



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Петар Милић

**Испитивање ефеката дијете обогаћене екстрактом
ароније на настанак и развој метаболичког синдрома на
анималном моделу**

Докторска дисертација

Ментор: Весна Вучић, научни саветник

Крагујевац, 2019. Година

САДРЖАЈ

1. УВОД	2
1.1. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ	2
1.1.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	3
1.1.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	5
1.1.3. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	5
1.1.4. КОМПЛИКАЦИЈЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	7
1.2. ЛЕЧЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	9
1.2.1. НЕФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	9
1.2.1.1. Физичка активност у циљу лечења метаболичког синдрома	9
1.2.1.2. Промене у навикама исхране у циљу лечења метаболичког синдрома	10
1.2.1.3. Фитонутријенси и биоактивна једињења у циљу лечења метаболичког синдрома	13
1.2.1.4. Дијета обogaћена екстрактом ароније у циљу лечења метаболичког синдрома	17
1.2.1.4.1. Фармаколошки ефекти ароније	18
1.2.2. ФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	20
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	22
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	24
3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ	24
3.2. ХРОНИЧНИ ПРОТОКОЛ СТУДИЈЕ	24
3.3. ВАРИЈАБЛЕ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ	27
3.3.1.1. Телесна тежина пацова	27
3.3.1.2. Функција срца пацова	27
3.3.1.3. Тест оралног оптерећења глукозом	30
3.3.1.4. Липидни профил	30
3.3.1.5. Маснокиселински профил	31
3.3.1.6. Нивои гвожђа	32
3.3.1.7. Параметри оксидационог стреса	32
3.3.1.8. Хистопатолошка анализа срца, јетре, бубрега и панкреаса	33
3.4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	34
4. РЕЗУЛТАТИ	36
4.1. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ПРОМЕНУ ТЕЛЕСНЕ ТЕЖИНЕ ПАЦОВА	36
4.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА	37
4.3. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ КОД ПАЦОВА	45
4.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА	47

4.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА -----	48 -
4.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА -----	56 -
4.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА-----	57 -
4.8. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ХИСТОПАТОЛОГИЈУ ПОЈЕДИНИХ ТКИВА-----	64 -
4.8.1. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ МИОКАРДА -----	64 -
4.8.2. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ЈЕТРЕ-----	66 -
4.8.3. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ БУБРЕГА-----	68 -
4.8.4. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ПАНКРЕАСА-----	70 -
5. ДИСКУСИЈА-----	73 -
5.1. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ПРОМЕНУ ТЕЛЕСНЕ ТЕЖИНЕ ПАЦОВА -----	73 -
5.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА -----	73 -
5.3. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ КОД ПАЦОВА-----	76 -
5.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА--	77 -
5.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА -----	78 -
5.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА -----	79 -
5.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА-----	80 -
5.8. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ХИСТОПАТОЛОГИЈУ ТКИВА МИОКАРДА, ЈЕТРЕ, БУБРЕГА И ПАНКРЕАСА-----	81 -
6. ЗАКЉУЧЦИ-----	84 -
7. ЛИТЕРАТУРА-----	86 -

I

УВОД

1. УВОД

1.1. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ

Метаболички синдром се у литератури по први пут споменуо почетком 20. века, када је описан као група повезаних метаболичких поремећаја који се јављају заједно. Од тада су се дефиниција и критеријуми за дијагнозу метаболичког синдрома мењали из године у годину (1).

Према дефиницији Светске Здравствене Организације (*World Health Organization*) из 1994. године, дијагноза метаболичког синдрома се може поставити код пацијената који уз дијабетес мелитус тип 2 и/или инсулинску резистенцију или поремећену толеранцију на глукозу имају присутна два или више од следећих критеријума: триглицериди (TG) $\geq 1,7$ mmol/L, липопротеин високе густине (HDL) $< 0,9$ mmol/L код мушкараца, односно $< 1,0$ mmol/L код жена; микроалбуминурија > 20 ug/min, тј. однос албумина и креатина > 30 mg/g; систолни крвни притисак (*systolic blood pressure*, SBP) ≥ 140 mmHg и дијастолни крвни притисак (*diastolic blood pressure*, DBP) ≥ 90 mmHg; централна гојазност коју карактерише BMI (*body mass index*) ≥ 30 kg/m² или однос струка и кукова $> 0,90$ код мушкараца, односно $> 0,85$ код жена (2). Европска група за инсулинску резистенцију (*European Group of Insulin Resistance*) је 1999. године објавила да се метаболички синдром може дијагностиковати код пацијената који уз инсулинску резистенцију имају још два од следећих критеријума: централна гојазност, односно обим струка ≥ 94 cm код мушкараца, односно ≥ 80 cm код жена; TG $\geq 2,0$ mmol/L и HDL $< 1,0$ mmol/L; SBP ≥ 140 mmHg и DBP ≥ 90 mmHg; глукоза наше $\geq 6,1$ mmol/L (3). Према Националном програму за едукацију и третман холестерола (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*), који је објављен 2001. године, метаболички синдром се може дијагностиковати код пацијената са присутним, најмање три, од следећих критеријума: централна гојазност, односно обим струка ≥ 102 cm код мушкараца, односно ≥ 88 cm код жена; TG $\geq 1,7$ mmol/L и HDL $< 1,03$ mmol/L код мушкараца, односно $< 1,3$ mmol/L код жена; SBP ≥ 130 mmHg и DBP ≥ 85 mmHg; глукоза наше $\geq 6,1$ mmol/L (4). Ови критеријуми потврђени су и 2005. године од стране Америчке асоцијација за срце (*American Heart Association*) и Националног института за срце, плућа и

крв (*National Heart, Lung, and Blood Institute*) (5). Исте године (2005.) Интернационална федерација за дијабетес (*International Diabetes Federation*) је пружио своју дефиницију која се од претходне разликовала само у следећим критеријумима: обим струка ≥ 94 cm код мушкараца, односно ≥ 80 cm код жена; глукоза наше $\geq 5,6$ mmol/L или постављена дијагноза за тип 2 дијабетес мелитуса (6).

Као што се може приметити, у основи свих наведених дефиниција налазе се исти параметри, који се само разликују у граничним вредностима. С обзиром да се поједини од наведених параметара битно разликују и од етничке припадности, у новијим препорукама наведене су различите вредности у зависности од земље, односно етничке групе којој пацијенти припадају (5, 6).

1.1.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

Међу основним карактеристикама метаболичког синдрома издваја се поремећај у нивоима глукозе и инсулина, при чему настаје хипергликемија, инсулинска резистенција или дијабетес мелитус тип 2. Под поремећајем нивоа инсулина подразумева се инсулинска резистенција која настаје када ћелије постану мање осетљиве на инсулин тако да он не може да оствари свој ефекат у ћелијама. С обзиром да тада остаје повећана количина глукозе у циркулацији, ствара се већа потреба за инсулином, који се временом накупља и доводи до оштећења бета ћелија панкреаса и оштећења њихове функције (7, 8). Као резултат ових поремећаја у организму може да настане хипергликемија и дијабетес мелитус тип 2, гликозурија и кетоацидоза, или бројна друга оштећења на ткивима која могу довести до кардиоваскуларних болести, атеросклерозе, хипертензије, дисфункције бета ћелија панкреаса, болести бубрега и других (7-10).

Повишен крвни притисак, односно хипертензија је још једна од неизоставних карактеристика метаболичког синдрома која обично укључује сужење артерија и издваја се као најважнији фактор ризика за кардиоваскуларна, ренална и друга хронична, незаразна обољења. Постоје различите класификације хипертензије и оне се махом разликују само у граничним вредностима. Међутим, битно је напоменути да се у новијим класификацијама

уводи и термин "предијабетес" који подразумева вредности SBP у опсегу од 120 до 139 mmHg и/или DBP у опсегу од 80 до 89 mmHg. Ово је посебно важно када је реч о метаболичком синдрому, јер већина пацијената заправо има прехипертензију или евентуално хипертензију првог степена (11, 12).

Такође, дуги низ година се разматрало да ли абдоминална гојазност треба и на који начин да стоји у критеријумима и као што је горе наведено, 2005. године она се уводи као обавезан критеријум за дијагнозу метаболичког синдрома. Гојазност која се карактерише претераним накупљањем, односно акумулацијом масти, значајно доприноси настанку атеросклерозе и других кардиоваскуларних обољења. Иако се дуги низ година гојазност представљала кроз вредности ВМІ, данас се зна да је најбољи показатељ гојазности заправо обим струка. На основу ВМІ не може се одредити каква је дистрибуција масти у телу, а сматра се да је то кључни фактор када је реч о гојазности. Узимајући у обзир преваленцију гојазности која је, у протекле две деценије повећана за три пута, овај критеријум се мора схватити озбиљно и размотрити сви начини који би могли да утичу на спречавање настанка или ублажавање гојазности (13).

Дислипидемија, која подразумева повишене нивое TG, LDL и смањене нивое HDL, такође је веома важна карактеристика метаболичког синдрома и повећава ризик за настанак обољења као што су дисфункција бета ћелија панкреаса, атеросклероза, стеатоза јетре и друге (14). TG су естри глицерола, трихидроксилног алкохола са масним киселинама чија је улога да у организму стварају енергетске депое из којих се прво ослобађају масне киселине, а потом и енергија која је неопходна за ћелије, а самим тим и за организам. Иако су TG дуги низ година искључивали из групе фактора ризик за кардиоваскуларне болести, данас се са сигурношћу може рећи да је чак један од најзначајнијих фактора (15). Поред TG, значајну улогу има и HDL холестерол за који се сматра да зависи од масе интраабдоминалног масног ткива, а не од укупне количине (масе) масног ткива (16). Са друге стране повишени нивои LDL-а нису неопходни за настанак метаболичког синдрома, али уколико постоје код пацијената, могу да имају клинички значај (17).

1.1.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

Имајући у виду да постоје различите дефиниције и критеријуми за постављање дијагнозе метаболичког синдрома, веома је тешко прецизно одредити преваленцију за овај синдром. На основу новијих података из литературе може се приметити да преваленција метаболичког синдрома расте паралелно уз гојазност, а посебно су погођене особе које живе у развијеним земљама, а имају нездраве животне навике, као што су седентерни начин живота, конзумација цигарета и алкохола, нездрава исхрана, нижи социоекономски статус и друге (18, 19). Сматра се да данас широм света постоји пандемија гојазности, како код деце и адолесцената, тако и код одраслих. Ова пандемија није заобишла ни Србију, а посебно забрињава чињеница што је драстичан пораст преваленције у последњих неколико година примећен код деце. Наиме, преваленција за предгојазност код деце се повећала за десетак процената, док се преваленција за гојазност готово удвостручила у периоду од 2006. до 2013. године (20).

1.1.3. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

Када се говори о факторима ризика за настанак метаболичког синдрома, мора се напоменути да претерана телесна тежина уз присуство централног (абдоминалног, висцералног) типа гојазности и резистенција на инсулин, се налазе у патофизиологији настанка метаболичког синдрома. Међутим, примећено је да одрђени образац понашања доприноси настанку и развоју метаболичког синдрома. Под образцем понашања подразумева се прекомерен унос хране (који доводи до гојазности) и/или неадекватна употреба воћа и поврћа у свакодневкој исхрани, одсуство физичке активности (седентерни начин живота), прекомерна конзумација масне хране, као и брзе хране, алкохола и дувана. Овакав образац понашања директно или индиректно доводи до настанка и развоја метаболичког синдрома (21).

Према Светској Здравственој Организацији препоручена дневна количина воћа и поврћа је око 400 g, односно пет порција. Сматра се да уколико би се повећао унос воћа и

поврћа, преваленција исхемијске болести би се смањила за 31%, а церебралног инсульта за 11%. Уз то, нездрава исхрана махом сачињена од масти и шећера доприноси развоју метаболичког синдрома, али и свих кардиометаболичких и малигних обољења. Промене у навикама исхране у многоне могу побољшати квалитет живота, али и спречити или допринети лечењу метаболичког синдрома (22).

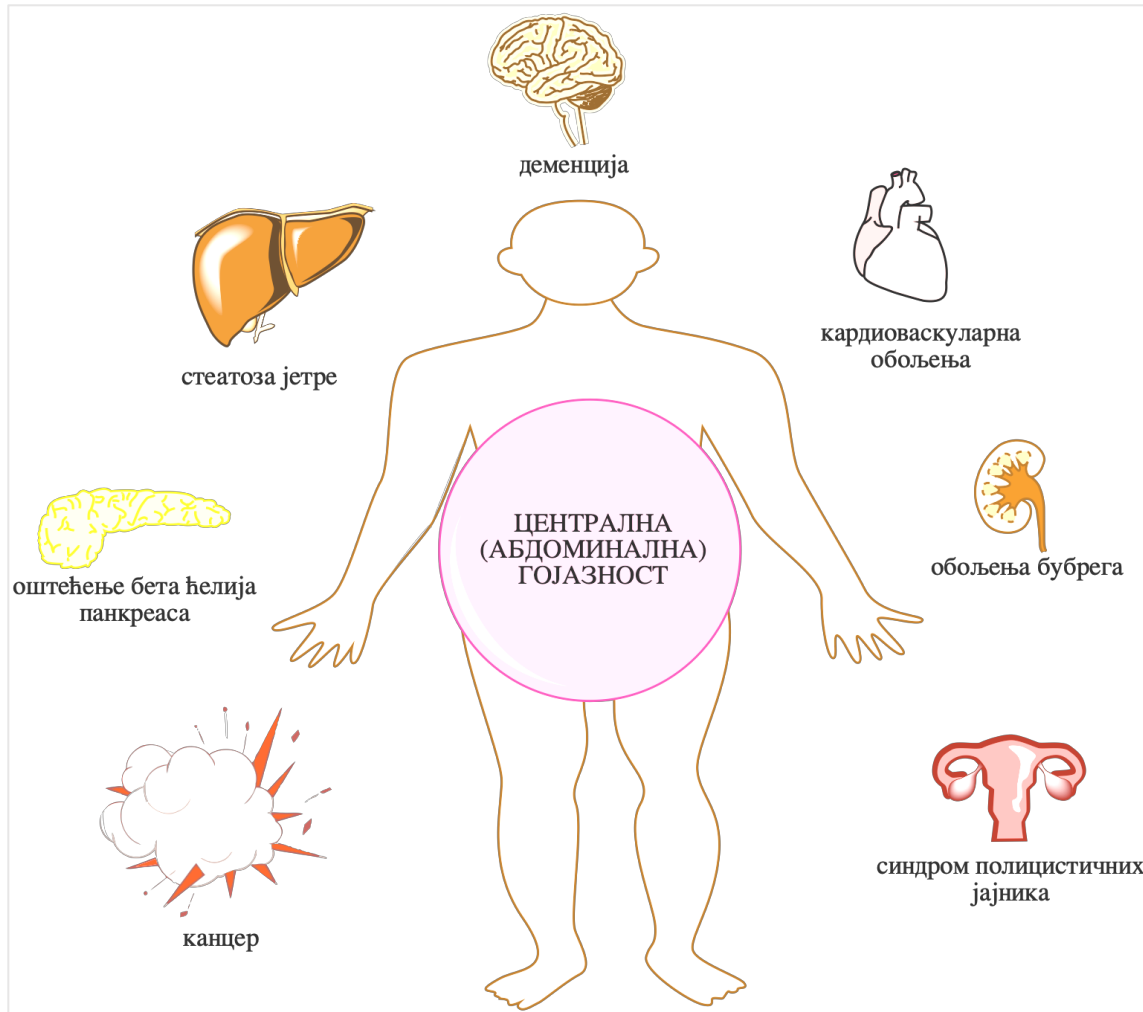
Физичка неактивност је, такође веома важан фактор који доводи до настанка метаболичког синдрома, а здравствени ефекат физичке активности је одавно познат не само за спречавање или побољшање симптома обољења већ и у побољшању мишићне снаге, кондиције и квалитета живота уопште (23). Према студији коју су објавили *Cavill* и сарадници, физичка активност може да умањи ризик за болести срца, мождани удар, гојазност, дијабетес мелитус тип 2, обољења коштаног система, карциноме дебелог црева и дојке, депресију и друге психолошке болести (24).

Као што је већ напоменуто, конзумирање цигарета или алкохола веома је повезано са настанком и развојем кардиоваскуларних обољења, а посебно са коронарном болешћу, исхемијским можданим ударом, периферним артеријским болестима и анеуризмом трбушне аорте. Такође у истраживању које је спроведено у Сједињеним Америчким Државама, у коме се испитивала повезаност конзумације цигарета (активна и пасивна изложеност дуванском диму) и преваленције метаболичког синдрома, показано је да је преваленција метаболичког синдрома код адолесцената који нису били изложени дуванском диму износила 1,2 %, док је код адолесцената који су били пасивно изложени диму 5,4 %, а код адолесцената који су активно били изложени дуванском диму 8,4 %. Ови подаци само су још једном доказали да је дувански дим веома значајан фактор ризика за настанак кардиоваскуларних обољења (25).

Када је реч о алкохолу, треба се прво споменути чињеница да црвено вино, због полифенола који се налазе у њему (поготово ресерватрола), има благотворан учинак на срце и крвне судове, али само уколико се конзумира у умереној количини (26). Оптимална количина износи до две чаше за мушкарце, односно до једне чаше за жене. Међутим, уколико се та умерена, оптимална количина алкохола прекорачи, сви благотворни ефекти алкохола, чак и црвеног вина нестају и онда се говори о конзумацији алкохола као фактору ризика за настанак кардиоваскуларних обољења (27).

1.1.4. КОМПЛИКАЦИЈЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

Метаболички синдром, односно удружена обољења која га сачињавају, заједно доприносе настанку и развоју многих компликација које могу да захвате више различитих органа (Слика 1).



Слика 1. Обољења и органи који су најчешће погођени услед компликација које могу да настану код пацијената са метаболичким синдромом.

Сматра се да пацијенти са метаболичким синдромом имају и до три пута већи ризик за настанак кардиоваскуларних и обољења бубрега, од особа које немају метаболички синдром. Имајући у виду да све компоненте метаболичког синдрома директно или

индиректно могу да погоршају морфологију и функцију срца, крвних судова и бубрега, ова чињеница је потпуно очекивана (28, 29).

Атеросклероза може да настане услед оксидације LDL холестерола, као последица оштећења HDL холестерола, или пак као резултат инфламације до које долази у крвним судовима. Такђе, присутна ендотелијална дисфункција, умањена вазодилатација, као и повећана адхезија тромбоцита и присутне тромбозе уз смањену фибролизу значајно доприносе настанку атеросклерозе (30, 31). Са друге стране инфаркт миокарда се веома често јавља као последица удружених компоненти овог синдрома и један је од најчешћих узрока смрти код пацијенета који болују од метаболичког синдрома (32).

Иако се не убрја у стандардне компоненте метаболичког синдрома, у више наврата је показано да хиперурицемија, односно повећана концентрација мокраћне киселине у крви, чешће настаје код пацијената са метаболичким синдромом, без обзира на њихову старост или пол (33, 34).

Стеатоза јетре код пацијената са метаболичким синдромом, најчешће настаје као последица гојазности, а у литератури се назива неалкохолна стеатоза јетре (*nonalcoholic fatty liver disease*). За постављање дијагнозе стеатозе јетре најпоузданија је биопсија, али с обзиром на њену инвазивност, често се прибегава другим методама попут одређивања концентрације аминотрансфераза у крви и ултрасонографији (35, 36).

Најновији литературни подаци повезују метаболички синдром са компликацијама попут: алцхајмерове болести, деменције, остеопорозе, синдрома полицистичних јајника, синдрома апнеје у сну и различитих облика канцера, а пре свега у плућима, простати или панкреасу (37).

Хронично повећање телесне тежине и адипоцита доводи до неурохормоналних промена и адаптацији кардиоваскуларног система. Као последице настају поремећаји у активацији ренин ангиотензин алдостерон ситема, повећане концентрације адипоцитокина, проинфламацијских цитокина и активације симпатичког нервнoг система. Такође, дисбаланс између прооксиданаса и антиоксиданаса који фаворизује настанак оксидационог стреса у комбинацији са инфламацијом блажег степена, одговоран је за бројне компликације и даљу прогресију свих компоненти метаболичког синдрома. Услед системске инфламације и хиперкоагубилности, може доћи до настанка плака који повећавају ризик од нежељених кардиоваскуларних обољења (38, 39). Када је реч о

молекуларном механизму који је одговоран за наведене компликације, не сме се заборавити ни улога Ca^{2+} канала који утичу на функционалну експресију SERCA2A и рианодинских рецептора који директно утичу на дисфункцију бета ћелија панкреаса (40, 41).

1.2. ЛЕЧЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

Узимајући у обзир високу преваленцију метаболичког синдрома веома је важно да третмани који се користе у лечењу, буду добро утемељени и ефикасни. С обзиром да је метаболички синдром комплексно обољење и терапија треба бити заснована на више различитих приступа. Као два основна, у литератури се разликују фармаколошки и нефармаколошки терапијски приступи за лечење метаболичког синдрома.

1.2.1. НЕФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

Као први корак у лечењу метаболичког синдрома отпочиње се са нефармаколошким приступом, односно променама у животним навикама које подразумевају промене у начину исхране и повећање физичке активности (42).

1.2.1.1. Физичка активност у циљу лечења метаболичког синдрома

Према Програму за превенцију дијабтеса (*Diabetes Prevention Program regimen*) из 2000. године, физичка активност у трајању од 150 минута недељно уз здравије навике у исхрани, значајно може да утиче на смањење симптома метаболичког синдрома, као и да успори његов развој. Оно што је битно напоменути је да се код особа са метаболичким синдромом или код повећаог ризика од настанка, саветује умерена физичка активност која подразумева ходање, односно шетању, а у зависности од стања, година и других индивидуалних карактеристика пацијента, препоручује се и вожња бицикла, трчање,

пливање и сличне активности. Сматра се да свака физичка активност у трајању од најмање 30 минута, која ангажује више група скелетних мишића представља добар почетак за све пацијенте који су гојазни, без обзира на њихове године (43).

1.2.1.2. Промене у навикама исхране у циљу лечења метаболичког синдрома

Промене у навикама исхране, односно дијете које се користе у циљу смањења симптома или у циљу превенције настанка метаболичког синдрома, у фокусу су истраживања многих научноистраживачких група широм света у последњих неколико деценија. Приликом претраживања стручне литературе, може се приметити да постоји велики број дијета које се предлажу као веома ефикасне у превенцији и лечењу овог синдрома, а у овом делу биће описане само неке од најефикаснијих.

Једна од најчешће коришћених и проучаваних дијета је хипокалоријска дијета (*energy restricted diets*) која подрзумева персонализован калоријски дневни унос у циљу енергетског дефицита. Наиме према овој дијети, дневни унос калорија треба да буде мањи од потреба организма, да би се на овај начин дошло до негативног баланса при чему се телесна тежина значајно смањује (44). У метаболичком синдрому код пацијената који су гојазни, губитак телесне тежине је веома значајан јер се директно побољшавају поремећаји попут централне гојазности (кроз губитак висцералног масног ткива), дијабетес мелитуса тип 2 и кардиоваскуларних обољења. У исто време услед губитка телесне тежине долази до побољшања ћелијске сигналне трансдукције инсулинског система и повећања периферне осетљивости на инсулин, чиме могу да се смање нивои глукозе, TG, LDL холестерола побољша инсулинска резистенција (45-47). Иако постоје различите препоруке, опште је прихваћено да смањење енергетских потреба за 500 до 600 kcal, ће довести до смањења телесне тежине и појаве свих пратећих бенефита (48).

Медитеранска дијета је веома популарна последњих пар година, а подразумева повећан унос маслиновог уља уз исхрану богату воћем, поврћем, цералијама, легуминозама, орашастим плодовима, житарицама, умерену конзумацију млечних производа, рибе и црног вина и веома ретку конзумацију слаткиша и црвеног меса. Висока количина влакана уз

антиоксидансе и антиинфламационе нутријенте (омега 3 масне киселине, олеинска киселина, фенолна једињења) су одговорни за све позитивне ефекте ове дијете (49, 50). Према многим објављеним научноистраживачким студијама, медитеранска дијета је веома ефикасна у превенцији и лечењу метаболичког синдрома јер смањује нивое LDL холестерола, TG, и повећава нивое HDL холестерола (51, 52). Поред тога што овакав начин исхране смањује ризик за настанак дијабетес мелитуса тип 2 и гојазности (53, 54), значајно се смањује и ризик за настанак кардиоваскуларних обољења (55).

Дијета богата омега 3 масним киселинама, као што јој и само име говори, подразумева унос есенцијалних омега 3 полинезасићених масних киселина (*omega 3 polyunsaturated fatty acids*, n-3 PUFA), пре свега еикозапентаенску (*eicosapentaenoic acid*, EPA) и докозахексаенску киселину (*docosahexaenoic acid*, DHA) кроз исхрану богату рибом, уљима алги и алфа линоленске киселине. Наиме, у више наврата је доказано да EPA и DHA смањују ризик за настанак и развој кардиоваскуларних обољења повезаних са метаболичким синдромом (57-59). Ови позитивни ефекти су у највећој мери повезани са смањењем нивоа TG, али и проинфламационих цитокина као што су интерлеукин 6 и фактор некрозе тумора алфа (*tumor necrosis factor-alpha*, TNF α) и C реактивног плазма протеина (CRP). Према препорукама Европске агенције за безбедност хране (*European Food Safety Authority*) за превенцију кардиоваскуларних обољења неопходно је да дневни унос EPA и DHA буде 250 mg, односно да два obroка недељно буду заснована на риби (58, 59).

