

# Učinci bijelog vina na prirast tjelesne mase štakora te na in vitro antioksidacijsku i vazodilatacijsku aktivnost

---

**Milat, Ana Marija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:450541>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**ANA MARIJA MILAT**

**UČINCI BIJELOG VINA NA PRIRAST TJELESNE MASE  
ŠTAKORA TE NA *IN VITRO* ANTIOKSIDACIJSKU I  
VAZODILATACIJSKU AKTIVNOST**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**ANA MARIJA MILAT**

**UČINCI BIJELOG VINA NA PRIRAST TJELESNE MASE  
ŠTAKORA TE NA *IN VITRO* ANTIOKSIDACIJSKU I  
VAZODILATACIJSKU AKTIVNOST**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2019.**

Doktorska disertacija sadrži rezultate znanstvenih istraživanja provedenih na  
Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta  
u Splitu.

VODITELJ RADA: izv. prof. dr. sc. Ivana Mudnić

Doktorska disertacija je izrađena u sklopu HRZZ 8652 projekta, „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“, voditelja prof. dr. sc. Mladena Bobana.

*Na početku želim zahvaliti za ono što je bilo prvo, projekt prof. Bobana, ali i njegovo vodstvo, posvećenost, ustrajnost, mudrost, prilike i ideje koje prethode i satkane su u svakoj napisanoj rečenici.*

*Za pregledavanje napisanih rečenica, sugestije i veliko bodrenje hvala prof. Grkoviću i Shelly Pranić, kojima to nije bilo teško ni u 10 navečer.*

*Hvala svima koji su bilo -kako, -kada, i –koliko bili uključeni u eksperimentalni rad ove disertacije: Ani Šešelji-Perišin, Antoneli Slišković, Ivi Jerčić, Ivani Generalić-Mekinić, Danijeli Skrozi, Ivici Ljubenkovu, Miji Grgi-Škaro, Diani Jurić, Nikoli Ključeviću, Danici Boban, Benjaminu Benzoni, Angeli Mastelić, Dinki Jurić, Tei Šerić i Ireni Budić-Leto u Hrvatskoj, prof. Jungbaueru u Austriji, a Zuriñe Rasines-Perei, Michaelu Jourdeu i prof. Teissedreu u Francuskoj.*

*Posebno hvala onima iz ove skupine koji su sa mnom dijelili subote i nedjelje u Nastambi za životinje, tzv. "Ekipi iz štale". Bez njih u ovoj disertaciji ne bi bilo nijednog broja.*

*Zasebno dodatno hvala mojim uredskim kolegicama, i prijateljicama, Diani i Miji, prvim recenzenticama svega napravljenog.*

*Hvala i Službi za poslijediplomske studije, posebno Juliji Pusić, koja sve sluša, rješava i upućuje, i voditeljima i kolegama s TRIBE-a. Zbog njih je bilo lakše studirati studij nakon studija.*

*Što su i taj studij opet odstudirali sa mnom, hvala mojoj obitelji i prijateljima.*

***Na kraju, najveće hvala mojoj divnoj mentorici, koja je podijelila sa mnom apsolutno sve, laboratorij, znanje, iskustvo, vrijeme, knjige, članke, strpljenje, prijateljsku i majčinsku ljubav... kad je trebalo i svoj ručak, i svoj laptop.***

*Hvala i Vinku, Jošku, Špiru i Pašku što su je podijelili sa mnom van svakog radnog vremena.*

*Disertaciju posvećujem  
onome koji je zaključio da će sad i on dobiti doktorat iz  
temeljnih medicinskih znanosti, kad već postajemo jedno...*

## Sadržaj

1. Popis oznaka i kratica.....	1
2. Uvod.....	5
2.1. Prirast tjelesne mase.....	8
2.2. Oksidacija vina.....	11
2.3. Antioksidacijska aktivnost.....	15
2.4. Vazodilatacijska aktivnost.....	18
3. Ciljevi i hipoteze.....	21
4. Metode i materijal.....	23
4.1. Pokusna vina.....	24
4.2. Prirast tjelesne mase.....	27
4.3. Biokemijska analiza pokusnih vina.....	29
4.3.1. Ukupni fenoli, flavonoidi, neflavonoidi.....	29
4.3.2. Flavanoli i njihovi dimeri.....	30
4.3.3. Fenolne kiseline.....	31
4.3.4. Produkti fluoroglucinolize.....	32
4.3.5. Određivanje promjene boje uzoraka vina.....	35
4.4. Antioksidacijska aktivnost.....	36
4.5. Vazodilatacijska aktivnost.....	39
4.6. Kemikalije.....	43
4.7. Statistička analiza.....	43
5. Rezultati.....	44
5.1. Prirast tjelesne mase.....	45
5.3. Biokemijska analiza vina.....	50
5.3. Antioksidacijska aktivnost.....	54
5.4. Vazodilatacijska aktivnost.....	56



6. Rasprava .....	58
6.1. Učinci bijelog vina na prirast tjelesne mase štakora .....	59
6.2. Učinci bijelog vina na <i>in vitro</i> antioksidacijsku i vazodilatacijsku aktivnost .....	62
7. Zaključci .....	67
8. Znanstveni doprinos .....	69
9. Kratki sažetak .....	71
10. Summary .....	73
11. Popis literature .....	75
12. Životopis .....	88

## **1. Popis oznaka i kratica**

$\Delta A_{420}$	promjena apsorbancije izmjerena na 420 nm
AAPH	2,2-azobis(2-propanamid)-dihidroklorid
ABTS	2,2'-azinodi(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat
Ach	acetilkolin
AMPK	AMP-proteinska kinaza, engl. <i>5' adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
AngII	angiotenzin II
ANOVA	analiza varijance
AUC	površina ispod krivulje, engl. <i>area under curve</i>
BMI	indeks tjelesne mase, engl. <i>body mass index</i>
BR	Briggs-Rauscher metoda
C	katehin, engl. <i>catechin</i>
CAE	ekvivalent kafeinske kiseline, engl. <i>caffeic acid equivalent</i>
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
CBG	citosolna $\beta$ -glukozidaza
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
CI	raspon pouzdanosti, engl. <i>confidence interval</i>
COMT	katehol-O-metiltransferaza
COX	ciklooksigenaza, engl. <i>cyclooxygenase</i>
C-P	katehin-fluoroglucinol, engl. <i>catechin phloroglucinol</i>
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazin
EC	epikatehin, engl. <i>epicatechin</i>
EC <sub>50</sub>	koncentracija koja izaziva 50% maksimalnog vazodilatacijskog učinka, engl. <i>half maximal effective concentration</i>
ECG	epikatehin-galat, engl. <i>epicatechin gallate</i>
ECG-P	epikatehin-galat-fluoroglucinol, engl. <i>epicatechin gallate phloroglucinol</i>
EC-P	epikatehin-fluoroglucinol, engl. <i>epicatechin phloroglucinol</i>
EDHF	endotelni čimbenik hiperpolarizacije, engl. <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina, engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGC	epigalokatehin, engl. <i>epigallocatechin</i>
EGC-P	epigalokatehin-fluoroglucinol, engl. <i>epigallocatechin phloroglucinol</i>
E <sub>max</sub>	maksimalni vazodilatacijski učinak

eNOS	endotelna NO sintaza
ESI-Q-TOF	engl. <i>electrospray ionisation quadrupole time-of-flight</i>
ET	mehanizam prijenosa elektrona, engl. <i>electron transfer</i>
ET-1	endotelin 1
FRAP	antioksidacijski kapacitet redukcije željeza, engl. <i>ferric reducing antioxidant power</i>
%G	udio estera s galnom kiselinom, -galata, engl. <i>percentage of galloylation</i>
GAE	ekvivalent galne kiseline, engl. <i>gallic acid equivalent</i>
GRP	bezbojni produkt reakcije s glutationom u vinu, engl. <i>grape reaction product</i>
GSH	glutation
HAT	mehanizam prijenosa atoma vodika, engl. <i>hydrogen-atom transfer</i>
HDL	lipoproteini velike gustoće, engl. <i>high-density lipoproteins</i>
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IK <sub>Ca</sub>	engl. <i>intermediate conductance calcium-activated potassium channels</i>
K	kontrolne životinje, koje piju samo vodu
LDL	lipoproteini male gustoće, engl. <i>low-density lipoproteins</i>
L-NAME	N- $\omega$ -nitro-L-arginin metil ester hidroklorida
mDP	srednji stupanj polimerizacije proantocijanidina, engl. <i>mean degree of polymerization</i>
MEOS	sustav mikrosomskih enzima za oksidaciju etanola (engl. <i>microsomal ethanol oxidizing system</i> )
mj	mjesec (starosti životinja)
MS	masena spektrometrija
MV	(intaktno) macerirano bijelo vino
MV <sub>s</sub>	macerirano bijelo vino sa sumporom
NA	noradrenalin
NO	dušikov oksid
n.p.	nije primjenjivo
OIV	Internacionalna organizacija za vinarstvo i vinogradarstvo, engl. <i>International Organization of Vine and Wine</i>

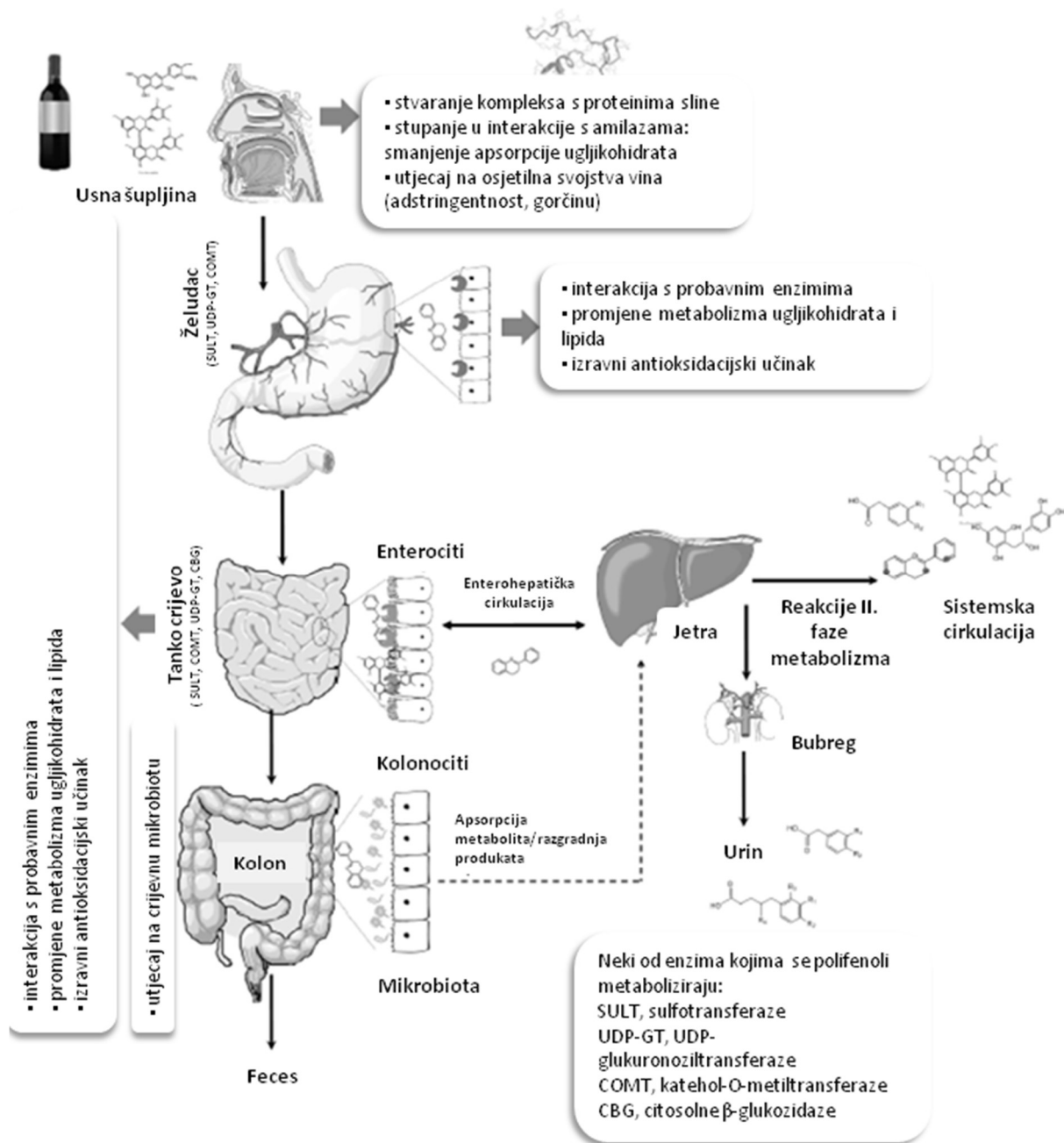
24h- OksMV	oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24 sata
48h- OksMV	oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 48 sata
ORAC	kapacitet apsorpcije kisikovih radikala engl. <i>oxygen radical absorbance capacity</i>
%P	udio prodelfinidina, -galo spojeva, engl. <i>percentage of prodelfinidins</i>
PDA	fotodiodni detektor, engl. <i>photodiode array</i>
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub> , prostaciklin
POD	peroksidaza
PPO	polifenol oksidaza
PTM	prirast tjelesne mase
ROS	kisikove reaktivne vrste, engl. <i>reactive oxygen species</i>
SEM	standardna pogreška sredine, engl. <i>standard error of mean</i>
SD	standardna devijacija
SK <sub>Ca</sub>	engl. <i>small conductance calcium-activated potassium channels</i>
SULT	sulfotransferaze
TE	ekvivalent troloksa, engl. <i>trolox equivalent</i>
Th	jedinica za m/z u masenoj spektrometriji, engl. <i>thomson</i>
TPTZ	2,4,6-tri-(2-piridil)-2-triazin
TXA <sub>2</sub>	tromboksan A <sub>2</sub> , engl. <i>tromboxane A<sub>2</sub></i>
UDP-GT	UDP-glukuronoziltransferaze, engl. <i>uridine diphosphate glucuronosyltransferase</i>
UE	ukupni unos energije
UPLC	tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti, engl. <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>
UV-VIS	ultraljubičasti-vidljivi spektar, engl. <i>ultraviolet-visible spectrum</i>
V	standardno bijelo vino
VLDL	lipoproteini vrlo male gustoće, engl. <i>very-low-density lipoprotein</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, engl. <i>World Health Organization</i>

## **2. Uvod**

Epidemiološki rezultati jasno pokazuju da umjerena konzumacija vina ima povoljne učinke na ljudsko zdravlje, posebice na kardiovaskularni sustav [1-3]. Vino usporava razvoj aterosklerotskih pojava putem antioksidacijskog, protuupalnog, antikoagulantnog učinka te pozitivnim djelovanjem na lipidni status [4-9]. Osim alkohola, polifenoli u vinu smatraju se najodgovornijima za ove učinke, iako mehanizam njihovog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen [10, 11]. Polifenoli su vjerojatno najistraživanije molekule nutritivnog podrijetla s biološkom aktivnosti. Neka znanstvena istraživanja ukazuju da mogu inhibirati proliferaciju tumorskih stanica, smanjiti vaskularizaciju tumora, ostvariti neuroprotektivni učinak, stimulirati vazodilataciju i povećati izlučivanje inzulina u *in vitro* eksperimentalnim uvjetima [12-14]. Ipak, danas se zna da su polifenoli iz hrane nakon konzumacije podložni značajnim metaboličkim promjenama (Slika 1) i u formi svojih metabolita postižu vrlo male koncentracije u ljudskoj plazmi [15].

Tehnološki postupci proizvodnje značajno utječu na kvalitetu i kemijski sastav vina. Dok se većina današnjih vina proizvodi tehnologijama koje sprječavaju brzu oksidaciju nakon otvaranja boce, proizvodnja organskih vina koja ne sadrže konzervanse sve je popularnija. Među takvim su vinima i tradicionalna macerirana bijela vina kod kojih se nakon fermentacije kontakt s čvrstim dijelovima grožđa (pokožice i sjemenke) nastavlja još tjednima ili mjesecima [16]. To omogućuje dodatnu ekstrakciju fenolnih spojeva iz pokožica i sjemenki što rezultira vinima specifične zlatne boje i visokog sadržaja polifenola [16-18]. Posljedične visoke koncentracije polifenola nastaju i zbog njihove dobre topljivosti u etanolu tijekom maceracije, a nakon završene fermentacije [19]. Zajedno s drugim sastojcima, fenoli uvjetuju kvalitetu vina i bitno utječu na njegova organoleptička svojstva [20].

Male promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima vodeno-alkoholnih otopina u kojima se nalaze polifenoli, ali i okolišni čimbenici kojima je vino izloženo, mogu utjecati na kemijsku stabilnost, topljivost, sklonost taloženju i reakcijama s proteinima. Sve to potencijalno mijenja biokemijska svojstva i biološku aktivnost vina [21]. Budući da su biološki učinci bijelih vina, napose maceriranih, manje istraživani, upravo su učinci standardnog i maceriranog bijelog vina istraženi i uspoređeni u ovoj doktorskoj disertaciji. Kako bi se uklonio utjecaj prouzročen sortom i uvjetima uzgoja vinove loze, istraživana vina proizvedena su od grožđa iste sorte, iz iste berbe i istog vinograda.



**Slika 1.** Shematski prikaz metaboličkog puta polifenola nakon konzumacije vina i njihovih istraživanih bioloških učinaka u različitim organskim sustavima. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od Fernandes i sur. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention [22].



## 2.1. Prirast tjelesne mase

Dislipidemija, hipertenzija, dijabetes melitus tip 2 i metabolički sindrom važni su čimbenici kardiovaskularnog rizika. Pretilost je usko povezana sa svakim od njih. Prekomjerna tjelesna masa i nakupljanje masnog tkiva identificirani su kao glavni uzroci smrtnosti od kroničnih bolesti. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (2011) više od polovice europske populacije ima prekomjernu tjelesnu masu, a 30% je pretilo [23, 24]. Paralelno s porastom pretilosti, današnje „rekreativno“ prekomjerno pijenje alkoholnih pića uzrokuje ozbiljne zdravstvene i društvene probleme i također predstavlja jedan od vodećih uzroka prerane smrti u svijetu. Zbog svega toga u zadnjih se desetak godina intenzivnije proučava povezanost konzumacije alkoholnih pića i prirasta tjelesne mase [25-27].

Alkohol iz vina može biti značajan izvor energije u prehrani. Unatoč visokoj kalorijskoj vrijednosti od 29,7 kJ/g, i dalje ostaje dvojbeno predstavlja li umjerena konzumacija napitaka koji sadrže alkohol čimbenik rizika za porast tjelesne mase i pretilost [28]. Epidemiološke studije pokazuju kontradiktorne rezultate. Ne uzimajući u obzir vrstu konzumiranog alkoholnog pića, dio studija zaključuje da postoji pozitivna povezanost između konzumacije alkoholnih pića i visokog indeksa tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*) zajedno s ostalim rizičnim čimbenicima za razvoj pretilosti kao što su: manjak tjelesne aktivnosti, način prehrane i pušenje [29, 30]. S druge strane, prospektivna istraživanja na velikom uzorku ljudi u trajanju od 10 i više godina, pokazuju da muškarci i žene koji su pili umjerene količine alkoholnih pića imaju sporiji prirast tjelesne mase i manji rizik od pretilosti u usporedbi s ljudima koji ne konzumiraju nikakva alkoholna pića [31, 32]. Suprotno tome, neke studije sugeriraju da postoji povezanost konzumacije samo velikih količina alkoholnih pića i razvijene alkoholne ovisnosti s povećanim prirastom tjelesne mase, osobito u ranijoj životnoj dobi [33].

U 2015. godini objavljen je pregledni rad koji objedinjuje sve dosadašnje epidemiološke podatke o povezanosti konzumacije alkoholnih pića i debljanja. Ondje je zaključeno kako konzumacija alkoholnih pića predstavlja jedan od rizičnih čimbenika za razvoj pretilosti u pojedinaca, pogotovo ako ih se konzumira u velikim količinama. S druge strane, pojedinci koji redovito piju umjerene količine mogu imati ukupno zdraviji život i bilježiti manji porast tjelesne mase [34].

U većini se slučajeva suprotni epidemiološki podaci mogu objasniti unatoč poteškoćama u procjeni unosa alkoholnih pića kao i u kontroli različitih zbunjujućih čimbenika (spol

ispitanika, vrste alkoholnih pića, učestalost konzumiranja, „uzorak pijenja“ – npr. uz obrok/samo vikendom/itd., bavljenje fizičkom aktivnosti, genetski čimbenici za razvoj pretilosti i dr.). S jedne strane, alkoholna pića uz obrok mogu pridonositi kalorijskom unosu zbog vlastitog kalorijskog sadržaja ili povećavanja apetita, kako je zabilježeno u nekim studijama [35-37]. Osim toga, s biokemijskog i metaboličkog aspekta, etanol se može promatrati kao preteča masti s obzirom da nizom metaboličkih procesa uzrokuje sintezu masnih kiselina i smanjuje njihovu  $\beta$ -oksidaciju. Na taj način uzrokuje nakupljanje triglicerida, koji se prenose lipoproteinima vrlo-niske gustoće (VLDL, engl. *very-low-density lipoproteins*), i masnog tkiva, posebno u predjelu abdomena [38].

S druge strane, etanol se bitno razlikuje od drugih izvora energije jer je jedini koji se ne može pohraniti i uvijek se metabolizira kao prvi supstrat. Induciranjem sustava mikrosomskih enzima za oksidaciju etanola (MEOS, engl. *microsomal ethanol-oxidizing system*) dolazi do njegovog metaboliziranja, ali uz stvaranje manje energije od očekivanog [39]. Osim toga, induciranje MEOS-a dovodi do pojačane termogeneze koja u zdravih ljudi s umjerenom konzumacijom alkoholnih pića iznosi oko 20%, što je više nego za bilo koji drugi energetski supstrat. Ovi podaci upućuju na zaključak da je veći dio energije dobiven iz alkohola dostupan i potencijalno iskoristiv za sintezu ATP-a [40-42].

Kad se u obzir uzmu vrste alkoholnog pića i načini konzumacije, neke studije impliciraju da bi crno vino moglo biti bolje u prevenciji prirasta tjelesne mase u odnosu na ostale vrste pića što se posebno odnosi na pivo i sokove. U literaturi je već utvrđena pozitivna povezanost konzumacije piva i sokova s debljanjem [43, 44]. S druge strane, studija u kojoj se četiri tjedna konzumiralo crno vino iznosi rezultate o povećanoj koncentraciji adiponektina u krvi, proteina koji se uz leptin povezuje s promjenom tjelesne mase i negativno korelira s porastom BMI-a [45].

U navedenoj problematici provedeno je i nekoliko istraživanja sa životinjama u kontroliranim eksperimentalnim uvjetima koja zaključuju da unos etanola nije uzrok povećanog prirasta tjelesne mase u štakora i miševa [46, 47]. Nadalje, studija na štakorskom modelu također je pokazala da umjeren konzumacija crnog vina u eksperimentalnoj skupini rezultira manjim prirastom tjelesne mase u odnosu na konzumaciju vode u kontrolnoj skupini [48]. Slično tome, u drugom istraživanju štakori koji su 8 tjedana konzumirali vodenu otopinu etanola ili crno vino imali su značajno manji prirast mase u odnosu na kontrolne životinje, unatoč sličnom ukupnom energetskom unosu [49].

Dosada su se povoljni učinci crnog vina na prirast tjelesne mase, u usporedbi s drugim alkoholnim pićima, najviše pripisivali različitim biološkim djelovanjima vinskih polifenola. Osobito u zadnje vrijeme, otkad se pretilosti pristupa kao epigenetskom poremećaju, sve je više istraživanja raznih molekula iz hrane i pića, a pogotovo flavonoida, koji bi mogli mijenjati epigenetske stanične mehanizme uključene u debljanje [50]. Govori se o ulozi flavonoida u smanjenju unosa i/ili apsorpcije hrane, promicanju iskorištenja ili sprječavanju skladištenja energije [22]. Jedna od popularnijih hipoteza je njihova uključenost u kontrolu apetita preko središnjeg živčanost sustava koji nadzire osjećaj sitosti [51]. Osim toga, novije su studije pokazale da bi polifenoli mogli potencirati AMP-om aktiviranu kinazu, AMPK (engl. *5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase*), koja nadzire transport glukoze i oksidaciju masnih kiselina. Opisanim mehanizmima djelovanja polifenoli bi mogli suprimirati glukoneogenezu u jetri, inducirati  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i pojačati prijenos glukoze u mišiće i masno tkivo, a smanjiti njezinu koncentraciju u krvi te time prevenirati razvoj inzulinske rezistencije [52, 53].

Jedan od pristupa u nadzoru tjelesne mase i liječenju pretilosti je smanjenje apsorpcije lipida. Polifenoli, stupajući u interakcije s probavnim enzimima i tu mogu ostvariti pozitivne učinke [54]. Naime, pokazano je da ekstrakt grožđa i oligomerni procijanidini mogu inhibirati aktivnost lipaza gušterače i time smanjiti apsorpciju triglicerida [55]. Djeluju izravno tako da se vezuju na kolesterol i žučne kiseline te smanjuju njihovu topljivost i apsorpciju kolesterola [56], ali i neizravno, putem glicerol-3-fosfat-dihidrogenaze smanjujući biosintezu lipida [57]. Osim navedenoga, polifenoli mogu dodatno utjecati na metabolizam ugljikohidrata inhibicijom  $\alpha$ -glikozidaze i amilaze, enzima uključenih u razgradnju prehrambenih ugljikohidrata do monomera [58].

Iako su prirast tjelesne mase i konzumacija alkoholnih pića u fokusu brojnih istraživanja, još je uvijek nedovoljno razjašnjen mehanizam kojim vino ne dovodi do povećanja tjelesne mase te su učinci različitih vrsta vina neistraženi. Gotovo sve studije koje ispituju povezanost konzumacije vina i prirasta tjelesne mase provedene su s crnim vinima zbog njihovog velikog sadržaja polifenola. Nadalje, nije jasno kompenzira li i u kojoj mjeri konzumacija vina unos energije iz hrane [34] te predstavlja li dob pokusnih životinja važan čimbenik u povezanosti konzumacije vina i prirasta tjelesne mase [32].

