdvajaju se polifenoli, s obzirom na njihovu široku zastupljenost, visok dijetarni unos i izražen antioksidativni kapacitet. Smanjenje nivoa oksidativnog stresa i inflamatornih procesa nakon suplementacije polifenolima bogatim proizvodima zabeleženi su kod ispitanika sa različitim faktorima rizika za KVB, kao što su pacijenti na dijalizi, oboleli od dijabetesa i osobe sa metaboličkim sindromom (28). Od značaja je i činjenica da su protektivni efekti dijetarnih antioksidanasa ustanovljeni i kod zdravih dobrovoljaca, kako mladih, tako i starijih, te je sugerisano na njihovu potencijalnu primenu u primarnoj prevenciji kardiovaskularnih i drugih bolesti (29).

#### **D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju najznačajniji uzrok obolevanja i umiranja u svetu. Prema najnovijim podacima Svetske zdravstvene organizacije 47% ukupnih smrtnih slučajeva u Evropi posledica je KVB. Veliki broj faktora rizika za nastanak KVB (hiperlipidemija, hiperglikemija, hipertenzija, gojaznost) povezan je sa ishranom. Rezultati brojnih epidemioloških studija pokazali su povezanost ishrane bogate voćem, povrćem i integralnim žitaricama sa smanjenjem rizika za nastanak KVB (30). Povoljno delovanje ovih namirnica u prevenciji KVB pripisuje se delom nutritivnim sastojcima (vitaminima, mineralima, dijetnim vlaknima), ali pre svega nenutritivnim biološki aktivnim sastojcima-fitohekimikalijama. Dalja istraživanja delovanja fitohekimikalija imaju za cilj potvrdu aktivnosti i naučnu zasnovanost preporuka za uključivanja

namirnica koje ih sadrže u sastav optimalne dijeta sa ciljem očuvanja KV zdravlja i primarne, sekundarne i tercijarne prevencije KVB.

Oksidativni stres je stanje poremećaja ravnoteže između stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i njihovog uklanjanja delovanjem antioksidanasa, što rezultuje oksidativnim oštećenjem proteina, lipida, DNK i ćelijskih komponenti. Faktori rizika za nastanak KVB i drugih hroničnih bolesti često su praćena promenama u stanju oksidativnog stresa. Oksidativni status osoba sa hipertenzijom karakteriše povećanje nivoa markera lipidne peroksidacije i smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima, pri čemu normalizacija vrednosti krvnog pritiska dovodi i do normalizacije vrednosti navedenih parametra oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Takođe pokazano je da je u stanju hipertenzije smanjena bioraspoloživost azot-monoksida, važnog vazodilatatora, koji se degradira u prisustvu slobodnih radikala (31). Stanje sistemskog oksidativnog stresa prisutno je i kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, odnosno insulinskom rezistencijom. Ključnu ulogu u nastanku insulinske rezistencije kod metaboličkog sindroma ima centralna gojaznost koju karakteriše poremećen oksidativni status u „akumuliranoj“ masti koji se manifestuje porastom ekspresije NADP oksidaze, a smanjenjem ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima (32). Pokazano je da je povezanost centralne gojaznosti i smanjenog antioksidativnog kapaciteta plazme nezavisna od starosti, pušenja, krvnog pritiska, nivoa šećera i lipida, kao i da povećanje nivoa oxLDL i biomarkera lipidne peroksidacije, prisutno kod centralne gojaznosti, ne zavisi od indeksa telesne mase (8). Gojaznost kao faktor rizika za nastanak KVB u pogledu povezanosti sa oksidativnim stresom, ima veći značaj kod žena u odnosu na muškarce. U studiji koja je uključivala više od tri hiljade ispitanika pokazano je da je kod gojaznih žena i žena sa povećanom telesnom masom aktivnost antioksidativnih enzima plazme 10 % niža od aktivnosti u kontrolnoj grupi žena sa normalnom telesnom masom dok je kod muškaraca aktivnost u ispitivanoj grupi niža za 6 % u odnosu na kontrolnu grupu (33).

