

# Izravni vazodilatacijski i in vitro antioksidacijski učinci vina i proška

---

**Cigić, Zvonka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*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:171:769389>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-24**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Zvonka Cigić**

**IZRAVNI VAZODILATACIJSKI I IN VITRO ANTIOKSIDACIJSKI UČINCI VINA I  
PROŠEKA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2015./2016.**

**Mentorica:**

**doc.dr. sc.Ivana Mudnić, dr. med.**

**U Splitu, srpanj, 2016. godine**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Zvonka Cigić**

**IZRAVNI VAZODILATACIJSKI I IN VITRO ANTIOKSIDACIJSKI UČINCI VINA I  
PROŠEKA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2015./2016.**

**Mentorica:**

**doc.dr. sc. Ivana Mudnić, dr. med.**

**U Splitu, srpanj, 2016. godine**

## Sadržaj:

1.	UVOD .....	1
1.1	Povijest i kultura konzumacije vina, ljekovitost vina .....	2
1.2	Crno i bijelo vino, prošek, tradicija i razlike u proizvodnji.....	4
1.3	Kemijska struktura i biološki učinci fenola .....	6
1.3.1	Flavonoidi .....	6
1.3.2	Neflavonoidi .....	8
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	10
3.	MATERIJALI I METODE.....	12
3.1	Pokusne životinje.....	13
3.2	Mjerenje vazodilatacije na izoliranim aortalnim prstenovima .....	13
3.3	Ispitivana vina.....	15
3.4	Metode analize antioksidacijskog kapaciteta.....	16
3.5	Metode analize polifenolnog sastava.....	16
3.5.1	Spektrofotometrijska analiza ukupnih fenola, flavonoida i ne-flavonoida.....	16
3.5.2	Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva .....	17
3.6	Statistička obrada.....	18
4.	REZULTATI.....	19
5.	RASPRAVA.....	26
6.	ZAKLJUČAK.....	30
7.	LITERATURA.....	32
8.	SAŽETAK.....	40
9.	SUMMARY.....	43
10.	ŽIVOTOPIS.....	46

*Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Ivani Mudnić koja mi je bila velika pomoć tijekom cijelog istraživanja i nezamjenjiva vodilja u pisanju diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji na svemu, posebno majci koja je uz mene cijeli život i bez čije podrške ovo nebi bilo moguće. Ovaj rad posvećujem njoj.*

*Zahvaljujem i mom Ivanu, mom „suncu“ u najoblačnijim danima, koji svaku minutu čini sretnijom i vedrijom!*

## **1. UVOD**

## **1.1 Povijest i kultura konzumacije vina, ljekovitost vina**

Od početka ljudske civilizacije čovjek je vino, osim kao napitak, upotrebljavao i kao lijek. Poznato je kako je još 400 godina pr. Kr. grčki liječnik Hipokrat, otac suvremene medicine, koristio vino kao sredstvo za jačanje, ublažavao njime bolove kod išijasa te liječio rane i crijevne bolesti. Sve do 19. stoljeća postojala je prava znanost o ljekovitosti vina, a dobar izbor vina u podrumu bio je važniji od ormarića s lijekovima. Nažalost, ova saznanja o ljekovitosti vina bila su gotovo 2 stoljeća zanemarivana, međutim, pomalo se ponovno otkrivaju te se danas u svijetu propagira ideja da umjerena konzumacija crnog vina uz uravnoteženu prehranu doprinosi maksimalnoj iskorištenosti ljudskih potencijala. Posljednjih nekoliko desetljeća, zahvaljujući brojnim epidemiološkim studijama i edukaciji stanovništva putem raznim medija, sve više ljudi počinje shvaćati ozbiljnost situacije i potrebu za promjenama u prehrani. Danas postoje brojne teorije o „zdravoj prehrani“ i načinima konzumacije pojedinih namirnica.

Poseban hit u svijetu posljednjih godina postala je tzv. mediteranska, odnosno sredozemna dijeta. Premda je ovaj način prehrane na sredozemnom području odavno poznat, u svijetu se počeo istraživati tek šezdesetih godina prošlog stoljeća. U to vrijeme, broj srčanih bolesti na Mediteranu je bio najniži u svijetu, a očekivana starost među najvišima. Istraživanja su zaključila da mediteranska dijeta poboljšava kardiovaskularno zdravlje i produljuje trajanje života. Temelji se na principu prehrane koja je usko povezana s mediteranskom regijom, od Grčke do Italije, uključujući i Hrvatsku. Neke vrste hrane su posebne za svaku zemlju, ali cijela regija dijeli isti stav prema hrani. U osnovi, tradicionalna dijeta naglašava važnost upotrebe svježe hrane sa plantaža, redovitu konzumaciju voća, povrća i ribe, ograničenu konzumaciju mesa, maslinovo ulje kao osnovni izvor masti te umjerenu konzumaciju vina. Do danas, brojne epidemiološke studije pokazale su da umjerena konzumacija crnog (crvenog) vina može imati povoljne biološke učinke na ljudsko zdravlje (1, 2).

Tradiciju pijenja vina iza obroka održavaju i Francuzi. Međutim, za razliku od mediteranskog načina prehrane kojem osnovu čine riba, voće, povrće i nezasićene masnoće iz maslinovog ili drugih hladno prešanih ulja, u francuskoj kuhinji prevladavaju zasićene masnoće iz punomasnih sireva, pašteta, crvenog mesa, maslaca i vrhnja. Ipak, paradoksalno, rezultati dobiveni usporedbom statističkih podataka nacionalnih studija pokazuju kako Francuzi imaju manju stopu kardiovaskularnih oboljenja, pretilosti i karcinoma kolona od očekivanog. Jedno od objašnjenja je uživanje u crnom vinu bogatom zaštitnim spojevima poput polifenola. Priča koja povezuje crno vino i zdravlje postala je aktualna ranih

devedesetih godina 20. stoljeća. Brojne kontrolirane studije pokazale su da crno vino, kada se konzumira u umjerenim količinama, povećava razinu HDL («dobrog») kolesterola, a smanjuje razinu LDL («lošeg») kolesterola u krvi. Zaštitno djelovanje vina na kardiovaskularni sustav pripisuje se ponajviše fitokemikaliji resveratrolu, koji se u visokoj koncentraciji nalazi u opni bobice grožđa. Ulaskom u 21. stoljeće, znanstveni krugovi se sve više odmiču od izdvajanja jednog čimbenika kojem možemo pripisati blagotvoran učinak na kardiovaskularno zdravlje. Sve je više prisutno razmišljanje kako je francuski paradoks zapravo rezultat kompleksnog multidimenzionalnog spleta različitih prehrambenih, kulturoloških i socioloških čimbenika. Važan aspekt francuskog paradoksa odnosi se na kulturološku važnost koju ima hrana u svakodnevnom životu Francuza. Posebno je značajan način konzumacije vina koje se redovito pije uz obrok i predstavlja odliku zdravog društvenog života.

Opće poznato i dobro istraženo povoljno svojstvo crnog vina na ljudsko zdravlje je vazodilatacija. Smatra se da je vazodilatacijsko djelovanje povezano sa sadržajem i koncentracijom polifenola u vinu (3, 4). Vazodilatacijski učinak vina je izravan, ovisan o endotelu, i povezan s dušikovim oksidom (NO). Pod utjecajem vina i vinskih fenola povećava se proizvodnja NO-a, ali i ekspresija endotelne NO sintetaze (eNOS), dok se sinteza vazokonstriktornog endotelina-1 smanjuje (5, 6). S obzirom na važnost endotelne disfunkcije u patogenezi kardiovaskularnih bolesti, povoljni biološki učinci vina i vinskih polifenola imaju potencijalno veliki značaj u prevenciji istih, uključujući i ishemijsku bolest srca (5). Važno je naglasiti da etanol, kojega u vinu ima 10-15%, također ostvaruje određene biološke učinke, međutim u eksperimentalnim *in vitro* uvjetima ne pokazuju vazodilatacijska svojstva. Osim izravnog vazodilatacijskog djelovanja, vino i vinski fenoli imaju i neizravnu ulogu u modulaciji krvožilne funkcije: smanjuju ekspresiju adhezijskih molekula i faktora rasta, inhibiraju migraciju i proliferaciju stanica glatkih mišića i inhibiraju agregaciju trombocita (7-9).

Biološki učinci bijelog vina manje su istraženi. Većina studija ukazuje na smanjenu vazodilatacijsku aktivnost bijelog vina, posebno u usporedbi sa crnim. Uzrokom razlika u biološkom djelovanju primarno se smatramanji sadržaj polifenola u bijelom vinu. Međutim, bijela vina pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost (10,11) i smanjuju ishemijsko – reperfuzijsko oštećenje miokarda u *in vitro* eksperimentalnim uvjetima (12,13).

Biološki potencijal prošeka, vina koji se u Hrvatskoj tradicionalno proizvodi i konzumira, najmanje je istražen.



## 1.2 Crno i bijelo vino, prošek, tradicija i razlike u proizvodnji

Povijest vina je duga koliko je duga i ljudska povijest. Prvi dokazi o proizvodnji vina potječu iz Kine čak 7000 godina prije Krista (14). Uzgoj vinove loze počeo je oko Kaspijskog mora i na području Mezopotamije, a vinova loza se širila u tri pravca: na istok prema Indiji, na jug prema Palestini i Egiptu te na zapad prema Europi i Balkanskom poluotoku. Republika Hrvatska je danas jedna od zemalja koja u vinarstvu ima izuzetno dugu tradiciju, a vinogradarski se dijeli u dvije regije: kontinentalnu i primorsku. Zahvaljujući njihovim zemljopisnim, agroekološkim i gospodarskim razlikama hrvatsko vinarstvo se izborom i bogatstvom razlikuje od svih ostalih. Prava je rijetkost da se na relativno maloj površini susreće tolika raznovrsnost sorti i tipova vina, što Republiku Hrvatsku i u svjetskim mjerilima svrstava u iznimno zanimljivo vinogradarsko i vinarsko područje.