## 2.2. Oksidacija vina

Oksidacija je kemijski proces kojim se iz atoma ili skupine atoma uklanja elektron u reakcijama koje mogu, ali ne moraju, uključivati vezanje kisika ili gubitak vodika. Uz neke iznimke, učinci oksidacije na hranu smatraju se štetnima i uključuju gubitak prehrambene vrijednosti, razgradnju lipida ili vitamina, razvoj neugodnih mirisa i promjene kvalitete okusa. Oksidacija vina nakon izloženosti zraku povezuje se s degradacijom organoleptičkih svojstava uz nastanak nepoželjnih mirisa i tamno smeđe boje, 'smeđenje' vina [59]. Rijetko, i više u slučaju crnih vina, govorimo o namjernoj, kontroliranoj oksidaciji vina koja povoljno utječe na stabilizaciju njegove boje i smanjenje adstringentnosti [60, 61]. U proizvodnji bijelih vina, s druge strane, ulažu se posebni napori kako bi se izbjegao dodir vina s kisikom jer se njegova oksidacija gotovo isključivo povezuje s gubitkom kvalitete [62, 63].

Zbog toga se bijela vina redovito zaštićuju konzervansima, od kojih je sumporov dioksid najčešće korištena kemikalija. Osim što sprječava promjenu boje vina, sumporov dioksid ostvaruje i antimikrobne učinke. Ipak, porastom broja prijavljenih alergijskih reakcija koje se pojavljuju u ljudi osjetljivih na sumpor, i drugih štetnih učinaka (npr. zaostajanje u rastu, klinički polineuritis, atrofija koštane srži i kosti i dr. [64]) Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, engl. *World Health Organization*) i Internacionalna Organizacija za vinarstvo i vinogradarstvo (OIV, engl. *International Organization of Vine and Wine*) pokušavaju uvesti restriktivnije mjere oko uporabe sumpora [65, 66]. Proizvodnja organskih vina koja nisu zaštićena konzervansima stoga je sve popularnija, ali je u takvim vinima mogućnost razvoja oksidacije posebno izražena.

Postoji više organskih tvari u vinu koje su potencijalna meta oksidacijskih procesa, od etanola do različitih kiselina, osobito vinske kiseline [67]. Zanimljivo je da su etanol i vinska kiselina inače značajno otporni na oksidaciju, osim ako je ona združena s oksidacijom fenola [59, 68]. Vinske fenole možemo podijeliti na flavonoide i neflavonoide, flavonoide dalje na flavan-3-ole, flavonole i antocijane, a neflavonoide na fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve) i njihove estere, te stilbene. Hidroksicinamati su glavna skupina fenola u bijelom vinu, te uz flavanole predstavljaju tvari koje će se prve oksidirati i započeti proces 'smeđenja' [20].

Vinski polifenoli koji sadrže 1,2-difenolnu (orto-katehol) grupu oksidacijom mogu biti prevedeni u kinone. Na ove reakcije značajno utječe pH vina tako da su one pri višim pH vrijednostima brže. S malim povećanjem pH značajno raste koncentracija fenolatnih iona koji

reagiraju s kisikom čineći tako vina s višim pH podložnijim oksidaciji. Nastali kinoni su još jači elektrofilni od početnih fenola i stupaju u reakcije s preostalim polifenolima. Na taj način regenerira se mala količina početnih dikatehola koja je ponovno podložna oksidaciji [69]. Ukupno u reakciju stupa više molekula kisika nego što je očekivano s obzirom na početni broj molekula polifenola [62]. Osim toga, u istim reakcijama najvjerojatnije postupno dolazi do polimerizacije produkata i neki su od njih na kraju odgovorni za smeđe obojenje oksidiranog vina [69].

Ukoliko je došlo do polimerizacije flavan-3-ola govorimo o nastanku proantocijanidina, ili kondenziranih tanina. Proantocijanidine možemo podijeliti na procijanidine, koji u svojoj strukturi osim katehina i epikatehina mogu sadržavati estere s galnom kiselinom, epikatehingalate, te na prodelfinidine, koji dodatno sadrže monomere epigalokatehina. U novije vrijeme, suvremenim se metodama mogu identificirati i kvantificirati sve navedene strukture u vinu, ali i odrediti stupanj polimerizacije proantocijanidina, na kojeg bi značajno moglo utjecati vrijeme maceracije u proizvodnji vina, i oksidacija nakon otvaranja [19, 62, 70].

U početku se mislilo da kisik može izravno reagirati s fenolima u reakcijama koje su autokatalizirane (brzina im se povećava kako se nastavlja oksidacija) [62]. Novije studije pokazuju da su reakcije oksidacije najčešće katalizirane ionima željeza i bakra u tzv. Fentonovoj reakciji koja pretvara vodikov peroksid u potentni hidroksi-radikal odgovoran za oksidaciju organskih spojeva [71]. Vinska se kiselina tako prevodi u glioksilnu kiselinu, a etanol u aldehid, nakon čega se oksidiraju i druge organske tvari u vinu koje su prisutne u manjim količinama, npr. glicerol, šećeri i dr. Kada je prisutan u vinu, sumporov dioksid veže se za hidroksi-radikal sprječavajući tako oksidaciju ostalih komponenti vina [59].

S obzirom na uključenost enzima u navedene procese, treba razlikovati enzimatsku i neenzimatsku oksidaciju. Prva je karakteristična za početne korake u proizvodnji vina i groždani mošt. Posredovana je djelovanjem polifenol oksidaza (PPO, engl. *polyphenoloxidases*) i peroksidaza (POD, engl. *peroxidases*) koje se aktiviraju nakon prešanja grožđa. Tada se oslobađaju i fenoli iz vakuola stanica svježeg grožđa, kao i oksidoreduktaze iz njihove citoplazme, te dolaze u dodir jedni s drugima [65, 72]. PPO su enzimi koji u strukturi sadrže bakar, i dijele se na tirozinaze i lakaze. Tirozinaze, još nazivane kateholaze, su enzimi iz grožđa koji najčešće kataliziraju oksidaciju monofenola i o-difenola. Lakaze se, s druge strane, stvaraju iz gljivica dodanih u proizvodnji vina, i mogu oksidirati veći spektar

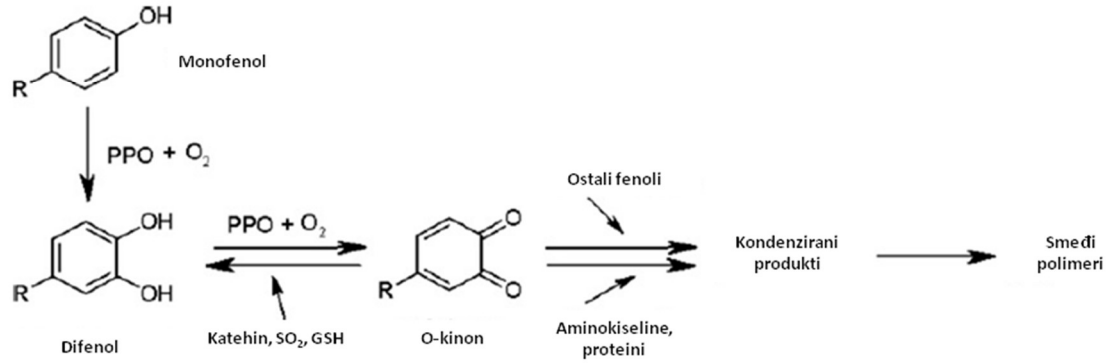
supstrata. POD sadrže atom željeza i njihova aktivnost ovisi o prisutnosti vodikovog peroksida u mediju. Smatraju se manje važnim enzimima od PPO grupe [62, 65].

Kao što je već rečeno, u bijelom će vinu hidroksicinamati biti primarni supstrati oksidacijskih reakcija (enzimatskih i neenzimatskih), i to posebno kaftarična kiselina koja se pretvara u kinon oblik. Ipak, za enzimatsku oksidaciju je karakteristično i to da s nastalim kinonima može reagirati glutation (GSH) stvarajući bezbojne produkte (GRP, engl. *grape reaction product*). GRP se smatra ograničavajućim čimbenikom u procesima 'smeđenja' jer ga kateholaze dalje ne mogu oksidirati. S obzirom na to, groždani sok s većim sadržajem glutationa ima i manji potencijal za 'smeđenje' [20, 73]. Smatra se da su standardna bijela vina zahvaljujući niskom sadržaju polifenola i značajnom stvaranju GRP-a otpornija na enzimatsku oksidaciju od crnih [65].

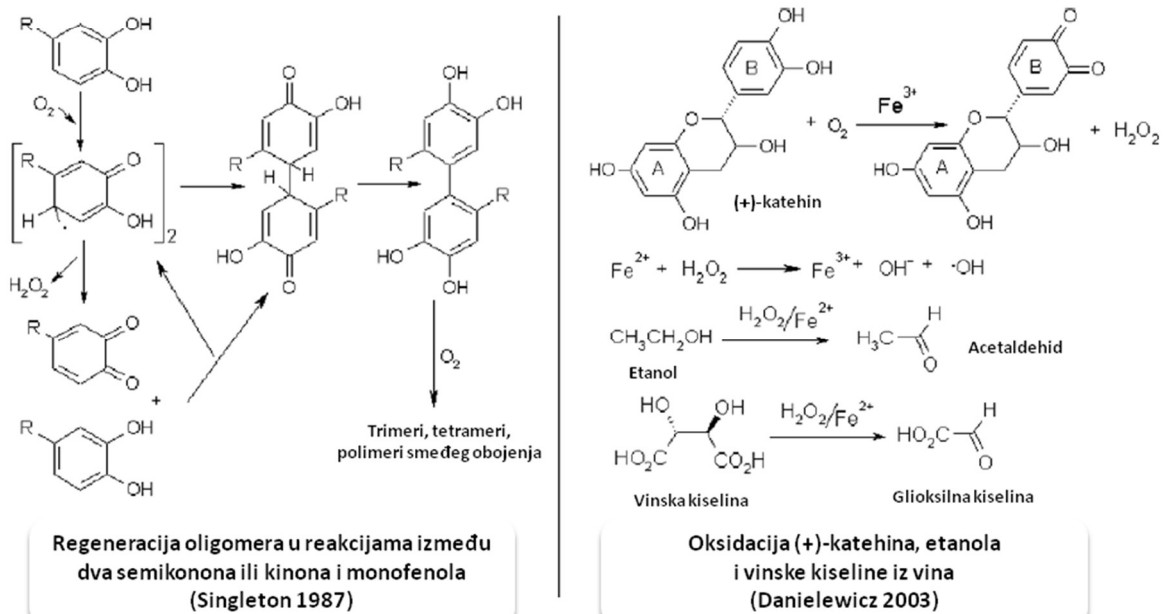
Neenzimatska oksidacija (ili, kako se još naziva, kemijska) je ipak daleko nepredvidljivija reakcija s kojom se povezuje gubitak kvalitete bijelog vina. Iako se može odvijati i u fazi mošta, prevlada u već fermentiranom vinu u kojem se aktivnost enzima smanjila. Druga je najvažnija razlika između ovih procesa u brzini njihovog razvoja. Enzimatska oksidacija događa se unutar par dana i značajno je brža od neenzimatske, koja se prirodno događa sporo [72]. Reakcije enzimatske i neenzimatske oksidacije fenola iz vina, uključujući razvoj smeđih kondenziranih produkata, prikazane su na Slici 2.

Iako se dosta zna o njezinim kemijskim mehanizmima, kakve posljedice oksidacija ima na biološke učinke vina zasad je skoro u potpunosti neistraženo. Osim toga, dok se većina zaključaka navedenih studija temelji na oksidaciji vina dodavanjem kisika u kontrolnim uvjetima (tzv. aeracija ili akcelerirani test 'smeđenja'), malo je podataka o spontanoj svakodnevnoj kratkotrajnoj oksidaciji vina nakon otvaranja boce i izlaganja zraku. Dok je donekle moguće pretpostaviti da neće biti značajnih promjena nakon otvaranja standardnog bijelog vina zaštićenog sumporom, učinke oksidacije na kemijski sastav i biološku aktivnost maceriranog vina bogatog polifenolima, i još k tome nezaštićenog sumporom, skoro je nemoguće predvidjeti.

### Reakcije enzimatske oksidacije u moštu



### Reakcije neenzimatske oksidacije u vinu

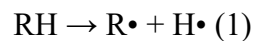


**Slika 2.** Reakcije enzimatske i neenzimatske oksidacije fenola i drugih organskih tvari iz vina. Preuzeto i prevedeno od Li i sur. Mechanisms of oxidative browning of wine [65], uključujući izvore koje su koristili navedeni autori [62, 71].

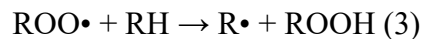
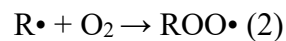
### 2.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost mjeri se kao moć sprječavanja ili prekidanja oksidacijskih reakcija. U oksidativnom stresu oksidacija lipida najčešće započinje aktiviranjem slobodnih radikala. Slobodni se radikali stvaraju tijekom normalnog metabolizma nekog biološkog sustava, ili pod utjecajem vanjskih čimbenika kao što su pušenje, zagađenje ili zračenje. Reakcije oksidacije slobodnim radikalima mogu se podijeliti u tri koraka: inicijacija, terminacija i propagacija. Inicijaciju karakterizira stvaranje reaktivnog alkilnog radikala (1) koji može stupati u reakciju s kisikom stvarajući lipidni peroksidni radikal (2). U propagaciji dodatno mogu nastati lipidni hidroperoksidi (3), a terminaciju označava reakcija dvaju radikala do nastanka ne-radikalnih spojeva (4).

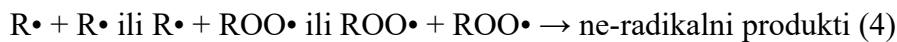
Inicijacija



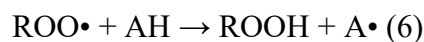
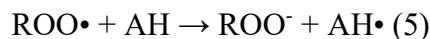
Propagacija



Terminacija



Prema načinu djelovanja, antioksidanse (AH) dijelimo u dvije skupine: one koji uklanjaju radikale i one koji imaju sposobnost jednostavnih reducensa. Uklanjanje radikala može biti temeljeno na mehanizmu prijenosa jednog elektrona, ET (engl. *electron transfer*) ili mehanizmu prijenosa atoma vodika, HAT (engl. *hydrogen-atom transfer*). Reakcije koje se događaju između antioksidansa i radikala stoga mogu izgledati kao (5) u slučaju ET mehanizma, ili kao (6) u slučaju HAT mehanizma. Za reducirajuće AH možemo reći da svi djeluju preko ET mehanizma [74].



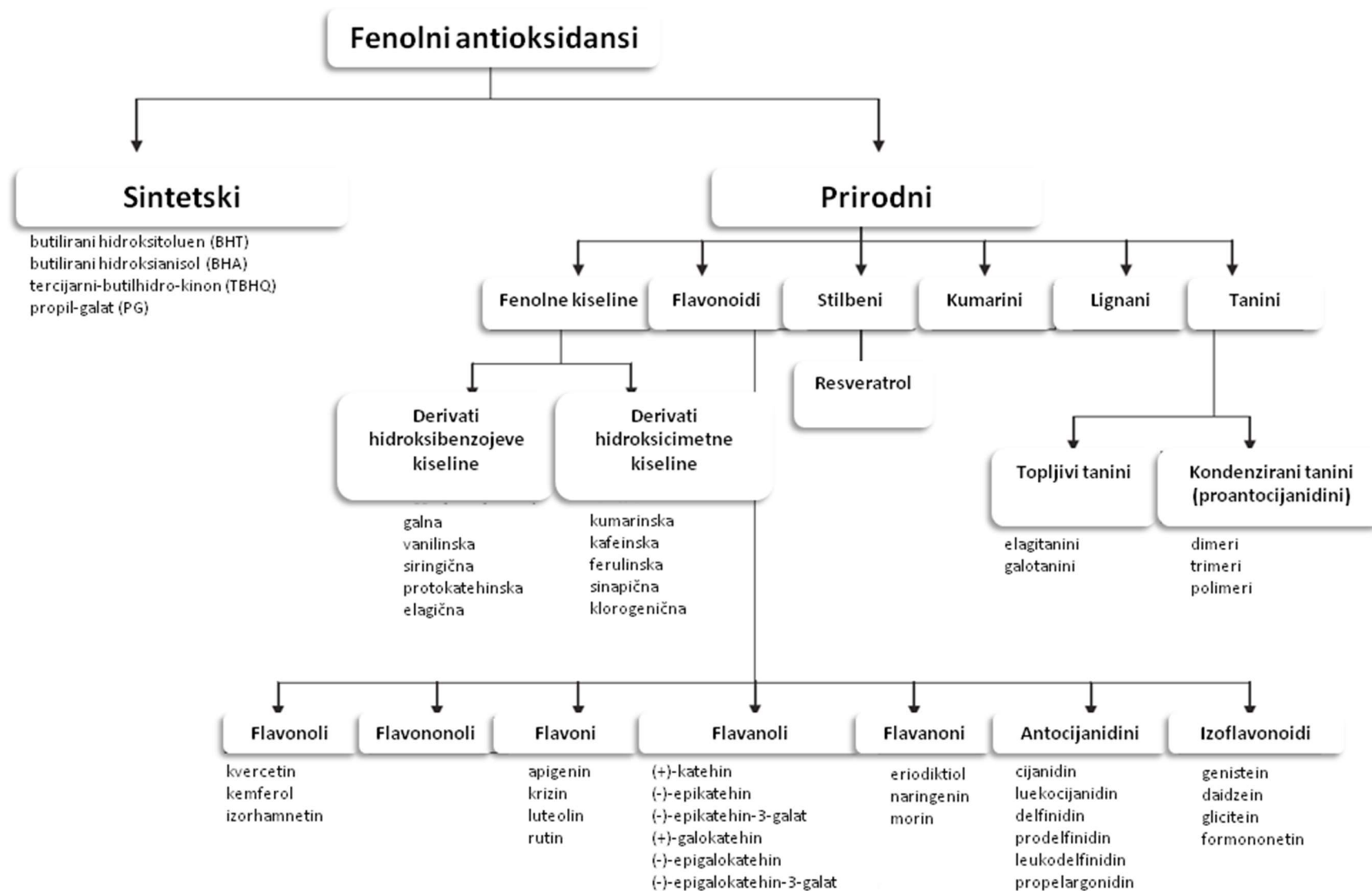
Biološki gledano, antioksidansi su prvenstveno spojevi koji produžuju rok trajanja hrane tako što je štite od propadanja uzrokovanog oksidacijom. Osim toga, s obzirom da se oksidativni stres u ljudskom organizmu smatra važnim patofiziološkom mehanizmom vaskularnih i drugih bolesti, antioksidansi su u zadnje vrijeme predmetom brojnih epidemioloških studija. U tim se studijama njihova konzumacija povezuje s povoljnim učincima na ljudsko zdravlje zbog potencijalnog neutraliziranja štetnih kisikovih reaktivnih vrsta (ROS, engl. *reactive*



*oxygen species*) [75, 76]. Kao antioksidansi najviše su istraživani fenolni spojevi prirodnog podrijetla iz hrane i pića, a u međuvremenu je proizvedeno i nekoliko sintetskih polifenola s antioksidacijskim učinkom (Slika 3). Važno je napomenuti da učinak polifenola kao antioksidansa ovisi o mnogim faktorima uključujući njihovu strukturu, uvjete oksidacije, te okruženje i vrstu tvari koja je oksidirana. S druge strane, može se dogoditi da se fenoli ponašaju kao prooksidansi u stanici potencirajući reakcije inicijacije oksidacije (vidi reakciju 1) [76, 77]. Time se, ipak, ne mora nužno naštetiti stanici zbog pokretanja reakcija stanične obrane od oksidativnog stresa kao što su npr. poticanje ekspresije i povećana aktivnost unutarstaničnih antioksidativnih enzima i dr.

Vinski fenoli primijenjeni *in vitro* inhibiraju oksidaciju lipoproteina male gustoće (LDL, engl. *low-density lipoproteins*) [78, 79], a u *in vivo* se uvjetima nakon konzumacije vina povećava razina lipoproteina velike gustoće (HDL, engl. *high-density lipoproteins*) [80, 81]. Osim toga, različitim metodama mjerenja antioksidacijske aktivnosti u ljudskoj krvi, pokazano je da konzumacija crnog vina povećava antioksidacijski kapacitet plazme ili seruma [82-84]. U svim dosadašnjim studijama koje su uspoređivale veliki broj različitih vina, bijela su vina ostvarila slabiji antioksidacijski učinak nego rose ili crna [85-90]. Osim toga, u svim je navedenim studijama koje su određivale i ukupni sadržaj fenola, slaba antioksidacijska aktivnost bijelih vina povezana s manjim ukupnim sadržajem fenola, što indicira da su upravo oni glavni antioksidansi u vinu [85, 86, 88-90]. U skladu su s time i rezultati studije s maceriranim vinima koja za svih 6 ispitivanih maceriranih bijelih vina, različitih sorti, proizvođača i godina berbe, pokazuje da imaju veću sposobnost inhibicije slobodnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala od 8 odabranih standardnih bijelih vina. Uz to, macerirano vino koje je imalo najveći ukupni sadržaj polifenola pokazalo se ujedno najboljim antioksidansom [17]. Nekoliko istraživanja o oksidaciji bijelih vina iznosi rezultate o povezanosti kinetike promjene boje oksidiranog vina i slabljenja antioksidativnog učinka [91, 92]. Zaključak je bio da s oksidacijom povezano 'smeđenje' standardnog bijelog vina dovodi do proporcionalnog pada njegovog antioksidativnog kapaciteta *in vitro*.

Konačno, unatoč velikom broju razvijenih metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti, najčešći su problem kod interpretacije i uspoređivanja rezultata u literaturi razlike u izražavanju rezultata, korištenim standardima, vremenu trajanja reakcija, te odabir metoda koje se temelje samo na jednom mehanizmu. Osim toga, na rezultate većine ovih metoda utječe brzina izvođenja pokusa, što tek u novije vrijeme otkad se koriste uređaji s mikrotitarskim pločicama za istovremeno mjerenje više uzoraka prestaje biti problem.



**Slika 3.** Klasifikacija fenolnih antioksidansa. Preuzeto i prevedeno od Shahidi i sur. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review [76].

## 2.4. Vazodilatacijska aktivnost

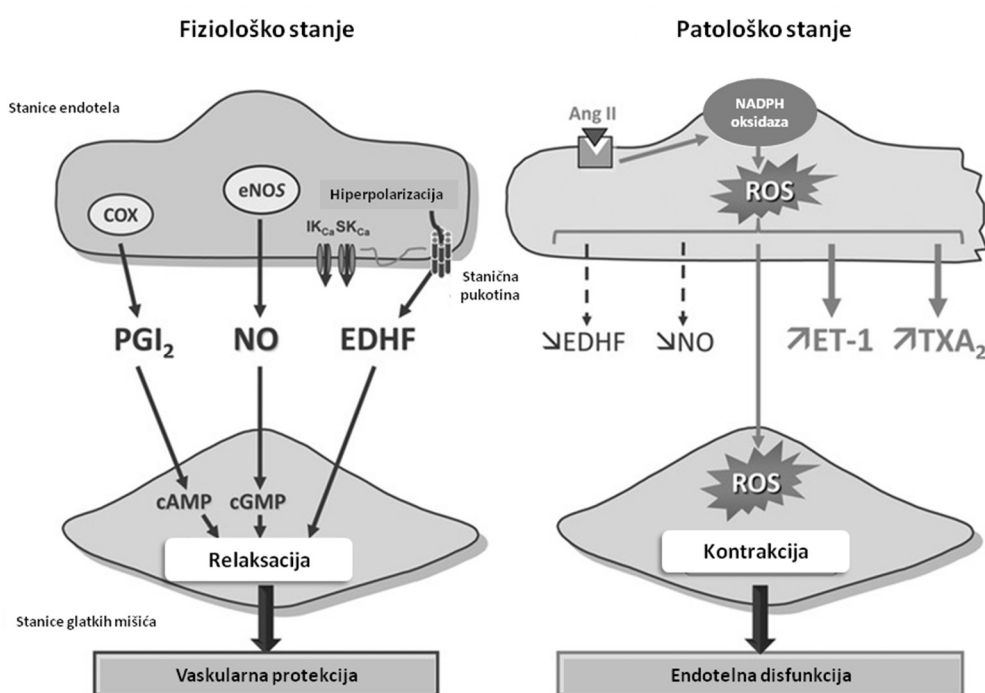
Vazodilatacijska se aktivnost opisuje kao smanjenje krvožilnog tonusa uslijed čega dolazi do pada perifernog otpora i povećanja krvnog protoka. S obzirom na to, vazodilatatori su tvari koje mogu povoljno utjecati u stanjima povišenog krvnog tlaka, angine pektoris, kongestivnog zatajenja srca, erektilne disfunkcije i dr., uz očekivane nuspojave kao što su glavobolja, crvenilo lica, hipotenzija, refleksna tahikardija, palpitacije i nastanak edema. Većina vazodilatacijskih medijatora u ljudskom organizmu je endotelnog podrijetla.

Najvažniji endotelni čimbenik u regulaciji krvožilnog tonusa s vazodilatacijskom aktivnošću je dušikov oksid (NO). Stvara ga konstitutivna, endotelna NO sintaza (eNOS) koja za to koristi aminokiselinu L-arginin i molekulski kisik uz prisustvo više različitih kofaktora. NO iz endotela difundira u stanice glatkog mišićja gdje aktivira gvanilat ciklazu i tako povećava koncentraciju cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) [93, 94]. cGMP olakšava defosforilaciju miozinskih lakih lanaca glatkog mišića krvne žile, sprječavajući interakciju miozina s aktinom. Osim toga, aktivira se protein kinaza ovisna o cGMP-u koja djeluje na kalcijске i kalijeve kanale. Ona povećava izlazak kalcija iz glatkomišićnih stanica, a fosforilacijom kalijevih kanala uzrokuje hiperpolarizaciju stanica. Sve ovo dovodi do vazodilatacije krvnih žila [95]. Osim neizravno, preko cGMP-a, danas se zna da NO može i izravno aktivirati kalijeve kanale i tako uzrokovati vazodilataciju [96]. U više animalnih studija potvrđena je ključna uloga NO u vazodilataciji korištenjem N- $\omega$ -nitro-L-arginin metil estera hidroklorida (L-NAME), analoga L-arginina koji, vežući se za eNOS, može blokirati nastajanje NO i učinke povezane s njim [97, 98].

Osim NO, endogenim vazodilatatorima smatraju se prostaciklini (PGI<sub>2</sub>), produkti oksigenacije arahidonske kiseline posredovane ciklooksigenazom (COX). PGI<sub>2</sub> dovode do vazodilatacije aktivirajući adenilat ciklazu koja povećava količinu cikličkog adenozin monofosfata (cAMP). I cAMP može potaknuti otvaranje kalijevih kanala te povećati izlazak kalija i kalcija iz stanice. Učinkovitost PGI<sub>2</sub> je potvrđena primjenom indometacina, inhibitora COX-a, čije dodavanje u eksperimentalni model označava blokiranje vazodilatacijskih učinaka PGI<sub>2</sub> [99, 100]. Ipak, tijekom pojedinačne inhibicije PGI<sub>2</sub> ili NO izgleda da neinhibirani medijator može nadoknaditi nedostatak drugog i uzrokovati jednaku vazodilataciju. Inače se PGI<sub>2</sub> smatra manje važnim čimbenikom od NO, dijelom i zato što je za njegov učinak potrebna aktivacija prostaciklinskih receptora na glatkim mišićima krvnih žila [96, 101].