Lipidna peroksidacija rezultat je kompleksnih lančanih reakcija koje rezultuju formiranjem različitih oksidovanih proizvoda, tj. peroksi-radikala masnih kiselina i odgovarajućih hidroperoksida. Nastali peroksi-radikali su nestabilni molekuli čijom daljom konverzijom nastaju stabilniji proizvodi, kao što je malondialdehid i srodni molekuli, koji istovremeno predstavljaju i markere lipidne peroksidacije. S obzirom da predstavlja mesto prvog kontakta ekstraćelijskih činioca i same ćelije, ćelijska membrana je ćelijska struktura koja je primarno izložena oštećenju delovanjem prooksidanasa prisutnih u plazmi, nastalih kao rezultat poremećaja prooksidativno-antioksidativne ravnoteže. Osnovno mesto delovanja slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta kiseonika su molekuli polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima ćelijskih membrana. Posebno osetljiva na delovanje prooksidanasa je DHA sa 6 dvostrukih veza, koje predstavljaju ciljno mesto interakcije. Istovremenim praćenjem nivoa proizvoda lipidne peroksidacije (MDA) i nivoa polinezasićenih masnih kiselina u membrani ćelija stiče se bolji uvid u stepen i mehanizme lipidne peroksidacije kao posledice oksidativnog stresa, a istovremeno i mehanizme delovanja biološki aktivnih jedinjenja koje je usmereno na prevenciju lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa uopšte.

Polifenoli predstavljaju najbrojniju i najzastupljeniju grupu biološki aktivnih, sekundarnih metabolita biljaka. Po zastupljenosti u ljudskoj ishrani predstavljaju najznačajniju grupu

nenutritivnih sastojaka namirnica i najznačajnije dijetarne antioksidanse. Antioksidativno delovanje polifenola zasnovano je na njihovoj zajedničkoj polifenolnoj strukturi i sposobnosti hvatanja slobodnih radikala formiranjem stabilnijeg fenoksil-radikala. Takođe, polifenoli poseduju i indirektni efekat kroz regulaciju statusa antioksidativnih enzima (34). Povoljno delovanje na stanje unutrašnje zaštite ostvaruje se prvenstveno modulacijom signalnih puteva i ekspresije gena u ćeliji.

Polifenoli, tačnije ekstrakti biljaka čiji su oni glavni biološki aktivni sastojci, mogu delovati zaštitno na biološke membrane, kao glavno mesto napada slobodnih radikala. Pokazano je da ovaj efekat može biti indirektan - hvatanjem radikalskih vrsta pri inkubaciji u medijumu, ali i direktan - ugradnjom polifenola u samu membranu (35). Naime, polifenoli se inkorporiraju u hidrofilni deo spoljašnjeg lipidnog sloja ćelijske membrane menjajući time pakovanje polarnih glava i sam oblik ćelije. Lokalizacija polifenola u ovom delu membrane stvara zaštitni sloj protiv različitih supstanci, pre svega reaktivnih kiseoničnih vrsta, u čemu se ogleda antioksidativna uloga ovih jedinjenja (36).

Plod aronije (*Aronia melanocarpa*) i proizvodi dobijeni njegovom preradom predstavljaju jedan od najznačajnijih dijetarnih izvora polifenola. Najzastupljenije klase polifenola su procijanidini i antocijani, prisutni kao cijanidin glikozidi, i sadržaj antocijana u svežem plodu iznosi 5000-10000 mg/kg. Rezultati velikog broja interventnih studija pokazali su povoljno delovanje aronije u prevenciji kardiovaskularnih bolesti smanjenjem nivoa ukupnog holesterola, LDL-a, ox-LDL-a, triglicerida, glukoze, HbA1c, vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska, kao i indeksa telesne mase (11, 37). Mali je broj studija u kojima se ispitivao uticaj aronije na oksidativni status kod ljudi. Pokazano je da konzumacija standardizovanog ekstrakta aronije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom dovodi do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze (37). Sikora i saradnici ispitivali su uticaj dugotrajne konzumacije ekstrakta aronije na funkciju trombocita kod pacijenata sa metaboličkim sindromom i pokazali povoljno delovanje (38).