Najpopularnija i najjednostavnija podjela vina je po boji. Prema tome, poznajemo bijelo, ružičasto (roze) i crno (crveno) vino. Boju vina najčešće određuje boja bobica grožđa od kojeg se vino dobiva (Slika 1).



**Slika 1.** Podjela vina po boji

Crno vino je tip vina koje se pripravlja od tamno obojenih sorti grožđa. Sama boja crnog, ili kako ga neki nazivaju, crvenog vina, može varirati od tamno crvene pa sve do svijetle, gotovo prozirne boje. Crvena boja vina dolazi primarno od antocijanidinskih pigmenta koji su prisutni u pokožici grožđa (15).

Bijelo vino, čija boja varira od svijetlo žute pa sve do zlatne, proizvodi se od svijetlo obojenih sorti grožđa, primarno zelene ili žute boje. Manjak obojenosti vina ukazuje na manju koncentraciju antocijana u pokožici bobica. Osim navedenoga, manjak antocijana nastaje i zbog razlika u proizvodnji crnog i bijelog vina (16). Crna vina se dobivaju paralelnim postupkom maceracije i alkoholne fermentacije mošta, dok su pri proizvodnji bijelog vina, ta dva procesa odvojena, tj. alkoholno se vrenje odvija u grožđanom soku bez čvrstih biljnih sastojaka (17). Alkoholno vrenje je najvažniji, središnji biokemijski proces, pa o njegovu tijeku i ishodu najviše ovisi kakve će kvalitete biti proizvedeno vino. Alkoholno vrenje mošta može se izvoditi: spontano, kvascima koji prirodnim putem dospijevaju u mošt ili primjenom selekcioniranih kvasca čiste kulture.

Prošek je dalmatisko desertno vino koje se po sorti vinove loze i načinu proizvodnje može veoma razlikovati duž dalmatinske obale. Također, razlike su uočljive i u boji, mirisu (buke) te ukupnoj kvaliteti. Jedan od glavnih čimbenika uspjeha proizvodnje prošeka je pravilan odabir sorte grožđa, a u primorskoj Hrvatskoj ih se tradicionalno koristi nekoliko. Najčešće i najdominantnije sorte su *Bogdanuša*, *Maraština* i *Vugava*, kojima se obično dodaju manje količine lokalno poznatih sorti.

Prošek se dobiva fermentacijom sasušanih bobica grožđa. Sušenje se može provoditi u otvorenim ili u zatvorenim prostorima. U modernoj proizvodnji preporučuje se sušenje u kontroliranim uvjetima (ventilirani staklenici, plastenici) (17). Tradicionalni naziv „prošek“ nose samo vina proizvedena od grožđa sušenog u sjeni. Vino dobiveno od grožđa sušenog na suncu se naziva „pečeno vino“ (18, 19). Sadržaj šećera na početku sušenja, svojstva grožđa (zbijenost, veličina bobica, debljina kože itd.) te uvjeti tijekom sušenja određuju dužinu sušenja ovisno o željenoj koncentraciji šećera na kraju sušenja, a to znači da nam sušenje može trajati od 10 do 25 dana. Sušenjem se osim šećera koncentriraju i druge tvari koje doprinose kvaliteti. To su ponajviše aromatski spojevi, antocijani, točnije spojevi koji doprinose boji. Masa nakon sušenja kreće se između 50 i 55 % od početne količine ubranoga grožđa, što prvenstveno ovisi o načinu sušenja, zatim o kvaliteti sirovine i samoj sorti koja se koristi. Nakon što završi fermentacija, prošek se odvaja od taloga te ulijeva u bačve. U tim bačvama ostaje jednu do dvije godine, pri čemu dolazi do prirodne stabilizacije. Trajanje dozrijevanja u drvenim bačvama za bijeli prošek duže je od crnih ili neutralnih sorti. Nasuprot

tome, kod prošeka aromatičnih sorti, dozrijevanje u drvetu bi trebalo biti kraće zbog boljeg očuvanja primarne arome.

### 1.3 Kemijska struktura i biološki učinci fenola

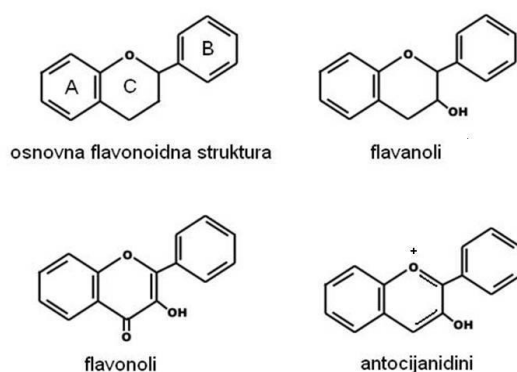
Fenoli su organski spojevi kod kojih je hidroksilna grupa (-OH) neposredno vezana na ugljikov atom aromatske jezgre. Pripadaju jednoj od najvećih skupina fitokemikalija koja obuhvaća više od 8000, biološki aktivnih spojeva.

Dokazano je da imaju snažan vazodilatacijski učinak, a osim navedenog djeluju pozitivno protiv oksidacijskog stresa, važnog u patofiziološkom mehanizmu nastanka vaskularnih i drugih bolesti. U *in vitro* eksperimentalnim uvjetima inhibiraju oksidaciju lipoproteina male gustoće (LDL), a nakon konzumacije jela ili pića bogatog polifenolima, primjerice vino, povećava se razina lipoproteina velike gustoće (HDL) i antioksidacijski kapacitet plazme u ljudi (20-26). Fenoli su odgovorni za boju crnih vina, također i bijelih, ali u puno manjoj mjeri. Naime, koncentracija ukupnih fenola u bijelom vinu iznosi prosječno 500 mg/L, dok je kod crnih vina puno veća, 5.500 mg/L. Po broju hidroksilnih grupa fenoli se dijele na mono, di, tri i polifenole (27,28). U procesu dozrijevanja grožđa u bobici se počinju stvarati polifenoli, najprije monomeri, a poslije polimeri, smješteni u kožici i opni sjemenke. Oksidativni procesi ubrzavaju polimerizaciju tih spojeva u moštu, koja se nastavlja kasnije i u vinu. Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na dvije osnovne skupine, flavonoide i neflavonoide (27, 29).

#### 1.3.1 Flavonoidi

Flavonoidi (od latinske riječi flavus što znači žut, iako se među njih ubrajaju i crveno-modro obojeni antocijanidini) (30) su najveća skupina prirodnih složenih fenola od kojih se mnoge pojavljuju u povrću, voću te pićima kao što su čaj, vino, kava i sokovi na bazi voća (31). Nalaze se i u crnim vinima u kojima čine 85% ukupnih fenola, dok u bijelim vinima prevladavaju ne-flavonoidi. Danas je poznato više od 5000 flavonoida, a znatan interes javnosti pobudili su zbog istraživanja koja su pokazala da je konzumacija namirnica bogatih ovim fitonutrijentima povezana s nizom pozitivnih učinaka na zdravlje. Uloga flavonoida povezana je s njihovim kemijskim sastavom. Obzirom da se njihove kemijske razlike očituju kroz osnovnu strukturu i stupanj polimerizacije, od prehrambenih flavonoida prije svega valja spomenuti: antocijane, flavanole, flavanone, flavone i izoflavone. Naime, oni su polifenolni spojevi koji imaju karakterističnu jezgru od tri aromatska prstena. Na benzenski prsten A izravno je vezan heterociklički prsten C koji na drugom ugljikovom atomu ima spojen prsten

benzena B (Slika 2). Pojedine skupine flavonoida imaju drugačiji prsten C. Prsten C može biti heterociklički piran kod skupine flavanola (tipični predstavnik je katehin) i antocijanidina (tipični predstavnik je cijanidin) ili piron kod skupine flavonola (tipični predstavnik je kvercetin) (32, 33). Antocijanidini su pigmenti vina i grožđa, a njihov specifičan konjugirani C prsten zaslužan je za plavo ili crveno obojenje. Antocijanidini su vrlo nestabilni i zapravo ne postoje u slobodnom obliku u vinu, već se nalaze kao glikozidi i tada se nazivaju antocijani (33). Upravo se antocijani izdvajaju kao flavonoidni spojevi posebno značajni za vazodilatacijsku aktivnost vina (34, 35).