Ukoliko je istovremeno inhibirana sinteza NO i PGI<sub>2</sub>, još uvijek može biti očuvan endotel-ovisni vazodilatacijski učinak u arterijama malog promjera, zahvaljujući EDHF-u, endotelnom čimbeniku hiperpolarizacije (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*). Iako je mehanizam njegovog djelovanja nedovoljno istražen, najvjerojatnije je povezan s promjenom struje kalija [102].

Vazodilatacijski učinak vina i vinskih fenola je povezan sa svakim od spomenutih medijatora endotelne funkcije. U mehanizme akutnih učinaka spada povećana proizvodnja i biodostupnost NO [103-107], te inhibicija PGI<sub>2</sub>, EDHF i endotelina-1. Svi najvažniji medijatori endotelne funkcije i njihova aktivacija ili promjena količine u fiziološkom i patološkom stanju prikazani na Slici 4. Nakon subakutne i/ili kronične izloženosti vinu i vinskim fenolima dolazi do povećane ekspresije eNOS i smanjene sinteze endotelina-1 [108, 109].



**Slika 4.** Shema najvažnijih vazoaktivnih medijatora endotelnog podrijetla koji imaju ulogu u kontroli vaskularnog tonusa u fiziološkom i patološkom stanju. COX, ciklooksigenaza, PGI<sub>2</sub>, prostaciklin, NO, dušikov oksid, eNOS, endotelna NO sintaza, IK<sub>Ca</sub>, engl. *intermediate conductance calcium-activated potassium channels*, SK<sub>Ca</sub>, engl. *small conductance calcium-activated potassium channels*, EDHF, endotelni čimbenik hiperpolarizacije, cAMP, ciklički adenzin monofosfat, cGMP, ciklički gvanozin monofosfat, Ang II, angiotenzin II, ROS, reaktivne kisikove vrste, ET-1, endotelin-1, TXA<sub>2</sub>, tromboksan A2. Preuzeto i prevedeno od B.Schini-Kerth i sur. Vascular protection by natural product-derived polyphenols: *In vitro* and *in vivo* evidence [110].

U istraživanjima vazodilatacijskog učinka vina i vinskih fenola *in vitro* korišteno je više modela, uključujući štakorsku aortu, humane koronarne žile, koronarne žile kunića, aortu zamorčića i dr. U većini navedenih studija crna vina ili njihovi fenoli ostvaruju snažni *in vitro* vazodilatacijski učinak preko nekog od navedenih mehanizama [111-117], ali jačina učinka varira ovisno o sorti vina i vrsti krvne žile, kao i o životinjskoj vrsti. S druge strane, pokazano je da vazodilatacijski učinak vina ne ovisi o sadržaju etanola [117]. Osim vazodilatacijskog učinka, za vino i vinske fenole pokazano je da ostvaruju vaskularnu zaštitu drugim mehanizmima: smanjuju ekspresiju adhezijskih molekula i čimbenika rasta, inhibiraju migraciju i proliferaciju stanica glatkih mišića krvnih žila, te inhibiraju agregaciju trombocita [107, 118].

Unatoč malom broju studija koje ispituju vazodilatacijsko djelovanje bijelih vina, redovito je pokazano da su bijela vina slabiji izravni vazodilatatori u odnosu na crna [111, 112]. To je očekivano s obzirom da su bijela vina u odnosu na crna višestruko siromašnija u sadržaju ukupnih fenola, a čija je uloga u vazodilataciji ključna. Štoviše, glavni fenoli u bijelom vinu su fenolne kiseline i njihovi konjugati, za koje je dokazano da imaju slab vazodilatacijski učinak, čak i ako se primjene u velikim koncentracijama [119]. Vazodilatacijski učinak maceriranih bijelih vina nikad nije istražen. Uz to, nikad nije ispitan utjecaj oksidacije na očuvanje tog biološkog učinka.

Stoga je cilj ovog istraživanja bio analizirati vazodilatacijsku i antioksidacijsku aktivnost intaktnog i oksidiranog maceriranog bijelog vina te ih usporediti s onima standardnog bijelog vina. Izravna vazodilatacijska i antioksidacijska aktivnost vina odabrani su kao uobičajeni, robusni i dobro dokumentirani *in vitro* biološki učinci vina. Štoviše, ovi biološki učinci vina mogu se barem djelomično smatrati odgovornima za epidemiološke nalaze negativne povezanosti između umjerene konzumacije vina i kardiovaskularnog rizika [120], budući da su oštećenje endotela i oksidativni stres važni elementi u patogenezi i kliničkoj ekspresiji ateroskleroze.

### **3. Ciljevi i hipoteze**

### **Ciljevi istraživanja:**

1. istražiti učinke konzumacije bijelog vina tijekom četiri tjedna na prirast tjelesne mase štakora,
2. usporediti učinke konzumacije maceriranog i standardnog bijelog vina kako bi se utvrdila moguća uloga polifenola u prirastu tjelesne mase,
3. ispitati u kojoj mjeri dob životinje utječe na moguće promjene u prirastu tjelesne mase uvjetovane konzumacijom vina,
4. utvrditi kako konzumacija vina utječe na unos hrane i ukupne popijene tekućine u štakora,
5. odrediti i usporediti antioksidacijske profile standardnog i maceriranog vina primjenom pet metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti koje su utemeljene na različitim kemizmima,
6. usporediti vazodilatacijski učinak standardnog i maceriranog vina na aortnim prstenovima štakora koji su prekontrahirani noradrenalinom,
7. utvrditi gubi li macerirano vino nakon izlaganja zraku 24 sata i 48 sati navedene biološke učinke,
8. utvrditi promjene u kemijskom sastavu vina nastale zbog maceracije i/ili oksidacije.

### **Hipoteze istraživanja:**

1. Konzumacija standardnog i maceriranog bijelog vina u štakora ne dovodi do većeg prirasta njihove tjelesne mase u odnosu na kontrolne životinje, bez obzira na dob.
2. Ukupna kalorijska vrijednost unesena vinom i hranom u skupini intervencijskih životinja ne razlikuje se od kalorijskog unosa kontrolnih životinja.
3. Macerirano bijelo vino je značajno bolji antioksidans i vazodilatator *in vitro* u usporedbi s kontrolnim standardnim bijelim vinom.
4. Promjena boje maceriranog vina od jantarne do tamno smeđe, 'smeđenje' vina, uzrokovano izlaganjem zraku do 48 sati povezano je sa slabljenjem antioksidacijskog i vazodilatacijskog učinka.

## **4. Metode i materijal**

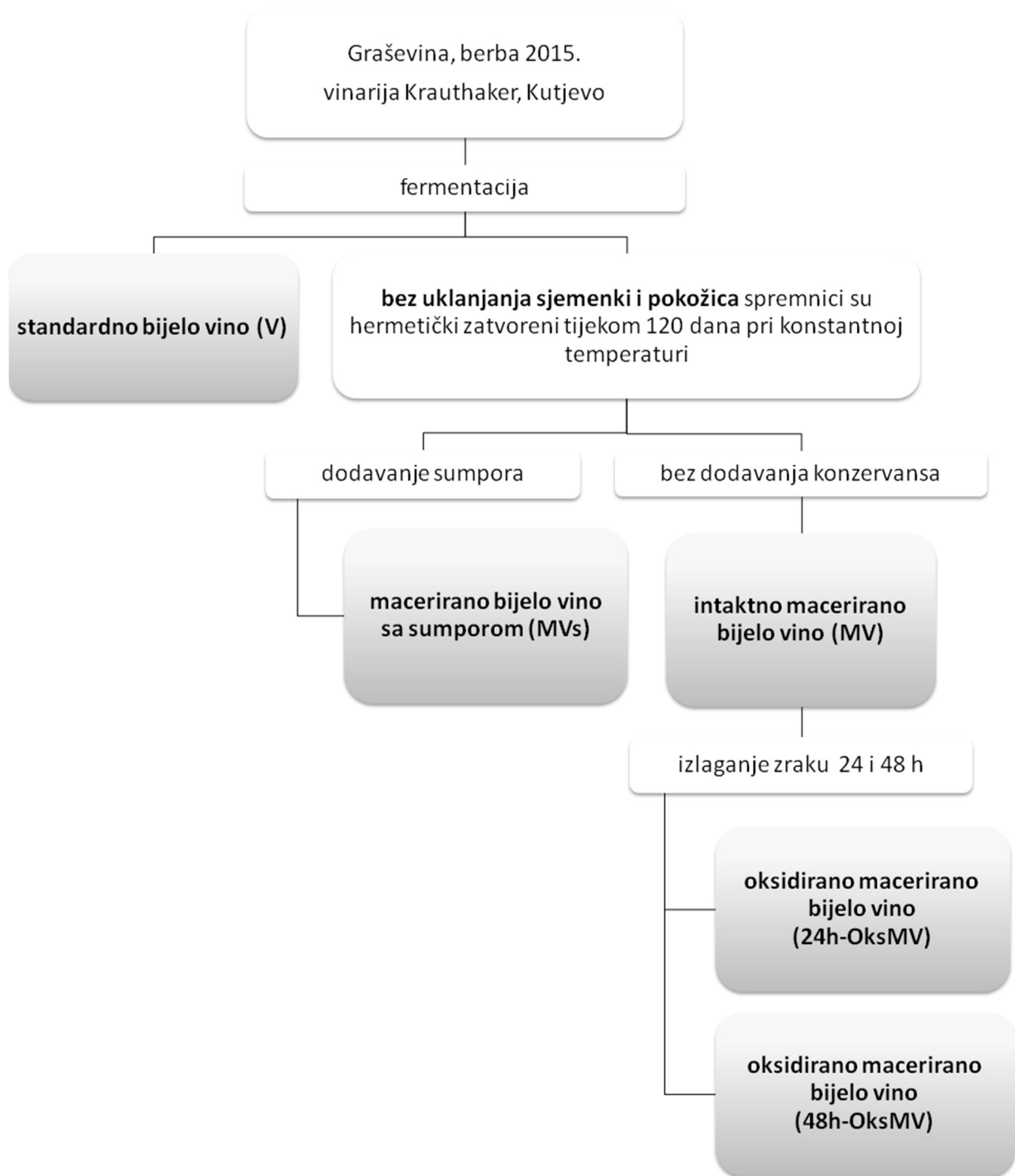


#### 4.1. Pokusna vina

Vina su proizvedena od grožđa sorte Graševina 2015. godine u Krauthaker vinariji, Kutjevo, Hrvatska. Graševina je bijelo grožđe nejasnog podrijetla s predjela središnje i istočne Europe, a predstavlja najrašireniju hrvatsku bijelu sortu. Poznata je pod različitim imenima. U Austriji se naziva *Welschriesling*, u Mađarskoj *Olaszrizling*, a u Sloveniji *Laški Rizling*. U najnovijem svjetskom literaturnom zapisu „*Wine Grapes*“ o vinskim sortama upravo je ime Graševina koje se koristi u Hrvatskoj izabrano kao glavni naziv ove sorte grožđa [121].

Standardno bijelo vino (V) proizvedeno je vinifikacijskim postupkom uobičajenim za proizvodnju bijelih vina pri čemu se tijekom fermentacije uklanjaju čvrsti dijelova grožđa iz grožđanog soka. Macerirano je vino dobiveno od iste sorte grožđa iz istog vinograda i iste godine berbe postupkom produljene maceracije po tradicionalnim gruzijskim principima proizvodnje [16]. U ovom vinifikacijskom postupku grožđani sok najprije spontano fermentira u kontaktu s čvrstim dijelovima grožđa. Nakon fermentacije, bez uklanjanja kožica i koštica grožđa, vino je hermetički zatvoreno u spremnike pri konstantnoj temperaturi tijekom 120 dana. Za potrebe istraživanja utjecaja konzumacije maceriranog vina na prirast tjelesne mase štakora, korišteno je vino proizvedeno s dodatkom sumpora (MVs). U istraživanju *in vitro* učinaka istih vina upotrijebljeno je isto macerirano vino, ali proizvedeno bez dodatka konzervansa (MV). Takvo vino je osjetljivo na oksidaciju nakon otvaranja. Analizirana su dva oksidirana uzorka: prvi nakon izlaganja zraku 24 sata (24h-OksMV) i drugi nakon izlaganja zraku 48 sati (48h-OksMV). Pojednostavljeni postupci proizvodnje i uzorci pokusnih vina zbirno su prikazani metodološkim dijagramom (Slika 5).

Detaljna enološka analiza vina učinjena je primjenom akreditiranih metoda opisanih u Kompendiju internacionalnih metoda za analizu vina i vinskog mošta Internacionalne organizacije za vinarstvo i vinogradarstvo (OIV 2016). Analiza uključuje pH, gustoću, sadržaj etanola, pepela, ugljikovog dioksida, slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida, te koncentracije ukupnog suhog ekstrakta, reducirajućih šećera, ekstrakta bez šećera, ekstrakta bez šećera i nehlapljivih kiselih produkata, ukupnih i hlapljivih kiselina, vinske kiseline, jabučne, mliječne, sorbinske i glukonske kiseline. Fizikalno-kemijski parametri enološke analize prikazani su u Tablici 1.



**Slika 5.** Metodološki dijagram pojednostavljenih postupaka proizvodnje i uzoraka pokusnih vina.

**Tablica 1.**

Fizikalno-kemijski parametri uzoraka vina

Parametar		V	MVs	MV
Gustoća	g/L	989	991	991
Etanol	vol%	13,0	13,3	13,3
	g/L	102,3	105,0	105,0
Kalorijska vrijednost	kJ/mL	3,04	3,12	3,12
Ukupni suhi ekstrakt	g/L	24,8	24,2	27,6
Reducirajući šećeri	g/L	4,0	3,2	3,7
Ekstrakt bez šećera	g/L	21,8	22,0	24,9
Ekstrakt bez šećera i nehlapljivih kiselih produkata	g/L	17,5	18,2	21,0
Pepeo	g/L	2,59	3,65	3,60
pH	-	3,54	3,90	3,94
CO <sub>2</sub>	mg/L	1382	588	751
Ukupne kiseline	g/L	3,56	3,29	3,33
Nehlapljive kiseline	g/L	0,25	0,7	0,67
Vinska kiselina	g/L	3,36	2,19	2,10
Jabučna kiselina	g/L	1,56	-0,2	-0,29
Mliječna kiselina	g/L	0,03	1,92	2,01
Sorbinska kiselina	g/L	0	0	0
Glukonska kiselina	g/L	-0,54	-0,64	-0,44
Slobodni SO <sub>2</sub>	mg/L	27	5	1
Ukupni SO <sub>2</sub>	mg/L	124	99	3

V, standardno bijelo vino; MVs, macerirano bijelo vino sa sumporom; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora.

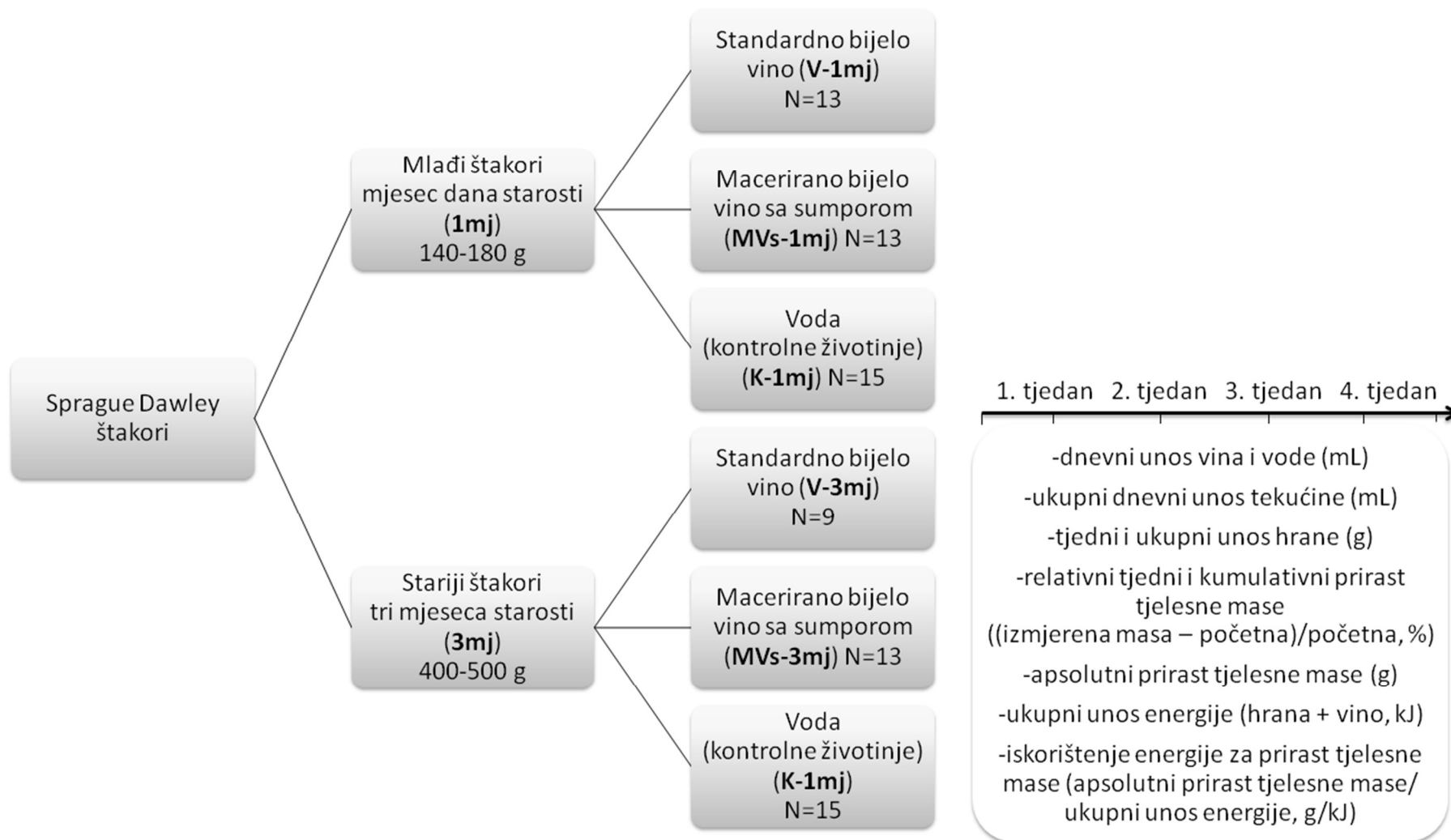
Kalorijska vrijednost uzoraka vina koji se koriste u istraživanju o prirastu tjelesne mase izračunata je kao produkt koncentracije etanola (102,3 g/L za standardno i 105 g/L za macerirano vino) i kalorijske vrijednosti etanola (29,7 kJ/g), izražena u kJ/mL i prikazana u Tablici 1.

## 4.2. Prirast tjelesne mase

U studiju su uključeni štakori Sprague Dawley soja, mužjaci iz vlastitog uzgoja Nastambe za eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu. S obzirom na početnu masu i vrijeme okota štakora, početni uzorak sastojao se od 45 mlađih (brzo-rastućih) životinja, mjesec dana starosti i tjelesne mase od 140 do 180 g i 45 starijih (sporije-rastućih) životinja koje su imale tri mjeseca i tjelesnu masu od 400 do 500 g. Navedene skupine su dalje randomizirane u skupine životinja koje konzumiraju vina i kontrolnih životinja koje konzumiraju samo vodu. Životinjama koje piju vino je ponuđeno standardno bijelo vino (V) ili macerirano bijelo vino (MVs), 24 sata dnevno *ad libitum* s dnevnim uključivanjem vode tijekom 6 sati u vremenskom razdoblju od četiri tjedna. Kontrolnim životinjama je ponuđena samo voda, 24 sata dnevno bez ograničenja. Čimbenik isključenja za životinje koje konzumiraju vino bio je dnevni unos vina manji od 7 mL. Konačni uzorak čine: kontrolne životinje (N=15 po dobnoj skupini), životinje koje piju standardno bijelo vino (N=13 za mlađe i N=9 za starije štakore) te životinje koje piju macerirano bijelo vino (N=15 za mlađe i N=13 za starije štakore).

Životinje su pile svježa pića koja su pripremana iznova svakog dana i dostavljana u posebnim bočicama dizajniranim tako da onemogućavaju nekontrolirano curenje (Ferplast Small Pet Sippy Water Bottle, Castelgomberto, Italija). Volumeni konzumiranih tekućina mjerili su se jednom dnevno u laboratorijskim menzurama. Životinje su se hranile standardnom hranom za glodavce (Mucedola S.R.L., Settimo Milanese, Milan, Italija) *ad libitum*. Tjelesna masa i unos hrane mjerili su se jednom tjedno u tri ponavljanja koristeći Grundig KW 4060 Digital Scale vagu. Sve su se životinje čuvale u zasebnim kavezima pri standardnim uvjetima temperature i svjetla (22–25°C, 12h ciklus svjetla/mraka).

Glavna mjera ishoda je promjena tjelesne mase pokusnih i kontrolnih životinja dvije dobne skupine izražena kao apsolutni prirast nakon četiri tjedna pijenja (konačna – početna masa, u gramima), te relativni tjedni prirast ( $((\text{izmjerena masa} - \text{početna masa}) * 100\% / \text{početna masa})$ ). Sekundarne mjere ishoda su ukupni dnevni unos tekućine (zbroj volumena vode i vina, gdje je primjenjivo), ukupni unos energije, UE (ukupna količina konzumirane hrane x kalorijska vrijednost hrane (16,54 kJ/g) + ukupni volumen konzumiranog vina x kalorijska vrijednost vina (3,04 kJ/mL za standardno i 3,12 kJ/mL za macerirano vino, kJ) te prirast tjelesne mase po jedinici konzumirane energije, PTM/UE (apsolutni prirast tjelesne mase/ukupni unos energije, g/kJ). Dijagram s opisom uzorka eksperimentalnih životinja, intervencijama i mjerama ishoda za prirast tjelesne mase prikazan je na Slici 6.



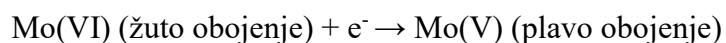
**Slika 6.** Dijagram s opisom uzorka eksperimentalnih životinja, intervencijama i mjerama ishoda za prirast tjelesne mase.

### 4.3. Biokemijska analiza pokusnih vina

#### 4.3.1. Ukupni fenoli, flavonoidi, neflavonoidi

Koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida određene su spektrofotometrijskim metodama. Spektrofotometrijska mjerenja provedena su na UV – VIS spektrofotometru „Specord 200” Analytik Jena GmbH, Jena, Njemačka.

Ukupni fenoli određeni su metodom po Folin-Ciocalteu [122]. Metoda se temelji na oksidaciji fenolnih spojeva do kinona dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa u lužnatim uvjetima (pH otopine je 10 uz dodatak Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Folin-Ciocalteu reagens je žuta smjesa nereduciranih volframofosfatnih i molibdofosfatnih aniona koji se uz nastale fenolate reduciraju i daju plavo obojenje.



Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih spojeva i mjeri se određivanjem apsorbancije pri 765 nm u odnosu na slijepu probu.

Ista se metoda koristila za određivanje koncentracije flavonoida i neflavonoida, nakon precipitacije s formaldehidom 24 sata na sobnoj temperaturi. Reakcija se odvija u kiselim uvjetima uz dodatak kloridne kiseline. Formaldehid reagira s flavonoidima dajući kondenzirane produkte koji se talože i moguće ih je ukloniti filtracijom. Preostali neflavonoidi u otopini određeni su pomoću metode s Folin-Ciocalteu reagensom.

Koncentracija flavonoida izračunata je iz razlike koncentracije ukupnih fenola i koncentracije neflavonoida sukladno dolje navedenoj formuli.

$$\text{Flavonoidi (mg GAE/L)} = \text{Ukupni fenoli (mg GAE/L)} - \text{Neflavonoidi (mg GAE/L)}$$

Mjerenja su izvršena u triplicatu, a rezultati izraženi kao mg/L ekvivalenata galne kiseline (GAE).

### 4.3.2. Flavanoli i njihovi dimeri

Koncentracije (+)-katehina, (-)-epikatehina i procijanidinskih dimera B1 (epikatehin-(4 $\beta$ →8)-katehin), B2 (epikatehin-(4 $\beta$ →8)-epikatehin), B3 (katehin-(4 $\alpha$ →8)-katehin) i B4 (katehin-(4 $\alpha$ →8)-epikatehin) određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, HPLC-om (engl. *high performanse liquid chromatography*) u uzorcima pokusnih vina za ispitivanje antioksidacijskog i vazodilacijskog učinka *in vitro*.

Oprema za HPLC analizu se sastoji se od Thermo-Finnigan Surveyor HPLC sistema (Thermo-Fisher, San Jose, CA, SAD) koji sadrži UV-VIS detektor (Surveyor PDA Plus), uređaj za automatsko uzorkovanje i kvartarni pumpni sistem (Surveyor LC Plus pumpa) koji je pod nadzorom Xcalibur sustava za obradu podataka. Osim toga, sadrži detektor fluorescencije (FL plus Detektor) kojim upravlja ChromQuest 4.2 softver. Kromatografsko razdvajanje provedeno je na Lichrospher C18 koloni reverzne faze (250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m).

Binarni su gradijentni sustav činili voda (otapalo A) i acetonitril (otapalo B) kao mobilne faze zakiseljene s mravljom kiselinom (0,5%), pri brzini protoka od 1 mL/min. Početni udio otapala B postavljen je na 3%. Gradijent mobilne faze prikazan je u Tablici 2.

**Tablica 2.**

Sastav gradijenta mobilne faze za određivanje flavanola i njihovih dimera HPLC-om

Vrijeme (min)	0	10	20	22	32	34	45	46	55
% A	97	95	93	90	88	86	75	0	97
% B	3	5	7	10	12	14	25	100	3

A, otapalo A (0,5vol% vodena otopina mravlje kiseline), B, otapalo B (0,5vol% otopina mravlje kiseline u acetonitrilu).

Pikovi su zabilježeni pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 280 nm i emisijskoj od 320 nm. Identifikacija srednjih pikova provedena je usporedbom s autentičnim standardima ((+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidinski dimeri B1, B2, B3, B4) koji su također korišteni kao referentni spojevi za kvantitativnu analizu. Detalji o metodi mjerenja koncentracije flavanola i njihovih dimera HPLC-om prethodno su objavljeni [123].