Дијете са високим уносом антиоксиданаса (*diets with high total antioxidant capacity*) подразумевају унос намирница које у себи садрже антиоксидансе који имају капацитет да уклоне реактивне слободне радикале и повећају активност антиоксидационих параметара (60). Намирнице повезане са смањењем ризика за настанак бројних обољења која су повезана са оксидационим стресом су воће, поврће, зачини (уз смањење соли), орашаста плодови и чоколада (61). Према Светској Здравственој Организацији да би се остварили бенефити овакве исхране неопходно је унети око 400 g ових намирница дневно (62).

Повећање броја obroка (*high mineral frequency pattern*) је један од новијих образаца исхране који је веома популаран код спортиста. Циљ овог начина исхране је да се дневни енергетски унос раздели у више мањих obroка који би се чешће конзумирали. У појединим студијама показано је да се на овај начин смањује телесна тежина, BMI, проценат масног ткива, које последично доводе до смањење ризика од настанка дијабетес мелитуса тип 2 и

коронарних болести срца (63-65). Са друге стране, у појединим студијама је показано да овакав начин исхране не доводи до споменутих бенефита и све претпоставке о механизмима су оповргнуте (66, 67). Наиме, прво се претпоставило да се на овај начин повећава енергија која се троши у току дана, али је у појединим студијама доказано да ова претпоставка није тачна (68). Друга претпоставка је била да се на основу повећања броја obroка смањују осцилације у нивоу глукозе и побољшава контрола апетита. Ова претпоставка је доказана али само код гојазних пацијената, док код оних који нису имали проблема у тежини, резултати су и даље недоследни (69).

Дијета базирана на ниском гликемијском индексу подразумева унос намирница са гликемијским индексом мањим од 50 као што су мекиње, интегрална рижа, већина воћа, грожђе, грашак, поједини орашаста плодови, млеко, црна чоколада, хумус, купус, тофу и многе друге. Сматра се да овакав начин исхране доводи до смањења нивоа гликолизираног хемоглобина А1С и фруктозамина у крви (70-72).

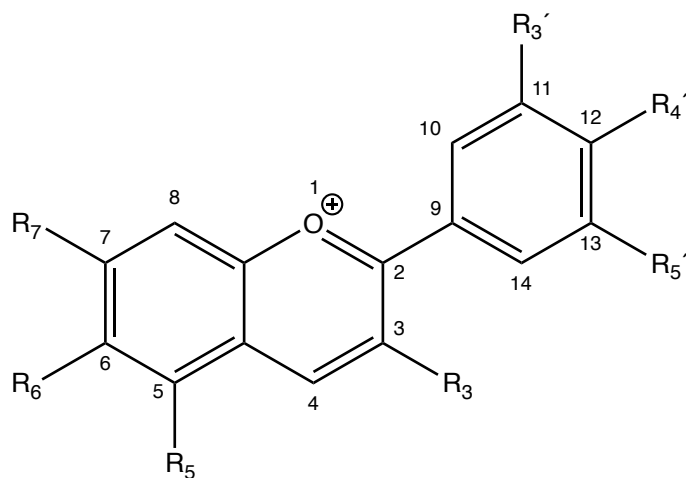
Протеинска дијета своје бенефите највероватније остварује кроз повећање термогенезе и повећање ситости. Повећање термогенезе се објашњава синтезом пептидних веза, повећаном продукцијом урее и глуконеогенезе, који захтевају утрошак веће количине енергије, док се повећање ситости објашњава повећањем нивоа различитих хормона за контролу апетита као што су инсулин, холецистокинин и/или глукагону сличан пептид 1 (73, 74). Исхрана заснована на протеинима такође има и друге предности јер побољшава хомеостазу глукозе, смањује нивое липида у крви, а уз то смањује крвни притисак и ризик за настанак кардиометаболичких обољења (75). Међутим, с обзиром да у појединим студијама корисни ефекти протеинске дијете нису пронађени (76), неопходна су даља истраживања која би пружила детаљније информације.

Као што се из приложеног може утврдити, постоје различите препоруке у исхрани, али још увек нема чврсто утемељених доказа који би издвојили само једну од наведених дијета као најбољу. Приликом препоруке пацијентима, треба узети у обзир све индивидуалне карактеристике, као и његове навике и очекивања.

1.2.1.3. Фитонутријенси и биоактивна једињења у циљу лечења метаболичког синдрома

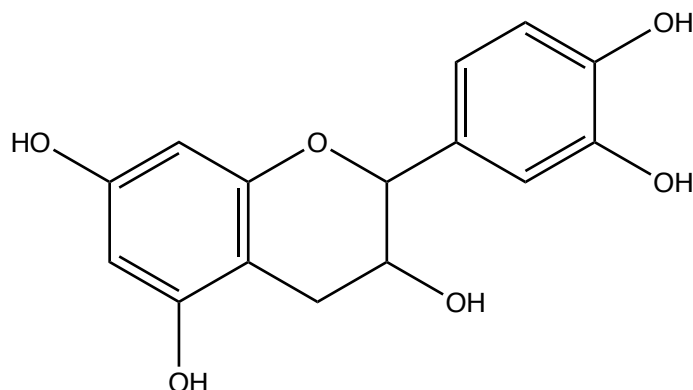
Према најновијим литературним подацима, последњих неколико година у фокусу научних истраживања налазе се биоактивна једињења, односно нутритијенти који су ефикасни у лечењу метаболичког синдрома и спречавању настанка компликација (77).

Антоцијанини (антоцијани) су полифеноли без карактеристичног мириса и укуса, растворљиви у води, а припадају класи флавоноида који се синтетишу путем циклуса фенилпропаноида (Слика 2). С обзиром да се могу јавити у различитим бојама, често се користе као прехранбени адитиви за пигмент (боју). Ова једињења се налазе у готово свим вишим биљкама, при чему се веће количине налазе у врстама из рода *Vaccinium* (боровница, брусница), *Rubus* (малина, купина), као и у аронији, црвеном купусу и грожђу (78, 79). Своју антиоксидациону активност антоцијанини остварују тако што инхибирају продукцију или отклањају слободне радикале јер премештају електроне са водониковог атома (80). Такође, ова група једињења може да побољша унос глукозе у мишиће и адипоцитне ћелије, независно од инсулина, чиме може да спречи настанак дијабетс мелитуса тип 2. Поред ових, примећено је и да остварује друге позитивне ефекте попут дилатације брахијалне артерије, смањење серумског нивоа VCAM-а, LDL холестерола, CRP, као и појединих интерлеукина (81, 82).



Слика 2. Општа структура антоцијанина

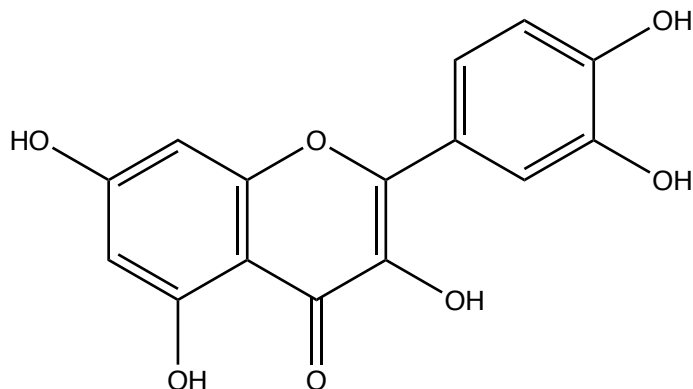
Катехин је полифенол који се налази у великом броју воћа и поврћа, чоколади и чају (Слика 3). Смањујући катехол О метил трансферазу и фосфодиестеразу доводи до мршављења. Са друге стране, смањујући нивое глукозе наште, укупног и LDL холестерола уз побољшање сензитивности на инсулин и повећање HDL холестерола, остварује антидијабетске и кардиопротективне ефекте (83, 84).



Слика 3. Структура катехина

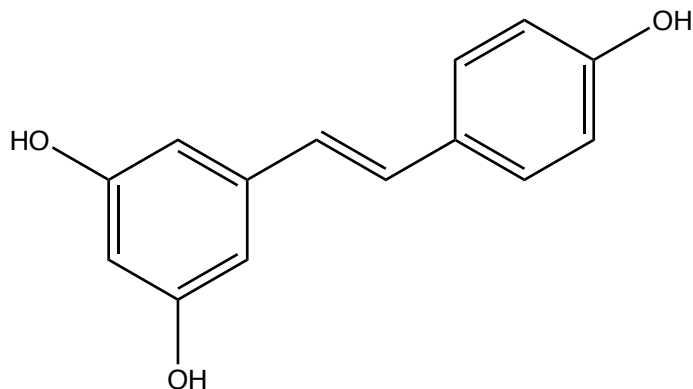
Кверцетин је један од значајнијих биофлавоноида, често се сматра њиховим представником, а присутна је у већем броју воћа, поврћа, лишћа, житарица, као и у зеленом чају и црвеном вину (Слика 4). С обзиром да има велики број позитивних ефеката, сматра се да може да побољша симптоме метаболичког синдрома. Као један од најзначајнијих ефеката који постиже, издваја се антиоксидациони капацитет који постиже тако што инхибира липидну пероксидацију и повећава антиоксидационе параметре попут супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GSX) и редукованог глутатиона (GSH) (85). Антиинфламацијски ефекат постиже тако што умањује нивое NFκB, TNF-α, интерлеукина (6, 1 бета, 8), митогеном активирани протеин киназу (MAPK) и генску експресију за моноцитни хемоатрактантни протеин 1 (86). Позитивне ефекте на гојазност постиже јер активира AMP активирани протеин киназу и смањује експресију за ССААТ везујући протеин алфа (С/ЕВР α) и стерол регулаторни протеин 1 (SREBP-1) (87). Антидијабетски ефекат постиже тако што инхибира глукозни транспортер 2 (GLUT2) и фофатидилинозитол 3 киназу зависну од инсулина (PI3K) и блокира тирозин киназу (88). Са друге стране, антихипертензивни ефекат постиже тако што повећава концентрацију

ендотелне азот моноксид синтазе (eNOS) и смањује агрегацију тромбоцита, чиме се директно побољшава функција ендотела (89).



Слика 4. Структура кверцетина

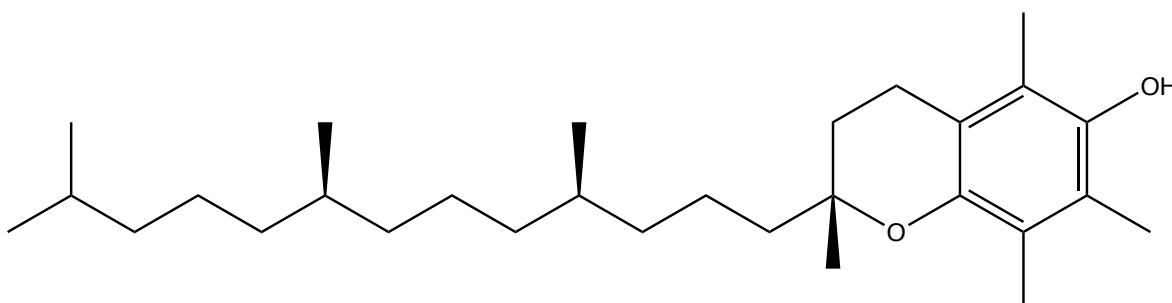
Ресвератрол је природни фенол који се посебно синтетише у процесу ферментације тако да га највише има у црвеном грејпфруту и производима попут црвеног вина и сока од грејпфрута (Слика 5). У литератури је доста проучаван и показано је да остварује антиинфламацијске, кардиопротективне и антидијабетске ефекте (90). Антиоксидациони ефекти се постижу отклањањем реактивних кисеоничних врста, док се антиинфламацијски ефекат постиже тако што инхибира NFκB, али уз то смањује продукцију проинфламационих цитокина и експресију циклооксигеназе (91-93). Кардиопротективни ефекти се постижу тако што повећава активност и експресију eNOS, највероватније јер активира никотинамид аденин динуклеотид зависну деацетилазу сиртуин 1 (Sirt 1) и 5' AMPK, стимулише Nrf2 и смањује експресију ICAM-1 и VCAM-1 (94, 95).



Слика 5. Структура ресвератрола

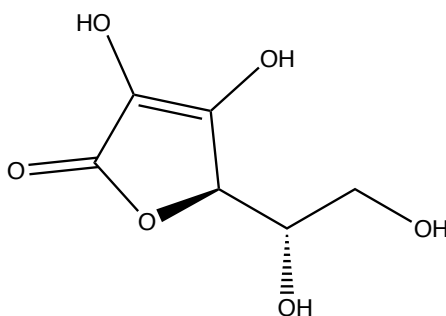
Поред споменутих полифенола значајне протективне улоге имају и различити витамини.

Токоферол, познат као витамин Е, убраја се у групу липосолубилних једињења који се могу пронаћи у уљима, орашастим плодовима и зрневљу (Слика 6). Витамин Е спречава многа метаболичка обољења и убраја се у веома ефикасне антиоксидансе, инхибира пероксидацију фосфолипидне мембране и спречава продукцију слободних радикала (96). Показује и значајне антиоксидационе ефекте тако што смањује продукцију CRP, интерлеукина 8, цитокина, а уз то инхибира циклооксигеназу и протеин киназу С (97). Због ових протективних ефеката често се саветује његова употреба код пацијената са метаболичким синдромом или код повећаног ризика од његовог настанка (96-98).



Слика 6. Структура токоферола

Аскорбинска киселина, односно витамин С је хидросолубилно једињење кога има у већини воћа (посебно у цитрусима), као и биберу и келју (Слика 7). Постиже значајне антиоксидационе ефекте и отклања слободне кисеоничне и азотне радикале. Често је испитивано једињење у научноистраживачким радовима и у више наврата су доказани његови позитивни ефекти у третману и превенцији кардиоваскуларних обољења и матеболичког синдрома (99, 100)



Слика 7. Структура аскорбинске киселине

1.2.1.4. Дијета обogaћена екстрактом ароније у циљу лечења метаболичког синдрома

Као што се, из претходно наведених чињеница, може закључити различите дијете, полифенолна једињења и витамини значајно могу да побољшају симптоме или да спрече настанак метаболичког синдрома. Због тога научници широм света покушавају да пронађу најадекватнију исхрану или суплементе који би остваривали бенефите на све компоненте метаболичког синдрома.

Aronia је бобичасто воће налик на боровнице које је веома отпорно на ниске температуре (и до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$). У зависности од врсте и поднебља где расте може да достигне висину и до 6 метара. Постоје различите врсте овог бобичастог воћа које се међусобно разликују и органолептички, најчешће по боји плода, па отуда долазе и њихови називи: црвеноплодна аронија (*Aronia arbutifolia*), љубичастоплодна аронија (*Aronia prunifolia*) и црноплодна аронија (*Aronia melanocarpa*) (101, 102). У нашој студији испитивани су ефекти екстракта *Aronia melanocarpa*, па ће у овом поглављу највише бити речи о овој врсти.

Aronia melanocarpa најчешће нарасте до 1 метар, док су листови једноставне грађе поређани наизменично најчешће 6 cm широки. Цвета у периоду између априла и јула, а цветови су мали, око 1,5 cm ширине и најчешће се састоје од пет латица беле боје и пет чашичних листића. Плод ове врсте ароније је тамнољубичасте до црне боје, пречника од 0,7 до 1 cm (103).

Aronia melanocarpa је веома богата фармаколошки активним супстанцама међу којима су значајнији полифеноли, посебно антоцијанини (којих има од 0,6 до 2 %) и процијанидини (којих има од 0,66 до 5,18 %), затим фенолна киселина и танини. Такође, у себи садржи и значајну количину сахарозе (око 15 g на 100 g ароније), шећерног алкохола (сорбитол), дијететска vlakна (око 5 g на 100 g ароније), масти (око 0,1 g на 100 g ароније) и протеина (око 0,7 g на 100 g ароније) (104, 105). *Aronia melanocarpa* значајан је извор минерала од којих се у највећој количини налазе калијум и цинк, а у мањим концентрацијама се налазе и натријум, калцијум, магнезијум и гвожђе. Од витамина најзначајније је присуство витамина B₁ (25-90 μg на 100 ml ароније), B₂ (25-110 μg на 100 ml ароније), B₆ (30-85 μg на 100 ml ароније), витамина C (5-100 μg на 100 ml ароније), ниацина (100-550 μg на 100 ml ароније), пантотенске киселине (5-38 μg на 100 ml ароније)

и у мањим количинама су присутне и фолна киселина, α и β токоферол и каротеноиди. Наведене концентрације највише зависе од облика у коме се примењује али и од многих других особина које могу да утичу на квалитет биљке попут, поднебља у коме је расла, години, начину чувања и многих других (106, 107).

1.2.1.4.1. Фармаколошки ефекти ароније

Захваљујући присуству великог боја фармаколошки активних једињења, *Aronia melanocarpa* може да допринесе превенцији и лечењу многих обољења.

Смањујући фракцију липида, *Aronia melanocarpa* директно смањује и ризике за настанак атеросклерозе и дислипидемија (108). Такође, у студији која се бавила испитивањем ефеката суплементације антоцијанина из ароније, примећено је да они значајно могу да допринесу смањењу висцералног масног ткива и позитивно да утичу на гојазност (109). У клиничким студијама потврђени су позитивни ефекти суплементације аронијом на ВМI код жена, као и снижење нивое LDL холестерола и TG уз повећање нивоа HDL холестерола. Ови протективни ефекти најчешће настају као последица смањене експресије гена за синтезу и преузимање холестерола, као и гена који су укључени у липидни метаболизам и липопротеине (110). Такође, постоје и чврсти докази који указују да *Aronia melanocarpa*, *in vitro* али и *in vivo* може да смањи синтезу протеина за адипогенски транскрипциони фактор (PPAR γ 2) (111). У више експерименталних и клиничких студија је доказано да аронија може смањити крвни притисак, највероватније јер смањује ангиотензин конвертујући ензим 1 и стимулише NO који доводи до вазорелаксације у ендотелу (112, 113). Антихипертензивни ефекат подразумева и фосфорилацију eNOS кроз редокс осетљиву активацију Src/PI3 киназа Akt пута (114).

Као ефикасан антиоксидант, *Aronia melanocarpa* постиже значајне ефекте и на редокс равнотежу. Повећавајући активност редукованог глутатиона (GSH), аронија значајно штити срчано ткиво код мишева третираних доксорубицином (115). С обзиром да у себи садржи веће концентрације хлорогенске киселине, рутина, хиперозида и кверцетина, конзумирање ароније и екстракта богатих овим бобичастим воћем повезано је са смањењем

липидне пероксидације и прооксидационог баланса уз повећање укупног антиоксидационог капацитета (116).

Имајући у виду високу концентрацију антоцијанина који се налазе у аронији и који доприносе антиоксидационом ефекту овог воћа, научници широм света сматрају да аронија може да оствари и значајне ефекте у лечењу и превенцији дијабетес мелитуса и свих пратећих микро и макроваскуларних компликација (117-120). Наиме, на више различитих модела доказан је антидијабетски ефекат ароније, а предложени су и различити механизми који су укратко набројани у **Табели 1**.

Табела 1. Механизми одговорни за антидијабетски ефекат *Aronia melanocarpa*

Предложени механизми	Референца
↓ активација дипептидил пептидазе IV који се постиже дејством цијанидин 3,5-диглукозида	(117)
↓ апсорпција глукозе или ↓ преузимање глукозе периферним ткивом	(118)
↓ концентрација тиобарбитурне киселине (TBARS), укупног холестерола (ТС) и триглицерида (TG) у крви	(119)
инхибиција алфа глукозидазе	(120)

Поред већ споменутих ефеката на кардиометаболичка обољења, битно је напоменути да су позитивни ефекти ароније примећени и на обољењима гастроинтестиналног тракта, али и да постиже значајне антиинфламационе, неуропротективне и имуномодулаторне ефекте (107, 121).

Због свих наведених протективних ефеката ароније, циљ ове студије био је да испита ефекте дијете обогаћене аронијом на пацове са метаболичким синдромом.

1.2.2. ФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

У случајевима када нефармаколошка терапија не покаже ефекте или када их се пацијенти на придржавају, неопходно је отпочети са фармаколошком терапијом. Наиме када се говори о фармаколошкој терапији метаболичког синдрома, заправо се мисли на терапију симптома односно компоненти метаболичког синдрома. С обзиром да се ова студија није бавила испитивањима фармаколошког приступа у лечењу метаболичког синдрома, у овом поглављу само ће се набројати групе лекова које се најчешће препоручују пацијентима у циљу лечења метаболичког синдрома.

Иако су нефармаколошки приступи у лечењу гојазности најадекватнији, неретко се код пацијената са прекомереном телесном тежином употребљавају и лекови. Лекови који се најчешће препоручују су: орлистат који делује тако што инхибира панкреасну и гастроинтестиналну лазу, силбутрамин који инхибира поновно преузимање норадреналина и серотонина на нивоу пресинаптичких неурона и метформин који је заправо орални антидијабетик, али је у најновијим студијама показано да има значајне ефекте у редукацији телесне тежине (122).

Фармакотерапији у случају дислипидемија се прибегава само када нефармаколошке мере нису дале значајне ефекте. У зависности од дислипидемије препоручују се лекови из групе статина (инхибитори хидроксил метил глутарил коензим А редуктазе), фибрата, затим холестирамина, холестипола, езетимиб, али и риблиа уља и омега 3 масне киселине (123).

Антихипертензивни лекови су добро проучени, а терапија се бира на основу индивидуалних карактеристика пацијената. Лечење се увек започиње једним леком у најмањој препорученој дози, а онда уколико је то потребно, доза и број лекова се постепено повећавају. У ову групу лекова се убрајају АСЕ инхибитори, блокатори рецептора за ангиотензин II, бета блокатори, блокатори калцијумских канала и диуретици (124).

Да би се спречили поремећаји толеранције на глукозу, превасходно се препоручује примена метформина који смањује продукцију глукозе у јетри и инхибира гликонеогенезу и тиазолидиндиона који селективно активирају PPAR- γ (125).

II

ЦИЉЕВИ

ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Општи циљ ове студије био је да испита ефекте исхране обogaћене екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола, на експерименталном моделу пацова са метаболичким синдромом. Специфични циљеви ове студије били су:

- 1) испитати промене телесне тежине код пацова на стандардној исхрани или исхрани обogaћеној липидима, у комбинацији са екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола;
- 2) проучити промене функције срца код пацова на стандардној исхрани или исхрани обogaћеној липидима, у комбинацији са екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола;
- 3) испитати ефекте стандардне дијете или дијете обogaћене липидима, у комбинацији са екстрактом ароније на нивое глукозе и инсулина;
- 4) проучити липидни профил код пацова који су храњени стандардном дијетом или дијетом обogaћеном липидима, у комбинацији са екстрактом ароније;
- 5) испитати маснокиселински профил код пацова који су храњени екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола у комбинацији са стандардном или исхраном обogaћеном липидима;
- 6) испитати редокс статус пацова храњених екстрактом ароније и стандардном дијетом или дијетом обogaћеном липидима;
- 7) истражити патохистолошке промене на срцу, бубрезима, панкреасу и јетри пацова који су уз екстракт ароније храњени стандардном или дијетом обogaћеном липидима;
- 8) упоредити ефекте ових двеју исхрана и предложити механизме који су одговорни за настанак уочених ефеката.

III
МАТЕРИЈАЛ
И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

Ово је била експериментална студија на пацовима *Wistar albino* соја. Поједини параметри праћени су *in vivo*, док је функција срца праћена *ex vivo*. Након жртвовања пацова, ефекат је испитиван и на ткивима појединих органа.

Ова студија је спроведена на 72 пацова, *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 8 недеља, просечне телесне масе око 200 ± 20 грама. Експерименталне животиње су биле чуване у строго контролисаним условима, при чему је температура у виваријуму износила 25°C , док је циклус светлости/тама постављен на 12:12 часова. Услови чувања су били према прописима Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Студија је спроведена у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу, при чему су се поштовале све препоруке Европске Уније према *EU Directive for welfare of laboratory animals (86/609/EEC)*, као и принципи добре лабораторијске праксе.

3.2. ХРОНИЧНИ ПРОТОКОЛ СТУДИЈЕ

Хронични протокол студије трајао је осам недеља (**Слика 8**), а *Wistar albino* пацови су најпре разврстани у 6 група (по 12 пацова у свакој групи):

- **CTRL** – контролна група здравих пацова која је током читавог експерименталног периода храњена стандардном храном;
- **SAE** – контролна група здравих пацова која је храњена стандардном храном у комбинацији са екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола;
- **MetS+HFd** – група пацова са метаболичким синдромом која је током читавог експерименталног периода храњена храном обогаћеном липидима;

- **MetS+HFd+SAE** – група пацова са метаболичким синдромом која је током читавог експерименталног периода храњена храном обогаћеном липидима, а последње четири недеље у образац исхране је додат екстракт ароније са стандардизованим процентом полифенола;
- **MetS+Sd** – група пацова са метаболичким синдромом која је храњена храном обогаћеном липидима до тренутка изазивања метаболичког синдрома, а након тога се наставило са стандардном храном;
- **MetS+Sd+SAE** – група пацова са метаболичким синдромом која је храњена храном обогаћеном липидима до тренутка изазивања метаболичког синдрома, а након тога се наставило са стандардном храном у комбинацији са екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола.

