

Ефект от приема на сок от арония върху антиоксидантния капацитет на кръвна плазма при здрави доброволци (Предварително съобщение)

Инж. Петко Денев дт,¹ д-р Николай Ботушанов,² д-р Димитър Троев,² доц. д-р Мария Орбецова,² доц. Мария Крачанова,¹ проф. Христо Крачанов¹

¹ Лаборатория по биологично-активни вещества към ИОХсЦФ, БАН, Пловдив

² Клиника по ендокринология, Медицински университет, Пловдив

Резюме

Изследван е ефектът на ежедневния прием на 200 ml сок от арония върху антиоксидантния капацитет на кръвната плазма при 20 здрави доброволци в продължение на 15 дни. С цел да се избегне пречищаното въздействие на кръвните протеини и да се оцени само антиоксидантния капацитет на нискомолекулните вещества, приети със сока от арония, плазмата бе подложена на депотеинизиране. Получените резултати от изследвания антиоксидантен капацитет на депотеинизираната плазма бяха сравнени с тези при сходна по пол и възраст контролна група без прием на сок. Получените резултати показват статистически значимо повишение на антиоксидантния капацитет на плазмата от изходен $1777.49 \pm 329.387 \mu\text{molTE/l}$ до $2005.75 \pm 252.211 \mu\text{molTE/l}$ на 10 ден от приема, като изненадващо се отчете намаление на антиоксидантния капацитет на 15 ден ($1828.18 \pm 333.515 \mu\text{molTE/l}$) спрямо този на 10 ден.

Ключови думи: арония, антиоксидантна активност, кръвна плазма.

Effect Of Aronia Juice Intake On The Antioxidant Capacity Of Blood Plasma In Healthy Volunteers (Preliminary study)

Petko Denev PhD,¹ Dr. Nikolay Botushanov,² Dr. Dimitar Troev,² Assoc. prof. Dr. Maria Orbezova,² assoc. prof. Maria Kratchanova PhD,¹ prof. Dr. Sci. Christo Kratchanov¹

¹ Laboratory of Biologically Active Substances, Plovdiv, IOC CF – BAS.

² Endocrinology clinic, Medical University, Plovdiv.

Abstract

The effect of the daily intake of 200 ml aronia juice on the antioxidant capacity of blood plasma, isolated from 20 healthy volunteers for a 15-days period was investigated. To avoid hindering effect of blood proteins and to assess only the contribution of the low-molecular antioxidants, taken with the juice, plasma samples were deproteinized. The obtained results for the plasma antioxidant capacity of the investigated group were compared to a control group which did not take aronia juice. The results indicate that blood plasma antioxidant capacity increases statistically significant from $1777.49 \pm 329.387 \mu\text{molTE/l}$ in the beginning to $2005.75 \pm 252.211 \mu\text{molTE/l}$ on the 10th day from the investigation. Surprisingly on the 15th day, decrease of the plasma antioxidant capacity was observed (1828.18 ± 333.515), compared to the 10th day.

Key words: aronia, antioxidant capacity, blood plasma.

Увод

Редица епидемиологични изследвания свързват консумацията на плодове и зеленчуци с намален риск от рак, сърдечно-съдови болести и заболявания, обусловени от стареенето.^{2,3} Все още тази обратна връзка не е напълно изяснена и не се знае точният механизъм, по който фитонутриентите предпазват от болести. Плодовете и зеленчуците съдържат голям брой биологично активни вещества и се счита, че антиоксидантното им действие е един от възможните механизми, който определя техния превантивен ефект. Предвид факта, че плодовете и зеленчуците се различават силно по своята антиоксидантна активност (АОА), са необходими нови изследвания, за да се проучи връзката между приема на различни храни и АОА *in vivo*.

Плодовете на аронията (*Aronia melanocarpa*) са все още малко позната суровина у нас и намират ограничено приложение в производството на храни. Терапевтичните данни за аронията са обобщени наскоро.⁹ Сред най-изявените ефекти на арониевите плодове е антиок-

сидантният ефект. Има много данни от *in vitro* изследвания за противораковия ефект на плодовете или на екстракти от тях. В серия от изследвания сокът от арония е показал хепатопротективен ефект, намалявайки индуцираната чрез тетрахлорметан липидна пероксидация в черния дроб и кръвната плазма на третираните животни. При експериментален модел на хиперлипидемия при плъхове приемът на сок от арония пречи на повишаването на нивата на холестерола, LDL-холестерола и триглицеридите в кръвната плазма. След прием на сок от арония е наблюдавано и намаление в серумната глюкоза, холестерола и кръвното налягане при пациенти с повишени нива на холестерол. Подобно хипотензивно действие на сок от арония е наблюдавано и при пациенти, прекарвали миокарден инфаркт, както и при пациенти с диабет тип II. Арониевите плодове са показали и потенциал при превенция и контрол на диабет тип II и затлъстяване.⁹

В литературата липсват данни за ефекта на плодове или екстракти от арония върху антиоксидантния капацитет на кръвната плазма. Поради високото съдържание на биологично активни вещества и многобройните терапевтични ефекти на аронията решихме да проведем такова изследване

Цел

Целта на настоящата работа е да се изследва ефекта на приема на сок от арония върху антиоксидантния капацитет на кръвна плазма при здрави доброволци.

