

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija Paunović

**Ispitivanje uticaja komercijalnih matičnih sokova
drenjine (*Cornus mas*) i crne ribizle (*Ribes nigrum*)
na prevenciju razvoja metaboličkog sindroma
kod pacova *Wistar* soja**

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija Paunović

**Testing the Effects of Commercial Cold Pressed
Cornelian Cherry (*Cornus mas*) and Black Currant
(*Ribes nigrum*) Juices on Prevention of Metabolic
Syndrome Development in *Wistar* Rats**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2024.

MENTORKE:

dr Iva Lakić, docent, Biološki fakultet – Univerzitet u Beogradu

dr Snježana Petrović, naučni savetnik, Institut za medicinska istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju – Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

dr Nebojša Jasnić, vanredni profesor, Biološki fakultet – Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Vučić, naučni savetnik, Institut za medicinska istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju – Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandra Arsić, naučni savetnik, Institut za medicinska istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju – Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Zahvaljujem se svojoj mentorki sa instituta, dr **Snjezani Petrović** na savetima, podršci i učešću u apsolutno svim fazama kroz koje sam tokom izrade ove disertacije prošla.

Zahvaljujem se dr **Ivi Lakić** i dr **Nebojši Jasniću**, na uloženom trudu i vremenu tokom pregledanja ove teze kao i sugestijama pri pisanju koje su omogućile da celo istraživanje bude prikazano u najboljem svetlu.

Zahvaljujem se dr **Vesni Vučić**, rukovodiocu grupe u kojoj je ova teza urađena na ukazanom poverenju, podršci i stručnim savetima koje mi je kroz sve ove godine pružila, kao i datoj mogućnosti da budem deo tima.

Posebnu zahvalnost dugujem i prof. dr **Jeleni Stevuljević Kotur** na pruženoj prilici da se deo ove disertacije uradi u laboratoriji čiji je ona rukovodilac, kao i nesebično prenetom znanju i spremnosti da izdvoji vreme i razumevanje za sva pitanja koja sam tokom svog rada imala.

Izrazitu zahvalnost dugujem i koleginicama sa instituta dr **Danijeli Ristić Medić**, dr **Aleksandri Arsić**, dr **Maji Milošević**, dr **Oliveri Mitrović Ajtić** i dr **Mariji Takić**, kao i dr **Nataši Veličković** sa IBISS-a na pomoći pri izradi ove teze, bilo saradnjom tokom eksperimentalnog dela, učešću u pisanju radova, korisnim stručnim savetima ili podršci koju nisu štedele i koju su mi pružale u trenucima pada optimizma.

Takođe se zahvaljujem i dr **Vanji Todorović**, dr **Olgici Nedić** i **Bojani Mičić** na učešću u eksperimentalnom radu.

Zahvaljujem se svom suprugu **Bogdanu** na strpljenju, prevodima, podršci i svemu što je godinama radio kako bi mi ovaj put učinio lakšim.