### 4.3.3. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline identificirane su tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti, UPLC-om (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*) (Agilent 1290 Infinity), opremljenom masenim spektrometrom (Agilent 6530 Accurate Mass) uz sustav za ionizacijsko elektroraspršenje, ESI-Q-TOF (engl. *electrospray ionisation quadrupole time-of-flight*) u uzorcima pokusnih vina za ispitivanje antioksidacijskog i vazodilatacijskog učinka *in vitro*.

Kromatografsko razdvajanje provedeno je C18 UPLC kolonom (2,1 x 100 mm, 1,8 µm, Agilent), koristeći vodu (otapalo A) i metanol (otapalo B) kao mobilne faze, obe zakiseljene s 0,1% mravljom kiselinom. Sastav gradijenta bio je sljedeći: 0% B tijekom 0,5 min; od 0 do 35% B 19 min; od 35 do 95% B 4 min; 95% B tijekom 3 min. Maseni spektrometar radio je u proširenom dinamičkom rasponu od 2 GHz (m/z 3200 Th). Tlak i brzina protoka nebulizatora podešeni su na 25 psi i 9 L/min. Temperatura plina za sušenje bila je 300 °C. Protok plina i temperatura u omotaču podešeni su na 9 L/min i 350 °C. Sve su analize provedene u negativu.

Analiza podataka provedena je pomoću softvera Mass Hunter Qualitative Analysis, verzija B.06.00 (Agilent Technologies, SAD). Derivati hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina identificirani su uspoređivanjem njihovih kromatografskih retencijskih vremena i točnih masa s onima čistih standarda. Kvantificirani su korištenjem kalibracijskih krivulja galne kiseline ili kafeinske kiseline u rasponu koncentracija od 1,5 do 50 mg/L. Koncentracije galne i siringične kiseline kao derivata hidroksibenzojeve kiseline izražene su u mg/L ekvivalenata galne kiseline (GAE, engl. *gallic acid equivalent*), dok su koncentracije kafeinske, kaftarične, cis- i trans-kutarične i cis- i trans-ferulične kiseline kao derivata hidroksicimetne kiseline izražene kao mg/L ekvivalenata kafeinske kiseline (CAE, engl. *caffeic acid equivalent*). Detaljna metoda određivanja koncentracije fenolnih kiselina u uzorcima vina prethodno je objavljena [124].



#### 4.3.4. Produkti fluoroglucinolize

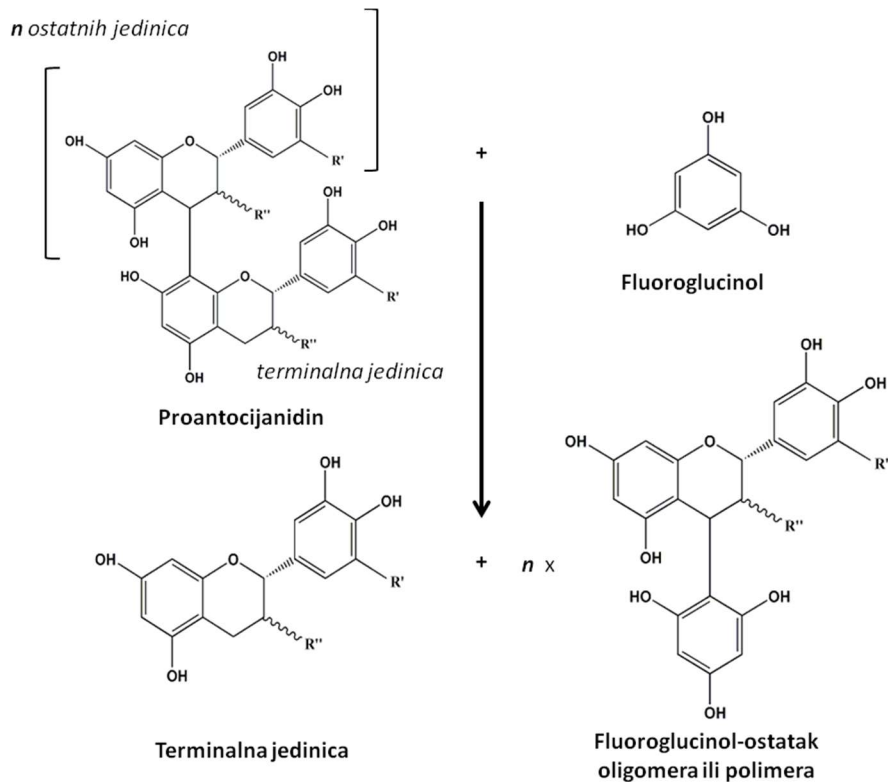
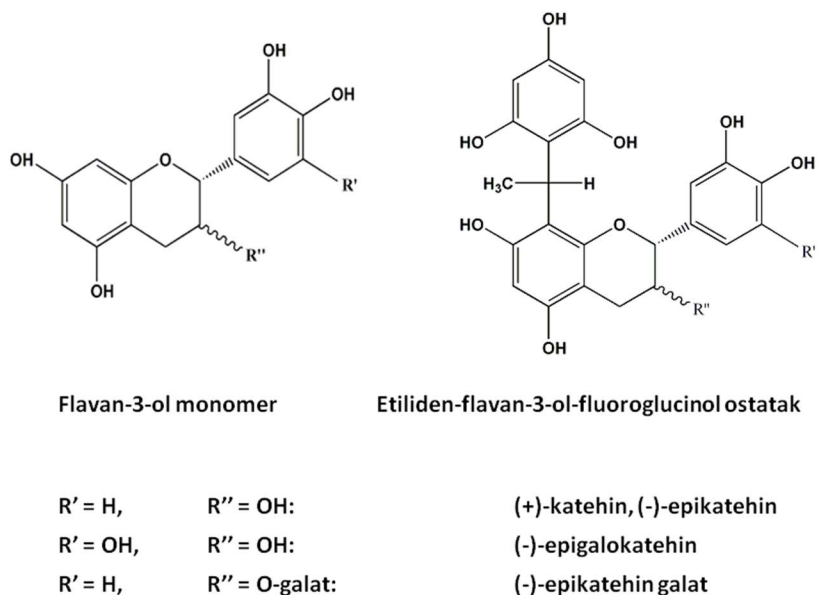
Srednji stupanj polimerizacije proantocijanidina, mDP (engl. *mean degree of polymerization*), udio prodelfinidina, -galo spojeva, %P (engl. *percentage of prodelfinidins*), te udio estera s galnom kiselinom, -galata, %G (engl. *percentage of galloylation*) određeni su u reakciji s fluoroglucinolom [70] u uzorcima pokusnih vina za ispitivanje antioksidacijskog i vazodilatacijskog učinka *in vitro*.

Oligomerni i polimerni spojevi u vinu depolimerizirani su u prisutnosti nukleofilnog sredstva (fluoroglucinol) u kiselom mediju. U reakciji se oslobađaju terminalne jedinice kao flavan-3-ol monomeri i etilidenflavan-3-ol-fluoroglucinol ostatak oligomera ili polimera. Reakcija fluoroglucinolize prikazana je na Slici 7.A.

Depolimerizacijom procijanidina kao terminalne jedinice mogu se osloboditi (+)-katehin (C, engl. *catechin*), (-)-epikatehin (EC, engl. *epicatechin*) ili (-)-epikatehin-galat (ECG, engl. *epicatechin gallate*). Ostatak oligomera ili polimera vezan za fluoroglucinol može biti (+)-katehin-fluoroglucinol (C-P, engl. *catechin phloroglucinol*), (-)-epikatehin-fluoroglucinol (EC-P, engl. *epicatechin phloroglucinol*) ili (-)-epikatehin-galat-fluoroglucinol (ECG-P, engl. *epicatechin gallate phloroglucinol*). Depolimerizacijom prodelfinidina, osim navedenih spojeva, također se mogu osloboditi (-)-epigalokatehin (EGC, engl. *epigallocatechin*) i (-)-epigalokatehin-fluoroglucinol (EGC-P, engl. *epigallocatechin phloroglucinol*) (Slika 7.B).

200  $\mu$ L vina otopi se u metanolu i doda 200  $\mu$ L reagensa fluoroglucinolize. Reakcijska otopina se ostavi u bočici od jantarnog stakla na 50 °C 20 min. Dodatkom 1 mL vodene otopine natrijevog acetata (40 mmol/L) reakcija se zaustavlja. Reagens fluoroglucinolize je smjesa fluoroglucinola (50 g/L) i askorbinske kiseline (10 g/L) otopljene u metanolu zakiseljenjem s 0,1 N kloridnom kiselinom. Reakcija fluoroglucinolize provedena je u duplikatu.

Reakcijski produkti analizirani su pomoću Thermo-Accela HPLC-UV sustava (Thermo-Fisher, San Jose, CA, SAD) sastavljenog od fotodiodnog detektora (engl. PDA, *photodiode array*), uređaja za automatsko uzorkovanje i kvaternarne pumpe pod nadzorom Xcalibur sustava za obradu podataka. Kromatografska razdvajanja su provedena pomoću reverzne Waters XTerra RR C18 (100 mm x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m) kolone pri sobnoj temperaturi. Binarni gradijentni sustav je pripremljen od vode (otapalo A), zakiseljene s octenom kiselinom (1%) i metanola (otapalo B) pri brzini protoka od 1 mL/min.

**A****B**

**Slika 7. A** Reakcija fluoroglucinolize. **B** Predloženi produkti fluoroglucinolize. Preuzeto i prevedeno od Drinkine i sur. Analysis of ethylidene-bridged flavan-3-ols in wine [70].

Uvjeti eluiranja bili su sljedeći: 5% B, 0 min; 16% B, 1 min; 22% B, 7 min; 35% B, 8 min; 42% B, 15 min; kolona je zatim isprana s 100% otapala B tijekom 3 minute i ponovno izjednačena s 5% B tijekom 4 minute prije sljedeće injekcije.

Koncentracije razgradnih produkata izražene u mol/L izračunavaju se pomoću molarnog apsorpcijskog (ekstincijskog) koeficijenta, specifičnog za svaki produkt primjenom formule:

$$C = \frac{\text{Površina}}{\text{Molarni ekstincijski koeficijent}}$$

Produkti reakcije fluoroglucinolize određeni su HPLC-om s reverznom fazom, a vrijednosti su mDP, %P i %G izračunate sukladno dolje navedenim formulama.

$$\text{mDP} = \frac{\sum \text{koncentracija terminalnih jedinica (flavan - 3 - ola)} + \sum \text{koncentracija ostatnih jedinica}}{\sum \text{koncentracija terminalnih jedinica (flavan - 3 - ola)}}$$

$$\%P = \frac{\sum \text{koncentracija terminalnih jedinica (EGC)} + \sum \text{koncentracija ostatnih jedinica (EGC - P)}}{\sum \text{koncentracija terminalnih jedinica (flavan - 3 - ola)} + \sum \text{koncentracija ostatnih jedinica}}$$

$$\%G = \frac{\sum \text{koncentracija terminalnih jedinica (ECG)} + \sum \text{koncentracija ostatnih jedinica (ECG - P)}}{\sum \text{koncentracija terminalnih jedinica (flavan - 3 - ola)} + \sum \text{koncentracija ostatnih jedinica}}$$

Identifikacija produkata potvrđena je masenom spektrometrijom sa signalima iona koji su prikazani u Tablici 3.

### Tablica 3.

Produkti reakcije s fluoroglucinolom i njihovi signali na masenom spektrometru

Produkt	[M-] (m/z)
(+)-Katehin (C)	289
(-)-Epikatehin (EC)	289
(-)-Epikatehin-galat (ECG)	441
(-)-Epigalokatehin (EGC)	305
(+)-Katehin-fluoroglucinol (C-P)	413
(-)-Epikatehin-fluoroglucinol (EC-P)	413
(-)-Epikatehin-galat-fluoroglucinol (ECG-P)	565
(-)-Epigalokatehin-fluoroglucinol (EGC-P)	429

#### **4.3.5. Određivanje promjene boje uzoraka vina**

Osim vizualnog zapažanja, 'smeđenje' maceriranog vina nakon izlaganja zraku 24 i 48 sati određeno je spektrofotometrijski primjenom modificirane metode koju su opisali Singleton i Kramling [125]. Mjerenja su izvršena u odnosu na 13% etanol (vinski destilat prirodnog podrijetla) u McIlvane puferu (0,1 M limunska kiselina i 0,2 M bezvodni natrijev hidrogenfosfat, pH = 4,0) pri čemu je u mediju postignuta koncentracija etanola i pH koje najbolje približno odgovaraju svim našim uzorcima vina. Boja se određuje kao apsorbancija na 420 nm koristeći UV – VIS spektrofotometar „Specord 200” Analytik Jena GmbH, Jena, Njemačka. Mjerenja se uobičajeno provode u rasponu apsorbancija od 400 do 480 nm. Pri višim apsorbancijama, međutim, vjerojatnija je interferencija s rozom bojom leukoantocijanidina iz crnih vina, pa je 420 nm sada najčešća i standardna valna duljina za određivanje i uspoređivanje boja i bijelih i crnih vina.

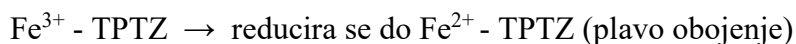
#### 4.4. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijski kapacitet je određen koristeći četiri različite spektrofotometrijske metode: FRAP (engl. *ferric reducing antioxidant power*), DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), ABTS (engl. *2,2'-azinobis-3-ethyl-benzo-thiazoline-6-sulfonic acid*) i ORAC (engl. *oxygen radical absorbance capacity*) te jednom vizualnom metodom, BR (Briggs-Rauscher).

Kako bi usporedba izmjerenih vrijednosti spektrofotometrijskih metoda bila jednostavnija, korišten je isti kalibracijski standard (troloks, sintetski vodotopljivi analog vitamina E). Rezultati spektrofotometrijskih metoda izraženi su kao  $\mu\text{M}$  ekvivalenata troloksa (TroloksE). Rezultati BR metode izraženi su kao inhibicijsko vrijeme (min) potrebno za zaustavljanje oksidacijske reakcije. Sve su reakcijske otopine pripremane svježe i uzorci su analizirani u četiri ponavljanja. Spektrofotometrijska mjerenja za FRAP, DPPH i ABTS provedena su na BGM FLUOstar Omega čitaču pločica s detektorom fluorescencije (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Njemačka) dok su ORAC mjerenja izvršena na Synergy HTX SILFA čitaču pločica (BioTek Instruments, Inc., Vinoski, Vermont, SAD).

##### FRAP

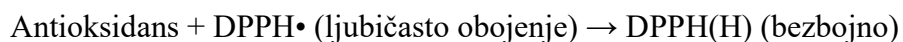
FRAP je izravni test antioksidacijske aktivnosti u kojem elektron-donirajući antioksidansi iz uzorka reduciraju željezo (III) u njegov željezo (II) oblik [126]. Za razliku od ostalih korištenih metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta, FRAP je jedina metoda koja antioksidacijsku aktivnost opisuje kao sposobnost reduciranja. Inicijalno je razvijena da bi se odredila antioksidacijska aktivnost krvne plazme, ali se može koristiti i za određivanje antioksidacijskog djelovanja drugih uzoraka. Nastali željezo (II) oblik reagira s TPTZ-om (2,4,6-tri(2-piridil)-triazin) stvarajući kompleks (fero-2,4,6-tri(2-piridil)-triazin). Njegovo plavo obojenje može se spektrofotometrijski mjeriti na 593 nm.



FRAP reagens priprema se miješanjem 300 mM natrij-acetatnog pufera (pH 3,6) s 10 mM TPTZ-om i s 20 mM željezovim (II) kloridom u volumnim omjerima 10:1:1. Pločica s 96 jažica se ispuni natrij-acetatnim puferom (slijepa proba, 40  $\mu\text{L}$ ), troloks standardom (10  $\mu\text{M}$  – 500 mM, 40  $\mu\text{L}$ ) i uzorcima (40  $\mu\text{L}$ ). Nakon toga, u sve se jažice doda FRAP reagens (300  $\mu\text{L}$ ). Apsorbancija se očitava nakon 4 minute kolorimetrijske reakcije.

## DPPH

Metoda ispituje antioksidacijsku aktivnost kao sposobnost inhibicije slobodnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala [127]. Antioksidans otpušta vodik pri čemu nastaje stabilan DPPH radikal. Za razliku od intenzivno ljubičasto obojenog radikala s nesparenim elektronima, nakon reakcije s antioksidansom produkt postaje bezbojan. Kolorimetrijska razlika mjeri se spektrofotometrijski na 515 nm.



Inicijalna metoda je modificirana [128]. Pločica s 96 jažica ispuni se metanolom (slijepa proba, 10 uL), troloks standardom (10  $\mu\text{M}$  – 750 mM, 10  $\mu\text{L}$ ) i uzorcima (10  $\mu\text{L}$ ). Uzorci su razrijeđeni u metanolu zbog ekstrakcije antioksidansa. 200  $\mu\text{L}$  DPPH $\cdot$  potom se dodaje u sve jažice, a apsorbancija mjeri nakon 20 minuta reakcije.

## ABTS

ABTS metoda još je jedna metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti kao sposobnosti uklanjanja radikala. Mehanizmom je slična DPPH testu, ali je osjetljivija i za ekstrakciju antioksidansa nije potreban metanol. Količina antioksidansa u uzorku korelira s gubitkom plavo-zelene boje ABTS $\cdot+$  radikala koji se prevodi u bezbojni ABTS oblik. Gubitak boje mjeri se spektrofotometrijski na 734 nm.



Prethodno se priprema smjesa ABTS-a (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline, 7 mM u deioniziranoj vodi) i oksidansa (2,45 mM kalij persulfat). Nakon 12-16 sati inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi stvori se stabilna tamno plavo-zelena otopina ABTS $\cdot+$  radikala [129]. Prije upotrebe, ABTS $\cdot+$  otopina je razrijeđena deioniziranom vodom do apsorbancije od  $0,7 \pm 0,02$  na 734 nm. Pločica s 96 jažica ispuni se Milli Q vodom (slijepa proba, 10  $\mu\text{L}$ ), troloks standardom (10  $\mu\text{M}$  - 500 mM, 10  $\mu\text{L}$ ) i uzorcima (10  $\mu\text{L}$ ). Zatim se u sve jažice dodaje 200  $\mu\text{L}$  otopine ABTS $\cdot+$ , a apsorbancija mjeri 10 minuta nakon početnog miješanja.

## ORAC

ORAC metoda je primijenjena prema neznatno modificiranom postupku koji su opisali Prior et al. [130]. Antioksidacijski kapacitet uzorka mjeri se kao sposobnost uklanjanja peroksilnih radikala koji inače podržavaju fluorescenciju fluoresceina. Nakon prevođenja u stabilni hidroperoksid fluorescencija se gubi linearno s jačinom antioksidansa.

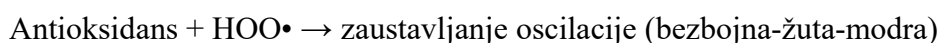


Fluorescentni se filteri postave na odgovarajuće valne duljine ekscitacije i emisije od 485 nm i 530 nm, a temperatura inkubatora na 37 °C. Pločica s 96 jažica ispunjena fosfatnim puferom (slijepa proba, 25 µL), troloks standardom (5µL - 500 mM, 25 µL) i uzorcima (25 µL). U svaku se jažicu potom dodaje fluorescein (0,08 µM, 150 µL) te se tako pripremljene pločice termostatiraju 30 min. Nakon toga dodaje se 2,2-azobis(2-propanamid)-dihidroklorid (AAPH, 0,15 M, 25 µL) koji generira peroksil radikale. Fluorescencija se mjeri svaku minutu tijekom perioda od 80 minuta.

ORAC je jedina metoda mjerenja antioksidacijskog kapaciteta u kojoj se rezultat izražava površinom ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC). AUC je izračunata za svaki uzorak integriranjem krivulje fluorescencije. Konačne AUC su izračunate oduzimanjem AUC slijepe probe. Vrijednosti ORAC-a određene su linearnom regresijskom jednadžbom krivulje troloks standarda i izražene su, poput ostalih spektrofotometrijskih metoda, u µM ekvivalenta troloksa (TE).

## BR

Antioksidacijska aktivnost u BR testu određuje se u oscilirajućem sustavu u kojem se događa reakcija antioksidansa s hidroperoksil radikalom (HOO•) pri čemu dolazi do promjene boje od bezbojne preko žute do plave. Sustav oscilacija je nazvan po znanstvenicima koji su ga opisali, Thomasu Briggs i Warrenu Rauscheru. Dodatkom antioksidansa oscilacije se zaustavljaju te se mjeri vrijeme inhibicije (min) koje linearno ovisi o koncentraciji dodanog antioksidansa [131].



Posudu od prozirnog stakla s jednakim volumenima otopine A (kalijev jodat, sumporna kiselina), B (15%-tni vodikov peroksid) i C (malonska kiselina, manganov sulfat, škrob)

postavi se miješati na magnetsku miješalicu. Oscilacije u boji započinju odmah, a nakon treće pojave modrog obojenja, u smjesu se dodaje jednaki volumen uzorka i započinje mjeriti vrijeme zadržavanja oscilacije sve do pojave žutog ili plavog obojenja.

#### **4.5. Vazodilatacijska aktivnost**

Koriste se štakori soja Sprague-Dawley, mužjaci (N=10 životinja po uzorku vina), tjelesne mase 300-350 g, iz vlastitog uzgoja Nastambe za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu, na Medicinskom fakultetu.

Nakon anestezije intramuskularnom primjenom ketamina (Ketaminol 10, 1,2 mL/kg, Intervet International, Nizozemska) i ksilazina (Xylapan, 0,4 mL/kg, Vetoquintol, Švicarska) i provjere gubitka osjeta na bolni podražaj, životinja se dekapitira. Učini se torakotomija i preparira torakalna aorta, disecira te prenese u preparativni bazenčić s hladnom Krebs – Henseleitovom otopinom (NaCl 118.6, KCl 4.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.5, glukoza 10.1 i EDTA 0.02 mM). Nakon pažljivog čišćenja masnog i vezivnog tkiva, aorta se izreže na prstenove širine 3-4 mm.

Prstenove se zatim namjesti u organske bazenčice s Krebs – Henseleitovom otopinom. Otopina se kontinuirano zagrijava primjenom cirkulacijske pumpe ( $t = 37 \pm 0,2$  °C) i oksigenira smjesom plinova (95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>) kako bi se u organskim bazenčićima osigurao i održavao stabilni parcijalni tlak kisika ( $565 \pm 35$  mmHg) i pH (7,35-7,40) otopine.

Dvije paralelne čelične žice provuku se kroz lumen prstena, od kojih se jedna fiksira za dno organskog bazenčića, a druga koncem poveže na pretvarač vlačne sile (FORT 10, World Precision Instruments, Berlin, Njemačka), radi mjerenja tonusa žilnog prstena (Slika 8).

Pretvarač sile spojen je na pojačalo (QUAD Bridge, ADInstruments, Castle Hill, Australija) i na analogno/digitalni pretvarač (MacLab/8e, ADInstruments), što s primjenom računalnog programa (CHART za Windows, verzija 4.2.4, ADInstruments) omogućava kontinuirani grafički prikaz žilnog tonusa i njegovih promjena.





**Slika 8.** Shema sustava za mjerenje tonusa izoliranog krvožilnog prstena.

Nulta napetost vaskularnih prstenova postavlja se na 20 mN. Na toj vrijednosti prstenovi se stabiliziraju 60 min s redovitim ispiranjem bazenčića svakih 15 min. Prstenovi se potom prekontrahiraju kontrolnom dozom noradrenalina ( $NA\ 10^{-7}\ \text{mol/L}$ ). Kada se postigne stabilni plato kontrakcije, očuvanost endotela se testira acetilkolinom ( $Ack\ 10^{-6}\ \text{mol/L}$ ). Relaksacija se izražava kao postotak smanjenja vazokonstrikcije uzrokovane noradrenalinom [132].

Isključivo prstenovi sa silom prekontrakcije većom od 10 mN i relaksacijom većom od 60% izlažu se kumulativnoj dozi (0,1 – 5%) ispitivanih uzoraka (N=135 prstenova; N=33 za standardno vino, te po N=34 za intaktno i oksidirano macerirano bijelo vino nakon 24 i 48 sati). Redoslijed i volumeni otopina koji se dodaju u bazenčiće (20mL) za ostvarivanje željenih koncentracija prikazani su u Tablici 4.

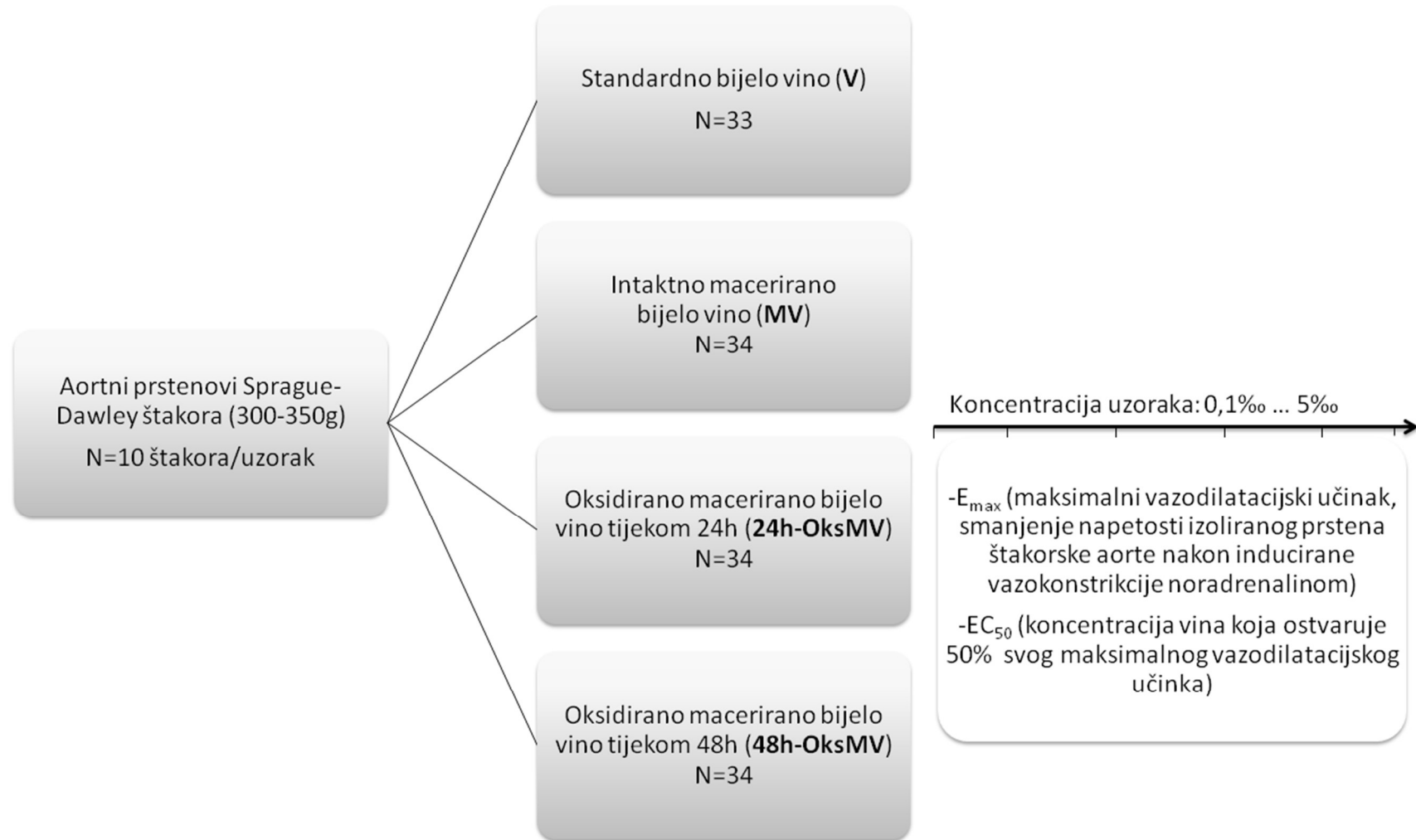
**Tablica 4.**

Protokol za ispitivanje vazodilatacijske aktivnosti vina nakon prekontrakcije noradrenalinom

Redoslijed	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Volumeni otopina	100 μL NA 10 <sup>-7</sup>	2 μL vina	4 μL vina	4 μL vina	4 μL vina	6 μL vina	10 μL vina	10 μL vina	10 μL vina	10 μL vina	20 μL vina	20 μL vina
	Stvarne koncentracije vina	n.p. 0,1 ‰	n.p. 0,3 ‰	n.p. 0,5 ‰	n.p. 0,7 ‰	n.p. 1 ‰	n.p. 1,5 ‰	n.p. 2 ‰	n.p. 2,5 ‰	n.p. 3 ‰	n.p. 4 ‰	n.p. 5 ‰

NA, noradrenalin; n.p., nije primjenjivo.