**Slika 2.** Glavne skupine flavonoida.

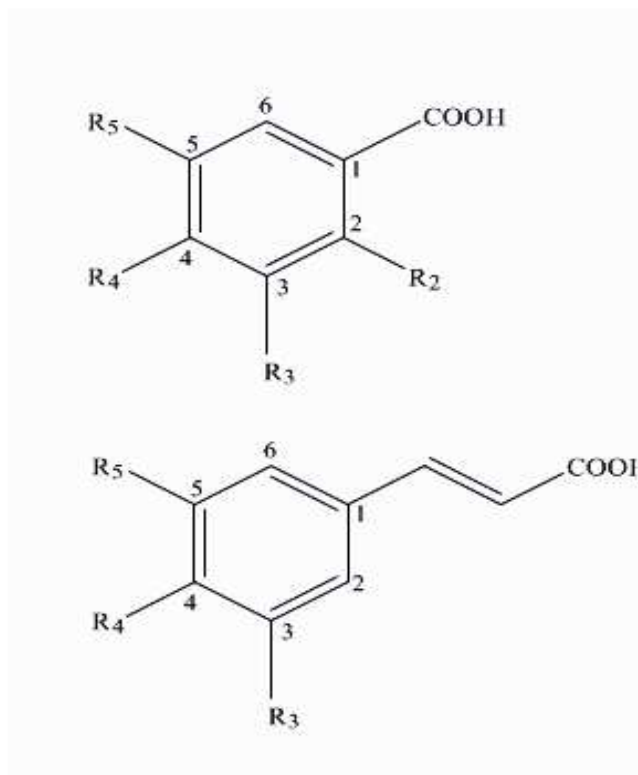
Flavonoidi primjenjeni kao pojedinačni spojevi ili različiti ekstrakti ostvaruju značajne antioksidacijske učinke u *in vitro* eksperimentalnim uvjetima. Opisano je kako flavonoidima bogat ekstrakt sjemenki grožđa ostvaruje značajnu antioksidacijsku sposobnost u *in vivo* studijama u kojima su korišteni štakori, štiteći njihovu gastrointestinalnu sluznicu od reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, eng. reactive oxygen species) stvorenih akutnim ili kroničnim stresom (36). Podsjetimo, antioksidansi su spojevi koji štite stanice od štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih radikala. Disbalans između antioksidansa i radikala kisika rezultira oksidativnim stresom, što dovodi do oštećenja stanica pa oksidativni stres može biti povezan s nastankom raka, starenjem, aterosklerozom, ishemijskim ozljedama, upalama i neurodegenerativnim bolestima. Međutim, bez obzira na *in vitro* rezultate, brojna su istraživanja pokazala kako se flavonoidi neznatno apsorbiraju nakon peroralne primjene, čak manje od 5%, od čega se većina brzo metabolizira i izluči pa je njihova biodostupnost niska

(37, 38). Stoga se iz navedenog postavlja pitanje što se od *in vitro* dokazanih antioksidacijskih učinaka uopće može ostvariti u „stvarnim“ biološkim sustavima.

### 1.3.2 Ne-flavonoidi

Ne-flavonoidi su sastavni dio tkiva biljaka, a dolaze vezani na antocijane i šećere. U grožđu se nalaze pretežito u kožici bobice, dok su u vinu raspoređeni u slobodnom ili obliku estera. Osim u vinu, prisutni su u voću, povrću i žitaricama (39). Osnovni ne-flavonoidi su fenolne kiseline i stilbeni.

Fenolne kiseline predstavljaju jednostavne fenole koji na benzenskom prstenu imaju najmanje jednu karboksilnu skupinu (Slika 3).

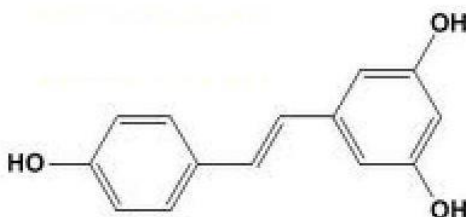


**Slika 3.** Fenolne kiseline.

Fenolne kiseline se dijele na derivate hidroksibenzojeve kiseline (*p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska, galna, siringinska, gentisinska, elaginska kiselina) i derivate hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, sinapinska kiselina).

Pojedine su fenolne kiseline pokazale vazodilatacijski i antioksidacijski učinak u različitim eksperimentalnim uvjetima. Ferulinska kiselina, primjerice, snižava krvni tlak spontano-hipertenzivnim štakorima (40) i obnavlja vazodilataciju ovisnu o endotelu u aortama spontano-hipertenzivnih štakora, povećavajući biodostupnost dušikova monoksida (NO) (41). Stilbeni su prirodni biljni spojevi nastali kao obrambeni odgovor biljke na UV zračenje, infekcije različitim mikroorganizmima i druge oblike stresa.

Najpoznatiji predstavnik ove skupine polifenola je resveratrol koji se pojavljuje u dva stereoizomerna oblika: *cis*-(Z) i *trans*-(Z). U brojnim studijama je opisana vazodilatacijska aktivnost *trans*-resveratrola (Slika 4) u različitim eksperimentalnim uvjetima (42, 43). Štoviše, u studiji Oralla i suradnika *trans*-resveratrol je istaknut kao ključni sastojak odgovoran za kardioprotektivni učinak vina (44). Smatra se da sadrži i mnoga druga povoljna svojstva: djeluje kao prirodni fungicid, sprječava replikaciju virusa herpesa, sprječava rast tumorskog tkiva i pojavu osteoporoze. Zanimljiva je činjenica kako grožđa koja dopijevaju u hladnijim, vlažnijim područjima, poput Pinota, imaju više resveratrola nego grožđa iz toplijih regija (45).



**Slika 4.** Struktura *trans*-resveratrola.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ispitati i usporediti fenolni sadržaj i biološke učinke: izravni vazodilatacijski učinak na izoliranim prstenovima aorte štakora i *in vitro* antioksidacijski učinak vina i prošeka proizvedenih od iste sorte grožđa.



### **3. MATERIЈAL I METODE**

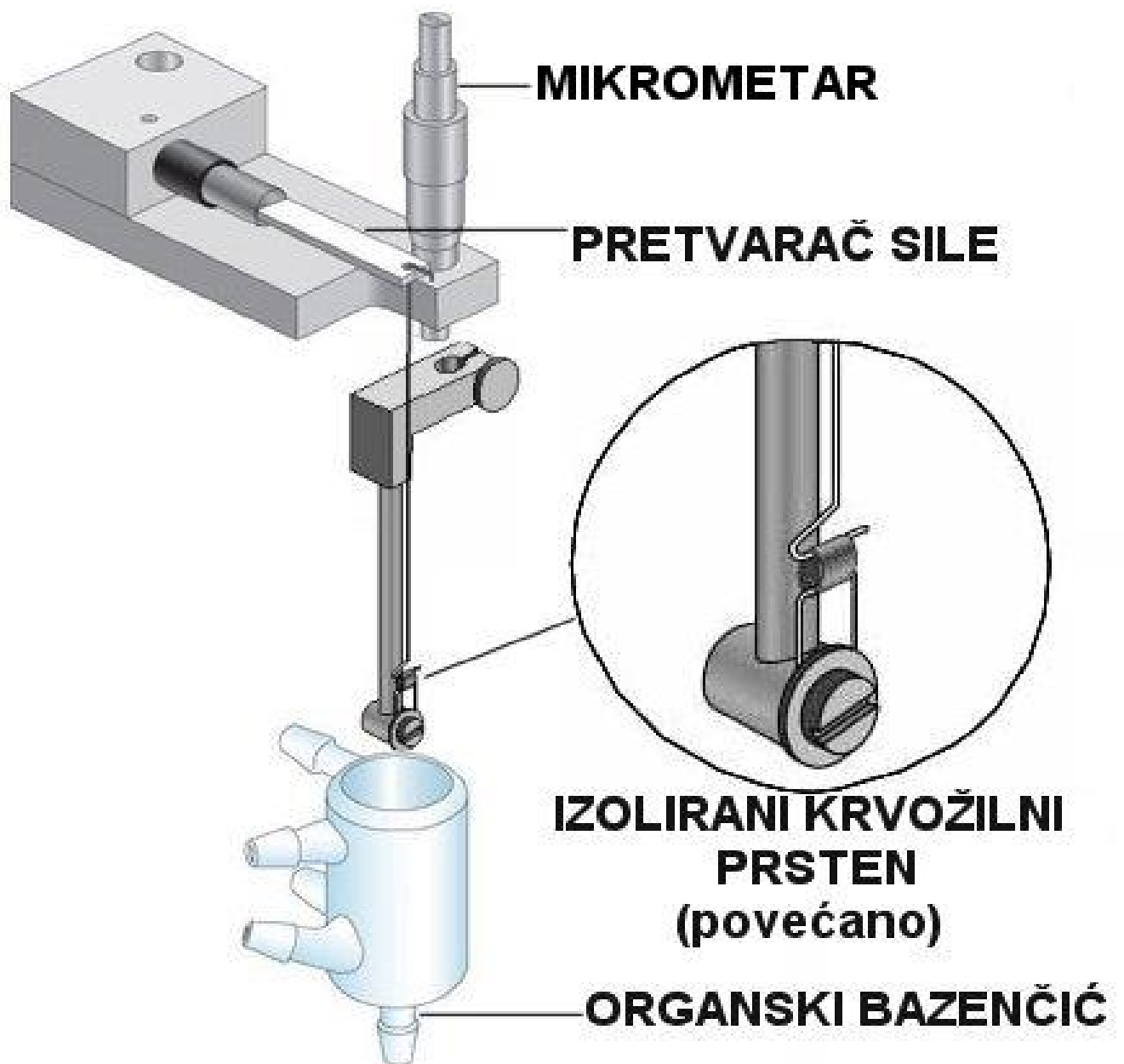
### 3.1 Pokusne životinje

Za potrebe istraživanja upotrijebljeno je 24 štakora Sprague - Dawley soja; mužjaci, stari 3-5 mjeseci, tjelesne mase 300-450g, uzgojeni u Sveučilišnoj nastambi za pokusne životinje u Splitu. Svi postupci provedeni u istraživanju odobreni su od Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Splitu.

### 3.2 Mjerenje vazodilatacije na izoliranim aortnim prstenovima

Nakon anestezije životinje (intraperitonealno, 1 g/kg tjelesne mase uretana), učinila se torakotomija, preparirala torakalna aorta, disecirala te prenijela u preparativni bazenčić s hladnom i oksigeniranom Krebs–Henseleitovom otopinom. Nakon pažljivog čišćenja masnog i vezivnog tkiva, aorta se izrezala na prstenove širine 3-4 mm. Prstenove se potom namjestilo u organske bazenčiće (20 mL zapremine) s Krebs – Henseleitovom otopinom koja se kontinuirano zagrijavala i oksigenirala ( $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ). Dvije paralelne čelične žice provukle su se kroz lumen prstena, od kojih se jedna fiksirala za dno organskog bazenčića, a druga koncem povezala na pretvarač vlačne sile (FORT 10, World Precision Instruments, Berlin, Njemačka), radi mjerenja tonusa žilnog prstena. Pretvarač sile se spajao na pojačalo (QUAD Bridge, ADInstruments, Castle Hill, Australija) i na analogno/digitalni pretvarač (MacLab/8e, ADInstruments), što je primjenom računalnog programa (CHART za Windows, verzija 4.2.4, ADInstruments) omogućilo kontinuirani grafički prikaz tijeka pokusa na ekranu računala (Slika 5).