Материали и методи

Изследването бе проведено със сок от арония, произведен в индустриални условия, опакован в стерилни, херметични опаковки (тип „Тетрапризма“).

Депротеинизиране на кръвна плазма: Депротеинизирането на кръвната плазма бе извършено съгласно процедурата, описана от Prior et al.⁶ Накратко, кръвната плазма се размразява и към 100 µl от нея се прибавят 200 µl 96% етанол, 100 µl дестилирана вода и 400 µl 0.5% перхлорна киселина. Сместа се разбърква и центрофугира (5 min, 10000x g). Супернатантът се отдеканти-

ра и използва за определяне на антиоксидантна активност.

Определяне на антиоксидантната активност: Антиоксидантната активност на сока от арония и депротеинизирана кръвна плазма бяха определени посредством Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC метод, разработен от Ou et al.,⁵ с някои модификации. Измерванията се извършват на FLUOstar OPTIMA флуориметър (BMG LABTECH, Offenburg, Germany). Бяха използвани вълна на възбуждане 485 nm и вълна на излъчване 520 nm. Резултатите са изразени в µmolTE/l кръвна плазма.

Определяне на общо количество полифенолни вещества: Определянето се извършва по метода на Singleton & Rossi, (1965).⁸

Определяне на общи антоцианини: Използван е pH-диференциален метод, описан от Lee et al.⁴

Определяне на сухи вещества, редуциращи захари и киселинност: За определяне на сухи вещества бе приложен рефрактометричният метод, а на редуциращи захари на сока от арония – методът на Бертран.¹ Киселинността на сока е определена титриметрично.¹

Клинично изследване: В проучването участваха 20 здрави доброволци,

Показател	Стойност
Сухи вещества при 20°C, рефрактометрично, %	13
Киселинност, като лимонена, %	0.7
Редуциращи захари, %	8.4
Полифенолно съдържание, mg/l	2934
Съдържание на антоцианини, mg/l	545.2
ORAC Антиоксидантна активност, µmolTE/l	42188

Табл. 1. Състав и характеристика на сок от арония

Ден	Антиоксидантен капацитет	
	Изследвана група I, µmolTE/l	Контролна група II, µmolTE/l
Изходно	1777.49 ± 329.38	1796.91 ± 418.71
5 ден	1712.80 ± 301.38 (p>0,05)*	1823.60 ± 204.53 (p>0,05)*
10 ден	2005.75 ± 252.21 (p<0,05)*	1964.35 ± 329.38 (p>0,05)*
15 ден	1828.18 ± 333.51 (p>0,05)*	1919.01 ± 251.24 (p>0,05)*

Табл. 2. Ефект на приема на сок от арония върху антиоксидантен капацитет на кръвна плазма

* Спрямо изходните стойности за съответната група

разделени в две групи: група I (6 мъже и 4 жени), които приемаха сок от арония и група II – контролна група от 10 индивида (7 жени и 3 мъже), които не приемаха сок. Всички участващи в проучването индивиди бяха на възраст 20–40 години, в добро здраве определено чрез снемане на щателна анамнеза, подробен физикален преглед и лабораторни изследвания. Всички участващи и от двете групи отговаряха на следните включващи критерии: 1) липса на анамнеза за сърдечно-съдови, чернодробни, гастроинтестинални или бъбречни заболявания; 2) не злоупотребяват с алкохол; 3) не са приемали антибиотици, витамини и минерали в рамките на 4 седмици преди включването им в проучването; 4) не пушат. При жените беше изключена настояща бременност чрез провеждане на тест за бременност.

Първата група приемаше ежедневно еднократно сутрин на гладно 200 ml сок от арония в продължение на 15 дни. Изходно, на 5, 10 и 15 ден се вземаше кръв сутрин на гладно за определяне на антиоксидантния капацитет на плазмата.

Резултати

Бяха определени съставът и антиоксидантната активност на сока от арония, използван в клиничното изследване. Резултатите са представени в табл. 1. Сокът се характеризира с висока антиоксидантна активност – 42188 µmolTE/l и високо съдържание на полифеноли и антоцианини, съответно 2934 mg/l и 545.2 mg/l. С ежедневен прием от 200 ml сок от арония се приемат 587 mg полифенолни съединения, от които 109 mg антоцианини и 8438 µmolTE/l антиоксидантна активност.

В табл. 2 са представени резултатите за изменението в антиоксидантния капацитет на кръвна плазма, измерен чрез Oxygen Radical Absorbance Capacity –

ORAC при всички, изследвани индивиди, след статистическа обработка на резултатите.