НЕДЕЉЕ	<i>Индукција метаболичког синдрома</i>				<i>Примена SAE</i>			
	1. →	2. →	3. →	4. →	5. →	6. →	7. →	8.
CTRL	Стандардна дијета (Sd)							
SAE	Стандардна дијета (Sd)				SAE (0,45 mL/kg дневно)			
	Стандардна дијета (Sd)							
MetS+HFd	Дијета обогаћена липидима (HFd)							
MetS+HFd+SAE	Дијета обогаћена липидима (HFd)				SAE (0,45 mL/kg дневно)			
	Дијета обогаћена липидима (HFd)							
MetS+Sd	Дијета обогаћена липидима (HFd)				Стандардна дијета (Sd)			
MetS+Sd+SAE	Дијета обогаћена липидима (HFd)				Стандардна дијета (Sd)			
	Дијета обогаћена липидима (HFd)							
	Дијета обогаћена липидима (HFd)				SAE (0,45 mL/kg дневно)			

Слика 8. Протокол студије

У свим групама где се у називу налази SAE, подразумева се да су пацови били храњени стандардизованим екстрактом ароније (*Standardized Aronia Extract*, SAE) у дози од 0,45 mL/kg дневно, током 4 недеље (од почетка пете до краја осме недеље хроничног протокола). SAE је екстракт плода *Aronia melanocarpa* у облику раствора за оралну употребу (Табела 2). Овај екстракт је производ фармацеутске компаније *Pharmanova*

(Београд, Србија), чија екстракција је урађена од стране *EU-Chem* компаније (Београд, Србија).

Табела 2. Заступљеност појединих фармаколошки активних једињења у SAE	
Антоцијанини	Концентрација у SAE
цијанидин 3-галактозид	2,68
цијанидин 3-глукозид	0,16
цијанидин 3-арабинозид	0,66
цијанидин 3-ксилозид	0,14
Флавоноиди	
рутин	0,12
хиперозид	0,27
изокверцетин	0,15

Групе CTRL и SAE, као и све друге у чијем називу се налази Sd, храњене су стандардном храном (*Standard diet*, Sd) која је у себи садржала 9% масти, 20% протеина, 53% скроба и 5% влакана. Групе CTRL и SAE храњене су овом дијетом током читавог експерименталног периода (од почетка прве до краја осме недеље), док су групе MetS+Sd и MetS+Sd+SAE храњене овом дијетом од почетка пете до краја осме недеље.

Групе у чијем називу се налази HFd, храњене су храном са високим садржајем липида (*High Fat diet*, HFd) која је у себи садржала 25% масти, 15% протеина, 51% скроба и 5% влакана.

Групе које су у свом називу имале MetS, заправо су чиниле пацови којима је претходно био изазван метаболички синдром (*Metabolic syndrome*, MetS). Метаболички синдром, за потребе овог истраживања, изазиван је код пацова према добро проученом и више пута потврђеном протоколу. Наиме, пацови су током месец дана (од почетка прве до краја четврте недеље) храњени храном обогаћеном липидима (HFd) након чега им је интраперитонеално инјектован стрептозотоцин у дози од 25 mg/kg телесне тежине (126). Три дана након примене стрептозотоцина проверавано је да ли је изазван метаболички синдром код пацова. Само они пацови код којих су параметри били у следећем рангу SBP ≥ 140 mmHg, DBP ≥ 85 mmHg, гликемија наше ≥ 7 mmol/L, инсулин наше ≥ 150 μ IU/ml, били су укључени у студију и сматрали су се пацовима са метаболичким синдромом.

3.3. ВАРИЈАБЛЕ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ

Да би се испитали ефекти различитих дијета обogaћених екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола на развој и лечење метаболичког синдрома, сви ефекти су одвојени у неколико засебних целина.

3.3.1.1. Телесна тежина пацова

Током експерименталног периода, животињама је једном недељно мерена телесна тежина, телесна дужина и обим абдомена. На основу ових вредности су прорачунавани ВМІ и *Lee* индекс. У одељку резултати приказане су просечне вредности пре конзумације екстракта ароније (у четвртој недељи експерименталног протокола, обележено као 0), након две недеље од конзумације екстракта ароније (на крају шесте недеље експерименталног протокола, обележено као 2) и након четири недеље од конзумације ароније (на крају осме недеље експерименталног протокола, обележено као 4).

ВМІ индекс се израчунавао као однос измерене телесне тежине (g) и квадриране вредности телесне дужине (cm²). Телесна дужина се мерила између њушке и аналног отвора. *Lee* индекс се израчунавао као кубни корен односа телесне тежине (g) и телесне дужине (cm).

3.3.1.2. Функција срца пацова

Функција срца код пацова *in vivo* је одређивана репном плетизмографијом и ехокардиографијом.

Репна плетизмографија представља неинвазивну методу за мерење крвног притиска пацова (*Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R)*, *IITC Life Science Inc. USA*) и помоћу ове методе добијене су вредности SBP, DBP као и фреквенца срца (HR) (127).

Ехокардиографија је спроведена на *Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, Massachusetts)* апарату, помоћу кога су добијене вредности дебљине зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле (*interventricular septal wall thickness at end diastole, IVSd*), унутрашње димензије леве коморе на крају дијастоле (*left ventricle internal dimension at end diastole, LVIDd*), дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле (*left ventricle posterior wall thickness at end diastole, LVPWd*), као и дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле (*interventricular septal wall thickness at end systole, IVSs*), унутрашња димензија леве коморе на крају систоле (*left ventricle internal dimension at end systole, LVIDs*), дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле (*left ventricle posterior wall thickness at end systole, LVPWs*) и проценат фракционог скраћења (*fractional shortening, FS*) (128).

Након хроничног протокола, животиње су анестезиране интраперитонеалном инјекцијом која је у себи садржала комбинацију кетамина (10 mg/kg) и ксилазина (5 mg/kg) и жртвоване, а изолована срца су постављена на *Langendorff*-ов апарат за ретроградну перфузију. Срца су перфундована загрејаним (37 °C), гасираним (O₂:CO₂ = 95:5) *Krebs-Henseleit*-овим раствором (pH 7,4) који је у себи имао адекватне количине NaCl, KCl, MgSO₄×7H₂O, NaHCO₃, KH₂PO₄, CaCl₂×2H₂O и глукозе.

Након што је сензор (*transducer BS473-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*) уведен у леву комору срца, отпочело се са *ex vivo* праћењем функције срца кроз следеће параметре:

- dp/dt max - максимална брзина развоја притиска у левој комори;
- dp/dt min - минимална стопа развоја притиска у левој комори;
- SLVP - систолни притисак у левој комори;
- DLVP - дијастолни притисак у левој комори;
- HR - фреквенца срца;
- CF - коронарни проток је мерен флоуметријски.

Након периода стабилизације (период у коме се срце ”прилагодило” сензору и успоставило скоро константне вредности свих параметара) отпочело се са *ex vivo* протоколом на *Langendorff*-овом апарату. Најпре је коронарни перфузиони притисак (CPR) постављен на 60 cm воденог стуба (cmH₂O), након чега се постепено повећавао на 80

cmH₂O, 100 cmH₂O и 120 cmH₂O, а онда и смањено на 40 cmH₂O и опет постепено повећавао од 40 cmH₂O до 120 cmH₂O. Први циклус (60-80-100-120-40 cmH₂O) назван је протокол промене притиска 1 (PCP 1), а други циклус (од 40 до 120 cmH₂O) назван је протокол промене притиска 2 (PCP 2). Приликом промене са једног на други притисак, водило се рачуна да прође најмање 5 минута, односно да се на срце испољи ефекат промене притиска. Упоредјујући вредности прилоком PCP 1 и PCP 2, добијају се информације о функцији срца. Да би се испитали ефекти различитих исхрана, поређено је процентуално смањење (-), односно процентуално повећање (+) између PCP 1 и PCP 2.

На сваком коронарном перфузионом притиску у епрувете је прикупљан коронарни венски ефлуент, који је чуван на -20 °C до даљих анализа. Анализе коронарног венског ефлуента подразумевале су мерење прооксидационих параметара: нитрити (NO₂⁻), индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS), супероксид анјон радикал (O₂⁻) и водоник пероксид (H₂O₂). С обзиром да су се за одређивање ових параметара користиле стандардне, више пута детаљно описане процедуре које се користе у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, само ће се кратко описати поступци и таласне дужине на којима су апсорбанце мерене.

Ниво нитрита је одређиван као индекс продукције азот монооксида у *Griess*-овом реагенсу. Ова метода је првенствено приказана у студији *Green* и сарадника који су детаљно описали протокол по коме се могу одредити нивои нитрита мерећи апсорбанцу узорка на таласној дужини од 543 nm (129).

Индекс липидне пероксидације мерен је индиректно преко TBARS нивоа, према методи по *Ohkawa*-у која је подразумевала да се у 1% тиобардитурну киселину која се налазила у 0,05 М NaOH пипетира адекватна количина плазме, након чега се такви узорци инкубирају на 100 °C током 15 минута, а апсорбанца мери на таласној дужини од 530 nm (130).

Нивои супероксид анјон радикала мерени су у реакцији нитро тетразолијум плавог при чему настаје нитро формазон плави. Након реакције коју је омогућила есејна смеша која је додата у узорке, апсорбанца је мерена три пута на таласној дужини од 550 nm уз мешање (131).

Мерење нивоа водоник пероксида у узорцима плазме, заснива се на оксидацији фенол црвеног у реакцији која је катализована *horseradish* пероксидазом. Ову методу су детаљно описали *Pick* и сарадници (132).

3.3.1.3. Тест оралног оптерећења глукозом

Тест оралног оптерећења глукозом (ОГТТ) спроведен је на крају хроничног протокола, један дан пре жртвовања пацова. Након 12 до 14 часова гладовања, узимана је крв из репа у којој су се одређивале вредности глукозе и инсулина (обележене као 0). Потом је свим пацовима *per os* дата глукоза у дози од 2 g/kg телесне тежине, након чега је крв из репа узимана након 30, 60, 120 и 180 минута од примене глукозе.

Нивои глукозе су мерени у свим споменутиим интервалима (0, 30, 60, 80, 120 и 180) помоћу глюкометра (*Accu-Chek, Roche Diagnostics, USA*) уз коришћење адекватних трачица.

Са друге стране, инсулин је мерен наште и 180 минута након примене глукозе, помоћу ELISA методе.

3.3.1.4. Липидни профил

Липидни профил у свим групама пацова испитиван је кроз мерење нивоа укупног холестерола (TC), TG, LDL и HDL холестерола у крви пацова. Непосредно пред жртвовање узимана је крв која се сакупљала и одмах центрифугирала да би се одвојила плазма и еритроцити. Плазма је одмах пребацивана у нове епендорфе и чувана на -20 °C до тренутка кад су анализе рађене. Са друге стране, еритроцити су три пута испирани у физиолошком раствору, након чега су лизирани помоћу дестиловане воде и тако чувани на -20 °C до даљих анализа.

Сви липидни параметри су одређивани спектрофотометријски помоћу комерцијално доступних комплета (*Siemens Healthcare Diagnostics*), користећи протоколе који су препоручени од стране произвођача.

3.3.1.5. Маснокиселински профил

Маснокиселински профил одређиван је у плазми пацова модификованом методом *Glaser*-а и његових сарадника која је објављена 2010. године (133). Ова метода подразумева следеће кораке: у 100 μl плазме додато је 1,5 ml хлороводоничне киселине која се налазила у метанолу (3 M HCl у метанолу), након тога су узорци икубирани 45 минута на 85 °C и остављени на собној температури да се охладе. У узорке је затим додато 1000 μl хексана, а након пар секунди на вортексу, узорци су центрифугирани 10 минута на 1800 g. Слој са хексаном (око 600 μl) је остављен да упари до сува, након чега је у њих додато још 100 μl хексана. 10 μl од овог узорка је инјектовано у гасни хроматограф (*Shimadzu 2014*) са капиларном колоном RESTEK Rtx 2330, 60 m, 0,25 mm, 0,2 μm . Температура се кретала у одсегу од 140 до 210 °C током 3 минута.

Масне киселине су појединачно одређиване тако што су се поредила добијена ретенциона времена са комерцијално доступним стандардима за PUFA (*Supelco, Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA*). Резултати су приказани као проценат укупних масних киселина у узорку, односно групи у којој су одређивани.

За процену активности одређених ензима укључених у биосинтезу масних киселина, прерачунаван је однос између производа и прекурсора:

- за активност елонгазе: 18:0/16:0;
- за делта 6 десатуразу (D6-десатураза индекс): 18:3n-6/18:2n-6;
- за делта 5 десатуразу (D5-десатураза индекс): 20:4n-6/20:3n-6.

Да би се испитала делта 9 десатураза, позната и као стеароил коензим А десатураза (*Stearoil-CoA desaturase, SCD*), прерачунавана су два различита индекса (SCD1) 16:1 и 16:0 у укупним липидима и (SCD2) 18:1 и 18:0 у укупним липидима.

Заступљеност масних киселина испитана је и у дијетама (стандардној и обогаћеној липидима), а с обзиром да SAE не садржи масне киселине његов додатак исхрани није утицао на присуство масних киселина.

3.3.1.6. Нивои гвожђа

С обзиром да се у литератури често могу наћи опречна мишљења о ефектима ароније и њених екстраката на нивое гвожђа, желели смо да испитамо ефекте наше дијете на овај параметар. Нивои гвожђа ($\mu\text{g/l}$) одређивани су на биохемијском анализатору (*Dimension, Dade Behring*) у плазми свих испитиваних група пацова.

3.3.1.7. Параметри оксидационог стреса

У плазми пацова одређивани су исти прооксидациони параметри као што су одређивани у коронарном венском ефлуенту: NO_2^- , TBARS, O_2^- , H_2O_2 . Методе за одређивање ових параметара у плазми заснивале су се на методама које су коришћене за одређивање њихових нивоа у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова (129-132), при чему су коришћени протоколи мало модификовани и прилагођени узорцима плазме.

Параметри антиоксидационог система заштите, као што су активност каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD) и нивои редукованог глутатиона (GSH) су мерени у узорцима лизираних еритроцита.

Активност каталазе је мерена према методи по *Beutler*-у на таласној дужини 360 nm у узорцима који су били разблажени водом и етанолом да би се уклонио хемоглобин (134).

Активност супероксид дисмутазе је мерена епинефринском методом коју су у својој студији детаљно описали *Misra* и *Fridovich*, а подразумевала је мерење апсорбанце узорака на таласној дужини од 470 nm (135).

Метода за одређивање редукованог глутатиона заснивала се на GSH оксидацији преко 5,5-дитиобис-6,2-нитробензоеве киселине која је детаљно описана у студији *Beutler*-а и сарадника, а подразумевала је мерење апсорбанце на 420 nm (136).

3.3.1.8. Хистопатолошка анализа срца, јетре, бубрега и панкреаса

Након жртвовања животиња, поред срца, изоловали су се и други органи попут јетре, бубрега и панкреаса. Прикупљено ткиво се током 24h фиксирало у 4% неутралном формалдехиду. После фиксације, до готове припреме ткива спроводило се низ процеса: дехидратација (растуће концентрације алкохола), осветљење (хлороформ или ксилен), фиксирање у парафинске блокове апаратом за калупљење (*Leica HistoCore Arcadia H*), сечење укалупљеног ткива микртоном (дебљина око 5 микрона, *Leica RM 2125 RTS*), депарафинизирање (термостат, ксилен), хидратација (опадајуће концентрације алкохола) и бојење. Сви узорци ткива били су обрађени у року од 7 дана од тренутка изоловања. За визуелизацију структура у хистолошким секцијама ткива спровело се бојење хематоксилин/еозин техником.

Након *ex vivo* протокола, срца пацова су фиксирана у 4% параформалдехиду, укалупљена у парафин, сечена на секције, а потом бојена хематоксилин/еозином. За анализу ткива миокарда за сваку животињу издвојена су по два калупа од којих су начињени пресеци који су анализирани.

За анализу ткива јетре и панкреаса за сваку животињу је издвојен по један калуп од кога су начињени пресеци који су анализирани.

За анализу ткива бубрега за сваку животињу је издвојен по један калуп од сваког бубрега, од кога су начињени пресеци који су анализирани.

Калупи су анализирани *single-blind* од стране специјалисте патологије, а препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus*, Јапан).

3.4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

За статистичку обраду резултата био је коришћен статистички програм SPSS 22.0 за *Windows*.

За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиле су се методе дескриптивне статистике. У случајевима када подаци нису били нормално распоређени, користила се трансформација података, односно логаритамска функција, која је претходила статистичкој анализи.

За поређење зависних варијабли у односу на групу и коришћени третман, употребљавала се двофакторска анализа варијансе (ANOVA), а у случајевима када су постојале статистички значајне разлике средње вредности поређења су вршена у оквиру *Newman-Keuls multiple comparison post-hoc* теста. У случајевима немогуности трансформације података, употребљавао се *Kruskal-Wallis* непараметријски тест. За тестирање повезаности између параметара, у зависности од њихове природе, користио се *Pearson*-ов или *Spearman*-ов коефицијент корелације.

Статички значајним нивоом сматрале су се вредности мање од 0,05 ($p < 0,05$), а све вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

IV

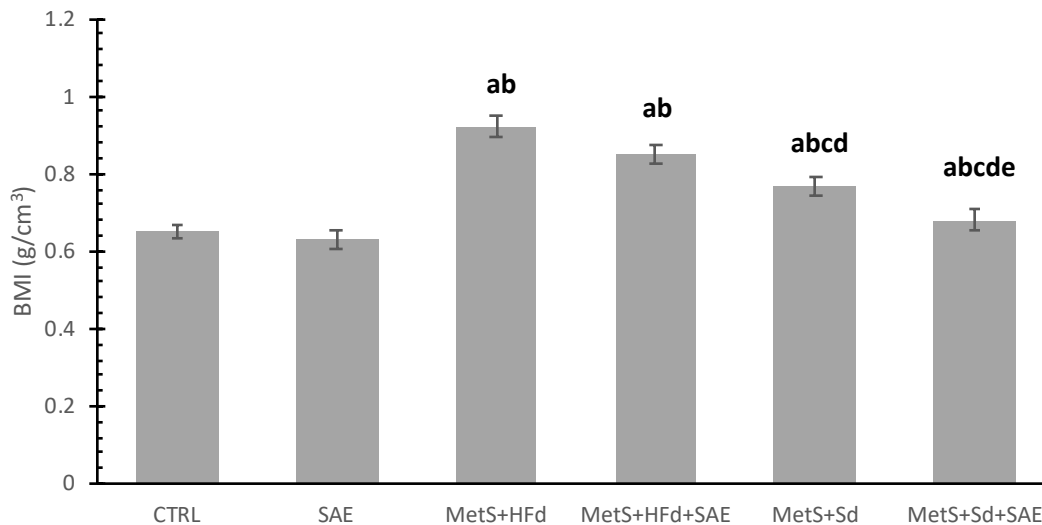
РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ПРОМЕНУ ТЕЛЕСНЕ ТЕЖИНЕ ПАЦОВА

Телесна тежина пацова приказана је кроз ВМІ и *Lee* индекс. Као што је приказано на **Графикону 1**, пацови са метаболичким синдромом имали су статистички значајно већи ВМІ у односу на здраве пацове. Промена исхране са масне на стандардну довела је до значајног пада ВМІ код пацова, док су пацови са метаболичким синдромом који су били храњени комбинацијом стандардне дијете обogaђене екстрактом ароније имали нижи ВМІ у односу на пацове са метаболичким синдромом који су били храњени само стандардном дијетом.

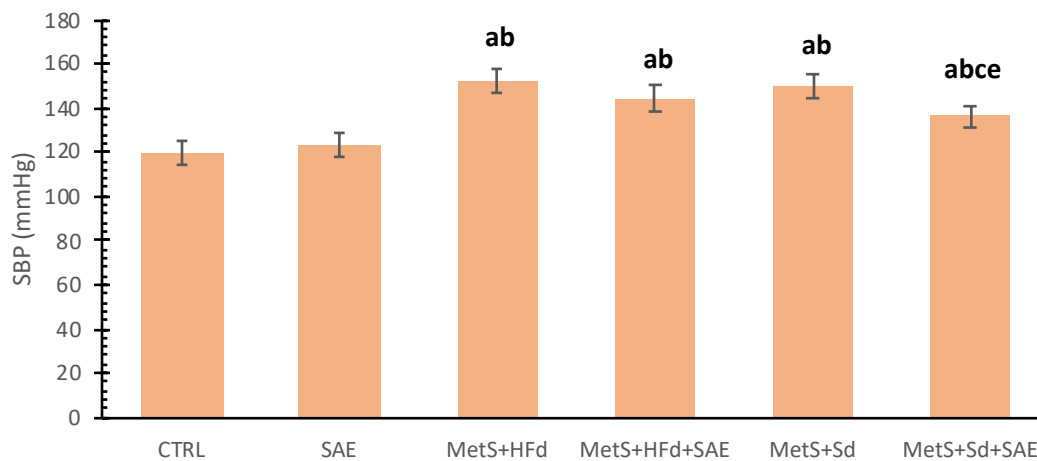
Вредности *Lee* индекса биле су скоро исте у свим испитиваним групама, па зато нису графички приказане: 2,53 у CTRL, 2,46 у SAE, 2,75 у MetS+HFd, 2,69 у MetS+HFd+SAE, 2,68 у MetS+Sd и 2,57 у MetS+Sd+SAE групи.



Графикон 1. ВМІ у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола. ^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

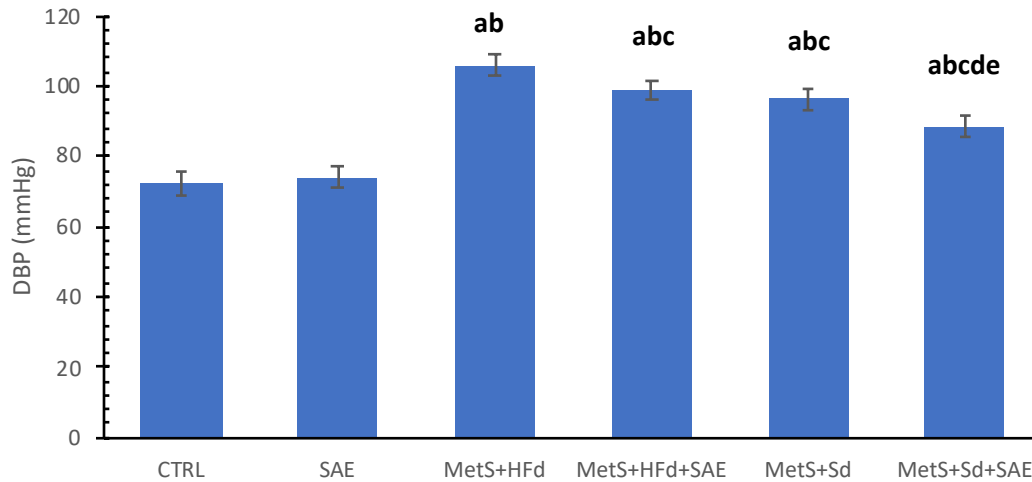
4.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА

SBP, DBP, као и HR били су значајно повишени у групи пацова са метаболичким синдромом у односу на здраве пацове (**Графикони 2-4**). У групама пацова са метаболичким синдромом у којима је SAE у комбинацији са Sd уведен у исхрану, вредности SBP су се значајно смањиле у односу на вредности у MetS+Sd и MetS+HFd+SAE групама (**Графикон 2**).



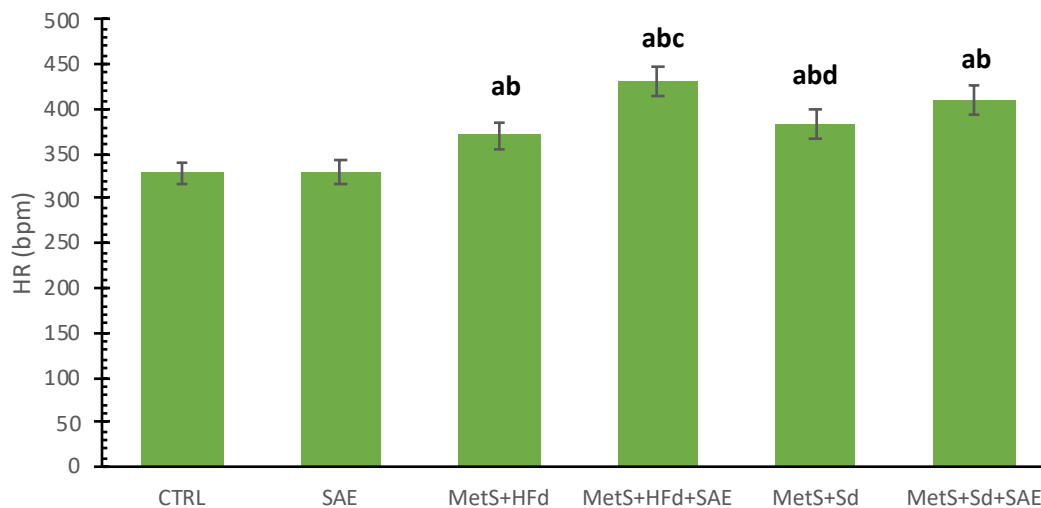
Графикон 2. SBP у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола. ^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

DBP је био значајно већи у MetS+HFd групи, у односу на MetS+HFd+SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групе, док је у MetS+Sd+SAE групи DBP вредност била значајно нижа него код осталих група пацова са метаболичким синдромом (**Графикон 3**).



Графикон 3. DBP у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола. ^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

Увођење SAE у исхрану пацова са метаболичким синдромом у MetS+HFd+SAE групи, довело је до повећања HR у односу на MetS+HFd и MetS+Sd групе (**Графикон 4**).