## E. CITIRANA RELEVANTNA LITERATURA

1. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA: Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991;31:32-35.
2. Erel O: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-1111.
3. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G: A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem* 2007;40:248-54.
4. Erel O: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277-85.
5. Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.

6. Richter RJ, Furlong CE: Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999;9:745-753.
7. Rose HG, Oklander M: Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res* 1965;6:481-431.
8. Christopherson SW, Glass RL: Preparation of Milk Fat Methyl Esters by Alcoholysis in an Essentially Nonalcoholic Solution. *J Dairy Sci* 1969;52:1289-1290.
9. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2004;43(3):200-27.
10. Zamora-Ros R, Serafini M, Estruch R, Lamuela-Raventós RM, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Fiol M, Lapetra J, Arós F, Covas MI, Andres-Lacueva C; PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(12):1167-74
11. Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J. Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit.* 2010;16(1):CR28-34.
12. Pilaczynska-Szczesniak L, Skarpanska-Steinborn A, Deskur E, Basta P, Horoszkiewicz-Hassan M. The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2005;15(1):48-58.
13. Faff J, Frankiewicz-Józko A. Effect of anthocyanins from Aronia melanocarpa on the exercise-induced oxidative stress in rat tissues. *Biol Sport.* 2003;20(1):15-23.
14. Malinowska J, Babicz K, Olas B, Stochmal A, Oleszek W. Aronia melanocarpa extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma. *Nutrition.* 2012;28(7-8):793-8.
15. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-85.
16. Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M. In vivo influence of extract from Aronia melanocarpa on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monit.* 2012;18(9):CR569-74.
17. Kędzierska M, Głowacki R, Czernek U, Szydłowska-Pazera K, Potemski P, Piekarski J, Jeziorski A, Olas B. Changes in plasma thiol levels induced by different phases of treatment in breast cancer; the role of commercial extract from black chokeberry. *Mol Cell Biochem.* 2013;372(1-2):47-55.
18. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, Economou M, Stefanadis C. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(8):590-7.
19. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9(6):813-39.
20. Guo H, Ling W, Wang Q, Liu C, Hu Y, Xia M. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(6):1393-401.
21. Kowalczyk E, Fijałkowski P, Kura M, Krzesiński P, Błaszczuk J, Kowalski J, Smigielski J, Rutkowski M, Kopff M. The influence of anthocyanins from Aronia melanocarpa on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia. *Pol Merkur Lekarski.* 2005;19(113):651-3.

22. Piñeiro-Corrales G, Lago Rivero N, Culebras-Fernández J.M. Role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease prevention. *Nutrición hospitalaria*.2013; 28:1-5.
23. Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res*. 2004;45(10):1846-51.
24. Aguilar Cordero MJ, González Jiménez E, Sánchez Perona J, Padilla López CA, Álvarez Ferre J, Ocete Hita E, Rizo Baeza M, Guisado Barrilao R, García Rivas F. Obesity and its relation with markers of inflammation and erythrocyte fatty acids in a group of overweight adolescents. *Nutr Hosp*. 2012;27(1):161-4.
25. Block RC, Harris WS, Reid KJ, Sands SA, Spertus JA. EPA and DHA in blood cell membranes from acute coronary syndrome patients and controls. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):821-8.
26. Skoczynska A, Jedrychowska I, Poreba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, Andrzejak R. Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacological Reports*. 2007;59:177–182.
27. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2008;88(1):38-50.
28. Bernabé J, Mulero J, Cerdá B, García-ViguerabC, Moreno DA, Parra S, Avilés F, Gil-Izquierdo A, Abellán J, Zafrilla P. Effects of citrus based juice on biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome patients. *J Funct Foods*. 2013;5(3):1031-8.
29. Abete I, Perez-Cornago A, Navas-Carretero S, Bondia-Pons I, Zulet MA, Martinez JA. A regular lycopene enriched tomato sauce consumption influences antioxidant status of healthy young-subjects: A crossover study. *J Funct Foods*. 2013;5(1): 28-35.
30. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2008;88:38-50.
31. Ceriello A: Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 2008;31(suppl):S181-184
32. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro T, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-1761.
33. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, Economou M, Stefanadis C: The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:590 – 597.
34. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:287-306.
35. Raudoniūtė I, Rovira J, Venskutonis P.R, Damašius J, Rivero-Pérez M.D, González-SanJosé M.L: Antioxidant properties of garden strawberry leaf extract and its effect on fish oil oxidation. *Food Sci Technol* 2011;46:935-943.
36. Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmiański J, Sarapuk J, Kleszczyńska H: Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophys* 2011;6:58-67.
37. 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.