Nakon ispiranja prstenovi su se prekontrahirali kontrolnom dozom noradrenalina ( $\text{Na}$ ,  $10^{-7}\text{ mol/l}$ ). Kada se postigao stabilni plato kontrakcije, očuvanost endotela se testirala acetilkolinom ( $\text{Ach}$ ,  $10^{-6}\text{ mol/l}$ ). Relaksacija se izražavala kao postotak smanjenja vazokonstrikcije uzrokovane noradrenalinom. Isključivo prstenovi s očuvanim endotelom (acetilkolinska relaksacija veća od 60%), prekontrahirani noradrenalinom ( $\text{Na}$ ,  $10^{-7}\text{ mol/l}$ ), bili su izloženi kumulativnoj dozi (0,1-5‰) ispitivanog pojedinačnog uzorka vina ili proška.



**Slika 5.** Shema sustava za izolirane aortne prstenove.

### 3.3 Ispitivana vina

Za potrebe istraživanja korištena su eksperimentalna vina proizvedena pod kontroliranim uvjetima, od sorti grožđa uzgojenih u vinogradu Zavoda za jadranske kulture i melioraciju krša te eksperimentalno proizvedeni prošeci od sorti grožđa iz komercijalnih vinograda na poluotoku Pelješcu i otoku Korčuli u Dalmaciji:

- a) Crno vino, *Plavac mali*, berba 2008.
- b) Bijelo vino, *Pošip*, berba 2010.
- c) Prošek od crne sorte, *Plavac mali*, berba 2007., 2008., 2009.
- d) Prošek od bijele sorte, *Pošip*, berba 2008.

**Eksperimentalna vina.** Tradicionalno, u Dalmaciji su se prošeci dobivali prosušivanjem grožđa i njegovom vinifikacijom. Danas je proizvodnja ovih vina u Dalmaciji simbolična, u količini koja ne zadovoljava potrebe tržišta. Zbog skupe i komplicirane proizvodnje te sve većih potreba tržišta, posljednjih se desetljeća pod ovim nazivom proizvode i vina koja nastaju koncentriranjem mošta te se doslađuju različitim sladilima ili se pojačavaju dodavanjem etanola u djelomično fermentirano vino. Zbog neodgovarajućih tehnika proizvodnje pa tako i svojstava komercijalnih prošeka i vina, za ovo istraživanje su korištena eksperimentalna vina (prošek) koja su proizvedena u kontroliranim uvjetima. Korištene su dvije sorte grožđa: *Plavac mali* i *Pošip*, uzgojene u komercijalnim vinogradima na poluotoku Pelješcu i otoku Korčuli u Dalmaciji. Vinogradi su bili stari približno 20 godina.

**Proizvodnja bijelog prošeka od sorte *Pošip*.** Za proizvodnju je upotrebjeno 490kg grožđa sorte *Pošip* iz vinograda na Korčuli, koje je nakon branja ostavljeno u stakleniku da se posuši u kontroliranim unutarnjim uvjetima. Sušenje je trajalo pet dana (10.-15. rujna 2008.). Staklenik je bio opremljen sistemom za kontrolu temperature i ventilacije; maksimalna temperatura za vrijeme sušenja bila je 40°C. Osušene bobice su smrvljene i sumporane s kalijevim metabisulfitom (Vinobran). Uloga sumpora je spriječavanje djelovanja oksidacijskih enzima i štetnih mikroorganizama (divljih kvasaca, bakterija) dok ne započne fermentacija sa željenim (plemenitim) kvascima. Alkoholna fermentacija izvršena je u triplikatu. Nakon 6 mjeseci, gotovi prošek je premješten u boce.

**Proizvodnja crnog proška od sorte *Plavac mali*.** U proizvodnji je upotrebljeno 400kg grožđa sorte Plavac mali iz vinograda na Pelješcu (berba 2007., 2008., 2009. godina). Grožđe je sušeno u stakleniku u kontroliranim uvjetima tijekom 18 dana u listopadu. Bobice su smrvljene te im je dodan kalijev metabisulfit (Vinobran) i pektolitički enzim *Endozym cultivar* (AEB S.p.A., Brescia, Italy, 30 g/100 kg). Mošt je podijeljen na tri jednaka dijela i premješten u spremnike od inoksa. Maceracija je trajala pet dana. Nakon maceracije, mesnati dio bobica protisnut je hidrauličkom presom. Mošt je prebačen u staklene spremnike od 25L gdje se fermentacija nastavila tijekom 6 mjeseci. Gotovi prošek uskladišten je u staklenim bocama.

### **3.4 Metode analize antioksidacijskog kapaciteta**

Antioksidacijski kapaciteti ispitivanih uzoraka bijelog, crnog vina i proška određeni su primjenom FRAP (prema engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metode (46). FRAP se temelji na sposobnosti uzorka (antioksidansa) da reducira  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ . Nastali  $Fe^{2+}$  oblik u reakciji s 2,4,6-tri-(2-piridil)-2-triazinom (TPTZ) daje spoj koji apsorbira svjetlo pri valnoj duljini 593 nm, a intenzitet plavog obojenja ovisi o antioksidacijskoj sposobnosti prisutnog antioksidansa.



Mjerenja su vršena u triplicatu. Rezultati su uspoređivani sa standardnim krivuljama s različitim koncentracijama troloksa (vodotopivog analoga vitamina E) i izražavani kao mikromolarni ekvivalenti troloksa (TE).

### **3.5 Metode analize polifenolnog sastava**

#### **3.5.1 Spektrofotometrijska analiza koncentracije ukupnih fenolnih spojeva, flavonoida i ne-flavonoida**

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

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima vina određen je primjenom Folin-Ciocalteu metode (47) koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupina do kinona dodatkom Folin-

Ciocalteu reagensa (FC) te nastajanju plavo obojenog produkta (48). Fenolni spojevi reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom pod uvjetom da je pH otopine 10 (što se postiže dodatkom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Pri toj pH vrijednosti fenoli disociraju proton i prelaze u fenolat anion, koji je potom sposoban reducirati FC reagens. 'Plavi spojevi' nastali reakcijom fenolata i FC reagensa ne zavise o strukturi fenolnog spoja. Sadržaj fenolnih spojeva računa se pomoću jednadžbe baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenata galne kiseline (mg GAE/L) u 1 litri uzorka.

Ne-flavonoidi su određeni metodom taloženja flavonoida s formaldehidom (48, 49). Metoda se temelji na taloženju flavonoida uslijed reakcije s formaldehidom. Formaldehid reagira s 6- ili 8- pozicijom 5,7-dihidroksi flavonoida formirajući metilol derivate koji se vežu na drugu 6- ili 8- poziciju drugog flavonoida itd. Kondenzirane molekule se uklanjaju filtracijom, a preostali fenoli (ne-flavonoidi) u filtratu određuju se F-C metodom (48).

Iz razlike ukupnih fenola i ne-flavonoida moguće je izračunati udio flavonoidne frakcije. Prilikom računanja udjela flavonoida potrebno je uzeti u obzir faktor razrjeđenja uzorka i način pripreme reakcijske smjese s formaldehidom.

### **3.5.2 Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva**

Koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva određena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, HPLC (od engl). HPLC je oblik kromatografije na stupcu koji se često koristi u analitičkoj kemiji. Služi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Princip rada HPLC-a je forsiranje prolaska analizirane tvari ili smjese kroz stupac (cijev s materijalom od sitnih čestica, kako bi povećali površinu) pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom kroz sam stupac. Postupak se sastoji od unošenja malog volumena uzorka u tok mobilne faze i na temelju specifičnih fizičkih i kemijskih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze.

Za potrebe ovog istraživanja korišten je HPLC, Perkin Elmer Instruments LLC (Shelton, Connecticut, USA), opremljen PerkinElmer-Series 200 UV/VIS detektorom, binarnom gradijentnom pumpom, PerkinElmer-Series 200 Pump, termostatom za kolone PerkinElmer-Series 200 Peltier Column Oveni radnom stanicom „TotalChrom Workstation“. Polifenoli su odvajani na oktadecilnoj koloni (UltraAqueus-C18; unutarnjeg promjera 4,6 mm, duljine 250 mm; veličine čestice 5  $\mu\text{m}$ ; Restek, Bellfonte, PA, SAD) pri 25 °C. Prije

analize uzorci vina su filtrirani (veličina pora filtera 0,45  $\mu\text{m}$ ) i injektirani PerkinElmer-Series 200 Autosampler (20  $\mu\text{l}$ ) u kromatografski sustav.

Gradijentna elucija uključuje primjenu dvaju otapala: otapalo A (0,2 % fosforna kiselina) i otapalo B (MeOH:Acetonitril=1:1) uz brzinu protoka od 0,8 mL/min. Otapala su degazirana PerkinElmer-Series 200 Vacuum Degaser.

Detekcija se vršila pri valnoj duljini od 280 nm. Pojedinačni fenolni spojevi identificirani su prema retencijskom vremenu, a kvantificirani usporedbom s kalibracijskim krivuljama vanjskih standarda. Svaki je uzorak dva puta injektiran u kromatografski sustav.

Sve kemikalije i reagensi su bili analitičkog stupnja čistoće i kupljeni od Sigma Chemical Co (Steineheim, Njemačka) i Merck (Darmstadt, Njemačka). Deionizirana voda (Milli Q) korištena je za pripremu svih otopina i reagensa.