Glavna mjera ishoda je izravna vazodilatacijska aktivnost ispitivanih vina koja je ovisna o dozi i prikazana krivuljama doza-učinak. Učinkovitost ispitivanog vina kao izravnog vazodilatatora izražava se maksimalnim vazodilatacijskim učinkom ( $E_{max}$ , smanjenje napetosti izoliranog prstena štakorske aorte nakon inducirane vazokonstrukcije noradrenalinom), a njegova potentnost koncentracijom vina koja ostvaruje 50% svog maksimalnog vazodilatacijskog učinka,  $EC_{50}$ . Dijagram koji prikazuje uzorak aortnih prstenova, intervencije i mjere ishoda u istraživanju vazodilatacijskog učinka prikazan je na Slici 9.



**Slika 9.** Dijagram s opisom uzorka aortnih prstenova, intervencijama i mjerama ishoda u ispitivanju vazodilatacijskog učinka.

Sva istraživanja s pokusnim životinjama odobrena su od Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Splitu i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede u sklopu projekta „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“.

#### 4.6. Kemikalije

Deionizirana voda (Milli Q®, Waters Corp., Milford, MA, SAD) korištena je za pripremu svih otopina i reagensa. Acetonitril (HPLC  $\geq$  99%), metanol (HPLC  $\geq$  99%), etanol i aceton kupljeni su od Scharlau (Sentmenat, Barcelona, Španjolska). U Laboratoriju za organsku i organskometalnu kemiju Sveučilišta u Bordeaux-u sintetizirani su procijanidinski dimeri B3 (katehin-(4 $\alpha$ →8)-katehin) i B4 (katehin-(4 $\alpha$ →8)-epikatehin) [133]. Kalijev jodat i manganov sulfat koji se koriste u Briggs-Rauscher metodi kupljeni su od Kemike (Zagreb, Hrvatska), a vodikov peroksid (30%) od Gram-mola (Zagreb, Hrvatska). Sve kemikalije potrebne za pripremu Krebs – Henseleitove otopine dobivene su od tvrtke VWR Chemicals (Radnor, SAD), osim natrij-hidrogen karbonata koji je kupljen od tvrtke Panreac (Barcelona, Španjolska). Sve su ostale kemikalije i reagensi bili analitičkog stupnja čistoće i kupljeni od Sigma Aldrich (Saint Louis, SAD).

#### 4.7. Statistička analiza

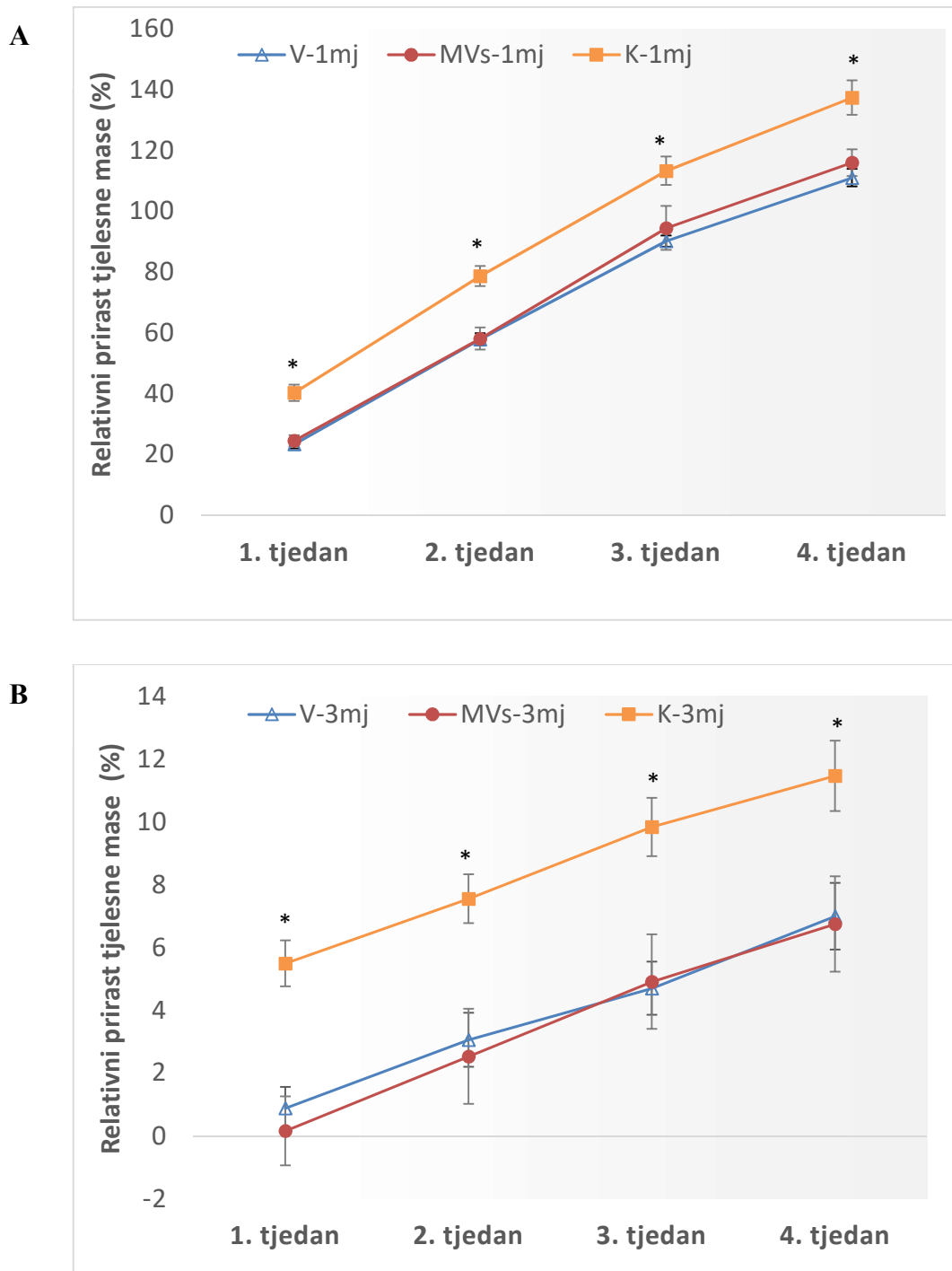
Minimalna veličina uzorka štakora za ispitivanje učinka bijelih vina na prirast tjelesne mase te aortnih prstenova za ispitivanje vazodilatacijske aktivnosti izračunata je primjenom programa G\*Power 3,1 (G\*Power, Dusseldorf, Njemačka). Rezultati prirasta tjelesne mase i maksimalni vazodilatacijski učinak prikazani su u obliku aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška sredine (SEM, engl. *standard error of mean*). EC<sub>50</sub> (engl. *half maximal effective concentration*) vrijednosti su izračunate nelinearnom regresijom i izražene kao aritmetička sredina s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*). Rezultati biokemijske analize i antioksidacijskog kapaciteta uzoraka vina *in vitro* izraženi su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD). Hipoteze prvog dijela istraživanja se testiraju primjenom *one-way* ANOVA testa i *post-hoc* Student *t*-testa koristeći SPSS (IBM SPSS Statistics verzija 24, New York, SAD) program, a drugog primjenom *two-way* ANOVA testa i *post-hoc* Tukey testa s razinom značajnosti  $P < 0,05$  koristeći GraphPrism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD).

## **5. Rezultati**

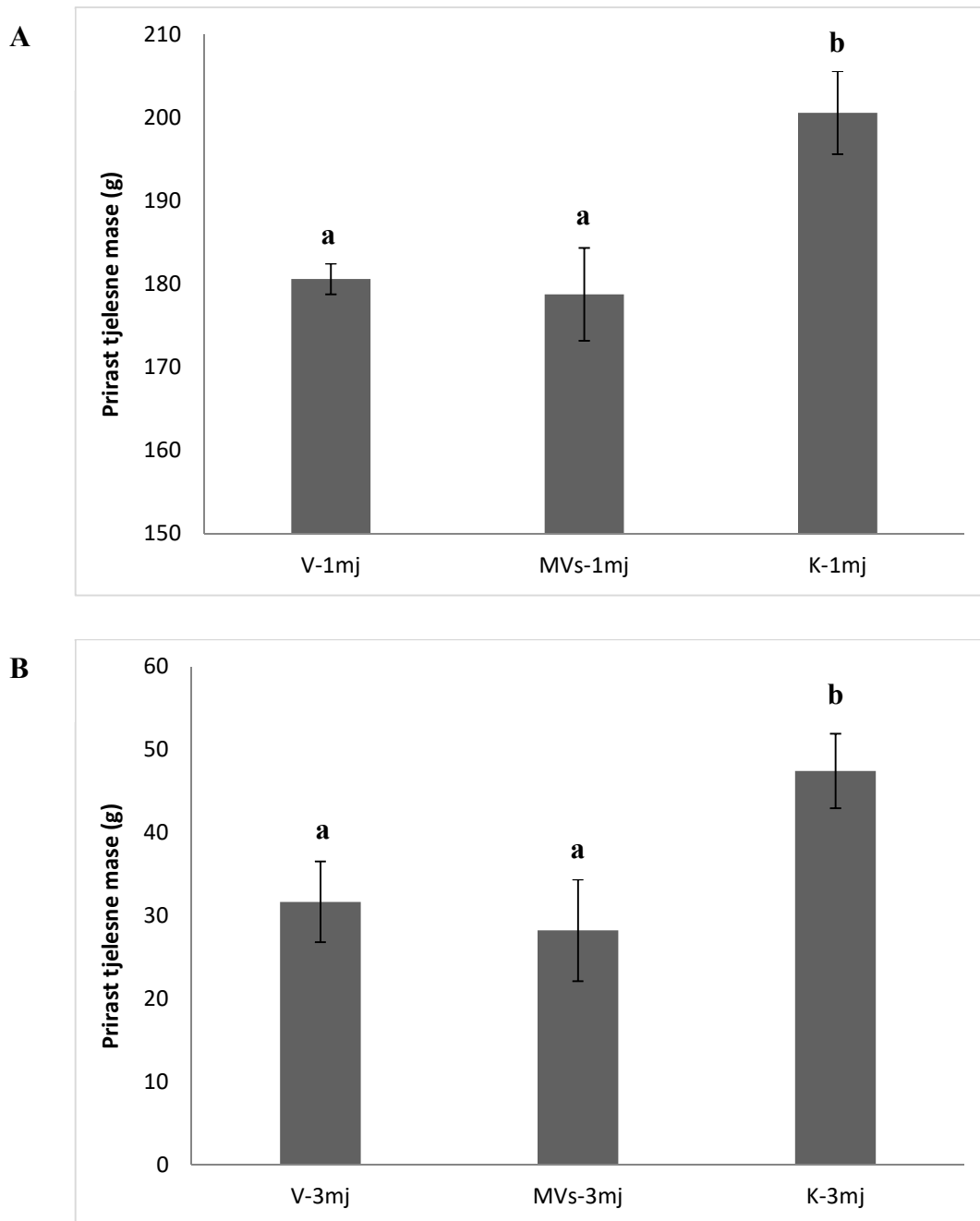
## 5.1. Prirast tjelesne mase

Početne tjelesne mase životinja u različitim skupinama obaju dobnih kategorija bile su slične, te su za mlađe životinje u tri pokusne skupine iznosile:  $164 \pm 4$  g (skupina koja konzumira standardno bijelo vino, V),  $155 \pm 3$  g (skupina koja konzumira macerirano bijelo vino sa sumporom, MVs) i  $147 \pm 3$  g (kontrolna skupina životinja koja pije samo vodu, K), dok su prosječne tjelesne mase u odgovarajućim skupinama starijih životinja istim redom bile:  $453 \pm 10$  g,  $439 \pm 9$  g,  $417 \pm 6$  g. Očekivano, brzina i vrijednost prirasta tjelesne mase u mlađih životinja bili su veći nego u starijih životinja. Međutim, u obje dobne kategorije životinje koje piju vino su manje porasle u tjelesnoj masi i na tjednoj i na kumulativnoj osnovi u usporedbi s kontrolnim životinjama koje piju samo vodu (Slika 10). U mlađih životinja prosječni apsolutni prirast tjelesne mase nakon četiri tjedna pokusa bio je  $181 \pm 2$  g za grupu koja pije standardno bijelo vino,  $179 \pm 6$  g za grupu s maceriranim bijelim vinom i  $201 \pm 5$  g za kontrolne životinje. Suprotno ostvarenoj razlici u prirastu tjelesne mase među životinjama koje piju vino i kontrolnih životinja, nije postojala statistički značajna razlika među životinjama koje piju standardno vino u odnosu na one koje piju macerirano vino ( $P = 0,024$  za V-1mj vs. K-1mj,  $P = 0,020$  za MV-1mj vs. K-1mj i  $P = 0,999$  za V-1mj vs. MVs-1mj, slika 11.A). U starijih životinja, ukupni prirast tjelesne mase iznosio je  $32 \pm 5$  g u skupini koja pije standardno bijelo vino,  $28 \pm 6$  g u skupini koja pije macerirano bijelo vino i  $47 \pm 4$  g u kontrolnoj skupini. Kao i u skupini mlađih životinja, nije bilo razlike u prirastu tjelesne mase između starijih životinja koje piju standardno u odnosu na one koje piju macerirano vino ( $P = 0,037$  za V-3mj vs. K-3mj,  $P = 0,029$  za MVs-3mj vs. K-3mj i  $P = 0,989$  za V-3mj vs. MVs-3mj, Slika 11.B).

Sve životinje koje piju vino konzumirale su manje hrane na tjednoj i kumulativnoj osnovi u usporedbi s kontrolnim životinjama, i to redom:  $154 \pm 2$  g (V-1mj),  $143 \pm 4$  g (MVs-1mj) i  $176 \pm 4$  g (K-1mj) tjedno za mlađe životinje i  $163 \pm 4$  g (V-3mj),  $149 \pm 4$  g (MVs-3mj) i  $178 \pm 10$  g (K-3mj) tjedno za starije životinje. Podaci o ukupnom unosu hrane nakon četiri tjedna ispitivanja prikazani su na Slici 12. za mlađe i starije životinje. Slično promjenama tjednog unosa hrane, i u ukupnom unosu hrane postoji razlika među životinjama koje piju vino i kontrolnim životinjama, ali bez razlike među grupama životinja koje piju standardno u odnosu na macerirano vino ( $P = 0,004$  za V-1mj vs. K-1mj,  $P < 0,001$  za MVs-1mj vs. K-1mj i  $P = 0,071$  za V-1mj vs. MVs-1mj,  $P = 0,026$  za V-3mj vs. K-3mj,  $P < 0,001$  za MVs-3mj vs. K-3mj i  $P = 0,079$  za V-3mj vs. MVs-3mj).

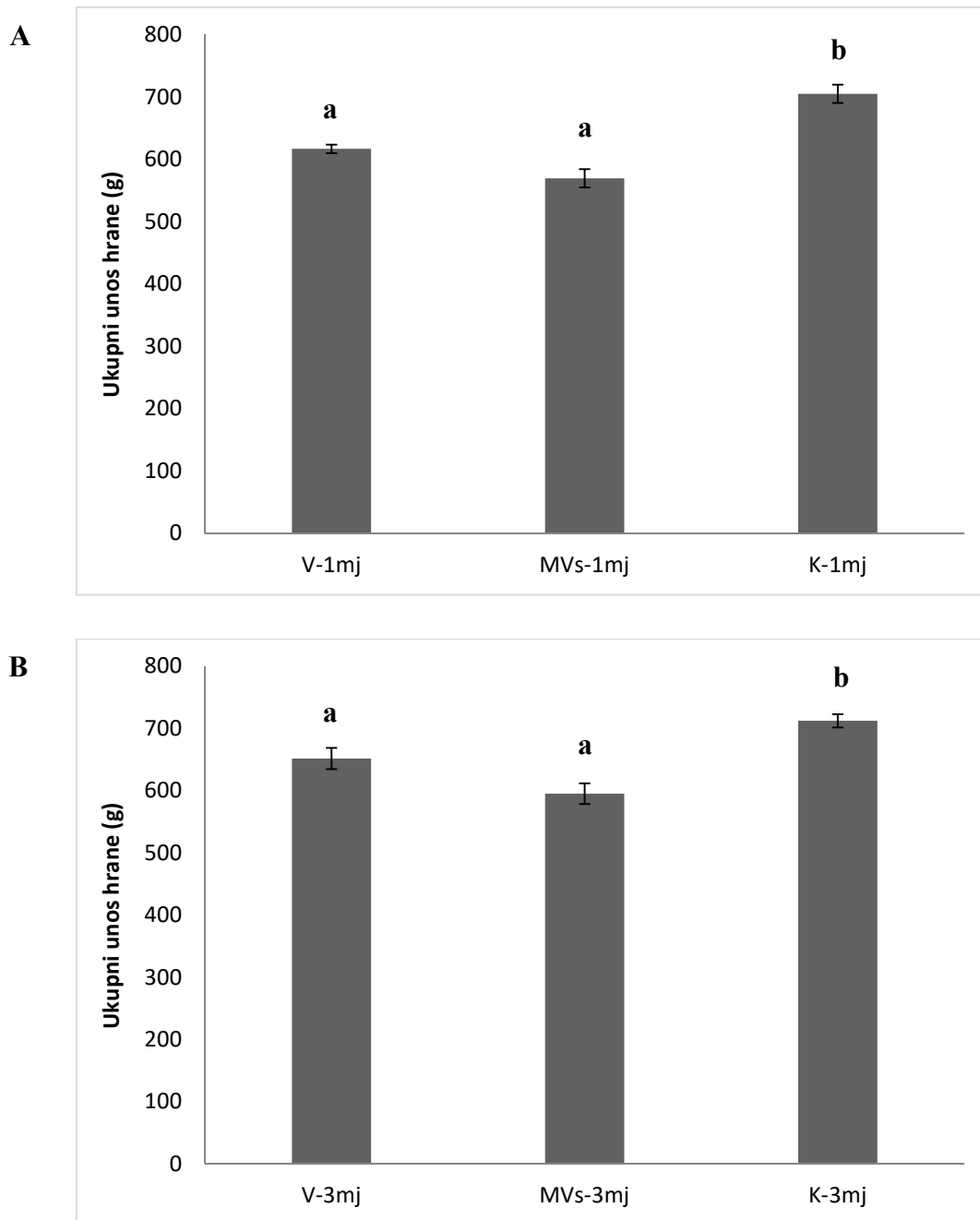


**Slika 10.** Relativni prirast tjelesne mase u mlađih (**A**) i starijih (**B**) štakora koji konzumiraju standardno bijelo vino (V) ili macerirano bijelo vino (MVs) i kontrolnih životinja koje konzumiraju samo vodu (K) tijekom četiri tjedna. Relativni prirast tjelesne mase izražen je kao postotak u odnosu na početnu tjelesnu masu. Budući da je kumulativni prirast tjelesne mase nakon četiri tjedna pokusa oko 10 puta veći u mlađih (1mj) nego u starijih (3mj) životinja, ordinatne skale nisu iste. \*  $P < 0,05$  za K vs. V i MVs u obje dobne kategorije.



**Slika 11.** Apsolutni prirast tjelesne mase u mlađih (**A**) i starijih (**B**) štakora koji konzumiraju standardno bijelo vino (V) ili macerirano bijelo vino (MVs) i kontrolnih životinja koje konzumiraju samo vodu (K) nakon četiri tjedna. Budući da je apsolutni prirast tjelesne mase nakon četiri tjedna pokusa oko četiri puta veći u mlađih (1mj) nego u starijih (3mj) životinja, ordinatne skale nisu iste. Različita slova označavaju statističku razliku među skupinama ( $P < 0,05$ ).





**Slika 12.** Ukupni unos hrane u mlađih (**A**) i starijih (**B**) štakora koji konzumiraju standardno bijelo vino (V) ili macerirano bijelo vino (MVs) i kontrolnih životinja koje konzumiraju samo vodu (K) nakon četiri tjedna. Različita slova označavaju statističku razliku među skupinama ( $P < 0,05$ ).

Uzimajući u obzir dnevni unos vina i ukupni unos tekućine, skupine V, MVs i K konzumiraju slične volumene bez obzira na dob životinja. Ukupni unos energije (UE) izračunat je kao zbroj kalorijske vrijednosti hrane i vina, gdje je primjenjivo, u svim skupinama životinja nakon četiri tjedna pokusa. Ukupni energetske unos bio je nešto niži u mlađih i starijih štakora koji konzumiraju macerirano bijelo vino u odnosu na sve ostale eksperimentalne skupine.

Kako bi se procijenio prirast tjelesne mase u odnosu na konzumiranu energiju, izračunali smo dodatnu mjeru ishoda kao omjer ova dva parametra. Ovu smo sekundarnu mjeru ishoda kojom opisujemo „učinkovitost konzumirane energije“ imenovali prirastom tjelesne mase po jedinici konzumirane energije, PTM/UE. Načelno, mlađe životinje imaju znatno veći PTM/UE nego starije. Učinkovitost konzumirane energije nije se, međutim, razlikovala između životinja iste dobi bez obzira na vrstu konzumiranog pića. U Tablici 5. prikazani su sažeti podaci o dnevnom unosu vina, ukupnom unosu tekućine, ukupnom unosu energije i prirastu tjelesne mase po jedinici konzumirane energije.

**Tablica 5.**

Prosječni unos tekućina, UE i PTM/UE u svim eksperimentalnim grupama životinja

	Dnevni unos vina	Ukupni unos		
		tekućine (vino+voda)	UE	PTM/UE
	mL/d	mL/d	kJ	g/kJ
V-1mj	10 ± 1	30 ± 1	11088,4 ± 126,4	0.0163 ± 0.0003
MVs-1mj	11 ± 1	30 ± 1	10380,1 ± 205,0*	0.0172 ± 0.0004
K-1mj	n.p.	33 ± 1	11657,5 ± 244,8	0.0173 ± 0.0004
V-3mj	15 ± 2	29 ± 2	12097,6 ± 315,5	0.0026 ± 0.0004
MVs-3mj	11 ± 1	30 ± 1	10808,1 ± 282,4*	0.0025 ± 0.0005
K-3mj	n. p.	32 ± 1	11776,7 ± 179,5	0.0040 ± 0.0004

n.p., nije primjenjivo; UE, ukupni unos energije; PTM/UE, prirast tjelesne mase po jedinici konzumirane energije; V, životinje koje konzumiraju standardno bijelo vino, MVs, macerirano bijelo vino i K, kontrolne životinje koje konzumiraju samo vodu, mlađe (1mj) i starije (3mj) dobi. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± SEM. \* P < 0,05 za MVs-1mj i MVs-3mj vs. skupine u istoj dobnoj kategoriji.

### 5.3. Biokemijska analiza vina

Rezultati biokemijske analize svih istraživanih vina koji uključuju ukupne fenole te koncentracije flavonoida i neflavonoida prikazani su u Tablici 6. Rezultati za vina iz drugog dijela istraživanja koji uključuju HPLC i UPLC analizu flavanola, njihovih dimera i fenolnih kiselina prikazani su u Tablici 7, a produkata fluoroglucinoloze, mDP, %P i %G u Tablici 8. 'Smeđenje' vina nakon izlaganja zraku i rezultati mjerenja apsorbancije uzoraka vina na 420 nm prikazani su na Slikama 13. i 14., te u Tablici 9.

Proces maceracije rezultirao je s više od 8 puta većim ukupnim sadržajem fenola u odnosu na standardno bijelo vino (Tablica 6). Oksidacija maceriranog vina izlaganjem zraku do 48 sati dovela je do značajne promjene boje vina od jantarne do tamno smeđe (Slike 13. i 14., Tablica 9). Ukupni sadržaj fenola ostao je, međutim, stabilan i nije se mijenjao pod utjecajem oksidacije i promjene boje vina (Tablica 6). Sličan fenomen opažen je u sadržaju monomera flavan-3-ola, katehina i epikatehina. Međutim, porast njihove koncentracije uslijed maceracije bio je od 10 do 40 puta veći u odnosu na odgovarajuće standardno bijelo vino (Tablica 7).

Promatrajući sadržaj dimera flavanola, samo koncentracija dimera B3 nije porasla s maceracijom. Ukupni učinci oksidacije i promjene boje vina na koncentraciju ispitivanih dimera u maceriranom vinu bili su neznatni. Samo diskretne promjene povezane s 48-satnom oksidacijom, ali različitog smjera, uočene su kod dimera B2 i B3 koji na kraju nisu imali učinka na ukupni sadržaj dimera. U slučaju fenolnih kiselina, postupak maceracije je načelno bio povezan s povećanjem njihovog sadržaja, ali s različitim utjecajem na koncentraciju pojedinih kiselina. Tako je proporcionalno najveće povećanje u odnosu na standardno bijelo vino zabilježeno za koncentracije galne i siringične kiseline. Ipak, kaftarična kiselina ostala je dominantni cinamat u standardnom i maceriranom bijelom vinu. Izloženost vina zraku i povezano 'smeđenje' ni u ovom slučaju nisu uzrokovali zamjetnu promjenu u sadržaju bilo koje od ispitivanih fenolnih kiselina (Tablica 7).