Графикон 4. HR у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола. ^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

Код здравих пацова чија исхрана је била обogaћена SAE примећено је значајно повећање IVSd, LVPWd, IVSs, LVPWs, FS и смањење LVIDs и LVIDd у односу на здраве пацове којима нија даван овај екстракт. Са друге стране у групи MetS+HFd, вредности IVSd и IVSs биле су значајно снижене, док су вредности LVIDd биле значајно повећане у односу на SAE групу. FS је био значајно нижи у MetS+HFd групи у односу на вредности забележене у CTRL и SAE групама, као и у MetS+HFd+SAE и MetS+Sd групама у односу на SAE групу. Увођење SAE у исхрану пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном дијетом значајно је утицао на повећање LVIDd, IVSs и LVIDs (Табела 3).

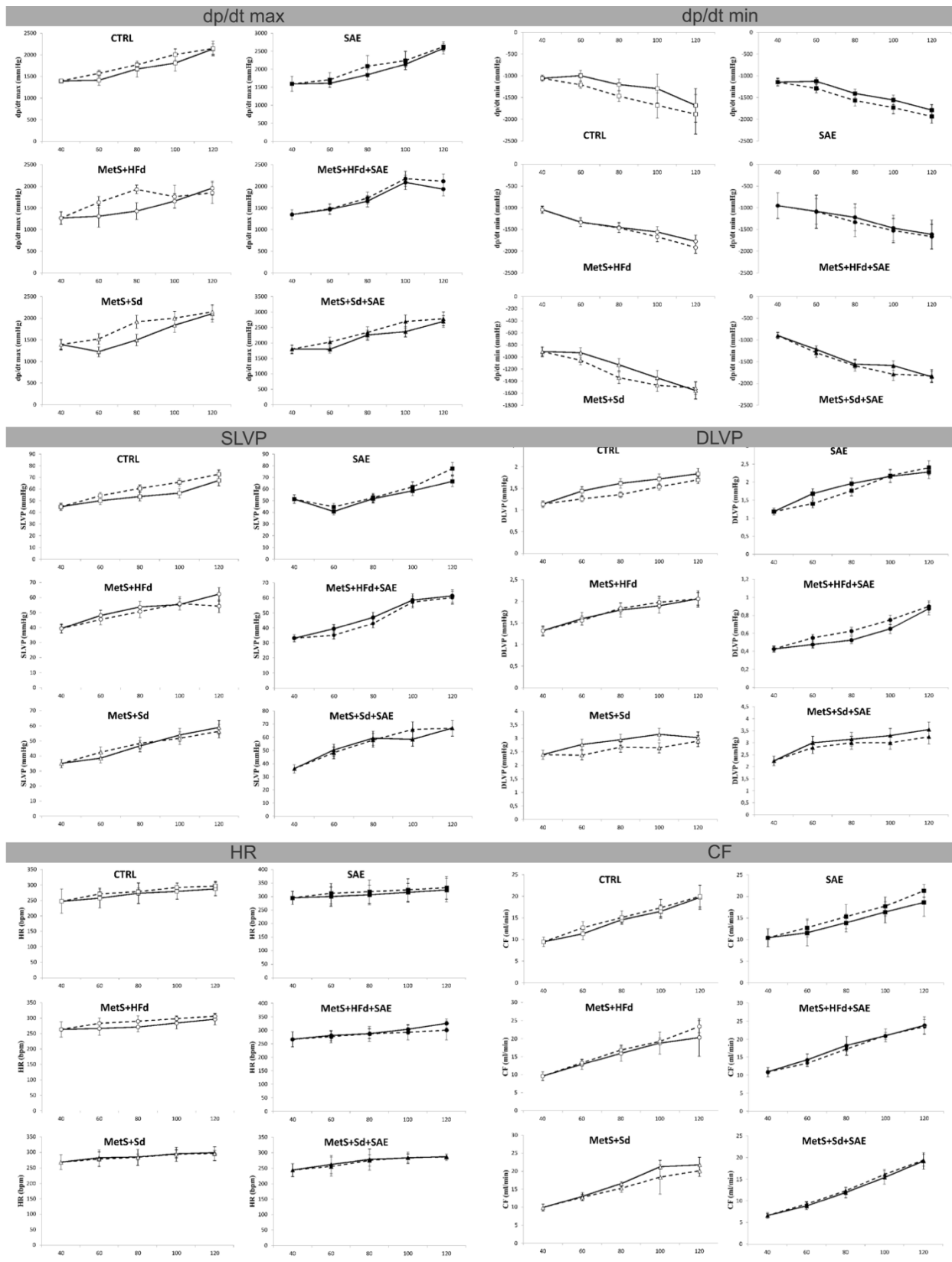
Табела 3. Ефекти различитих дијета на *in vivo* праћене кардиодинамске параметре

mm	CTRL	SAE	MetS+HFd	MetS+HFd+SAE	MetS+Sd	MetS+Sd+SAE
IVSd	1.22±0.2	1.89±0.2 ^a	1.28±0.3 ^b	1.34±0.2	1.58±0.2	1.59±0.2
LVIDd	6.80±0.4	5.73±0.2 ^a	6.23±0.4	6.70±0.4	5.53±0.3	7.93±0.4 ^e
LVPWd	1.94±0.4	3.45±0.4 ^a	2.22±0.1	1.72±0.1 ^b	1.88±0.2 ^b	1.93±0.2 ^b
IVSs	2.48±0.3	3.64±0.3 ^a	2.33±0.1 ^b	2.52±0.2	2.45±0.2 ^b	3.24±0.1 ^{ace}
LVIDs	3.20±0.5	2.03±0.2 ^a	3.24±0.2 ^b	3.16±0.1	2.48±0.2 ^{acd}	3.45±0.2 ^{be}
LVPWs	2.98±0.2	4.97±0.1 ^a	3.16±0.2	3.26±0.2	2.76±0.2 ^b	3.45±0.3
FS (%)	53.2±4.18	65.7±5.01 ^a	49.0±3.99 ^{ab}	52.2±4.32 ^b	51.4±4.19 ^b	56.3±4.21

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

На **Графикону 5** (испрекидана линија представља први, а пуна линија други циклус промене CPP) приказане су вредности *ex vivo* праћених параметара срчане функције, током протокола у коме се мењају притисци, док су у **Табели 4** приказане процентуалне разлике између два циклуса промене притиска на *Langendorff*-овом апарату.

Најзначајније разлике у вредностима dp/dt max присутне су на CPP = 60 cmH₂O и 80 cmH₂O у MetS+HFd (-24,77; -35,3) и MetS+Sd (-24,23; -28,11) групама. Код срца пацова са метаболичким синдромом којима је даван SAE, испитивани параметри се нису значајно мењали приликом два циклуса промене притиска. Вредности dp/dt min су се значајно мењале само код контролне групе пацова на CPP = 60 cmH₂O, 80 cmH₂O and 100 cmH₂O (процентуалне разике -21,25, -22,03, -29,7).

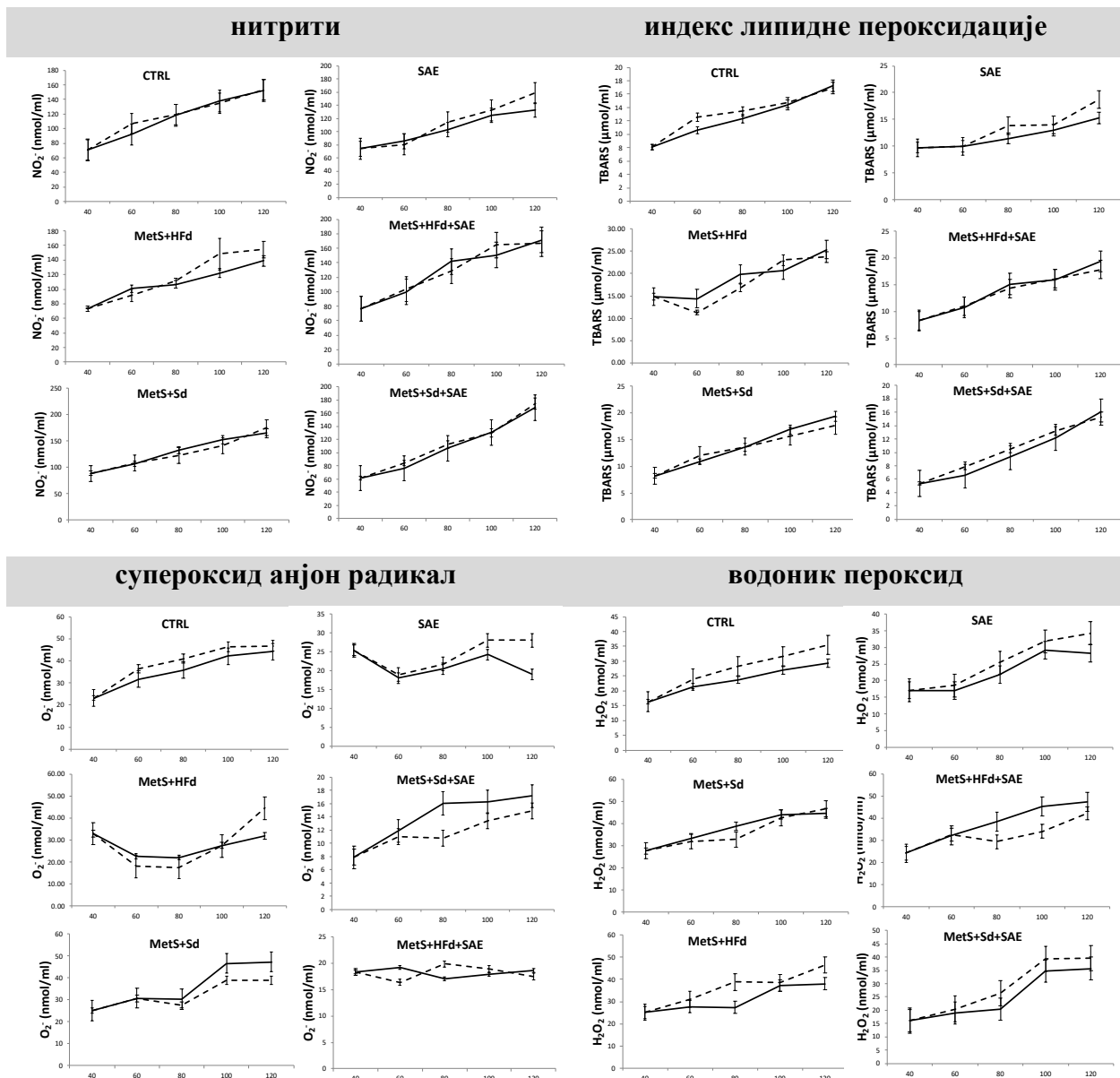


Графикон 5. Ex vivo праћени кардиодинамски параметри у испитиваним групама.

Табела 4. Процентуалне разлике у вредностима кардиодинамских параметара између првог и другог циклуса промене притиска

<i>CPP</i>	CTRL	SAE	MetS+HFd	MetS+HFd+SAE	MetS+Sd	MetS+Sd+SAE
	dp/dt max					
60	-11,05	-5,99	-24,77	-1,07	-24,23	-13,13
80	-6,11	-12,90	-35,30	-4,41	-28,11	-3,77
100	-10,88	-4,79	-6,22	-4,08	-8,80	-14,02
120	-0,63	-1,91	5,62	-9,39	-2,06	-3,24
	dp/dt min					
60	-21,25	-14,81	-0,46	-0,62	-13,64	-6,36
80	-22,03	-11,53	-0,80	-9,03	-18,90	-2,32
100	-29,70	-11,43	-7,04	-3,81	-9,14	-12,42
120	-12,04	-8,14	-8,08	-3,15	2,63	1,16
	SLVP					
60	-8,35	-9,49	5,37	10,80	-10,58	4,06
80	-13,11	-1,66	5,70	8,55	-4,18	2,44
100	-16,81	-5,81	-1,22	2,15	3,72	-12,46
120	-7,79	-16,29	12,60	1,99	4,12	-0,07
	DLVP					
60	12,50	16,67	2,50	-15,79	14,41	6,67
80	16,05	10,20	-2,22	-19,05	9,32	4,76
100	10,47	-0,93	-4,21	-15,38	15,87	9,09
120	7,61	-5,26	0,00	-2,86	4,13	8,45
	HR					
60	-5,29	-4,01	-6,26	1,59	1,39	2,51
80	-1,96	-3,85	-6,82	0,23	0,41	1,10
100	-4,58	-2,77	-5,04	3,66	0,31	-0,37
120	-3,41	-2,63	-3,21	7,85	1,02	0,61
	CF					
60	-12,37	-10,07	-3,11	6,74	1,93	-4,55
80	-3,57	-10,40	-5,78	5,48	7,88	-3,36
100	-5,10	-8,33	-2,55	-0,57	13,44	-4,55
120	-1,21	-14,66	-14,96	1,51	7,59	-1,04

На **Графикону 6** (испрекидана линија представља први, а пуна линија други циклус промене CPP) приказане су вредности прооксидационих параметара у коронарном венском ефлуенту који је сакупљан током *ex vivo* протокола, док су у **Табели 5** приказане процентуалне разлике ових параметара између два циклуса промене притиска на *Langendorff*-овом апарату. Није било статистички значајних разлика у вредностима прооксидационих параметара између два циклуса промене CPP.



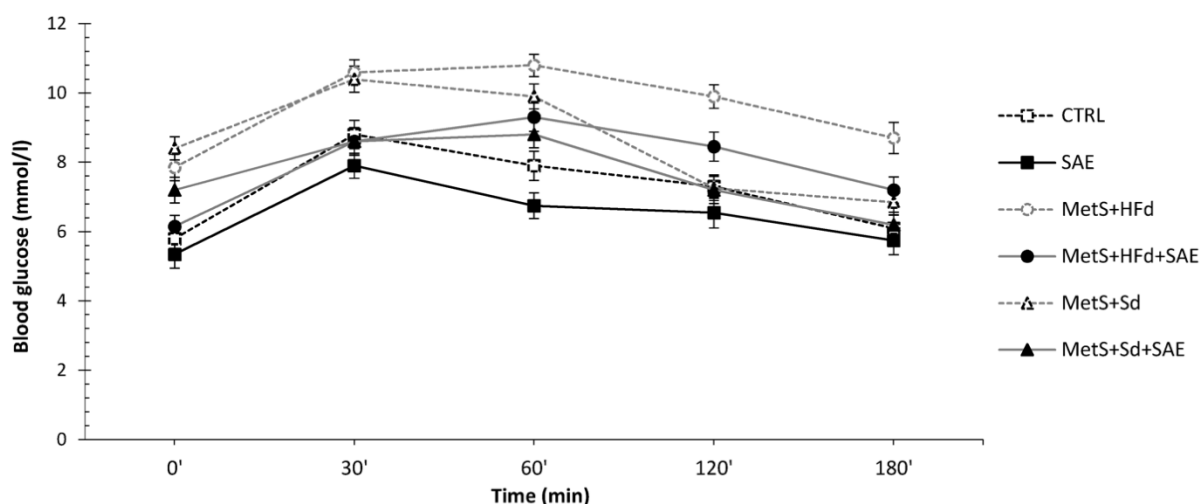
Графикон 6. Прооксидациони параметри у коронарном венском ефлуенту.

Табела 5. Процентуалне разлике у вредностима прооксидационих параметара између првог и другог циклуса промене притиска

<i>CPP</i>	CTRL	SAE	MetS+HFd	MetS+HFd+SAE	MetS+Sd	MetS+Sd+SAE
	NO ₂ ⁻ (nmol/ml)					
60	-16,11	5,82	8,87	-3,69	-1,16	-10,05
80	-0,70	-11,28	-4,23	9,31	7,95	-5,26
100	2,39	-6,05	-21,47	-9,07	7,92	0,57
120	-0,44	-19,59	-11,14	2,91	-6,37	-3,84
	TBARS (μmol/ml)					
60	-18,33	0,00	21,20	-2,23	-10,89	-18,33
80	-9,19	-20,60	15,57	5,45	-0,75	-12,06
100	-2,30	-8,08	-11,11	-1,04	7,22	-8,41
120	1,64	-22,23	6,43	8,14	8,72	4,75
	O ₂ ⁻ (nmol/ml)					
60	-14,60	-5,12	20,55	14,69	0,43	7,03
80	-14,82	-6,23	20,49	-16,11	8,73	32,83
100	-10,00	-15,72	0,97	-5,42	16,71	17,42
120	-6,15	-47,57	-39,29	6,45	17,61	13,21
	H ₂ O ₂ (nmol/ml)					
60	-12,14	-8,79	-11,89	-0,86	4,23	-7,67
80	-19,62	-16,64	-41,76	23,68	15,69	-28,90
100	-16,37	-9,59	-3,34	24,72	3,68	-12,84
120	-21,04	-20,98	-21,93	10,99	-4,98	-10,63

4.3. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ КОД ПАЦОВА

Просечне вредности глукозе, мерене током ОГТ теста приказане су на **Графикону 7**. Вредности глукозе наште биле су повећане код свих пацова са метаболичким синдромом у доносу на здраве пацове, сем у MetS+HFd+SAE групи, где су вредности глукозе били најнижи у односу на све групе пацова са метаболичким синдромом. Такође, ниво глукозе је био значајно нижи у MetS+Sd+SAE групи, у односу на MetS+Sd групу. Сличан тренд примећен је приликом мерења 30, 60 и 120 минута од примене глукозе, док је су у 180. минути највише вредности биле у MetS+HFd групи.



	0'	30'	60'	120'	180'
CTRL	5.81±0.34	8.82±0.41	7.93±0.42	7.29±0.34	6.08±0.39
SAE	5.35±0.40	7.91±0.36	6.75±0.37 ^a	6.55±0.44	5.75±0.41
MetS+HFd	7.85±0.38 ^{ab}	10.61±0.36 ^{ab}	10.77±0.32 ^{ab}	9.91±0.34 ^{ab}	8.71±0.45 ^{ab}
MetS+HFd+SAE	6.15±0.32 ^c	8.59±0.40 ^c	9.32±0.41 ^{abc}	8.45±0.42 ^{abc}	7.23±0.38 ^c
MetS+Sd	8.42±0.33 ^{abd}	10.43±0.38 ^{abd}	9.90±0.36 ^{ab}	7.25±0.35 ^{cd}	6.85±0.37 ^c
MetS+Sd+SAE	7.19±0.37 ^{abde}	8.60±0.39 ^{ce}	8.78±0.38 ^{bce}	7.18±0.39 ^{cd}	6.22±0.36 ^c

Графикон 7. Вредности глукозе током ОГТ теста.

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

Током ОГТТ мерене су и вредности инсулина и то наше (0) и 180 минута након давања глукозе пацовима, а добијене вредности су приказане у **Табели 6**.

Најнижа концентрација инсулина забележена је у SAE, а највећа у MetS+Sd групи, наше и 180 минута администрације глукозе. Код пацова са метаболичким синдромом, вредности инсулина биле су значајно веће него код здравих пацова. Такође, концентрација инсулина била је значајно нижа у MetS+Sd+SAE него у MetS+Sd групи, у 0 и 180. минути.

Табела 6. Вредности инсулина током ОГТТ.

	0'	180'
CTRL	122.9±6.76	123.7±6.61
SAE	106.9±6.04 ^a	113.8±6.51
MetS+HFd	185.1±7.78 ^{ab}	129.3±6.38
MetS+HFd+SAE	180.3±8.02 ^{ab}	131.1±7.13 ^b
MetS+Sd	205.8±9.87 ^{abcd}	145.2±7.65 ^b
MetS+Sd+SAE	182.1±9.32 ^{abcde}	127.3±6.72 ^e

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

4.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА

Вредности липидних параметара мерених у испитиваним групама, приказане су у **Табели 7**. Вредности укупног холестерола и TG биле су статистички више код пацова са метаболичким синдромом у односу на вредности измерене код здравих пацова, сем у MetS+HFd+SAE групи, где су вредности укупног холестерола биле сличне вредностима у SAE групи. Стандардна дијета, посебно у комбинацији са SAE довела је до снижења вредности триглицерида у односу на групе које су наставиле исхрану обogaћену липидима. Вредности HDL су биле значајно снижене само у MetS+HFd групи у односу на здраве пацове (CTRL и SAE групе), док је комбинована Sd и SAE исхрана значајно повећала нивое HDL холестерола код пацова са метаболичким синдромом, посебно у поређењу са MetS+HFd групом. Највише вредности LDL холестерола примећене су код пацова са метаболичким синдромом који у својој исхрани нису имали екстракт ароније. Поред тога, исхрана обogaћена SEA значајно је снизила нивое LDL холестерола и код здравих и код пацова са метаболичким синдромом.

Табела 7. Вредности липидних параметара мерених након хроничног протокола.

	<i>CTRL</i>	<i>SAE</i>	<i>MetS+HFd</i>	<i>MetS+HFd+SAE</i>	<i>MetS+Sd</i>	<i>MetS+Sd+SAE</i>
<i>TC (mmol/L)</i>	1.61±0.14	1.71±0.11	2.01±0.23 ^{ab}	1.82±0.19 ^{ac}	1.98±0.33 ^{ab}	1.91±0.25 ^{ab}
<i>TG (mmol/L)</i>	0.35±0.10	0.40±0.07	0.62±0.19 ^{ab}	0.56±0.15 ^{ab}	0.47±0.10 ^{abcd}	0.43±0.05 ^{cd}
<i>HDL (mmol/L)</i>	1.30±1.19	1.28±1.23	1.10±0.10 ^{ab}	1.20±0.07	1.25±0.10	1.49±0.26 ^c
<i>LDL (mmol/L)</i>	0.44±0.16	0.40±0.17	0.88±0.03 ^{ab}	0.57±0.14 ^c	0.73±0.03 ^{abd}	0.63±0.02 ^{ce}

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

4.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА

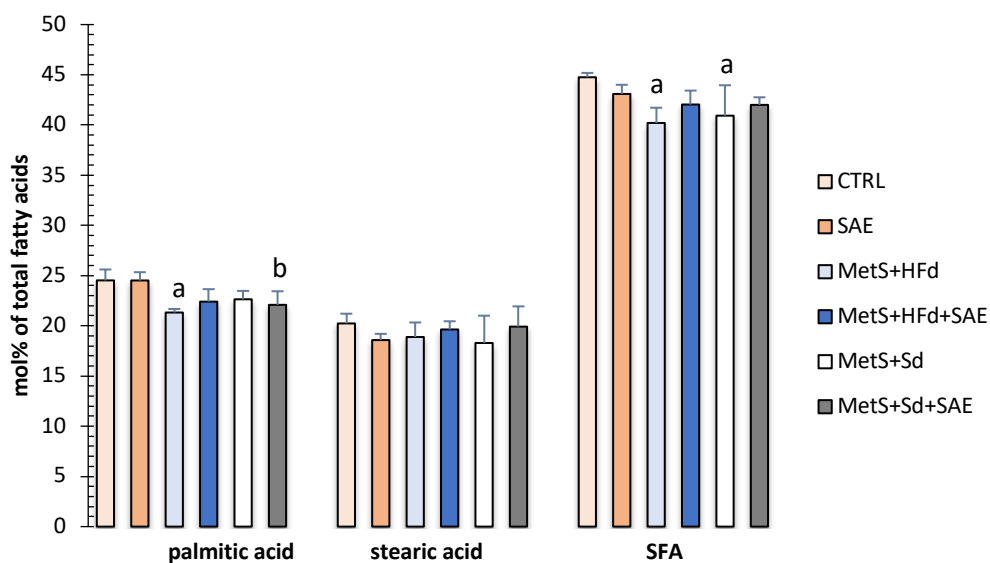
Заступљеност масних киселина у стандардној и дијети обогаћеној липидима, приказана је у **Табели 8**.

Табела 8. Заступљеност масних киселина (mol% од укупних масних киселина) у Sd и HFd.

<i>Fatty acid</i>	<i>Sd</i>	<i>HFd</i>
<i>C12:0</i>	0,05	0,02
<i>C14:0</i>	0,51	0,94
<i>C16:0</i>	13,55	40,61
<i>C16:1n-7</i>	1,04	0,29
<i>C18:0</i>	2,30	4,52
<i>C18:1n-9</i>	24,95	38,33
<i>C18:2n-6</i>	49,93	14,33
<i>C18:3n-3</i>	1,17	0,13
<i>C18:3n-6</i>	0,19	0,06
<i>C20:1n-9</i>	3,25	0,36
<i>C20:2n-6</i>	0,13	ND
<i>C20:3n-3</i>	0,72	0,08
<i>C20:3n-6</i>	0,12	ND
<i>C20:5n-3</i>	0,06	ND
<i>C22:6n-3</i>	0,58	0,06
<i>C24:0</i>	1,38	0,15
<i>SFA</i>	17,87	46,10
<i>MUFA</i>	29,24	38,98
<i>PUFA</i>	52,90	14,66
<i>n-6/ n-3 PUFA</i>	19,90	51,50

SFA – засићене масне киселине, MUFA – мононезасићене масне киселине, PUFA – полинезасићене масне киселине.