SAŽETAK

Metabolički sindrom (MetS) obuhvata skup simptoma, uključujući abdominalnu gojaznost, visok krvni pritisak, hiperglikemiju, nizak nivo HDL holesterola i povišenu koncentraciju triacilglicerida u krvi. Najčešće se razvija kao posledica dugotrajne ishrane s visokim sadržajem masti i šećera te niskim sadržajem vlakana. Procenjuje se da je ovo stanje prisutno kod četvrtine odrasle populacije, sa stalnom tendencijom povećanja broja novih slučajeva. Veliki broj studija pokazao je da konzumiranje plodova i proizvoda od voća bogatog polifenolima, ima blagotvorno dejstvo na kardiometaboličke parametre. Istovremeno, upotreba animalnih modela u prekliničkim studijama omogućava kontrolisane uslove i brže uočavanje potencijalnih efekata određenih tretmana. Zbog toga su ciljevi ove disertacije bili, prvo, uspostavljanje adekvatnog model sistema, a potom ispitivanje uticaja komercijalno dostupnih matičnih sokova drenjine i crne ribizle na prevenciju ishranom indukovanoj metaboličkog sindroma kod pacova. Prvi deo studije obuhvatao je četiri kontrolne i četiri eksperimentalne grupe sa po šest mužjaka pacova *Wistar* soja. U studiji su korišćena dva podsoja, *Kyoto* i *Hannover*, kao i dve starosne grupe: pacovi stari osam nedelja i četiri meseca. Za ishranu je korišćen pelet obogaćen sa 25% suncokretovog ulja i 20% fruktoze (HFHF), a tretman je trajao ukupno 16 nedelja. Kao kontrola korišćene su životinje odgovarajućeg podsoja i starosti, hranjene standardnom hranom za pacove. Niti kod jedne eksperimentalne grupe nije došlo do razvoja MetS, tj. nijedna grupa nije pokazala prisustvo dovoljnog broja parametara koji bi potvrdili da je MetS dijagnostikovao. Ipak, *Hannover* podsoj starosti četiri meseca pokazao se kao najpodložniji ovom tipu nutritivne intervencije, zbog čega su te jedinice korišćene u daljoj studiji. Studija je nastavljena ispitivanjem efekata sokova bogatih polifenolima na prevenciju razvoja MetS. Za indukciju MetS korišćen je HFHF pelet u koji je dodato 0,1% holne kiseline (HFF). Istraživanje je obuhvatalo četiri grupe sa po devet pacova: Kontrolna grupu - na standardnoj ishrani, HFF grupa - na HFF peletu i vodi, CR grupa - na HFF peletu i 20% matičnom soku crne ribizle, D grupa - na HFF peletu i 20% matičnom soku drenjine. Tretman je trajao deset nedelja. Po završetku tretmana, ispitivan je uticaj suplementacije sokovima na biohemijske parametre, krvni pritisak, količinu visceralnog masnog tkiva, inflamaciju, biomarkere oksidativnog stresa u plazmi, jetri i masnom tkivu, histološke promene na jetri, adipocitima i pankreasu, kao i promene lipidnog profila u tkivima. Konzumiranje oba soka uticalo je na smanjenje nivoa holesterola u krvi i očuvanje histomorfologije tkiva, pospešilo je lučenje insulina i smanjilo lučenje glukagona, pokazalo preventivni efekat na porast koncentracije određenih pro-inflamatornih masnih kiselina u tkivima i doprinelo očuvanju redoks balansa u plazmi i tkivima. Suplementacija sokom crne ribizle pokazala se delotvornijom, jer je kod ove grupe zabeleženo i poboljšanje tolerancije na glukozu, smanjenje inflamacije u jetri, kao i smanjenje akumulacije visceralnog masnog tkiva izazvanog HFF ishranom. Dobijeni rezultati sugerišu da suplementacija datim sokovima, posebno crnom ribizlom, može imati višestruko blagotvorno dejstvo na prevenciju razvoja MetS. Na taj način, ovi sokovi bi mogli doprineti ublažavanju štetnih efekata široko rasprostranjene "zapadnjačke dijeta" bogate rafinisanim ugljenim hidratima, mastima i drugom procesuiranom hranom.

Ključne reči: Metabolički sindrom, *Hannover* pacovi, *Kyoto* pacovi, HFF ishrana, sok od crne ribizle, sok od drenjine, inflamacija, oksidativni stres, masnokiselinski profil, imunohistološke analize

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: fiziologija

UDK broj: 547.565 [577.115.3 + 599.323.45] (043.3)

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MetS) represents combined occurrence of symptoms such as abdominal obesity, high blood pressure, hyperglycemia, low HDL cholesterol, and elevated triglyceride levels in the blood. A long-term consumption of a diet high in fat and sugar and low in fiber proved to be the most common cause of MetS. It is estimated that this condition affects 20-30% of the adult population, with a constant upward trend in new cases. Numerous studies have shown that consuming polyphenol-rich fruits and their products has beneficial effects on cardiometabolic parameters. At the same time, the use of animal models in preclinical studies provides controlled conditions and allows for quicker screening of the potential effects of specific treatments. Therefore, the aims of this dissertation were, first, to establish an adequate model system, and then to examine the effects of commercially available black currant and cornelian cherry juices on the prevention of diet-induced MetS in rats. The first part of the study included four experimental and four control groups, six male *Wistar* rats each. Two sub-strains, *Kyoto* and *Hannover*, and two age groups, eight-week-old and four-month-old rats were used. The animals in experimental groups were fed with pellet enriched with 25% sunflower oil and 20% fructose (HFHF). The treatment lasted for 16 weeks. Sub-strain and age-matched controls were fed a standard chow. None of the experimental groups developed MetS, i.e. no group showed a sufficient number of parameters to confirm the presence of MetS. However, the four-month-old *Hannover* sub-strain was found to be the most susceptible for this type of nutrition intervention, and that is the reason why this animals were used in further studies. The study continued by examining the effects of juices rich in polyphenols on the prevention of the development of MetS. Cholic acid (0.1%) was added to the HFHF pellets to get HFF diet used for MetS induction. The research included four groups of nine rats each: Control group - on a standard diet and water, HFF group - on HFF diet and water, BC group - on HFF diet and 20% black currant juice, CC group - on HFF diet and 20% cornelian cherry. The treatment lasted for 10 weeks. After completion of treatment, the effects of juice supplementation on biochemical parameters, blood pressure, visceral fat percentage, inflammation, oxidative status biomarkers in plasma, liver, and adipose tissue, histological changes in the liver, adipocytes, and pancreas, as well as on changes in the lipid profile in tissues were examined. Consumption of both juices led to a reduction in blood cholesterol levels and preservation of tissue morphology, increased insulin secretion and reduced glucagon secretion, prevented the increase in the concentration of certain pro-inflammatory fatty acids in tissues, and prevented the disruption of redox balance in plasma and tissues. Supplementation with black currant juice proved to be more effective, as this group also showed improved glucose tolerance, reduced liver inflammation, and reduced visceral fat accumulation induced by the HFF diet. The obtained results suggest that supplementation with these juices, especially black currant juice, may have multiple beneficial effects on the prevention of MetS development. In this way, these juices could contribute to mitigating the harmful effects of the widespread Western diet rich, in refined carbohydrates, fats and processed foods.