Srednji stupanj polimerizacije proantocijanidina u maceriranom vinu bio je nizak (1,7) i nije se mijenjao tijekom 48 sati oksidacije. Analiza produkata fluoroglucinolize iz proantocijanidina i kondenziranih tanina u maceriranom vinu pokazala je da je relativna prisutnost galatnih estera (%G) dvostruko veća od one prodelfinidinskih produkata (%P) (Tablica 8).

**Tablica 6.**

Ukupni fenoli, flavonoidi i neflavonoidi u uzorcima vina

		V	MVs	MV	24h-OksMV	48h-OksMV
Ukupni fenoli	mg GAE/L	305 ± 3*	2850 ± 35	2699 ± 8	2676 ± 13	2612 ± 6
Flavonoidi	mg GAE/L	3*	2477	2492	2492	2449
Neflavonoidi	mg GAE/L	302 ± 2	373 ± 3	207 ± 2	184 ± 1	163 ± 6

Rezultati su srednja vrijednost najmanje tri neovisna mjerenja i prikazani su kao aritmetička sredina ± SD. Koncentracija flavonoida je izračunata kao razlika između koncentracije ukupnih fenola i koncentracije neflavonoida; GAE, ekvivalenti galne kiseline; \* P < 0,05, Student *t*-test; V, standardno bijelo vino; MVs, macerirano bijelo vino sa sumporom; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.

**Tablica 7.**

Flavanoli i fenolne kiseline u uzorcima vina

		V	MV	24h-OksMV	48h-OksMV
<i>Flavanoli i njihovi dimeri</i>					
katehin	mg CE/L	5,14 ± 0,11*	65,34 ± 1,46	69,41 ± 0,37	69,51 ± 0,28
epikatehin	mg CE/L	1,16 ± 0,02*	42,48 ± 0,10	43,56 ± 0,80	44,73 ± 0,02
dimer B1	mg CE/L	2,78 ± 0,15*	37,15 ± 0,42	39,18 ± 0,18	39,89 ± 0,06
dimer B2	mg CE/L	1,17 ± 0,01*	9,29 ± 0,02	7,01 ± 0,43	6,66 ± 0,01
dimer B3	mg CE/L	2,12 ± 0,05*	1,13 ± 0,01	1,12 ± 0,03	1,45 ± 0,01
dimer B4	mg CE/L	2,62 ± 0,11*	23,02 ± 0,26	24,41 ± 0,12	25,33 ± 0,03
Σ monomeri	mg CE/L	6,30 ± 0,13*	107,8 ± 1,6	113,0 ± 1,2	114,2 ± 0,3
Σ dimeri	mg CE/L	8,70 ± 0,01*	70,60 ± 0,67	71,73 ± 0,11	73,33 ± 0,02
<i>Derivati hidroksibenzojeve kiseline</i>					
galna kiselina	mg GAE/L	2,18 ± 0,01*	20,67 ± 0,03	20,72 ± 0,01	20,61 ± 0,28
siringična kiselina	mg GAE/L	2,60 ± 0,01*	20,76 ± 0,28	20,59 ± 0,34	20,65 ± 0,08

*Derivati hidroksicimetne kiseline*

kafeinska kiselina	mg CAE/L	3,42 ± 0,10*	7,34 ± 0,01	7,48 ± 0,06	7,33 ± 0,23
kaftarična kiselina	mg CAE/L	25,43 ± 0,31*	43,54 ± 0,25	44,11 ± 0,04	44,67 ± 0,10
cis-kutarična kiselina	mg CAE/L	1,53 ± 0,01	1,90 ± 0,03	1,59 ± 0,53	1,58 ± 0,52
trans-kutarična kiselina	mg CAE/L	3,00 ± 0,05	3,45 ± 0,02	3,55 ± 0,04	3,38 ± 0,02
cis-ferulična kiselina	mg CAE/L	1,93 ± 0,02*	2,82 ± 0,04	3,24 ± 0,04	4,32 ± 0,04
trans-ferulična kiselina	mg CAE/L	3,29 ± 0,01*	5,19 ± 0,02	5,19 ± 0,01	5,07 ± 0,03

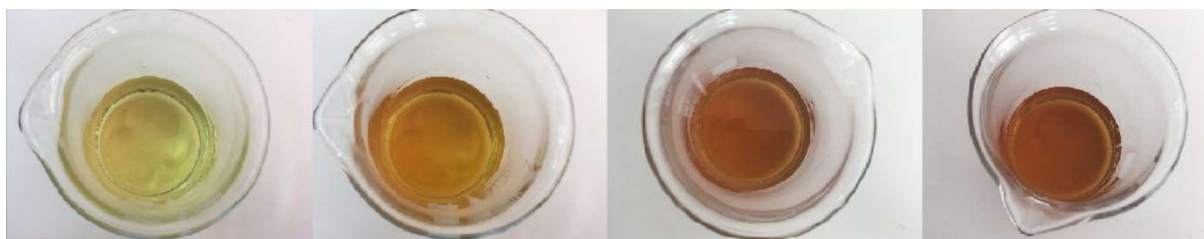
Rezultati su srednja vrijednost najmanje dva neovisna mjerenja i prikazani su kao aritmetička sredina ± SD. GAE, ekvivalenti galne kiseline; CE, ekvivalenti katehina; CAE, ekvivalenti kafeinske kiseline. \*P < 0,05 vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV. V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.

**Tablica 8.**

mDP, %P i %G u uzorcima vina

	V	MV	24h-OksMV	48h-OksMV
mDP	nd	1,7 ± 0,01	1,7 ± 0,03	1,7 ± 0,01
%P	nd	11,9 ± 0,12	10,5 ± 0,34	11,3 ± 0,23
%G	nd	24,2 ± 0,06	24,1 ± 0,28	22,9 ± 0,72

Rezultati su srednja vrijednost najmanje dva neovisna mjerenja i prikazani su kao aritmetička sredina ± SD. mDP, srednji stupanj polimerizacije proantocijanidina; %P, udio prodelfinidina; %G, udio estera s galnom kiselinom. \* P < 0,05 vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV. V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.



**A**

**B**

**C**

**D**

**Slika 13.** Graševina, vinarija Krauthaker, Kutjevo, berba 2015. godine, u laboratoriju Zavoda za temeljnu i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

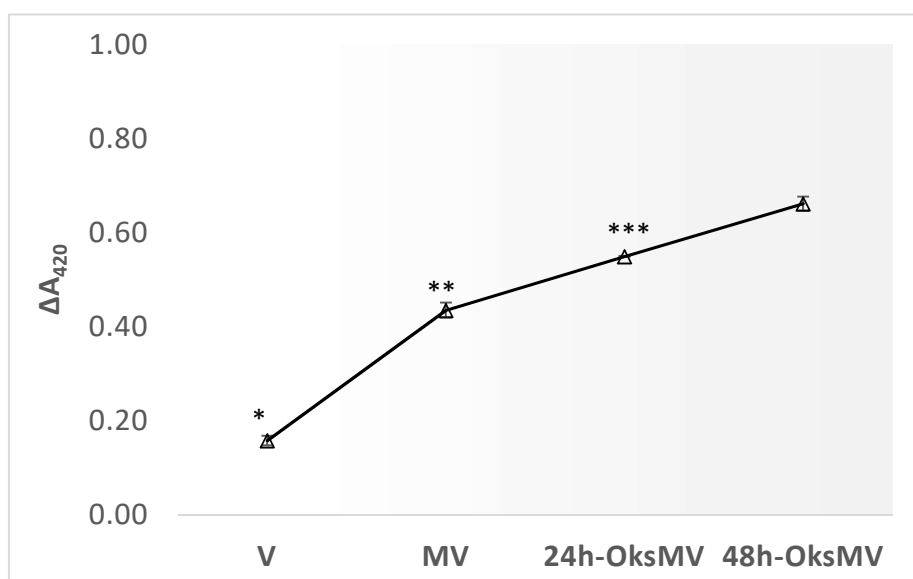
Uzorci standardnog bijelog vina (A), intaktnog macerirano bijelog vina (B), oksidiranog maceriranog bijelog vina nakon izlaganja zraku 24h (C) i 48h (D).

**Tablica 9.**

Apsorbancije uzoraka vina na 420 nm

V	MV	24h-OksMV	48h-OksMV
$0.159 \pm 0.010^*$	$0.436 \pm 0.016^{**}$	$0.550 \pm 0.001^{***}$	$0,662 \pm 0.015$

Rezultati su srednja vrijednost dva neovisna mjerenja i prikazani su kao aritmetička sredina  $\pm$  SD. \*  $P < 0,05$  vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV, \*\*  $P < 0,05$  vs. 24h-OksMV i 48h-OksMV, \*\*\*  $P < 0,05$  vs. 48h-OksMV. V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.



**Slika 14.** Apsorbancija uzoraka vina na 420 nm ( $\Delta A_{420}$ ) vs. 13% etanol u McIlvine puferu (pH 4,0). \*  $P < 0,05$  vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV, \*\*  $P < 0,05$  vs. 24h-OksMV i 48h-OksMV, \*\*\*  $P < 0,05$  vs. 48h-OksMV. V, standardno bijelo vino MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.

### 5.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijski kapacitet ispitivanih bijelih vina značajno se razlikovao između standardnog bijelog vina i svih uzoraka maceriranog bijelog vina (Tablica 10). Ovisno o metodi određivanja, antioksidacijski kapacitet maceriranog bijelog vina bio je veći od 5 do gotovo 45 puta u odnosu na standardno bijelo vino. Uspoređujući različite metode mjerenja, vidljivo je da je FRAP vrijednost standardnog bijelog vina bila mnogo niža od vrijednosti dobivenih drugim testovima koji su koristili isti kalibracijski standard (Slika 15). S postupkom maceracije, razlika između FRAP vrijednosti i vrijednosti dobivenih drugim testovima je nestala. S druge strane, ORAC vrijednosti i za standardno i za macerirano vino bile su kontinuirano veće nego u drugim testovima (Slika 15). Izlaganje zraku i 'smeđenje' nisu uzrokovali značajne promjene u antioksidacijskom učinku maceriranih uzoraka bez obzira na korištenu metodu.

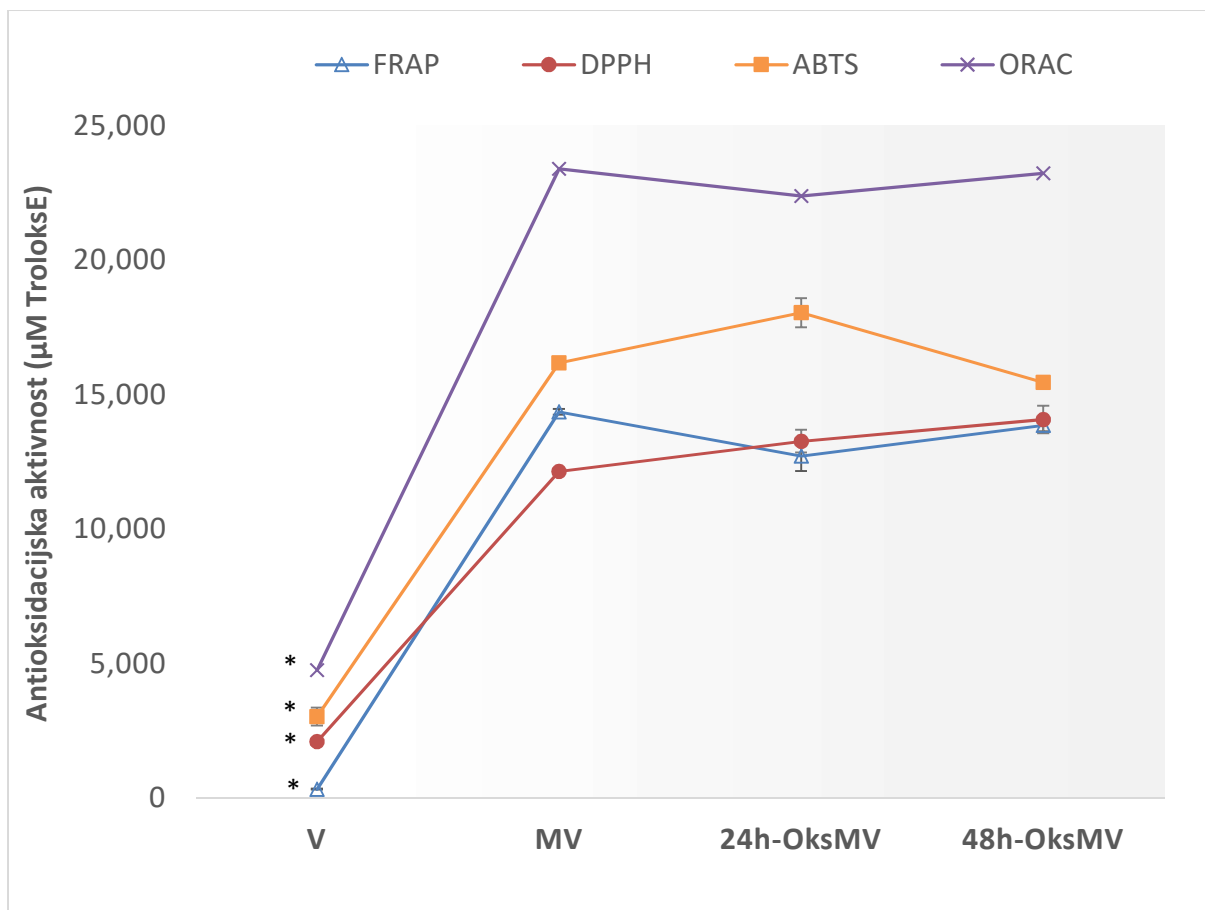
**Tablica 10.**

Antioksidacijska aktivnost pokusnih vina

		V	MV	24h-OksMV	48h-OksMV
FRAP	$\mu\text{M}$ TroloksE	$336,7 \pm 15,2^*$	$14362,6 \pm 107,7$	$12721,2 \pm 560,6$	$13856,8 \pm 221,6$
DPPH	$\mu\text{M}$ TroloksE	$2103,3 \pm 115,6^*$	$12145,0 \pm 100,0$	$13271,7 \pm 422,2$	$14078,3 \pm 511,1$
ABTS	$\mu\text{M}$ TroloksE	$3037,5 \pm 333,3^*$	$16178,6 \pm 125,0$	$18047,6 \pm 539,7$	$15458,3 \pm 222,2$
ORAC	$\mu\text{M}$ TroloksE	$4756,7 \pm 41,2^*$	$23398,3 \pm 308,0$	$22381,2 \pm 673,6$	$23229,4 \pm 447,3$
BR	min	$0,25 \pm 0,07^*$	$5,15 \pm 0,21$	$6,66 \pm 1,19$	$6,73 \pm 1,03$

Rezultati su srednja vrijednost četiri neovisna mjerenja i prikazani su kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

\*  $P < 0,05$  vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV. TroloksE, ekvivalenti troloksa; FRAP, engl. *ferric reducing antioxidant power*; DPPH, engl. *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl*; ABTS, engl. *2,2'-azinobis-3-ethyl-benzo-thiazoline-6-sulfonic acid*; ORAC, engl. *oxygen radical absorbance capacity*; ORAC, engl. *oxygen radical absorbance capacity*; BR, Briggs – Raucher metoda; V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.



**Slika 15.** Grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti ispitivanih vina spektrofotometrijskim metodama s istim kalibracijskim standardom. \*  $P < 0,05$  vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV. TroloksE, ekvivalenti troloksa; FRAP, engl. *ferric reducing antioxidant power*; DPPH, engl. *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl*; ABTS, engl. *2,2'-azinobis-3-ethyl-benzo-thiazoline-6-sulfonic acid*; ORAC, engl. *oxygen radical absorbance capacity*; ORAC, engl. *oxygen radical absorbance capacity*; V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.



#### 5.4. Vazodilatacijska aktivnost

Bazalna napetost aortnih prstenova (n=135) nakon izlaganja noradrenalinu bila je  $16,3 \pm 0,4$  mN. Sva ispitivana vina pokazala su izravan vazodilatacijski učinak ovisan o dozi na prekontrahiranim aortnim prstenovima. Maksimalni vazodilatacijski učinak,  $E_{max}$  standardnog bijelog vina bio je više od 6 puta niži u usporedbi s intaktnim maceriranim bijelim vinom ( $14,9 \pm 2,8$  % za V vs.  $98,4 \pm 2,9$  % za MV). Sukladno tome, intaktna macerirana graševina također je pokazala snažniju vazodilatacijsku potentnost izraženu kao koncentracija uzorka koja je potrebna za postizanje 50 % maksimalnog učinka,  $EC_{50}$  ( $0,50$  ‰ za MV vs.  $1,62$  ‰ za V). Izlaganje maceriranog vina zraku 24 i 48 sati nije rezultiralo promjenom maksimalnog vazodilatacijskog učinka ( $92,5 \pm 2,7$  % za 24h-OksMV i  $93,7 \pm 4,1$  % za 48h-OksMV, Tablica 11, Slike 16. i 17.).

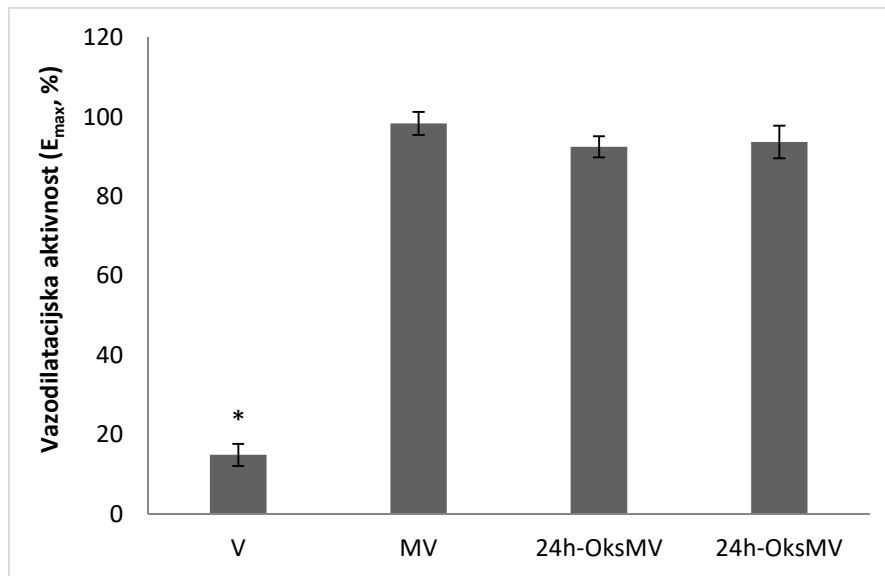
Međutim, pri najnižim koncentracijama (do 1 ‰) uočene su značajne razlike u vazodilatacijskoj aktivnosti između uzoraka intaktnog i oksidiranog maceriranog vina (Slika 17). To se također odrazilo na veću vazodilatacijsku potentnost intaktnog maceriranog vina u usporedbi s oksidiranim uzorcima ( $EC_{50}$  od  $0,50$  ‰ za MV,  $0,57$  ‰ za 24h-OksMV i  $0,65$  ‰ za 48h-OksMV). Pri višim koncentracijama te su razlike u vazodilatacijskoj aktivnosti između intaktnog i oksidiranog maceriranog vina nestale.

**Tablica 11.**

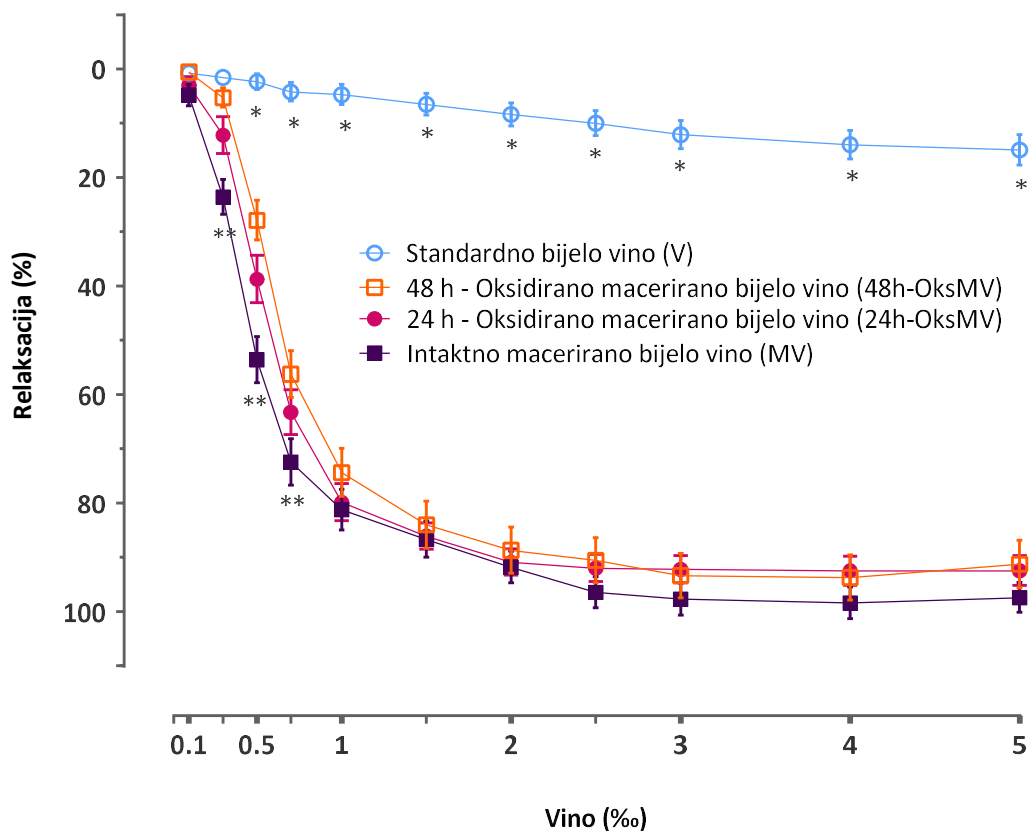
Vazodilatacijska aktivnost pokusnih vina izražena s  $E_{max}$  i  $EC_{50}$

	V	MV	24h-OksMV	48h-OksMV
$E_{max}$ (%)	$14,9 \pm 2,8^*$	$98,4 \pm 2,9$	$92,5 \pm 2,7$	$93,7 \pm 4,1$
$EC_{50}$ (95 % CI)(‰)	$1,62^*$ (1,24-2,11)	$0,50^{**}$ (0,46-0,54)	$0,57^{***}$ (0,54-0,60)	$0,65$ (0,61-0,69)

$E_{max}$ , maksimalni vazodilatacijski učinak izražen kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM;  $EC_{50}$ , koncentracija vina koja ostvaruje 50% svog maksimalnog vazodilatacijskog učinka, izračunata je nelinearnom regresijom i izražena kao aritmetička sredina s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*). \*  $P < 0,05$  vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV, \*\*  $P < 0,05$  vs. 24h-OksMV i 48h-OksMV, \*\*\*  $P < 0,05$  vs. 48h-OksMV. V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.



**Slika 16.** Maksimalni vazodilacijski učinak pokusnih vina nakon prekontrakcije noradrenalinom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV, V, standardno bijelo vino; MV, macerirano bijelo vino bez sumpora; 24h/48h-OksMV, oksidirano macerirano bijelo vino nakon izlaganja zraku 24h/48h.



**Slika 17.** Vazodilacija štakorskih aortnih prstenova prekontraahiranih noradrenalinom nakon izlaganja pokusnim vinima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  vs. MV, 24h-OksMV i 48h-OksMV, \*\*  $P < 0,05$  vs. 24h-OksMV i 48h-OksMV. (N=33 prstena za V, N=34 prstena po MV/24h-OksMV/48h-OksMV uzorcima).

## **6. Rasprava**

## 6.1. Učinci bijelog vina na prirast tjelesne mase štakora

Jedan od ključnih rezultata našeg istraživanja je utvrđivanje povezanosti konzumacije bijelog vina s manjim prirastom tjelesne mase štakora u odnosu na životinje koje piju samo vodu nakon četiri tjedna pokusa. Ovi su rezultati u skladu s nekoliko drugih istraživanja koja su izvijestila o istoj pojavi u štakora i miševa kao posljedici konzumacije crnog vina i vodene otopine etanola [46-49]. Nadalje, po prvi put smo pokazali da to vrijedi i za mlade, brzo-rastuće životinje, kao i za starije životinje koje su bile blizu platoa svoje tjelesne mase. Dodatan rezultat je povezanost konzumacije vina sa smanjenim unosom hrane u obje dobne kategorije (Slika 12.) što upućuje na zaključak da se kalorije unesene hranom djelomično nadoknađuju dodatnim kalorijama iz vina.

Kako nije uočena razlika između učinaka konzumacije standardnog bijelog vina i maceriranog bijelog vina bogatog polifenolima na prirast tjelesne mase i unos hrane, pretpostavlja se da su u ovom biološkom učinku vinski fenoli od sekundarnog značaja u odnosu na ostale sastojke vina. Etanol ima važnu ulogu kao potencijalni čimbenik u prirastu tjelesne mase. Uloga etanola u prirastu tjelesne mase dokazana je u studiji Monteiro i suradnika. U ovoj su studiji štakori koji su konzumirali crno vino i vodenu otopinu etanola odgovarajuće koncentracije imali manji prirast tjelesne mase i manji unos hrane u usporedbi s kontrolnim životinjama, dok razlike između učinaka crnog vina bogatog polifenolima i etanola nije bilo [49].

Zanimljivo je da je u našoj studiji ukupni unos energije, dobiven zbrajanjem kalorija iz hrane i vina, bio statistički manji u životinja koje konzumiraju macerirano bijelo vino. Ovo se djelomično može objasniti njihovom tendencijom da konzumiraju manje hrane u usporedbi sa životinjama koje piju standardnu graševinu, iako taj nalaz nije statistički potvrđen. Već se pokazalo da polifenoli mogu biti uključeni u kontrolu apetita djelovanjem na središnji živčani sustav koji nadzire želju za hranom i osjećaj sitosti [51]. S druge strane, nije bilo razlike u iskorištenju energije za prirast tjelesne mase (PTM/UE) između pokusnih i kontrolnih životinja iste dobne kategorije, bez obzira na vrstu konzumiranog pića. To se jednostavno može objasniti time što su životinje koje su manje jele, manje i porasle u tjelesnoj masi, pa su na kraju eksperimenta imale sličan prirast tjelesne mase po jedinici konzumirane energije.