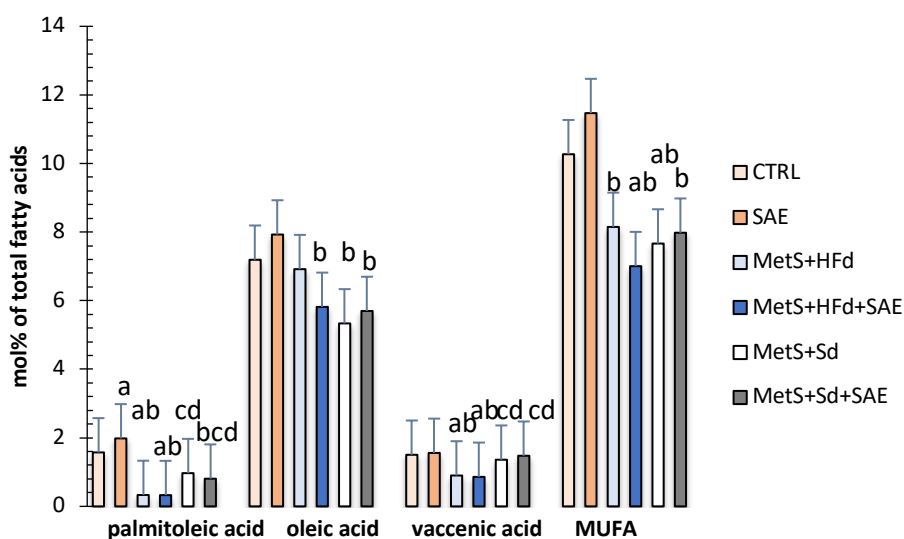
Ниво засићене масне киселине значајно је смањен у MetS+HFd и у MetS+Sd+SAE групи, у односу на CTRL и SAE групе (**Графикон 8**). Ниво SFA био је значајно нижи код пацова са метаболичким синдромом којима није даван SAE у односу на CTRL групу.



Графикон 8. Процент индивидуалних и укупних засићених масних киселина (SFA).

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

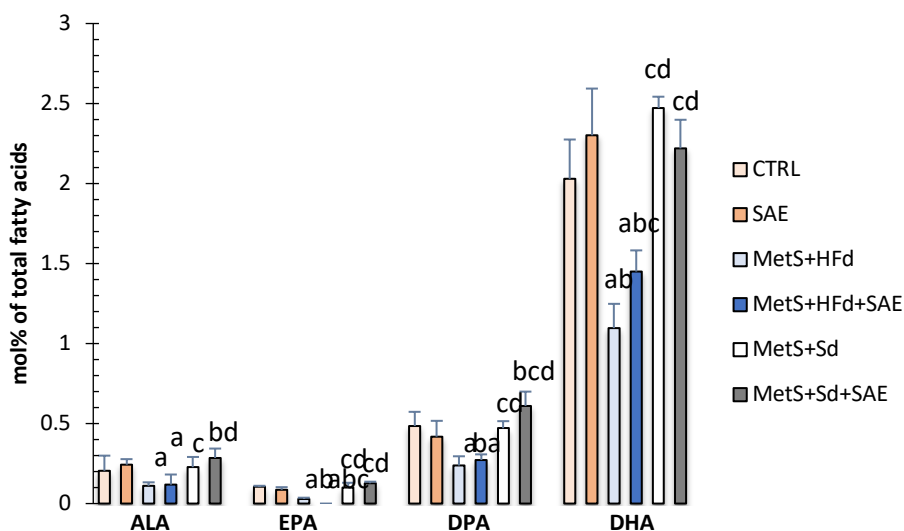
Са друге стране, нивои MUFA (Графикон 9) били су значајно нижи код свих пацова са метаболичким синдромом (MetS+HFd, MetS+HFd+SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE) у односу на нивое код здравих пацова који су током 4 недеље конзумирали SAE. Нивои MUFA су такође биле ниже у MetS+HFd+SAE и у MetS+Sd групи него у CTRL групи. Процент индивидуалних MUFA (PLA и вакценске киселине (VA, 18:1n-7)) био је смањен у MetS+HFd и MetS+HFd+SAE групама у односу на обе групе здравих пацова, као и пацова са метаболичким синдромом храњених стандардном дијетом. Олеинска киселина (OA, 18:1n-9) била је значајно снижена код пацова са метаболичким синдромом који су храњени SAE као и у MetS+Sd групи у односу на здраве пацове који су храњени SAE. Такође, ниво PLA био је значајно нижи код пацова из MetS+Sd+SAE групе него код здравих пацова храњених SAE. Додатак SAE у исхрану здравих пацова, значајно је повећао нивое палмитолеинске киселине (PLA, 16:1n-7).



Графикон 9. Процент индивидуалних и укупних мононезасићених масних киселина (MUFA).

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

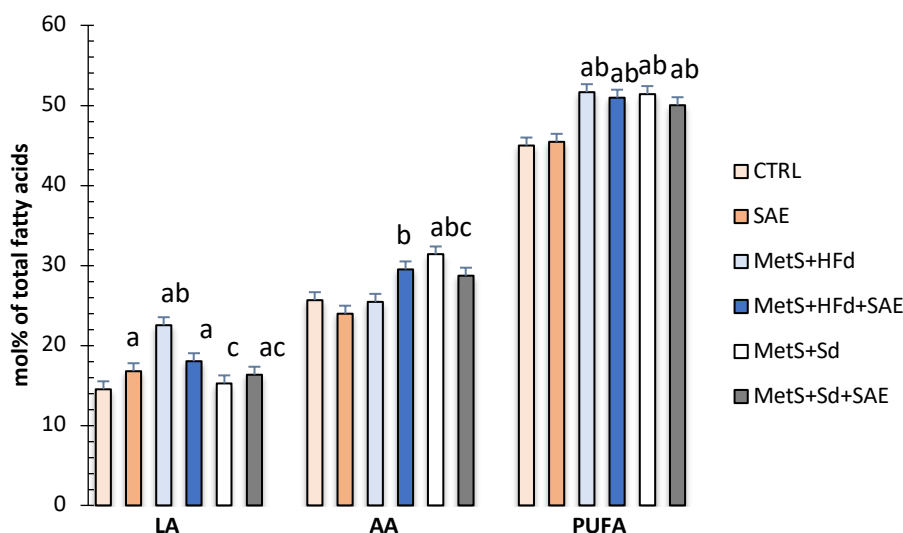
Додатак SAE у исхрану, није утицао на нивое индивидуалних n-3 масних киселина код здравих пацова: алфа линоленска киселина (ALA, 18:3 n-3), еикозапентаенска киселина (EPA, 20:5n-3), докозапентаенска киселина (DPA, 22:5n-3) и докозахексаенска киселина (DHA, 22:6n-3), али код пацова са метаболичким синдромом који су храњени HFd или комбинацијом HFd и SAE, вредности свих ових n-3 PUFA биле су значајно мање у односу на контролну групу пацова. Нивои EPA и DPA били су значајно нижи код ових група него код SAE групе, као и DPA у MetS+HFd групи. Поред тога, нивои EPA су биле ниже у MetS+HFd+SAE групи у односу на MetS+HFd групу, док су нивои DHA били значајно виши. Приликом поређења вредности код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном и масном храном, примећено је да су вредности EPA, DPA и DHA биле више у групама где су пацови храњени стандардном храном. Нивои ALA били су значајно виши у MetS+Sd групи, него у MetS+HFd групи, као и код MetS+Sd+SAE групе у односу на SAE и MetS+HFd+SAE групе (**Графикон 10**).



Графикон 10. Процент индивидуалних n-3 полинезасићених масних киселина.

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

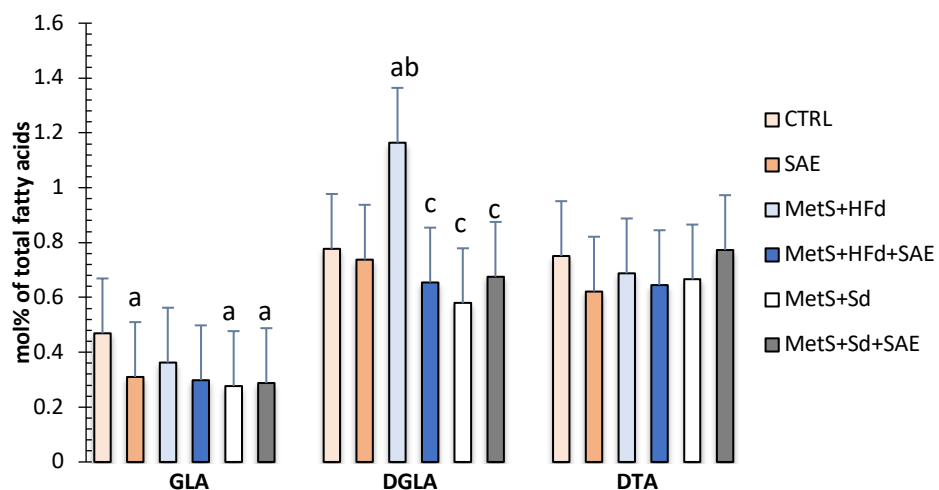
На **Графикону 11** приказани су ефекти различитих исхрана на најраспрострањеније n-6 PUFA, као што су линоленска киселина (LA, 18:2n-6), арахидонска киселина (AA, 20:4 n-6) и укупне полинезасићене киселине. Наши резултати показују да исхрана обogaћена SAE значајно повећава нивое LA код свих група пацова, док је ниво ове масне киселине значајно нижи у MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групама у односу на MetS+HFd групу. Поред тога, ниво AA био је значајно виши у MetS+HFd+SAE групи у односу на SAE групу, као и у MetS+Sd групи у односу на CTRL, SAE и MetS+HFd групе.



Графикон 11. Процент линоленске киселине (LA), арахидонске киселине (AA) и укупних полинезасићених масних киселина (PUFA).

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

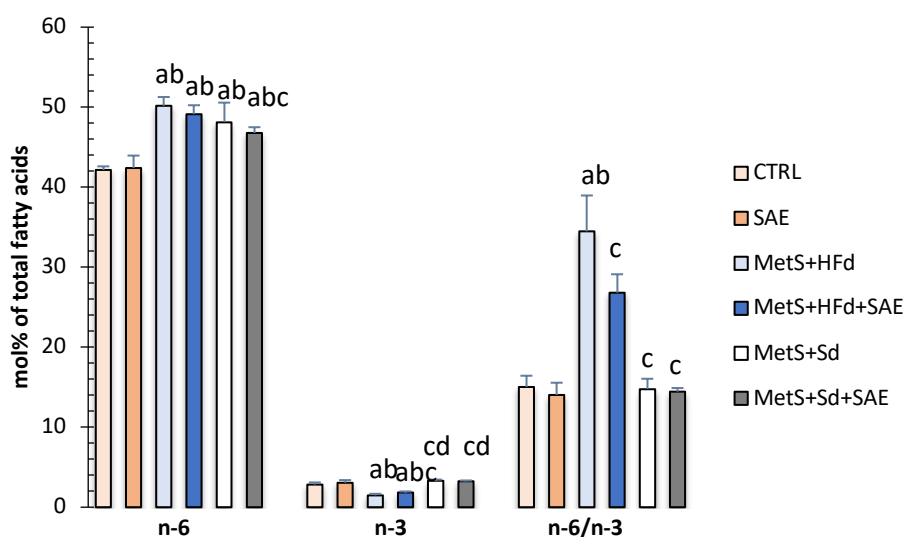
Највиши нивои дихомо-гама-линоленске киселине (DGLA, 20:3n-6) пронађени су у MetS+HFd групи, док је ниво γ -линоленске киселине (GLA, 18:3n-6) био виши у CTRL групи, у односу на вредности које су измерене у SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групама (Графикон 12).



Графикон 12. Процент индивидуалних n-6 полинезасићених масних киселина.

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

Слично као што је био случај са нивоима PUFA, значајно веће вредности n-6 масних киселина су примећене код свих пацова са метаболичким синдромом, без обзира на исхрану. Најнижи нивои n-3 PUFA пронађени су код пацова из групе MetS+HFd. Поред тога, пацови са метаболичким синдромом који су били на Sd исхрани, имали су више нивое n-3 PUFA него пацови који су били на HFd исхрани. У складу са овим однос између однос n-6 и n-3 масних киселина, био је највиши у MetS+HFd групи (**Графикон 13**).



Графикон 13. Процент укупних n-3 и n-6 полинезасићених масних киселина и однос n-6/n-3.

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

Активност десатураза и елонгаза приказане су у **Табели 9**. Увођењем SAE у исхрану, значајно се повећала процењена активност SCD1 код здравих пацова. Поред тога, примећено је да пацови са метаболичким синдромом имају значајно нижи индекс SCD1 у односу на здраве пацове. Најнижа активност D5 десатуразе, пронађена је у MetS+HFd групи (значајно нижа од активности у CTRL, MetS+HFd+SAE и MetS+Sd групама). Такође, процењена активност овог ензима била је значајно већа код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном храном у односу на здраве пацове.

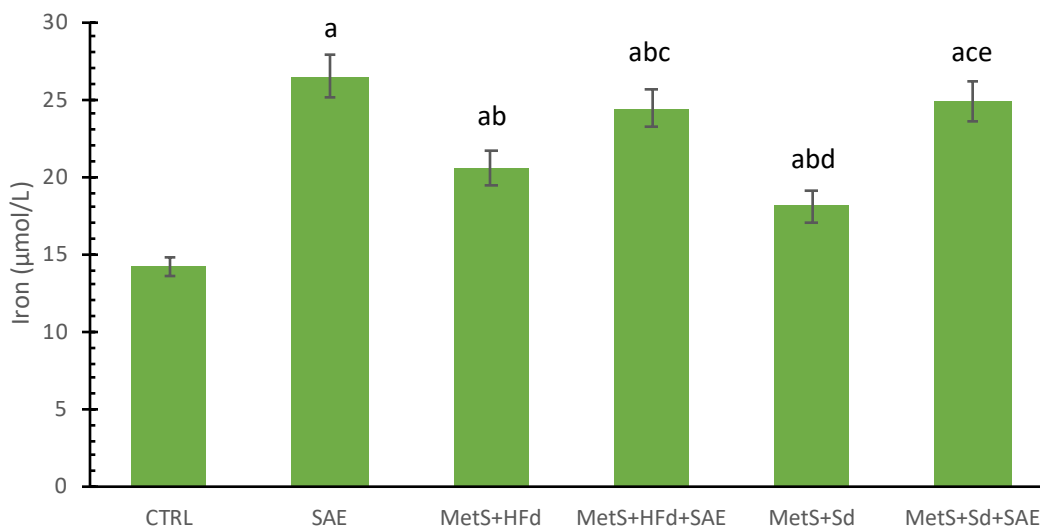
Табела 9. Индекси десатураза и елонгаза у плазми

<i>FA</i>	<i>CTRL</i>	<i>SAE</i>	<i>MetS+HFd</i>	<i>MetS+HFd+SAE</i>	<i>MetS+Sd</i>	<i>MetS+Sd+SAE</i>
<i>SCD-1 16:1n-7/16:0</i>	0.06±0.01	0.08±0.01 ^a	0.02±0.0 ^{ab}	0.01±0.00 ^{ab}	0.04±0.03 ^{ab}	0.04±0.02 ^{ab}
<i>SCD-2 18:1n-9/18:0</i>	0.36±0.01	0.43±0.03	0.37±0.09	0.30±0.05	0.30±0.12	0.29±0.05
<i>D6 18:3n-6/18:2n-6</i>	0.03±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01
<i>D5 20:4n-6/20:3n-6</i>	33.03±1.32	32.61±3.98	22.00±3.33 ^a	46.20±8.09 ^c	50.12±12.24 ^{abc}	43.05±6.87 ^{ab}
<i>ELONG 18:0/16:0</i>	0.83±0.08	0.76±0.04	0.89±0.07	0.88±0.06	0.81±0.12	0.91±0.15

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

4.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА

Увођењем SAE у исхрану, значајно су повећани нивои гвожђа у свим групама, тако да су значајно више вредности пронађене у SAE, MetS+HFd+SAE MetS+Sd+SAE групама, у односу на остале групе. Најниже вредности гвожђа забележене су у контролној групи у поређењу са осталим групама (**Графикон 14**).

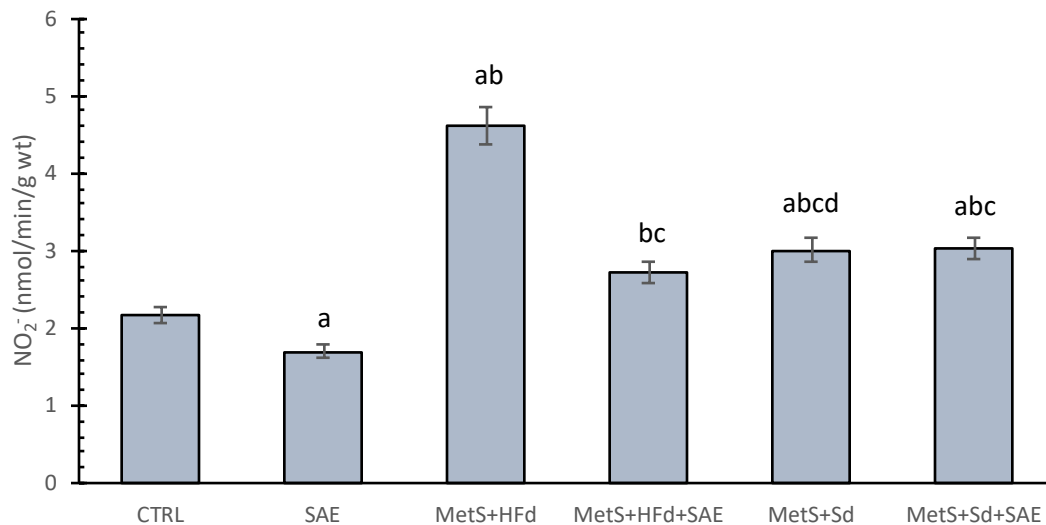


Графикон 14. Нивои гвожђа у серуму испитиваних група пацова.

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

4.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА

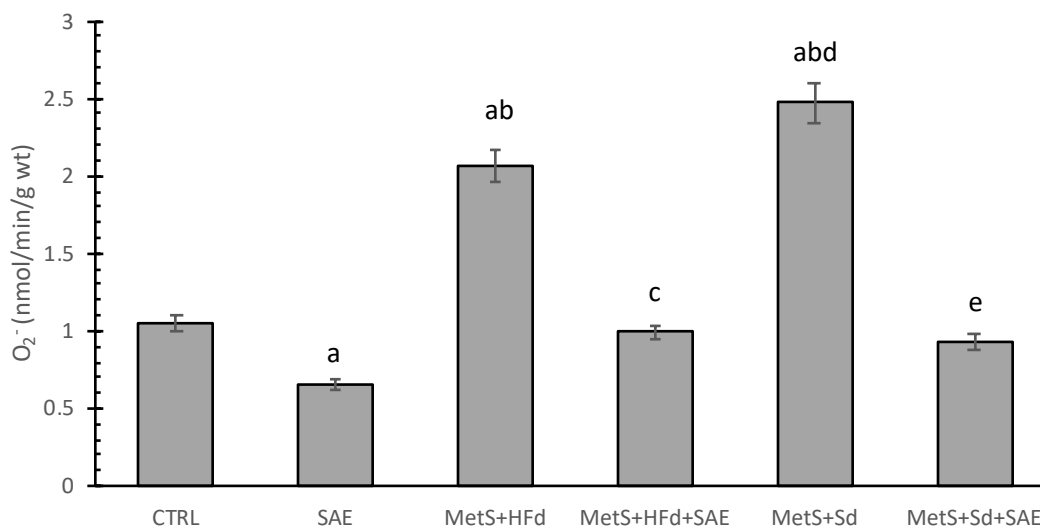
Ниво NO_2^- био је значајно снижен у SAE групи у односу на CTRL групу, и значајно повишен код свих група пацова са метаболичким синдромом у односу на групе здравих пацова (CTRL и SAE групе). Највише вредности NO_2^- биле су забележене у MetS+HFd групи, док су се са додатком SAE у HFd или Sd исхрану ове вредности значајно смањиле. Такође, интересантно је да су пацови из MetS+Sd групе имали значајно више вредности NO_2^- у односу на MetS+HFd+SAE групу (**Графикон 15**).



Графикон 15. Нивои нитрита у плазми испитиваних група пацова.

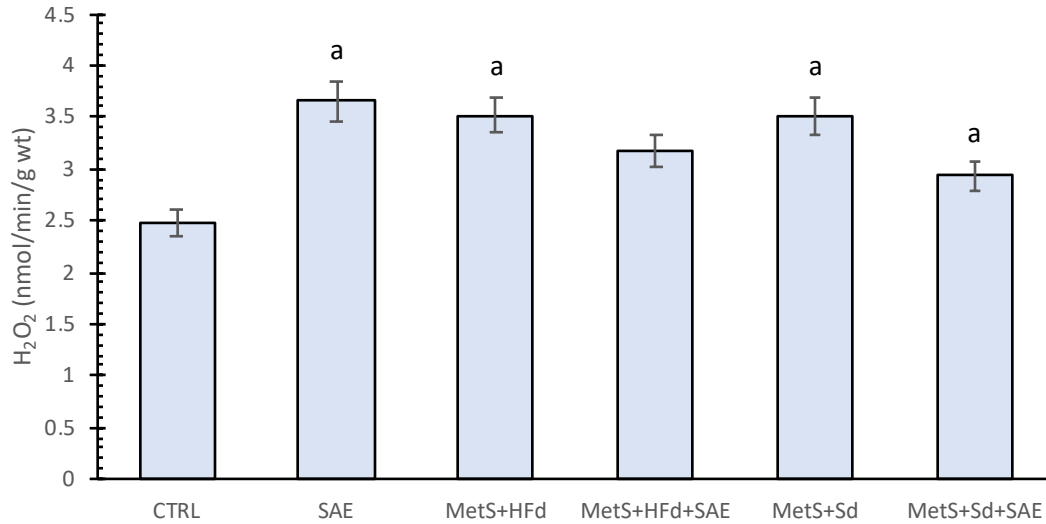
^a $p < 0,05$ у односу на CTRL; ^b $p < 0,05$ у односу на SAE; ^c $p < 0,05$ у односу на MetS+HFd; ^d $p < 0,05$ у односу на MetS+HFd+SAE; ^e $p < 0,05$ у односу на MetS+Sd.

Највише вредности O_2^- забележене су код пацова са метаболичким синдромом који нису конзумирали SAE. Такође, увођење SAE у исхрану здравих и пацова са метаболичким синдромом, значајно је смањило нивое O_2^- (**Графикон 16**).



Графикон 16. Нивои супероксид анјон радикала у плазми испитиваних група пацова. ^a $p < 0,05$ у односу на CTRL; ^b $p < 0,05$ у односу на SAE; ^c $p < 0,05$ у односу на MetS+HFd; ^d $p < 0,05$ у односу на MetS+HFd+SAE; ^e $p < 0,05$ у односу на MetS+Sd.

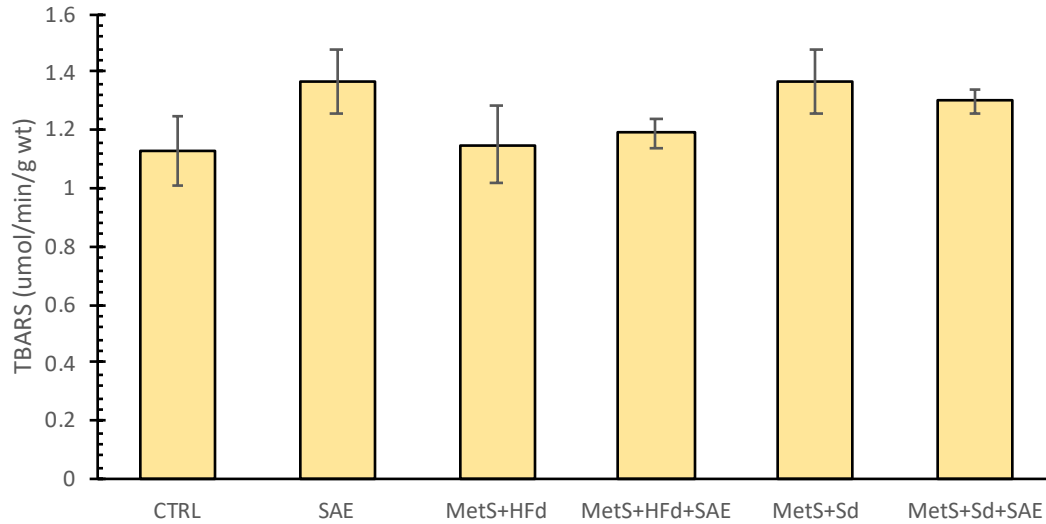
Нивои водоник пероксида били су значајно повишени у свим испитиваним групама (осим у MetS+HFd+SAE групи) у односу на нивое који су измерени у CTRL групи (Графикон 17).



Графикон 17. Нивои водоник пероксида у плазми испитиваних група пацова.

