

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milica I. Kojadinović

**BIOLOŠKO DELOVANJE POLIFENOLA NARA  
(*Punica granatum* L.) NA PARAMETRE  
OKSIDATIVNOG STRESA I MASNOKISELINSKI  
PROFIL FOSFOLIPIDA PLAZME I ERITROCITA  
OSOBA SA METABOLIČKIM SINDROMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milica I. Kojadinović

**BIOLOGICAL PROPERTIES OF POLYPHENOLS  
IN POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) ON  
THE OXIDATIVE STRESS AND FATTY ACID  
PROFILE IN PLASMA AND ERYTHROCYTES IN  
PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

## LISTA SKRAĆENICA

AA-arahidonska kiselina

ACP-acil noseći protein

ALA- $\alpha$  linoleinska kiselina

ALT-alanin aminotransferaza

APO-apolipoprotein

AST-aspartat aminotransferaza

ATP-adenozin trifosfat

BHT-butilovani hidroksitoluen

BMI-indeks telesne mase (*engl.* body mass index)

CACO-heterogeni humani epitel kolorektalnog adenokarcinoma ćelije

CAT- katalaza

CLA-konjugovana linolna kiselina

CoA- koenzim A

CPT-1-karnitin palmitoil-transferaza-1

DCFH-DA-diholoro-dihidro-fluorescin diacetat

DGLA-dihomo-gama-linolna kiselina

DHA- dokozaheksaenska kiselina

DMSO-dimetil sulfoksid

DPA- dokozapentaenska kiselina

DPPH-2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EA-elaginska kiselina

EC-SOD-ekstracelularna superoksid dismutaza

EPA-eikozapentaenska kiselina

ER-eritrociti

EDTA-etilendiamintetrasirćetna kiselina

EFSA-Evropska agencija za bezbednost hrane (*engl.* European Food Safety)

FAD-flavin adenin dinukleotid (oksidovana forma)

FADH-flavin adenin dinukleotid (redukovana forma)

FAS-sintaza masnih kiselina

FC-Folin Ciocalteu

FL-fosfolipidi

GAE-ekvivalent galne kiseline  
GLC-gasno tečna hromatografija  
GSH- glutation  
GSSH-glutation disulfid  
GPx- glutation peroksidaza  
GST- glutation S-transferaza  
HDL-lipoproteini velike gustine (*engl.* High Density Lipoprotein)  
HOL-holesterol  
HPLC-tečna hromatografija pod visokim pritiskom (*engl.* High Pressure Liquid Chromatography)  
Hb-hemoglobin  
IDL-intermedijerni lipoprotein  
IL- interleukin  
INF $\gamma$ -interferon gama  
INT-2-(4-jodofenil)-3(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hlorid  
LA-linolna kiselina  
LDL-lipoproteini male gustine (*engl.* Low Density Lipoprotein)  
LP-lipoprotein  
KVB-kardiovaskularne bolesti  
MDA-malondialdehid  
MK- masne kiseline  
MUFA-mononezasićene masne kiseline (*engl.* Monounsaturated Fatty Acid)  
MetS-metabolički sindrom  
MnSOD-mangan superoksid dismutaza  
NADPH-nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (redukovana forma)  
NAD<sup>+</sup>- nikotinamid-adenin-dinukleotid (oksidovana forma)  
NBT- *engl.* Nitro Blue Tetrazolium  
NOS- azot oksid sintaza (*engl.* nitric oxide synthase)  
PA-palmitisnka kiselina  
PBS-fosfatni pufer (*engl.* Phosphate-Buffered Saline)  
PG-prostaglandin  
PLA-palmitoleinska kiselina

PPARs-*engl.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

PUFA-polinezasićene masne kiseline (*engl.* Polyunsaturated Fatty Acid)

ROS- reaktivne vrste kiseonika (*engl.* Reactive Oxygen Species)

RNS- reaktivne vrste azota (*engl.* Reactive Nitrogen Species)

SA-stearinska kiselina

SDS-natrijum dodecil sulfat (*engl.* Dodium Dodecyl Sulfate)

SFA-zasićene masne kiseline (*engl.* Saturated Fatty Acid)

SOD- superoksid dismutaza

TBA-tiobarbiturna kiselina

TBARS-*engl.* Tiobarbituric Acid Reactive Substances

TCA-trihlorsirćetna kiselina

TG-trigliceridi

TLC-tankoslojna hromatografija

TNF- $\alpha$ - *engl.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

TPH-triptofan hidroksilaza

URO-urolitini

VHDL-lipoproteinske čestice veoma visoke gustine (*engl.* Very High Density Lipoprotein)

VLDL-lipoproteinske čestice veoma niske gustine (*engl.* Very Low Density Lipoprotein)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Metabolički sindrom.....	1
1.2. Fosfolipidi.....	4
1.3. Masne kiseline.....	6
1.3.1. Sinteza masnih kiselina.....	8
1.3.2. Razgradnja masnih kiselina.....	10
1.3.3. Biološka uloga masnih kiselina.....	11
1.4. Oksidativni stres.....	13
1.4.1. Sistem antioksidativne zaštite.....	16
1.4.2. Antioksidativni enzimi.....	17
1.5. Sok od nara.....	19
1.6. CACO-2.....	22
<b>2. CILJ</b> .....	24
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	25
3.1. Sok od nara i njegova karakterizacija.....	25
3.1.1. Određivanje rastvorljive suve materije, ukupne kiselosti, pH vrednosti, proteina, masti, pepela, ukupnih i redukovanih šećera.....	25
3.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	26
3.1.3. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida.....	26
3.1.4. Određivanje ukupnog sadržaja antocijana.....	26
3.1.5. Određivanje sadržaja elaginske kiseline.....	27
3.1.6. Određivanje antiradikalske aktivnosti.....	27
3.2. Dizajn humanih interventnih studija.....	28
3.2.1. Protokol dvonedeljne interventne studije.....	28
3.2.2. Protokol šestonedeljne interventne studije.....	30
3.3. Antropometrijska merenja ispitanika.....	30
3.4. Uzorkovanje krvi i priprema bioloških uzoraka.....	30
3.5. Hematološke i biohemijske analize.....	31
3.6. Određivanje profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita.....	31

3.6.1. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme i eritrocita gasno-tečnom hromatografijom.....	31
3.6.2. Ekstrakcija ukupnih lipida iz plazme.....	31
3.6.3. Ekstrakcija ukupnih lipida iz eritrocita.....	32
3.6.4. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom (TLC).....	32
3.6.5. Metilacija masnih kiselina.....	33
3.6.6. Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom.....	33
3.7. Analiza parametara oksidativnog stresa.....	35
3.7.1. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije u eritrocitima.....	35
3.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) u ER.....	36
3.7.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) u eritrocitima.....	37
3.7.4. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPx) u eritrocitima.....	38
3.7.5. Određivanje koncentracije hemoglobina u hemolizatima eritrocita.....	39
3.8. Čelijska linija CACO-2.....	39
3.9. Testovi za određivanje citotoksičnosti.....	40
3.9.1. Laktat dehidrogenaza test.....	40
3.9.2. Test sa tripan plavim.....	41
3.10. Određivanje unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta.....	41
3.11. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u ćelijskom lizatu CACO-2 ćelija.....	42
3.12. Statistička obrada rezultata.....	42
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>43</b>
4.1. Karakteristike soka od nara.....	43
4.2. Antropometrijski i hematološki parametri, lipidni profil, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima kod zdravih osoba sa metaboličkim sindromom.....	44
4.2.1. Antropometrijske karakteristike.....	44
4.2.2. Krvna slika učesnika u studiji.....	46
4.2.3. Lipidni profil učesnika u studiji.....	46
4.2.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnika u studiji.....	47
4.2.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi učesnika u studiji.....	48
4.2.6. Masnokiselinski profil u fosfolipidima membrane eritrocita.....	49
4.2.7. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima.....	51
4.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite i stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima kod zdravih ljudi i ljudi sa metaboličkim sindromom.....	51
4.3.1. Aktivnost superoksid-dismutaze.....	51
4.3.2. Aktivnost katalaze.....	52

4.3.3. Aktivnost glutation peroksidaze.....	53
4.4. Antropometrijski, hematološki i biohemijski parametri, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima učesnika u dvonedeljnoj studiji.....	53
4.4.1. Antropometrijske karakteristike učesnika u studiji.....	53
4.4.2. Krvna slika i sedimentacija učesnika u studiji.....	54
4.4.3. Biohemijski parametri učesnika u studiji.....	55
4.4.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnika u studiji.....	56
4.4.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi.....	58
4.4.6. Masnokiselinski profil fosfolipida membrane eritrocita učesnika u studiji.....	58
4.4.7. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima.....	60
4.5. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite i stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima učesnika u dvonedeljnoj studiji.....	60
4.5.1. Aktivnost superoksid-dismutaze u eritrocitima učesnika u studiji.....	60
4.5.2. Aktivnost katalaze u eritrocitima učesnika u studiji.....	61
4.5.3. Aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima učesnika u studiji.....	62
4.5.4. Stepen lipidne peroksidacije.....	62
4.6. Antropometrijski, hematološki i biohemijski parametri, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima učesnika u šestonedeljnoj studiji.....	63
4.6.1. Antropometrijske karakteristike učesnika u studiji.....	63
4.6.2. Krvna slika i sedimentacija učesnika u studiji.....	64
4.6.3. Biohemijski parametri učesnika u studiji.....	65
4.6.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnika u studiji.....	66
4.6.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi učesnika u studiji.....	68
4.6.6. Masnokiselinski profil fosfolipida membrane eritrocita.....	68
4.6.7. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima učesnika u studiji.....	70
4.7. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite i stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima učesnika u šestonedeljnoj studiji.....	70
4.7.1. Aktivnost superoksid-dismutaze u eritrocitima učesnika u studiji.....	70
4.7.2. Aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima učesnika u studiji.....	71
4.7.3. Stepen lipidne peroksidacije.....	72
4.8. Antropometrijski, hematološki i biohemijski parametri, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima kod osoba ženskog pola u šestonedeljnoj studiji.....	72
4.8.1. Antropometrijske karakteristike učesnica u studiji.....	72
4.8.2. Krvna slika i sedimentacija učesnica u studiji.....	73
4.8.3. Biohemijski parametri učesnica u studiji.....	74
4.8.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnica u studiji.....	75



4.8.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi učesnica u studiji.....	76
4.8.6. Masnokiselinski profil fosfolipida membrane eritrocita.....	77
4.8.7. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima učesnica u studiji.....	79
4.9. Efekat urolitina na rast ćelija adenokarcinoma kolona CACO-2.....	79
4.9.1. Laktat dehidrogenazni esej sa pojedinačnim urolitinima.....	79
4.9.2. Laktat dehidrogenazni esej sa mešavinom urolitina.....	80
4.9.3. Određivanje unutrašnjih reaktivnih vrsta kiseonika DCFH-DA esejem- kratkoročni tretman.....	81
4.9.4. Određivanje unutrašnjih reaktivnih vrsta kiseonika DCFH-DA-dugoročni tretman.....	82
4.10. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u ćelijskom lizatu CACO-2 ćelija.....	83
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>85</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>96</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>98</b>
<b>8. BIOGRAFIJA.....</b>	<b>118</b>
<b>9. IZJAVA O AUTORSTVU.....</b>	<b>119</b>
<b>10. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA.....</b>	<b>120</b>
<b>11. IZJAVA O KORIŠĆENJU.....</b>	<b>121</b>

**KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:**

**MENTORI:**

**dr Marija Glibetić**, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu-Institut za medicinska istraživanja

---

**dr Aleksandra Arsić**, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu-Institut za medicinska istraživanja

---

**ČLAN KOMISIJE:**

**dr Iva Lakić**, docent  
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

---

**DATUM ODBRANE:** \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

Mom mentoru, višem naučnom saradniku **dr Aleksandri Arsić** izražavam duboko poštovanje i od srca se zahvaljujem na bezrezervnoj, profesionalnoj podršci kroz sve faze izrade ove teze. Toliki trud, vreme, strpljenje i razumevanje koje mi je pružila kao mentor i čovek bih poželela svakom budućem doktorandu.

Naučnom savetniku **dr Mariji Glibetić**, u okviru čijeg projekta je ova teza urađena, se zahvaljujem na ukazanom poverenju i podršci. Njeni profesionalni saveti su uvek bili višestruko korisni.

Docentu **dr Ivi Lakić**, na profesionalnoj i toploj saradnji i pomoći koju mi je pružila pri izradi teze.

Mom velikom prijatelju, kumi i kolegici, docentu **dr Milici Popović**, od srca se zahvaljujem na divnoj i profesionalnoj saradnji sa Hemijskim fakultetom, kao i nesebičnoj, svakovrsnoj podršci kroz sve naše “školske” dane.

Veliko hvala i kolegicama višem naučnom saradniku **dr Tamari Popović** i naučnom saradniku **dr Jasmini Debljak-Martaćić**, kao i svim ostalim kolegama iz Centra izvrsnosti u oblasti ispitivanja hrane i metabolizma.

Zahvaljujem se i svim saradnicima Centra izvrsnosti u oblasti ispitivanja ishrane i metabolizma Instituta za medicinska istraživanja.

Zahvaljujem se i svim svojim dragim prijateljima koji su mi sve ove godine izrade teze pružali podršku svako na svoj način.

Posebno hvala dugujem svojim **roditeljima** i **bratu**, na podršci, ljubavi i razumevanju.

Najveću zahvalnost dugujem svom sinu **Vuku**, bez koga se sigurno ne bih otisnula na ovo “doktorsko” putovanje. Njemu posvećujem ovu tezu.

# **BIOLOŠKO DELOVANJE POLIFENOLA NARA (*Punica granatum L.*) NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA I MASNOKISELINSKI PROFIL FOSFOLIPIDA PLAZME I ERITROCITA OSOBA SA METABOLIČKIM SINDROMOM**

## **SAŽETAK**

Skup višestrukih kardiometaboličkih poremećaja povezanih sa ishranom koji obuhvata izmenjen metabolizam glukoze i insulina, centralnu gojaznost, dislipidemiju i hipertenziju, predstavlja metabolički sindrom. Mnogobrojne epidemiološke studije potvrdile su da ishrana bogata voćem smanjuje rizik od nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Zbog toga je cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita efekat konzumiranja soka od nara na biohemijske parametre, krvni pritisak, metabolizam lipida i masnih kiselina i biomarkere oksidativnog statusa u plazmi i eritrocitima, kod osoba oba pola, sa metaboličkim sindromom. Sprovedene su dve interventne studije, u trajanju od dve i šest nedelja, u kojima je bilo uključeno ukupno 80 pacijenata sa metaboličkim sindromom. Pacijenti svake studije bili su nasumice podeljeni u dve grupe od kojih je interventna konzumirala 300 ml soka od nara, dok je kontrolna grupa bila bez tretmana. Rezultati istraživanja su pokazali da je konzumiranje soka od nara u trajanju od dve nedelje dovelo je do značajnog smanjenja koncentracije LDL-holesterola u serumu, kao i do značajnog smanjenja nivoa dokozaheksaenske kiseline i povećanja procenjene aktivnosti  $\Delta 9$  desaturaze u plazmi. Osim toga, u eritrocitima smo pokazali značajno povećanje nivoa dihomogama-linolenske kiseline i dokozaheksaenske kiseline i smanjenje aktivnosti glutathion peroksidaze. Suplementacija sokom od nara, tokom 6 nedelja, dovela je do značajnog povećanja nivoa ukupnih zasićenih masnih kiselina u plazmi, kao i do povećanja nivoa mononezasićenih masnih kiselina i smanjenja dokozaheksaenske kiseline i aktivnosti glutathion peroksidaze u eritrocitima. Naši rezultati su pokazali da konzumiranje soka od nara značajno menja masnokiselinski profil plazme i eritrocita i aktivnost enzima antioksidativne zaštite, kod osoba sa metaboličkim sindromom.

Ključne reči: metabolički sindrom, sok od nara, interventne studije, masno kiselinski profili, enzimi antioksidativne zaštite

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: fiziologija

**BIOLOGICAL PROPERTIES OF POLYPHENOLS IN POMEGRANATE  
(*Punica granatum* L.) ON THE OXIDATIVE STRESS AND FATTY ACID  
PROFILE IN PLASMA AND ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH  
METABOLIC SYNDROME**

**SUMMARY**

Metabolic syndrome is a set of multiple cardiometabolic disorders associated with nutrition including disturbance in metabolism of glucose and insulin, central obesity, dyslipidemia, and hypertension. Numerous epidemiological studies have shown that a diet rich in fruits reduces the risk of cardiovascular disease. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to investigate the effect of pomegranate juice on biochemical parameters, blood pressure, metabolism of lipids and fatty acids and biomarkers of oxidative status in plasma and erythrocytes, in both gender subjects with the metabolic syndrome. There were two intervention trials, for a period of two and six weeks, in which were included 80 subjects with the metabolic syndrome. Subjects in both trials were randomly divided into two groups: intervention group consumed 300 ml of pomegranate juice, the control group was untreated. The results showed that consumption of pomegranate juice for a period of two weeks resulted in a significant decrease in the concentration of LDL-cholesterol in serum, as well as a significant decrease in the level of docosahexaenoic acid and an increase in the estimated activity of  $\Delta 9$  desaturase activity in plasma. Furthermore, we have shown a significant increase in the level of dihomo-gamma-linolenic acid and docosahexaenoic acid and the decrease in the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. Supplementation with pomegranate juice, for 6 weeks, resulted in a significant increase in the level of total saturated fatty acids in the plasma, as well as increase the level of monounsaturated fatty acids and the decrease in docosahexaenoic acid and glutathione peroxidase activity in erythrocytes.

Key words: metabolic syndrome, pomegranate juice, interventional studies, fatty acid profile, antioxidative enzymes

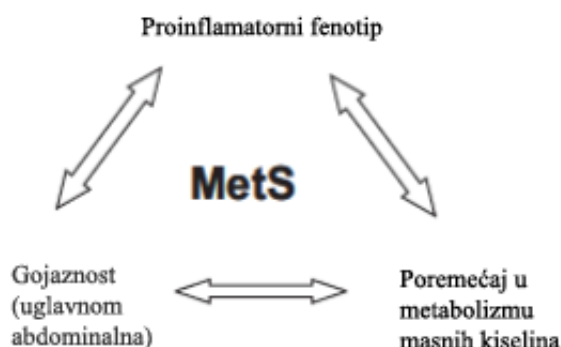
Scientific field: biology

Special topic: physiology

# 1. UVOD

## 1.1. Metabolički sindrom

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju jedan od najčešćih uzroka smrti u Evropi (oko 48%), a i u našoj zemlji su na vodećem mestu. (Nichols i sar 2012). Osim ekonomskih i društvenih promena, promene u načinu života i navikama u ishrani u velikoj meri doprinose razvoju KVB. Skup višestrukih kardiometaboličkih poremećaja povezanih sa ishranom koji obuhvata izmenjen metabolizam glukoze i insulina, centralnu (abdominalnu) gojaznost, dislipidemiju (visok nivo triglicerida i lipoproteina male gustine (LDL-holesterola) nizak i nivo lipoproteina velike gustine (HDL-holesterola)) i hipertenziju, naziva se metabolički sindrom (MetS) (Adult Treatment Panel III, 2002) (Slika 1.). Na razvoj MetS, utiču još i etiološki faktori kao što su genetska predispozicija i životne navike, dok su ishrana i izostanak fizičke aktivnosti spoljašni faktori koji takođe mogu uticati na neke komponente Mets (Riccardi i Rivellesse 2000, Vessby 2000, Adult Treatment Panel III, 2002, Riccardi i sar. 2004). Osim navedenih i drugi poremećaji, kao što su oštećen proces fibrinolize i pojačana koagulacija, koji predstavljaju znakove inflamacije i endotelne disfunkcije, povezani su sa MetS (Adult Treatment Panel III, 2002).



Slika 1. Trijada faktora koji doprinose razvoju metaboličkog sindroma (prilagođeno iz Lindsay ER i sar. 2007)

Iako ne postoji jedinstvena definicija MetS, on se obično definiše prema kriterijumima Nacionalnog edukativnog programa za lečenje holesterola odraslih, panel III (NCEP)

(*engl.* National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III), kao prisustvo najmanje tri od pet navedenih faktora rizika:

- abdominalna gojaznost (obim struka >102 cm za muškarce i >88cm za žene)
- visok nivo triglicerida ( $\geq 1.70$  mmol/l)
- nizak nivo HDL-holesterola (<1.03 mmol/l kod muškaraca ili < 1.29 mmol/l kod žena)
- visok krvni pritisak ( $\geq 130/85$  mm Hg kod poslednja dva merenja)
- visok nivo glukoze ( $\geq 5.6$  mmol/l). (Adult Treatment Panel III, 2002)

ATP III panel ne zahteva rutinsko merenje nivoa insulina, proinflatornog ili protrombinskog stanja, što je mnogo jednostavnije kako za uspostavljanje dijagnoze MetS tako i propisivanja adekvatne terapije (Riccardi i Rivellese 2000, Vessby 2000, Rivellese i sar. 2003, Rasmussen i sar. 2006, Takić i sar. 2009, Ristić-Medić i Vučić 2013).

Osnovu MetS čine izmenjena funkcija masnog tkiva i insulinska rezistencija (Anderson i sar. 2001). Istovremeno, disfunkcionalno masno tkivo takođe doprinosi razvoju insulinske rezistencije (Anderson i sar. 2001). Naime, povećanje broja ćelija masnog tkiva sa jedne strane i infiltracija makrofaga u masno tkivo sa druge strane, doprinose povećanju proizvodnje proinflatornih citokina i vode ka otpornosti ćelija na insulin. Ipak, neki autori tvrde da je insulinska rezistencija primarni posrednik MetS (Robinson i Graham 2004). Glukoza posredstvom insulina ulazi u masno tkivo preko glukoznog transportera GLUT4. Kretanje i ugrađivanje vezikula u kojima se nalaze glukozni transporteri GLUT4 u plazma membranu stimulisana je insulinom. Insulin deluje povećanjem transporta glukoze kroz svaki transporter, povećanjem broja funkcionalnih transportera ili kombinacijom oba mehanizma. U odsustvu insulina, glukozni transporteri ostaju unutar ćelije što dovodi do sprečavanja ulaska glukoze u ćeliju. Insulinska rezistencija u masnom tkivu povezana je sa smanjenjem broja i aktivnošću GLUT4 transportera. (Abel ED et al. 2001).

Gojaznost je povezana sa smanjenom fizičkom aktivnošću, visokim unosom kalorija i određenim navikama u ishrani. Postoje različiti tipovi gojaznosti ginoidni ili ženski tip kod koga se masno tkivo nagomilava potkožno i to uglavnom u predelu butina, karličnom pojasu, na bedrima i u predelu zadnjice, dok se abdominalni, visceralni ili muški tip gojaznosti karakteriše nagomilavanjem masnog tkiva u predelu gornjeg dela trbuha,

ramenog pojasa kao i oko unutrašnjih organa. Raspodela telesne masti tj. obim struka, a ne njena količina, predstavlja značajan parametar za procenu gojaznosti i rizika od KVB i dijabetesa tip 2 (Ruderman i sar. 1998). S toga, distribucija masnog tkiva ima važnu ulogu u patogenezi MetS. Tako je poznato da abdominalno masno tkivo nije samo pasivni depo za skladištenje triglicerida (TG) već sintetiše i luči brojne biološki aktivne molekule, citokine i adipokine (TNF- $\alpha$ , leptin, adiponektin, rezistin) koji igraju važnu ulogu u metabolizmu (Despres 1994, Hsieg i Yoshinaga 1995, Chobanian i sar. 2003, Perk i sar. 2012). Osobe sa MetS su u hroničnom stanju tihe inflamacije, koja se karakteriše poremećenim nivoom pro-i anti-inflamatornih citokina (npr. tumor nekrosis faktor-TNF- $\alpha$ , interleukin-6 (IL-6), IL-18, IL-10), C-reaktivnog proteina i adipokina).

Povišeni krvni pritisak predstavlja glavni faktor rizika za nastanak KVB i smrtnost. Progresivno povećanje krvnog pritiska, tokom vremena u direktnoj je korelaciji sa vaskularnim starenjem, odnosno endotelnom disfunkcijom, arterijskim zadebljanjima i inflamacijom (Sun Z 2015). Prema definiciji Međunarodnog udruženja za hipertenziju SZO (1999), pod povišenim krvnim pritiskom smatra se sistolni krvni pritisak  $\geq 140$  mmHg, i dijastolni krvni pritisak  $\geq 90$  mmHg (2003, Perk i sar. 2012). U poslednje vreme, u skladu sa prevencijom razvoja hipertenzije uvedena je i klasa "prehipertenzija". Tu spadaju vrednosti normalnog i visoko normalnog pritiska (od 120 do 139 mmHg za sistolni i / ili od 80 do 89 mmHg za dijastolni), a namenjene su za identifikaciju pojedinaca kod kojih bi rane intervencije, u smislu promene načina života, uticale na regulisanje ili smanjenje napredovanja povišenih vrednosti krvnog pritiska. Većina osoba sa MetS ima prehipertenziju ili hipertenziju (Chobanian i sar. 2003).

Prateća pojava gojaznosti je hiperlipoproteinemija, koja je prisutna kod preko 30% gojaznih osoba (Despres 1994). Slično, kao posledica gojaznosti, kod osoba sa MetS, primećene su promene u metabolizmu lipida tj. povećan nivo TG i LDL-holesterola i snižen nivo HDL-holesterola.

Holesterol (HOL) se u plazmi nalazi u obliku lipoproteina (LP)-stabilnih koloidnih kompleksa koji se sastoje od hidrofobnog jezgra TG i estara holesterola, okruženih omotačem koji čine fosfolipidi (FL), slobodni holesterol i apolipoproteini (APO). U lipoproteinske čestice spadaju - hilomikroni, lipoproteini vrlo male gustine (VLDL), lipoproteini male gustine (LDL), lipoproteini velike gustine (HDL), kao i lipoproteini vrlo velike gustine (VHDL). Najveći deo lipoproteina čini LDL frakcija (50-60%), HDL



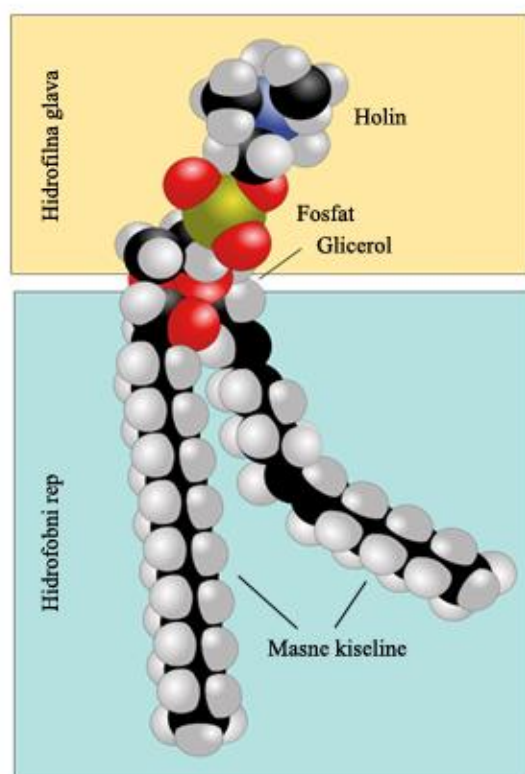
čestice čine 20-40%, a VLDL čestice svega 5-10%. Najveći deo triglicerida u plazmi prenose VLDL čestice i hilomikroni, a većinu holesterola LDL čestice. Pored navedene četiri vrste LP, u plazmi su normalno prisutni još lipoprotein Lp (a) čiji proteinski deo ima srtukturnu i antigensku sličnost sa plazminogenom (veza procesa ateroskleroze sa fibrinolizom) i kratkotrajno, i u minimalnim koločinama, intermedijarni lipoprotein (IDL) (Van Meer 1989). Trigliceridi čine najveći deo lipida hrane. Pod dejstvom pankreasne lipaze u crevima se najveći deo (95%) razlaže na mono-gliceride, glicerol i masne kiseline (MK), apsorbuje i resintetiše u enterocitima (ER) u TG gde zajedno sa apolipoproteinima, HOL i FL grade hilomikrone. Hilomikroni limfotokom, preko *ductus thoracicus*, dospevaju u vensku cirkulaciju. U cirkulaciji kao i na unutrašnjoj strani lumena kapilara ekstrahepatičnog tkiva (mišićnog, masnog i mlečnih žlezda) vrši se katabolizam ovih čestica pod dejstvom enzima lipoproteinske lipaze, koja se nalazi vezana za specifične receptore na membrani endotelijalnih ćelija. Pri tome se trigliceridi hidrolizuju do monoacilglicerida i MK, a FL do lizofosfolipida i MK (Faver 1989, Van Meer 1989, Dixon 1991, Kent 1995)

## 1.2. Fosfolipidi

Fosfolipidi su složeni lipidi koji potpunom hidrolizom daju masne kiseline, alkohol, fosforu kiselinu i azotnu bazu. U zavisnosti od vrste alkohola koji sadrže, dele se na dve grupe: sfingolipide, koji sadrže sfingozin i glicerofosfolipide, koji sadrže glicerol. Uloga FL u biološkim sistemima je višestruka. Oni su strukturni delovi bioloških membrana, funkcionišu kao signalni molekuli, a predstavljaju i izvore energije.

Fosfolipidi su amfipatični molekuli čiji je hidrofobni rep sastavljen od alifatičnih lanaca MK, a hidrofилnu glavu čini fosforilisani alkohol (slika 2). Amfipatična priroda fosfilipidnih molekula osnov je njihove biološke funkcije u ćelijskim membranama. Biološka membrana je tanka, polupropustljiva i visoko selektivna barijera, koja štiti integritet ćelije i održava ćelijsku homeostazu. To je dinamična struktura u kojoj FL mogu karakterističnim pokretima, kao što su lateralna difuzija, flip-flop i rotacija oko svoje ose, prelaziti iz gel (čvrstog) stanja u sol (tečno) stanje. Održavanje membrane u polučvrstom stanju, kao i normalnog fosfolipidnog statusa od suštinske je važnosti za normalan ćelijski metabolizam i homeostazu. Naime raspored fosfolipidnih klasa u biološkim sistemima je

asimetričan. Tako je spoljašnji sloj sastavljen uglavnom od fosfatidilholina, dok se fosfatidiletanolamin i fosfatidilserin nalaze na unutrašnjoj strani membrane (Dowhan i Bogdanov 2002). Promene u metabolizmu lipida dovode do promena u sastavu bioloških membrana, funkciji i distribuciji proteina, genskoj ekspresiji i ćelijskoj funkciji, koje dalje vode razvoju različitih patoloških stanja. Neka od njih su inflamacija, hipertenzija, dijabetes, bolesti jetre, srca, bubrega, neurološki poremećaji, cistična fibroza i kancer.



Slika 2. Struktura fosfolipida (preuzeto sa <http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch05/phospholipid.html>)

Dužina i stepen nezasićenosti MK lanca FL, odgovorni su za fluidnost biološke membrane. Manji indeks nezasićenosti tj. veliki procenat zasićenih masnih kiselina (SFA) smanjuje fluidnost biološke membrane, a samim tim menja njenu funkciju. U održanju fluidnosti membrane važnu ulogu ima i HOL, koji se uveže među lance MK i sa jedne strane onemogućava njihovu kristalizaciju, a sa druge strane sterički ometa velike pokrete MK, smanjujući pri tome fluidnost membrane (Dowhan i Bogdanov 2002).

Poznato je da FL funkcionišu i kao sekundarni glasnici, jer pod dejstvom fosfolipaze A, dolazi do cepanja molekula FL i oslobađanja MK, a njihovom daljom modifikacijom nastaju prostaglandini (PG), tromboksani i leukotrijeni. Ovi molekuli funkcionišu kao sekundarni glasnici i imaju važnu ulogu u regulaciji intracelularnih signalnih puteva, aktivirajući neke ključne enzime kakav je protein kinaza C, a takođe učestvuju u inflamatornim reakcijama i imunom odgovoru (Laposata 1995).

Iako su triacilgliceroli primarni molekuli za čuvanje lipidnih rezervi i obezbeđivanje energije u organizmu, FL takođe služe i kao izvor energije. Naime, potpunom oksidacijom MK, oslobođenih prilikom hidrolize FL, nastaju CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O i oslobađa se energija (Dowhan i Bogdanov 2002).

### **1.3. Masne kiseline**

Važni strukturni elementi svih FL su MK. Iako su MK karboksilne kiseline koje sadrže od 4 do 28 ugljenikovih atoma, u sastav FL ulaze MK od 14 do 24 C atoma. Među njima najzastupljenije su one koje imaju 16 i 18 C atoma (Petrovic i Arsic 2016).

Nomenklatura MK zasniva se na tri osnovne karakteristike MK: dužini ugljovodoničnog niza, stepenu zasićenosti (broj dvostrukih veza) i poziciji dvostruke veze u lancu. Prema stepenu zasićenosti MK delimo na zasićene i nezasićene, a prema broju dvostrukih veza se dele na mono- i polinezasićene MK. Najčešće MK prikazane su u Tabeli 1. Nezasićene masne kiseline se u zavisnosti od broja dvostrukih veza dele na mononezasićene (MUFA) i polinezasićene MK (PUFA). Mononezasićene MK imaju jednu dvostruku vezu, a polinezasićene MK dve ili više dvostrukih veza u lancu MK.

Osim što ulaze u sastav FL, MK su sastavni deo triglicerida i holesterol estara, a u organizmu oko 5% MK egzistiraju i kao slobodne (neesterifikovane), koje se u plazmi transportuju vezane za albumin.