Važno je napomenuti kako su sve životinje dnevno konzumirale slične ukupne volumene tekućine, čime je ostvaren bitan preduvjet za usporedbu mjera ishoda među skupinama. Donekle paradoksalna činjenica da su mlađe životinje, iako tri puta manje tjelesne mase od starijih životinja, konzumirale slične količine i tekućine i hrane (Tablica 5. i Slika 12.),

zapravo je samo rezultat njihove nekoliko puta veće stope rasta. Drugim riječima, proporcionalno veća potrošnja hrane i tekućine nužna je kako bi se održavao veći metabolički obrtaj kod mlađih, brzo-rastućih životinja. Ovo je također potvrđeno njihovim (više puta) većim prirastom tjelesne mase po jedinici konzumiranih kalorija u odnosu na starije životinje (prikazano u Tablici 5.). S druge strane, stabilan unos tekućine i hrane u starijih životinja potreban je za održavanje njihovih osnovnih metaboličkih potreba.

Uklanjanjem razlika između ispitivanih vina, koje bi mogle biti posljedica razlika u sorti grožđa, uvjetima rasta vinove loze uključujući teren na kojem raste ili vrijeme berbe, postalo je moguće izolirati i objektivnije odrediti utjecaj tehnologije proizvodnje vina i sadržaja polifenola na istraživane učinke. Rezultati ove studije, međutim, nisu potvrdili bitnu ulogu fenola u vinu na prirast tjelesne mase životinja. Iako u našem istraživanju nismo izravno ispitivali učinke etanola, naši rezultati sugeriraju važnu ulogu etanola u prirastu tjelesne mase. Slično je izvijestilo nekoliko drugih autora [46, 47, 49] koji su pokazali da etanol općenito (proučavan sam ili u odnosu na crno vino) nije bio povezan s povećanim prirastom tjelesne mase u životinja.

Ispitanici koji umjereno konzumiraju alkoholna pića (ljudi ili životinje) često imaju značajno niži prirast tjelesne mase u usporedbi s onima koji uopće ne konzumiraju alkoholna pića. Bez obzira na niz zbunjujućih čimbenika koji utječu na ovaj zaključak (npr. fizička aktivnost ispitanika), još uvijek je moguće da se radi i o neposrednom fiziološkom učinku etanola iz alkoholnih pića [134].

Epidemiološke studije pokazuju da energija unesena etanolom ne ulazi u kalkulaciju ili se barem značajno razlikuje od drugih izvora energije. Kao što je navedeno, etanol se ne može pohraniti poput drugih pravih nutrijenata i uvijek je prva komponenta koja se metabolizira. Kada se alkoholno piće konzumira uz obrok, upravo etanol automatski postaje prioritetni supstrat i privremeno odgađa jetreni oksidacijski metabolizam ugljikohidrata i masti. Unos alkohola iz pića može tako potencijalno smanjiti oksidaciju drugih supstrata maksimalno do 50% [135]. Ovo je ujedno razlog zbog kojeg očekujemo da konzumacija alkoholnih pića dovodi do pohranjivanja masti s obzirom da je inhibirana njihova oksidacija. Ovaj se biokemijski slijed i dalje povezuje s manjim prirastom tjelesne mase u usporedbi s pohranjivanjem ugljikohidrata u obliku glikogena nakon pretjerane konzumacije šećera. Stoga se zaključuje da se energija pohranjena na ovaj način može učinkovitije iskoristiti [28]. Uz to, termogeni je učinak etanola prilično velik i u zdravih ljudi koji umjereno konzumiraju

alkoholna pića iznosi između 15% i 25%. U usporedbi s mastima gdje je taj učinak oko 13% i ugljikohidratima, 8%, pretpostavlja se da se veći dio energije iz etanola iskorištava za povećanje topline tijela, ali i za sagorijevanje kalorija iz druge hrane [40, 41]. Etanol također utječe i na simpatički živčani sustav te smanjuje koncentraciju glukoze u krvi inhibicijom glukoneogeneze u jetri [136]. Ipak, postoje dokazi i da alkoholno piće uz obrok smanjuje beta-oksidaciju masnih kiselina i koncentracije leptina u krvi u usporedbi s hranom iste kalorijske vrijednosti [137].

Iako naša studija nije usredotočena na mehanizme kojima bi etanol mogao djelovati na promjenu tjelesne mase, ipak donosi dodatne eksperimentalne dokaze uloge etanola. Model konzumacije vina koji smo izabrali usporediv je s modelom umjerenog dobrovoljnog pijenja iz studije Arola i sur. [138] u kojoj su životinje imale slobodan pristup vinu, bez stresnih tretmana i nefiziološke konzumacije vina (kao npr. metodom gastrične lavaže). Osobito je važno napomenuti da količina konzumiranog vina u našem istraživanju, u smislu udjela u ukupnom unosu energije (oko 8%), približno odgovara doprinosu alkoholnih pića ukupnom energetsom unosu u ljudi koji umjereno konzumiraju alkoholna pića zajedno s hranom [35], zbog čega zaključci opisanog istraživanja mogu vrijediti i za ljudsku populaciju.

Konačno, postoji dobar razlog za odabir vina kao ispitivanog alkoholnog pića budući da je ono nezaobilazna sastavnica kulture mediteranske prehrane. Za razliku od crnog vina, prema našim najboljim saznanjima, učinci bijelog vina na prirast tjelesne mase štakora dosad nisu uopće ispitivani.

Unatoč provedenom istraživanju i dalje su potrebna nova kako bi se istražio točan mehanizam u podlozi nepovezanosti umjerenе konzumacije vina i prirasta tjelesne mase i kako bi se jasno razlučila uloga etanola i polifenola. Iako naši rezultati upućuju na ključnu ulogu etanola, zbog činjenice da su životinje obje dobne skupine koje su konzumirale macerirano bijelo vino bogato polifenolima imale manji ukupni energetske unos u odnosu na životinje koje su konzumirale standardno vino i kontrolne životinje, ostaju otvorena pitanja o ulozi i sudjelovanju polifenola u energetske metaboličkim procesima, osobito nakon dužeg perioda umjerenе konzumacije.

## 6.2. Učinci bijelog vina na *in vitro* antioksidacijsku i vazodilatacijsku aktivnost

Ključni rezultat ove studije je da oksidacija maceriranog bijelog vina nezaštićenog sumporom nije utjecala na njegovu maksimalnu izravnu vazodilatacijsku i antioksidacijsku aktivnost unatoč intenzivnom 'smeđenju' i promjenama organoleptičkih svojstava. Ovaj je rezultat u suprotnosti sa studijama koje su pokazale da pojavom smeđe boje (većim  $\Delta A_{420}$ ) oksidiranih standardnih bijelih vina proporcionalno pada njihov *in vitro* antioksidacijski učinak [91, 92]. Iako specifični smeđi produkti nisu u potpunosti okarakterizirani, postoje snažni dokazi da su vinski fenoli, osobito oni koji sadrže 1,2-difenolne skupine, primarni supstrati uključeni u reakcije oksidacije i 'smeđenja' [20, 59, 67, 139]. U slučaju bijelih vina, flavanoli (kao što su katehin, epikatehin i njihovi oligomeri - proantocijanidini) i hidroksicinamati (prvenstveno kafeinska kiselina i njezin konjugat, kaftarična kiselina) glavni su razredi fenola i ujedno prvi koji se oksidiraju [20, 72]. Dobiveni kinoni mogu biti supstrati u daljnjim reakcijama s nukleofilnim spojevima (uključujući i druge fenole), što postupno vodi nastanku stvarnog pigmenta [20, 59, 65, 67, 139].

Detaljna analiza fenolnog sastava i sadržaja uzoraka vina doista potvrđuje da su hidroksicinamati, i to najviše kaftarična kiselina, dominantni fenolni spojevi u standardnom bijelom vinu (Tablica 7). Proces maceracije očekivano je rezultirao velikim povećanjem ukupnog sadržaja fenola. Dok se sadržaj hidroksicinamata otprilike udvostručio, kaftarična kiselina ostala je dominantni cinamat. Promjene koje se odnose na flavanole bile su mnogo izraženije s obzirom da se njihov sadržaj povećao 10 - 40 puta u odnosu na sadržaj u standardnom bijelom vinu (Tablica 7). Dostupnost velikog broja fenolnih reaktanata, uz odsustvo sumpornog dioksida, zapravo stvara povoljno okruženje za proces oksidacije i povezanog 'smeđenja'. U takvim uvjetima, moglo bi se očekivati da će oksidacija fenola kao glavnih antioksidansa u vinu utjecati na antioksidacijski kapacitet vina, kao što je pokazano za standardna bijela vina [91, 92]. Valja napomenuti, međutim, da reakcije između oksidiranih fenola mogu rezultirati stvaranjem novih antioksidanata, što otežava predviđanje antioksidacijske aktivnosti vina nakon izlaganja zraku [92]. Naime, kinoni nastali oksidacijom polifenola stupaju u reakciji s drugim fenolima i proizvode dimere ili polimere koji mogu „preurediti“ svoju strukturu i tako dovesti do stvaranja novih difenola. Takvi spojevi imaju niži redoks potencijal i podložniji su oksidaciji od svojih početnih molekula [65]. Dodatno, predloženo je da oksidacija tih produkata rezultira ubrzanjem procesa polimerizacije [69, 139].

Ipak, izgleda da se rezultati našeg istraživanja ne mogu u potpunosti objasniti opisanim fenomenima. Naime, udio monomera i dimera flavan-3-ola nije bio pod utjecajem 48-satne oksidacije, i monomeri su ostali dominantni spojevi. Osim toga, vrijednost srednjeg stupnja polimerizacije flavanolnih frakcija u ispitivanim uzorcima bijelog vina ostala je niska i nije se mijenjala s razvojem oksidacije i 'smeđenja' (Tablica 8). Analiza produkata razgradnje flavanolnih oligomera u reakciji s floroglucinolom očekivano je pokazala veći udio estera s galnom kiselinom, %G, galata, u odnosu na produkte prodelfinidina, %P, galokatehina (Tablica 8). Iako su galati koji prvenstveno potječu iz sjemenki grožđa manje topljivi spojevi i proizvede se sporije u usporedbi s galokatehinima i prodelfinidima koji se nalaze samo u kožicama grožđa, dugi period maceracije ispitivanog vina omogućio je dovoljno vremena za značajnu ekstrakciju i galatnih estera [20, 140, 141].

Činjenica da je macerirano bijelo vino bez sumpora nakon izlaganja zraku 48 sati razvilo intenzivnu smeđu boju (Slike 13. i 14.), a nije značajno promijenilo svoj antioksidacijski kapacitet, zapravo privlači znanstvenu pozornost. Važno je napomenuti da je ovaj rezultat dobiven svim provedenim analizama unatoč njihovim različitim mehanizmima procjene antioksidacijskog kapaciteta.

Rezultati pokazuju da je vrijednost FRAP-a za standardno bijelo vino bila nekoliko puta manja od vrijednosti dobivenih drugim testovima (a s istim kalibracijskim standardom), što ukazuje na to da se polifenoli sadržani u ovom vinu uglavnom ponašaju kao „hvatači“ radikala (dokazano koristeći DPPH, ABTS, ORAC testove), više nego reducensi. Kvalitativne i kvantitativne promjene u fenolnom sastavu koje su se s druge strane dogodile tijekom maceracije rezultirale su pomakom FRAP vrijednosti 'bliže' prema vrijednostima drugih testova (Tablica 10., Slika 15).

Uspoređujući vrijednosti ABTS i DPPH testova, koji su vrlo slični u mehanizmima procjene antioksidacijske aktivnosti, redovito su uočene više ABTS vrijednosti. Sličan rezultat u istraživanjima drugih autora objašnjen je većim afinitetom ABTS reagensa za reakcije s fenolnim spojevima koji su u našim vinima dominantne sastavnice [89, 142].

Što se tiče ORAC testa, njegove vrijednosti bile su konstantno najviše u usporedbi s ostala tri testa koja su koristila isti kalibracijski standard. To može biti djelomično zbog činjenice da je ORAC jedini test koji koristi površinu ispod krivulje za kvantifikaciju rezultata. Osim toga, moguće je da su naši uzorci vina imali najveći afinitet za peroksil radikale na čijem se



uklanjanju temelji ova metoda. Zbog toga se ujedno ORAC može smatrati biološki relevantnijim testom kada se uzme u obzir zastupljenost peroksil radikala kao oksidansa u brojnim biološki važnim reakcijama [88].

Iako cilj ovog istraživanja nije bio objasniti kemijske mehanizme odgovorne za tamnjenje vina, a očuvan antioksidacijski kapacitet, utvrđeno je da se macerirana vina u tom smislu ne ponašaju kao standardna bijela vina. Budući da se reakcije oksidacije fenola prirodno odvijaju sporo, naša hipoteza je da vrijeme od 48 sati izlaganja zraku nije bilo dovoljno da se iscrpi značajan dio oksidabilnih fenola koji su inicijalno obilno prisutni u maceriranom vinu.

U skladu su s tom pretpostavkom i rezultati o vazodilatacijskoj aktivnosti ispitivanih vina. Naime, kada se vina primjenjuju u višim koncentracijama, nije uočena nikakva razlika između intaknog (MV) i oksidiranih uzoraka maceriranog vina (24h- i 48-OksMV), jer su svi izazvali sličnu maksimalnu vazodilataciju (Slike 16. i 17.). Ovi rezultati ukazuju na to da su svi uzorci maceriranog vina prisutni u velikim koncentracijama u bazenčiću s izoliranim organom osigurali dovoljnu količinu očuvanih fenola s vazodilatacijskim učinkom. S druge strane, pri višim razrjeđenjima (koncentracija vina u bazenčiću  $\leq 1\%$ ), kada su fenoli prisutni u znatno manjim koncentracijama, postala je očita šteta uzrokovana izlaganjem zraku i posljedičnom promjenom boje. U takvim se uvjetima intaktno macerirano vino pokazalo učinkovitijim od oksidiranih uzoraka. Štoviše, vazodilatacijska potentnost oksidiranih uzoraka sve više slabi s trajanjem izlaganja zraku, što se pokazuje povećanjem  $EC_{50}$  vrijednosti u odnosu na intaktno macerirano vino (Tablica 11).

Standardno bijelo vino ostvarilo je manji izravni vazodilatacijski učinak. Iako postoji samo nekoliko studija koje istražuju vazodilatacijske učinke bijelih vina, naši su rezultati u potpunosti u skladu s ranijim istraživanjima Fitzpatricka i Flescha [111, 112] koji su pokazali znatno slabije vazodilatacijske učinke bijelih vina u usporedbi s crnima. U provedenoj studiji, čak i najveće doze standardnog bijelog vina nisu izazvale značajnu vazorelaksaciju. Ovaj je rezultat očekivan imajući u vidu i nizak sadržaj fenola bijelih vina, ali i to da su u standardnom bijelom vinu upravo fenolne kiseline i njihovi konjugati dominantni fenolni spojevi. U prijašnjim istraživanjima u našem laboratoriju već je pokazan slab vazodilatacijski učinak za spektar fenolnih kiselina čak i kada se primjenjuju u mnogo većim koncentracijama od onih koje se mogu pronaći u vinu [119]. Macerirana vina, s druge strane, pokazala su veći izravni vazodilatacijski odgovor koji je rezultatski više usporediv s učinkom crnih vina [112,

143]. Štoviše, i ukupni sadržaj fenola u maceriranom vinu bio je usporediv s onim u crnim vinima [86, 144].

Važno je napomenuti da su koncentracije etanola u bazenčićima s izoliranim organom u primijenjenim količinama vina bile u rasponu koncentracija koje se mogu očekivati u ljudskoj plazmi nakon umjerene konzumacije vina [117]. Osim etanola, i koncentracije fenola postignute pri primijenjenim volumenima vina bile su usporedive s koncentracijama u krvi ispitanika nakon umjerene konzumacije vina [145, 146]. Upravo je raspon korištenih doza u provedenom istraživanju prednost naše studije naspram istraživanja gdje su koncentracije ispitivane *in vitro* previsoke i nespojive s onima koje se postižu *in vivo* nakon konzumacije vina.

Neki su autori već pokušali povezati jednu komponentu vina s ostvarenim vazodilatacijskim učinkom, pogotovo iz skupine fenolnih spojeva, uključujući npr. oligomere procijanidina tipa B [147]. Iako je naše macerirano vino bogato procijanidinima, smatramo da se složeni biološki učinak vodeno-alkoholne smjese, kao što je vino, ne može pripisati samo jednoj fenolnoj frakciji. Ovo je potvrđeno rezultatima studija provedenih na staničnim kulturama ljudskog endotela koji su pokazali da je najveći postignuti stimulacijski učinak na eNOS bio doista ostvaren primjenom mješavine polifenolnih spojeva koji sinergistički induciraju ekspresiju i promotorsku aktivnost enzima [148, 149].

U nastojanju da se ustanovi značaj i moguća povezanost rezultata antioksidacijske i vazodilatacijske aktivnosti, dvaju različitih bioloških učinaka ispitivanih vina, važno je istaknuti njihovu komplementarnost *in vivo*. Činjenica je da se ovi procesi događaju istovremeno i jedan na drugoga utječu izravno i neizravno, upućuju na zaključak da se antioksidacijski i vazodilatacijski učinci ne bi trebali promatrati zasebno. Najvažnije mjesto gdje vinski fenoli mogu izravno djelovati kao kemijski antioksidansi je gastrointestinalni sustav. Tu tijekom probave lokalno nastaju toksični hidroperoksidi koji se nakon apsorpcije ponašaju kao proupalni medijatori uzrokujući postprandijalni oksidativni stres i oštećenje vaskularnog endotela. Već je pokazano da konzumacija vina uz obrok može spriječiti stvaranje i apsorpciju produkata lipidne peroksidacije iz hrane [150, 151] i ublažiti oksidativni stres i oštećenje vaskularnog endotela uzrokovano obrocima s visokim udjelom masti [152, 153]. Na staničnoj razini pokazalo se da fenoli iz vina štite NO od razgradnje zbog svoje antioksidacijske aktivnosti uklanjanjem superoksidnih radikala i inhibicijom NADPH oksidaze [154]. Osim toga, fenoli mogu spriječiti "rasprezanje" eNOS enzima, fenomena koji

je uključen u oštećenje endotela u različitim bolestima, a posredovan oksidacijom eNOS kofaktora tetrahidrobiopterina, putem kojeg enzim preusmjerava svoju aktivnost s korisne proizvodnje NO prema štetnoj proizvodnji superoksidnih radikala [107].

Konačno, svjesni smo da kratko vrijeme izlaganja naših uzoraka zraku predstavlja ograničenje studije jer možemo očekivati da bi se s produženim vremenom oksidacije dogodile i značajnije promjene, kako u kemijskom sastavu vina, tako i u biološkoj aktivnosti. Unatoč tome naši se rezultati mogu translirati u svakodnevni život i imaju praktično značenje utoliko što se macerirano bijelo vino uz vidno promijenjena svojstva nakon izlaganja zraku ne treba odbaciti kao bezvrijedno, barem ne neposredno nakon otvaranja.

## **7. Zaključci**

1. Konzumacija bijelog vina tijekom četiri tjedna nije dovela do većeg prirasta tjelesne mase štakora u usporedbi s prirastom tjelesne mase štakora koji su konzumirali samo vodu.
2. Kako nema razlike u prirastu tjelesne mase između štakora koji konzumiraju standardno i macerirano bijelo vino, odlučujuću ulogu u prirastu tjelesne mase vjerojatno nemaju polifenoli.
3. Unos hrane manji je u životinja koje konzumiraju vino, a ukupan energetska unos manji je u životinja koje konzumiraju macerirano vino u odnosu na sve ostale životinje. Dio energije iz hrane kompenzira se unosom vina u štakora, a polifenoli vina doprinose ovom učinku.
4. Štakori mlađe životne dobi imaju značajno veći apsolutni i relativni prirast tjelesne mase i bolju iskoristivost konzumirane energije u odnosu na starije štakore.
5. Postupak produljene maceracije utjecao je na sastav i sadržaj polifenola te je rezultirao boljom antioksidacijskom i vazodilatacijskom aktivnošću maceriranog vina *in vitro* u usporedbi sa standardnim bijelim vinom.
6. Izlaganje maceriranog vina zraku do 48 sati nije značajno promijenilo kemijski sastav vina unatoč promjeni boje od jantarne do tamno smeđe ('smeđenje' vina).
7. 'Smeđenje' maceriranog vina uzrokovano izlaganjem zraku do 48 sati nije povezano sa slabljenjem antioksidacijskog učinka niti maksimalnog vazodilatacijskog učinka.
8. Kad se oksidirana macerirana vina primjene u malim koncentracijama *in vitro*, raspoloživost je vazoaktivnih fenola ograničena i ostvaruje se slabiji vazodilatacijski učinak u odnosu na intaktno vino. Uzorak maceriranoga vina koji je bio dulje izložen zraku ima najmanju vazodilatacijsku potentnost.

## **8. Znanstveni doprinos**

Alkohol iz vina još se uvijek promatra kao značajan izvor energije visoke kalorijske vrijednosti i potencijalni rizični čimbenik za razvoj pretilosti. U našoj je studiji utvrđeno da konzumacija bijelih vina ne dovodi do povećanog prirasta tjelesne mase štakora. Ovi su rezultati novost jer dosad nisu istraživana bijela vina te su dodatni argument za odbacivanje hipoteze o povezanosti umjerene konzumacije bijelog vina s prirastom tjelesne mase. Model konzumacije vina u našem istraživanju u kojem životinje imaju slobodan pristup vinu, bez stresnih postupaka i nefiziološke konzumacije (kao npr. intragastrična lavaža), rezultira unosom energije iz vina usporedivim s onim kod umjerene konzumacije vina u ljudi. U tom smislu opisana studija predstavlja primjenjivo translacijsko istraživanje. Na kontroliranom animalnom modelu, rezultati donose nove podatke o tome kompenzira li se dio energije iz hrane unosom vina te predstavlja li dob pokusnih životinja važan čimbenik prirasta tjelesne mase. S obzirom da se značajan dio bioloških učinaka vina pripisuje polifenolima iz njegova sastava, obje naše studije ispituju njihovu ulogu uspoređujući učinke standardnog bijelog vina siromašnog polifenolima s onima maceriranog vina, bogatog polifenolima.

Naše drugo istraživanje ispituje antioksidacijski i vazodilatacijski učinak kao dodatne biološke učinke bijelih vina. Kako bi zaključci o antioksidacijskom učinku vina bili što mjerodavniji, za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta korišteno je pet metoda koje su utemeljene na različitim kemizmima. Potentan izravni vazodilatacijski učinak maceriranih bijelih vina ukazuje na mehanizme očuvanja vaskularne funkcije povezane s umjerenim pijenjem vina. Konačno, prema našim spoznajama, ne postoje istraživanja opisana u svjetskoj literaturi koja ispituju povezanost organoleptičkih promjena maceriranog vina zbog izlaganja zraku s gubitkom njegovih bioloških učinaka. Budući da je opisana situacija česta u svakodnevnom životu, rezultati istraživanja praktično su primjenjivi.

S epidemiološkog aspekta naša istraživanja imaju značajni znanstveni doprinos obzirom na porast pretilosti i bolesti koje su s njom povezane, uključujući i kardiovaskularne bolesti. Uz to, opisana istraživanja u skladu su sa svjetskim trendovima u smislu etnofarmakološkog pristupa istraživanjima biološki potentnije hrane, a ostvareni rezultati predstavljaju poticaj kulturi umjerenosti, zdrave prehrane te proizvodnji biološki vrjednije hrane.

## **9. Kratki sažetak**



## UČINCI BIJELOG VINA NA PRIRAST TJELESNE MASE ŠTAKORA TE NA *IN VITRO* ANTIOKSIDACIJSKU I VAZODILATACIJSKU AKTIVNOST

Biološki učinci bijelih, a napose maceriranih bijelih vina jantarne boje i bogatog polifenolnog sadržaja, rijetko su istraživani. Stoga smo u ovom istraživanju ispitali i usporedili učinke standardnog i maceriranog bijelog vina na prirast tjelesne mase štakora te njihovu antioksidacijsku i vazodilatacijsku aktivnost *in vitro*. Prirast tjelesne mase ispitivan je u mlađih, brzo-rastućih, i starijih štakora koji su dosegli plato svoje težine. Štakori obje dobne skupine koji konzumiraju vino unose manje hrane i imaju manji prirast tjelesne mase u odnosu na štakore koji konzumiraju samo vodu. Ukupni je energetske unos najmanji u štakora koji konzumiraju macerirano vino. U usporedbi s intaktnim, macerirano je vino bolji antioksidans, što je potvrđeno primjenom više metoda utemeljenih na različitim mehanizmima, i bolji izravni vazodilatator noradrenalinom prekontrahiranih aortnih prstenova štakora. Međutim, macerirana vina, proizvedena bez konzervansa, podložna su oksidaciji. Stoga smo dodatno istražili utjecaj oksidacije povezane s izlaganjem maceriranog vina zraku do 48h na njegov kemijski sastav i *in vitro* biološke učinke. Unatoč 'smeđenju', kemijski sastav oksidiranih vina nije se značajno promijenio u odnosu na intaktno, a antioksidacijski i maksimalni vazodilatacijski učinci ostali su očuvani. Međutim, pri najnižim koncentracijama, kod ograničene raspoloživosti vazoaktivnih fenola, oksidirana macerirana vina ostvarila su, razmjerno duljini izloženosti zraku, slabiju vazodilataciju.

## **10. Summary**

## **EFFECTS OF WHITE WINE ON RATS WEIGHT AND *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND VASODILATORY ACTIVITY**

Biological effects of white, and particularly amber-colored macerated white wines rich in polyphenolic content, are rarely investigated. Therefore, in this study, we examined and compared the effects of standard and macerated white wine on rats weight gain and their *in vitro* antioxidative and vasodilating activity. Body weight gain was studied in younger, fast-growing, and older rats that almost reached their weight plateau. In both age categories, wine-drinking animals consumed less food and gained less weight in comparison to water-only drinking controls. Total energy intake was the lowest in macerated wine-drinking rats. In comparison to standard, macerated wine was better antioxidant, as confirmed by several methods based on different mechanisms, and more effective direct vasodilator of noradrenaline-precontracted rat aortic rings. However, macerated wine produced without preservatives is highly susceptible to oxidation. Therefore, we additionally investigated the effects of oxidation associated with its exposure to air for up to 48h on its chemical composition and *in vitro* biological activities. Despite 'browning', chemical composition of oxidized wines did not change significantly in comparison to intact, and their antioxidant and maximal vasodilatory effects remained preserved. However, at low concentrations, when availability of vasoactive phenols was limited, vasodilatory potency increasingly weakened with exposure to air.