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

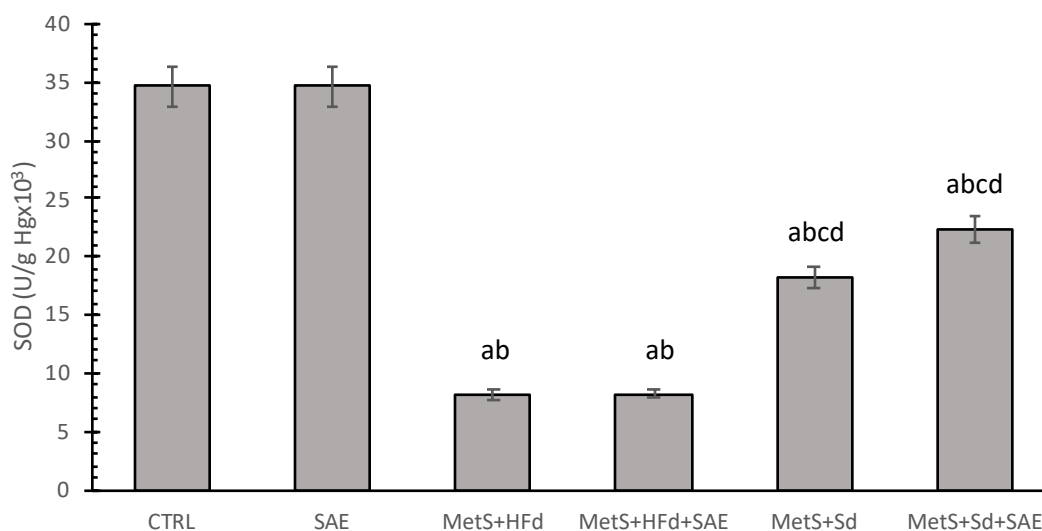
Вредности индекса липидне пероксидације који је мерен преко TBARS, нису се значајно разликовале између испитиваних група након хроничног протокола (**Графикон 18**).



Графикон 18. Нивои TBARS у плазми испитиваних група пацова.

^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

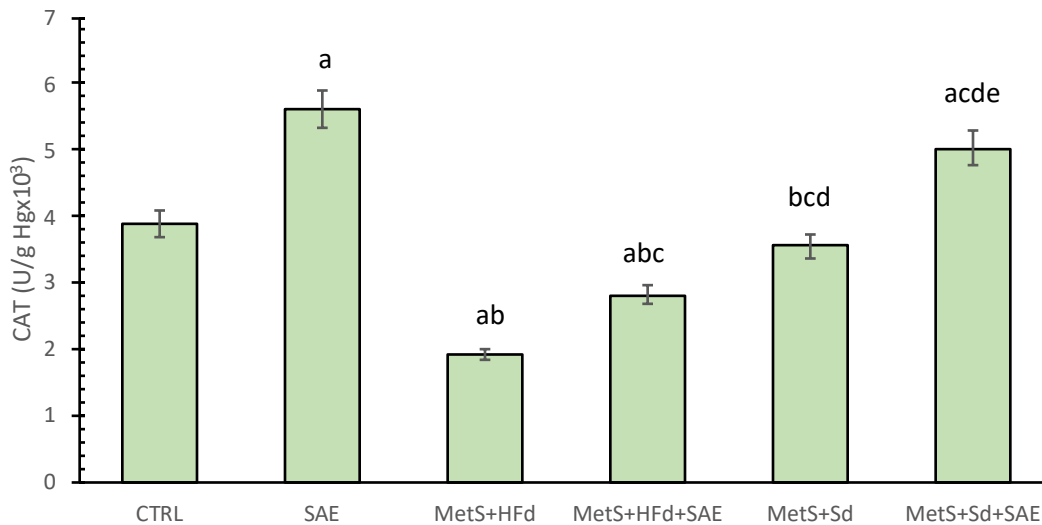
Активност SOD значајно је смањена код пацова са метаболичким синдромом у односу на њену активност код здравих пацова. Промена са масне на стандардну исхрану са или без SAE довела је до повећања активности супероксид дисмутазе у MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групама (**Графикон 19**).



Графикон 19. Активност супероксид дисмутазе у лизираним еритроцитима испитиваних група пацова.

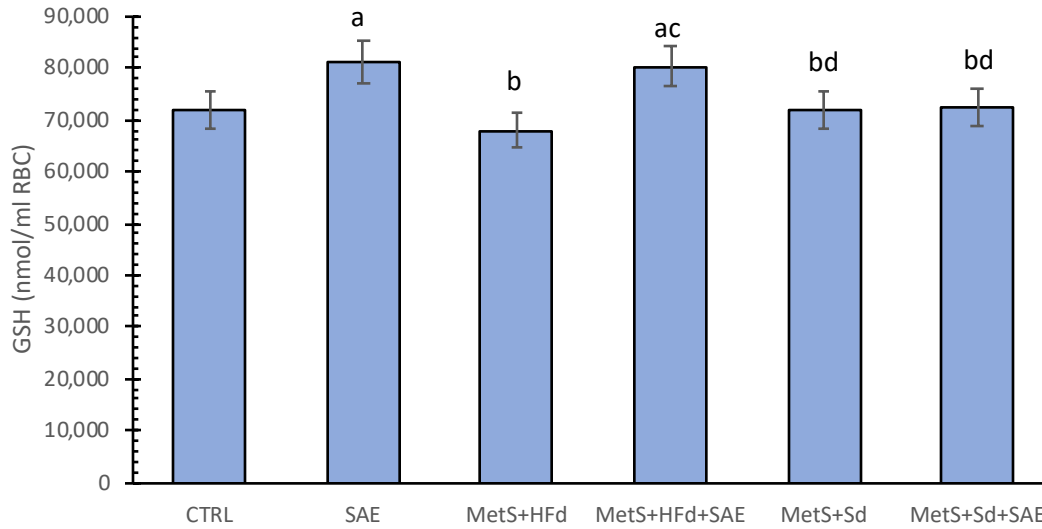
^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

Активност калалазе била је значајно виша у SAE групи, у односу на друге испитиване групе (осим у MetS+Sd+SAE групи). Са друге стране овај параметар је у CTRL групи био значајно виши у односу на MetS+HFd и MetS+HFd+SAE групу и значајно нижи у односу на MetS+Sd+SAE групу. Додатак SAE у исхрану пацова са метаболичким синдромом значајно је повећао CAT у односу на пацове који нису конзумирали SAE (Графикон 19).



Графикон 20. Активност каталазе у лизираним еритроцитима испитиваних група пацова. ^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

Нивои GSH били су значајно повећани у SAE и MetS+HFd+SAE групи у односу на остале испитиване групе (**Графикон 21**).



Графикон 21. Активност редукованог глутатиона у лизираним еритроцитима испитиваних група пацова.

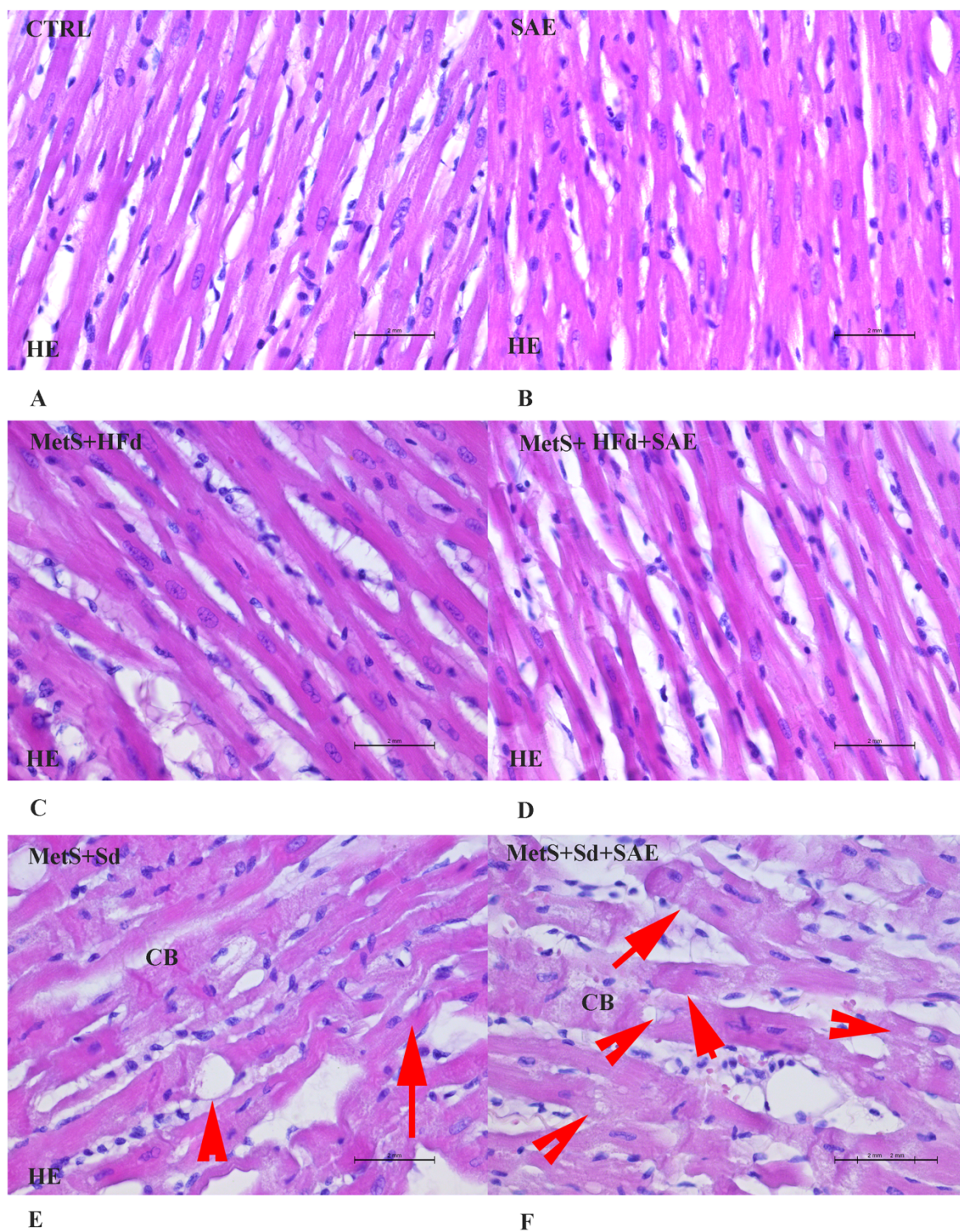
^ap<0,05 у односу на CTRL; ^bp<0,05 у односу на SAE; ^cp<0,05 у односу на MetS+HFd; ^dp<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; ^ep<0,05 у односу на MetS+Sd.

4.8. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ХИСТОПАТОЛОГИЈУ ПОЈЕДИНИХ ТКИВА

4.8.1. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ МИОКАРДА

Мишићна ткива миокарда су у потпуности очувана и присутна је попречна испруганост мишића у CTRL, SAE, MetS+HFd и MetS+HFd+SAE групама. У ткиву истих група (CTRL, SAE, MetS+HFd и MetS+HFd+SAE) не уочавају се знаци интрацелуларног или интерстицијалног едема, не уочавају се знаци пасивне хиперемije, нити ћелијске вакуолизације, хиперконтракција саркомера није присутна, као ни фиброза или некроза ткива.

Са друге стране у MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групама присутна је вакуолизација субендокардних и субпикардних кардиомиоцита леве коморе, хиперконтракција саркомера, и интерстицијални едем. Некроза контракционих трака уочава се само у MetS+Sd групи (Слика 9).

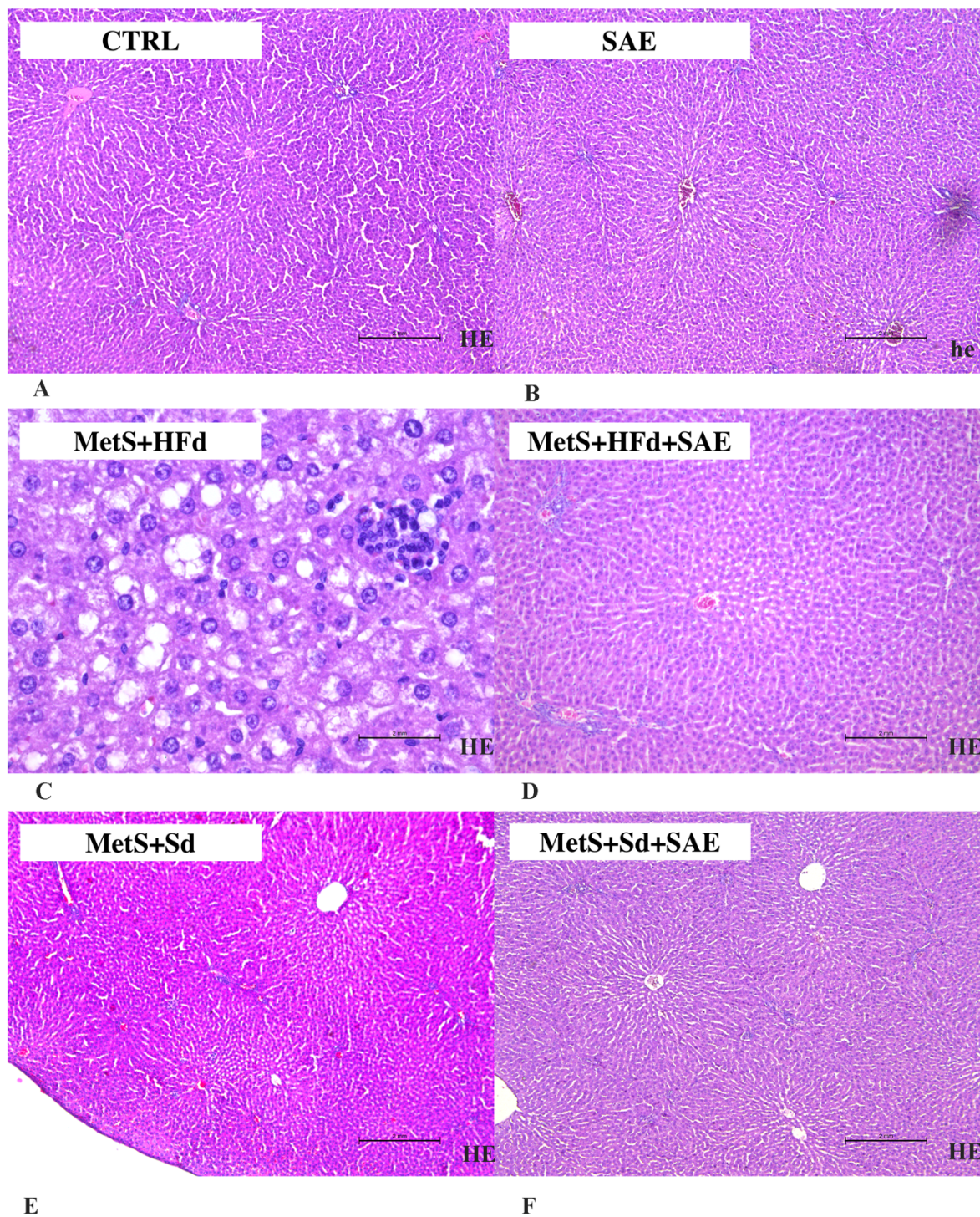


Слика 9. Мишићна ткива миокарда обојена хематоксилин/еозином

4.8.2. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ЈЕТРЕ

Ткиво јетре пацова из CTRL, SAE, MetS+HFd+SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE група било је уобичајених карактеристика. Лобулуси јетре су очуване и правилне грађе, хепатоцити су правилно распоређени у јетриним гредицама, без промена, синусоидни капилари су уобичајених карактеристика, без промена. Нису уочене никакве промене које би представљале фиброзу или инфламацију. Али је у MetS+HFd+SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групама уочена ретка фокална некроза (**Слика 10**).

Са друге стране у ткиву јетре пацова из MetS+HFd групе присутне су микровезикуларе масне промене (**Слика 10**).

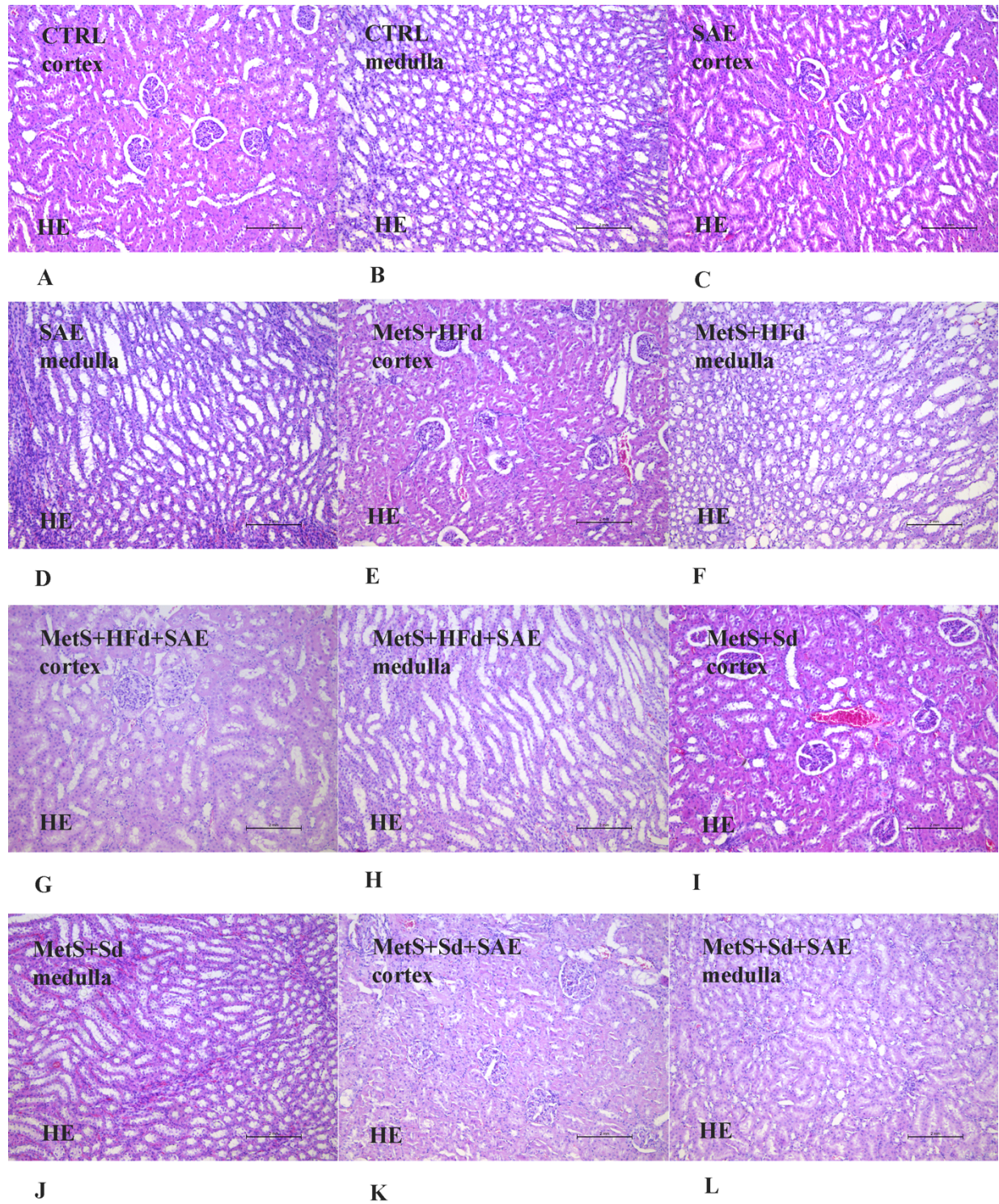


Слика 10. Ткива јетре обојена хематоксилин/еозином

4.8.3. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ БУБРЕГА

Ткиво бубрега пацова из свих испитиваних група (CTRL, SAE, MetS+HFd, MetS+HFd+SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE) је било уобичајених карактеристика (**Слика 11**).

Кортекс и медула су јасно дефинисани, односно очуване су основне грађе ткива. Грађа бубрежних телашаца и бубрежних тубула је потпуно правилна, без присутних патолошких промена. Нема знакова запаљења, едема, некрозе, као ни фиброзе (**Слика 11**).

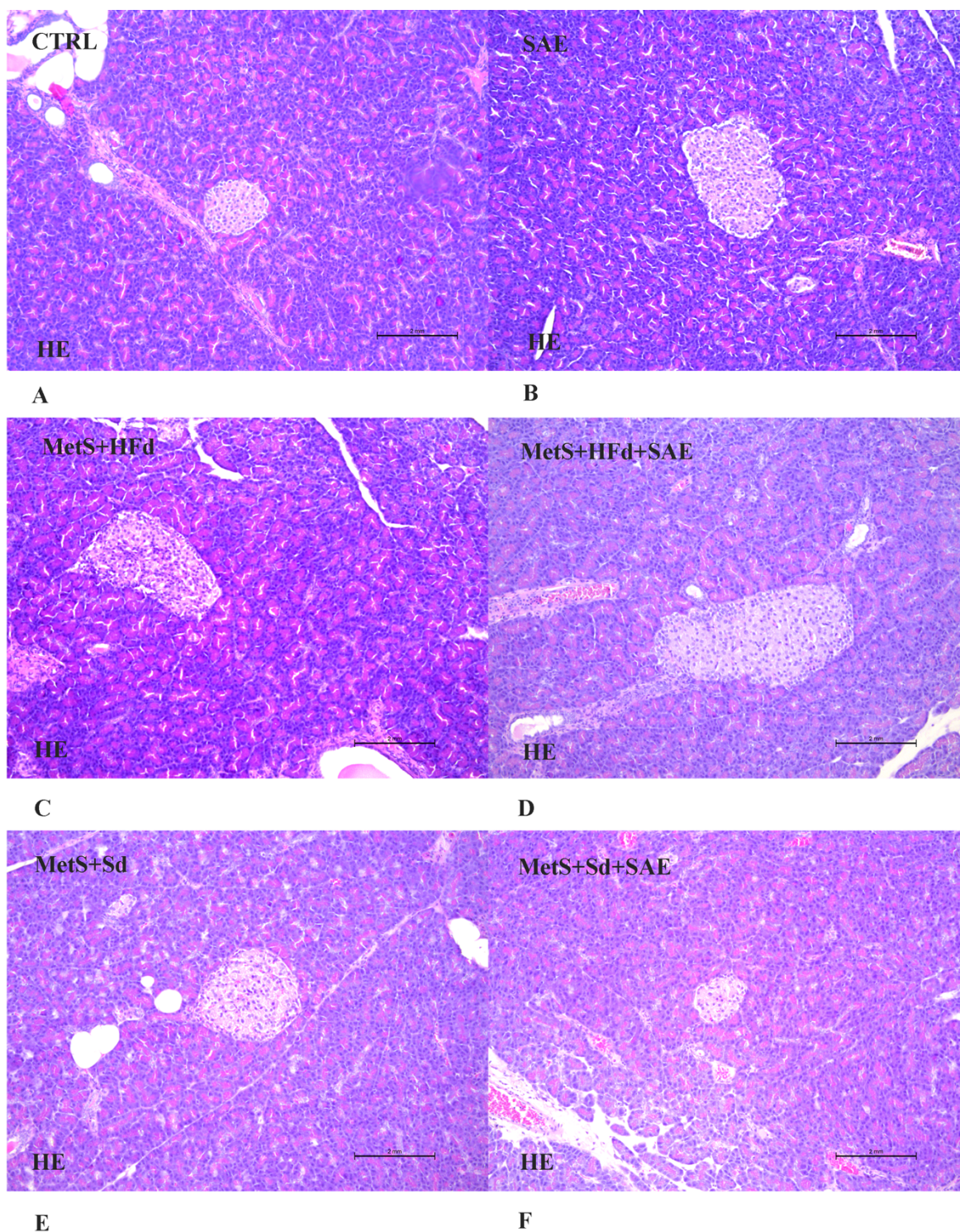


Слика 11. Ткива бубрега (медуле и кортекса) обојена хематоксилин/еозином

4.8.4. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ПАНКРЕАСА

Грађа егзокриног панкреаса је у целини очувана у свим испитиваним групама (CTRL, SAE, MetS+HFd, MetS+HFd+SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE). Ацинуси су са јасно дефинисаном базалном ламином. Поларизација ацинусних ћелија је регуларна. Нема инфламацијских промена. Нема фиброзе. Нема интерстицијалног едема. Нема некрозе (**Слика 12**).

Ендокрини панкреас је такође очуване грађе, у виду правилно дистрибуираних Лангерхансових острваца. Ћелије су очуване морфологије. Нису присутне запаљенске промене, као ни фиброза или некроза (**Слика 12**).



Слика 12. Ткива панкреаса обојена хематоксилин/еозином

V

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

5.1. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ПРОМЕНУ ТЕЛЕСНЕ ТЕЖИНЕ ПАЦОВА

Наши резултати јасно указују да је највећи пораст ВМІ примећен код пацова са метаболичким синдромом који су храњени масном храном и након индукције метаболичког синдрома (MetS+HFd група). Ови резултати су у складу са већ објављеним радовима, чији резултати сведоче да услед хроничне исхране обogaђене мастима долази до значајног повећања телесне тежине код људи и животиња (137, 138).

Увођење екстракта ароније у исхрану пацова са метаболичким синдромом у комбинацији са масном храном, спречава се повећање телесне тежине и долази до смањења ВМІ вредности. Међутим, промене у исхрани и прелазак са масне на стандардну храну допринео је снижењу телесне тежине код пацова. Такође, веома је важно напоменути да је до највећег снижења телесне тежине дошло код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном храном обogaђеном екстрактом ароније.