Tabela 1. Najvažnije MK u životinjskim mastima

Trivijalni naziv	Hemijski naziv	Skraćena oznaka
<b>Zasićene MK</b>		
Buterna	Butanska	4:0
Kaprnska	Heksanska	6:0
Kaprilna	Oktanska	8:0
Kaprińska	Dekanska	10:0
Laurinska	Dodekanska	12:0
Miristinska	Tetradekanska	14:0
Palmitinska	Heksadekanska	16:0
Stearinska	Oktadekanska	18:0
Arahinska	Eikozanska	20:0
Behenska	Dokozanska	22:0
Lignocerinska	Tetrakozanska	24:0
<b>Mononezasićene MK</b>		
Palmitoleinska	cis-9-dekaenska	16:1, n-7
Oleinska	cis-9-oktadekaenska	18:1, n-9
Vakcenska	cis-11-oktadekaenska	18:1, n-7
Gadoleinska	cis-9-eikozaenska	20:1, n-7
Eručna	cis-13-dokozaenska	22:1, n-9
Cetoleinska	cis-11-dokozaenska	22:1, n-11
Nervonska	cis-15-tetrakozaenska	24:1, n-9
<b>Polinezasićene MK</b>		
Linolna	cis-9,12-oktadekadienska	18:2, n-6
$\gamma$ -linolenska	cis-6,9,12-oktadekatrienska	18:3, n-6
$\alpha$ -linolenska	cis-9,12,15-oktadekatrienska	18:3, n-3
Dihomo- $\gamma$ -linolenska	cis-8,11,14-eikozatrienska	20:3, n-6
Arahidonska	cis-5,8,11,14-eikozatetraenska	20:4, n-6
Eikozapentaenska	cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenska	20:5, n-3
Dokozapentaenska	cis-7,10,13,16,19-dokozapentaenska	22:5, n-3
Dokozaheksaenska	cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenska	22:6, n-3

Prema geometrijskoj izomeriji nezasićene masne kiseline dele se na *cis* i *trans*. U prirodi, sve dvostruke veze u MK nalaze se u *cis*-konformaciji. Međutim, u različitim procesima proizvodnje hrane, kakvi su na primer proces rafinisanja biljnih ulja ili proces proizvodnje margarina i drugih čvrstih masnoća, dolazi do konverzije *cis* u *trans* konformaciju i formiranja *trans* MK (Nikolaidis and Mougios 2004). Takođe, *trans* MK mogu biti formirane i u digestivnom traktu preživara, kada nastaje konjugovana linolna kiselina (CLA) a mogu ih formirati i bakterije. *Trans* MK imaju negativni efekat na zdravlje jer utiču na metabolizam lipida pri čemu povećavaju nivo LDL-holesterola, a smanjuju nivo HDL-holesterola u plazmi. To vodi povećanom riziku od ateroskleroze i koronarne bolesti srca, zbog čega ih treba izbegavati u ishrani. Za razliku od drugih *trans* MK, CLA nije aterogena (Mensink and Katan 1990).

### 1.3.1. Sinteza masnih kiselina

Masne kiseline se sintetišu u jetri, masnom tkivu, plućima i mozgu. Acetil-CoA prekursor je svih C atoma u MK i nastaje oksidovanom dekarboksilacijom piruvata, razgradnjom aminokiselina i  $\beta$ -oksidacijom MK. Prva faza sinteze MK je sinteza malonil-CoA, a zatim slede faze elongacije, redukcije, dehidratacije i ponovne redukcije. Malonil-CoA nastaje karboksilacijom acetil-CoA u prisustvu acetil-CoA karboksilaze.

Sinteza MK započinje kovalentnim vezivanjem acetil-CoA i malonil-CoA za sulfhidrilnu grupu acil nosećeg proteina (*engl.* Acyl carrier protein-ACP) i nastajanjem acetil ACP i malonil ACP. Ove reakcije katalizuju enzimi acetil transacilaze i malonil transacilaze. Nakon toga, elongacija se nastavlja reakcijom acetil ACP i malonil ACP, koji dejstvom enzima acil-malonil-ACP sintaze daju acetoacetil-ACP ( $\beta$ -ketoacil ACP) pri čemu se oslobađa CO<sub>2</sub>. U narednoj fazi, dejstvom  $\beta$ -ketoacil-ACP reduktaze acetoacetil-ACP se redukuje do D- $\beta$ -hidroskibutiril-ACP, u prisustvu nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata (NADPH) kao reduktanta. Nadalje, procesom dehidracije dejstvom 3-hidroksiacil-ACP dehidrataze D- $\beta$ -hidroskibutiril-ACP pelazi u  $\alpha$ ,  $\beta$ -*trans*-butenoil-ACP (krotonil-ACP). Na kraju, krotonil-ACP se delovanjem enoil-ACP reduktaze redukuje do butiril-ACP. Butiril-ACP reaguje sa malonil-ACP i ciklus se ponavlja. Sinteza MK se dalje nastavlja do palmitoil-ACP (ukupno 7 ciklusa) koji se delovanjem tioesteraza cepa na palmitat i ACP.

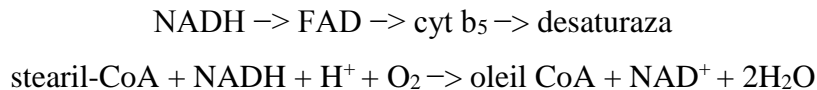
Svi enzimi koji učestvuju u sintezi MK do 16 ugljenikovih atoma, deo su jednog enzimskog sistema koji se naziva sintaza masnih kiselina (*engl.* Fatty acid synthase, FAS). Kod sisara FAS je homodimer, dok je kod bakterija ovaj enzim multienzimski kompleks koji se sastoji od šest različitih enzima i odvojenog ACP. Palmitat je konačni proizvod sinteze masnih kiselina kompleksom FAS, koji koristi NADPH kao reduktant (Petrovic i Arsic 2016).



Masne kiseline se pomoću acetil-CoA sintetišu u citosolu. Međutim, acetil-CoA nastaje u mitohondrijama i nema sposobnost prolaska kroz mitohondrijalnu membranu. Zbog toga, acetil-CoA reaguje sa oksaloacetatom i gradi citrat, koji prolazi kroz unutrašnju i spoljašnju mitohondrijalnu membranu i dospeva u citosol. U citosolu se, delovanjem ATP citratne liaze, citrat razlaže do acetil-CoA i oksaloacetata.

Dalja sinteza MK sa više od 16C atoma odvija se u endoplazmatičnom retikulumu u prisustvu četiri enzima. Nastanak dugolančanih MK otpočinje, isto kao sa FAS, reakcijom malonil-CoA i acil-CoA i formiranjem  $\beta$ -ketoacil-CoA u prisustvu elongaza. Slede reakcije redukcije, dehidracije i ponovljene redukcije što vodi produženju lanca za 2C atoma (Cook i McMaster 2002). Ove reakcije odvijaju se u prisustvu 3-ketoacil-CoA reduktaze, 3-hidroksiacil-CoA dehidrataze i 2, 3-trans-enoil-CoA reduktaze. Produžetak MK lanca kod sisara katalizuje sedam različitih elongaza. Elongaze 1, 3, 6 i 7 su uključene u produžavanje lanaca SFA i MUFA, a elongaze 2, 4 i 5 uključene su u produžavanje lanaca PUFA.

Nezasićene MK se sintetišu uvođenjem dvostruke veze u određenu poziciju na acil lancu dugolančanih MK, u prisustvu enzima acil-CoA desaturaze. Ove desaturaze prisutne su u membranama endoplazmatičnog retikuluma i koriste acil-CoA kao supstrat i citohrom  $b_5$  kao donor elektrona. Postoje dve familije desaturaza: stearil-CoA desaturaza ( $\Delta 9$ ) i MK desaturaza u koje spadaju  $\Delta 6$  i  $\Delta 5$  desaturaze. Sinteza MUFA iz SFA dešava se u prisustvu  $\Delta 9$  desaturaze, kada iz palmitoil-CoA nastaje palmitoleil-CoA, a iz stearil-CoA nastaje oleil-CoA tj. palmitoleinska (PLA 16:1n-7) i oleinska kiselina (18:1n-9) (Petrovic i Arsic 2016).



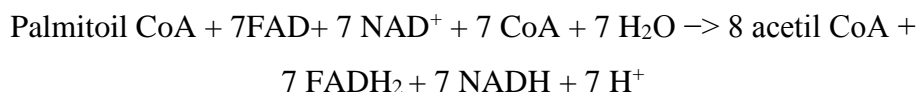
Sinteza PUFA katalizovana je  $\Delta 6$  i  $\Delta 5$  desaturazom i počinje uvođenjem dvogube veze na poziciju  $\Delta 6$  u molekul linolne (LA C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske kiseline (ALA C18:3n-3). Nakon toga sledi reakcija elongacije, a onda  $\Delta 5$  desaturaza uvodi drugu dvostruku vezu na poziciji  $\Delta 5$  u lancu od 20C atoma kada nastaju arahidonska (AA 20:4n-6) i eikozanopentaenska kiselina (EPA) (Benatti i sar. 2004). Sinteza dokozaheksaenske kiseline (DHA 22:6n-3) odvija se iz EPA kroz dve uzastopne elongacije, jednu desaturaciju, i završava  $\beta$ -oksidacijom 24:6n-3 do DHA u peroksizomima.

Za razliku od biljaka, sisari nemaju  $\Delta 12$  i  $\Delta 15$  desaturaze, koje uvode dvostruku vezu na C9 u MK lancu. S'toga ne mogu da sintetišu LA i ALA *de novo* i zato su ove MK za njih esencijalne i moraju da se unose hranom (Hastings i sar. 2001).

### 1.3.2. Razgradnja masnih kiselina

Katabolizam MK odvija se u mitohondrijama u procesu  $\beta$ -oksidacije, pri čemu se oslobađa energija. Da bi process  $\beta$ -oksidacije MK mogao da počne, MK koje su hemijski relativno inertne, najpre moraju biti aktivirane. Proces aktivacije MK dešava se u citosolu, u prisustvu tiokinaze, pri čemu najpre nastaje acil-adenilat anhidrid a zatim acil-CoA. Tako nastao acil-CoA transportuje se u mitohondrijalni matriks, pomoću specifičnog proteinskog nosača (karnitin palmitoil transferaza 1, CPT-I), koji transportuje acil-karnitin u mitohondriju, a slobodan karnitin u citoplazmu (Kerner i Hoppel 2000). U matriksu, acil-karnitin reaguje sa CoA u prisustvu karnitin aciltransferaze II pri čemu nastaje acil-CoA i oslobađa se karnitin. Proces  $\beta$ -oksidacije, u mitohondrijalnom matriksu, počinje oksidacijom acil-CoA do *trans*- $\Delta^2$ -enoil-CoA u prisustvu acil-CoA dehidrogenaze. Druga faza je hidratacija *trans*-dvostruke veze koju katalizuje enzim enoil-CoA hidrataza i nastajanje L-3-hidroksi acil CoA. Treći korak predstavlja dehidrogenizaciju  $\beta$ -hidroksi acil-CoA do  $\beta$ -keto acil-CoA pomoću L-3-hidroksi acil-CoA dehidrogenaze pri čemu nastaje i molekul NADH. Poslednja faza je reakcija tiolize gde dolazi do cepanja  $C_\alpha$ - $C_\beta$ - veze pomoću tiolne grupe drugog molekula CoA, u prisustvu  $\beta$ -ketotiolaze i nastajanje acetil-CoA i acil-CoA koji je kraći za 2C atoma. Acil-CoA zatim

ulazi u “krug” procesa  $\beta$ -oksidacije. U poslednjem koraku ovog ciklusa MK sa parnim brojem C atoma cepa se na dva molekula acetil CoA. Potpuna oksidacija palmitoil CoA zahteva sedam ponovljenih ciklusa:



Za oksidaciju nezasićenih MK nepohodni su dodatni enzimi, izomeraze i reduktaze, a za oksidaciju polinezasićenih MK neophodne su reduktaze. Masne kiseline procesom  $\beta$ -oksidacije u svakom ciklusu daju jedan molekul acetil-CoA. Acetil-CoA zatim ulazi u Krebsov ciklus. Ciklus limunske kiseline je poslednja faza u kojoj acetil-CoA, nastao iz ugljenih hidrata, masti i proteina oksidacijom prelazi u  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  i na taj način oslobađa energiju. NADH i  $\text{FADH}_2$  koji nastaju procesu  $\beta$ -oksidacije i u Krebsovom ciklusu koriste se kao elektron transportski lanac za proizvodnju adenozin trifosfata (ATP) (MacFarlane i sar. 2008).

$\beta$ -oksidacija se odvija i u peroksizomima gde ima glavnu ulogu u razgradnji dugolančanih MK. Krajnji proizvod oksidacije je oktanoil-CoA. Acil-CoA oksidaze u peroksizomima razlikuju se od onih u mitohondrijama, jer proizvode  $\text{H}_2\text{O}_2$  umesto  $\text{FADH}_2$ . U peroksizomima se ne odvija Krebsov ciklus, pa se iz acetil-CoA ne mogu dobiti  $\text{CO}_2$  i voda. Masne kiseline u peroksizomima ne podležu oksidativnoj fosforilaciji i predstavljaju glavni izvor acetil jedinica neophodnih za sintezu novih MK u procesu elongacije. Uloga ovog sistema je u obezbeđivanju homeostaze esencijalnih polinezasićenih MK u organizmu neophodnih za sintezu membranskih lipida (Lee i sar. 1998).

### **1.3.3. Biološka uloga masnih kiselina**

Zasićene MK se sintetišu u organizmu, ali se unose i hranom. Najvažniji izvor zasićenih MK je hrana životinjskog porekla. Zasićene masne kiseline imaju različit efekat na zdravlje ljudi. Tako npr. buterna kiselina (C4:0) ima ulogu u prevenciji kancerogenih oboljenja, dok kaprilna (C8:0), kaprinska (C10:0), i laurinska (C12:0) kiselina imaju antiviralnu i antibakterijsku aktivnost. Dodatno, smatra se da laurinska kiselina deluje i



protektivno na razvoj karijesa. Sa druge strane, miristinska (C14:0) i palmitinska (C16:0) kiselina, su poznate po svom trombogenom i aterogenom efektu, dok stearinska kiselina (SA C18:0) nema takav efekat. Šta više, pokazano je da SA kiselina deluje protektivno na razvoj ateroskleroze kao i da ima i antikancerogenu aktivnost jer indukuje apoptozu u ćelijama tumora dojke (Kelly i sar. 2001, Evans i sar. 2009).

Najzastupljenija MUFA u ishrani je oleinska kiselina (C18:1 n-9), koja se uglavnom nalazi u maslinovom ulju. Oleinska kiselina egzistira i kao sastavni deo membranskih FL. Ona povećava fluidnost biloške membrane i transport molekula kroz istu, reguliše aktivnost membranskih receptora, učestvuje u transdukciji signala i transkripciji nekih gena (Stump i sar. 2001). Osim toga pokazano je da dovodi do smanjenja koncentracije ukupnog HOL, LDL holesterola i koncentracije TG u plazmi, a ima i protektivan efekat na koronarne bolesti srca. Visok sadržaj oleinske kiseline u ishrani, koji je karakterističan za mediteransku dijetu, smanjuje rizik od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Iako je PLA (C16:1 n-7) manje prisutna u svakodnevnoj ishrani, značajna je, jer pospešuje proces lipogeneze, odnosno nagomilavanja masti u masnom tkivu. Linolna i  $\alpha$ -linolenska su esencijalne MK i moraju se unositi hranom (Haug i sar. 2007). Lionolna kiselina, koja je najzastupljenija u suncokretvom i sojinom ulju, prekursor je dugolančanih PUFA n-6 familije, dok je ALA, koja se u velikoj koncentraciji nalazi u lanenom semenu, prekursor n-3 familije PUFA. Dugolančane PUFA, one sa 20 i više C atoma, sintetišu se u organizmu ali se takođe i unose hranom, i to uglavnom hranom životinjskog porekla. Arahidonska kiselina, se nalazi u mesu, piletini i jajima, dok su glavni izvori n-3 PUFA, eikozapentaenske i dokozaheksaenske kiseline u ribi i ribljem ulju (Calder 2003). Iz arahidonske kiseline sintetišu se proinflamatorni eikozanoidi, prostaglandini E2 i leukotrijeni B4. Suprotno tome, EPA je prekursor antiinflamatornih eikozanoida kao što su prostaglandin E3 i leukotrijen B5, koji slabe efekat proinflamatornih eikozanoida i na taj način štite organizam od zapaljenskih bolesti (lupus, artritis i astma). DHA u skladu sa svojim stimulativnim efektom na neuro- i sinaptogenezu ključna je MK za optimalnu funkciju nervnog sistema. Osim toga, n-3 PUFA imaju hipolipemijski, hipotenzivni, antitrombogeni i antiagregativni efekat.

Sastav masnih kiselina FL seruma, plazme i eritrocita predstavlja biološki marker dijetarnog unosa MK (Zock i sar. 1997, Nikolić i sar. 2008). Literaturni podaci govore da osobe sa MetS imaju izmenjen masnokiselinski profil FL u serumu i plazmi, a on

odslikava unos MK u prethodne četiri nedelje (Ristić-Medić i Vučić 2013). Ipak, korelacija između dijetarnog unosa i sastava određenih MK u FL seruma varira (Kobayashi i sar. 2001). Najbolji kandidati za biomarkere dijetetskog unosa su esencijalne masne kiseline, LA i ALA, *trans* MK, MK sa neparnim brojem C atoma, račvaste MK, jer brzo pokazuju promene u kvalitetu dijetarnih masti (Hodge i sar. 2007, Thiebaut i sar. 2009). Međutim, mnoge studije su pokazale da ne postoji direktna veza između unosa i nivoa ALA u fosfolipidima seruma, što je verovatno posledica ugrađivanja ALA u druga tkiva. Opšti metabolizam masnih kiselina u različitim organima i tkivima, odražava se u MK sastavu fosfolipida ER. Eritrociti se zbog toga najpogodniji za proučavanje sastava ćelijske membrane, dostupniji su za istraživanja od drugih ćelija i pokazuju dijetarni unos u prethodnih 120 dana (Arab 2003).

Pored promena u profilu MK, naučni podaci potvrđuju smanjenu antioksidativnu zaštitu kod osoba sa MetS, zbog niske koncentracije egzogenih antioksidanata i/ili smanjene aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (Armutcu i sar. 2008). Ovakve promene direktno vode pojavi oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Šta više, neki autori sugerisu da oksidativni stres može biti rani događaj u patologiji MetS a ne samo njegoja posledica (Roberts i Sindhu 2009). Gojaznost, kao jedan od ključnih pojava kod MetS, obično je povezana sa oksidativnim stresom. S obzirom na to da infiltracija makrofaga u masno tkivo dovodi do prekomerne proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (*engl.* Reactive oxygen species-ROS), postoji direktna korelacija između oksidativnog stresa i gojaznosti (Frassetto i Sebastian 2012).

#### **1.4. Oksidativni stres**

Oksidativni stres se definiše kao stanje poremećene ravnoteže između prooksidanata sa jedne i antioksidanata sa druge strane i povezan je sa patogenezom različitih stanja uključujući aterosklerozu, dijabetes (Birben i sar. 2012). Višak reaktivnih vrsta kiseonika i reaktivnih vrsta azota (*engl.* Reactive nitrogen species-RNS) reaguje sa biomolekulima, kakvi su DNK, proteini i lipidi, i dovodi do promena u njihovoj strukturi i funkciji (Halliwell 1989, Diplock i sar. 1998, Griffith i sar. 2002).

Reaktivne vrste kiseonika i RNS su proizvod normalnog metabolizma ćelije.

ROS su nestabilne i mogu da se podele u dve grupe: slobodni radikali i neradikalske vrste (Tabela 2.). Slobodni radikali su molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini veoma reaktivnim u interakciji sa drugim molekulima. Tri glavne vrste ROS koje imaju fiziološki značaj su superoksid anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\bullet}$ ) i vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) (Birben i sar. 2012).

Tabela 2. Radikalske i neradikalske reaktivne vrste kiseonika

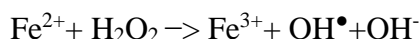
$O_2^{\bullet-}$	superoksid anjon radikal	$^1O_2$	singlet kiseonik
$OH^{\bullet}$	Hidroksil	$H_2O_2$	vodonik peroksid
$HO_2^{\bullet}$	Hidroperoksil	$HOCl$	hipohlorna kiselina
$RO^{\bullet}$	Alkoksil	$ROOH$	organski peroksidi
$RO_2^{\bullet}$	Peroksil	$O_3$	Ozon

**Superoksid anjon radikal** ( $O_2^{\bullet-}$ ) se formira dodavanjem jednog elektrona molekulskom kiseoniku (Miler i sar. 1990). Redukcija molekula kiseonika je proces koji se odvija u mitohondrijama u prisustvu NADH-dehidrogenaze i ubihinon-Q-citohrom b kompleksa. U normalnim fiziološkim procesima molekulski kiseonik se u mitohondrijama, preko elektron transportnog sistema, redukuje u vodu, ali se dešava da 1-3% svih elektrona odlaze iz sistema i prebace se na kiseonik stvarajući tako superokside. Super oksid anjon radikal, nastao u mitohondrijama se spontano ili u prisustvu enzima mangan superoksid dismutase (MnSOD) prevodi u manje aktivan  $H_2O_2$  i  $O_2$ , tako da uglavnom nema toksične efekte.

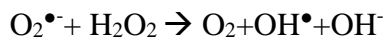


**Vodonik peroksid** nastao iz superoksid anjon radikala, u prisustvu superoksid dismutase (SOD), lako prolazi kroz plazma membranu. Peroksizomi predstavljaju glavno mesto nastanka  $H_2O_2$ . U njima, u prisustvu brojnih oksidaza, dolazi do redukcije kiseonika sa 2

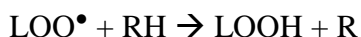
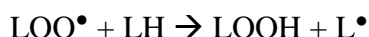
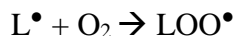
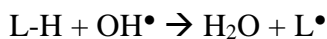
elektrona i stvaranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Iako je veoma toksičan, njegov štetni efekat, sprečava se delovanjem enzima katalaze (CAT), koji ga prevodi u vodu i kiseonik. Izuzetno, kada dođe do oštećenja peroksizoma, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prelazi u citosol gde uzrokuje oksidativni stres. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovodi do oksidacije proteina, a učestvuje i u inicijaciji procesa lipidne peroksidacije. Osim toga, u nizu reakcija Haber-Veisove i Fentonove, vodonik-peroksid u prisustvu gvožđa ili bakra dovodi do stvaranja **hidroksil radikala** (OH•).



Hidroksil radikal nastaje i u reakciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>. Hidroksil radikal je najreaktivnija ROS i može da ošteti proteine, lipide, ugljene hidrate i DNK i može da pokrene reakciju

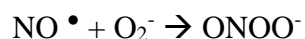


Ostali slobodni radikali kiseonika su **peroksil radikali** (ROO•) iz koga može da nastane **hidroperoksil radikal** (HOO•), koji ima važnu ulogu u peroksidaciji MK. Slobodni radikali pokreću lančanu reakciju lipidne peroksidacije tako što uzimaju atom vodonika iz metilenske grupe sa bočnog ugljovodoničnog lanca. Nastali radikal lipida zatim reaguje sa kiseonikom i daje peroksil radikal (LOO•). Peroksil radikal pokreće reakciju i prevodi PUFA u lipidni hidroperoksid (LOOH). Lipidni hidroperoksid je veoma nestabilan i lako se razlaže do aldehida (npr. 4-hidroksi-2,3-nonenal) i malonaldehida (MDA). Druga grupa produkata lipidne peroksidacije su izoprostani koji nastaju peroksidacijom arahidonske kiseline. Peroksidacija lipida narušava celovitost ćelijske membrane i dovodi do prestrukturiranja ćelijske membrane (Montuschi i sar. 1999, Wood i sar. 2000).



**Reaktivne vrste azota** se proizvode u stanju koje se još naziva i nitrozativni stres (Ridnour i sar. 2004). U grupu radikalskih RNS spadaju azot monoksid i azot dioksid, dok u grupu neradikalskih vrsta spadaju azotasta kiselina, nitrozo katjon, nitroksidni

anjon, peroksinitriti, azot-(IV) oksid, azot-(III) oksid itd. (Leeuwenburgh i Heinecke 2001). Super-oksid anjon i azot-monoksid, koje stvaraju ćelije imunog sistema, mogu međusobno da reaguju prilikom inflamatornog odgovora. Tada nastaje peroksinitritini anjon (ONOO<sup>-</sup>), koji dovodi do oksidativnog oštećenja, lipidne peroksidacije i fragmentacije DNK (Carr i Frei 1999).



#### 1.4.1. Sistem antioksidativne zaštite

Organizam održava oksido-redukциони balans i štiti sebe od toksičnosti na različite načine (Đorđević 2004). Antioksidativni sistem predstavlja jedan od načina neutralizacije reaktivnih vrsta koje nastaju kao deo normalnih metaboličkih procesa. Antioksidansi su molekuli koji sprečavaju ili smanjuju nivo oksidativnih oštećenja biomolekula (Halliwell 1990). Jedinjenja koja imaju osobine antioksidanasa mogu se podeliti na enzimska i neenzimska endogena jedinjenja, a osim njih postoje i egzogena antioksidativna jedinjenja koja se unose hranom. Antioksidansi mogu da se nađu u citoplazmi, ćelijskoj membrani i ekstracelularnom prostoru.

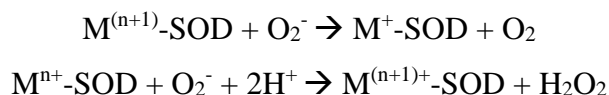
Neenzimske komponente antioksidativnog sistema uključuju molekule niske molekulske mase, kao što su vitamini C i E, β-karoten, mokraćna kiselina i tioli (L-γ-glutamil-L-cisteinil-L-glicin) (Birben i sar. 2012). Vitamin C je molekul koji je rastvorljiv u vodi i koji svoj antioksidativni kapacitet postiže i u unutarćelijskoj i vanćelijskoj sredini tako što neutrališe ROS. Osim toga, on prevodi slobodni radikal vitamina E u vitamin E (Bunker 1992, Mezzetti i sar. 1996). Vitamin E je liposolubilni molekul koji se nagomilava sa unutrašnje strane ćelijske membrane i predstavlja glavnu odbranu membrane od oksidativnih oštećenja. On donira elektron peroksil radikalu, koji se produkuje za vreme lipidne peroksidacije i tako ga neutrališe (White i sar. 1997).

Karotenoidi su pigmenti koji se nalaze u biljkama, koji takođe imaju antioksidativnu sposobnost (Rice-Evans i sar. 1997). β-karoten direktno reaguje sa peroksil (ROO<sup>•</sup>), hidroksil (•OH) i superoksid (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) radikalima i tako ih inaktivira. β-karoten inhibira oksidativnu aktivaciju TNF-α i IL-6 i proizvodnju TNF-α (Bunaciu i Yen 2015).

### 1.4.2. Antioksidativni enzimi

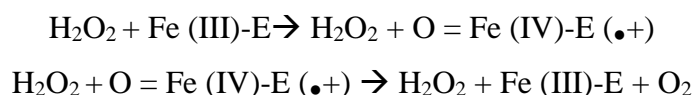
Unutarćelijska koncentracija ROS zavisi od njihove produkcije i/ili njihovog uklanjanja od strane antioksidativnog sistema. Tri najvažnija antioksidativna enzima, neophodna za održavanje redoks ravnoteže, koji se nalaze u svim ćelijama sisara su: superoksid dismutaza, katalaza i supstrat specifična peroksidaza, glutation peroksidaza (GPx) (McCord i sar. 1971).

**Superoksid dismutaza** je antioksidativni enzim koji predstavlja prvu liniju odbrane ćelije od ROS. On katalizuje reakciju dismutacije superoksid anjon radikala u vodonik peroksid i molekularni kiseonik (Pinazo-Duran i sar. 2014):



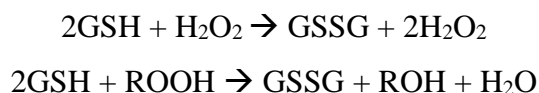
U ljudskom organizmu postoje tri molekulska tipa SOD, koji se razlikuju po prirodi metala i aminokiselinskog sastava u aktivnom mestu, kao i po broju subjedinica i kofaktorima koji su neophodni za njihovu aktivnost. Tako se: CuZn-SOD nalazi u citoplazmi, Mn-SOD u mitohondrijama, a postoji i ekstracelularna SOD (EC-SOD). CnZnSOD je homodimer molekulske mase 32kDa. Bakar i cink su redoks aktivni metali u CuZnSOD, koja čini 90% ukupne aktivnosti SOD u eukariotskim ćelijama (Liu i sar. 2004). Male frakcije ovog enzima nađene su i u lizozomima, peroksizomima i jedru (Okado-Matsumoto i Fridovich 2001). Mitohondrijska Mn-SOD je protein molekulske mase od 96 kDa, koji se sastoji od četiri iste subjedinice gde svaka subjedinica sadrži atom Mn(III). Pronađeno je da aktivnost MnSOD u nekim tipovima kancera opada, dok je sa druge strane kod karcinoma pankreasa pokazano da aktivnost MnSOD raste (Andreadis i sar. 2003, Comhair i sar. 2005). Ekstracelularna SOD je glikozilovani, tetramerni protein molekulske mase 155 kDa koji u svom aktivnom mestu ima bakar i cink koje koristi kao katalitičke kofaktore. Ekstracelularna SOD ima heparin vezujući domen koji ima afinitet za heparin i heparin-sulfat proteoglikane koji su lokalizovani na površini ćelije. Heparin-vezujući domen je važan jer posreduje vezivanju EC-SOD za ćelije (Sandstorm i sar. 1992).

**Katalaza** katalizuje razgradnju vodonik peroksida do vode i kiseonika u ćelijama. Aktivnost katalaze se kod svih sisara većim delom odvija u peroksizomima, ali je ima i u mitohondrijama (Nishikawa i sar. 2002). Po strukturi katalaza je tetramerni protein molekulske mase 240 kDa, koji u svom aktivnom centru ima Fe<sup>3+</sup> vezan za porfirinsku hem grupu enzima:



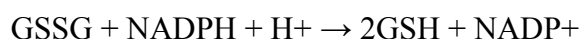
Katalaza neutrališe visoke koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok niske koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neutrališu peroksidaze (Pinazo-Duran i sar. 2014).

**Glutation peroksidaza** je selenoprotein, enzim koji se nalazi u citosolu i mitohondrijama i katalizuje reakciju redukcije vodonik peroksida u vodu i organskih hidroperoksida u alkohol. GPx za svoj rad koristi glutation kao kofaktor, koji predstavlja snažan reduktant u oksido-redukcionim reakcijama neutralizacije peroksida (Mates i sar. 1999).



Oksidovani glutation je glavni rastvorljivi antioksidant, a odnos redukovani glutation/oksidovani glutation (GSH/GSSG) je osnovni pokazatelj oksidativnog stresa. GSH detoksifikuje vodonik peroksid i lipidne perokside delovanjem (GPx). GSH donira elektron i redukuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O i O<sub>2</sub>. Glutation je kofaktor za nekoliko antioksidativnih enzima kao što su GPx i transferaze.

Oksidovani glutation (GSSG) se pod dejstvom glutation reduktaze vraća u redukovanu formu (GSH) i to uz učešće NADPH kao redukujućeg ekvivalenta (Dickinson i Forman 2002).



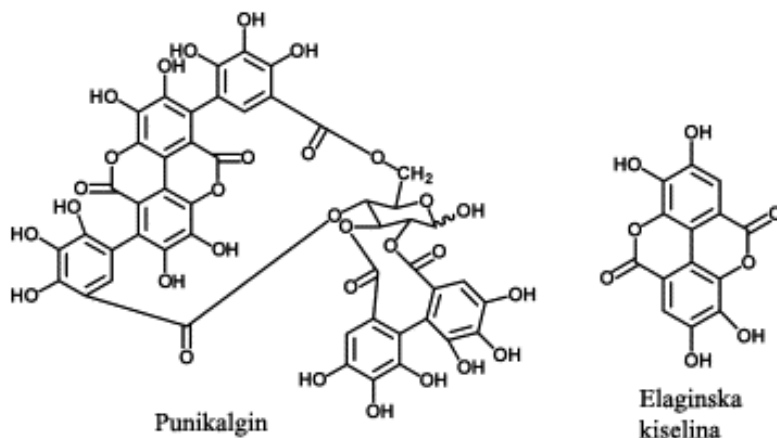
## 1.5. Sok od nara

Mnogobrojne epidemiološke studije potvrdile su da ishrana bogata voćem, povrćem i integralnim žitaricama smanjuje rizik od nastanka KVB (Joshipura i sar. 2001, Dauchet i sar. 2009). Nar (*Punica granatum* L.), za koga se kaže da je rastao u rajskom vrtu, dugo se koristi u narodnoj medicini, posebno u zemljama Istočne i Južne Evrope u kojima se gaji u velikim količinama. Nar se konzumira kako svež, tako i u formi sokova, džemova, vina (Oberlies i Paine 2007, Zarfeshany i sar. 2014). Svež sok sadrži 85% vode, 10% šećera, 1.5% pektina, askorbinsku kiselinu, i polifenolne komponente. Među mnogim raznovrsnim bioaktivnim komponentama u naru, fenolna jedinjenja predstavljaju glavnu komponentu koja ima povoljan uticaj na zdravlje ljudi (Gil i sar. 2000, Kulkarni i sar. 2007). Do sada je proučavan uticaj kako soka, tako i ekstrakata nara na različite hronične bolesti, zahvaljujući čemu je nar okarakterisan kao funkcionalna hrana. Iako postoje istraživanja koja govore o preventivnoj ulozi nara na razvoj gojaznosti, hipertenzije, kardiovaskularnih i drugih oboljenja, EFSA (*engl.* European Food Safety Authority) još uvek nije utvrdila vezu između konzumiranja soka od nara i njegovih efekata na zdravlje (Faria i sar. 2007, Danesi i sar. 2014). Glavni nedostaci u ovom polju su nedovoljno razumevanje mehanizama delovanja aktivnih komponenti nara. Naime postoje uverenja da bioaktivni molekuli direktno interaguju sa slobodnim radikalima, ali da utiču i na aktivnost enzima antioksidativne zaštite, na ekspresiju gena i različite signalne puteve u ćeliji (Sudheesh i Vijayalakshimi 2005, Eberhardt 2006, Faria i sar. 2007). Pored toga, sadržaj polifenola i totalnog antioksidativnog kapaciteta, u voću i soku od nara, razlikuju se među istraživanjima. Te razlike mogu poticati od različitih uslova gajenja, uslovima rasta, i/ili procesovanja ploda itd. (Di Nunzio i sar. 2013).