### **3.6 Statistička obrada**

Rezultati su izraženi su kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija ili standardna pogreška sredine. Vrijednost  $P < 0,05$  predstavlja granicu statističke značajnosti. Za statističku analizu vazodilatacijskih učinaka koristila se jednosmjerna (usporedba maksimalnih učinaka (E<sub>max</sub>) i dvosmjerna analiza varijance (ANOVA-usporedba učinaka uz varijable dozu i vrstu uzorka) s Bonferronijevim *post hoc* testom. Statistička analiza sastava i antioksidacijske aktivnosti vina učinjene su primjenom Mann-Whitney U testa.

Rezultati su analizirani primjenom programa GraphPad Prism (verzija 4.03; GraphPad Software, San Diego, SAD) i STATISTICA (verzija 6.0; Statsoft. Inc., Tulsa, SAD).

#### **4. RESULTATI**



Ispitivana vina pokazala su različit vazoaktivni učinak ovisan o dozi.

Očekivano su prošeci i vino crne sorte grožđa, *Plavac mali* pokazali superiornu vazodilatacijsku učinkovitost u usporedbi s bijelim vinom i prošekom *Pošip*.

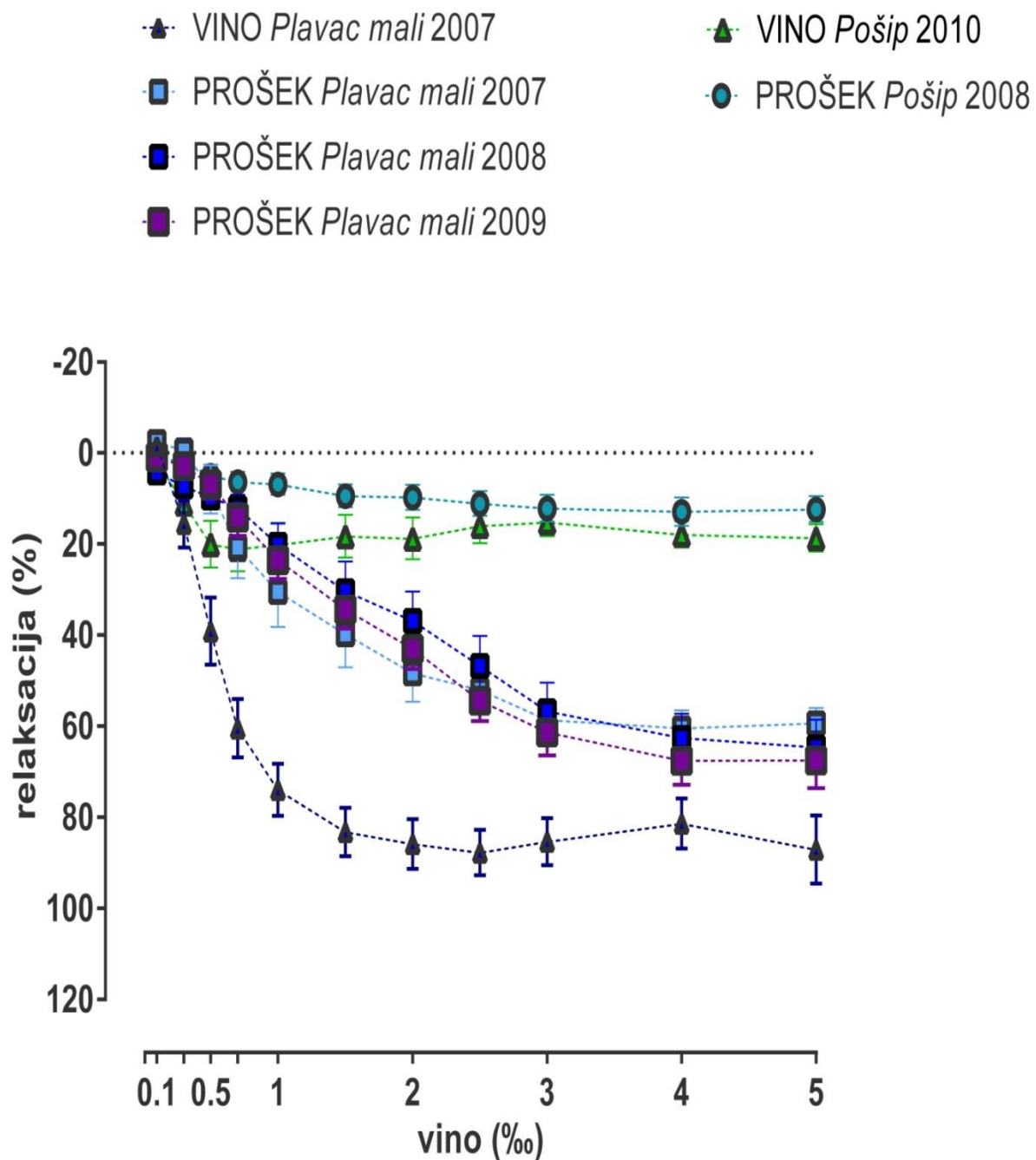
Vino *Plavac mali* je najučinkovitiji i najpotentniji izravni vazodilatator koji je već u dozi od 2‰ ostvario maksimalni vazodilatacijski učinak.

Prošek *Plavac mali* ostvario je također značajan vazodilatacijski učinak. Ipak u usporedbi s vinom iste sorte učinkovitost mu je približno za trećinu manja te maksimalni vazodilatacijski učinak ostvaruje pri dozi od 4 ‰. Uspoređujući međusobno uzorke prošeka iste sorte, a različite starosti (2007., 2008. i 2009. godine) očigledno je da među njima nema značajne razlike.

S druge strane, bijelo vino *Pošip* i prošek iste sorte (*Pošip*) pokazuju zanemariv vazodilatacijski učinak, te se značajno razlikuju od vina i prošeka *Plavca malog* i spadaju u skupinu vrlo slabo učinkovitih izravnih vazodilatatora. Ako se uzorci prošeka i vina iste bijele sorte *Pošip* usporede međusobno primjećujemo da se razlikuju prema potentnosti; vino je potentnije te u nižoj koncentraciji (već pri 0,7 ‰ ostvaruje maksimalni vazodilatacijski učinak).

Primjena vodene otopine etanola u volumnim koncentracijama u kojima je prisutano ispitivanim vinima nije ostvarila izravni vazodilatacijski učinak u izoliranim prstenovima aorte štakora.

Slika 6 je prikaz krivulja doza – učinak za sve ispitivane uzorke vina i prošeka.



**Slika 6.** Krivulje doza-učinak ispitivanih uzoraka vina i prošekana aortnim prstenovima štakora. Vazodilatacijski učinak izražen je kao postotak smanjenja kontrakcije izazvane primjenom noradrenalina ( $NA\ 10^{-7}\ \text{mol/L}$ );  $n=10$  za svaki uzorak vina.

Maksimalni vazodilatacijski učinci ( $E_{max}$ ) i  $EC_{50}$  ispitivanih vina prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Vazodilatacijska aktivnost uzoraka crnog vina i prošeka te bijelog vina i prošeka izražena maksimalnim vazodilatacijskim učinkom ( $E_{max}$ ) i dozom pri kojoj se postiže 50% maksimalnog vazodilatacijskog učinka ( $EC_{50}$ )

Uzorak	$E_{max}$ (%)	$EC_{50}$ (95% CI)(‰)
Vino <i>Plavac mali</i> 2007.	87,1±5,0	0,5 (0,5-0,6)
Prošek <i>Plavac mali</i> 2007.	60,4±3,9	1 (0,8-1,1)
Prošek <i>Plavac mali</i> 2008.	64,4±6,0	1,6 (1,4-1,9)
Prošek <i>Plavac mali</i> 2009.	67,5±6,1	1,4 (1,2-1,6)
Vino <i>Pošip</i> 2010.	21±4,9*	0,3 (0,2-0,4)*
Prošek <i>Pošip</i> 2008.	12,9±3,1*	0,8 (0,5-1,2)*

$E_{max}$ , maksimalni vazodilatacijski učinak, izražen kao srednja vrijednost ± SEM ; \* $p < 0,05$  vs. crnog vina i prošeka (*Plavac mali*)

$EC_{50}$ , koncentracija pri kojoj se ostvaruje 50% maksimalnog vazodilatacijskog učinka, izračunata primjenom nelinearne regresijske analize i izražena sa 95% intervalom pouzdanosti (CI) u zagradama

Kemijska analiza vina potvrdila je bogatiji fenolni i flavonoidni sadržaj vina i prošeka *Plavca maloga* u odnosu na *Pošip*, te vina *Plavca maloga* u odnosu na proške iste sorte.

Očekivano niži ukupni sadržaj fenola imali su vino i prošek bijele sorte, međutim i među njima je bilo razlika. Suprotno od već spomenutih razlika između vina i prošeka od crne sorte u kojem prevaga ukupnog fenolnog sadržaja ide u korist vina, kod vina i prošeka dobivenih od bijelog grožđa dominantnijim se pokazao prošek.

Osim prema sadržaju ukupnih fenola, ispitivana vina su se značajno razlikovala i prema omjeru flavonoidnih i ne-flavonoidnih spojeva; crno vino i prošeci odlikuje se većom koncentracijom flavonoida u odnosu na ne-flavonoide, dok u bijelom vinu i prošku prevladavaju ne-flavonoidi. Vino i prošeci crne sorte su najbogatiji antocijanima koji se u bijelom vinu i u prošku nalaze u vrlo niskim koncentracijama.

Antioksidacijska aktivnost korelira sa fenolnim sadržajem.

FRAP crnog vina i proška višestruko je veći od FRAP-a bijelog vina i proška. Sva tri uzorka crnog proška pokazuju niže vrijednosti od uzorka crnog vina, dok se antioksidacijska aktivnost bijelog vina i bijelog prošek neznajno razlikuje.

Rezultati su prikazani u Tablici 2.