5.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА

Узимајући у обзир да су кардиоваскуларне компликације веома честе код метаболичког синдрома, циљ је био да се детаљно испитају ефекти дијета обogaђених аронијом на *in vivo* и *ex vivo* праћену функцију миокарда, крвни притисак, као и параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

Прелазак са високо калоричне на стандардну исхрану довео је до пада дијастолног крвног притиска. Ипак, најзначајнији хипотензивни ефекат код пацова са метаболичким синдромом, постигнут је у групи пацова који су храњени комбинацијом стандардне хране и екстрактом ароније. Екстракт ароније допринео је снижењу дијастолног крвног притиска

чак и код пацова који били храњени храном са високим садржајем липида (MetS+HFd+SAE група). Са друге стране, четворонедељна примена екстракта ароније код здравих, нормотензивних пацова није утицала на крвни притисак. Наши резултати су у складу са литературним подацима, чији резултати сведоче да плодови ароније и полифенолни екстракт ароније ефикасно смањују систолни и дијастолни крвни притисак код спонтано хипертензивних пацова (139). Механизам одговоран за хипотензивни ефекат испитиваног екстракта ароније, највероватније укључује инхибицију бубрежног система ренин-ангиотензин алдостерон (140). Значајн хипотензивни ефекат *Aronia melanocarpa* потврђен је и у студијама на моделу хипертензије (141-143). С обзиром да је хипотензивни ефекат примећен приликом уноса хране богате флавоноидима, сматра се да су и они одговорни за снижење систолног и дијастолног притиска (144, 145). Хипотензивни ефекат ароније потврђен је и у клиничким студијама код пацијената са метаболичким синдромом и код пацијената са хипертензијом (146).

Током мерења крвног притиска у нашој студији, код пацова је регистрована и фреквенца срца. Повећање фреквенце срца у групама пацова са метаболичким синдромом највероватније настаје као резултат повећања активности симпатичког нервног система који је испровоциран масном исхраном (147). Имајући то на уму, уочено смањење фреквенце срца код пацова који су након индукције метаболичког синдрома храњени стандардном храном, потпуно је логично и очекивано. Међутим, значајне промене у фреквенци срца нису уочене када је екстракт ароније додат у режим исхране код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном храном, док је повећање фреквенце примећено у MetS+HFd+SAE групи. На основу наших резултата може се рећи да је екстракт ароније са стандардизованим процентом полифенола очувао функцију и контрактилност миокарда и није утицао на промену броја откуцаја код здравих пацова. Слични резултати на фреквенцу срца су добијени и у претходним истраживањима у којима су испитивани ефекти екстракта који у себи садрже полифеноле (148).

Ехокардиографским прегледом миокарда уочено је да је екстракт ароније био најефикаснији код здравих пацова јер је дошло до значајног повећања вредности IVSd, LVPWd, IVSs, LVPWs, FS и смањења вредности LVIDs у односу на контролну групу здравих пацова. С друге стране, додавање екстракта ароније у исхрану пацова са метаболичким синдромом у комбинацији са стандардном или масном храном, није значајно

утицао на функцију миокарда у поређењу са MetS+HFd групом. Најзначајнији ефекат екстракта ароније види се код здравих пацова јер је довео до побољшања систолне функције, која се манифестовала кроз значајно повећање фракционог скраћења (FS) у односу на скоро све друге групе. Сличне вредности *in vivo* мерених кардиодинамских параметара у CTRL, MetS+Sd+SAE и MetS+HFd+SAE групама, указује на то да је исхрана обогаћена екстрактом ароније била ефикасна у побољшању фракционог скраћења без обзира на дијететски режим којим су пацови са метаболичким синдромом били подвргнути. У складу са нашим резултатима, у раније објављеним студијама је показано да полифеноли и биљке богате полифенолима имају ефекат у смањењу патолошких промена фракционог скраћења које настају услед развоја кардиометаболичких обољења (149). Смањење системског крвног притиска након третмана екстрактом ароније може повећати фракционисане скраћења, што резултира повећаном контрактилношћу миокарда (150).

Слични резултати добијени су и током *ex vivo* ретроградне перфузије миокарда. Контрактилност миокарда, процењивана кроз максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори (dp/dt max and dp/dt min), била је очувана код пацова са метаболичким синдромом који су у својој исхрани (стандардна или масна дијета) имали екстракт ароније. Овај ефекат је посебно присутан у условима нормоксије, односно када је коронарни перфузиони притисак био у опсегу између 60 и 80 cmH₂O. Исхрана обогаћена екстрактом ароније код здравих пацова допринела је побољшању релаксације срца (вредности су биле боље него у CTRL групи).

Са друге стране, приликом праћења промене прооксидационих параметара у коронарном венском ефлуенту, примећено је да су вредности свих испитиваних параметара били приближно исте у оба циклуса промене притиска. Ови резултати потврђују претходне наводе да аронија и њени екстракти остварују кардиопротективне ефекте, највероватније услед значајног антиоксидационог, антиинфламацијског, вазорелаксантног и антитромотичког ефекта (143).

5.3. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЂЕЊА ГЛУКОЗОМ КОД ПАЦОВА

Да би се проценило да ли екстракт ароније који је испитиван у нашем истраживању може да утиче на нивое глукозе у крви, сви пацови су били подвргнути ОГТ тесту. Наши резултати указују да екстракт ароније није утицао на нивое глукозе наше код здравих пацова, док је код пацова са метаболичким синдромом уочен значајан хипогликемијски ефекат. Сличан тренд забележен је и 30, 60, 120 и 180 минута након администрације глукозе, осим чињенице да у 120. и у 180. минуту није било разлике у нивоу глукозе између MetS+Sd и MetS+Sd+SAE група.

Када је реч о концентрацији инсулина наше, она је била значајно нижа код здравих пацова који су у својој исхрани имали SAE у односу на здраве пацове који су храњени само стандардном храном. Високи нивои инсулина у MetS+HFd групи нису снижени ни када је SAE екстракт уведен у исхрану. Са друге стране, код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном храном у комбинацији са екстрактом ароније нивои инсулина били су нижи (и у нултом и у стоосамдесетом минуту) у односу на пацове који су храњени само стандардном храном. У складу са нашим резултатима који сведоче да се боља толеранција глукозе постиже код пацова који су храњени SAE екстрактом, постоје и студије других научника у којима су показани корисни ефекти екстракта *A. melanocarpa* на нивое инсулина код гојазних мишева (151). Ови протективни ефекти највероватније настају као последица инхибиције дипептидил пептидазе IV и активности глукозидаза (117, 120).

5.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА

Приликом проучавања доступне научне литературе, примећено је да је повећање нивоа глукозе у крви код метаболичког синдрома најчешће праћено повећањем укупног холестерола, TG, LDL и VLDL холестерола, као и смањењем HDL холестерола (152), док екстракти базирани на аронији могу ефикасно да утичу на липидни статус (116, 141). Слични резултати добијени су и у нашој студији. Код пацова са метаболичким синдромом, који су храњени дијетом обogaћеном липидима примећене су највише вредности липидних параметара, док је са променом исхране (са масне на стандарду исхрану) са или без додатка екстракта ароније уочен значајан позитиван ефекат на ове параметре. Важно је истаћи да су вредности укупног холестерола биле најниже код метаболичких пацова храњених комбинацијом масне хране и екстракта ароније, док су вредности TG, HDL и LDL холестерола биле најниже у групи где је здравија исхрана комбинована са испитиваним екстрактом ароније. Наши резултати су у корелацији са претходним у којима је показано да је конзумација сока ароније повезана са снижењем нивоа липида код пацова који су храњени дијетом богатом фруктозом (153). Побољшања липидног статуса изазвана аронијом пронађена су и код пацијената са благом хиперхолестеролемијом и/или метаболичким синдромом, али и код спортиста (154-156). Као што је раније сугерисано, смањење нивоа триглицерида у серуму услед конзумације ароније, највероватније је повезано са повећањем серумске липазе, која хидролизује триглицериде у масне киселине (157). Поред тога, зна се да екстракти базирани на полифенолима могу да потискују експресију појединих гена који су одговорни за липогене ензиме и који доводе до снижења синтезе триглицерида у јетри (158). Поред тога, регулација липидног статуса у крви највероватније настаје као последица способности флавоноида да инхибира активност панкреасне липазе и повећа активност лецитин ацил трансферазе. Лецитин ацил трансфераза је значајна јер је то један од ензима који су одговорни за уклањање укупног холестерола из крви (159, 160). Такође, уочено је да екстракти базирани на аронији могу да смање експресију гена који су одговорни за метаболизам липида и липопротеина, који укључују синтезу масних киселина и ацил коензим А оксидазу (161).

5.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА

Да би се проценило да ли промене у исхрани (масна/стандарда храна, екстракт ароније) могу да побољшају маснокиселински профил код пацова са метаболичким синдромом, у нашој студији, мерени су њихови нивои у плазми свих пацова који су били укључени у студију. У бројним клиничким и експерименталним студијама више пута је потврђено да су нивои појединих масних киселина (пре свега палмитинске, палмитолеинске и олеинске) повезани са снижењем крвног притиска, као и нивоа инсулина и глукозе (162). У нашем истраживању, проценат засићене палмитинске масне киселине смањен је у MetS+HFd и MetS+Sd+SAE групама у поређењу са здравим пацовима, док је проценат стеаринске киселине био приближно исти у свим испитиваним групама. Ови резултати су изненађујућ и неочекивани, јер је у HFd показано да се налази значајно виши ниво палмитинске и олеинске киселине у односу на нивое који су пронађени у Sd. Ипак, сличне резултате добила је истраживачка група *Liu* и сарадника, који су показали је да исхрана обogaћена липидима довела до смањења нивоа палмитинске киселине у триацилглицеролу и слободних масних киселина у серуму пацова (163). Механизми који су одговорни за ове промене су још увек непознати, али се сматра да је смањење процента палмитинске/SFA и олеинске киселине, као и последично повећање процента PUFA довело до повећаног флукса SFA и MUFA. Због оваквих резултата, неопходна су даља истраживања која би детаљно објаснила све промене.

5.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА

Имајући у виду да је гвожђе есенцијални елемент који је укључен у одржавање хомеостазе организма, разумевање утицаја нашег екстракта ароније у комбинацији са различитим режимима исхране на његов ниво у серуму је од великог значаја. Највиши ниво гвожђа примећен је у групи здравих пацова у чију исхрану је уведен и SAE, а уз то је и повећан ниво гвожђа пронађен у свим групама са метаболичким синдромом у поређењу са здравим пацовима. У претходно објављеној студији, *Lee* и сарадници су показали да је повећан ниво гвожђа повезан са метаболичким синдромом (164). Промена у навикама исхране, односно промена са масне на стандардну храну није довела до промене у нивоима гвожђа, док је стандардне исхрана обogaћена екстрактом ароније изазвала значајан пораст у нивоима гвожђа. Ови резултати су у складу са другим истраживањима у којима је такође показано да суплементација соком од ароније повећава ниво гвожђа у серуму гојазних мишева (165). Заправо, поједини флавоноиди имају потенцијал да хелирају гвожђе и смање његову апсорпцију механизмом који је независан од хормона који је укључен у хомеостазу гвожђа, хепцидина (166). С друге стране, за поједине флавоноиде је показано и да могу да смање активност хепцидина тако што доводе до повећања апсорпције и нивоа гвожђа у серуму (166, 167), што такође може бити објашњење за повећање нивоа гвожђа у групама пацова које су конзумирале испитивани екстракт ароније.

5.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА

С обзиром да се зна да услед метаболичког синдрома код пацијената долази до повећања оксидационог стреса, постоји повећана потреба за конзумирањем антиоксиданата које би повећале антиоксидационе параметре и индиректно смањиле ниво реактивних врста. Као најадекватнији и најбољи издвајају се природни антиоксиданси који би се у организам уносили путем исхране (168, 169). Зато је у нашој студији испитивано како четворонедељна примена екстракта ароније са стандардизованим процентом полифенола у комбинацији са стандардном или масном исхраном може да утиче на редокс хомеостазу пацова. Наши резултати су показали да је у групама пацова којима је даван екстракт дошло до снижења нивоа нитрити и супероксид анјон радикала, док су антиоксидациони параметри попут редукованог глутатиона и каталазе били повећани. Повећана активност САТ највероватније је одговорна за катализирање реакције којом се водоник пероксид претвара у воду и кисеоник, чиме концентрације водоник пероксида у плазми остају непромењене. Као што је и очекивано, повећана производња прооксидационих параметара и смањена активност антиоксидационих ензима SOD и САТ уочена је у MetS+HFd групи у поређењу са контролном, CTRL групом. Увођење три различите стратегије исхране, као што је конзумирање SAE, прелазак на стандардну исхрану или комбинација стандардне дијете са SAE, довела је до снижења нивоа NO_2^- у односу на NO_2^- нивое који су измерени код пацова из MetS+HFd групе. Највећи утицај на повећање активности антиоксидационих ензима је примећен у случају када је стандардна исхрана била обogaћена SAE. Повећавајући нивое антиоксидационих параметара, показано је да поједини полифеноли могу и да сакупљају и отклањају слободне радикале. Хелирање јона гвожђа, чиме се омогућава катализовање појединих реакција које стварају слободне радикале је један од механизма који се налази у основи антиоксидационих ефеката полифенола (170-173).

5.8. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ХИСТОПАТОЛОГИЈУ ТКИВА МИОКАРДА, ЈЕТРЕ, БУБРЕГА И ПАНКРЕАСА

Хистопатолошком анализом миокарда, јетре, бубрега и панкреаса, утврђено је да значајнијих промена у већини испитиваних група нема. Наиме, ткиво панкреаса и бубрега било је потпуно очувано, иако је код свих пацова са метаболичким синдромом, на основу биохемијских параметара потпуно јасно да су пацијенти били болесни, веће структурне промене на овим органима не постоје. Разлог за овако нешто је највероватније дужина хроничног протокола, тако да четири недеље метаболичког синдрома није било довољно дуго да би дошло до развоја компликација, а самим тим и да би се уочиле значајније морфолошке промене на ткиву бубрега и панкреаса.

Са друге стране на ткивима миокарда уочавају су поједине разлике између испитиваних група. Вакуолизација субендокардних и субепикардних кардиомиоцита леве коморе уз хиперконтракцију саркомера и присуство интерстицијалног едем, присутне су код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном храном уз или без додатка екстракта ароније. Међутим у групи пацова који су храњени аронијом није присутна некроза контракционих трака, као што је то случај у MetS+Sd групи. На основу овог параметра, види се да је SAE ипак, донекле допринео очувању морфолошке структуре миокарда. Зашто су ове промене присутне само у MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групама, и зашто нису присутне MetS+HFd и MetS+HFd+SAE групама, када су оне имале лошије готово све праћене биохемијске и функционалне параметре још увек се не зна и потребна су даља, детаљнија истраживања која би дала објашњење за ове резултате.

Са друге стране, код пацова са метаболичким синдромом који су храном са високим садржајем липида уочена је измењеном структура ткива јетре, која се манифестовала као микровезикуларна стеатоза јетре. Међутим, код пацова који су уз HFd храњени и екстрактом ароније, као и код пацова који су након индукције метаболичког синдрома пребачени на стандардну исхрану са или без додатка екстракта, значајно су нормализоване промене у ткиву јетре. Способност антоцијана који се налазе у аронији да смањи стеатозу јетре која је изазвана метаболичким синдромом и раније је документована (173, 174), тако да може да се претпостави да су антоцијани одговорни за пројективне ефекте нашег испитиваног екстракта. Резултати појединих студија сведоче и о позитивним ефектима

Aronia melanocarpa на акумулацију липида у јетри, тако што долази до инхибиције експресије PPAR γ 2 заједно са побољшањем телесне тежине, функције јетре, липидног профила и антиоксидационе способности. Петходно објављени и наши резултати указују на значајан потенцијал *Aronia melanocarpa* и њених екстраката на потенцијалну терапеутску ефикасност код стеатоозе јетре (173, 174).

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата наше студије могу се извести следећи закључци:

- 1) конзумирање екстракта ароније са стандардизованим процентом полифенола спречио је да дође до повећања телесне тежине код пацова са метаболичким синдромом;
- 2) четворонедељни унос испитиваног екстракта ароније показао је значајне кардиопротективне и повољне ефекте на функцију миокарда;
- 3) промена дијететског режима са HFd на Sd са или без примене испитиваног екстракта значајно је утицала на побољшање липидног профила код пацова са метаболичким синдромом;
- 4) четворонедељни унос екстракта ароније са стандардизованим процентом полифенола, допринео је бољој толеранцији на глукозу у ОГТ тесту;
- 5) промена дијететског режима са HFd на Sd са или без примене испитиваног екстракта значајно је утицала на побољшање маснокиселинског профила код пацова;
- 6) испитивани екстракт ароније побољшао је системску редокс равнотежу тако што је повећао антиоксидационе и смањио прооксидационе параметре у системској циркулацији;
- 7) стеатоза јетре, до које је дошло код пацова са метаболичким синдромом, значајно је умањена код пацова који су током четири недеље храњени и екстрактом ароније;
- 8) благотворнији ефекти испитиваног екстракта ароније бољи су уколико се он комбинује са здравијим начином исхране (стандардна дијета).

VII

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

- 1) Ferranini E, Haffner S.M, Mitchell B.D, Stern M.P. Hyperinzulinemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia*. 1991;34:416–422.
- 2) Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med*. 1998;15:539–553.
- 3) Fugger G, Dold M, Bartova L, Kautzky A, Souery D, Mendlewicz J, et al. Major depression and comorbid diabetes-Findings from the European Group for the Study of Resistant Depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019;109638.
- 4) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) *JAMA*. 2001;285:2486–2497.
- 5) Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735–2752.
- 6) Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—A new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059–1062.
- 7) Ballard KD, Mah E, Guo Y, Pei R, Volek JS, Bruno RS. Low-fat milk ingestion prevents postprandial hyperglycemia-mediated impairments in vascular endothelial function in obese individuals with metabolic syndrome. *J. Nutr*. 2013;143:1602–1610.
- 8) Russell WR, Baka A, Bjorck I, Delzenne N, Gao D, Griffiths HR, Hadjilucas E, Juvonen K, et al. Impact of Diet Composition on Blood Glucose Regulation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2016;56:541–590.
- 9) Pugliese G, Solini A, Bonora E, Orsi E, et al. Distribution of cardiovascular disease and retinopathy in patients with type 2 diabetes according to different classification systems for chronic kidney disease: A cross-sectional analysis of the renal insufficiency and

- cardiovascular events (RIACE) Italian multicenter study. *Cardiovasc. Diabetol.* 2014;13:59.
- 10) Asif M. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. *J. Educ. Health Promot.* 2014;3:1.
 - 11) James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8) *JAMA.* 2014;311:507–520.
 - 12) Thomas G, Shishehbor M, Brill D, Nally JV, Jr. New hypertension guidelines: One size fits most? *Clevel. Clin. J. Med.* 2014;81:178–188.
 - 13) Selassie M, Sinha AC. The epidemiology and aetiology of obesity: A global challenge. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2011;25:1–9.
 - 14) Bosomworth NJ. Approach to identifying and managing atherogenic dyslipidemia: A metabolic consequence of obesity and diabetes. *Can. Fam. Phys.* 2013;59:1169–1180.
 - 15) Alsheikh-Ali AA, Lin JL, Abourjaily P, Ahearn D, Kuvin JT, Karas RH. Prevalence of low high-density lipoprotein cholesterol in patients with documented coronary heart disease or risk equivalent and controlled low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol.* 2007; 100(10):1499–1501.
 - 16) Cominacini L, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, De Santis A, Pasini C, Pastorino AM, Bosello O. High-density lipoprotein lipases in obesity. *Ann Nutr Metab.* 1993; 37: 175–184.
 - 17) Depres JP. Dyslipidaemia and obesity. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab.* 1994; 8:629–659.
 - 18) Bales CW, Kraus WE. Caloric restriction: Implications for human cardiometabolic health. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* 2013;33:201–208.
 - 19) Lee EG, Choi JH, Kim KE, Kim JH. Effects of a Walking Program on Self-management and Risk Factors of Metabolic Syndrome in Older Korean Adults. *J. Phys. Ther. Sci.* 2014;26:105–109.
 - 20) MZRS. Istraživanje zdravlja stanovnika Republike Srbije za 2013. godinu. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2014.
 - 21) Kanungsukkasem U, Ng N, Minh HV, Razzaque A, Ashraf A, Juvekar S, Ahmed SM, Bich TH. Fruit and vegetable consumption in rural adults population in INDEPTH HDSS sites in Asia, *Global Health Action.* 2009; 35, Supplement 1.

- 22) Cavill N, Kahlmeier S, Racioppi F. Physical activity and health in Europe: evidence for action, WHO. 2006. 7.
- 23) Pedersen PK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports*. 2006; 16(Suppl. 1):3–63
- 24) Lock K, Pomerleau J, Causer L, Altmann DR, McKee M. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. *Bull WHO*. 2005; 83:100-8.
- 25) Kotseva K, Wood D, De Backer G, De Bacquer D, Pyorala K, Keil U. EUROASPIRE III: a survey on the lifestyle, risk factors and use of cardioprotective drug therapies in coronary patients from 22 European countries. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009; 16:121–137.
- 26) Opie LH, Lecour S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur Heart J*. 2007; 28:1683–1693.
- 27) Rosell M, De Faire U, Hellénus ML. Low prevalence of the metabolic syndrome in Wine drinkers - is it the alcohol beverage or the lifestyle? *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57:227–234.
- 28) van Dijk CG, Oosterhuis NR, Xu YJ, Brandt M, Paulus WJ, van Heerebeek L, Duncker DJ, Verhaar MC, Fontoura D, Lourenço AP, Leite-Moreira AF, Falcão-Pires I, Joles JA, Cheng C. Distinct Endothelial Cell Responses in the Heart and Kidney Microvasculature Characterize the Progression of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in the Obese ZSF1 Rat With Cardiorenal Metabolic Syndrome. *Circ Heart Fail*. 2016 Apr;9(4):e002760.
- 29) Schlaich M, Straznicky N, Lambert E, Lambert G. Metabolic syndrome: a sympathetic disease? *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Feb;3(2):148-57. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70033-6.
- 30) Parthasarathy S, Litvinov D, Selvarajan K., Garelnabi M. Lipid peroxidation and decomposition—Conflicting roles in plaque vulnerability and stability. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008;1781:221–231.
- 31) McGrowder D, Riley C, Morrison EY, Gordon L. The role of high-density lipoproteins in reducing the risk of vascular diseases, neurogenerative disorders, and cancer. *Cholesterol*. 2011;2011:496925.
- 32) Tune JD, Goodwill AG, Sassoon DJ, Mather KJ. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl Res*. 2017 May;183:57-70.
- 33) Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, WHO. 2011

- 34) Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med*. 2003; 4(6):S11–S18.
- 35) Ervin BR. Prevalence of Metabolic Syndrome Among Adults 20 Years of Age and Over, by Sex, Age, Race and Ethnicity, and Body Mass Index: United States, 2003–2006 National Health Statistics Reports. 2009: No 13.
- 36) Legetic B, Campbell N. Reducing salt intake in the Americans: Pan American Health Organization actions. *J Health Commun*. 2011 Aug;16 (Suppl 2):37–48.
- 37) Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2016;31:936–944.
- 38) Soares R, Costa C. *Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome*. Springer; Heidelberg, Germany: 2009.
- 39) Ferri N, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and metabolic syndrome: Insights on insulin resistance, inflammation, and atherogenic dyslipidemia. *Endocrine*. 2016 doi: 10.1007/s12020-016-0939-0.
- 40) Sassoon DJ, Goodwill AG, Noblet JN, Conteh AM, Herring BP, McClintick JN, et al. Obesity alters molecular and functional cardiac responses to ischemia/reperfusion and glucagon-like peptide-1 receptor agonism. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(4):43.
- 41) Zibadi S, Vazquez R, Moore D, Larson DF, Watson RR. Myocardial lysyl oxidase regulation of cardiac remodeling in a murine model of diet-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(3):H976–82.
- 42) Williams CL, Hayman LL, Daniels SR et al. Cardiovascular health in childhood: a statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation* 2002; 106: 143-60.
- 43) Diabetes Prevention Program (DPP) Research Group. The Diabetes Prevention Program (DPP): description of lifestyle intervention. *Diabetes Care*. 2002;25(12):2165-2171.
- 44) Bales CW, Kraus WE. Caloric restriction: Implications for human cardiometabolic health. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev*. 2013;33:201–208.

- 45) Grams J, Garvey WT. Weight Loss and the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes Using Lifestyle Therapy, Pharmacotherapy, and Bariatric Surgery: Mechanisms of Action. *Curr. Obes. Rep.* 2015;4:287–302.
- 46) Tay J, Thompson CH, Luscombe-Marsh ND, et al. Effects of an energy-restricted low-carbohydrate, high unsaturated fat/low saturated fat diet versus a high-carbohydrate, low-fat diet in type 2 diabetes: A 2-year randomized clinical trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2018;20(4), 858-871.
- 47) Gomes JM, Costa JDA, Alfenas RC. Effect of increased calcium consumption from fat-free milk in an energy-restricted diet on the metabolic syndrome and cardiometabolic outcomes in adults with type 2 diabetes mellitus: a randomised cross-over clinical trial. *British Journal of Nutrition.* 2018;119(4):422-430.
- 48) Fleming JA, Kris-Etherton PM. The evidence for alpha-linolenic acid and cardiovascular disease benefits: Comparisons with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv. Nutr.* 2014;5:863S–876S.
- 49) Davis C, Bryan J, Hodgson J, Murphy K. Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review. *Nutrients.* 2015;7:9139–9153.
- 50) Salas-Salvadó J, Guasch-Ferré M, Lee CH., et al. Protective effects of the Mediterranean diet on type 2 diabetes and metabolic syndrome. *The Journal of nutrition.* 2015;146(4):920S-927S.
- 51) Michielsen CC, Hangelbroek RW, Feskens EJ, Afman LA. Disentangling the Effects of Monounsaturated Fatty Acids from Other Components of a Mediterranean Diet on Serum Metabolite Profiles: A Randomized Fully Controlled Dietary Intervention in Healthy Subjects at Risk of the Metabolic Syndrome. *Molecular nutrition & food research.* 2019;63(9):1801095.
- 52) Garcia-Silva J, Navarrete NN, Peralta-Ramírez MI, et al. Efficacy of Cognitive Behavioral Therapy in Adherence to the Mediterranean Diet in Metabolic Syndrome Patients: A Randomized Controlled Trial. *Journal of nutrition education and behavior.* 2018;50(9);896-904.
- 53) Esposito K, Maiorino MI, Bellastella G, et al. A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: A systematic review with meta-analyses. *BMJ Open.* 2015;5:e008222.