Najrasporstranjenija klasa jedinjenja u naru su hidrolizabilni tanini, posebno elagitanini i galotanini, koji su prisutni u svim delovima biljke. Bioaktivnost nara je većim delom zasnovana na prisustvu ovih jedinjenja (Gil i sar. 1995, Gil i sar. 2000). Glavni elagitanini su punikalgin i granatin. Punikalgin se sastoji od elaginske i galne kiseline i molekula glukoze. Elaginska kiselina (EA) je prisutna u svim delovima biljke, a u mezokarpu nara ima najviše EA i granatina B. Nakon konzumiranja nara, elagitanini se u crevnom traktu hidrolizuju do EA (Arapitsas i sar. 2007, Bakkalbasi i sar. 2009). Bioraspoloživost EA pokazuje veliki stepen varijacije, koji zavisi od brojnih faktora: slabe rastvorljivosti



slobodne EA u želucu, vrste elagitanina kao prekursora za EA i ograničene apsorpcije EA u crevima (Gonzalez-Sarrias i sar. 2015). (Slika 3)

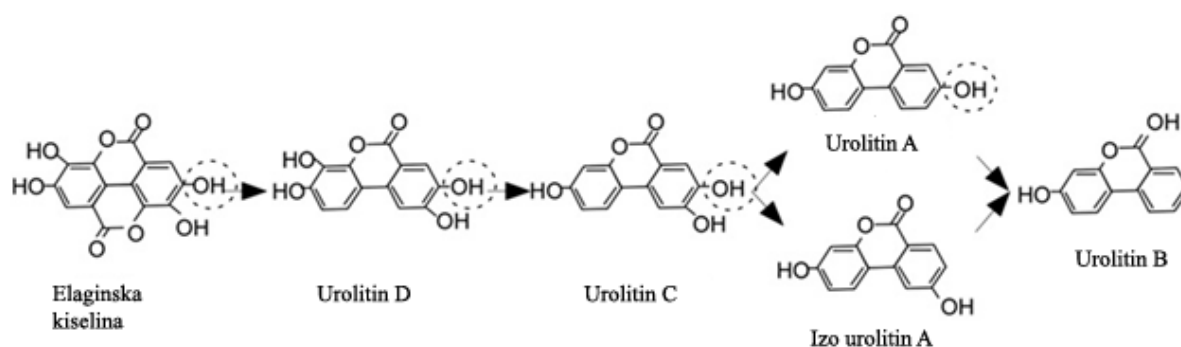


Slika 3. Strukturne formule punikalgina i elaginske kiseline

Elaginska kiselina se pod uticajem crevne flore metaboliše do urolitina (URO). Apсорpcija, bioraspoloživost i farmakokinetika EA još uvek nije dovoljno istražena (Seeram i sar. 2004). Dosadašnja saznanja o bioraspoloživosti EA i elagitanina zasnovana je na studijama sa miševima i pacovima (Boukharta i sar. 1992, Clifford i Scalbert 2000, Lei i sar. 2003). Kao rezultat apсорpcije i metabolizma elagitanina u eksperimentu sa miševima, koji su uzimali nar u koncentraciji od 600 mg/kg težine tela, u urinu je detektovana EA (0.05% doze) (Boukharta i sar. 1992). Međutim, nakon jedne nedelje konzumiranja hrane u kojoj je sadržaj EA bio 1%, ni u krvi ni u tkivima nije detektovana EA (Smart 1986). Kod pacova je nađeno da nakon oralnog konzumiranja EA, 10% doze se eskretuje i detektuje u urinu i fecesu i to kao metaboliti EA (Doyle i Griffiths 1980). Niska koncentracija slobodne EA u plazmi se dovodi u vezu sa tim da je slabo rastvorljiva u vodi i može da bude posledica intenzivne metaboličke transformacije i razgradnje pre apсорpcije (Lei i sar. 2003).

Elaginska kiselina se u crevima metaboliše od strane mikrobiote do URO A (3, 8-dihidroksi-6H-benzo[c] hromen-6-one), izourolitina-A (izoUROA; 3, 9-dihidroksi-6H-dibenzo [b, d] piran-6-one), urolitina B (3-hidroksi-6H-benzo [c] hromen-6-one), urolitina C (3, 8, 9-trihidroksibenzo [c] hromen-6-one), urolitina D (3, 4, 8, 9-tetrahidroksibenzo [c] hromen-6-one) (Cerda i sar. 2003). (Slika 4.) Katabolizam EA do

URO zavisi od sastava mikrobiote pojedinca i u zavisnosti od smeše URO koja se dobije prilikom razgradnje, postoje različiti metabolički fenotipovi (Tomas-Barberan i sar. 2014). Ukoliko je krajnji metabolit URO A, onda govorimo o metaboličkom fenotipu A. Metabolički fenotip B, prisutan je ukoliko su zastupljeni urolitin A, Izo UROA i URO B, dok su oni koji ne proizvode URO označeni kao metabolički fenotip 0 (Tomas-Barberan i sar. 2014). Interesantno je da je metabolički fenotip B prisutan u visokom procentu kod osoba sa hroničnim bolestima kakve su MetS ili kancer (Tomas-Barberan i sar. 2014).



Slika 4. Hemijska struktura urolitina (prilagođeno iz Kang I i sar. 2016)

Pozitivni efekti na zdravlje koji se pripisuju URO su brojni i raznovrsni, od antimalarijskog dejstva do uticaja na ekspresiju nekih gena (Whitley 2006). Nagomilavanje EA i URO u crevima (Whitley 2006) i prostati (Seeram i sar. 2007) može da ima hemopreventivni efekat. Mešavina URO A i URO B može da uspori i ublaži proces ateroskleroze smanjenjem adhezije TPH-1 monocita za endotelijalne ćelije humane umbilikalne vene i sekreciju ćelijskih adhezivnih molekula i proinflamatornih citokina (IL-6) (Mele i sar. 2016). Osim toga, pokazano je da smeša EA i urolitina A i B, u koncentracijama koje se dostižu u lumenu creva nakon obroka, može doprineti prevenciji razvoja kancera jer modulira ekspresiju nekoliko gena (Gonzales-Sarrias i sar. 2009). Molekularni mehanizam ovog antikancerogenog efekta URO dešava se još i indukcijom ciklin-zavisne inibitor kinaze 1A gena, sa uključivanjem specifičnih mikro RNA (Gonzales-Sarrias i sar. 2016).

Poznato je da reaktivne vrste kiseonika igraju značajnu ulogu u karcinogenezi, tako što oštećuju DNK i pospešuju mutagenezu, lipidnu peroksidaciju i utiču na ćelijske signalne puteve (Perse M 2013). Antioksidativni efekat URO je utvrđen *in vitro* gde je pokazano

da ovi molekuli imaju hemijsku sposobnost da hvataju slobodne radikale (Ishimoto i Hatano 2012). Elaginska kiselina je prirodni antioksidant širokog spektra dejstva. Primarni mehanizam antioksidativnog delovanja EA je u sposobnosti “hvatanja” slobodnih radikala, RNS i ROS, uključujući hidroski-radikale, peroksil-radikale, NO<sub>2</sub> radikale i peroksinitrite. Drugi zaštitni mehanizmi EA uključuju i zaštitu DNK od mutacija, direktnim vezivanjem EA za DNK, inhibiciju produkcije ROS i heliranje metalnih jona, kao što je npr. bakarni jon (Priyadarsini i sar. 2002, Gerhauser i sar. 2003). U naru su, osim elagitanina, u velikoj meri zastupljeni i antocijani. Međutim antocijani nisu bioraspoloživi, odnosno nakon konzumiranja soka od nara ovi molekuli se ne detektuju u serumu ili urinu. Crvena boja nara upravo potiče od visokog sadržaja antocijana (Gil i sar. 1995, Alighourchi i sar. 2008, Boročov i sar. 2011).

Nar sadrži i niske koncentracije isparljivih jedinjenja kao što su monoterpeni, aledhidi, estri i alkoholi (Vazquez-Araujo i sar. 2010, Melgarejo i sar. 2011). Nekoliko organskih kiselina učestvuju u ukusu i kiselosti soka od nara. Tu spadaju limunska kiselina, malonska kiselina, oksalna kiselina, askorbinska kiselina, galna kiselina, kumarinska kiselina, hlorogena kiselina, kafeinska kiselina i ferulinska kiselina (Amakura i sar. 2000, Poyrazoglu i sar. 2002, Schwartz i sar. 2009, Dafny-Yalin i sar. 2010, Glazer i sar. 2010, Fischer i sar. 2011). Masne kiseline i lignani su zastupljeniji u zrnu nara. Ukupni lipidi čine 6-21.6 %, a u njima ima čak 90% nezasićenih masnih kiselina (Kaufam i Wiesman 2007, Elfalleh i sar. 2011). U semenkama nara prisutna je visoka koncentracija fitostreola kao što su b-sitosterol, kampesterol i stigmasterol (Kaufam i Wiesman 2007).

## **1.6. CACO-2**

Efekat različitih polifenola na biološke sisteme, veoma često se ispituje *u in vitro* modelima. Čelijska linija CACO-2 predstavlja “živeću” liniju heterogenog humanog epitela kolorektalnog adenocarcinoma čelije. CACO-2 čelije se naširoko koriste u *in vitro* esejima kako bi se ispitivala apsorpcija jedinjenja ili leka kroz epitelnu čelijsku barijeru (Hilgers i sar. 1990). Kada CACO-2 čelije rastu na semipermeabilnim filterima, spontano se diferenciraju u kulturu i formiraju konfluentan monosloj, koji po strukturi i funkciji liče na epitel tankog creva. Ove čelije imaju enzimske i transportne sisteme. CACO-2 formiraju monoslojeve od različitih epitelnih čelija koje su povezane jakim vezama, koje

sprečavaju difuziju rastvora. Tako ovaj sistem obezbeđuje selektivnu barijeru za modelovanje strukture transportnih veza i za pasivni i sa “nosačem” posredovani transport. Pored toga CACO-2 ćelije pokazuju mehanizam “apical efflux”-a, koji ima glavnu ulogu u ograničavanju apsorbcije oralno uzetog leka (Lakshmana 2009).

## 2. CILJ

- ispitati efekat svakodnevnog konzumiranja 300 ml soka od nara, kod osoba oba pola sa MetS, tokom dve i šest nedelja, na:
  1. vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska,
  2. antropometrijske, hematološke i biohemijske parametre,
  3. masnokiselinski profil fosfolipida plazme i ER, kao i
  4. parametre oksidativnog stresa (stepen lipidne peroksidacije i aktivnost enzima antioksidativne zaštite) u plazmi i ER
- u *in vitro* uslovima ispitati efekat metabolita EA (urolitini A, B, C i D) na vijabilnost i oksidativni stres ćelija adenokarcinoma kolona (Caco-2 ćelije).
- uporediti vrednosti ispitivanih parametara osoba sa MetS sa istim parametrima uslovno zdravih ispitanika

### **3. MATERIJAL I METODE**

Predmet našeg istraživanja bio je da se utvrdi kako polifenoli iz soka od nara utiču na krvni pritisak, metabolizam lipida i MK i biomarkere oksidativnog statusa u plazmi i ER, kod osoba sa MetS. U skladu sa tim sprovedene su dve interventne studije, u trajanju od dve i šest nedelja, kod ispitanika oba bola kod kojih je potvrđeno prisustvo MetS. Kontrolnu grupu su činili ispitanici koji nisu pili sok od nara.

#### **3.1. Sok od nara i njegova karakterizacija**

U studiji je korišćen komercijalno dostupan sok od nara proizvođača iz Danilovgrada iz Crne Gore koji je za proizvodnju soka koristio plodove divlje i gajene sorte nara. Divlja sorta nara činila je 20%, dok je gajena sorta nara činila 80% soka. Ovaj odnos divljeg i gajenog nara u soku zasnovan je na tradicionalnim receptima iz ovog regiona i kao takav obezbeđuje optimalnu biološku vrednost proizvoda. Sok je dobijen mlevenjem, ceđenjem i pasterizacijom celog ploda nara, bez dodavanja aditiva ili konzervanasa. Za potrebe studija korišćen je sok iz iste serije, dobijen iz homogene sirovine i samim tim ujednačenog hemijskog sastava, a učesnicima u studiji je savetovano da po otvaranju flašu drže u frižideru. U soku je određivana koncentracija lipida, proteina, redukovanih šećera, pepela, kiselost i pH vrednost. Osim toga određivan je i sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, antocijana, EA kao i antiradikalska aktivnost soka.

##### **3.1.1. Određivanje rastvorljive suve materije, ukupne kiselosti, pH vrednosti, proteina, lipida, pepela, ukupnih i redukovanih šećera**

Sastav soka je analiziran AOAC metodama (Association of Official Analytical Chemists 2000), koje uključuju određivanje lipida (metod broj 935.38), proteina (metod broj 950.36), redukovanih šećera (metod broj 975.14) i određivanje sadržaja pepela (metod broj 930.22). Kiselost je merena titracijom u skladu sa AACC metodom (kiselost AACC metod 02-31) (American Association of Cereal Chemists International 2000), a pH je merena pH metrom (Testo AG, Lenzkirh, Nemačka) na sobnoj temperaturi. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna merenja.

### **3.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola**

Ukupni sadržaj fenola u soku određivan je spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu (FC) metodom (Waterman i Mole 1994) sa malim izmenama. U 200  $\mu$ l razblaženog soka dodato je 1 ml FC reagensa (mešavina fosfomolibdata i fosfotungstata) i 500  $\mu$ l destilovane vode. Nakon 6 min dodato je 1.25 ml 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i inkubacija nastavljena u mraku na sobnoj temperaturi još 90 min. Apsorbanca je merena na 760 nm prema slepoj probi (destilovana voda). Na osnovu vrednosti apsorbance serije razblaženja galne kiseline (0-600  $\mu\text{g/ml}$ ) koja je korišćena kao standard, konstruisana je standardna kriva i određena koncentracija ukupnih fenola u soku. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) po 100 ml soka i predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

### **3.1.3. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida**

Ukupni sadržaj flavonoida određivan je kolorimetrijski po metodi Changa i saradnika (Chang i sar. 2002). Ukratko, u 50  $\mu$ l soka od nara dodato je 950  $\mu$ l metanola, 4 ml destilovane vode i 0.3 ml 5%  $\text{NaNO}_2$ , nakon čega je rastvor inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. U reakcionu smešu je zatim dodato 0.3 ml 10%  $\text{AlCl}_3$ , a nakon 6 minuta i 2 ml 1 M  $\text{NaOH}$ . Finalna zapremina od 10 ml postignuta je dodavanjem destilovane vode (oko 2.4 ml). Posle 15 minuta inkubiranja na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca na 415 nm. Slepa proba je sadržala sve komponente kao i reakciona smeša izuzev soka i  $\text{AlCl}_3$  (1 ml metanola + 4 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.3 ml  $\text{NaNO}_2$  + 0.3 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Kvercetin, koncentracije od 6.25 do 100  $\mu\text{g/ml}$  u metanolu, korišćen je kao standard, a ukupan sadržaj flavonoida izražavan je u gramima kvercetina na 100 ml soka i predstavlja srednju vrednost tri uzastopna određivanja.

### **3.1.4. Određivanje ukupnog sadržaja antocijana**

Sadržaj ukupnih antocijana određivan je primenom pH diferencijalne metode (Konić-Ristić i sar. 2011). U 5 ml soka dodato je 95 ml metanola. Nakon 30 minuta stalnog mešanja, rastvor je proceđen kroz filter papir u flask zapremine 100 ml. Pripremljeno je odgovarajuće razblaženje (1:10) hlorovodonične kiseline u 0.1 % metanolu, a aporbanca

je merena na 528 nm. Kao slepa proba korišćen je 0.1% (v/v) rastvor HCl. Sadržaj ukupnih antocijana (g/ml) izražen je u odnosu na ekvivalent cijanidin-3-glukozid hlorida. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna određivanja.

### **3.1.5. Određivanje sadržaja elaginske kiseline**

Sadržaj EA u soku određivan je na HPLC-u (*engl.* High Pressure Liquid Chromatography). Korišćen je Agilent 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) opremljen degaserom, binarnom pumpom, autosemplerom, kolonskim kompartmentom sa Zorbax SB-C18 kolonom (RR, 1.8 $\mu$ m, 2.1 mm X 100mm) i DAD detektorom. U 15 ml soka dodato je 40 ml rastvora metanol/voda/HCl (50:33:17) i ekstrakcija je rađena u ultrasoničnom vodenom kupatilu u trajanju od 20 minuta. Nakon filtracije kroz 0.45  $\mu$ m filter papir u popipropilensku vajlu, ekstrakt koji je dobijen hidrolizovan je 60 minuta na 100°C, a nakon hlađenja injektovan u HPLC sistem. Mobilna faza je bila smeša 2% rastvora mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B), a korišćen je sledeći program: 0-2 min. 1% B, 2-25 min., 2-25 min. 1-12% B, 25-33 min., 12% B, 33-35 min, 12-30% B, 35-36 min., 30-1 % B, 36-40 min, 1 % B. Protok mobilne faze bio je 0.4 ml/min, temperatura kolone 40° C, a injekciona zapremina 10  $\mu$ l. Spektralni podaci svih pikova čuvani su u opsegu 190-450 nm, a na hromatogramu su beleženi na 366 i 378 nm. Podaci su obrađeni ChemStation softveru (Agilent Technologies). Dve talasne dužine su korićene za izračunavanje koncentracije EA 366 nm i 378 nm, a za konstruisanje standardne prave injektovano je po 10  $\mu$ l metanolnih rastvora EA (Roth, Karlsruhe, Germany) koncentracije 0.04, 0.10, 0.20 mg/l.

### **3.1.6. Određivanje antiradikalske aktivnosti**

Antiradikalska aktivnost soka određivana je merenjem sposobnosti soka da neutrališe 2, 2-difenil 1-1 pikrilhidrazil (DPPH) radikal, po metodi *Braca, A. i sar.*, uz male modifikacije (Braca i sar. 2001). Najpre je napravljena serija razblaženja uzoraka u 70 % etanolu. Nakon toga je u 4 ml tih razblaženja dodato 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH u 70% etanolu i ostavljeno u mraku 30 min. Apsorbanca rastvora merena je na 517 nm. Rezultati su izražavani kao vrednost IC<sub>50</sub> (g/l), što predstavlja koncentraciju soka potrebnu da



neutrališe 50% početne koncentracije DPPH u datim eksperimentalnim uslovima. Procenat neutralizacije DPPH radikala je računat po sledećoj formuli:

$$I(\%) = \frac{(A_k - A_a)}{A_k} \times 100$$

u kojoj  $A_k$  predstavlja apsorbancu negativne kontrole (umesto soka je rastvarač), a  $A_a$  apsorbancu analize, odnosno uzorka.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije soka. Koncentracije koje neutrališu 50% DPPH radikala ( $IC_{50}$ ) određene su korišćenjem algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

### **3.2. Dizajn humanih interventnih studija**

U prvom delu ove teze ispitivali smo vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, antropometrijske, hematološke i biohemijske parametre, masnokiselinske profile fosfolipida plazme i ER i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u ER, kod uslovno zdravih (N=41) i osoba sa MetS (N=71).

#### **3.2.1. Protokol dvonedeljne interventne studije**

U prvu studiju bilo je uključeno 24 ispitanika oba pola, regrutovanih u sklopu regularne kliničke prakse u Kliničko bolničkom centru Zemun na Internoj klinici, odeljenju za endokrinologiju, dijabetes i poremećaje metabolizma.

Kriterijumi za uključenje u studiju podrazumevali su ispitanike oba pola starosti od 40 do 60 godina, kod kojih je potvrđen MetS. Metabolički sindrom, po NCEP ATP III (*engl.* National Cholesterol Education Program III, Nacionalni holesterol edukacioni program III) kriterijumima (2002), definisan je prisustvom tri ili više, od ukupno pet faktora rizika za nastanak KVB:

1. Abdominalna gojaznost (obim struka > 102cm kod muškaraca, > 88cm kod žena),
2. Nivo triglicerida u serumu  $\geq 1.7$  mmol/l,
3. Nivo HDL-holesterola u serumu < 1.03mmol/l kod muškaraca, < 1.29mmol/l kod žena,
4. Vrednost sistolnog/dijastolnog krvnog pritiska  $\geq 130/85$ mmHg,
5. Nivo glukoze u serumu na tašte  $\geq 5.6$ mmol/l.

Osim toga, kriterijumi za uključivanje u studiju podrazumevali su i pridržavanje zadatih dijetarnih ograničenja, koja su definisana protokolom studije a koja se odnose na izbegavanje namirnica sa visokim sadržajem polifenola, kao što su koštunjavi plodovi i bobičasto voće, dve nedelje pre početka studije i striktno u toku same studije. Takođe, učesnicima studije je objašnjeno da se njihove uobičajne navike u ishrani ne mogu menjati tokom trajanja studije, jer bi mogle da umanje efekat same intervencije.

Kriterijumi za ne uključivanje u studiju podrazumevali su:

- osobe sa kardiovaskularnim i drugim hroničnim oboljenjima, koji zahtevaju aktivnu farmakoterapiju;
- osobe sa dijagnostifikovanim dijabetesom, koja uključuje terapiju insulinom;
- osobe koje su na hormonskoj supstitucionoj terapiji
- pušače
- osobe koje su uzimale riblje ulje ili druge suplemente koji utiču na metabolizam lipida i MK, ukoliko su uzimani tri meseca pre početka studije.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničko bolničkog centra Zemun i sprovedena je u skladu sa principima Helsinške deklaracije.

Ispitanici koji su prihvatili učešće u studiji bili su nasumice podeljeni u dve grupe, od kojih je prva, interventna grupa svakodnevno konzumirala 300 ml soka od nara uz obrok, tokom 2 nedelje, dok je druga, kontrolna grupa bila bez tretmana.

Pre početka studije nutricionista je obavio razgovor sa svim učesnicima o njihovim navikama u ishrani.

### **3.2.2. Protokol šestonedeljne interventne studije**

Nakon obrađenih rezultata, organizovali smo drugu interventnu studiju u trajanju od šest nedelja, u koju su takođe bili uključeni ispitanici oba pola (N=56) sa MetS. Kriterijumi za uključenje u studiju, kao i sam protokol bili su isti u obe studije. Međutim, 16 ispitanika je odustalo tokom studije, tako da je studiju završilo ukupno 40 ispitanika.

### **3.3. Antropometrijska merenja ispitanika**

Antropometrijski parametri: telesna masa, masa masnog tkiva, masa mišićnog tkiva i ukupan sadržaj vode koji su izraženi u kilogramima bili su mereni metodom analize bioelektrične impedance na apratu Tanita SC331S. Ova metoda zasnovana je na određivanju otpora koji pruža tkivo prilikom prolaska slabe naizmenične struje (800 mikroampera) kroz ljudski organizam. Merenje visine tela izraženo u cm, određivano je stadiometrom (Perspective Enterprises, Kalamazoo, MI) sa preciznošću od 1 mm. Stepen uhranjenosti ispitanika je izražavan kroz indeks telesne mase (BMI), koji predstavlja količnik telesne mase izražene u kilogramima i kvadrata visine u metrima:

$$\text{BMI} = \text{težina (kg)} / (\text{visina (m)})^2$$

Obim struka određivan je u predelu pupka neelastičnom trakom za merenje.

### **3.4. Uzorkovanje krvi i priprema bioloških uzoraka**

Krv je uzorkovana ujutru između 7 h i 9 h, nakon 12-to časovnog gladovanja. Serum je izolovan spontanom koagulacijom na sobnoj temperaturi i centrifugiranjem 10 minuta na 1860 x g obrtaja u Eppendorf 5804 centrifugi. Biohemijske analize u serumu urađene su odmah po odvajanju seruma.

Masnokiselinski profil FL, kao i stepen lipidne peroksidacije (MDA) određivani su u plazmi. Plazma je odvojena centrifugiranjem pune krvi sa etilendiamintrisirćetna kiselina (EDTA) kao antikoagulansom, 10 min na 2880 x g i zamrznuta u porcijama od 0.5 ml na -80°C. Nakon odvajanja plazme, ER su tri puta isprani fiziološkim rastvorom (0.9 % NaCl), podeljeni u manje zapremine i do analize čuvani na -80°C. U ER je određivan

masnokiselinski profil fosfolipida, aktivnost enzima antioksidativne zaštite i stepen lipidne peroksidacije.

### **3.5. Hematološke i biohemijske analize**

Kompletna krvna slika je odrađena automatski na hematološkom analizatoru ABX MICROS 60. Biohemijske analize (TG, ukupni holesterol, HDL-holesterol, LDL-holesterol, glukoza, urea, kreatinin i transaminaze) urađene su na biohemijskom analizatoru Cobas c111, korišćenjem laboratorijskih komercijalnih kitova (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) prema uputstvu proizvođača.

### **3.6. Određivanje profila masnih kiselina u fosfolipidima membrane eritrocita**

#### **3.6.1. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme i eritrocita gasno-tečnom hromatografijom**

Ukupni lipidi plazme i ER ekstrahovani su smešom organskih rastvarača hloroform-metanol 2:1 (v/v). Lipidne klase su razdvojene tankoslojnom hromatografijom (TLC). Masne kiseline fosfolipidne frakcije su esterifikovane, a dobijeni metil estri MK su analizirani gasno-tečnom hromatografijom (GLC).

#### **3.6.2. Ekstrakcija ukupnih lipida iz plazme**

Ekstrakcija lipida plazme vršena je po modifikovanoj metodi izolovanja ukupnih lipida iz animalnih tkiva (Folch i sar. 1957). U 0.5 ml plazme dodato je 4.5 ml smeše organskih rastvarača hloroforma i metanola u odnosu 2:1 (v/v) koji sadrži 50 mg butilhidroksitoluena (BHT) tj. 2, 6-bis (1, 1-dimetiletil)-4-metilfenola kao antioksidans. Uzorci su zatim snažno mešani, na vorteksu, tokom 60 sekundi i ostavljeni 3 sata u frižideru na +4°C. Nakon centrifugiranja u trajanju od 10 minuta na 1860 x g, odbačen je gornji vodeni sloj, a donji organski uparen do suva. Suvi prečišćen ekstrakt rastvoren je u 0.3 ml smeše hloroform-metanol 2:1 (v/v) i korišćen za hromatografsko razdvajanje lipidnih klasa.

### **3.6.3. Ekstrakcija ukupnih lipida iz eritrocita**

Priprema lipidnog ekstrakta iz ER započeta je homogenizacijom 0.5 ml ER u avanu, dodavanjem 3 ml smeše rastvarača hloroform-metanol 2:1 (v/v) koji sadrži 2g/l BHT-a (antioksidans), a nastavljena dodavanjem 3 ml smeše hloroform-metanol 1:2 (v/v) i 3 ml smeše hloroform-metanol 1:1 (v/v). Uzorak je ostavljen preko noći na -20°C, a nakon toga proceden kroz filter papir i uparen do suva. Tako prečišćeni lipidni ekstrakt rastvoren je u 0.3 ml smeše hloroform-metanol 2:1 (v/v) i korišćen za hromatografsko razdvajanje lipidnih klasa.

### **3.6.4. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom**

Razdvajanje lipidnih klasa rađeno je jednodimenzionom tankoslojnom hromatografijom na silika gelu GH600, MERCK, Velika Britanija, debljine 0.5 mm. Ukupni lipidni ekstrakt plazme i ER nanošen je na ploču sa silika gelom. Pre upotrebe, ploča je aktivirana zagrevanjem na 110°C u trajanju od 45 minuta. Kao sistem za razvijanje, korišćena je smeša organskih rastvarača petroletar-dietiletar-sirćetna kiselina (87:12:1, v/v/v). Razdvojene frakcije lipida identifikovane su pod UV lampom (slika 5). Kao najpolarnija lipidna klasa, FL u ovom sistemu rastvarača ostaju na početku.



Slika 5. TLC hromatogram neutralnih lipida

(PL = fosfolipidi, DG = diacilgliceroli, HOL = holesterol,  
TG = triacilgliceroli, HOL-E = estri holesterola)

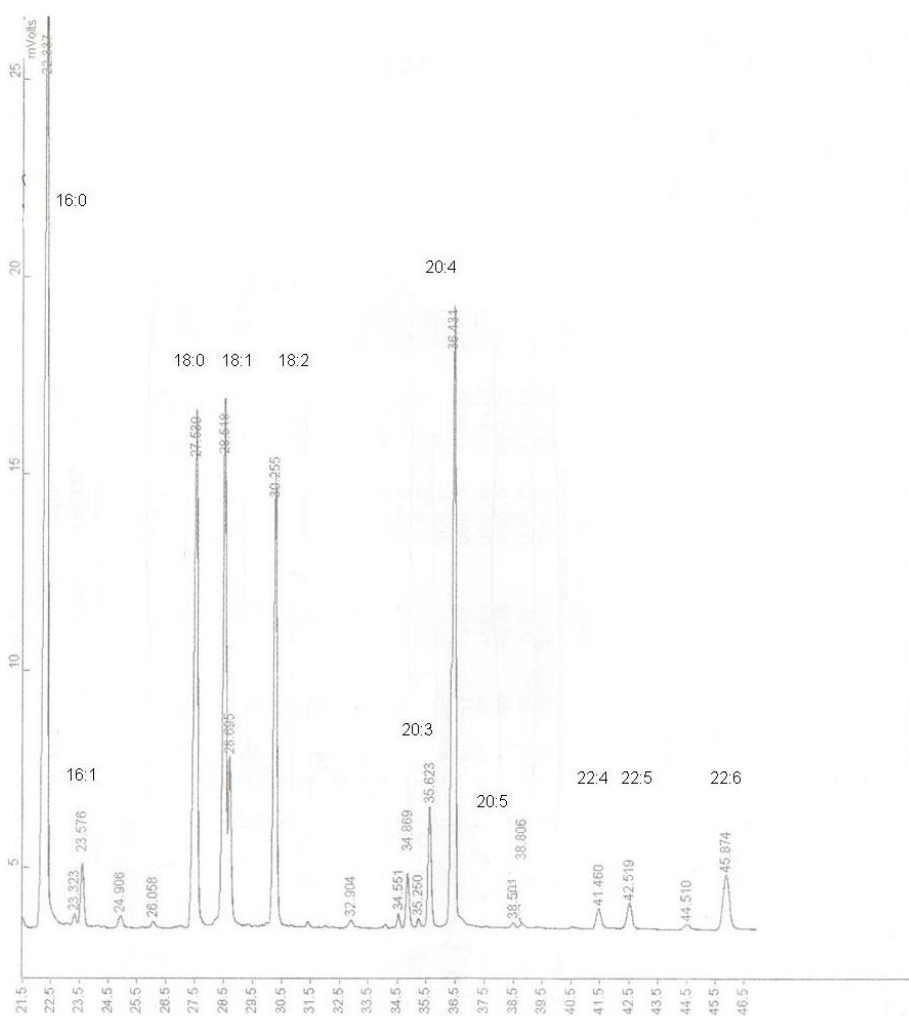
### 3.6.5. Metilacija masnih kiselina

Masne kiseline su direktno esterifikovane po modifikovanoj metodi transesterifikacije (Christopherson i Glass 1969). U epruvete za metilaciju, koje su opremljene teflonskim zatvaračima preneti je fosfolipidna frakcija plazme ili ER i dodato je 1.5 ml heksana. Proces esterifikacije počeo je dodatkom 0.2 ml 2 M NaOH u metanolu i zagrevanjem na 85°C 1sat, a nastavljen dodatkom 0.2 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u metanolu i zagrevanjem 2 sata na 85°C. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, epruvete su centrifugirane na 1860 x g, 15 minuta, a gornji heksanski sloj je uparen do suva u struji azota.

### 3.6.6. Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom

Dobijeni metil estri masnih kiselina analizirani su gasno-tečnom hromatografijom (*engl.* Gas liquid chromatography-GLC) na aparatu SHIMADZU 2014, Kyoto, Japan, koji je bio opremljen kapilarnom kolonom Rtx 2330, RESTEK, USA. Dužina kolone bila je 60 m, prečnik 0.25 mm ID a debljina filma stacionarne faze 0.20 μm. Protok nosećeg gasa

(helijuma) bio je 5 ml/min, protok vazduha 320 ml/min, a vodonika 30 ml/min. Temperatura kolone na startu bila je 140°C i podizana je do 190°C, brzinom od 3°C/minutu, a zatim do 210°C brzinom od 1°C/minutu. Temperatura detektora bila je 240°C, a injektora 220°C. Uzorci pripremljenih metil-estara rastvoreni su neposredno pre injektovanja u 10 µl heksana, od čega je injektovan 1 µl. Masne kiseline, u dobijenim hromatogramima indentifikovane su upoređivanjem sa hromatogramom komercijalnog standarda masnih kiselina PUFA-2 standard (Supelco, Inc., Belleforte, Pa., USA). Rezultati su izraženi u procentima od ukupno razdvojenih masnih kiselina. Primer GLC hromatograma masnih kiselina fosfolipida seruma (Slika 6.).