**Tablica 2.** Ukupni sadržaj fenola, glavne fenolne frakcije i antioksidacijska aktivnost crnog vina, crnog proška, bijelog vina i bijelog proška

Uzorci	Ukupni fenoli (mg GAE/l)	Flavonoidi (mg GAE/l)	Ne-flavonoidi (mg GAE/l)	Antocijani (mg C-3-GE/l)	FRAP (mmol TE/l)
Vino Plavac mali 2007.	3243,2±165,5	3118,7±43,6	199,5±3,8	41,0±2,7	9,4±0,06
Prošek Plavac mali 2007.	2160,9±37,6	1395,7±14,2	765,7±34,5	41,1±3,5	5,7±0,09
Prošek Plavac mali 2008.	2606,7±63,6	2061,7±31,7	793,7±44,4	40,0±1,7	6,5±0,01
Prošek Plavac mali 2009.	2776,5±105	2 007±29,3	707,7±31,4	40,6±1,3	7±0,01
Vino Pošip 2010.	282,1±7,76*	39±2,6*	243±5,5*	2,4±0,2*	0,7±0,0*
Prošek Pošip 2008.	443,9±21,6*	21,6±1,1*	429,7±5,9*	6,1±2,0*	0,6±0,01*

GAE (eng. *gallic acid equivalent*) – ekvivalent galne kiseline; C-3-GE (eng. *cyanidine -3-glucoside equivalent*) – ekvivalent cijanidin-3-glukozida; FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant capacity*); TE (eng. *Trolox equivalent*) – ekvivalent Troloksa. Podaci su dobiveni iz najmanje dva nezavisna uzorka i prikazani su kao srednja vrijednost ± SD; \*p<0,05 vs. crnog vina i proška (*Plavac mali*).

Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva iz skupine flavonoida (katehin, epikatehin, epikatehin galat i epigalokatehin) i ne-flavonoida (hidroksibenzojeva, galna, vanilinska i kumarinska kiselina te resveratrol) pokazala je zanimljive rezultate.

Flavonoid katehin najzastupljeniji je u uzorku crnog vina *Plavac mali*. U bijelom vinu ga ima najmanje, gotovo 10 puta manje od koncentracije u crnom vinu.

Suprotno očekivanjima, katehini su dosta zastupljeni i u prošek u bijele sorte grožđa *Pošip*, a koncentracije katehina u prošek crne sorte *Plavac mali* su općenito niže nego u crnom vinu iste sorte te se međusobno razlikuju obzirom na godinu berbe.

Epikatehini su zastupljeni u visokim i vrlo sličnim koncentracijama u prošecima crne i bijele sorte grožđa, dok ih u vinima iste sorte također ima, ali u 2 do 4 puta nižim koncentracijama. Epikatehin galat je najzastupljeniji u prošek crne sorte, a slijedi ga crno vino. U prošek bijele sorte uopće se ne može izmjeriti, dok su mu vrijednosti iz bijelog vina zanemarivo niske.

Vina i prošeci dvije sorte grožđa se razlikuju i prema koncentraciji ne-flavonoidnih spojeva: fenolnih kiselina i resveratrola.

Ukupna koncentracija fenolnih kiselina bila je najviša u crnim prošecima te crnom vinu, međutim u rezultatima se jasno uočavaju razlike obzirom na godinu berbe. Prošek i vino bijele sorte imaju općenito mnogo niže koncentracije ovih spojeva, a u prošek ih ima gotovo tri puta više nego u bijelom vinu.

Analize koncentracija pojedinačnih fenolnih kiselina pokazuju najzanimljivije rezultate. Naime, zastupljenost galne kiseline je najveća u vinima crne sorte grožđa. U prošecima dobivenim od iste sorte galna kiselina se također može detektirati u visokoj koncentraciji. Međutim, u sva tri uzorka je manja od one u crnom vinu, a također ovisi o godini berbe.

Nadalje, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina u najvišim koncentracijama detektira u prošecima crne i bijele sorte, a u vinima je ima i do 5 puta manje.

Vanilna i p-kumarinska kiselina pokazuju međusobno slične rezultate. Najviše koncentracije izmjerene su u crnim prošecima, a najmanje ili nemjerljive u vinima i prošecima dobivenih od bijelog grožđa.

Resveratrol je izmjeren u vrlo niskim koncentracijama u svim uzorcima vina i prošeka, iako je bio najviši u crnom vinu.

Identificirani polifenolni spojevi i njihove koncentracije navedeni su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Koncentracije (mg/l) odabranih fenolnih spojeva u uzorcima vina i proška.

Vino	Vino	Prošek	Prošek	Prošek	Vino	Prošek
	<i>Plavac</i>	<i>Plavac</i>	<i>Plavac</i>	<i>Plavac</i>	<i>Pošip</i>	<i>Pošip</i>
	<i>mali 2007.</i>	<i>mali 2007.</i>	<i>mali 2008.</i>	<i>mali 2009.</i>	2010.	2008.
Katehin	9,92±1,1	4,81±0,1	4,91±0,2	1,76±0,1	1,98±0,0	6,95±0,9
Epikatehin	45,37±4,6	75,55±2,1	76,35±0,3	72,85±0,2	24,55±0,1	77,48±7,6
Epikatehin galat	5,3±0,8	10,6±0,1	16,19±0,9	7,82±0,3	1,21 ± 5,3	nd
Galna kiselina	60,95±0,3	23,77±0,2	30,71±0,0	58,02±0,0	1,07± 0,0	1,85±0,0
3,4-dihidroksibenzojeva	4,55±0,2	26,19±0,1	22,42±0,1	21,15 ±1,5	6,04 ± 0,1	24,73±2,8
Vanilna kiselina	nd	2,98±0,0	4,84± 0,0	3,94 ± 0,0	0,71± 0,0	nd
p-kumarinska kiselina	2,89±0,2	2,02± 0,1	9,19±0,02	15,93±0,1	0,36± 0,0	0,64±0,0
Resveratrol	0,84±0,0	nd	0,05±0,1	0,54±0,1	0,078±0,0	nd

Nd (eng. non detectable)-spoj nije mjerljiv u uzorku

Podaci su dobiveni iz najmanje dva nezavisna uzorka i prikazani su kao srednja vrijednost ± SEM



Hrvatski prošek spada u veliku i raznoliku skupinu desertnih slatkih vina koja su u znanstvenoj literaturi najčešće opisana zbog specifičnih aroma i senzornih osobitosti. Stoga je rastući broj publikacija o njihovom kemijskom sastavu i užitnosti (50). Međutim, nedostaje publikacija o njihovim biološkim svojstvima. U Europi i sjevernoj Americi postoji mnogo sorti slatkih desertnih vina i značajno se razlikuju prema načinu proizvodnje, korištenim sortama grožđa, mogućem dodavanju šećera ili alkohola, duljini maceracije, načinu čuvanja i slično.

U opisanom znanstvenom istraživanju pokušali smo usporedbom „običnog“ vina i prošeka pokazati u kojoj mjeri i na koji način posebna tehnologija fermentacije sušenoga grožđa utječe na biološko svojstvo vazodilatacije i antioksidacije te polifenolni sadržaj i sastav vina.

U jedinoj studiju u kojoj su korištene iste sorte, Plavac mali i Pošip (51) uspoređivana je prisustvo i koncentracija hlapljivih tvari u prošek obaju sorti. Zanimljivo je da unatoč činjenici da se radi o crnoj i bijeloj sorti razlike u hlapljivim kemijskim spojevima nisu prevelike (postoje značajne razlike tek u 13 od identificiranog 61 spoja) te da su arome obaju prošeka zapravo usporedive.

Naše je istraživanje pokazalo očekivane značajne razlike u ukupnom sadržaju polifenola, flavonoida, neflavonoida i antocijana među crnim i bijelim prošecima. Usporedbom „običnog“ vina i prošeka *Plavca maloga* nailazimo na nekoliko zanimljivih rezultata. U prošek je sadržaj ukupnih fenola smanjen, a značajan udio polifenola čine ne-flavonoidi. Zanimljivo je da nema razlike u koncentraciji antocijana koji se uz procijanidine smatraju najznačajnijima za vazodilatacijsku aktivnost (34,35).

Unatoč činjenici da u prošek ima više ne-flavonoidnih spojeva, HPLC analize pojedinačnih fenolnih kiselina i resveratrola nisu pokazale značajne niti konzekventne razlike među vinima. Tako je primjerice koncentracija najzastupljenije galne kiseline najveća u crnom vinu i prošek iz 2009. godine, a koncentracija p-kumarinske kiseline najmanja u crnom vinu i prošek iz 2007. godine. Konzistentan je nalaz veće koncentracije 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u crnim prošecima u odnosu na vino. Koncentracija je ove kiseline također višestruko veća u bijelom prošek nego u vinu. Neke se kiseline nisu mogle izmjeriti, a moguće je objašnjenje da su u hidroalkoholnom mediju bile u obliku estera (39). Biološka aktivnosti ne-flavonoidnih spojeva, osobito resveratrola je često istraživana. Resveratrolu se pripisuju antioksidacijska, kardioprotektivna, vazodilatacijska, protuupalna, antitumorska i brojna djelovanja. Fenolne su kiseline slabije istraživane. Postoje publikacije o njihovim značajnim antioksidacijskim, ali slabim vazodilatacijskim svojstvima (52). Ipak,



dobivaju sve više na značenju zbog činjenice da se brojni fenolni spojevi *in vivo* pod utjecajem bakterija probavnoga trakta u svom metabolizmu pretvaraju u fenolne kiseline (53, 54, 55).

Od mjerenih flavonoidnih spojeva katehin je prisutniji u vinu, a epikatehin i epikatehin-galat u prošek. Iznenadujuće je da je epikatehinom najbogatiji bijeli prošek koji je ujedno i najsiromašniji flavonoidima. U literaturi postoje publikacije o izravnim vazodilatacijskim, ali i vazokonstriksijskim učincima ovih spojeva i njihovih derivata (56,57).