## **11. Popis literature**

1. Gronbaek, M., et al., *Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits*. BMJ, 1995. 310(6988): p. 1165-9.
2. Poli, A., et al., *Moderate alcohol use and health: a consensus document*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013. 23(6): p. 487-504.
3. Chiva-Blanch, G., et al., *Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies*. Alcohol Alcohol, 2013. 48(3): p. 270-7.
4. van Bussel, B.C.T., et al., *Alcohol and red wine consumption, but not fruit, vegetables, fish or dairy products, are associated with less endothelial dysfunction and less low-grade inflammation: the Hoorn Study*. Eur J Nutr, 2018. 57(4): p. 1409-1419.
5. Chiva-Blanch, G., et al., *Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial*. Clin Nutr, 2013. 32(2): p. 200-6.
6. Tousoulis, D., et al., *Acute effects of different alcoholic beverages on vascular endothelium, inflammatory markers and thrombolysis system*. Clin Nutr, 2008. 27(4): p. 594-600.
7. Chiva-Blanch, G., et al., *Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial*. Am J Clin Nutr, 2012. 95(2): p. 326-34.
8. Sacanella, E., et al., *Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial*. Am J Clin Nutr, 2007. 86(5): p. 1463-9.
9. Mansvelt, E.P., et al., *The in vivo antithrombotic effect of wine consumption on human blood platelets and hemostatic factors*. Ann N Y Acad Sci, 2002. 957: p. 329-32.
10. Arranz, S., et al., *Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer*. Nutrients, 2012. 4(7): p. 759-81.
11. Del Rio, D., et al., *Polyphenols and health: what compounds are involved?* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. 20(1): p. 1-6.
12. Silva, A.R., et al., *The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures*. Cell Biol Toxicol, 2008. 24(1): p. 75-86.
13. Ferguson, P.J., et al., *A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines*. J Nutr, 2004. 134(6): p. 1529-35.

14. Hsu, H.Y., et al., *Cell death induced by flavonoid glycosides with and without copper*. Food Chem Toxicol, 2008. 46(7): p. 2394-401.
15. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr, 2005. 81(1 Suppl): p. 230S-242S.
16. Baghaturia, N.S., *Georgian winemaking. Theory and Practice*. private ed2010: Tbilisi Odishvili Z.G.
17. Ruzic, I., et al., *Phenolic content and antioxidant potential of macerated white wines*. Eur Food Res Technol, 2011. 233(3): p. 465-472.
18. Lukic, I., et al., *Phenolic and Aroma Composition of White Wines Produced by Prolonged Maceration and Maturation in Wooden Barrels*. Food Technol Biotechnol, 2015. 53(4): p. 407-418.
19. Hernandez-Jimenez, A., et al., *Effect of Ethanol on Grape Seed Proanthocyanidin Extraction*. Am J Enol Viticult, 2012. 63(1): p. 57-61.
20. Waterhouse, A.L., *Wine phenolics*. Ann N Y Acad of Sci, 2002. 957: p. 21-36.
21. Zanchi, D., et al., *Colloidal dispersions of tannins in water-ethanol solutions*. Langmuir, 2007. 23(20): p. 9949-59.
22. Fernandes, I., et al., *Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention*. Molecules, 2017. 22(2).
23. Abdelaal, M., C.W. le Roux, and N.G. Docherty, *Morbidity and mortality associated with obesity*. Ann Transl Med, 2017. 5(7): p. 161.
24. Haslam, D.W. and W.P. James, *Obesity*. Lancet, 2005. 366(9492): p. 1197-209.
25. Yeomans, M.R., *Alcohol, appetite and energy balance: is alcohol intake a risk factor for obesity?* Physiol Behav, 2010. 100(1): p. 82-9.
26. Suter, P.M., E. Hasler, and W. Vetter, *Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: is alcohol a risk factor for obesity?* Nutr Rev, 1997. 55(5): p. 157-71.
27. Poli, A., et al., *Moderate alcohol use and health: A consensus document*. Nutr Metab Cardio Dis, 2013. 23(6): p. 487-504.
28. Suter, P.M., *Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity?* Crit Rev Clin Lab Sci, 2005. 42(3): p. 197-227.
29. Wannamethee, S.G. and A.G. Shaper, *Alcohol, body weight, and weight gain in middle-aged men*. Am J Clin Nutr, 2003. 77(5): p. 1312-7.

30. Lahti-Koski, M., et al., *Associations of body mass index and obesity with physical activity, food choices, alcohol intake, and smoking in the 1982-1997 FINRISK Studies*. Am J Clin Nutr, 2002. 75(5): p. 809-17.
31. Liu, S., et al., *A prospective study of alcohol intake and change in body weight among US adults*. Am J Epidemiol, 1994. 140(10): p. 912-20.
32. Wang, L., et al., *Alcohol consumption, weight gain, and risk of becoming overweight in middle-aged and older women*. Arch Intern Med, 2010. 170(5): p. 453-61.
33. Wannamethee, S.G., et al., *Alcohol intake and 8-year weight gain in women: a prospective study*. Obes Res, 2004. 12(9): p. 1386-96.
34. Traversy, G. and J.P. Chaput, *Alcohol Consumption and Obesity: An Update*. Curr Obes Rep, 2015. 4(1): p. 122-30.
35. Westerterp-Plantenga, M.S. and C.R. Verwegen, *The appetizing effect of an aperitif in overweight and normal-weight humans*. Am J Clin Nutr, 1999. 69(2): p. 205-12.
36. Tremblay, A. and S. St-Pierre, *The hyperphagic effect of a high-fat diet and alcohol intake persists after control for energy density*. Am J Clin Nutr, 1996. 63(4): p. 479-82.
37. Tremblay, A., et al., *Alcohol and a high-fat diet: a combination favoring overfeeding*. Am J Clin Nutr, 1995. 62(3): p. 639-44.
38. *Critique 160: Do the calories in alcoholic beverages lead to increased obesity?* . 2015 [cited 2019 30. ožujka ]; Available from: <http://alcoholresearchforum.org/critique-160-do-the-calories-in-alcohol-lead-to-increased-obesity-23-march-2015/>.
39. Lieber, C.S., *Perspectives: do alcohol calories count?* Am J Clin Nutr, 1991. 54(6): p. 976-82.
40. Sonko, B.J., et al., *Effect of alcohol on postmeal fat storage*. Am J Clin Nutr, 1994. 59(3): p. 619-25.
41. Murgatroyd, P.R., et al., *Alcohol and the regulation of energy balance: overnight effects on diet-induced thermogenesis and fuel storage*. Br J Nutr, 1996. 75(1): p. 33-45.
42. Suter, P.M., E. Jequier, and Y. Schutz, *Effect of ethanol on energy expenditure*. Am J Physiol, 1994. 266(4 Pt 2): p. R1204-12.
43. Sayon-Orea, C., et al., *Type of alcoholic beverage and incidence of overweight/obesity in a Mediterranean cohort: the SUN project*. Nutrition, 2011. 27(7-8): p. 802-8.
44. Sayon-Orea, C., M.A. Martinez-Gonzalez, and M. Bes-Rastrollo, *Alcohol consumption and body weight: a systematic review*. Nutr Rev, 2011. 69(8): p. 419-31.

45. Beulens, J.W., et al., *The effect of moderate alcohol consumption on fat distribution and adipocytokines*. Obesity (Silver Spring), 2006. 14(1): p. 60-6.
46. Aguiar, A.S., V.A. Da-Silva, and G.T. Boaventura, *Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats?* Braz J Med Biol Res, 2004. 37(6): p. 841-6.
47. Smith, R.R., et al., *Ethanol consumption does not promote weight gain in female mice*. Ann Nutr Metab, 2008. 53(3-4): p. 252-9.
48. Vadillo, M., et al., *Moderate red-wine consumption partially prevents body weight gain in rats fed a hyperlipidic diet*. J Nutr Biochem, 2006. 17(2): p. 139-42.
49. Monteiro, R., et al., *Red wine increases adipose tissue aromatase expression and regulates body weight and adipocyte size*. Nutrition, 2009. 25(6): p. 699-705.
50. Vanhees, K., et al., *You are what you eat, and so are your children: the impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring*. Cell Mol Life Sci, 2014. 71(2): p. 271-85.
51. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. 404(6778): p. 661-71.
52. Ali, F., A. Ismail, and S. Kersten, *Molecular mechanisms underlying the potential antiobesity-related diseases effect of cocoa polyphenols*. Mol Nutr Food Res, 2014. 58(1): p. 33-48.
53. Rupasinghe, H.P., et al., *Phytochemicals in regulating fatty acid beta-oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss*. Pharmacol Ther, 2016. 165: p. 153-63.
54. Tan, Y., S.K.C. Chang, and Y. Zhang, *Comparison of alpha-amylase, alpha-glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera*. Food Chem, 2017. 214: p. 259-268.
55. Terra, X., et al., *Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet*. J Nutr Biochem, 2009. 20(3): p. 210-8.
56. Yasuda, A., et al., *Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet*. Biofactors, 2008. 33(3): p. 211-23.
57. Ardevol, A., et al., *Changes in lipolysis and hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes*. Int J Obesity, 2000. 24(3): p. 319-324.
58. Tadera, K., et al., *Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2006. 52(2): p. 149-53.



59. Waterhouse, A.L. and V.F. Laurie, *Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses*. Am J Enol Viticult, 2006. 57: p. 306-313.
60. Atanasova, V., et al., *Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making*. Anal Chim Acta, 2002. 458(1): p. 15-27.
61. Castellari, M., et al., *Evolution of phenolic compounds in red winemaking as affected by must oxygenation*. Amer J Enol Viticult, 1998. 49(1): p. 91-94.
62. Singleton, V.L., *Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications*. Amer J Enol Viticult, 1987. 38(1): p. 69-77.
63. Singleton, V.L., E. Trousdale, and J. Zaya, *Oxidation of Wines .1. Young White Wines Periodically Exposed to Air*. Amer J Enol Viticult, 1979. 30(1): p. 49-54.
64. Fitzhugh, O.G., L.F. Knudsen, and A.A. Nelson, *The chronic toxicity of sulfites*. J Pharmacol Exp Ther, 1946. 86(1): p. 37-48.
65. Li, H., A. Guo, and H. Wang, *Mechanisms of oxidative browning of wine*. Food Chem, 2008. 108(1): p. 1-13.
66. Yang, W.H. and E.C.R. Purchase, *Adverse Reactions to Sulfites*. Canad Med Assoc J, 1985. 133(9): p. 865-&.
67. Kilmartin, P.A., *The Oxidation of Red and White Wines and its Impact on Wine Aroma*. Chemistry in New Zealand, 2009. 73(2): p. 18-22.
68. M., C., et al., *Effects of different enological treatments on dissolved oxygen in wines*. Ital J Food Sci, 2004. 16: p. 387-396.
69. Singleton, V.L., et al., *Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine*. Amer J Enol Viticult, 1985. 36(1): p. 50-56.
70. Drinkine, J., et al., *Analysis of ethylidene-bridged flavan-3-ols in wine*. J Agric Food Chem, 2007. 55(4): p. 1109-1116.
71. Danilewicz, J.C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*. Amer J Enol Viticult, 2003. 54(2): p. 73-85.
72. Baron, R., et al., *Comparative study of browning and flavan-3-ols during the storage of white sherry wines treated with different fining agents*. J Sci Food Agric, 2000. 80(2): p. 226-230.
73. Rigaud, J., et al., *Influence of Must Composition on Phenolic Oxidation-Kinetics*. J Sci Food Agric, 1991. 57(1): p. 55-63.

74. Shahidi, F. and Y. Zhong, *Measurement of antioxidant activity*. J Funct Foods, 2015. 18: p. 757-781.
75. Carocho, M. and I.C. Ferreira, *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives*. Food Chem Toxicol, 2013. 51: p. 15-25.
76. Shahidi, F. and P. Ambigaipalan, *Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review*. J Funct Foods, 2015. 18: p. 820-897.
77. Gordon, M., *Dietary antioxidants in disease prevention*. Nat Prod Rep, 1996. 13(4): p. 265-73.
78. Frankel, E.N., et al., *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine*. Lancet, 1993. 341(8843): p. 454-7.
79. Kerry, N.L. and M. Abbey, *Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro*. Atherosclerosis, 1997. 135(1): p. 93-102.
80. Araya, J., et al., *Red wine raises plasma HDL and preserves long-chain polyunsaturated fatty acids in rat kidney and erythrocytes*. Br J Nutr, 2001. 86(2): p. 189-95.
81. Andrade, A.C., et al., *Short-term red wine consumption promotes differential effects on plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol, sympathetic activity, and endothelial function in hypercholesterolemic, hypertensive, and healthy subjects*. Clinics (Sao Paulo), 2009. 64(5): p. 435-42.
82. Maxwell, S., A. Cruickshank, and G. Thorpe, *Red wine and antioxidant activity in serum*. Lancet, 1994. 344(8916): p. 193-4.
83. Whitehead, T.P., et al., *Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum*. Clin Chem, 1995. 41(1): p. 32-5.
84. Modun, D., et al., *The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols*. Atherosclerosis, 2008. 197(1): p. 250-6.
85. Alonso, A.M., et al., *Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content*. J Agric Food Chem, 2002. 50(11): p. 3112-3115.
86. Katalinic, V., et al., *Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin*. Food Chem, 2004. 86(4): p. 593-600.

87. Stasko, A., et al., *Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study)*. Food Chem, 2006. 96(2): p. 185-196.
88. Paixao, N., et al., *Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines*. Food Chem, 2007. 105(1): p. 204-214.
89. Stratil, P., V. Kuban, and J. Fojtova, *Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods*. Czech J Food Sci, 2008. 26(4): p. 242-253.
90. Li, H., et al., *Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines*. Food Chem, 2009. 112(2): p. 454-460.
91. Sioumis, N., et al., *Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity*. Food Chem, 2006. 94(1): p. 98-104.
92. Sioumis, N., et al., *Browning development in white wines: dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics*. Eur Food Res Technol, 2005. 220(3-4): p. 326-330.
93. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. 327(6122): p. 524-6.
94. Moncada, S., *The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1993. 28: p. 97-9.
95. Lincoln, T.M., P. Komalavilas, and T.L. Cornwell, *Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase*. Hypertension, 1994. 23(6 Pt 2): p. 1141-7.
96. Bolotina, V.M., et al., *Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle*. Nature, 1994. 368(6474): p. 850-3.
97. Persson, P.B., et al., *Phasic and 24-h blood pressure control by endothelium-derived relaxing factor in conscious dogs*. Am J Physiol, 1992. 262(5 Pt 2): p. H1395-400.
98. Rees, D.D., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(9): p. 3375-8.
99. Bunting, S., S. Moncada, and J.R. Vane, *The effects of prostaglandin endoperoxides and thromboxane A<sub>2</sub> on strips of rabbit coeliac artery and certain other smooth muscle preparations [proceedings]*. Br J Pharmacol, 1976. 57(3): p. 462P-463P.

100. Parfenova, H., P. Hsu, and C.W. Leffler, *Dilator prostanoid-induced cyclic AMP formation and release by cerebral microvascular smooth muscle cells: inhibition by indomethacin*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. 272(1): p. 44-52.
101. Vanhoutte, P.M., *Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease*. Circ J, 2003. 67(7): p. 572-5.
102. Busse, R., et al., *EDHF: bringing the concepts together*. Trends Pharmacol Sci, 2002. 23(8): p. 374-80.
103. Andriambeloso, E., et al., *Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta*. Brit J Pharmacol, 1997. 120(6): p. 1053-1058.
104. Andriambeloso, E., J.C. Stoclet, and R. Andriantsitohaina, *Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. 33(2): p. 248-54.
105. Zenebe, W., O. Pechanova, and R. Andriantsitohaina, *Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity*. Physiol Res, 2003. 52(4): p. 425-32.
106. de Moura, R.S., et al., *Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. 44(3): p. 302-9.
107. Stoclet, J.C., et al., *Vascular protection by dietary polyphenols*. Eur J Pharmacol, 2004. 500(1-3): p. 299-313.
108. Wallerath, T., et al., *Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects*. J Am Coll Cardiol, 2003. 41(3): p. 471-8.
109. Corder, R., et al., *Endothelin-1 synthesis reduced by red wine*. Nature, 2001. 414(6866): p. 863-4.
110. Schini-Kerth, V.B., et al., *Vascular Protection by Natural Product-Derived Polyphenols: In Vitro and In Vivo Evidence*. Planta Med, 2011. 77(11): p. 1161-1167.
111. Fitzpatrick, D.F., S.L. Hirschfield, and R.G. Coffey, *Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products*. Amer J Physiol, 1993. 265(2 Pt 2): p. H774-8.
112. Flesch, M., A. Schwarz, and M. Bohm, *Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries*. Amer J Physiol Heart Circ Physiol, 1998. 275(4): p. H1183-H1190.

113. Andriambeloso, E., et al., *Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta*. J Nutr, 1998. 128(12): p. 2324-33.
114. Cishek, M.B., et al., *Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits*. Clin Sci (Lond), 1997. 93(6): p. 507-11.
115. Rendig, S.V., et al., *Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. 38(2): p. 219-27.
116. Brizic, I., et al., *Differences in vasodilatory response to red wine in rat and guinea pig aorta*. J Cardiovasc Pharmacol, 2009. 53(2): p. 116-20.
117. Boban, M., et al., *Red wine induced modulation of vascular function: separating the role of polyphenols, ethanol, and urates*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. 47(5): p. 695-701.
118. Dell'Agli, M., A. Busciala, and E. Bosisio, *Vascular effects of wine polyphenols*. Cardiovasc Res, 2004. 63(4): p. 593-602.
119. Mudnic, I., et al., *Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine*. Food Chem, 2010. 119(3): p. 1205-1210.
120. Panagiotakos, D.B., et al., *Beer, wine consumption, and 10-year CVD incidence: the ATTICA study*. Eur J Clin Nutr, 2018.
121. Robinson, J., J. Harding, and J. Vouillamoz, *Wine Grapes 2012*, London, United Kingdom: Allen Lane. 1280.
122. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents*. Amer J Enol Viticult, 1965. 16: p. 144-158.
123. Quagliari, C., et al., *Comparison of Aquitaine and Rioja Red Wines: Characterization of Their Phenolic Composition and Evolution from 2000 to 2013*. Molecules, 2017. 22(2).
124. Vallverdu-Queralt, A., et al., *Straightforward Method To Quantify GSH, GSSG, GRP, and Hydroxycinnamic Acids in Wines by UPLC-MRM-MS*. J Agric Food Chem, 2015. 63(1): p. 142-149.
125. Singleton, V.L. and T.E. Kramling, *Browning of White Wines and an Accelerated Test for Browning Capacity*. Amer J Enol Viticult, 1976. 27(4): p. 157-160.
126. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*. Methods Enzymol, 1999. 299: p. 15-27.

127. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. Food Sci Technol, 1995. 28(1): p. 25-30.
128. Miliauskas, G., P.R. Venskutonis, and T.A. van Beek, *Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts*. Food Chem, 2004. 85(2): p. 231-237.
129. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med, 1999. 26(9-10): p. 1231-1237.
130. Prior, R.L., et al., *Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples*. J Agric Food Chem, 2003. 51(11): p. 3273-9.
131. Cervellati, R., et al., *The Briggs-Rauscher reaction as a test to measure the activity of antioxidants*. Helv Chim Acta, 2001. 84(12): p. 3533-3547.
132. Music, I., et al., *Effects of four-weeks moderate drinking of red wine and ethanol on the rat isolated heart and aortic rings reactivity during ischemia and hypoxia*. Period Biol, 2005. 107(2): p. 165-173.
133. Tarascou, I., et al., *A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling*. Magn Reson Chem, 2006. 44(9): p. 868-880.
134. Hellerstedt, W.L., R.W. Jeffery, and D.M. Murray, *The association between alcohol intake and adiposity in the general population*. Am J Epidemiol, 1990. 132(4): p. 594-611.
135. Schutz, Y., *Role of substrate utilization and thermogenesis on body-weight control with particular reference to alcohol*. Proc Nutr Soc, 2000. 59(4): p. 511-7.
136. Delarue, J., et al., *Effects of adrenergic blockade on hepatic glucose production during ethanol administration*. Clin Physiol, 1997. 17(5): p. 509-21.
137. Raben, A., et al., *Meals with similar energy densities but rich in protein, fat, carbohydrate, or alcohol have different effects on energy expenditure and substrate metabolism but not on appetite and energy intake*. Am J Clin Nutr, 2003. 77(1): p. 91-100.
138. Arola, L., et al., *Model for voluntary wine and alcohol consumption in rats*. Physiol Behav, 1997. 62(2): p. 353-7.
139. Oliveira, C.M., et al., *Oxidation mechanisms occurring in wines*. Food Res Inter, 2011. 44(5): p. 1115-1126.

140. Gonzalez-Manzano, S., J.C. Rivas-Gonzalo, and C. Santos-Buelga, *Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration*. Anal Chim Acta, 2004. 513(1): p. 283-289.
141. Gonzalez-Manzano, S., et al., *Characterization of the mean degree of polymerization of proanthocyanidins in red wines using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)*. J Agric Food Chem, 2006. 54(12): p. 4326-32.
142. Stratil, P., B. Klejdus, and V. Kuban, *Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals*. Talanta, 2007. 71(4): p. 1741-1751.
143. Mudnic, I., et al., *Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines*. J Med Food, 2012. 15(3): p. 315-21.
144. Stockham, K., et al., *Comparative studies on the antioxidant properties and polyphenolic content of wine from different growing regions and vintages, a pilot study to investigate chemical markers for climate change*. Food Chem, 2013. 140(3): p. 500-6.
145. Caccetta, R.A., et al., *Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability*. Amer J Clin Nutr, 2000. 71(1): p. 67-74.
146. Estruch, R., et al., *Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases erythrocyte superoxide dismutase activity: a randomised cross-over trial*. NMCD, 2011. 21(1): p. 46-53.
147. Corder, R., et al., *Red wine procyanidins and vascular health*. Nature, 2006. 444(7119): p. 566-566.
148. Rathel, T.R., et al., *Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and the vinification process*. J Hypertens, 2007. 25(3): p. 541-9.
149. Wallerath, T., et al., *A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase*. Nitric Oxide, 2005. 12(2): p. 97-104.
150. Kanner, J. and T. Lapidot, *The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants*. Free Radic Biol Med, 2001. 31(11): p. 1388-95.
151. Ursini, F., et al., *Postprandial plasma lipid hydroperoxides: A possible link between diet and atherosclerosis*. Free Radic Biol Med, 1998. 25(2): p. 250-252.

152. Djousse, L., et al., *Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects*. Amer J Cardiol, 1999. 84(6): p. 660-4.
153. Ventura, P., et al., *Red wine consumption prevents vascular oxidative stress induced by a high-fat meal in healthy volunteers*. Inter J Vitam Nutr Res, 2004. 74(2): p. 137-43.
154. Dal-Ros, S., et al., *Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 419(2): p. 381-7.



## 12. Životopis

Rođena sam 8. svibnja 1991. u Splitu. Upisala sam Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija, koji se izvodi na Medicinskom i Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu, 2010. godine. Diplomirala sam 2015. godine s prosječnom ocjenom 4,64. Diplomski rad izradila sam pod mentorstvom prof. dr. sc. Janoša Terzića u Laboratoriju za istraživanje raka na Medicinskom fakultetu u Splitu. Stručno osposobljavanje odradila sam u sklopu zadnje godine studija u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije i Bolničkoj ljekarni KBC-a Split nakon čega sam položila stručni ispit Hrvatske ljekarničke komore za stjecanje odobrenja za samostalni rad.

Iste godine upisala sam poslijediplomski studij Translacijska istraživanja u biomedicini na Medicinskom fakultetu u Splitu. Od 2016. godine radim kao asistent na Katedri za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Sudjelujem u nastavi na studijima Medicina, Farmacija, Dentalna medicina, Medicina na engleskom jeziku te na Odjelu zdravstvenih studija. Od 2016. godine suradnik sam na HRZZ Projektu 8652 „Biološki učinci vina: utjecaj vinifikacijske tehnologije, dealkoholizacije i starenja vina“. U sklopu poslijediplomskog studija položila sam Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama; kategorija 3 (Broj potvrde: 11/6/16 HR 191/04/P). Radi stručnog usavršavanja tijekom 2017. i 2018. godine boravila sam u Laboratoriju za fiziologiju i imunologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku i u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu.

Sudjelovala sam u organizaciji Prvog kongresa Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu 2014. godine, Osmog hrvatskog kongresa farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem na Medicinskom fakultetu u Splitu 2016. godine te Drugog kongresa biofizičkih pristupa u biomedicinskim istraživanjima na MediLS-u u Splitu 2017. godine. Dobila sam Dekanovu nagradu 2013. godine, Pohvalnicu dekana 2016. godine, Nagradu za najbolje objavljeni rad magistra farmacije na Medicinskom fakultetu u Splitu u 2017. godini, te Nagradu u kategoriji najbolje ocijenjenog nastavnika/suradnika na studiju Medicine na engleskom jeziku u akademskoj godini 2017./2018. Član sam Hrvatskog društva farmakologa i Hrvatske ljekarničke komore. Autor sam pet znanstvenih članaka te 11 kongresnih priopćenja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima.

## Popis publikacija

**Ana Marija Milat**, Mladen Boban, Pierre-Louis Teissedre, Ana Šešelja-Perišin, Diana Jurić, Danijela Skroza, Ivana Generalić-Mekinić, Ivica Ljubenkov, Josip Volarević, Zuriñe Rasines-Perea, Michael Jourdes, Ivana Mudnić. *Effects of oxidation and browning of macerated white wine on its antioxidant and direct vasodilatory activity*, Journal of Functional Foods, 2019

**Ana Marija Milat**, Ivana Mudnić, Ivica Grković, Nikola Ključević, Mia Grga, Iva Jerčić, Diana Jurić, Danica Ivanković, Benjamin Benzon, Mladen Boban. *Effects Of White Wine Consumption On Weight In Rats: Do Polyphenols Matter?*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017

Nikola Ključević, **Ana Marija Milat**, Mia Grga, Ivana Mudnić, Mladen Boban, Ivica Grković. *White wine consumption influences inflammatory phase of repair following myocardial infarction in rats.*, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2017

Diana Jurić, Shelly Pranić, Ružica Tokalić, **Ana Marija Milat**, Ivana Mudnić, Ivančica Pavličević, Ana Marušić. *Clinical trials on drug-drug interactions registered in ClinicalTrials.gov reported incongruent safety data in published articles: an observational study.*, Journal of Clinical Epidemiology, 2018

Nikolina Režić-Mužinić, Angela Mastelić, Benjamin Benzon, Anita Markotić, Ivana Mudnić, Ivica Grković, Mia Grga, **Ana Marija Milat**, Nikola Ključević, Mladen Boban. *Expression of adhesion molecules on granulocytes and monocytes following myocardial infarction in rats drinking white wine.*, PLoS One, 2018