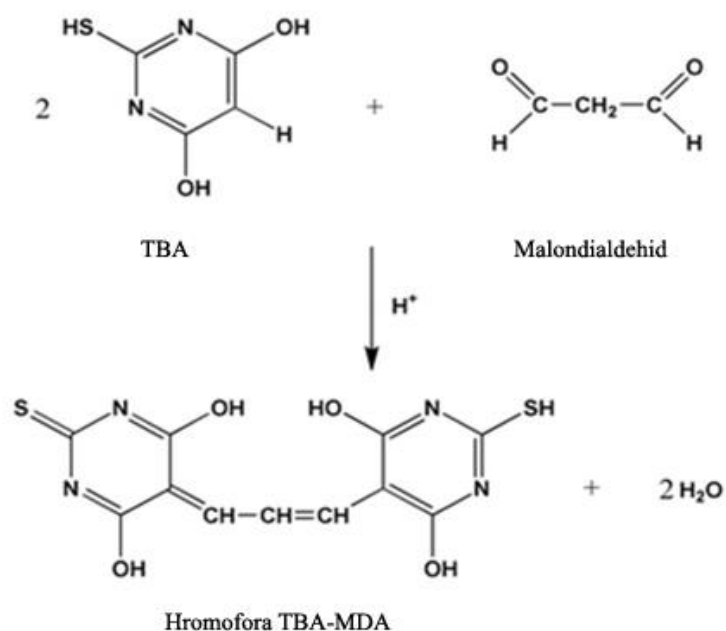


Slika 6. GLC hromatogram masnih kiselina PL seruma.

### 3.7. Analiza parametara oksidativnog stresa

#### 3.7.1. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije u eritrocitima

Nivo lipidne peroksidacije u ER određivali smo koristeći komercijalni kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA). Metoda određivanja MDA zasnovana je na reakciji malondialdehida i ostalih TBARS (*engl.* Tiobarbituric acid reactive substances) sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) na visokoj temperaturi u kiseloj sredini, gde nastaje kompleks čiji je maksimum apsorpcije na 535 nm. Metod je zasnovan na reakciji:

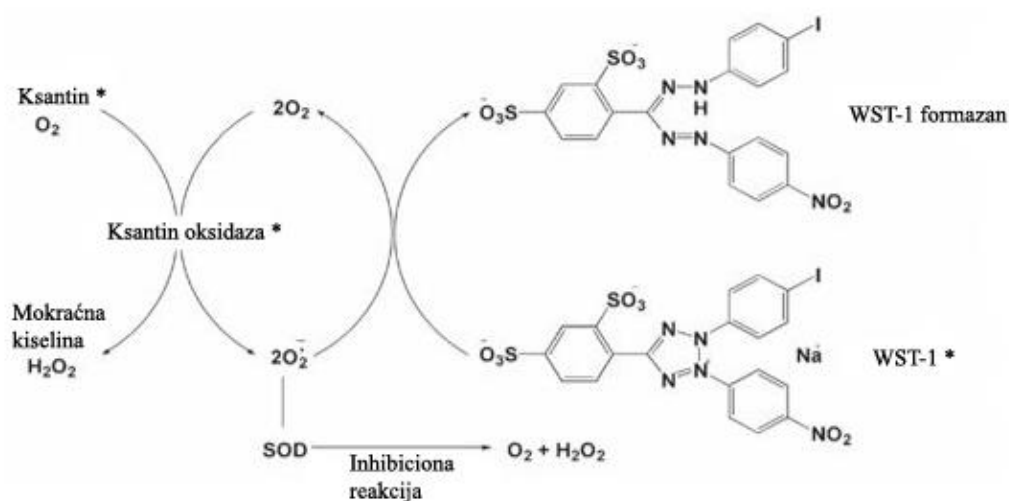


Ukratko, lizat ER napravljen je dodatkom 9900  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O na 100  $\mu\text{l}$  ER. U 100  $\mu\text{l}$  lizata dodato je 100  $\mu\text{l}$  rastvora SDS i 4 ml pomenutog reagensa za bojenje (530 mg tiobarbiturne kiseline je pomešano sa 50 ml rastvora TBA-sirćetne kiseline, zatim je dodato 50 ml rastvora TBA-natrijum hidroksida i mešano sve dok se TBA nije potpuno rastvorio). Smeša je inkubirana na 100°C tokom 60 minuta. Ohlađene epruvete su centrifugirane 10 min. na 1600 x g. Po 150  $\mu\text{l}$  supernatanta prebačeno je u mikrotitarsku ploču sa 96 mesta i određivana je apsorbanca na 540 nm. Rezultati su izraženi u jedinicama po gramu Hb (U/gHb).



### 3.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) u eritrocitima

Aktivnost superoksid-dismutaze u ER je određivana po metodu Goldsteina i saradnika (Goldstein i sar. 1988). Određivanje aktivnosti SOD ovom metodom zasnovana je na merenju stepena inhibicije proizvodnje superoksid-anjona, gde se kao izvor superoksid anjon radikala koristi ksantin. Iz ksantina, u prisustvu ksantin oksidaze, nastaje superoksid anjon radikal koji dalje reaguje sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (INT) pri čemu nastaje crvena formazan boja sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini 505 nm (Slika 7.).



Slika 7. Princip određivanja aktivnosti SOD (preuzeto sa <https://www.dojindo.com/store/p/203-SOD-Assay-Kit-WST.html>)

SOD u uzorku ER katalizuje razlaganje superoksid anjon radikala, pri čemu inhibira reakciju sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum (INT) što za posledicu ima smanjenje koncentracije nastalog formazan proizvoda, odnosno intenzitet nastale boje. Nastanak obojenog jedinjenja praćen je kinetički merenjem apsorpcije na 505 nm, a jedinica aktivnosti SOD je predstavljena kao količina enzima koja uzrokuje inhibiciju ove reakcije za 50 %.

Preciznije, u 5 µl uzorka (lizata eritrocita koji je razblažen 25 puta sa 0.01 M fosfatnim puferom, pH=7) dodato je 170 µl radnog reagensa (0.05 mmol/l ksantina, 0.025 mmol/l INT i 0.94 mmol/l fosfatnog pufera) a nakon 30 s 25 µl ksantin oksidaze (80U/l). Procenat

inhibicije SOD određivan je na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanci očitanih za seriju standardnih rastvora poznate koncentracije SOD (4.84, 2.42, 1.21, 0.60, 0.30 U/ml). Standardi su razblaženi u 0.01 M fosfatnom puferu, pH=7. Aktivnost SOD merena je na 505 nm i izražena u jedinicama po gramu hemoglobina (U/gHb).

$$(100 - A_{\text{uzorka}}) \times 25 / \text{Hg iz lizata ER}$$

### 3.7.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) u eritrocitima

Aktivnost katalaze u ER je određivana po metodi Aebi i saradnika (Aebi i sar. 1984), koja se zasniva na praćenju promene apsorbance na 230 nm spektrofotometrijskom metodom. Katalaza razlaže H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do vode i molekuskog kiseonika, pri čemu je jedna jedinica aktivnosti definisana kao aktivnost enzima potrebna za razgradnju 1 μmol vodonik-peroksida za 60s na 25°C i pH=7. Katalaza je izražena kao U/gHb.

U 50 μl uzorka hemolizata ER (koji je pripremljen tako što je u 50 μL hemolizata (1:1) dodato 50 μl 95% etanola i 5 ml vode i inkubirano 10 minuta na 37°C), dodato je 50 μl 1 M Tris pufera pH=8 i 1 ml 10 mM rastvora vodonik peroksida. Pad apsorbance na spektrofotometru praćen je svakih 30 sekundi, tokom 3 minuta. Aktivnost CAT, koja je izražena po gramu Hb, izračunata je pomoću formule:

$$\text{CAT} = \frac{100 \times R \times \Delta A}{\text{Hb} \times V \times 0.071}$$

gde je:

ΔA - srednja vrednost promene apsorbance u minuti;

R - faktor razblaženja (101);

Hb - količina hemoglobina (u g/100 ml lizata);

V - zapremina uzorka (u ml);

0.071 - milimolarni apsorptivni koeficijent vodonik peroksida.

### 3.7.4. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze u eritrocitima

Aktivnost GPx određivana je u ER po metodi Paglia i Valentine (Paglia i Valentine 1967) (Slika 8). Metoda je zasnovana na aktivnosti GPx koja katalizuje oksidaciju GSH sa kumen hiperoksidom, do GSSH. Redukovana forma glutationa nastaje u prisustvu glutation-reduktaze i NADPH koji se oksiduje do NADP<sup>+</sup>. Ova reakcija redukcije praćena je padom apsorbance na 340 nm. Količina enzima koja oksiduje 1 nM NADPH u minuti, predstavlja jedinicu aktivnosti GSH-Px i izražava se u U/g Hb.



Slika 8. Princip određivanja GPx

U 5  $\mu$ l uzorka (0.05 ml heparizirane krvi u koju je dodato 1 ml destilovane H<sub>2</sub>O, a nakon 5 minuta inkubiranja na sobnoj temperaturi i 1 ml Drapkinovog reagensa) dodato je 220  $\mu$ l radnog reagensa (4 mmol/l glutationa, 0.5 mmol/l glutation reduktaze, 0.034 mmol/l NADPH, 0.05M fosfatnog pufera pH=7.2 i EDTA 4.3 mmol/l) i 10  $\mu$ l kumen hidroksiperoksida koncentracije 0.18 mmol/l. Apsorbanca je merena na 340 nm, a aktivnost enzima je izračunata pomoću formule:

$$GPx = \frac{(\text{Auzorka} - \text{Aslepe probe}) \times 41}{\text{Hemoglobin (g)}} = \frac{U}{gHb}$$

### 3.7.5. Određivanje koncentracije hemoglobina u hemolizatima eritrocita

Aktivnost antioksidativnih enzima u ER izražena je u jedinicama po g Hb. Koncentracija Hb u uzorcima određivana je kolorimetrijskom cijanomethemoglobinskom metodom sa Drabkinovim reagensom (Van Kampen i Zijlstra 1961). Princip metode se zasniva na oksidaciji Hb u prisustvu alkalnog kalijum-fericijanida do methemoglobina, koji u reakciji sa kalijum-cijanidom formira cijanomethemoglobin sa apsorpcionim maksimumom na 540 nm. U 20 µl uzorka ER dodato je 5 ml Drabkin reagensa (sadrži kalijum-fericijanid i kalijum-cijanid), i merena apsorbanca na 540 nm nakon 5 min, koristeći Drabkinov reagens kao slepu probu. Sadržaj Hb u g/l određen je na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta prema sledećoj jednačini:

$$\text{hemoglobin} = A \times \frac{16114 \times 5.02}{11000 \times 0.02}, \text{ odnosno:}$$
$$\text{hemoglobin} = A \times 368$$

gde je: A - apsorbanca, 16114 g/mol - relativna molekulska masa Hb, 11000 l/mol/cm - molarni apsorpcioni koeficijent, 5,02 ml – ukupna zapremina, 0,02 ml – zapremina pakovanih ER.

### 3.8. Čelijska linija CACO-2

U *in vitro* eksperimentima korišćena je kancerska čelijska linija humanog porekla gajena u kulturi: CACO-2 ćelije adenocarcinoma kolona, American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, SAD). Čelije su gajene u komercijalnoj DMEM hranljivoj podlozi (Eaglova hranljiva podloga modifikovana po Dulbecco-u tako da sadrži 4 mM L-glutamina, 4.5 g/l glukoze, 1 mM natrijum-piruvata i 1.5 g/l natrijum-bikarbonata) uz dodatak fetalnog seruma govečeta (10 %) koji je inaktiviran toplotom, streptomicina (100 µg/ml) i penicilina (100IU/ml), na pH=7.2. Čelije su gajene na temperaturi 37°C u atmosferi vazduha sa 5 % ugljen-dioksida. Broj zasejanih ćelija po bunaru u 96-well flasku bio je  $1.5 \times 10^4$  (Nunc, Roskilde, Denmark) i ostavljene da adheriraju 4h nakon čega su bile tretirane sa pojedinačnim ili smešama različitih urolitina (Tabela 4.)

Tabela 3. Tretman urolitinima kojima su tretirane CACO-2 ćelije

Tretman	Sadržaj tretmana	Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )
1	URO-A	od 18.75 $\mu\text{M}$ do 150 $\mu\text{M}$
2	URO-B	od 18.75 $\mu\text{M}$ do 150 $\mu\text{M}$
3	URO-C	od 18.75 $\mu\text{M}$ do 150 $\mu\text{M}$
4	URO-D	od 18.75 $\mu\text{M}$ do 150 $\mu\text{M}$
5	URO-A + URO-B	30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$
6	URO-A + URO-C +URO-D	30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$
7	URO-B + URO-C + URO-D	30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$
8	URO-A + URO-B + URO-C +URO-D	30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$ + 30 $\mu\text{M}$

Sve supstance za tretman su rastvorene u DMSO (dimetil sulfoksid) i filtrirane (0.2  $\mu\text{M}$ ) pre nego što su bile dodate u medijum za kulturu. Kontrolne ćelije su tretirane sa DMSO (0.5%). Ćelije su inkubirane sa svim jedinjenjima maksimalno do 168 sati.

U eksperimentu za trenutnu stimulaciju primenjen je tretman broj 8 (Tabela 5). Flask za ćelijsku kulturu T25 (Nunc, Roskilde, Denmark) zasejan je u gustini od  $1 \times 10^4$  ćelija po  $\text{cm}^2$  i ćelije su rasle

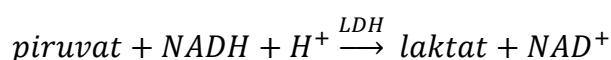
dok nije dostignuto 80% konfluencije. Potom su ćelije tretirane tripsinom (2.5  $\text{g}^{-1}$  tripsina, 0.2  $\text{gL}^{-1}$  EDTA) i vitalnost je merena testom sa Tripan plavim po protokolu koji je opisan u delu 3.9.2. Mešavina urolitina u DMEM je dodavana u ćelije tretirane tripsinom, nakon čega su ćelije inkubirane 2 sata na 37 °C u atmosferi vazduha sa 5% ugljen-dioksida.

### 3.9. Testovi za određivanje citotoksičnosti

Za praćenje citotoksičnosti korišćenih URO, određivali smo aktivnost laktat-dehidrogenaze i vitalnosti ćelija pre trenutne stimulacije (stdev).

#### 3.9.1. Laktat dehidrogenaza test

Laktat dehidrogenaza katalizuje reakciju redukcije piruvata u laktat, pri čemu se NADH oksiduje do NAD.



U 50  $\mu$ l supernatanta ćelijske kulture dodato je 150  $\mu$ l reagensa koji je sadržao NAD 7.5 mM, L-laktat 55 mM, pufer pH=8.95, nereaktivni stabilzator i natrijum-azid (0.1 %) kao prezervativ. Promena apsorbancije je praćena na 339 nm tokom 5 min.

### **3.9.2. Test sa tripan plavim**

Supernatant ćelijske kulture pomešan je sa Tripan plavim u odnosu 1:1 koristeći 0.4 % rastvor Tripan plavog. Nevijabilne ćelije su se bojile plavo, a vijabilne ćelije su ostajale neobojene. Tripan plavo je pre upotrebe filtriran kroz sterilni filter papir.

### **3.10. Određivanje unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta**

Nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta koje su nastale unutar ćelija merenjem oksidacije 2, 7-dihlorfluorescin diacetata (DCFH-DA) (Molecular Probes; Life Sciences, Eugene, OR, USA), po već opisanoj metodi (Cathcart i sar. 1983). CACO-2 ćelije su tretirane mešavinom URO u hranljivom medijumu (tretman 8, Tabela 3.) pri čemu su inkubirane 2 h i to je bio kratkoročni tretman ili 168 sati za dugoročni tretman. Nakon inkubacije sa URO, dodat je 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u fosfatnom puferu i inkubiran 1 sat na 37°C sa 5 % CO<sub>2</sub>. Ćelije su isprane dva puta rastvorom PBS-a, nakon čega je dodat 0.1  $\mu$ M DCFH-DA u PBS-u. Ćelije su inkubirane 30 min u atmosferi vazduha sa 5 % ugljen-dioksida na 37°C u mraku. Nakon inkubacije, ćelije su isprane sa PBS, centrifugirane na 800 x g 10 minuta i ponovo rastvorene u 100  $\mu$ M PBS i analizirane protočnom citometrijom koristeći FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Brzina analiziranja je bila oko 1000 događaja u sekundi. Za pobuđivanje je korišćen laser sa plavim tečnim stanjem 200 mW na talasnoj dužini od 488 nm. Emisija je zabeležena filterom od 525 nm (FL1, DCFH-DA). Pozitivne ćelije su obeležene na FL1-DCFH-DA, SSC plotu. Vrednosti su izražene kao procenat fluorescencije 2,7-dihlorfluorescin (DCFH-DA) u ćelijama tretiranim sa DMEM kao negativna kontrola i 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao pozitivna kontrola.

### **3.11. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u ćelijskom lizatu caco-2 ćelija**

Aktivnost enzima antioksidativne zaštite CACO-2 ćelija određivan je u 100 µl ćelijskog lizata. Aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i GPx određivan je na isti način kao i u ER. Ukratko, Caco-2 ćelije su tretirane tripsinom i centrifugirane na 1500 x g u trajanju od 10 minuta na 4 °C. Centrifugirane ćelije su lizirane sa 50 mM Tris puferom pH=7.5 ohlađenom na ledu, sa 150 nM NaCl, 1% NP-40 (Serva, Heidelberg, Germany), 2 mM EDTA i mešavinom inhibitora proteaza (Sigma Aldrich, Manheim, Germany). Pre merenja enzimske aktivnosti, u lizatima, lizati ćelija su centrifugirani na 10 000 x g 15 minutes, na 4 °C. Koncentracija proteina u supernatantu je određivana metodom po Loriju (Lowry i sar. 1951).

### **3.12. Statistička obrada rezultata**

Rezultati su obrađeni upotrebom statističkog paketa SPSS for Windows (IBM SPSS 22). Parametri od značaja određivani su metodom deskriptivne statistike: mere varijabiliteta (standardna devijacija), merenje centralne tendencije (srednja vrednost), kao i grafičko i tabelarno prikazivanje.

Šapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov test je korišćen za ispitivanje normalne distribucije podataka i prikazani su kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Podaci su u zavisnosti od raspodele analizirani parametrijskim ili neparametrijskim testovima.

Za poređenje dve grupe ispitanika koristili smo Studentov t-test. Za dužu i kraću studiju podaci koji su sledili normalnu raspodelu za razliku između parova analizirani su sparenim t-testom, odnosno Willcoxon-ovim testom. Kada nisu sledili normalnu distribuciju, podaci su analizirani Mann-Whitney testom.

Minimalan uslov za postojanje statističke značajnosti definisan je p vrednošću (nivoom značajnosti) manjom ili jednakom 0.05 ( $p \leq 0.05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike soka od nara

Nutritivni sastav soka od nara prikazan je u Tabeli 4. Pored energetske vrednosti, lipida, proteina, ukupnih ugljenih hidrata, redukujućih šećera, ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, pH i DPPH, u soku je određen i sadržaj EA, zaslužne za biološku aktivnost soka od nara.

Tabela 4. Sastav soka od nara

Ispitivani parametri	Vrednosti
Energetska vrednost (KJ)	230
Masti (g/kg)	< 1
Proteini ( g/kg)	< 1
Ukupni ugljenihidrati ( g/kg)	135
Redukujući šećeri ( g/kg)	123.3
Titribilnost ( $\text{mol l}^{-1}$ )	11.6
Ukupni fenoli (g/l) <sup>*a</sup>	$2.938 \pm 0.113$
Ukupni flavonoidi (g/l) <sup>*b</sup>	$0.183 \pm 0.003$
Ukupni antocijani (g/l) <sup>*c</sup>	$0.021 \pm 0.001$
Elaginska kiselina (g/l)	$0.0389 \pm 0.0019$
Neutralizacija DPPH radikala (g/l)	$0.00125 \pm 0.0003$
Ph	3.49

*\*rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD (N=3); <sup>a</sup>Izraženo kao ekvivalent galne kiseline; <sup>b</sup>Izraženo kao ekvivalent kvercetina; <sup>c</sup>Izraženo kao ekvivalent cijanidin-3-glukozid hlorida*



## **4.2. Antropometrijski i hematološki parametri, lipidni profil, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima kod zdravih i osoba sa metaboličkim sindromom**

### **4.2.1. Antropometrijske karakteristike**

Antropometrijske karakteristike zdravih učesnika studije i osoba sa MetS prikazane su u Tabeli 5. Rezultati su pokazali da su osobe sa MetS imale značajno viši ( $p < 0.001$ ) BMI, obim struka i kuka, vrednosti sistolnog krvnog pritiska i procenat masti u odnosu na uslovno zdrave ispitanike.

Tabela 5. Antropometrijske karakteristike i vrednosti krvnog pritiska zdravih i osoba sa MetS

Antropometrijski parametri	Zdrave osobe (N=41)	Osobe sa MetS (N=70)	Referentne vrednosti
Životno doba (godine)	43.44 ± 8.69	50.81 ± 8.79	
Telesna masa (kg)	70.74 ± 10.41	85.23 ± 16.18	
Telesna visina (cm)	175.16 ± 9.23	171.50 ± 9.46	
Indeks telesne mase BMI muškarci (kg/m <sup>2</sup> )	23.65 ± 1.31	28.58 ± 3.48***	Zdravi BMI<25; Umereno gojazni 25<BMI<30; Gojazni BMI>30
Indeks telesne mase BMI žene (kg/m <sup>2</sup> )	22.37 ± 1.50	28.72 ± 5.69***	
Procenat masti muškarci (%)	10.88 ± 2.26	27.98 ± 3.56***	ž 16-33%, m 8-20%
Procenat masti žene (%)	21.27 ± 4.26	40.62 ± 7.44***	
Obim struka muškarci (cm)	75.56 ± 9.64	103.77 ± 7.44**	
Obim struka žene (cm)	73.64 ± 7.14	97.05 ± 14.92**	
Obim kuka muškarci (cm)	92.03 ± 5.45	107.00 ± 9.75**	
Obim kuka žene (cm)	95.14 ± 4.35	109.08 ± 14.60**	
Sistolni krvni pritisak (mm/Hg)	116.20 ± 5.35	133.05 ± 15.05*	
Dijastolni krvni pritisak (mm/Hg)	76.6 ± 5.83	81.53 ± 10.21	

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*\*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ) između grupe zdravih i osoba sa MetS. Korišćen je Studentov t-test za poređenje podataka sa normalnom raspodelom.*

#### 4.2.2. Krvna slika učesnika studije

Krvna slika zdravih i osoba sa MetS određivana je neposredno po vađenju krvi. Rezultati su pokazali da je broj ER i hematokrit bio statistički značajno veći ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) kod osoba sa MetS u odnosu na zdrave ispitanike. (Tabela 6.) ali i da su te vrednosti bile u okviru referentnih.

Tabela 6. Krvna slika kod zdravih i osoba sa MetS

Krvna slika	Zdrave osobe (N=37)	Osobe sa MetS (N=64)	Referentne vrednosti
Le ( $\times 10^9/l$ )	$6.55 \pm 1.72$	$5.99 \pm 1.45$	3.50-10.0
Er ( $\times 10^{12}/l$ )	$4.64 \pm 0.54$	$5.24 \pm 1.08^{**}$	3.80-5.80
Hb (g/l)	$133.89 \pm 8.9$	$136.86 \pm 14.22$	110-165
Hct (l/l)	$0.41 \pm 0.05$	$0.44 \pm 0.13^*$	0.350-0.500
Plt ( $\times 10^9/l$ )	$241.06 \pm 52.20$	$257.91 \pm 69.34$	150-390

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.01$ ), \* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između grupe zdravih i osoba sa MetS..*

#### 4.2.3. Lipidni profil učesnika studije

Lipidni profil ispitanika određivan je u serumu neposredno nakon vađenja krvi. Rezultati koji su prikazani u Tabeli 7. pokazali su da je koncentracija triglicerida, ukupnog holesterola i LDL-holesterola bila statistički značajno ( $p < 0.001$ ) viša, a koncentracija HDL-holesterola značajno ( $p < 0.05$ ) niža, kod osoba sa MetS u odnosu na grupu koju su činili zdravi ispitanici.

Tabela 7. Lipidni profil kod zdravih i osoba sa MetS

Lipidni parametri	Zdrave osobe (N=41)	Osobe sa MetS (N=71)	Referentne vrednosti
Trigliceridi (mmol/l)	0.94 ± 0.11	1.72 ± 0.79***	0.46-2.28
Holesterol (mmol/l)	4.74 ± 0.34	6.23 ± 1.14**	3.87-5.20
HDL-holesterol (mmol/l)	1.47 ± 0.10	1.37 ± 0.30*	ž>1.60, m>1.45
LDL-holesterol (mmol/l)	2.90 ± 0.67	3.96 ± 0.93***	<3.40

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*\*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p<0.001$ ), \*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p<0.01$ ) između grupe zdravih i ljudi sa MetS.

#### 4.2.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnika u studiji

Profil MK u fosfolipidima plazme, tj. procentualni udeo pojedinačnih, ukupnih zasićenih, mono- i polinezasićenih masnih kiselina u obe grupe ispitanika prikazan je u Tabeli 8. Procenat palmitinske (16:0), stearinske (18:0) i zasićenih masnih kiselina (SFA) kod osoba sa MetS bio je značajno viši ( $p<0.001$ ) u odnosu na grupu zdravih ispitanika. Sa druge strane, procenat zastupljenosti linolne kiseline i n-6 PUFA bio je značajno niži ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ) kod osoba sa MetS u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.

Tabela 8. Procentualni udeo MK fosfolipida plazme kod zdravih i osoba sa MetS

Masne kiseline (mol %)	Zdrave osobe (N=38)	Osobe sa MetS (N=51)
16:0	27.41 ± 1.85	29.43 ± 2.12***
16:1	0.48 ± 0.15	0.57 ± 0.28
18:0	15.76 ± 1.24	17.23 ± 1.40***
18:1 (n-9)	10.68 ± 1.24	10.88 ± 1.53
18:2	25.23 ± 2.20	22.03 ± 2.67**
20:3	2.88 ± 0.77	3.36 ± 0.82
20:4	12.13 ± 1.59	11.95 ± 2.17
20:5	0.36 ± 0.16	0.41 ± 0.40
22:4	0.62 ± 0.19	0.63 ± 0.37
22:5	0.72 ± 0.17	0.68 ± 0.23
22:6	2.95 ± 0.79	2.83 ± 0.87
SFA	43.17 ± 2.00	46.66 ± 2.33***
MUFA	11.17 ± 1.31	16.45 ± 1.67
PUFA	43.23 ± 3.89	41.89 ± 2.80
n-6	42.51 ± 1.78	37.27 ± 2.57***
n-3	4.03 ± 0.94	3.92 ± 1.19
n-6/n-3	10.71 ± 2.70	10.50 ± 2.98

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*\*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ); \*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.01$ ) između grupe zdravih i ljudi sa MetS. Korišćen je Studentov t-test za poređenje podataka sa normalnom raspodelom.

#### 4.2.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi učesnika u studiji

Procenjena aktivnost enzima desaturaza i elongaza u plazmi predstavljena kao odnos pojedinačnih MK prikazana je u Tabeli 9. Rezultati su pokazali da je procenjena aktivnost  $\Delta 6$  desaturaze i elongaze bila značajno ( $p < 0.001$ ) viša, dok je procenjena aktivnost  $\Delta 5$  desaturaze bila značajno ( $p < 0.001$ ) niža kod osoba sa MetS u odnosu na zdrave ispitanike.

Tabela 9. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi kod zdravih i osoba sa MetS

Desaturaze i elongaze u plazmi	Zdrave osobe (N=37)	Osobe sa MetS (N=51)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	0.69 $\pm$ 0.12	0.50 $\pm$ 0.11***
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	0.12 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.06***
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	4.52 $\pm$ 1.35	3.45 $\pm$ 1.18***
elongaza (18:0/16:0)	0.63 $\pm$ 0.08	0.59 $\pm$ 0.07

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*\*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ) između grupe zdravih i ljudi sa MetS..

#### 4.2.6. Masnokiselinski profil u fosfolipidima membrane eritrocita

Profil MK u fosfolipidima membrana ER, gotovo se u potpunosti razlikovao kod dve ispitivane grupe (Tabela 10.). Tako je procenat palmitinske (16:0), stearinske (18:0) i ukupnih SFA, ali i PAL (16:1, n-7) i EPA (20:5, n-3) kiseline bio statistički značajno ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) viši, dok je procenat LA (18:2 n-6), AA (20:4 n-6), dokozatetraenske (22:4 n-6), DPA (22:5 n-3), DHA (22:6 n-3), ukupnih polinezasićenih, ukupnih n-6 PUFA i ukupnih n-3PUFA bio značajno ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) niži kod osoba sa MetS u odnosu na grupu zdravih ispitanika.

Tabela 10. Procentualna zastupljenost MK u fosfolipidima membrane ER

Masne kiseline (mol %)	Zdrave osobe (N=35)	Osobe sa MetS (N=30)
16:0	24.83 ± 3.95	26.93 ± 4.29**
16:1	0.31 ± 0.31	0.64 ± 0.44***
18:0	18.95 ± 3.14	22.35 ± 2.92***
18:1 (n-9)	16.53 ± 1.57	16.53 ± 2.25
18:2	14.50 ± 1.75	12.82 ± 2.58***
20:3	1.65 ± 0.39	1.69 ± 0.80
20:4	14.63 ± 3.45	12.13 ± 3.15***
20:5	0.36 ± 0.23	0.51 ± 0.32**
22:4	3.38 ± 1.19	2.39 ± 1.17***
22:5	1.37 ± 0.52	1.03 ± 0.53***
22:6	3.33 ± 1.63	2.53 ± 1.14**
SFA	43.77 ± 6.46	49.28 ± 6.12***
MUFA	16.84 ± 1.55	17.16 ± 2.36
PUFA	39.22 ± 6.49	33.10 ± 6.69**
n-6	34.16 ± 5.23	29.03 ± 5.63***
n-3	5.06 ± 1.83	4.07 ± 1.55***
n-6/n-3	7.38 ± 1.99	7.87 ± 2.57

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*\*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ); \*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.01$ ); \* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između grupe zdravih i ljudi MetS.

#### 4.2.7. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima

U Tabeli 11. prikazane su procenjene vrednosti aktivnosti desaturaza i elongaza u ER u obe ispitivane grupe. Vrednost procenjene aktivnosti  $\Delta 9$  desaturaze bila je statistički značajno ( $p < 0.001$ ) niža, dok je aktivnost  $\Delta 5$  desaturaze i elongaze bila statistički značajno ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) viša kod osoba sa MetS u odnosu na zdrave osobe.

Tabela 11. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u ER

Desaturaze i elongaze u ER	Zdrave osobe (N=30)	Osobe sa MetS (N=35)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	0.90±0.16	0.76±0.16***
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	0.12±0.03	0.14±0.08
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	9.12±2.44	10.18±11.13*
elongaza (18:0/16:0)	0.77±0.09	0.84±0.13**

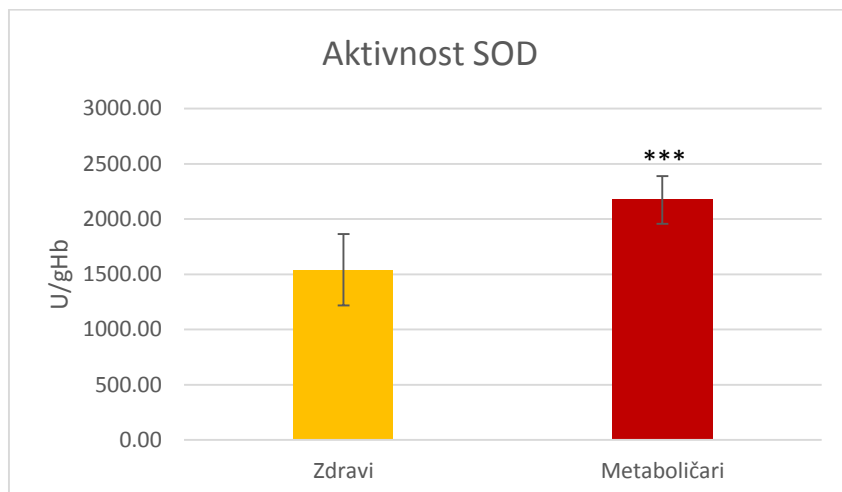
Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*\*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ); \*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.01$ ); \* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između grupe zdravih i ljudi sa MetS..

#### 4.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima kod zdravih i ljudi sa metaboličkim sindromom

##### 4.3.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Aktivnost enzima superoksid dismutaze u ER osoba sa MetS je bila statistički značajno ( $p < 0.001$ ) viša u poređenju sa kontrolnom grupom koju su činile zdrave osobe (Grafik 1.).