38. Sikora J, Broncel M, Markowicz M, Chałubiński 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;51:549-556.

## **F. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **M21 – Rad u vrhunskom međunarodnom naučnom časopisu**

1. **Kardum N**, Takić M, Šavikin K, Zec M, Zdunić G, Spasić S, Konić-Ristić A. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J Funct Foods*. 2014;9:89-97. (IF 4,480; Food Science & Technology 5/122)
2. **Kardum N**, Petrović-Oggiano G, Takic M, Glibetić N, Zec M, Debeljak-Martacic J, Konić-Ristić A. Effects of Glucomannan-Enriched, Aronia Juice-Based Supplement on Cellular Antioxidant Enzymes and Membrane Lipid Status in Subjects with Abdominal Obesity. *Sci World J*. 2014;869250, doi:10.1155/2014/869250 (IF 1,219; Multidisciplinary Sciences 16/55)

### **M22 – Rad u vodećem međunarodnom naučnom časopisu**

3. **Kardum N**, Konić Ristić A, Savikin K, Spasić S, Stefanović A, Ivanišević J, Miljković M. Effects of Polyphenol-Rich Chokeberry Juice on Antioxidant/Pro-Oxidant Status in Healthy Subjects. *J Med Food*. 2014;17(8):869-874. (IF 1,699; Food Science & Technology 48/122)

## **F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE**

Na osnovu svega što je izloženo u doktorskoj disertaciji smatramo da ovaj rad predstavlja značajan naučni doprinos u proučavanju efekata konzumacije soka ploda aronije, bogatog polifenolima, na pokazatelje oksidativnog statusa i antioksidativne zaštite u serumu i eritrocitima zdravih osoba sa i bez faktora rizika za nastanak KVB, na profil masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita, na vrednosti biohemijjskih parametara koji su tradicionalni faktori rizika za nastanak KVB, kao i na vrednosti ambulatorno merenog arterijskog krvnog pritiska kod ispitanika sa visokim-normalnim krvnim pritiskom, odnosno hipertenzijom stadijuma 1 . Ovi podaci će moći da se koriste u preporukama za uključivanja namirnica koje sadrže nenutritivne biološki aktivne sastojke -fitohemikalije u sastav optimalne dijeta sa ciljem očuvanja kardiovaskularnih zdravlja i primarne, sekundarne i terciarne prevencije kardiovaskularnih bolesti.

Komisija smatra da je kandidat uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za



javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom **“Uticaj soka ploda aronije na markere oksidativnog statusa i profil masnih kiselina kod zdravih osoba sa i bez faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti”**, kandidata mr farm. Nevene Kardum.

Članovi komisije:

1. \_\_\_\_\_

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

2. \_\_\_\_\_

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

3. \_\_\_\_\_

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

4. \_\_\_\_\_

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

5. \_\_\_\_\_

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