- 54) Mayneris-Perxachs J, Sala-Vila A, Chisaguano M, et al. Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk. *PLoS ONE*. 2014;9:e85202.
- 55) Koloverou E, Esposito K, Giugliano D, Panagiotakos D. The effect of Mediterranean diet on the development of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of 10 prospective studies and 136,846 participants. *Metab. Clin. Exp.* 2014;63:903–911.
- 56) Schwingshackl L, Missbach B, König J, Hoffmann G. Adherence to a Mediterranean diet and risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr.* 2015;18:1292–1299.
- 57) Lopez-Huertas E. The effect of EPA and DHA on metabolic syndrome patients: A systematic review of randomised controlled trials. *Br. J. Nutr.* 2012;107:185–194.
- 58) Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2018;58:1-16.
- 59) EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J.* 2010;8:1461–1566.
- 60) Mancini FR, Affret A, Dow C, et al. Dietary antioxidant capacity and risk of type 2 diabetes in the large prospective E3N-EPIC cohort. *Diabetologia*. 2018;61(2);308-316.
- 61) Sotoudeh G, Abshirini M, Bagheri F, et al. Higher dietary total antioxidant capacity is inversely related to prediabetes: a case-control study. *Nutrition*. 2018;46:20-25.
- 62) World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. WHO; Geneva, Switzerland: 2000. (World Health Organization Technical Report Series). Report of a WHO Consultation.
- 63) Schwarz NA, Rigby BR, La Bounty P, Shelmadine B, Bowden RG. A review of weight control strategies and their effects on the regulation of hormonal balance. *J. Nutr. Metab.* 2011;2011:237932.
- 64) Bhutani S, Varady KA. Nibbling versus feasting: Which meal pattern is better for heart disease prevention? *Nutr. Rev.* 2009;67:591–598.

- 65) Ekmekcioglu C, Touitou Y. Chronobiological aspects of food intake and metabolism and their relevance on energy balance and weight regulation. *Obes. Rev.* 2011;12:14–25.
- 66) Cameron JD, Cyr MJ, Doucet E. Increased meal frequency does not promote greater weight loss in subjects who were prescribed an 8-week equi-energetic energy-restricted diet. *Br. J. Nutr.* 2010;103:1098–1101.
- 67) Leidy HJ, Tang M, Armstrong CL, Martin CB, Campbell WW. The effects of consuming frequent, higher protein meals on appetite and satiety during weight loss in overweight/obese men. *Obesity.* 2011;19:818–824.
- 68) Smeets AJ, Lejeune MP, Westerterp-Plantenga MS. Effects of oral fat perception by modified sham feeding on energy expenditure, hormones and appetite profile in the postprandial state. *Br. J. Nutr.* 2009;101:1360–1368.
- 69) Perrigue MM, Drewnowski A, Wang CY, Neuhouser ML. Higher Eating Frequency Does Not Decrease Appetite in Healthy Adults. *J. Nutr.* 2016;146:59–64.
- 70) Bellastella G, Bizzarro A, Aitella E, et al. Pregnancy may favour the development of severe autoimmune central diabetes insipidus in women with vasopressin cell antibodies: Description of two cases. *Eur. J. Endocrinol.* 2015;172:K11–K17.
- 71) de Mello Fontanelli M, Sales CH, Carioca AA, et al. The relationship between carbohydrate quality and the prevalence of metabolic syndrome: challenges of glycemic index and glycemic load. *European journal of nutrition.* 2018;57(3):1197-1205.
- 72) Livesey G, Taylor R, Livesey HF, et al. Dietary glycemic index and load and the risk of type 2 diabetes: Assessment of causal relations. *Nutrients.* 2019;11(6):1436.
- 73) Bendtsen LQ, Lorenzen JK, Bendtsen NT, Rasmussen C, Astrup A. Effect of dairy proteins on appetite, energy expenditure, body weight, and composition: A review of the evidence from controlled clinical trials. *Adv. Nutr.* 2013;4:418–438.
- 74) Koppes LL, Boon N, Nooyens AC, van Mechelen W, Saris WH. Macronutrient distribution over a period of 23 years in relation to energy intake and body fatness. *Br. J. Nutr.* 2009;101:108–115.
- 75) Gregory SM, Headley SA, Wood RJ. Effects of dietary macronutrient distribution on vascular integrity in obesity and metabolic syndrome. *Nutr. Rev.* 2011;69:509–519.
- 76) De Jonge L, Bray GA, Smith SR, et al. Effect of diet composition and weight loss on resting energy expenditure in the POUNDS LOST study. *Obesity.* 2012;20:2384–2389.

- 77) Rios-Hoyo A, Cortes MJ, Rios-Ontiveros H, Meaney E, Ceballos G, Gutierrez-Salmean G. Obesity, Metabolic Syndrome, and Dietary Therapeutical Approaches with a Special Focus on Nutraceuticals (Polyphenols): A Mini-Review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2014;84:113–123.
- 78) Joshi Y, Goyal, B. Anthocyanins: a lead for anticancer drugs”, *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry.* 2011;1(4):1119-1126.
- 79) Mazza G. Anthocyanins and heart health”, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità.* 2007;43(4):369-374.
- 80) Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytother. Res.* 2016;30:1265–1286.
- 81) Jiang X, Li X, Zhu C, Sun J, Tian L, Chen W, Bai W. The target cells of anthocyanins in metabolic syndrome. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2019;59(6):921-946.
- 82) Naseri R, Farzaei F, Haratipour P, et al. Anthocyanins in the management of metabolic syndrome: A pharmacological and biopharmaceutical review. *Frontiers in pharmacology.* 2019;9.
- 83) Thielecke F, Boschmann M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome—a review. *Phytochemistry.* 2009;70(1):11-24.
- 84) Hibi M, Takase H, Iwasaki M, Osaki N, Katsuragi Y. Efficacy of tea catechin-rich beverages to reduce abdominal adiposity and metabolic syndrome risks in obese and overweight subjects: a pooled analysis of 6 human trials. *Nutrition research.* 2018;55:1-10.
- 85) Rubio-Ruiz ME, Guarner-Lans V, Cano-Martínez A, et al. Resveratrol and Quercetin Administration Improves Antioxidant DEFENSES and reduces Fatty Liver in Metabolic Syndrome Rats. *Molecules.* 2019;24(7):1297.
- 86) Ostadmohammadi V, Milajerdi A, Ayati E, Kolahdooz F, Asemi Z. Effects of quercetin supplementation on glycemic control among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytotherapy Research.* 2019;33(5):1330-1340.
- 87) Tabrizi R, Tamtaji OR, Mirhosseini N, et al. The effects of quercetin supplementation on lipid profiles and inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2019;1-14.

- 88) Amiot MJ, Riva C, Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obesity Reviews*. 2016;17(7):573-586.
- 89) Rubio-Ruiz ME, Okonny E, Klinge CM. Mechanisms of Resveratrol and Estrogen in Cardioprotective Function. 2018:9.
- 90) Chaplin A, Carpéné C, Mercader J. Resveratrol, metabolic syndrome, and gut microbiota. *Nutrients*. 2018;10(11), 1651.
- 91) Rubio-Ruiz ME, Guarner-Lans V, Cano-Martínez A, et al. Resveratrol and Quercetin Administration Improves Antioxidant DEFENSES and reduces Fatty Liver in Metabolic Syndrome Rats. *Molecules*. 2019;24(7):1297.
- 92) Sheen JM, Yu HR, Tain YL, et al. Combined maternal and postnatal high-fat diet leads to metabolic syndrome and is effectively reversed by resveratrol: A multiple-organ study. *Scientific reports*. 2018;8(1):5607.
- 93) Walker JM, Eckardt P, Aleman JO, et al. The effects of trans-resveratrol on insulin resistance, inflammation, and microbiota in men with the metabolic syndrome: A pilot randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of clinical and translational research*. 2019;4(2):122.
- 94) Hou CY, Tain YL, Yu HR, Huang LT. The Effects of Resveratrol in the Treatment of Metabolic Syndrome. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3):535.
- 95) Tain YL, Hsu CN. Developmental programming of the metabolic syndrome: can we reprogram with resveratrol?. *International journal of molecular sciences*. 2018;19:2584.
- 96) Traber MG, Buettner GR, Bruno RS. The relationship between vitamin C status, the gut-liver axis, and metabolic syndrome. *Redox biology*. 2018;10:1091.
- 97) Hayashi D, Shirai Y. Protective Role of Alpha-Tocopherol in Diabetic Nephropathy. In *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. Academic Press. 2018;375-383.
- 98) Bruno RS. Vitamin E and Metabolic Syndrome. In *Vitamin E in Human Health*. Humana Press, Cham. 2019;295-310.
- 99) Beydoun MA, Chen X, Jha K, Beydoun HA, Zonderman AB, Canas JA. Carotenoids, vitamin A, and their association with the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition reviews*. 2019;77(1):32-45.

- 100) Park S, Ham JO, Lee BK. Effects of total vitamin A, vitamin C, and fruit intake on risk for metabolic syndrome in Korean women and men. *Nutrition*. 2015;31(1):111-118.
- 101) Taheri, R., Connolly, B. A., Brand, M. H., & Bolling, B. W. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(36):8581-8588.
- 102) Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Kubica, P., et al. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. × prunifolia* and their antioxidant activities. *European Food Research and Technology*,. 2017; 243(9):1645-1657.
- 103) Oszmiański, J., Wojdyło, A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 2015;221(6):809-813.
- 104) Tanaka, T., Tanaka, A. Chemical components and characteristics of black chokeberry. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)*. 2001;
- 105) Jurikova, T., Mlcek, J., Skrovankova, S., et al. Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Molecules*. 2017;22(6), 944.
- 106) Lazarova, M. P., Dimitrov, K. I., Nikov, I. S., & Dzhonova, D. B. Polyphenols extraction from black chokeberry wastes. *BULGARIAN CHEMICAL COMMUNICATIONS*. 2016;48,:442-445.
- 107) Denev, P., Číž, M., Kratchanova, M., & Blazheva, D. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food chemistry*. 2019;284:108-117.
- 108) Santhakumar, A. B., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;113:49-65.
- 109) Takahashi A, Shimizu H, Okazaki Y, et al. Anthocyanin-rich Phytochemicals from *Aronia* Fruits Inhibit Visceral Fat Accumulation and Hyperglycemia in High-fat Diet-induced Dietary Obese Rats. *J Oleo Sci*. 2015;64(12):1243-50.

- 110) Kim B, Park Y, Wegner CJ, Bolling BW, Lee J. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in caco-2 cells. *J. Nutr. Biochem.* 2013;24:1564-70.
- 111) Park, C. H., Kim, J. H., Lee, E. B., et al. *Aronia melanocarpa* extract ameliorates hepatic lipid metabolism through PPAR γ 2 downregulation. *PloS one.* 2017;12(1), e0169685.
- 112) Loo, B. M., Erlund, I., Koli, R., Puukka, P., Hellström, J., Wähälä, K., ... & Jula, A. (2016). Consumption of chokeberry (*Aronia mitschurinii*) products modestly lowered blood pressure and reduced low-grade inflammation in patients with mildly elevated blood pressure. *Nutrition research*, 36(11), 1222-1230.
- 113) Pokimica, B., García-Conesa, M. T., Zec, M., Debeljak-Martačić, J., Ranković, S., Vidović, N., ... & Glibetić, M. Chokeberry juice containing polyphenols does not affect cholesterol or blood pressure but modifies the composition of plasma phospholipids fatty acids in individuals at cardiovascular risk. *Nutrients.*2019;11(4), 850.
- 114) Some, A. A., Belemnaba, L., Belemtougri, R. G., Nikiema, M., & Ouedraogo, S. Endothelium dependent and endothelium independent activity of ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae) on porcine coronary arteries and its underlying mechanisms of vasorelaxation. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2016;5(6), 259-264.
- 115) Pavlova V, Sainova I, Alexieva B, Valkova I, Markova T, Nikolova E. Antioxidant effect of aronia melanocarpa extract after doxorubicin. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2014;20:188-92.
- 116) Kardum N, Konic-Ristic A, Savikin K, et al. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on antioxidant/pro-oxidant status in healthy subjects. *J Med Food.* 2014;17(8):869-74.
- 117) Yamane, T., Imai, M., Handa, S., Yamada, K., Sakamoto, T., Ishida, T., ... & Nakano, Y. (2019). Reduction of blood glucose and HbA1c levels by cyanidin 3, 5-diglucoside in KKAY mice. *Journal of Functional Foods*, 58, 21-26.
- 118) Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:223S–9S.
- 119) Jurgonski A, Juskiewicz J, Zdunczyk Z. Comparison of the effects of chokeberry fruit extract, chicory flour and their dietary combination on blood parameters and antioxidant status of healthy and diabetic rats. *Pol J Food Nutr Sci.* 2008;58(2):273–8.

- 120) Bräunlich M, Slimestad R, Wangensteen H, Brede C, Malterud KE, Barsett H. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients* (2013) 5(3):663–78.
- 121) Wu, T., Grootaert, C., Pitart, J., Vidovic, N. K., Kamiloglu, S., Possemiers, S., ... & Van Camp, J. (2018). *Aronia (Aronia melanocarpa) Polyphenols Modulate the Microbial Community in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and Decrease Secretion of Proinflammatory Markers in a Caco-2/endothelial Cell Coculture Model. Molecular nutrition & food research*, 62(22), 1800607.
- 122) Daneschvar, H. L., Aronson, M. D., & Smetana, G. W. (2016). FDA-approved anti-obesity drugs in the United States. *The American journal of medicine*, 129(8), 879-e1.
- 123) Kopin, L., & Lowenstein, C. J. (2017). Dyslipidemia. *Annals of internal medicine*, 167(11), ITC81-ITC96.
- 124) Wright, J. M., Musini, V. M., & Gill, R. (2018). First-line drugs for hypertension. *Cochrane Database of systematic reviews*, (4).
- 125) Ahrén, B., Masmiquel, L., Kumar, H., Sargin, M., Karsbøl, J. D., Jacobsen, S. H., & Chow, F. (2017). Efficacy and safety of once-weekly semaglutide versus once-daily sitagliptin as an add-on to metformin, thiazolidinediones, or both, in patients with type 2 diabetes (SUSTAIN 2): a 56-week, double-blind, phase 3a, randomised trial. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 5(5), 341-354.
- 126) Ghelani, H., Razmovski-Naumovski, V., & Nammi, S. (2017). Chronic treatment of (R)- α -lipoic acid reduces blood glucose and lipid levels in high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced metabolic syndrome and type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. *Pharmacology research & perspectives*, 5(3).
- 127) Rabadán-Chávez, G. M., Reyes-Maldonado, E., Quevedo-Corona, L., Paniagua-Castro, N., Escalona-Cardoso, G., & Jaramillo-Flores, M. E. (2016). The prothrombotic state associated with obesity-induced hypertension is reduced by cocoa and its main flavanols. *Food & function*, 7(12), 4880-4888.
- 128) Chang, R. L., Nithiyantham, S., Huang, C. Y., Pai, P. Y., Chang, T. T., Hu, L. C., ... & Kuo, W. W. (2019). Synergistic cardiac pathological hypertrophy induced by high-salt diet in IGF-IIR α cardiac-specific transgenic rats. *PloS one*, 14(6), e0216285.

- 129) Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982, 126, 131-138.
- 130) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358
- 131) Cheng, C. W., Chen, L. Y., Chou, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 262-267.
- 132) Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal Immunolocal Methods.* 1980, 38, 161-170.
- 133) Glaser C, Demmelmair H, Koletzko B (2010) High-Throughput Analysis of Total Plasma Fatty Acid Composition with Direct In Situ Transesterification. *PLoS ONE* 5:e12045.
- 134) Beutler, E. Catalase. In: *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*; Beutler, E., Ed.; Publisher: Grune and Stratton, New York, 1982, pp. 105–106.
- 135) Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 1972, 247, 3170–3175.
- 136) Beutler, E. Reduced glutathione (GSH). In: *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*; Beutler, E., Ed.; Publisher: Grune and Stratton, New York, 1975, pp. 112–114.
- 137) Mansoor, N., Vinknes, K. J., Veierød, M. B., & Retterstøl, K. (2016). Effects of low-carbohydrate diets v. low-fat diets on body weight and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 115(3), 466-479.
- 138) Atamni, H. J. A. T., Mott, R., Soller, M., & Iraqi, F. A. (2016). High-fat-diet induced development of increased fasting glucose levels and impaired response to intraperitoneal glucose challenge in the collaborative cross mouse genetic reference population. *BMC genetics*, 17(1), 10.
- 139) Hellström, J.K.; Shikov, A.N.; Makarova, M.N.; Pihlanto, A.M.; Pozharitskaya, O.N.; Ryhänen, E.L.; Kivijärvi, P.; Makarov, V.G.; Mattila, P.H. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii* var. Viking). *J Funct Foods.* 2010, 2, 163-169.
- 140) Yamane, T. (2018). Beneficial Effects of Anthocyanin From Natural Products on Lifestyle-Related Diseases Through Inhibition of Protease Activities. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 58, pp. 245-264). Elsevier.

- 141) Kardum, N., Milovanović, B., Šavikin, K., Zdunić, G., Mutavdžin, S., Gligorijević, T., & Spasić, S. (2015). Beneficial effects of polyphenol-rich chokeberry juice consumption on blood pressure level and lipid status in hypertensive subjects. *Journal of medicinal food*, 18(11), 1231-1238.
- 142) Cebova, M., Klimentova, J., Janega, P., & Pechanova, O. (2017). Effect of bioactive compound of *Aronia melanocarpa* on cardiovascular system in experimental hypertension. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- 143) Parzonko, A., & Naruszewicz, M. (2016). Cardioprotective effects of *Aronia melanocarpa* anthocyanins. From laboratory experiments to clinical practice. *Current pharmaceutical design*, 22(2), 174-179.
- 144) Sureda, A., Silva, A. S., Sanchez-Machado, D. I., Lopez-Cervantes, J., Daglia, M., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Hypotensive effects of genistein: From chemistry to medicine. *Chemico-biological interactions*, 268, 37-46.
- 145) Bouaziz, A., Abdalla, S., Baghiani, A., & Charef, N. (2015). Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(1), 19-28.
- 146) Sikora J, Broncel M, Mikiciuk-Olasik E. *Aronia melanocarpa* Elliot reduces the activity of angiotensin i-converting enzyme-in vitro and ex vivo studies. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:739721.
- 147) Kanthe, P.S.; Patil, B.S.; Bagali, S.C.; Reddy, R.C.; Aithala, M.R.; Das, K.K. Protective effects of Ethanolic Extract of *Emblica officinalis* (amla) on Cardiovascular Pathophysiology of Rats, Fed with High Fat Diet. *J Clin Diagn Res*. 2017, 11, CC05-CC09.
- 148) Jo, E., Lewis, K. L., Higuera, D., Hernandez, J., Osmond, A. D., Directo, D. J., & Wong, M. (2016). Dietary caffeine and polyphenol supplementation enhances overall metabolic rate and lipid oxidation at rest and after a bout of sprint interval exercise. *Journal of strength and conditioning research*, 30(7), 1871-1879.
- 149) Pan, S. L., Lin, H., Luo, H. Q., Gao, F. D., Meng, L. P., Guo, Y., ... & Chi, J. F. (2017). Effects of yellow wine polyphenols on cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy rats. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi= Zhongguo yingyong shenglixue zazhi= Chinese journal of applied physiology*, 33(5), 431-435.

- 150) Yadegari, M.; Khamesipour, F.; Talebiyan, R.; Katsande, S. Echocardiography findings after intravenous injection of *Achillea millefolium* (Yarrow) extract in the dog. *Malaysian Applied Biology* 2015, 44, 85-91.
- 151) Kim, N.H.; Jegal, J.; Kim, Y.N.; Heo, J.D.; Rho, J.R.; Yang, M.H.; Jeong, E.J. Chokeberry Extract and Its Active Polyphenols Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Modulates Fat Accumulation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients* 2018, 10, pii: E1734.
- 152) Mitra SK, Gopumadhavan S, Muralidhar TS, Anturlikar SD, Sujatha MB (1995) Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated hemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. *Indian J Exp Biol* 33:798-800.
- 153) Qin B, Anderson RA (2012) An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Brit J Nutr* 108:581-587.
- 154) García-Flores LA, Medina S, Gómez C, Wheelock CE, Cejuela R, Martínez-Sanz JM, Oger C, Galano JM, Durand T, Hernández-Sáez Á, Ferreres F, Gil-Izquierdo Á. Aronia-citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: a lipidomic approach using representative oxylipins in urine. *Food Funct.* 2018 Jan 24;9(1):463-475.
- 155) Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M (2012) In vivo influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monit* 8:CR569-CR574.
- 156) Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jezierska J (2010) *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 16:CR28-CR34.
- 157) Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M., & Beisiegel, U. (2002). Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *Journal of molecular medicine*, 80(9), 576-584.
- 158) Odbayar, T. O., Badamhand, D., Kimura, T., Takahashi, Y., Tsushida, T., & Ide, T. (2006). Comparative studies of some phenolic compounds (quercetin, rutin, and ferulic acid) affecting hepatic fatty acid synthesis in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(21), 8261-8265.

- 159) Frémont, L., Gozzelino, M. T., & Linard, A. (2000). Response of plasma lipids to dietary cholesterol and wine polyphenols in rats fed polyunsaturated fat diets. *Lipids*, 35(9), 991-999.
- 160) Ohta, Y., Sami, M., Kanda, T., SAITO, K., OSADA, K., & KATO, H. (2006). Gene expression analysis of the anti-obesity effect by apple polyphenols in rats fed a high fat diet or a normal diet. *Journal of Oleo Science*, 55(6), 305-314.
- 161) Kim B, Park Y, Wegner CJ, Bolling BW, Lee J (2013) Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in caco-2 cells. *J Nutr Biochem* 24:1564-1570
- 162) Kotronen A, Velagapudi VR, Yetukuri L, et al (2009) Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia* 52:684-690
- 163) Liu TW, Heden TD, Matthew Morris E, Fritsche KL, Vieira-Potter VJ, Thyfault JP (2015) High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity Prone Rats: Implications for In Vitro Studies. *Lipids* 50:997-1008.
- 164) Lee, H.J.; Jang, H.B.; Park, J.E.; Park, K.H.; Kang, J.H.; Park, S.I.; Song, J. Relationship between Serum Levels of Body Iron Parameters and Insulin Resistance and Metabolic Syndrome in Korean Children. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014, 5, 204-210.
- 165) Yamane, T.; Kozuka, M.; Konda, D.; Nakano, Y.; Nakagaki, T.; Ohkubo, I.; Ariga, H. Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase. *J Nutr Biochem*. 2016, 31, 106-112.
- 166) Imam, M.U.; Zhang, S.; Ma, J.; Wang, H.; Wang, F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients* 2017, 9, pii: E671.
- 167) Mu, M.; An, P.; Wu, Q.; Shen, X.; Shao, D.; Wang, H.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Yao, H.; Min, J.; Wang, F. The dietary flavonoid myricetin regulates iron homeostasis by suppressing hepcidin expression. *J Nutr Biochem*. 2016, 30, 53-61.
- 168) Davì, G., Santilli, F., & Patrono, C. (2010). Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), 216-226.
- 169) Mahmoud, A. M., Wilkinson, F. L., Sandhu, M. A., Dos Santos, J. M., & Alexander, M. Y. (2019). Modulating Oxidative Stress in Drug-Induced Injury and Metabolic Disorders: The

- Role of Natural and Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- 170) Yu, H., Guo, Z., Wang, S., Kazlauciusas, A., Channa, S., Fernando, G. S. N., ... & Sergeeva, N. N. (2019). Fabrication of hybrid materials from titanium dioxide and natural phenols for efficient radical scavenging against oxidative stress. *ACS Biomaterials Science & Engineering*.
- 171) Gülçin, İ., Tel, A. Z., Gören, A. C., Taslimi, P., & Alwasel, S. H. (2019). Sage (*Salvia pilifera*): determination of its polyphenol contents, anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-13.
- 172) Sharma, H., Chawla, N., & Dhatt, A. S. (2019). Nutraceutical content and free radical scavenging capacity of brinjal (*Solanum melongena* L.) genotypes. *Scientia horticulturae*, 244, 294-303.
- 173) Sangsefidi, Z. S., Hosseinzadeh, M., Ranjbar, A. M., Akhondi-Meybodi, M., Fallahzadeh, H., & Mozaffari-Khosravi, H. (2019). The effect of total anthocyanin-base standardized (*Cornus mas* L.) fruit extract on liver function, tumor necrosis factor α , malonaldehyde, and adiponectin in patients with non-alcoholic fatty liver: a study protocol for a double-blind randomized clinical trial. *Nutrition Journal*, 18(1), 39.
- 174) Haga, S., YiMin, Yamaki, H., Jin, S., Sogon, T., Morita, N., & Ozaki, M. (2019). Extracts of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits improve liver steatosis and injury in mice by preventing lipid accumulation and cell death. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1-11.