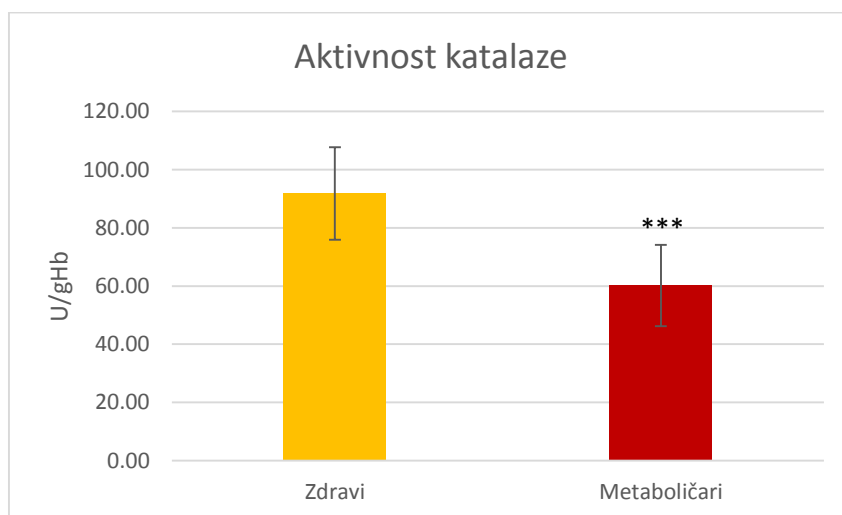


Grafik 1. Aktivnost superoksid dismutaze u ER kod zdravih i ljudi sa MetS

*Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*\*\*predstavlja značajnu ( $p < 0.001$ ) razliku u odnosu na grupu zdravih ljudi. Korišćen je Studentov t-test za poređenje podataka sa normalnom raspodelom.*

#### 4.3.2. Aktivnost katalaze

Određivanje aktivnosti CAT u ER (Grafik 2.) pokazalo je da je aktivnost ovog enzima bila statistički značajno ( $p < 0.001$ ) niža kod osoba sa MetS u odnosu na zdravu kontrolu.

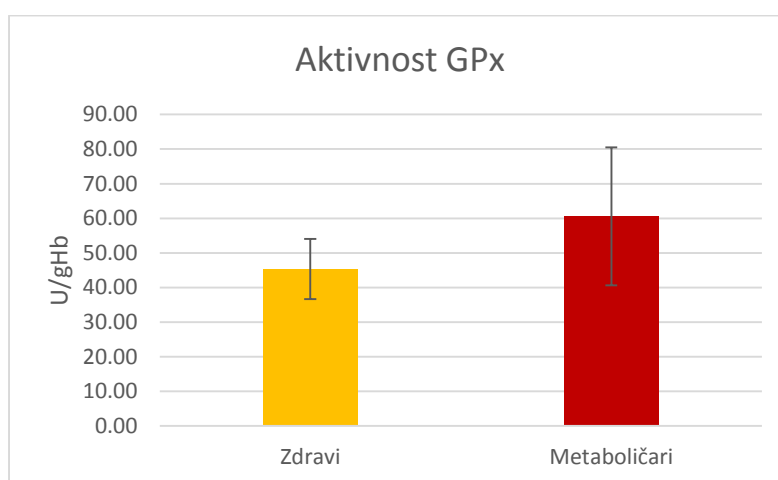


Grafik 2. Aktivnost katalaze kod zdravih i osoba sa MetS

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*\*\*predstavlja značajnu ( $p < 0.001$ ) razliku u odnosu na zdravu kontrolu. Korišćen je Studentov t-test za poređenje podataka sa normalnom raspodelom.

#### 4.3.3. Aktivnost glutation peroksidaze

Za razliku od SOD i CAT, aktivnost GPx nije se značajno razlikovala između grupe zdravih i osoba sa MetS (Grafik 3.).



Grafik 3. Aktivnost glutation peroksidaze kod zdravih i ljudi sa MetS

#### 4.4. Antropometrijski, hematološki i biohemijski parametri, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima učesnika u dvonedeljnoj studiji

##### 4.4.1. Antropometrijske karakteristike učesnika u studiji

Antropometrijske karakteristike i vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska učesnika dvonedeljne studije prikazane su u Tabeli 12. U studiju su bile uključene osobe oba pola, starosti između 40 i 60 godina, kod kojih je utvrđeno prisustvo MetS. Ispitanici su metodom slučajnog uzorka bili podeljeni u 2 grupe. Interventna grupa konzumirala je 300 ml soka od nara tokom 2 nedelje, dok je kontrolna grupa bila bez suplementacije.

Naši rezultati su pokazali da nije bilo značajnih razlika u ispitivanim parametrima na početku i na kraju studije u obe ispitivane grupe.

Tabela 12. Antropometrijske karakteristike učesnika na početku i na kraju dvonedeljne studije

Antropometrijski parametri	Intreventna grupa na početku (N=12)	Intreventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=12)	Kontrolna grupa na kraju (N=12)
Životno doba (godine)	54.42 ± 6.26		52.38 ± 13.31	
Telesna masa (kg)	87.53 ± 15.51	87.14 ± 14.96	88.75 ± 19.39	79.69 ± 19.05
Telesna visina (cm)	173.17 ± 7.19		172.18 ± 13.36	
Indeks telesne mase (kg/m <sup>2</sup> )	29.02 ± 3.80	28.96 ± 3.62	27.85 ± 2.49	27.78 ± 2.38
Obim kuka (cm)	112.25 ± 9.85	111.75 ± 9.47	109.83 ± 9.19	108.86 ± 9.27
Obim struka muškarci (cm)	102.75 ± 2.36	101.05 ± 5.20	104.00 ± 11.70	100.75 ± 12.01
Obim struka žene (cm)	96.43 ± 9.50	95.85 ± 9.50	96.40 ± 11.90	97 ± 12.02
Procenat masti (%)	34.58 ± 7.90	34.64 ± 7.61	38.16 ± 4.53	36.99 ± 4.38
Sistolni krvni pritisak (mm/Hg)	133.42 ± 18.33	129.33 ± 16.13	126.20 ± 17.11	126.09 ± 20.16
Dijastolni krvni pritisak (mm/Hg)	82.92 ± 10.11	77.50 ± 10.46	78.00 ± 11.06	74.50 ± 9.79

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.*

#### 4.4.2. Krvna slika i sedimentacija učesnika u studiji

Krvna slika i sedimentacija svih učesnika u studiji određivane su neposredno nakon vađenja krvi. Iako se broj ER i hematokrit značajno ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) smanjio, nakon 2

nedelje konzumiranja soka, vrednosti svih ispitivanih parametara bile su u okviru referentnih (Tabela 13.).

Tabela 13. Vrednosti krvne slike i sedimentacije na početku i na kraju dvonedeljne studije

Krvna slika i sedimentacija	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=12)	Kontrolna grupa na kraju (N=12)
Le ( $\times 10^9/l$ )	5.92 $\pm$ 1.22	6.07 $\pm$ 1.65	5.82 $\pm$ 1.52	5.65 $\pm$ 1.44
Er ( $\times 10^{12}/l$ )	4.96 $\pm$ 0.59	4.82 $\pm$ 0.51**	4.75 $\pm$ 0.32	4.62 $\pm$ 0.35
Hb (g/l)	125.83 $\pm$ 13.31	123.33 $\pm$ 11.25	123.17 $\pm$ 10.78	119.50 $\pm$ 10.93
Hct (l/l)	0.52 $\pm$ 0.28	0.42 $\pm$ 0.04*	0.42 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.03
Plt ( $\times 10^9/l$ )	265.25 $\pm$ 69.32	271.08 $\pm$ 82.65	228.00 $\pm$ 21.40	210.33 $\pm$ 18.64
Pct	0.19 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02
Se	9.50 $\pm$ 6.80	10.67 $\pm$ 8.41	10.17 $\pm$ 4.83	8.33 $\pm$ 4.59

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku, \*\* predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.01$ ) razliku u odnosu na početak studije.

#### 4.4.3. Biohemijski parametri učesnika u studiji

Biohemijski parametri u serumu određivani su kod svih ispitanika neposredno posle vađenja krvi. Rezultati prikazani u Tabeli 14. pokazuju da konzumiranje 300 ml soka od nara značajno ( $p < 0.05$ ) smanjuje koncentraciju LDL-holesterola i AST kod osoba sa MetS nakon 2 nedelje. Vrednosti biohemijskih parametara u kontrolnoj grupi nisu se značajno menjali tokom studije.

Tabela 14. Vrednosti biohemijskih parametara u serumu na početku i na kraju dvonedeljne studije

Biohemijski parametri	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=12)	Kontrolna grupa na kraju (N=12)
Glukoza (mmol/l)	5.50 ± 0.77	5.40 ± 1.11	5.33 ± 1.35	5.00 ± 1.08
Trigliceridi (mmol/l)	1.74 ± 0.69	1.80 ± 0.87	1.33 ± 0.83	1.33 ± 0.82
Holesterol (mmol/l)	7.07 ± 1.16	6.80 ± 1.19	6.51 ± 1.14	5.79 ± 0.97
HDL-olesterol (mmol/l)	1.24 ± 0.23	1.18 ± 0.23	1.51 ± 0.27	1.47 ± 0.28
LDL-olesterol (mmol/l)	4.25 ± 0.84	3.97 ± 0.83*	4.03 ± 0.93	3.45 ± 0.76
Urea (mmol/l)	4.90 ± 2.36	4.35 ± 1.14	4.98 ± 1.19	4.88 ± 1.05
Mokraćna kiselina (µmol/l)	393.73±137.81	348.75±122.94	305.00±110.29	339.43±124.95
ALT (U/l)	32.76 ± 15.61	28.56 ± 15.58	22.86 ± 8.93	23.80 ± 9.01
AST (U/l)	23.42 ± 5.12	21.08 ± 3.79*	21.96 ± 4.57	22.06 ± 4.81

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.

#### 4.4.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnika u studiji

Profil masnih kiselina u fosfolipidima plazme obe grupe ispitanika koje su učestvovalе u studiji, prikazan je u Tabeli 15. Od svih ispitivanih parametara, jedino je procenat zastupljenosti DHA (22:6 n-3) u interventnoj grupi, na kraju studije bio statistički značajno ( $p < 0.05$ ), niži u odnosu na početak studije.

Tabela 15. Masnokiselinski profil fosfolipida plazme na početku i na kraju dvonedeljne studije

Masne kiseline (mol %)	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=12)	Kontrolna grupa na kraju (N=12)
16:0	30.51 ± 2.29	30.63 ± 2.04	28.96 ± 2.02	29.99 ± 3.29
16:1	0.59 ± 0.36	0.64 ± 0.39	0.43 ± 0.16	0.58 ± 0.32
18:0	17.58 ± 1.39	17.12 ± 1.86	16.87 ± 1.24	14.83 ± 5.03
18:1 (n-9)	8.45 ± 1.84	9.26 ± 2.25	8.62 ± 1.39	9.35 ± 1.77
18:1 (n-7)	1.41 ± 0.42	1.66 ± 0.51	1.70 ± 0.37	1.93 ± 0.36
18:2	23.37 ± 3.74	24.06 ± 2.49	22.21 ± 3.18	21.74 ± 2.83
20:3	3.51 ± 1.20	3.56 ± 1.05	3.69 ± 0.69	3.32 ± 1.00
20:4	10.83 ± 2.91	10.13 ± 2.59	12.58 ± 2.13	12.80 ± 3.25
20:5	0.15 ± 0.12	0.15 ± 0.09	0.46 ± 0.37	0.58 ± 0.62
22:4	0.46 ± 0.18	0.41 ± 0.13	0.53 ± 0.21	0.57 ± 0.32
22:5	0.61 ± 0.14	0.60 ± 0.12	0.74 ± 0.21	0.81 ± 0.46
22:6	2.48 ± 0.98	1.85 ± 0.54*	3.20 ± 0.91	3.50 ± 1.10
SFA	48.09 ± 2.55	47.76 ± 2.60	45.83 ± 2.16	44.81 ± 4.92
MUFA	10.45 ± 2.10	11.57 ± 2.73	10.75 ± 1.41	11.86 ± 1.74
PUFA	41.45 ± 3.24	40.76 ± 2.75	43.42 ± 3.09	43.33 ± 5.01
n-6	38.22 ± 2.94	38.15 ± 2.79	39.01 ± 3.01	38.44 ± 4.69
n-3	3.24 ± 1.07	2.61 ± 0.59	4.40 ± 1.35	4.89 ± 1.73
n-6/n-3	12.67 ± 3.19	15.43 ± 4.03	9.69 ± 3.14	8.79 ± 3.17

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) u odnosu na početak studije.

#### 4.4.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi

Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi prikazna je u Tabeli 16. Rezultati su pokazali da je vrednost  $\Delta 9$  desaturaze bila statistički značajno ( $p < 0.05$ ) viša, nakon 2 nedelje konzumiranja soka od nara, kod osoba sa MetS. Procenjena aktivnost ostalih enzima, na početku i na kraju studije, nije se značajno razlikovala u ispitivanim grupama.

Tabela 16. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza na početku i na kraju dvonedeljne studije

Desaturaze i elongaze u plazmi	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=12)	Kontrolna grupa na kraju (N=12)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	$0.48 \pm 0.12$	$0.55 \pm 0.19^*$	$0.51 \pm 0.09$	$0.57 \pm 0.10$
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	$0.15 \pm 0.07$	$0.15 \pm 0.07$	$0.17 \pm 0.04$	$0.15 \pm 0.07$
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	$2.80 \pm 0.88$	$2.92 \pm 1.46$	$3.55 \pm 1.13$	$3.65 \pm 1.67$
elongaza (18:0/16:0)	$0.58 \pm 0.07$	$0.56 \pm 0.08$	$0.59 \pm 0.06$	$0.56 \pm 0.07$

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) u odnosu na početak studije.*

#### 4.4.6. Masnokiselinski profil fosfolipida membrane eritrocita učesnika u studiji

Profil MK u fosfolipidima membrane ER u obe ispitivane grupe, tačnije procentualni udeo pojedinačnih masnih, ukupnih SFA, MUFA i PUFA prikazan je u Tabeli 17. Za razliku od plazme, procenat DHA (22:6) ali i DGLA (20:3 n-6) kiseline bio je statistički značajno ( $p < 0.05$ ) veći u interventnoj grupi nakon dvonedeljne suplementacije.

Tabela 17. Procentualna zastupljenost MK u fosfolipidima membrane ER na početku i na kraju dvonedeljne studije

Masne kiseline (mol %)	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=12)	Kontrolna grupa na kraju (N=12)
16:0	30.88 ± 2.30	30.67 ± 2.73	26.09 ± 3.38	26.63 ± 3.50
16:1	0.62 ± 0.51	0.46 ± 0.14	0.69 ± 0.38	0.64 ± 0.32
18:0	23.93 ± 2.83	23.21 ± 2.05	24.76 ± 2.07	23.43 ± 1.94
18:1 (n-9)	13.52 ± 2.72	14.50 ± 1.80	15.59 ± 2.51	16.87 ± 3.15
18:1 (n-7)	2.30 ± 0.71	1.85 ± 0.24	1.96 ± 0.21	1.99 ± 0.36
18:2	13.77 ± 3.03	11.99 ± 3.39	11.69 ± 1.94	11.61 ± 2.14
20:3	1.40 ± 0.28	1.89 ± 0.47*	1.85 ± 0.81	2.12 ± 0.67
20:4	9.16 ± 1.76	10.19 ± 1.00	12.44 ± 2.57	11.17 ± 2.08
20:5	0.68 ± 0.38	0.62 ± 0.37	0.44 ± 0.24	0.56 ± 0.34
22:4	1.42 ± 0.21	1.83 ± 0.49	2.37 ± 0.78	2.77 ± 1.01
22:5	0.67 ± 0.41	0.87 ± 0.43	0.80 ± 0.30	0.94 ± 0.22
22:6	1.66 ± 0.47	1.93 ± 0.60*	2.32 ± 0.73	2.27 ± 0.51
SFA	54.81 ± 2.87	53.88 ± 2.79	50.84 ± 4.38	50.05 ± 4.33
MUFA	16.44 ± 2.62	16.81 ± 1.86	17.26 ± 2.40	18.51 ± 3.47
PUFA	28.75 ± 3.54	29.31 ± 3.89	31.90 ± 4.67	28.67 ± 4.04
n-6	25.75 ± 3.22	25.89 ± 3.68	28.34 ± 4.33	27.67 ± 4.53
n-3	3.00 ± 0.82	3.42 ± 1.01	3.56 ± 0.85	3.77 ± 0.88
n-6/n-3	9.08 ± 2.39	8.16 ± 2.57	8.44 ± 2.81	7.65 ± 2.01

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.



#### 4.4.7. Procenjena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima

Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u ER prikazana je u Tabeli 18. i pokazala da je nakon dve nedelje konzumiranja 300 ml soka od nara, došlo do značajnog ( $p < 0.05$ ) povećanja  $\Delta 6$  desaturaze i elongaze i smanjenja ( $p < 0.01$ )  $\Delta 5$  desaturaze, kod osoba sa MetS.

Tabela 18. Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u ER na početku i na kraju dvonedeljne studije

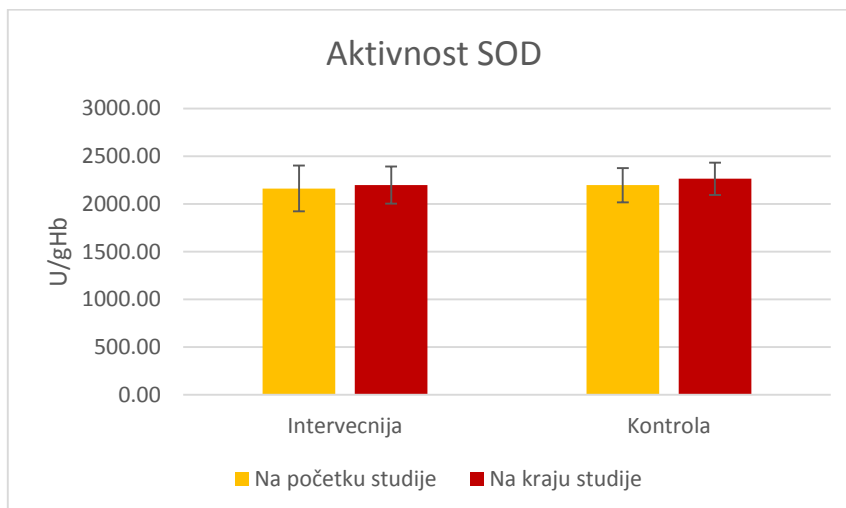
Desaturaze i elongaze u eritrocitima	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=12)	Kontrolna grupa na kraju (N=12)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	$0.67 \pm 0.14$	$0.71 \pm 0.06$	$0.69 \pm 0.15$	$0.79 \pm 0.17$
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	$0.11 \pm 0.03$	$0.17 \pm 0.06^*$	$0.14 \pm 0.11$	$0.16 \pm 0.08$
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	$7.38 \pm 1.73$	$5.66 \pm 1.27^{**}$	$7.48 \pm 3.19$	$6.22 \pm 2.35$
elongaza (18:0/16:0)	$0.79 \pm 0.13$	$0.76 \pm 0.11$	$0.94 \pm 0.15$	$0.88 \pm 0.18$

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*\* predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.01$ ) razliku; \* predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.

#### 4.5. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite i stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima učesnika u dvonedeljnoj studiji

##### 4.5.1. Aktivnost superoksid dismutaze u eritrocitima učesnika u studiji

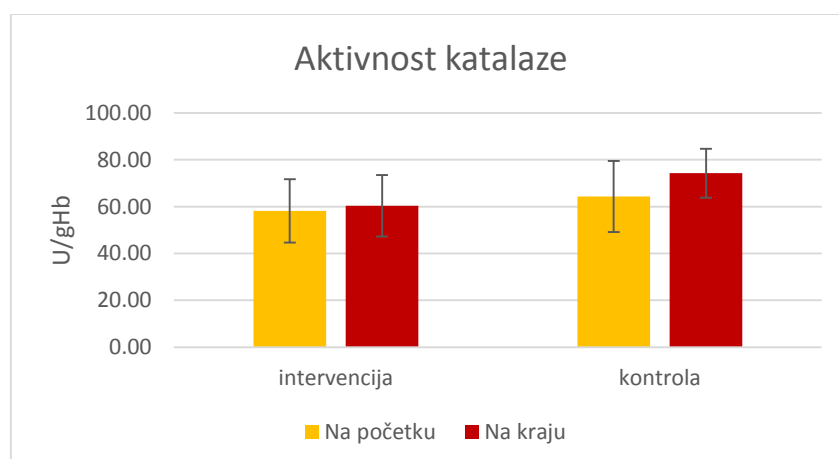
Aktivnost superoksid dismutaze u ER, interventne i kontrolne grupe, nije se značajno razlikovala na početku i na kraju studije (Grafik 4.).



Grafik 4. Aktivnost superoksid dismutaze u ER učesnika na početku i na kraju dvonedeljne studije

#### 4.5.2. Aktivnost katalaze u eritrocitima učesnika u studiji

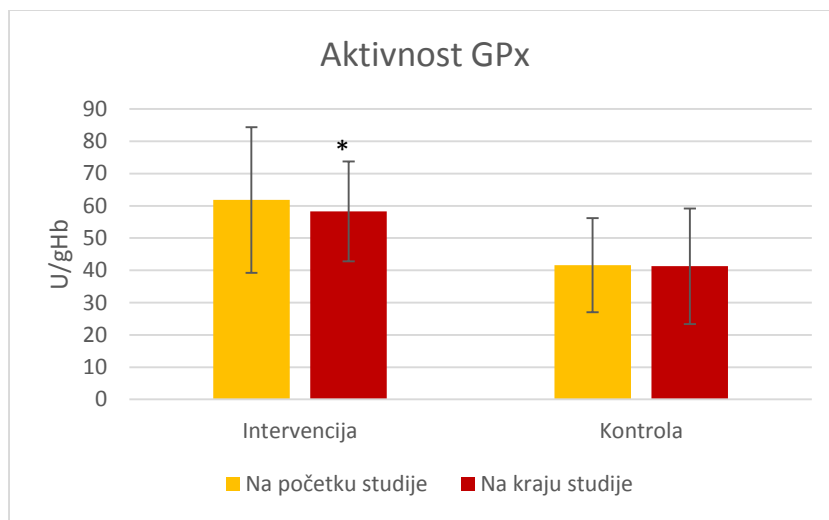
Rezultati određivanja aktivnosti katalaze (Grafik 5.) u ER, obe ispitivane grupe, pokazali su da nije bilo statistički značajne razlike na početku i na kraju studije.



Grafik 5. Aktivnost katalaze u ER učesnika na početku i na kraju dvonedeljne studije

### 4.5.3. Aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima učesnika u studiji

U odnosu na druge enzime antioksidativne zaštite, kod kojih nije bilo statistički značajnih promena, rezultat određivanja aktivnosti GPx u ER pokazao je značajno smanjenje ( $p < 0.05$ ) aktivnosti GPx, nakon dvonedeljnog konzumiranja soka od nara, kod osoba sa MetS (Grafik 6.).

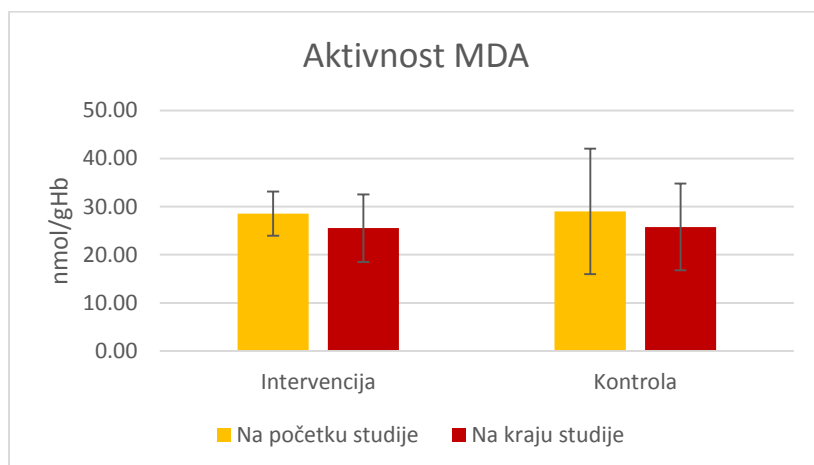


Grafik 6. Aktivnost glutation peroksidaze u ER učesnika na početku i na kraju dvonedeljne studije

*Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \* predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.*

### 4.5.4. Stepen lipidne peroksidacije

Koncentracija MDA u ER, kao parametra lipidne peroksidacije, kod svih učesnika u studiji se nije značajno menjala tokom dvonedeljne studije (Grafik 7.)



Grafik 7. Koncentracija malonaldehida u ER učesnika na početku i na kraju dvonedeljne studije

#### **4.6. Antropometrijski, hematološki i biohemijski parametri, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima učesnika u šestonedeljnoj studiji**

##### **4.6.1. Antropometrijske karakteristike učesnika u studiji**

Nakon dvonedeljne studije organizovali smo studiju u trajanju od 6 nedelja u koju su bili uključeni ispitanici oba pola, starosti između 40 i 60 godina, kod kojih je potvrđen MetS. Svi ispitanici bili su podeljeni u 2 grupe pri čemu je interventna grupa dobijala 300 ml dnevno soka tokom 6 nedelja. Iako su vrednosti nekih parametara bile promenjene na kraju studije, te razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 19.)

Tabela 19. Antropometrijske karakteristike učesnika na početku i na kraju šestonedeljne studije

Antropometrijski parametri	Intreventna grupa na početku (N=25)	Interventna grupa na kraju (N=25)	Kontrolna grupa na početku (N=15)	Kontorolna grupa na kraju (N=15)
Životno doba (godine)	52.19 ± 6.72		47.25 ± 10.29	
Telesna masa (kg)	87.32 ± 13.72	86.95 ± 14.71	81.36 ± 18.81	78.37 ± 18.37
Telesna visina (cm)	170.54 ± 9.16		171.76 ± 10.34	
Indeks telesne mase BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.84 ± 4.44	29.65 ± 4.51	27.13 ± 6.63	26.88 ± 5.99
Obim kuka muškarci (cm)	109.95 ± 2.35	111.78 ± 3.80	107.90 ± 4.58	107.67 ± 3.58
Obim kuka žene (cm)	119.60 ± 8.52	117.33 ± 9.3	109.10 ± 14.98	108.38 ± 11.67
Obim struka muškarci (cm)	110.00 ± 2.92	100.50 ± 7.8	96.50 ± 8.39	98.20 ± 11.39
Obim struka žene (cm)	98.11 ± 8.19	93.57 ± 9.47	90.90 ± 13.63	87.31 ± 11.64
Procenat masti (%)	37.01 ± 8.72	37.78 ± 8.90	31.27 ± 9.73	32.17 ± 8.43
Sistolni krvni pritisak (mm/Hg)	133.28 ± 15.48	129.86 ± 18.78	126.87 ± 18.26	124.65 ± 16.28
Dijastolni krvni pritisak (mm/Hg)	82.83 ± 9.75	79.14 ± 8.85	80.60 ± 11.32	75.65 ± 8.20

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.*

#### 4.6.2. Krvna slika i sedimentacija učesnika u studiji

Krva slika i sedimentacija svih učesnika u studiji određivane su neposredno nakon vađenja krvi. Rezultati su pokazali da je broj leukocita bio statistički značajno ( $p < 0.05$ ) veći, dok je vrednost Hb bila statistički značajno ( $p < 0.05$ ) manja nakon šestonedeljnog konzumiranja soka od nara, ali da su sve vrednosti bile u okviru referentnih (Tabela 20.)

Tabela 20. Krvna slika i sedimentacija na početku i na kraju šestonedeljne studije

Krvna slika i sedimentacija	Interventna grupa na početku (N=25)	Interventna grupa na kraju (N=25)	Kontrolna grupa na početku (N=15)	Kontrolna grupa na kraju (N=15)
Le (x 10 <sup>9</sup> /l)	5.99 ± 1.57	6.48 ± 1.41*	6.07 ± 1.47	6.07 ± 1.33
Er (x 10 <sup>12</sup> /l)	4.72 ± 0.40	4.66 ± 0.42	4.83 ± 0.49	4.67 ± 0.47
Hb (g/l)	139.81 ± 11.19	137.35 ± 12.31*	143.43 ± 13.02	139.48 ± 12.10
Hct (l/l)	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.03
Plt (x10 <sup>9</sup> /l)	266.50 ± 87.06	264.58 ± 72.15	251.62 ± 49.75	245.52 ± 39.21
Se	13.88 ± 10.43	14.71 ± 12.14	12.89 ± 7.73	11.83 ± 6.37

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu razliku (p<0.05) u odnosu na početak studije.*

#### 4.6.3. Biohemijski parametri u serumu

Biohemijski parametri u serumu određivani su neposredno nakon vađenja krvi. Rezultati prikazani u Tabeli 21. pokazuju da konzumiranje soka od nara nije uticalo na promenu biohemijskih parametara kod osoba sa MetS izuzev koncentracije glukoze koja ja bila značajno (p<0.05) veća, na kraju studije ali su te vrednosti bile u okviru referentnih.

Tabela 21. Vrednosti biohemijskih parametara u serumu na početku i na kraju šestonedeljne studije

Biohemijski parametri	Interventna grupa na početku (N=25)	Interventna grupa na kraju (N=25)	Kontrolna grupa na početku (N=15)	Kontrolna grupa na kraju (N=15)
Glukoza (mmol/l)	5.09 ± 0.66	5.35 ± 0.73*	5.38 ± 1.40	5.12 ± 1.26
Trigliceridi (mmol/l)	1.65 ± 0.87	1.95 ± 0.98	1.44 ± 0.81	1.19 ± 0.65
Holesterol (mmol/l)	6.10 ± 1.03	6.15 ± 1.12	5.77 ± 1.08	5.50 ± 0.68
HDL-holesterol (mmol/l)	1.33 ± 0.34	1.32 ± 0.37	1.40 ± 0.28	1.42 ± 0.30
LDL-holesterol (mmol/l)	3.99 ± 0.92	3.91 ± 1.09	3.69 ± 0.98	3.48 ± 0.61
Urea (mmol/l)	5.19 ± 1.42	4.86 ± 1.20	4.71 ± 1.26	4.70 ± 1.09
Mokraćna kiselina (μmol/l)	342.44 ± 125.71	324.71 ± 77.42	263.88 ± 93.85	305.36 ± 102.14
ALT (U/l)	24.44 ± 14.22	27.42 ± 19.77	24.75 ± 12.58	25.25 ± 16.21
AST (U/l)	24.70 ± 12.28	22.51 ± 7.66	21.81 ± 7.03	22.77 ± 10.22

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.

#### 4.6.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnika studije

Profil MK u fosfolipidima plazme interventne i kontrolne grupe, tačnije procentualni udeo pojedinačnih MK, ukupnih SFA, MUFA i PUFA u obe grupe prikazan je u Tabeli 21. Analiza masnokiselinskog profila FL plazme obe ispitivane grupe nakon šest nedelja trajanja studije, pokazala je da procenat AA (20:4 n-6) bio značajno manji dok je procenat ukupnih SFA bio značajno veći, nakon šestonedeljnog konzumiranja soka od nara.

Tabela 21. Masnokiselinski profil fosfolipida plazme na početku i na kraju šestonedeljne studije

Masne kiseline (mol %)	Interventna grupa na početku (N=25)	Interventna grupa na kraju (N=25)	Kontrolna grupa na početku (N=15)	Kontrolna grupa na kraju (N=15)
16:0	27.33 ± 1.40	28.45 ± 1.87	28.55 ± 2.33	26.78 ± 1.12
16:1	0.69 ± 0.40	0.85 ± 0.37	0.35 ± 0.15	0.62 ± 0.36
18:0	17.55 ± 1.57	18.27 ± 2.15	16.05 ± 0.72	16.47 ± 2.44
18:1 (n-9)	8.55 ± 1.16	8.57 ± 1.90	8.07 ± 1.63	8.15 ± 0.98
18:1 (n-7)	2.30 ± 0.50	1.94 ± 0.68	1.93 ± 0.37	2.21 ± 0.33
18:2	21.42 ± 1.92	21.28 ± 2.34	20.95 ± 3.53	21.90 ± 3.36
20:3	3.12 ± 0.65	3.54 ± 1.03	3.90 ± 0.88	3.45 ± 1.48
20:4	13.14 ± 1.67	11.61 ± 0.62*	14.10 ± 1.97	15.24 ± 3.69
20:5	0.77 ± 0.51	0.96 ± 0.62	0.68 ± 0.39	0.81 ± 0.70
22:4	0.97 ± 0.77	0.82 ± 0.73	0.67 ± 0.21	0.84 ± 0.36
22:5	0.80 ± 0.34	0.63 ± 0.29	0.82 ± 0.26	0.97 ± 0.70
22:6	3.37 ± 0.80	3.21 ± 1.21	3.94 ± 0.62	4.58 ± 0.73
SFA	44.88 ± 1.79	46.72 ± 1.69*	44.60 ± 2.11	43.25 ± 2.74
MUFA	11.54 ± 1.81	11.37 ± 2.50	10.34 ± 1.66	10.97 ± 1.30
PUFA	43.58 ± 1.35	42.04 ± 2.61	45.05 ± 3.17	47.78 ± 3.28
n-6	38.65 ± 1.73	37.25 ± 1.97	39.61 ± 3.65	41.43 ± 4.56
n-3	4.93 ± 1.15	4.79 ± 1.48	5.44 ± 1.05	6.35 ± 1.38
n-6/n-3	8.38 ± 2.70	8.36 ± 2.17	7.62 ± 2.21	6.92 ± 2.45

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.