Bijeli prošek ima veći sadržaj ukupnih fenola, ne-flavonoida i antocijana u odnosu na vino. Pretpostavljamo da je tijekom sušenja došlo do koncentriranja, a tijekom proizvodnje do snažnije ekstrakcije polifenolnih spojeva.

Antioksidacijska svojstva povezana su s ukupnim sadržajem fenola te su svi prošeci dobri, ali malo slabiju antrioksidansi u odnosu na vino. Naši su rezultati u skladu s rezultatima ostalih studija o antioksidacijskom učinku polifenolima bogatih otopina (kakva je i vino), koji sugeriraju da je *in vitro* antioksidacija povezana s koncentracijom polifenola (21).

Prvu studiju o vazodilatacijskim učincima vina i vinskih fenola proveli su Fitzpatrick i suradnici 1993. godine na izoliranoj štakorskoj aorti (58). Studija opisuje vazodilatacijske učinke nekoliko sorti crnog i bijelog vina, soka iz grožđa i pojedinih polifenolnih spojeva iz vina i pokazuje da je vazodilatacijski učinak vina posredovan proizvodnjom NO-a i cGMP-a, kao drugog glasnika. Slijedile su studije o učincima vinskih polifenola i vina na različitim humanim i životinjskim izoliranim krvnim žilama (2, 59, 60). Tako su Flesch i suradnici pokazali da vina iz Italije i Francuske dilatiraju humane koronarne žile, za razliku od njemačkih vina koja nemaju takav učinak (61).

U našem istraživanju najbolji je vazodilatator crno vino, slijede crni prošeci s nešto slabijom aktivnošću, a najslabiju su vazodilatatori bijelo vino i prošek. Ovi se rezultati mogu usporediti sa studijom Mudnic I. i suradnika (62) u kojoj vrlo sličnim obrascem u usporedbi bijelih, crnih i kupinovitih vina, crno vino ostvaruje najsnažniji, kupinova vina srednje jak, a bijela vina najslabiji vazodilatacijski učinak. Ovdje se najsnažniji vazodilatacijski učinak crnog vina pripisuje njegovom bogatom sadržaju antocijana. Naše provedeno istraživanje je pokazalo da to nije tako. Prošeci i vino *Plavac mali* su gotovo jednaki u sadržaju antocijana, a razlike u vazodilatacijskom učinku su prisutne.

Uzevši sve u obzir, rezultati potvrđuju da se vazodilatacijski učinak složenih otopina, kao što je vino, ne može pripisati samo jednom polifenolnom spoju. Biološki je učinak rezultat sinergističkog djelovanja različitih polifenola, kao što je pokazano i za druge biološke učinke u različitim eksperimentalnim uvjetima (63, 64).

S obzirom na činjenicu da vazodilatacijski i antioksidacijski učinci doprinose prevenciji mnogih kardiovaskularnih bolesti koje su povezane s morbiditetom i mortalitetom u svijetu, dobiveni rezultati mogu biti značajni s epidemiološkog aspekta. Važno je naglasiti da se i u slučaju antioksidacijskog i vazodilatacijskog biološkog učinka rezultati *in vitro* studija ne smiju generalizirati i bez rezervno prenijeti na *in vivo* biološke sustave. Ovo je posebno važno glede antioksidacijskog učinka jer se u prehrambenoj tehnologiji ovom učinku daje veliki značaj, iako je često nejasno što se s ovim učinkom događa nakon unosa namirnica u organizam.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Crno vino je učinkovit i potentan izravni vazodilatator u *in vitro* uvjetima. Crni prošek ostvaruje također dobar vazodilatacijski učinak, međutim slabiji i manje potentan od vina dobivenog iz iste sorte. Vino i prošek bijele sorte grožđa ostvaruju zanemarivi *in vitro* vazodilatacijski učinak. Ipak, uspoređujući bijelo vino i bijeli prošek zaključujemo da je vino potentnije u ostvarivanju vazodilatacijskog učinka.
2. Crno vino je najbolji *in vitro* antioksidans. Sva tri uzorka crnog prošeka pokazala su se slabijim antioksidansi od crnog vina, ali je i njihov antioksidacijski učinak značajan. S druge strane, vino i prošek bijele sorte imaju vrlo nisku antioksidacijsku sposobnost uz minimalne međusobne razlike.
3. Crno se vino odlikuje visokim sadržajem ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana. Crni prošeci također imaju visoki sadržaj ukupnih fenola i antocijana, međutim glavna je razlika prema crnom vinu, osim niže ukupne vrijednosti polifenola, viša koncentracija ne-flavonoida. Bijelo vino ima gotovo dvostruko niži sadržaj polifenola i antocijana od bijelog prošeka, ali omjeri flavonoida i ne-flavonoida u ukupnom fenolnom sadržaju su im vrlo slični, odnosno prevaga ide u korist ne-flavonoida.
4. Prosušivanje grožđa i primjena tradicionalnih vinifikacijskih metoda omogućuje stvaranje posebno aromatičnih slatkih vina, prošeka, čiji se polifenolni sastav značajno razlikuje od standardnih vina. Ipak, primijenjena tehnologija dovodi do smanjenja izravnog vazodilatacijskog i antioksidacijskog biološkog učinaka *in vitro*.

## **7. LITERATURA**

1. German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:561-93.
2. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2005;45(4):287-306.
3. Di Castelnuovo A RS, Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation.* 2002;105:2836-44.
4. Streppel MT, Ocke MC, Boshuizen HC, Kok FJ, Kromhout D. Long-term wine consumption is related to cardiovascular mortality and life expectancy independently of moderate alcohol intake: the Zutphen Study. *Journal of Epidemiology and Community Health.* 2009;63(7):534-40.
5. Andriambeloson E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 1999;33(2):248-54.
6. Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, et al. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 2001;414(6866):863-4.
7. Russo P, Tedesco I, Russo M, Russo GL, Venezia A, Cicala C. Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD.* 2001;11(1):25-9.
8. Ruf JC. Alcohol, wine and platelet function. *Biological research.* 2004;37(2):209-15.
9. Kikura M, Levy JH, Safon RA, Lee MK, Szlam F. The influence of red wine or white wine intake on platelet function and viscoelastic property of blood in volunteers. *Platelets.* 2004;15(1):37-41.
10. Dudley JJ, Lekli I, Mukherjee S, Das M, Bertelli AA, Das DK. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2008;56(20):9362-73.

11. Kikura M, Levy JH, Safon RA, Lee MK, Szlam F. The influence of red wine or white wine intake on platelet function and viscoelastic property of blood in volunteers. *Platelets*. 2004;15(1):37-41.
12. Russo P, Tedesco I, Russo M, Russo GL, Venezia A, Cicala C. Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2001;11(1):25-9.
13. Ruf JC. Alcohol, wine and platelet function. *Biological research*. 2004;37(2):209-15.
14. Estreicher SK. *Wine: From Neolithic Times to the 21st Century*: Algora Pub.; 2006.
15. Jara-Palacios MJ, Gordillo B, Gonzalez-Miret ML, Hernanz D, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ. Comparative Study of the Enological Potential of Different Winemaking Byproducts: Implications in the Antioxidant Activity and Color Expression of Red Wine Anthocyanins in a Model Solution. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014.
16. Pretorius IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 2000;16(8):675-729.
17. Mirošević N. Atlas hrvatskog vinogradarstva i vinarstva: Golden Marketing - Tehnička Knjiga; 2009. 351-69 p.
18. Doymaz I. Sun drying of seedless and seeded grapes. *Journal of food science and technology*. 2012;49(2):214-20.
19. Teslime M, Ferhunde E., Birol, Y. S. Sun/solar drying of differently treated grapes and storage stability of dried grapes. *Journal of Food Engineering*. 1996;29(3-4):289-300.
20. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*. 1994;344(8916):193-4.
21. Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*. 1997;135(1):93-102.

22. Araya J, Rodrigo R, Orellana M, Rivera G. Red wine raises plasma HDL and preserves long-chain polyunsaturated fatty acids in rat kidney and erythrocytes. *The British journal of nutrition*. 2001;86(2):189-95.
23. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 1993;341(8843):454-7.
24. Andrade AC, Cesena FH, Consolim-Colombo FM, Coimbra SR, Benjo AM, Krieger EM, 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*. 2009;64(5):435-42.
25. Modun D, Music I, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, Obad A, 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):250-6.
26. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clinical chemistry*. 1995;41(1):32-5.
27. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998;59:317-33.
28. Maestri DM, Nepote V, Lamarque Al, Zygodlo JA. Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: advances in research*. 2006;37:105-35.
29. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011;126:1821-35.
30. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 84. 2011;84:513-23.
31. Rodríguez Vaquero MJ, Manca de Nadra MC. Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008;151:342-52.
32. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998;56(11):317-33.



33. Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:21-36.
34. Corder R, Mullen W, Khan NQ, Marks SC, Wood EG, Carrier MJ, et al. Oenology: red wine procyanidins and vascular health. *Nature.* 2006;444(7119):566.
35. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2000;48(2):220-30.
36. Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Bagchi M, Garg A, Milnes MM, et al. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Molecular and cellular biochemistry.* 1999;196(1-2):109-16.
37. Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free radical biology & medicine.* 2006;41(12):1727-46.
38. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine.* 2004;36(7):838-49.
39. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition.* 2004;79(5):727-47.
40. Suzuki A, Kagawa D, Fujii A, Ochiai R, Tokimitsu I, Saito I. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension.* 2002;15(4 Pt 1):351-7.
41. Suzuki A, Yamamoto M, Jokura H, Fujii A, Tokimitsu I, Hase T, et al. Ferulic acid restores endothelium-dependent vasodilation in aortas of spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension.* 2007;20(5):508-13.
42. Novakovic A, Bukarica L, Kanjuh V, Heinle H. Potassium channels-mediated vasorelaxation of rat aorta induced by resveratrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2006;99:360-4.
43. Li HF, Tian ZF, Qiu XQ, Wu JX, Zhang P, Jia ZJ. A study of mechanisms involved in vasodilatation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 2006;55(4):365-72.

44. Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular pharmacology*. 2002;61(2):294-302.
45. Gatto P, Vrhovsek U, Muth J, Segala C, Romualdi C, Fontana P, et al. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(24):11773-85.
46. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;23:970.
47. Singleton VL, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965;16:144-58.
48. Amerine MA, Ough CS. *Methods for Analysis of Musts and Wines*. New York: Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons Inc; 1980; 352 p.
49. Kramling TA, Singleton VL. An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1969;20:86-92.
50. Reboredo-Rodriguez P, Gonzalez-Barreiro C, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J. Effects of sugar concentration processes in grapes and wine aging on aroma compounds of sweet wines-a review. *Clinical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015; 55:1053-1072.
51. Budić-Leto I, Humar I, Zdunić G, Hribar J, Zlatić E. Volatile Compounds in Prošek Dessert Wines produced from White and Red Grapes. *Czech. J. Food Sci*. 2015; 33(4): 356-360.
52. Mudnic, I., Modun, D., Rastija, V., Vukovic, J., Brzic, I., Katalinic, V., et al. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*. 2010; 119:1205-1210.
53. Forester SC, Waterhouse AL. Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *J Nutr*. 2009;139(9):1824S-31S.

54. Aura AM, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, et al. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European journal of nutrition*. 2005;44(3):133-42.
55. Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A. Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2010;20(1):1-6.
56. Alvarez-Castro E, Campos-Toimil M, Orallo F. Apigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2004; 369:496-506.
57. Alvarez E, Campos-Toimil M, Justiniano-Bastaran H, Lugnier C, Orallo F. Study of mechanisms involved in the vasorelaxation induced by epigallocatechin -3-gallate in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 147:269-280.
58. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*. 1993;265(2 Pt 2):H774-8.
59. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. *European journal of pharmacology*. 2004;500(1-3):299-313.
60. Bohm M, Rosenkranz S, Laufs U. [The "French Paradox"--effects of alcohol, wine and wine polyphenols on the heart]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2002;127(51-52):2748-56.
61. Flesch M, Schwarz A, Bohm M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 2):H1183-90.
62. Mudnic I, Budimir D, Modun D, Gunjaca G, Generalic I, Skroza D, et al. Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines. *Journal of medicinal food*. 2012;15(3):315-21.

63. Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*. 2005;43(1):41-6.
64. Wallerath T, Li H, Godtel-Ambrust U, Schwarz PM, Forstermann U. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2005;12(2):97-104.

## **8. SAŽETAK**

**Naslov:** Izravni vazodilatacijski i *in vitro* antioksidacijski učinci vina i prošeka

**Cilj istraživanja:** Ispitati i usporediti fenolni sadržaj i biološke učinke vina i prošeka proizvedenih od iste sorte grožđa.

**Materijali i metode:** Za potrebe istraživanja upotrijebljena su 24 štakora soja Sprague - Dawley, mužjaka, stari 3-5mjeseci, tjelesne mase 300-450 g, uzgojenih u Sveučilišnoj nastambi za pokusne životinje Medicinskog fakulteta u Splitu.

U istraživanju sukorištena eksperimentalna vina (*Plavac mali*), bijela vina (*Pošip*) te prošeci od istih sorti grožđa. Nakon određivanja glavnih fenolnih frakcija (flavonoida i ne-flavonoida), ispitan je izravni vazodilatacijski učinak odabranih vina na izoliranim prstenovima aorte štakora. Kumulativnoj dozi (0,5 do 5%) pojedinačnog ispitivanog vina bili su izloženi isključivo prstenovi s očuvanim endotelom (acetilkolinska relaksacija veća od 60% nakon prethodne prekontrahiranosti noradrenalinom). Relaksacija vaskularnih prstenova potaknuta određenom dozom vina se izražavala kao postotak smanjenja vazokonstrikcije uzrokovane noradrenalinom.

Koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, kao i antioksidacijski kapacitet svih ispitivanih uzoraka određeni su spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijski kapacitet određen je FRAP (prema engl. *Ferric reducing antioxidant power*) metodom i izražen u mmol/L ekvivalenata troloksa (TE). Koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva, određena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, HPLC.

**Rezultati:** Izravni maksimalni vazodilatacijski učinak,  $E_{max}$ , crnog i bijelog prošeka u usporedbi sa standardnim crnim i bijelim vinom bio je 20-30% manji s vrijednostima  $60,4 \pm 3,9\%$ ,  $64,4 \pm 6,0\%$  i  $64,7 \pm 6,1\%$  vs.  $87,1\% \pm 5,0\%$  za crni prošek iz 2007., 2008. i 2009.godine vs. crno vino iz 2007.godine te  $E_{max}$   $12,9 \pm 3,1\%$  vs.  $21 \pm 4,9\%$  za bijeli prošek iz 2008. godine vs. bijelo vino iz 2010.godine. Antioksidacijska sposobnost crnog prošeka također pokazuje niže vrijednosti u usporedbi sa vinom iste sorte u sva tri uzorka, dok bijelo vino i prošek pokazuju slične vrijednosti koje su međutim zanemarivo niske. Crno se vino odlikuje visokim sadržajem ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana, dok je u crnom prošeku koncentracija ukupnih fenola za oko trećinu manja, antocijana ista, a ne-flavonoida trostruko veća. Bijelo vino i prošek imaju mnogo niži sadržaj antocijana i ukupnih fenola uz izraženu dominaciju ne-flavonoidne komponente.

**Zaključak:** Studija je pokazala da prošek crne sorte ima značajnu, ali ipak slabiju vazodilatacijsku i antioksidacijsku aktivnost *in vitro*, da je vrlo bogat polifenolima, ali da ima manju koncentraciju ukupnih fenola i flavonoida, a veću koncentracijom ne-flavonoida u usporedbi sa standardnim crnim vinom (*Plavac mali*).

Vino i prošek dobiveni od bijele sorte grožđa ostvarili su slabi vazodilatacijski i antioksidacijski učinak *in vitro*, iako je vino bilo potentnije u ostvarivanju vazodilatacijskog učinka. Odlikuju se niskim koncentracijama i antocijana i ukupnih fenola te dominacijom ne-flavonoida.

Uspoređujući polifenolni sadržaj i sastav, može se zaključiti da tradicionalni način proizvodnje prošeka u usporedbi sa standardnim tehnikama proizvodnje vina dovodi do povećanja koncentracije određenih ne-flavonoidnih i flavonoidnih spojeva, koji međutim ne doprinose značajno vazodilatacijskom i antioksidacijskom učinku.

## **9. SUMMARY**



**Title:** Vasodilatory and antioxidant activity of Prosek dessert wine in comparison to standard wine

**Keywords:** red wine, wine polyphenols, vasodilation, antioxidant activity, rat aorta

**Objective:** Dessert wine Prosek is produced in accordance with the principles of traditional wine making method by fermentation of dried grapes. It results with wine of distinctive organoleptic properties, high alcohols and unfermented sugars. In comparison with standard wines, biological effects of dessert wines are largely uninvestigated. Our aim was to analyze and compare biochemical, antioxidant and direct vasodilatory activity of Prosek produced from the most important red autochthonous Croatian variety *Plavac mali* with the corresponding standard red wine and Prosek produced from white variety *Pošip* with the standard white wine.

**Materials and methods:** Three vintages of Prosek *Plavac mali* (2007, 2008 and 2009) were compared with wine *Plavac mali* from 2007 and one vintage of Prosek *Pošip* from 2008. with wine *Pošip* from 2010. All tested wines were analyzed spectrophotometrically for the content of total phenolics, flavonoids, non-flavonoids and anthocyanins and by HPLC for the content of selected flavanols and phenolic acids. The antioxidant activity was determined by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). The vasodilatory activity of wines was determined in the isolated rat aortic rings (N=24 rats) precontacted by norepinephrine ( $10^{-7}$  M). Wines were applied in cumulative concentrations from 1:10000 to 5:1000.

**Results:** The direct maximal vasodilatory effect of red Prosek (*Plavac mali*) relative to the standard red wine was 20 - 30% lower with  $E_{max}$  of  $60,4 \pm 3,9\%$ ,  $64,4 \pm 6,0\%$ ,  $67,5 \pm 6,1\%$  and  $87,1\% \pm 5\%$  for Prosek from 2007, 2008, 2009 and wine from 2007, respectively.

Maximal vasodilatory effects of white Prosek (*Pošip*) relative to the standard white wine was also lower with  $E_{max}$   $12,9 \pm 3,1\%$  and  $21,6 \pm 4,9\%$  for Prosek from 2008 and wine from 2010, respectively. Antioxidant activity of red Prosek was also consistently lower in all three measurement systems in comparison to red wine. White Prosek and white wine showed similar ability to reduce the ferric ion, but the values of their antioxidant activity were negligible low. The total phenolic and flavonoid content was higher in red wine, whereas red wine and Prosek samples were similar in anthocyanins content. On the other hand, Prosek had three-fold higher content of non-flavonoids.

**Conclusions:** Prosek produced from red and white variety proved inferior to standard red and white wine in direct vasodilatory and antioxidant activity. Traditional Prosek wine making technique resulted in higher content of special flavonoid and non-flavonoid compounds which were not related to vasodilatory and antioxidant activity of wine.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Osobni podatci**

Ime i prezime: Zvonka Cigić

Mobitel: 091 / 722-0679

Elektronska pošta: [zvonka.cigic@gmail.com](mailto:zvonka.cigic@gmail.com)

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 22. srpnja 1991. godine, Šibenik

**Obrazovanje**

1998. – 2006. Osnovna škola Faust Vrančić, Šibenik

2006. – 2010. opća gimnazija Antun Vrančić, Šibenik

2010. – 2016. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

**Strani jezici**

Engleski jezik: aktivno znanje

Talijanski jezik: osnovno znanje