Обсъждане

В един от първите опити да се изчисли дневната необходимост от антиоксиданти, приемани с храната Prior et al.⁷ демонстрират, че приемът на някои плодове като боровинки, грозде и киви се свързва с повишение на антиоксидантния капацитет на кръвната плазма. От друга страна, приемът на въглехидрати и мазнини е свързан с намаление на антиоксидантния статус на плазмата. Авторите изчисляват, че в зависимост от дневния енергиен прием между 5000 и 15000 $\mu\text{mol TE/g}$ са необходими за покриване на дневните нужди от антиоксиданти. ORAC антиоксидантната активност на използвания сок от арония е доказателство, че този продукт е един добър източник на антиоксиданти. В направено от нас сравнително изследване бе установено, че сокът от арония превъзхожда значително други подобни плодови напитки, предлагани на българския пазар по съдържанието на полифенолни съединения и антоцианини и е на първо място по антиоксидантна активност (резултатите не са представени).

Известно е, че в кръвната плазма присъстват множество протеини, които проявяват антиоксидантни свойства. С цел да се оцени само влиянието на антиоксидантите, приети със сока от арония, всички проби от кръвна плазма бяха депротеинизирани, чрез утаяване на белтъците с перхлорна киселина. Получените резултати от изследвания антиоксидантен капацитет (АОК) на депротеинизираната плазма бяха сравнени с тези при сходна по пол и възраст контролна група без прием на сок. В двете групи – с и без прием на сок бяха отчетени сходни изходни стойности на антиоксидантния капацитет на плазмата, което отразява относително еднакъв прием на антиоксиданти с храната. Резултати-

те показват статистически значимо повишение на антиоксидантния капацитет на плазмата от изходен $1777.49 \pm 329.387 \mu\text{molTE/l}$ на $2005.75 \pm 252.211 \mu\text{molTE/l}$ на 10 ден от приема, ($t = 0.629$; $p < 0.05$), като този ефект намалява на 15 ден – $1828.18 \pm 333.515 \mu\text{molTE/l}$ (статистически незначима разлика в стойностите на антиоксидантния капацитет спрямо изходните $p > 0.05$). Сравнено с контролната група се отчита статистически значимо повишаване на АОК на 10-ти ден ($2005.75 \pm 252.211 \mu\text{molTE/l}$ спрямо $1964.35 \pm 503.852 \mu\text{molTE/l}$; $p < 0.05$) и заличаване на тази разлика на 15 ден. В групата без прием на сок не се отчитат статистически значими разлики изходно и на десети ден ($p > 0.05$), като промяната в абсолютните стойности може би отразява промяна в хранителния режим за този период.

Наскоро са обобщени няколко мащабни изследвания, изследващи връзката между приема на храни, съдържащи различни антиоксиданти и антиоксидантния капацитет на кръвната плазма.⁷ Изследванията са проведени в няколко лаборатории и при използване на различна постановка на експериментите. Установено е, че след прием на боровинки, киви и череши, но не и на ягоди, антиоксидантният капацитет на кръвната плазма се повишава. Резултатите от тези изследвания сочат, че храната влияе върху антиоксидантния капацитет *in vivo*, като нейното въздействие се обуславя от няколко фактора: 1) антиоксидантната активност на храната; 2) количество приета храна; 3) вид на приетите биологично активни компоненти; 4) метаболизъм на приетите антиоксиданти в организма; 5) съдържанието на фруктоза в приетата храна.

От направените изследвания става ясно, че консумацията на храни с висока антиоксидантна активност не гарантира повишение на антиоксидантния капацитет *in vivo*. Това се дължи на факта, че биологично активните компоненти в храните, освен чрез директно антиоксидант-

но действие влияят върху биологичните процеси и индиректно, чрез многообразието от сигнали, които защитават клетката от оксидативното увреждане на свободните радикали. Все пак, по-задълбочени клинични изследвания са нужни за да се изследва механизмът на повишаване на антиоксидантния капацитет на кръвната плазма и намаляването на риска от различни заболявания.

Изводи

Получените резултати сочат, че доказаният *in vitro* антиоксидантен ефект на плодовия сок от арония се реплицира и *in vivo* при здрави индивиди. Това ни дава основание да считаме, че приемът на сок от арония би имал положителен ефект при предотвратяване развитието на заболявания, свързани с оксидативен стрес. За да се изясни точния механизъм, по който се повишава антиоксидантния капацитет на кръвната плазма, са нужни допълнителни изследвания.

Книгопис

1. Люцканов Н., Т. Иванова. Ръководство за практически упражнения по биохимия. Пловдив, ВИХВП, 1985.
2. De Stefani E. et al. Vegetables, fruits, related dietary antioxidants, and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*, 38, 2000, 23–29.
3. Josphipura K.J. et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*, 134, 2001, 1106–1114.
4. Lee J. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruits juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int*, 88, 2005, № 5, 1269–1278.
5. Ou B., M. Hampsh-Woodill, R.L. Prior. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, 49, 2001, 4619–4626.
6. 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*, 51, 2003, №11, 3273–3279.
7. Prior R.L. et al. Plasma Antioxidant Capacity Changes Following a Meal as a Measure of the Ability of a Food to Alter *In Vivo* Antioxidant Status. *J Am Coll Nutr*, 26, 2007, № 2, 170–181.
8. Singleton V., J. Rossi. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16, 1965, 144–158.
9. Valcheva-Kuzmanova S.V., A. Belcheva. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med*, 48, 2006, 11–17.