#### 4.6.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi učesnika u studiji

Procena aktivnosti sistema desaturaza i elongaza u plazmi prikazan je u Tabeli 22. Rezultati su pokazali da je nakon šest nedelja konzumiranja soka od nara došlo do smanjenja aktivnosti  $\Delta 5$  desaturaze.

Tabela 22. Aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi na početku i na kraju šestonedeljne studije

Desaturaze i elongaze u plazmi	Interventna grupa na početku (N=25)	Interventna grupa na kraju (N=25)	Kontrolna grupa na početku (N=15)	Kontrolna grupa na kraju (N=15)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	0.49 $\pm$ 0.11	0.48 $\pm$ 0.14	0.50 $\pm$ 0.11	0.57 $\pm$ 0.08
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	0.15 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.10
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	4.37 $\pm$ 0.95	3.58 $\pm$ 1.29*	3.89 $\pm$ 1.52	4.41 $\pm$ 3.24
elongaza (18:0/16:0)	0.64 $\pm$ 0.07	26.61 $\pm$ 14.69	0.57 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.09

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.

#### 4.6.6. Masnokiselinski profil fosfolipida membrane eritrocita

Profil masnih kiselina u FL membrana ER u obe ispitivane grupe, odnosno procentualni udeo pojedinačnih MK, SFA, MUFA i PUFA u obe grupe prikazan je u Tabeli 23. Masnokiselinski profil ER se prilično razlikovao na početku i na kraju studije, u interventnoj grupi. Tako je procenat palmitinske (16:0), palmitoleinske (16:1, n-7), oleinske (18:1 n-9), SFA i MUFA bio statistički značajno ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) viši, a procenat AA (20:4, n-6), DPA (22:5, n-3), DHA (22:6, n-3) i ukupnih PUFA značajno ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) niži u odnosu na početak studije. U kontrolnoj grupi nije bilo promena.

Tabela 23. Procentualna zastupljenost masnih kiselina u fosfolipidima membrane ER na početku i na kraju šestonedeljne studije

Masne kiseline (mol %)	Interventna grupa na početku (N=25)	Interventna grupa na kraju (N=25)	Kontrolna grupa na početku (N=15)	Kontrolna grupa na kraju (N=15)
16:0	24.00 ± 3.37	25.55 ± 2.72*	26.38 ± 3.59	27.23 ± 4.12
16:1	0.54 ± 0.35	0.85 ± 0.61*	0.64 ± 0.37	0.59 ± 0.32
18:0	20.10 ± 1.53	20.23 ± 1.54	23.70 ± 2.88	22.88 ± 2.44
18:1 (n-9)	17.39 ± 1.38	18.47 ± 1.58*	15.99 ± 2.42	16.90 ± 2.79
18:2	13.83 ± 1.88	14.11 ± 1.67	12.13 ± 2.24	11.77 ± 2.66
20:3	1.81 ± 0.72	2.25 ± 0.84	1.51 ± 0.95	1.85 ± 0.92
20:4	14.26 ± 2.48	12.28 ± 2.43**	12.44 ± 2.70	11.22 ± 2.39
20:5	0.49 ± 0.23	0.48 ± 0.33	0.47 ± 0.40	0.50 ± 0.33
22:4	2.88 ± 1.35	2.43 ± 1.14	2.67 ± 0.94	2.97 ± 1.00
22:5	1.36 ± 0.63	1.01 ± 0.42*	0.88 ± 0.33	1.02 ± 0.31
22:6	3.35 ± 1.15	2.35 ± 0.88**	2.41 ± 0.89	2.28 ± 0.80
SFA	44.10 ± 4.53	45.78 ± 3.26*	50.08 ± 4.94	50.11 ± 5.22
MUFA	17.94 ± 1.51	19.32 ± 1.58**	16.62 ± 2.57	17.49 ± 2.88
PUFA	37.97 ± 5.61	34.91 ± 4.51*	32.52 ± 5.24	31.61 ± 6.40
n-6	32.78 ± 4.66	31.07 ± 3.40	28.75 ± 4.73	27.81 ± 5.79
n-3	3.85 ± 1.23	3.83 ± 1.21	3.77 ± 1.00	3.80 ± 1.11
n-6/n-3	8.36 ± 2.18	8.67 ± 2.31	8.12 ± 2.68	7.86 ± 2.44

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*\*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ), \*\* predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.01$ ); \*predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) u odnosu na početak studije.

#### 4.6.7. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima učesnika u studiji

Procenjene aktivnosti desaturaza i elongaza u ER (Tabela 24.) su pokazale da je nakon šest nedelja konzumiranja soka od nara, došlo do smanjenja aktivnosti  $\Delta 5$  desaturaze.

Tabela 24. Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u ER na početku i na kraju šestonedeljne studije

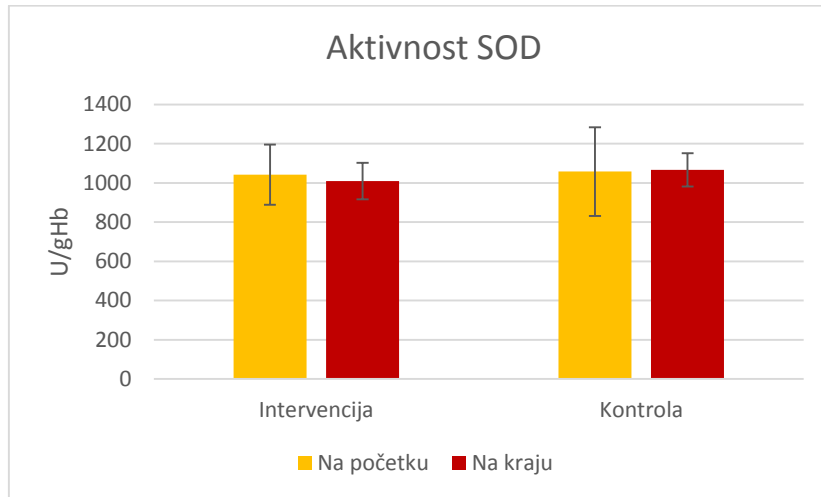
Desaturaze i elongaze u plazmi	Interventna grupa na početku (N=25)	Interventna grupa na kraju (N=25)	Kontrolna grupa na početku (N=15)	Kontrolna grupa na kraju (N=15)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	$0.86 \pm 0.07$	$0.92 \pm 0.10$	$0.69 \pm 0.17$	$0.75 \pm 0.17$
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	$0.14 \pm 0.06$	$0.16 \pm 0.05$	$0.14 \pm 0.10$	$0.16 \pm 0.08$
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	$8.10 \pm 3.25$	$6.31 \pm 2.64^*$	$8.42 \pm 3.92$	$7.02 \pm 2.71$
elongaza (18:0/16:0)	$0.84 \pm 0.09$	$0.80 \pm 0.10$	$0.91 \pm 0.15$	$0.85 \pm 0.14$

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) u odnosu na početak studije.

#### 4.7. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite i stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima učesnika u šestonedeljnoj studiji

##### 4.7.1. Aktivnost superoksid dismutaze učesnika u studiji

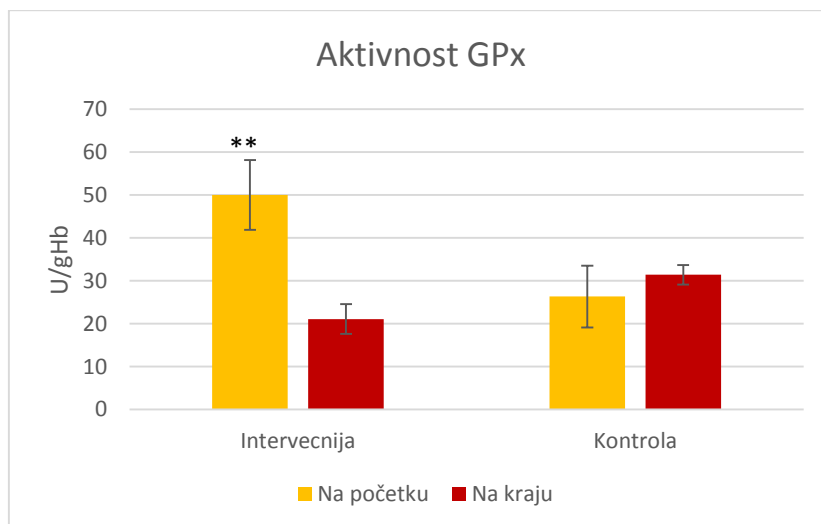
Određivanje aktivnosti SOD (Grafik 8.) u ER učesnika u šestonedeljnoj studiji pokazala je da do kraja studije nije bilo značajnih razlika ni u jednoj od ispitivanih grupa.



Grafik 8. Aktivnost superoksid dismutaze u ER učesnika na početku i na kraju šestonedeljne studije

#### 4.7.2. Aktivnost glutacion peroksidaze učesnika u studiji

Aktivnost GPx u ER (Grafik 9.) u interventnoj grupi se statistički značajno smanjila ( $p < 0.01$ ) nakon 6 nedelja konzumiranja 300 ml/danu soka od nara. U kontrolnoj grupi nije bilo značajnih razlika.

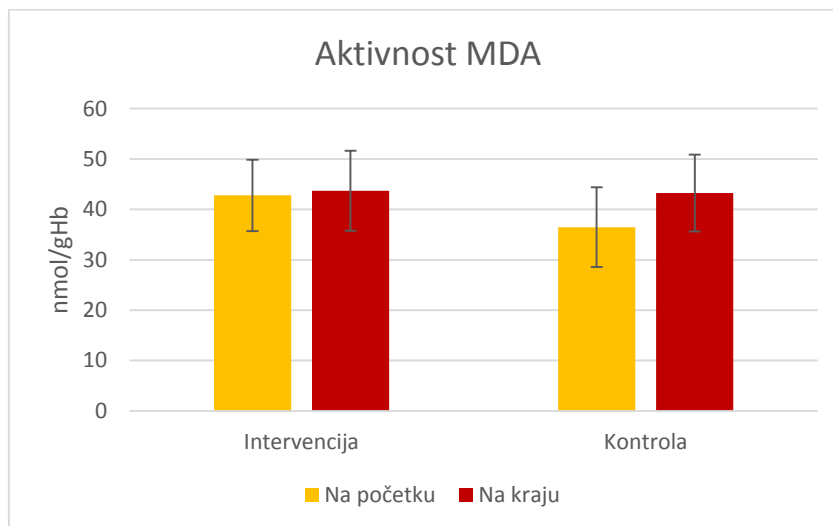


Grafik 9. Aktivnost glutacion peroksidaze u ER učesnika na početku i na kraju šestonedeljne studije

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*\* ( $p < 0.01$ ) predstavlja značajnu razliku u odnosu na početak studije.

### 4.7.3. Stepen lipidne peroksidacije

Koncentracija MDA u ER na kraju studije nije se značajno razlikovala u odnosu na početak, ni u jednoj od ispitivanih grupa (Grafik 10.).



Grafik 10. Koncentracija malonaldehida u ER učesnika na početku i na kraju šestonedeljne studije

### 4.8. Antropometrijski, hematološki i biohemijski parametri, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i eritrocitima kod osoba ženskog pola u šestonedeljnoj studiji

Budući da su veći deo kontrolne grupe činile ispitanice ženskog pola, u nastavku ove disertacije predstavili smo rezultate studije obrađene samo kod osoba ženskog pola.

#### 4.8.1. Antropometrijske karakteristike učesnica u studiji

Antropometrijske karakteristike žena koje su učestvovalе u studiji su prikazane u Tabeli 25. Dobijeni rezultati pokazuju da nije došlo do statistički značajnih promena ni u jednom parametru ni u interventnoj, ni u kontrolnoj grupi.

Tabela 25. Antropometrijske karakteristike učesnica na početku i na kraju šestonedeljne studije

Antropometrijski parametri	Intreventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=11)	Kontrolna grupa na kraju (N=11)
Telesna masa (kg)	83.59 ± 13.75	82.66 ± 14.55	76.69 ± 21.74	73.04 ± 18.07
Telesna visina (cm)	166.59 ± 7.01		166.29 ± 5.61	
Indeks telesne mase BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.98 ± 3.57	32.17 ± 3.56	27.83 ± 7.84	26.50 ± 6.63
Obim kuka (cm)	119.67 ± 8.52	117.33 ± 9.30	109.10 ± 14.98	108.38 ± 11.67
Obim struka (cm)	98.11 ± 8.19	93.57 ± 9.47	90.90 ± 13.63	87.31 ± 11.64
Procenat masti (%)	40.62 ± 7.44	40.87 ± 7.14	35.47 ± 8.99	35.24 ± 7.47
Sistolni krvni pritisak (mm/Hg)	133.33 ± 15.40	122.50 ± 8.62	134.91 ± 120.29	120.29 ± 15.93
Dijastolni krvni pritisak (mm/Hg)	82.78 ± 7.08	81.50 ± 7.61	84.09 ± 11.23	74.43 ± 7.76

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija*

#### **4.8.2. Krvna slika i sedimentacija**

Krvna slika i sedimentacija određivane su neposredno po vađenju krvi (Tabela 26.). Dobijeni rezultati ukazuju na to da 6 nedelja konzumiranja soka od nara nije uticalo za vrednosti hematoloških parametara kod osoba ženskog pola, sa MetS.

Tabela 26. Krvna slika i sedimentacija učesnica na početku i na kraju šestonedeljne studije

Krvna slika i sedimentacija	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=11)	Kontrolna grupa na kraju (N=11)
Le ( $\times 10^9/l$ )	5.92 $\pm$ 1.25	6.35 $\pm$ 1.21	6.09 $\pm$ 1.53	5.75 $\pm$ 1.29
Er ( $\times 10^{12}/l$ )	4.58 $\pm$ 0.31	4.51 $\pm$ 0.32	4.62 $\pm$ 0.22	4.44 $\pm$ 0.23
Hb (g/l)	135.05 $\pm$ 8.28	132.26 $\pm$ 9.23	137.43 $\pm$ 7.72	133.21 $\pm$ 6.38
Hct (l/l)	0.40 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.02
Plt ( $\times 10^9/l$ )	261.63 $\pm$ 52.13	261.53 $\pm$ 64.54	248.00 $\pm$ 41.95	239.71 $\pm$ 36.22
Pct	0.21 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.02
Se	16.44 $\pm$ 10.86	17.29 $\pm$ 13.24	12.36 $\pm$ 5.60	13.79 $\pm$ 5.29

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.*

#### **4.8.3. Biohemijski parametri učesnica u studiji**

Biohemijski parametri u serumu određivani su neposredno nakon vađenja krvi i prikazani su u Tabeli 27. Vrednosti dobijene na kraju studije nisu se značajno razlikovale, ni za jednu od ispitivanih grupa, u odnosu na početak studije.

Tabela 27. Biohemijski parametri u serumu učesnica na početku i na kraju šestonedeljne studije

Biohemijski parametri	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=11)	Kontrolna grupa na kraju (N=11)
Glukoza (mmol/l)	5.42 ± 0.75	5.54 ± 1.00	5.50 ± 1.58	5.22 ± 1.49
Trigliceridi (mmol/l)	2.18 ± 1.04	2.55 ± 1.10	2.14 ± 0.74	2.16 ± 0.74
Holesterol (mmol/l)	6.44 ± 0.91	6.58 ± 1.07	6.40 ± 0.73	5.75 ± 0.58
HDL-holesterol (mmol/l)	1.11 ± 0.21	1.05 ± 0.19	1.29 ± 0.15	1.30 ± 0.21
LDL-holesterol (mmol/l)	3.88 ± 0.78	3.60 ± 1.10	3.45 ± 0.29	3.75 ± 1.11
Urea (mmol/l)	5.31 ± 1.51	4.94 ± 1.30	4.52 ± 1.33	4.56 ± 1.19
Mokraćna kiselina (μmol/l)	324.16 ± 134.14	305.06 ± 72.41	230.48 ± 79.36	255.17 ± 65.12
ALT (U/l)	22.72 ± 14.60	21.27 ± 8.13	20.12 ± 9.01	17.81 ± 7.53
AST (U/l)	21.94 ± 7.97	19.83 ± 4.71	20.19 ± 6.70	19.36 ± 7.91

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.*

#### **4.8.4. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme učesnica u studiji**

Masnokiselinski profil FL plazme učesnica u studiji prikazan je u Tabeli 28. U interventnoj grupi procentualni udeo ukupnih SFA bio je statistički značajno ( $p < 0.05$ ) viši, a udeo AA (20:4) statistički značajno ( $p < 0.05$ ) niži, na kraju studije. Zastupljenost MK u fosfolipidima plazme u kontrolnoj grupi nije se značajno razlikovala na početku i na kraju studije.



Tabela 28. Masnokiselinski profil FL u plazmi učesnica na početku i na kraju šestonedeljne studije

Masne kiseline (mol %)	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=11)	Kontrolna grupa na kraju (N=11)
16:0	27.33 ± 1.40	28.45 ± 1.87	28.55 ± 2.33	26.78 ± 1.12
16:1	0.69 ± 0.40	0.85 ± 0.37	0.35 ± 0.15	0.62 ± 0.36
18:0	17.55 ± 1.57	18.27 ± 2.15	16.05 ± 0.72	14.47 ± 2.44
18:1 (n-9)	8.55 ± 1.16	8.57 ± 1.90	8.07 ± 1.63	8.15 ± 0.38
18:1 (n-7)	2.30 ± 0.50	1.94 ± 0.68	1.93 ± 0.37	2.21 ± 0.33
18:2	21.42 ± 1.92	21.28 ± 2.34	20.95 ± 3.53	21.90 ± 3.36
20:3	3.12 ± 0.65	3.54 ± 1.03	3.90 ± 0.88	3.45 ± 1.48
20:4	13.14 ± 1.67	11.61 ± 0.62*	14.10 ± 1.97	15.24 ± 3.69
20:5	0.77 ± 0.51	0.96 ± 0.62	0.68 ± 0.39	0.81 ± 0.70
22:4	0.97 ± 0.77	0.82 ± 0.73	0.67 ± 0.21	0.84 ± 0.36
22:5	0.80 ± 0.34	0.63 ± 0.29	0.82 ± 0.26	0.97 ± 0.70
22:6	3.37 ± 0.80	3.21 ± 1.21	3.94 ± 0.62	4.58 ± 0.73
SFA	44.8 ± 1.79	46.72 ± 1.69*	44.60 ± 2.11	41.25 ± 2.74
MUFA	11.54 ± 1.81	11.13 ± 2.83	10.34 ± 1.66	10.97 ± 1.30
PUFA	43.58 ± 1.35	42.04 ± 2.61	45.05 ± 3.17	47.78 ± 3.28
n-6	38.65 ± 1.73	39.03 ± 7.18	39.61 ± 3.65	41.43 ± 4.56
n-3	4.93 ± 1.15	4.79 ± 1.48	5.44 ± 1.05	6.35 ± 1.38
n-6/n-3	8.38 ± 2.70	8.30 ± 2.17	7.62 ± 2.21	6.92 ± 2.45

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.

#### 4.8.5. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi učesnica u studiji

Procenjene aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi (Tabela 29.) pokazale su da je došlo do smanjenja aktivnosti  $\Delta 5$  desaturaza nakon šest nedelja konzumiranja soka od nara.

Tabela 29. Aktivnost desaturaza i elongaza u plazmi učesnica u šestonedeljnoj studiji

Desaturaze i elongaze u plazmi	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=11)	Kontrolna grupa na kraju (N=11)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	0.49 $\pm$ 0.11	0.48 $\pm$ 0.14	0.50 $\pm$ 0.11	0.57 $\pm$ 0.08
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	0.15 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.10
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	4.37 $\pm$ 0.95	3.58 $\pm$ 1.29*	3.89 $\pm$ 1.52	5.41 $\pm$ 3.24
elongaza (18:0/16:0)	0.64 $\pm$ 0.07	0.65 $\pm$ 0.11	0.57 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.09

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.*

#### **4.8.6. Masnokiselinski profil fosfolipida u eritrocitima**

Procentualna zastupljenost masnih kiselina u ER učesnica u šestonedeljnoj studiji prikazana je u Tabeli 30. Naši rezultati su pokazali da je procenat DHA (22:6) bio značajno niži a procenat ukupnih MUFA značajno ( $p < 0.05$ ) viši nakon konzumiranja soka, kod osoba ženskog pola sa MetS.

Tabela 30. Masnokiselinski profil FL u membrani ER učesnica u studiji na početku i na kraju šestonedeljne studije

Masne kiseline (mol %)	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=11)	Kontrolna grupa na kraju (N=11)
16:0	22.38 ± 2.07	24.66 ± 2.98	27.08 ± 3.24	28.00 ± 5.52
16:1	0.59 ± 0.23	1.12 ± 0.80	0.74 ± 0.46	0.54 ± 0.40
18:0	19.81 ± 0.91	19.17 ± 1.19	25.90 ± 2.85	21.80 ± 9.70
18:1 (n-9)	16.34 ± 2.45	17.92 ± 0.93	17.79 ± 3.20	18.82 ± 7.45
18:2	13.63 ± 2.08	14.54 ± 1.09	12.43 ± 1.92	14.76 ± 3.58
20:3	2.09 ± 0.38	2.35 ± 0.83	1.16 ± 0.65	1.78 ± 1.01
20:4	15.76 ± 4.45	12.89 ± 2.03	10.56 ± 2.91	12.32 ± 9.95
20:5	0.56 ± 0.11	0.54 ± 0.30	0.26 ± 0.19	0.43 ± 0.51
22:4	3.35 ± 1.02	2.85 ± 0.88	1.29 ± 1.49	0.58 ± 0.19
22:5	1.54 ± 0.69	1.29 ± 0.52	1.09 ± 1.22	0.32 ± 0.26
22:6	3.93 ± 1.14	2.67 ± 1.18*	1.70 ± 1.26	1.17 ± 1.24
SFA	42.19 ± 2.43	43.83 ± 3.86	52.97 ± 4.42	49.81 ± 7.26
MUFA	16.93 ± 2.31	19.04 ± 0.99*	18.53 ± 3.58	18.82 ± 7.35
PUFA	42.21 ± 7.74	37.13 ± 4.38	46.28 ± 4.38	49.65 ± 6.69
n-6	34.83 ± 3.61	32.62 ± 2.78	25.44 ± 4.35	29.45 ± 12.02
n-3	6.04 ± 1.66	4.50 ± 1.77	3.06 ± 1.65	1.92 ± 1.66
n-6/n-3	6.29 ± 2.37	8.03 ± 2.48	11.10 ± 7.10	18.78 ± 5.02

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja statistički značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku u odnosu na početak studije.

#### 4.8.7. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima učesnica u studiji

Aktivnost sistema desaturaza i elongaza u ER prikazana je u Tabeli 31. Nije bilo značajnih razlika u procenjenoj aktivnosti enzima nakon 6 nedelja konzumiranja soka od nara.

Tabela 31. Aktivnost desaturaza i elongaza u ER učesnica u šestonedeljnoj studiji

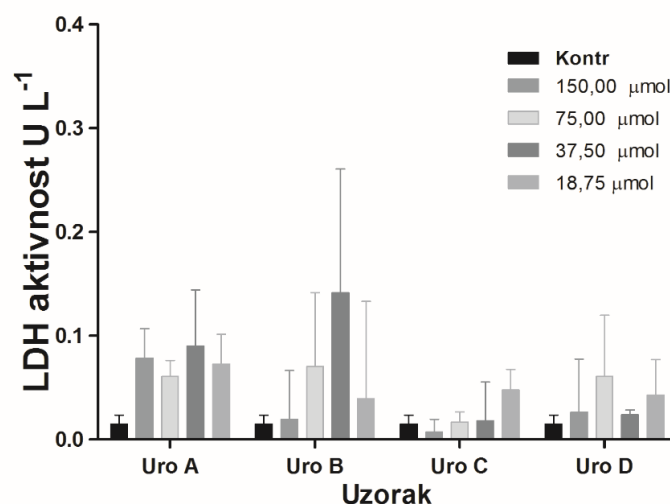
Desaturaze i elongaze u ER	Interventna grupa na početku (N=12)	Interventna grupa na kraju (N=12)	Kontrolna grupa na početku (N=11)	Kontrolna grupa na kraju (N=11)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	0.83 ± 0.12	0.94 ± 0.04	0.78 ± 0.13	0.89 ± 0.07
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	0.16 ± 0.05	0.16 ± 0.06	0.10 ± 0.06	0.12 ± 0.06
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)	7.22 ± 1.86	6.13 ± 2.33	7.81 ± 3.13	5.21 ± 3.95
elongaza (18:0/16:0)	0.89 ± 0.09	0.78 ± 0.07	0.97 ± 0.16	0.98 ± 0.21

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija*

#### 4.9. Efekat urolitina na rast ćelija adenocarcinoma kolona-CACO-2

##### 4.9.1. Laktat dehidrogenazni esej sa pojedinačnim urolitinima

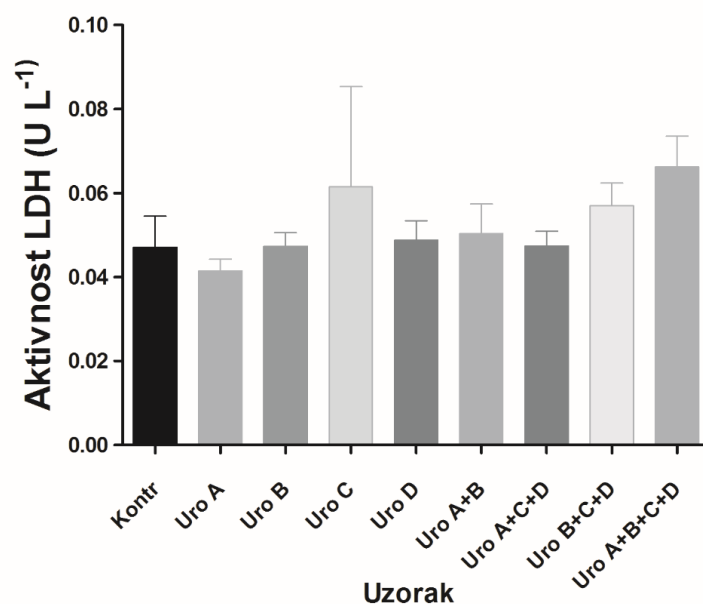
Određivanjem aktivnosti laktat dehidrogenaze u supernatantu CACO-2 ćelija sa pojedinačnim urolitinima nije pokazana statistički značajna citotoksičnost ni za jednu od primenjenih koncentracija (Slika 9.).



Slika 9. Esej ćelijske vitalnosti nakon suplementacije sa pojedinačnim URO; CTRL predstavlja kontrolni uzorak ćelija koja je rasla bez dodavanja urolitina. Uzorci su statistički analizirani analizom varijanse, korišćenjem Kruskal-Valisovog testa sa Turkovim post-hok testom ( $p < 0.05$ ). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

#### 4.9.2. Lakatat dehidrogenazni esej sa mešavinom urolitina

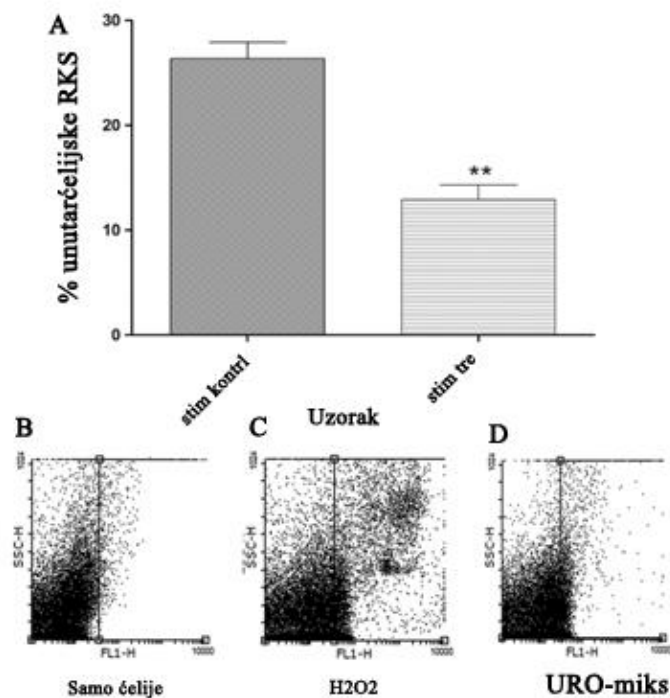
Određivanjem aktivnosti laktat dehidrogenaze, u supernatantu CACO-2 ćelija, sa mešavinom URO, nije pokazana statistički značajna citotoksičnost ni za jednu od primenjenih koncentracija (Slika 10.)



Slika 10. Esej ćelijske vitalnosti nakon suplementacije sa različitim koncentracijama mešavine URO; Kontr predstavlja kontrolni uzorak ćelija koja je rasla bez dodavanja URO. Uzorci su statistički analizirani analizom varijanse, korišćenjem Kruskal-Valisovog testa sa Turkovim post-hoc sestom ( $p < 0.05$ ). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

#### 4.9.3. Određivanje unutrašnjih rekativnih vrsta kiseonika DCFH-DA esejem-kratkoročni tretman

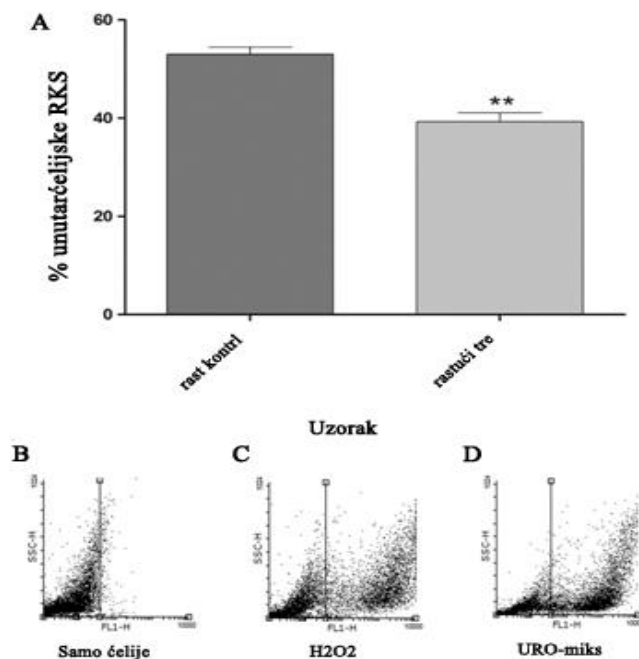
Ćelije koje su tretirane mešavinom URO u kratkoročnom tretmanu, tj. one koje su inkubirane sa URO 2 h, su pokazale statistički značajno ( $p < 0.05$ ) smanjenje produkcije unutarćelijskih ROS, u odnosu na grupu ćelija koje nisu tretirane mešavinom URO (Slika 11.).



Slika 11. *Merenje procenta unutarćelijskih kiseoničnih vrsta floucitometrijom-DCFH-DA esejem, nakon kratkoročnog tretmana sa mešavinom urolitina; A) procenat unutarćelijskih kiseoničnih vrsta meren sa DCFDA B) u kontrolnim ćelijama, C) ćelijama tretiranim sa 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, D) ćelije tretirane sa mešavinom urolitina. SCC—bočno rasuta svetlost, FL1- DCFH-DA fluorescencija. Uzorci su statistički analizirani analizom varijanse, korišćenjem Kruskal-Valisovog testa sa Turkovim post-hok testom ( $p < 0.05$ ). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.*

#### 4.9.4. **Određivanje unutrašnjih rekativnih vrsta kiseonika DCFH-DA esejem-dugoročni tretman**

Slično, ćelije koje su tretirane mešavinom URO u dugoročnom tretmanu tj. one koje su inkubirane sa URO168 h, značajno manje ( $p < 0.01$ ) su produkovale ROS, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija koja nije bila tretirana (Slika 12.).

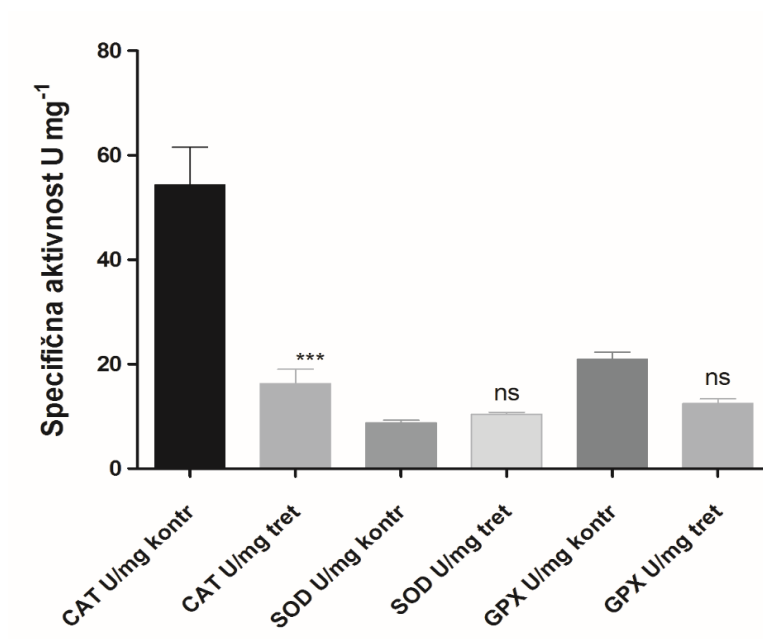


Slika 12. Merenje procenta unutarćelijskih kiseoničnih vrsta floucitometrijom-DCFH-DA esejem, nakon dugoročnog tretmana sa mešavinom urolitina; A) procenat unutarćelijskih kiseoničnih vrsta meren sa DCFDA B) u kontrolnim ćelijama, C) ćelijama tretiranim sa  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , D) ćelije tretirane sa mešavinom urolitina. SCC—bočno rasuta svetlost, FL1- DCFH-DA fluorescencija. Uzorci su statistički analizirani analizom varijanse, korišćenjem Kruskal-Valisovog testa sa Turkovim post-hok testom ( $p < 0.05$ ). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

#### 4.10. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u ćelijskom lizatu caco-2 ćelija

U ćelijskom lizatu određivana je aktivnost enzima antioksidativne zaštite, odnosno aktivnost SOD, CAT i GPx. Rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje ( $p < 0.001$ ) aktivnosti CAT i to u grupi ćelija koje su tretirane URO.





Slika 13. Aktivnost antioksidativnih enzima: CAT, SOD, GPX. Uzorci su statistički analizirani analizom varijanse, korišćenjem Kruskal-Valisovog testa sa Turkovim post-hok sestom ( $p < 0.05$ ). Greške predstavljaju standardnu devijaciju triplikata merenja.

## 5. DISKUSIJA

Naučni podaci potvrđuju promjenjen lipidni i masno kiselinski profil i smanjenu antioksidativnu zaštitu kod osoba sa MetS, koji je identifikovan kao kritično predkliničko stanje tokom kojeg je neophodno intervenirati. Zbog visokog sadržaja polifenolnih komponenti, nar je prepoznat kao jedna od namirnica čiji antioksidanti imaju brojne pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Nedavne studije su pokazale da polifenoli soka od nara, prevashodno EA i njeni metaboliti, mogu da deluju preventivno na nastanak kancera kolona jer menjaju ekspresiju nekoliko gena uključenih u ključne ćelijske procese i kancerogenezu.

Cilj našeg istraživanja bio je ispitivanje efekta konzumiranja soka od nara na antropometrijske, hematološke i biohemijske parametre, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i ER i aktivnost enzima antioksidativne zaštite kod osoba oba pola sa MetS, kao i efekat metabolita nara u *in vitro* uslovima na vijabilnost CACO-2 ćelije i oksidativni stres, u njima.

U prvom delu istraživanja poredili smo antropometrijske, hematološke i biohemijske parametre, MK profil fosfolipida plazme i ER i aktivnost enzima antioksidativne zaštite, zdravih osoba i osoba sa MetS. U skladu sa kriterijuma i dijagnostikovanjem MetS, BMI i procenat masti bili su značajno viši kod osoba sa MetS u odnosu na zdrave ispitanike. Gojaznost je ključni faktor u razvoju MetS i povezan je sa povećanim rizikom od pojave KVB, kancera i dijabetesa (Paniagua 2016). Povišen procenat masti u direktnoj je vezi sa insulinskom rezistencijom, oksidativnim stresom, sistemskom inflamacijom i aterosklerozom (Phillips i sar. 2013). Osim toga, vrednosti obima struka su u direktnoj korelaciji sa krvnim pritiskom, endotelijalnom disfunkcijom, koagulacijom, lipidnim parametrima u plazmi, glukozom, insulinskom senzitivnošću (Savva i sar. 2013). Povišen krvni pritisak, kao jedan od faktora koji doprinose razvoju MetS, u direktnoj je korelaciji sa moždanim udarom (Vishram 2012), povećanjem debljine krvnih sudova i smanjenjem njihovog lumena, smanjenjem elastičnosti velikih krvnih sudova, pogotovu aorte (Uchmanowicz i sar. 2017). Hronično visok krvni pritisak dovodi do nepovratnih vaskularnih promena i povećava rizik od kardiovaskularnih komplikacija (Zdrojewski 2012). Imajući u vidu negativan efekat gojaznosti i povišenog krvnog pritiska na zdravlje

osoba sa MetS, možemo zaključiti da osim redovne medikamentne terapije i određena dijetoterapija i fizička aktivnost mora biti uključena u proces lečenja ovih osoba.

Analiza biohemijskih parametara pokazala je da je koncentracija TG i LDL-holesterola bila značajno viša, dok je koncentracija HDL-holesterola bila značajno niža kod osoba sa MetS u odnosu na zdrave ispitanike. Uloga HDL-holesterola u organizmu je pre svega zaštitna, jer sprečava oksidaciju LDL-holesterola (Ahn i Kim 2016), a osim toga on ima antiinflamatorni, antiapoptotski i antitrombotični efekat (Ahn i Kim 2016). Literaturni podaci govore da smanjenje nivoa HDL-holesterola povećava rizik od KVB dok njegova povećana koncentracija u plazmi smanjuje rizik od infarkta miokarda (Sharrett i sar. 2001, Di Angelantonio i sar. 2009, Ahn i Kim 2016). Takođe, brojne epidemiološke, animalne i kliničke studije pokazale su direktnu korelaciju između povećane koncentracije LDL-holesterola i koronarnih bolesti, moždanog udara i bolesti perifernih arterija (Lewington i sar. 2007, Stone i sar. 2014, Wadhera i sar. 2016). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora i kriterijuma MetS i potvrđuju da je koncentracija HDL-holesterola u negativnoj a koncentracija LDL-holesterola u pozitivnoj korelaciji sa pojavom MetS.

Osim toga, pokazali smo da se masnokiselinski profil u plazmi i ER značajno razlikuje kod osoba sa MetS i zdravih ljudi, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Warensjo i sar. 2005). Naši rezultati pokazuju visok nivo kako ukupnih SFA, tako i pojedinačnih (PAL i SA) kod osoba sa MetS u plazmi, u odnosu na zdrave ispitanike, što pokazuju i drugi autori (Vessby i sar. 2002, Vessby 2003, Riccardi i sar. 2004, Yu i sar. 2012). Poznato je da masnokiselinski profil u FL plazme reflektuje dijetetski unos MK ali i njihovu endogenu sintezu. Visok nivo SFA, koji smo mi opisali, može biti uzrok povećanog dijetetskog unosa, ali i pojačane SFA. Budući da je procenjena aktivnost elongaze, koja katalizuje sintezu SA iz PA, bila veća kod osoba sa MetS, možemo reći da je kod osoba sa MetS verovatno pojačana sinteza SFA. Visok nivo SFA ima brojne negativne efekte na zdravlje i povezan je sa povećanim rizikom od KVB i dijabetesa tipa 2 (Wang i sar. 2003).

Rezultati naše studije pokazali su da procentualni udeo LA, n-6 i ukupnih PUFA, kao i procenjena aktivnost  $\Delta 5$  i  $\Delta 9$  desaturaze bili značajno niži kod osoba sa MetS u odnosu na kontrolnu grupu, dok je procenjena aktivnost  $\Delta 6$  desaturaze bila značajno viša. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji takođe pokazuju da MK profil osoba sa MetS i dijabetesom tipa 2, osim visokog nivoa PA, karakteriše i nizak nivo LA i visok

nivo DGLA i PLA (Vessby i sar. 2002, Vessby 2003, Riccardi i sar. 2004). Osim toga, podaci u literaturi govore da osobe sa MetS imaju nižu procenjenu aktivnost  $\Delta 5$ , a višu procenjenu aktivnost  $\Delta 6$  desaturaze,  $\Delta 9$  desaturaze i elongaze (Warensjo i sar. 2005), što je takođe u skladu sa našim rezultatima. Poznato je da je LA esencijalna masna kiselina n-6 familije, koja se mora unositi hranom u organizam, a iz koje se u prisustvu desaturaza i elongaza sintetišu dugolančane MK. S obzirom na to da PUFA u organizmu imaju čitav niz veoma bitnih bioloških funkcija, kao što su, normalno funkcionisanje mozga, regulacija imunog odgovora, uticaj na kancerogenezu (Benatti i sar. 2004), ovi rezultati negativno utiču na opšte stanje osoba sa MetS. Koliki je značaj aktivnosti  $\Delta 5$  desaturaze govore i istraživanja Warensjo, Riserus i saradnika (Warensjo i sar. 2005) koji su pokazali da je niska procenjena aktivnost  $\Delta 5$  desaturaze značajno predvidela razvoj MetS, kod muškaraca, tokom 20 godina (Warensjo i sar. 2005), dok su Vessby i saradnici pokazali da je smanjena aktivnost  $\Delta 5$  nezavisan faktor rizika za infarkt miokarda (Vessby i sar. 2003).

Masnokiselinski profil ER kod osoba sa MetS pokazao je razlike u procentualnom sadržaju za skoro sve ispitivane MK. Osim visokog sadržaja ukupnih i pojedinačnih SFA, PUFA i ukupnih n-6 PUFA u plazmi ali i u ER, bilo je značajnih razlika i u nivoima ostalih MK. Tako je kod osoba sa MetS dobijen visok nivo PA, a nizak nivo AA, DTA, DPA, DHA i ukupnih PUFA u ER. Masnokiselinski profil ER zavisi od višemesečnog unosa MK i njihove metaboličke aktivnosti, i u velikoj meri utiče na fluidnost i propustljivost bioloških membrana. Imajući u vidu da veći procenat SFA smanjuje fluidnost bioloških membrana i dovodi do smanjenja propustljivosti kroz membranu, možemo reći da osobe sa MetS imaju izmenjen transport kroz ćelijsku membranu. Dugolančane n-6 i n-3 PUFA sintetišu se iz esencijalnih MK, LA i ALA, u prisustvu istog enzimskog sistema mikrozomalnih desaturaza i elongaza. Afinitet ovih enzima veći je za MK n-3 familije u odnosu na n-6 familiju. Prekomerno unošenje n-6 PUFA može smanjiti elongaciju i desaturaciju ALA i time dovesti do deficita n-3 PUFA. Zbog toga je, za optimalno funkcionisanje organizma, osim adekvatnog unosa MK, jako važno da postoji balans između n-6 i n-3 PUFA. Jedna od važnih uloga masnih kiselina je sinteza PG. Kao što je već rečeno, iz AA se u organizmu sintetišu prostaglandini E2 serije i leukotrijeni B4 serije koji mogu uticati na produkciju proinflamatornih (TNF- $\alpha$ , IL-1b, a posebno IL-6) i imunomodulatornih citokina, i time utiču na funkcionisanje imunog sistema (Kogteva

i Bezgulov 1998). Sa druge strane, EPA je prekursor antiinflamatornih eikozanoida: PGE3 i leukotrijena B5 serije. U našoj studiji nivo EPA bio je značajno viši kod osoba sa MetS nivo DPA, DHA i ukupnih n-3 PUFA bio je značajno niži kod osoba sa MetS. Literaturni podaci govore da postoji negativna korelacija između ukupnih n-3 PUFA i DHA u fosfolipidima seruma i BMI, sa obimom struka, i gojaznošću kod osoba sa MetS (Yu i sar. 2012), kao i da n-3 PUFA povećavaju oksidaciju masti i mogu smanjiti količinu masti kod gojaznih žena (Kunesova i sar. 2006). Osim toga, nizak nivo n-3 PUFA u plazmi može biti povezan sa neurološkim pogoršanjem bolesnika sa ishemičnim moždanim udarom (Suda i sar. 2013). Takođe, cirkulišući nivoi EPA i DHA u krvi su obrnuto i značajno povezani sa smanjenim rizikom od pojave KVB (De Oliveira Otto i sar. 2013). Animalne i *in vitro* studije ukazuju na zaštitni efekat n-3 PUFA na progresiju tumora (Ip 1997). Nizak nivo ukupnih n-3 PUFA kod osoba sa MetS može ukazivati na niži unos n-3 MK. Međutim, imajući u vidu da je u našoj studiji nivo bio EPA viši a nivo DPA i DHA bio niži, kod osoba sa MetS, naši rezultati sugerišu na to da je smanjena konverzija EPA u DPA i DHA, kod osoba sa MetS. U skladu sa tim, možemo reći da je kod osoba sa MetS potrebno povećati unos n-3 PUFA, pre svega DHA, čime bi se smanjile posledice niskog nivoa DHA u organizmu i poboljšalo opšte stanje osoba sa MetS.

Oksidativni stres definisan je kao stanje u organizmu u kome je produkcija slobodnih radikala tolika da prevazilazi sposobnost endogenih i egzogenih antioksidanata da ih eliminišu. U tom slučaju raste količina ROS koji reaguju sa proteinima, lipidima i DNK, pri čemu nastaju molekuli koji imaju toksičan efekat na ćelije i tkiva. Posledice ovih reakcija su promena metabolizma ćelije i potencijalno oštećenje različitih sistema organa (Taniyama i Griendling 2003, Ceriello i Motz2004, Otani 2011). Mnoge studije su pokazale da oštećenja ćelija koja izazvaju ROS imaju direktnu ulogu u razvoju i napredovanju mnogih hroničnih bolesti, uključujući aterosklerozu, hipertenziju, insulinsku rezistenciju, dijabetes tip 2 (Urakawa i sar. 2003), ali i MetS (Ford i sar. 2003). U našoj studiji, aktivnost enzima antioksidativne zaštite u ER značajno se razlikovala između ispitivanih grupa. Tako je aktivnost SOD bila značajno viša, dok je aktivnost CAT bila značajno niža kod osoba sa MetS. Osim toga, aktivnost GPx bila je viša kod osoba sa MetS ali ta razlika nije bila statistički značajna. Slično nama i drugi autori su pokazali da je kod osoba sa MetS, povećana aktivnost SOD u odnosu na zdrave ispitanike (De

Fonseca i sar. 2014). Osim toga, osobe sa MetS imaju niži nivo vitamina C i E i nekih karotenoida, čak i nakon dijetetske intervencije i povećanja unosa voća i povrća (Ford i sar. 2003). Sa druge strane, studija na modelu pacova kod kojih je hranom indukovana MetS, pokazala je da je kod ovih životinja povećana produkcija ROS sa jedne strane i smanjena aktivnost SOD i GPx sa druge strane (Roberts i sar. 2006). Visoka aktivnost SOD kod osoba sa MetS, koju smo opisali u ovoj disertaciji, može biti razlog visoke koncentracije  $O_2^-$  sa jedne strane, ali i očuvanja normalne enzimske aktivnosti sa druge strane, koja je omogućila prevođenje  $O_2^-$  u  $H_2O_2$ . Međutim, naši rezultati su pokazali značajno niži nivo CAT kod osoba sa MetS, dok se nivo GPx nije značajno razlikovao između zdravih i osoba sa MetS. Niži nivo CAT potvrđuje tvrdnje drugih autora da je u MetS poremećen antioksidativni odbrambeni sistem. Imajući u vidu da se nivo GPx nije značajno razlikovao između dve grupe ispitanika, možemo reći da je u našoj studiji aktivnost enzima antioksidativne zaštite bila samo delimično promenjena.

Poznato je da ishrana igra ključnu ulogu ne samo u održanju fiziološke ravnoteže već i u prevenciji mnogih bolesti (Sahebkar i sar. 2016). Brojni literaturni podaci ukazuju na potencijalne terapijske efekte mikronutrijenata iz hrane, na smanjenje rizika od razvoja KVB ali i drugih patoloških stanja koja su povezana sa oksidativnim stresom (Grassi i sar. 2010). Jedan od prirodnih proizvoda za koga je potvrđeno da obiluje antioksidativnim materijama je nar, (Saxena i Vikram 2004). U novije vreme nar predstavlja jedan od prirodnih proizvoda čiji se antimikrobni, antibakterijski, antiviralni, antiinflamatorni, antikancerogeni, kao i protektivni efekat na gojaznost, proučavaju širom sveta.

U skladu sa tim naša dalja istraživanja odnosila su se na ispitivanje efekta soka od nara na antropometrijske, hematološke i biohemijske parametre, vrednosti krvnog pritiska, masnokiselinski profil FL plazme i ER i procenu aktivnosti elongaza i desaturaza u plazmi i ER kod osoba sa MetS, najpre u trajanju od 2 nedelje. Rezultati ove studije pokazali su da se antropometrijske karakteristike i vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, nisu značajno razlikovali između ispitivanih grupa na početku i na kraju studije. Analizom hematoloških parametara pokazali smo da je broj ER i hematokrit bio značajno niži u interventnoj grupi na kraju studije, ali i da su te vrednosti bile u okvirima referentnih. Sasvim suprotno, Manthou i saradnici (Manthou i sar. 2017) pokazali su da konzumiranje 500 ml soka od nara u trajanju od 14 dana, dovodi do povećanja broja ER, Hb i hematokrita kod zdravih osoba, sugerišući da nar može prevenirati degradaciju ER ili čak

stimulisati eritropoezu kod zdravih osoba. Osim toga, ranije je pokazano da visoka koncentracija polifenola povećava otpornost ER na oksidativni stres, a da flavonoidi direktnim vezivanjem za Hb, štite isti od oksidativnih agenasa (Manthou i sar. 2017). Sa druge strane, poznato je da povećanje ROS može doprineti kraćem životu ER u nekim patološkim stanjima, kakva je npr. anemija izazvana nedostatkom gvožđa (Nagababu i sar. 2008). Razloge disproporcije u rezultatima između studija, možemo tražiti u količini soka, kao i činjenici da su u našoj studiji učestvovali osobe sa MetS u poređenju sa prethodnom studijom u kojoj su učestvovali zdravi ispitanici. U skladu sa time potrebna su dalja ispitivanja, sa različitom količinom soka i dužinom studije, koja bi doprinela boljem razumevanju uticaja biološki aktivnih molekula iz soka od nara na kompletnu krvnu sliku u različitim patološkim stanjima.

Dalje, analiza biohemijskih parametara pokazala je značajno smanjenje koncentracije LDL-holesterola i aktivnosti AST na kraju studije, kod osoba koje su konzumirale sok. Ostali biohemijski parametri nisu se razlikovali u ispitivanim grupama, na početku i na kraju studije. Literaturni podaci koji govore o efektu koji sok od nara ima na lipidni profil nisu konzistentni. Tako, Sahebkar i saradnici (Sahebkar i sar. 2016) u meta-analizi koja je uključila 12 nasumičnih studija, pokazuju da konzumiranje soka od nara ne utiče na lipidni profil, ni kod zdravih ispitanika, tako ni kod gojaznih, umereno gojaznih, osoba sa hiperlipidemijom, ali ni osoba sa hipertenzijom. Studije su pokazale da nakon 6 nedelja konzumiranja 200 ml soka od nara i 8 nedelja uzimanja 40 g koncentrata soka od nara, došlo do značajnog smanjenja LDL i ukupnog HOL (Esmailzadeh i sar. 2004, Parsaeyan i sar. 2012) kod pacijenata sa dijabetesom tip 2 koji su razvili hiperlipidemiju. Pored toga, zabeleženo je da polifenoli iz nara, kao što je galna kiselina, smanjuju ukupni HOL, TG i LDL-holesterol kod gojaznih miševa (Jang i sar. 2008). Prema našim saznanjima, do sada je sprovedena samo jedna studija koja je ispitivala efekat soka od nara na lipidni profil, kod odraslih osoba sa MetS. Njihovi rezultati su pokazali da konzumiranje 500 ml soka, u trajanju od 7 dana, dovelo do povećanja koncentracije TG (Moazzen i Alizadeh 2017). Već smo spomenuli da je povišena koncentracija LDL-holesterola povezana sa povećanim rizikom od razvoja koronarne bolesti srca, jednog od najčešćih uzroka smrti širom sveta. Osim toga, meta-analiza koja je uključila 26 kliničkih studija pokazala je da je za svako smanjenje LDL-holesterola od 1mmol/l, rizik od bilo kakvog kardiovaskularnog događaja smanjen za 20 %, a smrtnost je smanjena za 10 %, (Delahoy

i sar. 2009). Imajući u vidu da se koncentracija LDL-holesterola u našoj studiji, smanjila značajno ali za samo 0,25 mmol/l, još uvek ne možemo govoriti o uticaju soka na smanjenje rizika nekog od eventualnih KVB ili stopi smrtnosti. Mehanizam kojim sok od nara deluje na koncentraciju lipida nije sasvim razjašnjen, ali se pretpostavlja da se odvija preko PPARs (*engl.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), koji su osnovni modulatori metabolizma lipida (Hsu i Huang 2007). Naime, smatra se da se punična i galna kiselina iz nara vezuju za PPAR- $\alpha$  i time ga aktiviraju, koji onda aktivira transkripcione faktore a oni ekspresiju gena koji su uključeni u metabolizam lipida (Viladomiu i sar. 2013). Među genima koje reguliše PPAR nalaze se geni koji kodiraju: apolipoproteine APOA1, APOA2 i APOA5, enzime uključene u oksidaciju MK (acil-CoA oksidaza, karnitin palmitoil transferaza-I i II), enzime potrebne za desaturaciju MK kao što je MK acil CoA-desaturaza ( $\Delta 6$ ) i stearoil-CoA desaturaza ( $\Delta 9$ ), geni koji su uključeni u metabolizam HDL-a i sintezu ketonskih tela (Jansen CL 2002, Majkic-Singh N 1994). Naši rezultati su u skladu sa navedenim tvrdnjama, jer smo analizom masnokiselinskog profila fosfolipida plazme pokazali da je procenjena aktivnost  $\Delta 9$  desaturaze značajno viša na kraju studije, što znači da sok od nara koji su konzumirali naši ispitanici tj. njegove aktivne komponente, mogao da dovede do povećane sinteze  $\Delta 9$  desaturaze kod osoba sa MetS. Poznato je da MK profil fosfolipida plazme reflektuje dijetarni unos i ednogenu sintezu u prethodnih nekoliko dana do par nedelja, a da MK profil u ER reflektuje dijetarni unos i sintezu MK do 3 meseca. Zbog toga razlog smanjenja nivoa DHA u plazmi, koje smo dobili na kraju interventnog perioda, može biti u činjenici da aktivne komponente nara možda mogu da utiču i na aktivnost drugih enzima koji su uključeni u biosintezu MK, odnosno elongaza i desaturaza. Sa druge strane, naši rezultati su pokazali da je procentualna zastupljenost DGLA i DHA u ER bila značajno viša na kraju studije u interventnoj grupi. Imajući u vidu da su ER prva linija odbrane organizma od štetnog dejstva slobodnih radikala, viši nivo dugolančanih MK može poticati od protektivnog dejstva polifenola soka od nara na membranu ER, tj. od njihove sposobnosti da inaktiviraju slobodne radikale i tako smanje stepen oksidacije PUFA. Analiza aktivnosti enzima antioksidativne zaštite na početku i na kraju studije pokazala je da je nivo GPx bio značajno niži na kraju studije u interventnoj grupi, dok se aktivnost ostalih enzima, kao i MDA nisu značajno razlikovali na početku i na kraju studije. Rezultati drugih autora takođe pokazuju da nar dovodi do smanjenja aktivnosti enzima



antioksidativne odbrane (SOD i GPx) kod dijabetesnih pacova, nakon 4 nedelje suplementacije (Mollazadeh i sar. 2017). Osim toga Kakkar i sar., 1997 su pokazali da je kod pacova koji su 6 nedelja konzumirali nara, nakon prve nedelje najpre došlo do povećanja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, ali je kasnije ta aktivnost opadala (Kakkar i sar. 1997). Iako tačan mehanizam na koji deluju polifenoli iz nara nije sasvim razjašnjen, jedan od načina je da oni doniraju elektron iz OH grupe fenolnih prstenova, slobodnom radikalu kao što je  $O_2^{\bullet-}$  ili  $OH^{\bullet}$ . Na taj način dolazi do stabilizacije ili inaktiviranja slobodnih radikala čime se zaustavljaju slobodno-radikalske lančane reakcije i tako smanjuju oksidativna oštećenja proteina, lipida i DNK molekula (Nijveldt i sar. 2001, Castaneda-Ovando i sar. 2009). Pored toga, glavna bioaktivna komponenta nara, punikalagin, poznat je kao čistač i Fe helator vodonik-peroksida (Cao i sar. 2015). Mi nismo određivali koncentraciju slobodnih radikala u cirkulaciji, ali možemo pretpostaviti da su polifenoli prisutni u soku mogli da vežu određenu količinu  $H_2O_2$  zbog čega se aktivnost GPx smanjila.

Imajući u vidu naše dosadašnje rezultate ali i rezultate drugih autora, ukazala se potreba za nastavkom istraživanja koja su podrazumevala organizovanje studije u trajanju od 6 nedelja sa istom količinom soka, kod osoba sa MetS.

Slično rezultatima prve studije, rezultati druge studije u trajanju od 6 nedelja, nisu pokazali značajne promene u vrednostima antropometrijskih parametara kako kod svih ispitanika, tako ni kada smo analizirali grupu u kojoj su bile samo osobe ženskog pola. Osim toga, iako je nekoliko studija pokazalo da se krvni pritisak kod osoba sa visokim rizikom od KVB (Aviram i Dornfeld 2001), kod osoba sa MetS (Moazzen i Alizadeh 2017), kao i kod zdravih ispitanika (Lynn i sar. 2012), snižava nakon konzumiranja soka od nara, u našoj studiji nije bilo takvog efekta. Slično našim rezultatima, Basu i saradnici (Basu i sar. 2013) nisu pokazali efekat nara na krvni pritisak kod pacijenata sa dijabetesom tip 2. Mehanizam kojim neki polifenoli, kao što su rezervatrol i kvercetin, mogu da izazovu vazodilataciju i normalizuju krvni pritisak zasnovan je na neutralizaciji superoksid anjon radikala iz cirkulacije, čime se povećava bioraspoloživost jednog od najsnažnijih vazodilatatora, azot oksida (Chen i Pace-Asciak 1996). Pored toga, neki polifenoli mogu da indukuju ekspresiju gena za endotelnu azot oksid sintazu (*engl.* endothelial nitric oxide synthase eNOS), čime imaju up-regulatorni efekat na nivo NO (Olszanecki i sar. 2002). Kakav će efekat soka od nara biti na krvni pritisak verovatno

zavisi od količine soka koji se konzumira, sadržaja i prirode fenolnih jedinjenja u njemu, kao i od dijagnoze osoba koje se ispituju.

Slično rezultatima prve studije i u drugoj je došlo do smanjenja nivoa Hb, ali su te vrednosti bile u okvirima referentnih. Osim toga, nivo glukoze u interventnoj grupi bio je značajno viši na kraju studije kod svih ispitanika, pri čemu su i te vrednosti bile u okviru referentnih. Sa druge strane, koncentracija lipida nije se značajno menjala tokom studije. Iako je u kraćoj studiji došlo do značajnog smanjenja koncentracije LDL-holesterola u plazmi, u studiji koja je trajala šest nedelja LDL-holesterol bio je niži samo u grupi žena, na kraju studije, ali te razlike nisu bile statistički značajne. Hipoholesterolemijski efekat nekih polifenola, posebno procijanidina koji imaju veliku molekulsku masu, zasnovan je na činjenici da takvi molekuli smanjuju resorpciju HOL u crevima (Ogino i sar. 2007). Takođe nekoliko autora je ukazalo da smanjen nivo TG potiče od smanjene regulacije acetil CoA karboksilaze pri čemu kao posledica dolazi do sprečavanja akumulacije TG u jetri (Aoun i sar. 2010). Disproporcija među rezultatima može poticati od različitog sadržaja nekih polifenola u različitim sortama nara, a u svakom slučaju zavisi i od zdravstvenog stanja i patologije ispitanika.

Konzumiranje soka od nara dovelo je do značajnog povećanja relativne količine ukupnih SFA u FL plazme, kod svih ispitanika kao i kod osoba ženskog pola. Iako je nivo SFA u FL plazme obično povezan sa pojavom visokog stepena rizika za koronarne bolesti srca (Clarke i sar. 2009), nedavne studije i meta analiza nisu pokazale značajnu povezanost između unosa SFA i pojave ovih oboljenja (De Souza i sar. 2015). Povišen nivo SFA, može biti rezultat njihove smanjene konverzije SFA u MUFA, što se dešava u uslovima smanjene aktivnosti  $\Delta 9$  desaturaze. Međutim, budući da se sadržaj ukupnih MUFA nije značajno razlikovao na početku i na kraju studije, pri čemu je prva studija potvrdila da nar utiče na aktivnost nekih enzima koji su uključeni u sintezu PUFA, pretpostavljamo da je povećanje nivoa ukupnih SFA posledica povećane aktivnosti elongaze koje su uključene u sintezu, pre nego smanjena aktivnost  $\Delta 9$  desaturaze. Već smo ranije sugerisali da postoji velika mogućnost da aktivne komponente nara mogu uticati na aktivnost enzima koji su uključeni u biosintezu dugolančanih PUFA, kao i da je jedan od tih enzima upravo elongaza. Stoga još jednom podvlačimo da su neophodna dalja istraživanja koja bi podrazumevala praćenje efekta polifenola nara na ekspresiju gena koji kodiraju enzime neophodne za sintezu MK.

Osim toga naši rezultati su pokazali da se nivo AA kao i nivo  $\Delta 5$  desaturaze značajno smanjio u plazmi nakon interventnog perioda, kod svih ispitanika i kod osoba ženskog pola. Arahidonska kiselina je neposredni prekursor eikozanoida kao što su leukotrijeni B4 (LTB4), tromoboksani A2 i PGE2, poznatiji kao potencijalni medijatori inflamacije, vazokonstrikcije i agregacije trombocita (Kawakami 2005). Literaturni podaci govore da je za osobe sa metaboličkim sindromom karakteristično stanje hronične inflamacije blagog stepena i povećana proizvodnja nekih proinflamatornih faktora (Monteiro i sar. 2010) Rezultat našeg istraživanja od posebnog je značaja za osobe sa MetS, jer smanjenje nivoa AA možda može voditi sniženju inflamacije. Kod osoba ženskog pola, došlo je do značajnog povećanja sadržaja ukupnih MUFA i značajnog smanjenja sadržaja DHA u fosfolipidima membrane eritrocita, nakon konzumiranja soka od nara u trajanju od 6 nedelja. Poznato je da je povećan sadržaj MUFA u direktnoj korelaciji sa smanjenim rizikom od KVB, kao i da MUFA deluju protektivno na rad srca (Hu i sar. 1997). Kao što smo već pomenuli, visok sadržaj MUFA uglavnom potiče od povećane aktivnosti  $\Delta 9$  desaturaze. Iako literaturni podaci govore o pozitivnom uticaju soka od nara na smanjenje nivoa TBARS i kod zdravih (Aviram i sar. 2000) i kod osoba koje imaju dijabetes (Fenercioglu i sar. 2010), u našoj studiji nije bilo takvog efekta. Još je pokazano da osobe, sa smanjenim rizikom od bolesti srca, ukoliko su dugoročno konzumirale sok od nara imaju statistički značajan pad u proizvodnji lipidnih peroksida nakon 12 meseci konzumacije (Davidson i sar. 2009). Smanjenje nivoa MDA u plazmi je takođe pokazano u studiji koja je trajala četiri nedelje i u kojoj su gojazne osobe koristile polifenolski ekstrakt bogat elagitaninima (Heber i sar. 2007). Polifenoli inaktiviraju ROS kao što su  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet-}$  i peroksinitriti.

Neusaglašenost koja postoji između studija, zavisi od patološkog stanja ali i od drugih faktora kao što je metodologija koja se primenjuje za određivanje nivoa lipidne peroksidacije, starost ispitanika, navika u ishrani.

Slično rezultatima prve studije, i nakon 6 nedelja konzumiranja soka od nara, došlo je do smanjenja aktivnosti GPx, što potvrđuje činjenicu da aktivne komponente nara heliraju  $H_2O_2$  i time smanjuju potrebu za hidrolizom istog od strane GPx.

Antioksidativnu aktivnost nara ispitivali smo i u *in vitro* uslovima, tretirajući CACO-2 ćelije metabolitima EA, kakvi su URO A, B, C i D.

Kao biomarker efikasnosti URO u eliminaciji slobodnih radikala, merena je proizvodnja ROS unutar ćelija. Potencijalni zaštitni efekat URO je praćen kroz dva tipa tretmana: dugoročnu inkubaciju koja predstavlja hroničnu preventivnu upotrebu mešavine URO; i kratkoročnu inkubaciju koja predstavlja moguću terapeutsku primenu te iste mešavine. Kod svih merenja CACO-2 ćelije su tretirane sa “radikalnim inducerom”  $H_2O_2$  i preinkubirane sa mešavinom URO koja se smatra fiziološkom, pa samim tim i necitotoksičnom za CACO-2 ćelije. Mešavina URO A, -B, -C, -D dovela je do smanjenja proizvodnje slobodnih radikala izazvanih dodatkom  $H_2O_2$ , odnosno do smanjenja oksidativnog stresa. Poznato je da urolitini imaju hemijsku sposobnost da “sakupljaju” slobodne radikale (Ishimoto i sar. 2012). Kao što je ranije pokazano hemoprotektivna osobina URO nije ograničena samo na neutralisanje ROS, već deluje i na moduliranje aktivnosti enzima (Sasha i sar. 2016). U skladu sa tim i mi smo pokazali da URO utiču na aktivnost enzima antioksidativne odbrane. Naime, u našoj studiji došlo je do smanjenja CAT, koja metaboliše  $H_2O_2$  do vode i do molekuskog kiseonika, verovatno kao posledica direktne interakcije URO i  $H_2O_2$  čime je smanjena njegova koncentracija u ćeliji. Na taj način URO mogu smanjiti oksidativni stres u ćeliji a samim tim imati protektivni efekat na patološka stanja u čijoj se osnovi nalazi oksidativni stres.

## 6. ZAKLJUČAK

Shodno postavljenim ciljevima, rezultati dobijeni u ovoj tezi upućuju na sledeće zaključke:

Osobe sa MetS imaju veći:

- obim struka, obim kuka, sistolni krvni pritisak, indeks telesne mase i procenat masti,
- koncentraciju TG, ukupnog holesterola, LDL-holesterola u serumu
- nivo PA, SA i SFA u plazmi
- nivo PA i SA, SFA, PLA, EPA u ER
- procenjenu aktivnost  $\Delta 6$  desaturaze i elongaze u plazmi
- procenjenu aktivnost  $\Delta 5$  u ER
- aktivnost SOD u ER

i niži nivo:

- HDL-holesterola.
- nivo LA i n-6 PUFA u plazmi,
- nivo LA, AA, DTA, DPA, DHA i ukupnih PUFA, n-6 i n-3 u ER
- procenjene aktivnosti  $\Delta 9$  i  $\Delta 5$  desaturaze u plazmi,
- procenjene aktivnosti  $\Delta 9$  u ER,

u odnosu na zdrave ispitanike.

Konzumiranje soka od nara u trajanju od dve nedelje dovelo je do:

- značajnog smanjenja koncentracije LDL-holesterola u serumu
- povećanja procenjene aktivnosti  $\Delta 9$  desaturaze u plazmi
- smanjenja nivoa DHA u plazmi
- povećanje procentualne zastupljenosti DGLA i DHA u ER
- povećanja procenjene aktivnosti  $\Delta 6$  desaturaze i elongaze u ER
- smanjenje procenjene aktivnosti  $\Delta 5$  desaturaze u ER
- smanjenja aktivnosti GPx u ER

a nakon šest nedelja:

- smanjenje nivoa AA u plazmi
- povećanje nivoa ukupnih SFA u plazmi
- povećanja nivoa PA, PLA, oleinske kiseline, ukupnih SFA i MUFA u ER
- smanjenje nivoa AA, DPA, DHA i ukupnih PUFA u ER
- smanjenje procenjene aktivnosti  $\Delta 5$  desaturaze u plazmi
- smanjenje procenjene aktivnosti  $\Delta 5$  desaturaze u ER
- smanjenja aktivnosti GPx u ER.

Tretiranje CACO-2 ćelija metabolitima nara, kakvi su urolitin A, B, C, D dovela je do:

- smanjenja proizvodnje ROS i aktivnosti enzima CAT, izazvanih dodatkom  $H_2O_2$ , u *in vitro* uslovima

## 7. LITERATURA

- **Aebi H.** Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology* (edited by Kumar CV, Elsevier Science). 1984; 105:121-126.
- **Abel ED, Peroni O, Kim JK.** Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001; (409):729-733.
- **Ahn N, Kim K.** High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in cardiovascular disease: effect of exercise training. *Int Med Res*. 2016; 5(3):212-215.
- **Alighourchi H, Barzegar M, Abbasi S.** Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *Eur Food Res Technol*. 2008; 227(3):881-887.
- **Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y.** Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2000; 891(1):183-188.
- **Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC.** Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(3):213-25.
- **Andreson PJ, Critchley J, Chan JCN, Cockram CS, Lee ZSK, Thomas GN, et al.** Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obesity Realt Metab Disord*. 2001; 25(12):1782-8.
- **Aoun M, Michel F, Fouret G, Casas F, Jullien M, Wrutniak-Cabello C, et al.** A polyphenol extract modifies quantity but not quality of liver fatty acid content in high-fat-high-sucrose diet-fed rats: possible implication of the sirtuin pathway. *Br J Nutr*. 2010; 104(12):1760-70.
- **Arab L.** Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr*. 2003; 3(3):925S-932S.
- **Arapitsas P, Menichetti S, Vincieri FF, Romani A.** Hydrolyzable Tannins with the Hexahydroxydiphenoyl Unit and the m-Depsidic Link: HPLC-DAD-MS Identification and Model Synthesis. *J Agr Food Chem*. 2007; 55(1):48-55.
- **Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A.** Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46(6):785-90.
- **Arts IC, Hollman PC.** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(1):317s-325s. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate

juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001; 158(1):195-8.

- **Aviram M, Dornfeld L.** Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001; 15(1):195-8.
- **Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R et al.** Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(5):1062-76.
- **Bakkalbasi E, Menten O, Artik N.** Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009; 49(3):283-98.
- **Basu A, Newman ED, Bryant AL, Lyons TJ, Betts NM.** Pomegranate Polyphenols Lower Lipid Peroxidation in Adults with Type 2 Diabetes but Have No Effects in Healthy Volunteers: A Pilot Study. *J Nutr Metabolism*. 2013; 2013:7.
- **Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M.** Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23(4):281-302.
- **Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012; 5(1):9-19.
- **Boadi WY, Iyere PA, Adunyah SE.** In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. *J Appl Toxicol*. 2005; 25(1):82-8.
- **Borochoy-Neori H, Judenstein S, Harari M, Bar-Yaakov I, Patil BS, Lurie S, et al.** Climate Effects on Anthocyanin Accumulation and Composition in the Pomegranate (*Punica granatum L.*) Fruit Arils. *J Agric Food Chem*. 2011; 59(10):5323-5334.
- **Boukharta M, Jalbert G, Castonguay A.** Biodistribution of ellagic acid and dose-related inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice. *Nutr Cancer*. 1992; 18(2):181-9.



- **Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I.** Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J Nat Prod.* 2001; 64(7):892-895.
- **Bunaciu RP, Yen A.** Retinoid Chemoprevention: Who Can Benefit? *Curr Pharmacol rep.* 2015; 1(6):391-400.
- **Bunker VW.** Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci.* 1992; 49(4):299-312.
- **Calder PC.** N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids.* 2003; 38(4):343-52.
- **Cao K, Xu J, Pu W, Dong Z, Sun L, Zang W, et al.** Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. *Sci Rep.* 2015; 5:14014.
- **Carr A, Frei B.** Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J.* 1999; 13(9):1007-24.
- **Castaneda-Ovando A, De Lourdes Pacheco-Hernandez M, Paez-Hernandez ME, Rodriguez JA, Galan-Vidal CA.** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 2009; 113(4):859-871.
- **Cathcart R, Schwieters E, Ames BN.** Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem.* 1983; 134(1):111-116.
- **Cerda B, Llorach R, Ceron JJ, Espin JC, Tomas-Barberan FA.** Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr.* 2003; 42(1):18-28.
- **Ceriello A, Motz E.** Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(5):816-23.
- **Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC.** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 2002; 10(3):178-182.
- **Chen CK, Pace-Asciak CR.** Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol.* 1996; 27(2):363-6.
- **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al.** The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention,

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*. 2003; 289(19):2560-72.

- **Christopherson SW, Glass RL.** Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J Dairy Sci*. 1969; 52(8):1289-1290.
- **Chun OK, Kim DO, Lee CY.** Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(27):8067-72.
- **Clarke R, Shipley M, Armitage J, Collins R, Harris W.** Plasma phospholipid fatty acids and CHD in older men: Whitehall study of London civil servants. *Br J Nutr*. 2009; 102(2):279-84.
- **Clifford MN, Scalbert A.** Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr*. 2000; 80(7):1118-1125.
- **Comhair SA, Ricci KS, Arroliga M, Lara AR, Dweik RA, Song W, et al.** Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(3):306-313.
- **Cook HW, McMaster CR.** Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (4<sup>th</sup> edition), (edited by Vance DE, Vance JE, Elsevier Science). 2002; vol 36
- **Dafny-Yalin M, Glazer I, Bar-Ilan I, Kerem Z, Holland D, Amir R.** Color, sugars and organic acids composition in aril juices and peel homogenates prepared from different pomegranate accessions. *J Agr Food Chem*. 2010; 58(7):4342-4352.
- **Danesi F, Kroon PA, Saha S, De Biase D, D'Antouno LF, Bordoni A.** Mixed pro- and anti-oxidative effects of pomegranate polyphenols in cultured cells. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(11):19458-71.
- **Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger M, et al.** Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2009; 104(7): 936-42.
- **Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J.** Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Net Revc Cardiol*. 2009; 6(9):599-608.

- **De Fonseca LJ, Nunes-Souza V, Guedes Gda S, Mota-Gomes MA, Rabelo LA.** Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:898501.
- **Delahoy PJ, Magliano DJ, Webb K, Grobler M, Liew D.** The relationship between reduction in low-density lipoprotein cholesterol by statins and reduction in risk of cardiovascular outcomes: An updated meta-analysis. *Clin Ther.* 2009; 31(2):236-44.
- **De Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, Kishibe T, et al.** Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ;* 2015; 351:h3978.
- **Despres JP.** Dyslipidaemia and obesity. *Bailleres Clin Endocrinol Metab.* 1994; 8(3):629-60.
- **De Oliveira Otto MC, Wu JH, Baylin A, Vaidya D, Rich SS, Tsai MY, et al.** Circulating and dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and incidence of CVD in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(6):e000506.
- **Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I.** Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(6):1203-8.
- **Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al.** Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *Jama.* 2009; 302(18):1993-2000.
- **Dixon RM, August PW, Rajagopalan B, Radda GK.** Abnormal phosphomonoester signals in <sup>31</sup>P MR spectra from patient with hepatic lymphoma. A possible merker of liver infiltration and response chemotherapy. *Br J Cancer.* 1991; 185:299-303.
- **Dickinson DA, Forman HJ.** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(5-6):1019-26.

- **Di Nunzio M, Toselli M, Verardo V, Caboni MF, Bordoni A.** Counteraction of oxidative damage by pomegranate juice: influence of the cultivar. *J Sci Food Agr.* 2013; 93(14):3565-3573.
- **Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, et al.** Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* 1998; 80(1):S77-112.
- **Dixon RM, Angust PW, Rajagopalan B, Radda GK.** Abnormal phosphomonoester signals in <sup>31</sup>P MR spectra from patient with hepatic lymphoma. A possible marker of liver infiltration and response chemotherapy. *Br J Cancer.* 1991; 63(6):953-8.
- **Djordjevic VB.** Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004; 237:57-89.
- **Doyle B, Griffiths LA.** The metabolism of ellagic acid in the rat. *Xenobiotica.* 1980; 10(4):247-56.
- **Dowhan W, Bogdanov M.** Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (4th Edition)*, (edited by D.E. Vance and J.E. Vance, Elsevier Science), 2002; pp. 1-35.
- **Eberhardt MV, Jeffery EH.** When dietary antioxidants perturb the thiol redox. *J Sci Food Agr.* 2006; 86(13):1996-1998.
- **Elfalleh W, Ying M, Nasri N, Sheng-Hua H, Guasmi F, Ferchichi A.** Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum L.*) seeds. *Int J Food Sci Nutr.* 2011; 62(3):200-206.
- **Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L.** Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *J Med Food.* 2004; 7(3):305-8.
- **Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M (2012).** *European Cardiovascular Disease Statistics 2012.* European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.
- **Evans LM, Cowey SL, Siegal GP, Hardy RW.** Stearate Preferentially Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Nutr Cancer.* 2009; 61(5):746-53.
- **Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C.** Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *Eur J Nutr.* 2007; 46(5):271-8.

- **Faver G, Blancy J, Tournier F, Soula G.** Proliferative effect of high density lipoprotein (HDL) fractions (HDL 1, 2, 3). *Biochim Biophys Acta.* 1989; 1013(2):118-24.
- **Fenercioglu AK, Saler T, Genc E, Sabuncu H, Altuntas Y.** The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *J Endocrinol Invest.* 2010; 33(2):118-24.
- **Fischer UA, Carle R, Kammerer DR.** Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chem.* 2011; 127(2):807-821.
- **Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226(1):497-509.
- **Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW.** The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes.* 2003; 52(9):2346-52.
- **Frassetto LA, Sebastian A.** How metabolic acidosis and oxidative stress alone and interacting may increase the risk of fracture in diabetic subjects. *Med Hypotheses.* 2012; 79(2):189-92.
- **Gerhauser C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauft J, et al.** Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2003; 523-524:163-72.
- **Gil MI, Garcia-Viguera C, Artes F, Tomas-barberan FA.** Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *J Sci Food Agr.* 1995; 68(1):77-81.
- **Gil MI, Tomaas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA.** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(10):4581-9.
- **Goldstein S, Michel C, Bors W, Saran M, Czapski G.** A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Rad Bio Med.* 1988; 4(5):295-303.

- **Gonzales-Sarrias A, Garcia-Villalba R, Nunez-Sanchez MA, Tome-Carneiro J, Zafrilla P, Mulero J, et al.** Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: a crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *J Funct Foods*. 2015; 19(A):225-235.
- **Gonzales-Sarrias A, Espin JC, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT.** Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53(6):686-98.
- **Gonzales-Sarrias A, Nunez-Sanchez MA, Tome-Carneiro J, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC.** Comprehensive characterization of the effects of ellagic acid and urolithins on colorectal cancer and key-associated molecular hallmarks: microRNA cell specific induction of CDKN1A (p21) as a common mechanism involved. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(4):701-16.
- **Grassi D, Desideri G, Ferri C.** Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis. *Nutrients*. 2010; 2(8):889-902.
- **Griffith SC, Owens IP, Thuman KA.** Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol Ecol*. 2002; 11(11):2195-212.
- **Halliwell B.** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*. 1989; 70(6):737-57.
- **Halliwell B.** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990; 9(1):1-32.
- **Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S.** The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 1994; 16(6): 845-50.
- **Hastings N, Agba M, Tocher DR, Leaver MJ, Dick JR, Sargent JR, et al.** A vertebrate fatty acid desaturase with Delta 5 and Delta 6 activities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(25):14304-9.
- **Haug A, Hostmark AT, Harstad OM.** Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis*. 2007; 6:25.
- **Heber D, Seeram NP, Wyatt H, Henning SM, Zhang Y, Ogden LG, et al.** Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol

- dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(24):10050-4.
- **Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS.** Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceut Res.* 1990; 7(9):902-910.
  - **Hodge AM, Simpson JA, Gibson RA, Sinclair AJ, Makrides M, O’Dea K, et al.** Plasma phospholipid fatty acid composition as a biomarker of habitual dietary fat intake in an ethnically diverse cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007; 17(6):415-26.
  - **Hsieg SD, Yoshinaga H.** Waist/height ratio as a simple and useful predictor of coronary heart disease risk factors in women. *Intern Med.* 1995; 34(12):1147-52.
  - **Hsu SC, Huang CJ.** Changes in liver PPAR $\alpha$  mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(2):86-96.
  - **Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, et al.** Dietary Fat Intake and the Risk of Coronary Heart Disease in Women. *N Engl J Med.* 1997; 337(21):1491-9.
  - **Ip C.** Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66(6):1523s-1529s.
  - **Ishimoto H, Tai A, Yoshimura M, Amakura Y, Yoshida T, Hatano T, et al.** Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Biosci Biotech Biochem.* 2012; 76:395-399.
  - **Jang A, Srinivasan P, Lee NY, Song HP, Lee JW, Lee M, et al.** Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid–linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice. *Chemico-Biol Interact.* 2008; 174(2):109-117.
  - **Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM.** Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002; 43(6):1565-75.
  - **Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, et al.** The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2001; 134(12):1106-14.

- **Jovanović SV, Simić MG.** Antioxidants in nutrition. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899:326-34.
- **Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J.** Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci.* 1997; 60(9):667-679.
- **Kang I, Buckner T.** Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. *Adv Nutr.* 2016; 7(5):961-972.
- **Kaufman M, Wiesman Z.** Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J Agr Food Chem.* 2007; 55(25):10405-10413.
- **Kawakami Y, Murakami Y, Kawakami T, Moroyama N, Takiue T, Moritani Y.** Abnormal fatty acid profil of blood cell phospholipidids and dietary fatty acid intake in patients with ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr.* 2005; 37:95-102.
- **Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Abedin L, Li D.** A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *Eur J Clin Nutr.* 2001; 55(2):88-96.
- **Kent C.** Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 1995, 64: 315-343.
- **Kerner J, Hoppel C.** Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1486(1):1-17.
- **Kobayashi M, Sasaki S, Kawabata T, Hasegawa K, Akabane M, Tsugane S.** Single measurement of serum phospholipid fatty acid as a biomarker of specific fatty acid intake in middle-aged Japanese men. *Eur J Clin Nutr.* 2001; 55(8):643-50.
- **Kogteva GS, Bezgulov VV.** Unsaturated fatty acids as endogenous bioregulators. *Biochemistry.* 1998; 63(1):4-12.
- **Konic-Ristic A, Savikin K, Zdunic G, Jankovic T, Juranic Z, Menkovic N, et al.** Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chem.* 2011; 125(4):1412-1417.
- **Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM.** In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(4):1491-500.



- **Kunesova M, Braunerova R, Hlavaty P, Tvrzicka E, Stankova B, Skrha , et al.** The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol Res.* 2006; 55(1):63-72.
- **Lakshmana RA, Sankar GG.** Caco-2 cells: an overview. *Asian J Pharmaceut Res Heal Care.* 2009; 1(2):260-275.
- **Laposata M.** Fatty acids. Biochemistry to clinical significance. *Am J Clin Pathol.* 1995; 104(2):172-9.
- **Lei F, Xing DM, Xiang L, Zhao YN, Wang W, Zhang LJ, Du LJ.** Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Sci.* 2003; 796(1):189-94.
- **Lee WN, Lim S, Bassilian S, Bergner EA, Edmond J.** Fatty acid cycling in human hepatoma cells and the effects of troglitazone. *J Biol Chem.* 1998; 273(33):20929-34.
- **Leeuwenburgh C, Heinecke JW.** Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001; 8(7):829-38.
- **Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, et al.** Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet.* 2007; 370(9602):1829-39.
- **Lindsay ER, Andrea CB, Vera CM.** Inflammation, obesity, and fatty acid metabolism: influence of n-3 polyunsaturated fatty acids on factors contributing to metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007; 32: 1008–1024.
- **Liu J, Hinkhouse MM, Sun W, Weydert CJ, Ritchie JM, Oberley LW, et al.** Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. 2004; 16(3):239-50.
- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-275.
- **Lynn A, Hamadeh H, Leung WC, Rusell JM, Barker ME.** Effects of pomegranate juice supplementation on pulse wave velocity and blood pressure in

- healthy young and middle-aged men and women. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012; 67(3):309-14.
- **MacFarlane DP, Forbes S, Walker BR.** Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 2008; 197(2):189-204.
  - **Majkić-Singh N.** Medicinska biohemija: Metabolizam lipida i lipoproteina. Beograd: Farmaceutski fakultet, zavod za medicinsku biohemiju; 1994, 170-225.
  - **Manthou E, Georgakouli K, Deli CK, Sotiropoulos A, Fatouros IG, Kouretas D, et al.** Effect of pomegranate juice consumption on biochemical parameters and complete blood count. *Exp Ther Med.* 2017; 14(2):1756-1762.
  - **Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32(8):595-603.
  - **McCord JM, Keele BB, Fridovich I.** An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971; 68(5):1024-7.
  - **Melgarejo P, Calin-Sanchez A, Vazquez-Araujo L, Hernandez F, Martinez JJ, Legua P, et al.** Volatile composition of pomegranates from 9 Spanish cultivars using headspace solid phase microextraction. 2011; 76(1):S114-S120.
  - **Mele L, Mena P, Piemontese A, Marino V, Lopez-Gutierrez N, Bernini F, et al.** Antiatherogenic effects of ellagic acid and urolithins in vitro. *Arch Biochem Biophys.* 2016; 599:42-50.
  - **Mensink RP, Katan MB.** Effects of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med.* 323(7):439-45.
  - **Mezzetti A, Lapenna D, Romano F, Costantini F, Pierdomenico SD, De Cesare D, et al.** Systemic oxidative stress and its relationship with age and illness. *Associazione Medica "Sabin". J Am Geriatr Soc.* 1996; 44(7):823-7.
  - **Miller DM, Buettner GR, Aust SD.** Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8(1):95-108.
  - **Moazzen H, Alizadeh M.** Effects of Pomegranate Juice on Cardiovascular Risk Factors in Patients with Metabolic Syndrome: a Double-Blinded, Randomized Crossover Controlled Trial. *Plant Food Hum Nutr.* 2017; 72(2):126-133.

- **Mollazadeh H, Boroushaki MT, Soukhtanloo M, Afshari AR, Vahedi MM.** Effects of pomegranate seed oil on oxidant/antioxidant balance in heart and kidney homogenates and mitochondria of diabetic rats and high glucose-treated H9c2 cell line. *Avicenna J Phytomed.* 2017; 7(4):317-333.
- **Monteiro R, Azevedo I.** Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:289645.
- **Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ.** Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(1):216-20.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection E, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106:3143–421.
- **Nagababu E, Gulyani S, Earley CJ, Cutler RG, Mattson MP, Rifkind JM.** Iron-deficiency anaemia enhances red blood cell oxidative stress. *Free Radic Res.* 2008b;42(9):824–9.
- **Nakao M, Takio S, Ono K.** Alkyl peroxy radical-scavenging activity of catechins. *Phytochemistry.* 1998; 48(8):2379-82.
- **Nijveldt RJ, Van Nood ELS, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74(4):418-25.
- **Nikolaidis MG, Mougios V.** Effects of exercise on the fatty-acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med.* 2004; 34(15):1051-76.
- **Nikolic M, Ristic-Medic D, Stanic D, Postic M, Arsic A, Niketic V.** Dietary lipid intake influences the level of cholesterol bound to haemoglobin in human erythrocytes. *Eur J Nutr.* 2008; 47(3):123-130.
- **Nishikawa M, Tamada A, Kumai H, Yamashita F, Hashida M.** Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. *Int J Cancer.* 2002; 99(3):474-9.

- **Oberlies NH, Paine MF.** Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. Los Angeles: edited by Seeram NP, Schulman RN, Heber D, American Chemical Society). *J Nat Prod.* 2007; 70(7):1222.
- **Ogino Y, Osada K, Nakamura S, Ohta Y, Kanda T, Sugano M.** Absorption of dietary cholesterol oxidation products and their downstream metabolic effects are reduced by dietary apple polyphenols. *Lipids.* 2007; 42(2):151-61.
- **Okado-Matsumoto A, Fridovich I.** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001; 276(42):38388-93.
- **Olszanecki R, Gebaska A, Kozlovski VI, Gryglewski RJ.** Flavonoids and nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53(4):571-84.
- **Otani H.** Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(7):1911-26.
- **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1):158-69.
- **Paniagua JA.** Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes.* 2016; 7(19):483-514.
- **Parsaeyan N, Mozaffari-Khosravi H, Mozayan MR.** Effect of pomegranate juice on paraoxonase enzyme activity in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Met Dis.* 2012; 11:11.
- **Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al.** European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J.* 2012; 33(13):1635-701.
- **Perše M.** Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? *BioMed Res Inter.* 2013; 2013:1-9.

- **Phillips CM, Tierney AC, Perez-Martinez P, Defoort C, Blaak EE, Gjelstad IM, et al.** Obesity and body fat classification in the metabolic syndrome: impact on cardiometabolic risk metabotype. *Obesity*. 2013; 21: E154-E161.
- **Pinazzo-Duran MD, Gallego-Pinazo R, Garcia-Medina JJ, Zanon-Moreno V, Nucci C, Dolz-Marco R, et al.** Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging*. 2014; 9:637-52.
- **Petrovic S, Arsic A.** Fatty Acids: Fatty Acids. Oxford: Edited by Caballero B, Finglas PM, Toldra F, Academic Press. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016; pp. 623-631.
- **Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, Vafeiadou K, Tzounis X, Whiteman M, et al.** The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 350(4):960-8.
- **Poyrazoglu E, Gokmen V, Artik N.** Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum L.*) grown in Turkey. *J Food Compos Anal*. 2002; 15(5):567-575.
- **Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H.** Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(7):2200-6.
- **Rasmussen BM, Vessby B, Uusitupa M, Berglund L, Pedersen E, Riccardi G, et al.** Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(2):221-6.
- **Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolucci N, et al.** The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem*. 2004; 385(1):1-10.
- **Riccardi G, Rivellese AA.** Dietary treatment of the metabolic syndrome--the optimal diet. *Br J Nutr*. 2000; 83(1):S143-8.
- **Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA.** Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*. 2004; 23(4):447-56.
- **Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM, Holloway DE.** Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? *Free Radic Res*. 1997; 26(4):381-98.

- **Ristic-Medic D, Vucic V.** Dietary fats and metabolic syndrome. *J Nutr Health Food Sci.* 2013; 1:8-15.
- **Rivellese AA, Maffettone A, Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Berglund L, et al.** Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. *Atherosclerosis.* 2003; 167(1):149-58.
- **Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND.** Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism.* 2006; 55(7):928-34.
- **Roberts CK, Sindhu KK.** Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009; 84(21-22):705-12.
- **Robinson LE, Graham TE.** Metabolic syndrome, a cardiovascular disease risk factor: role of adipocytokines and impact of diet and physical activity. *Can J Appl Physiol.* 2004; 29(6):808-29.
- **Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S.** The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes.* 1998; 47(5): 699-713.
- **Sahebkar A, Simental-Mendia LE, Giorgini P, Ferri C, Grassi D.** Lipid profile changes after pomegranate consumption: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytomedicine.* 2016; 23(11):1103-1112.
- **Sandstrom J, Carlsson L, Marklund SL, Edlund T.** The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. *J Biol Chem.* 1992; 267(25):18205-9.
- **Sasha P, Yeoh BS, Singh R, Chandrasekar B, Vemula PK, Haribabu B, et al.** Gut microbiota conversion of dietary ellagic acid into bioactive phytochemical urolithin A inhibits heme peroxidases. *PLoS One.* 2016; 11(6):0156811.
- **Savva SC, Lamnisos D, Kafatos AG.** Predicting cardiometabolic risk: waist-to-height ratio or BMI. A metaanalysis. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2013; 6: 403-419.
- **Saxena A, Vikram NK.** Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. *J Altern Complement Med.* 2004; 10(2):369-78.
- **Seeram NP, Aronson WJ, Zhang Y, Henning SM, Moro A, Sartippour M, Harris DM, et al.** Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate

- cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(19):7732-7.
- **Seeram NP, Lee R, Heber D.** Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clim Chim Acta.* 2004; 348(1-2):63-8.
  - **Schwartz E, Tzulker R, Glazer I, Bar-Yakov I, Wiesman Z, Tripler E, et al.** Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *J Agr Food Chem.* 2009; 57(19):9197-9209.
  - **Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, et al.** Coronary Heart Disease Prediction From Lipoprotein Cholesterol Levels, Triglycerides, Lipoprotein(a), Apolipoproteins A-I and B, and HDL Density Subfractions; The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 2001; 104(10):1108-13.
  - **Smart RC, Huang MT, Chang RL, Sayer JM, et al.** Disposition of the naturally occurring antimutagenic plant phenol, ellagic acid, and its synthetic derivatives, 3-O-decylellagic acid and 3,3-di-O-methylellagic acid in mice. *Carcinogenesis.* 1986; 7:1663-1667.
  - **Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al.** 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014; 129(25):S1-45.
  - **Stump DD, Fan X, Berk PD.** Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake. *J Lipid Res.* 2001; 42(4):509-20.
  - **Suda S, Katsumata T, Okubo S, Kanamaru T, Suzuki K, Watanabe Y, et al.** Low serum n-3 polyunsaturated fatty acid/n-6 polyunsaturated fatty acid ratio predicts neurological deterioration in Japanese patients with acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2013; 36(5-6):388-93.
  - **Sudheesh S, Vijayalakshmi NR.** Flavonoids from *Punica granatum*—potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia.* 2005; 76(2):181-186.

- **Sun Z.** Aging, arterial stiffness and hypertension. *Hypertension*. 2015; 65(2):252-256.
- **Takić M, Ristić-Medić D, Mandić LJ, Glibetić M, Arsić A, Debeljak-Martačić J, et al.** N-3 polyunsaturated acids in erythrocyte phospholipids are associated with insulin sensitivity in obese patients on a typical Serbian diet, *Arch Biol Sci*. 2009; 67:37-43.
- **Taniyama Y, Griendling KK.** Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003; 42(6):1075-81.
- **Thiebaut AC, Rotival M, Gauthier E, Lenoir GM, Boutron-Ruaulz MC, Joulin V, et al.** Correlation between serum phospholipid fatty acids and dietary intakes assessed a few years earlier. *Nutr Cancer*. 2009; 61(4):500-9.
- **Tomas-Barberan FA, Garcia-Villalba R, Gonzales-Sarrias A, Selma MV, Espin JC.** Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J Agric Food Chem*. 2014; 62(28):6535-8.
- **Uchmanowicz I, Chudiak A, Jankowska-polanska B, Gobbens R.** Hypertension and Frailty Syndrome in Old Age: Current Perspectives. *Cardiac Failure Review*. 2017; 3(2):102-107.
- **Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, et al.** Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(10):4673-6.
- **Wadhwa RK, Steen DL, Khan I, Giugliano RP, Foody JM.** A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *J Clin Lipid*. 2016; 10(3):472-489.
- **Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH.** Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr*. 2003; 78(1):91-8.
- **Warensjo E, Riserus U, Vessby B.** Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia*. 2005; 48(10):1999-2005.



- **Warensjo E, Sundstrom J, Lind L, Vessby B.** Factor analysis of fatty acids in serum lipids as a measure of dietary fat quality in relation to the metabolic syndrome in men. *Am J clin Nutr.* 2006; 84(2):442-8.
- **Waterman PG, Mole S.** Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific. *Methods in ecology.* 1994.
- **White E, Shannon JS, Patterson RE.** Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6(10):769-74.
- **Whitley AC, Sweet DH, Walle T.** Site-specific accumulation of the cancer preventive dietary polyphenol ellagic acid in epithelial cells of the aerodigestive tract. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58:1201-1209.
- **Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML.** Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids.* 2000; 35(9):967-74.
- **Van Kampen EJ, Zijlstra WG.** Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. *Clin Chem Acta.* 1961; 6:538-44.
- **Van Meer G.** Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol.* 1989; 5:247-75.
- **Vazquez-Araujo L, Chambers IE, Adhikari K, Carbonell-Barrachina AA.** Sensory and physicochemical characterization of juices made with pomegranate and blueberries, blackberries, or raspberries. *J Food Sci.* 2010; 75(7):S398-S404.
- **Vessby B.** Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14(1):15-9.
- **Vessby B.** Dietary fat and insulin action in humans. *Br J Nutr.* 2000; 83(1):S91-6.
- **Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, boberg M, Andersson A.** Desaturation and Elongation of Fatty Acids and Insulin Action. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967:183-95.
- **Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J.** Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013; 2013:18.
- **Vishram JKK, Borglykke A, Andreasen AH, Jeppensen J, Ibsen H, Jorgensen T, et al.** Impact of Age on the Importance of Systolic and Diastolic

Blood Pressures for Stroke Risk: The MONica, Risk, Genetics, Archiving, and Monograph (MORGAM) Project. *Hypertension*. 2012; 60(5):1117-1123.

- **Yu Y, Cai Z, Zheng J, Chen J, Zhang X, Huang XF, et al.** Serum levels of polyunsaturated fatty acids are low in Chinese men with metabolic syndrome, whereas serum levels of saturated fatty acids, zinc, and magnesium are high. *Nutr Res*. 2012; 32(2):71-7.
- **Zdrojewski T, Wiecek A, Grodzicki T, et al.** Dissemination, awareness and effectiveness of treatment of hypertension in people over 65 in Poland. In: *medical, psychological, sociological and economic aspects of aging in Poland*. Poznan. 2012; 155-68.
- **Zock PL, Mensink RP, Harryvan J, De Vries JH, Katan MB.** Fatty acids in serum cholesteryl esters as quantitative biomarkers of dietary intake in humans. *Am J Epidemiol*. 1997; 145(12):1114-22.
- **Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH.** Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res*. 2014; 3:100.

## BIOGRAFIJA

Milica Kojadinović rođena je 7. Maja 1982. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Školske 2001/2002 godine upisala je studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, smer diplomirani biohemičar. Diplomirala je 3. oktobra 2008. godine sa prosečnom ocenom 8.06 i ocenom 10 na diplomskom ispitu pod nazivom "Identifikacija komercijalnih probiotika; karakterizacija na osnovu pripadnosti rodu bakterija" i ovim stekla zvanje diplomirani biohemičar. Doktorske akademske studije upisala je školske 2013/2014 na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Integrisane nauke o ishrani. Od 27. juna 2012. zaposlena je na Institutu za Medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, u Centru izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma. U februaru 2015. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik. U toku dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada, Milica Kojadinović angažovana je u okviru projekta: „Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji", finansiranom od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj pod nazivom, III41030. Bila je uključena i u rad evropskih projekata pod nazivom: Povoljni efekti dijetarnih bioaktivnih peptida i polifenola na kardiovaskularno zdravlje ljudi (Bacchus) i Jeftine tehnologije i tradicionalni sastojci za proizvodnju priuštive, hrane korektne sa stanovišta nutritivne vrednosti u smislu unapređenja zdravlja, kod siromašnih populacionih grupa (CHANCE), finansiranim od strane Evropske komisije (FP7). Autor je i koautor 4 rada publikovanih u međunarodnim časopisima, od kojih 2 rada čine deo doktorske teze. Autor je i koautor saopštenja 16 sa međunarodnih naučnih skupova, od kojih su 7 rezultati iz doktorske disertacije. Član je Biohemijskog društva Srbije od 2012. godine i Društva fiziologa Srbije od 2014. godine.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписана Милица Којадиновић

број индекса Б3047/2013

**Изјављујем**

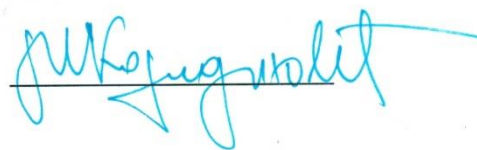
да је докторска дисертација под насловом

**„Биолошко деловање полифенола нара (*Punica granatum* L.) на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида плазме и еритроцита особа са метаболичким синдромом“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 21.јануар 2019.



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Којадиновић

Број индекса Б3047/2013

Студијски програм Интегрисане науке о исхрани

Наслов рада

**„Биолошко деловање полифенола нара (*Punica granatum* L.) на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида плазме и еритроцита особа са метаболичким синдромом“**

Ментор Александра Арсић

Потписани/а \_\_\_\_\_



Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 21.јануар 2019.



**Прилог 3.**

**Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Биолошко деловање полифенола нара (*Punica granatum* L.) на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида плазме и еритроцита особа са метаболичким синдромом“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 21. ЈАНУАР 2019.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.