Keywords: Metabolic syndrome, *Hannover* rats, *Kyoto* rats, HFF diet, Black currant juice, Cornelian cherry juice, Inflammation, Oxidative stress, Fatty acid profile, Immunohistological analyses

Scientific field: Biology

Special topic: Physiology

UDK number: 547.565 [577.115.3 + 599.323.45] (043.3)

SPISAK SKRAĆENICA

AA – arahidonska kiselina - engl. *Arachidonic Acid*
ABTS – 2, 2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina
ACP – engl. *Acyl Carrier Protein*
ADP – adenzin difosfat
ALA – α -linolenska kiselina - engl. *α -Linolenic Acid*
ALT – alanin transaminaza
AMP – adenzin monofosfat
AMPK – engl. *AMP-Activated Protein Kinase*
AOPP – uznapredovali proizvodi oksidacije proteina – engl. *Advanced Oxidation Protein Products*
Apo – apolipoprotein
AST – aspartat transaminaza
ATP – adenzin trifosfat
AUC – engl. *Area Under the Curve*
BHT – 2,6-di-terc-butic-4-metilfenol
BMI – engl. *Body Mass Index*
ChREBP – engl. *Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein*
COX – ciklooksigenaza
CR – crna ribizla
CRP – C reaktivni protein
DHA – dokozaheksaenska kiselina - engl. *Docosahexaenoic Acid*
DMSO – dimetil-sulfoksid
DPA – dekozapentaenska kiselina
DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina - engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*
EPA – eikozapentaenska kiselina - engl. *Eicosapentaenoic Acid*
FADS1 – engl. *Fatty Acid Desaturase 1*
FADS2 – engl. *Fatty Acid Desaturase 2*
GAP – gliceraldehid-3-fosfat
GLC – gasno-tečna hromatografija
GLUT – transporter za glukozu tip - engl. - *Glucose Transporter Type*
GSH – glutation - engl. *Gluthation*
GSPx – glutation peroksidaza - engl. *Gluthation Peroxidase*
D – drenjina
DBP – dijastolni krvni pritisak - engl. *Diastolic Blood Pressure*
HDL – lipoproteinske čestice velike gustine - engl. *High-Density Lipoprotein*
HFD – ishrana sa visokim sadržajem masti - engl. *High Fat Diet*
HFF – ishrana sa visokim sadržajem masti (ulja) i fruktoze uz dodatak holne kiseline - engl. *High Fat-Fructose Diet*; (HFHF sa dodatkom holne kiseline)
HFHF – ishrana sa visokim sadržajem masti (ulja) i fruktoze - engl. *High-Fat High-Fructose Diet*
IDL – engl. *Intermediate-Density Lipoprotein*
IDF – Međunarodna federacija za dijabetes - engl. *International Diabetes Federation*
IL-1 – interleukin 1
IL-6 – interleukin 6
IMA – ishemijski modifikovani albumin
IPGT – engl. *Intraperitoneal Glucose Tolerance*
iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina
IRS – engl. *Insulin Receptor Substrate*
KVB – kardiovaskularne bolesti
LA – linolna kiselina - engl. *Linoleic Acid*

LC-PUFA – dugolančane polinezasićene masne kiseline - engl. *Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*
LDL – lipoproteinske čestice male gustine - engl. *Low-Density Lipoprotein*
LT – leukotrien
LOO – lipidni peroksid
LOX – lipoksigenaza
MAP – mitogen-aktivirana proteinska kinaza
MDA – malondialdehid
MetS – metabolički sindrom
MK – masne kiseline
MLR – multipla linearna regresija
MUFA – mononezasićene masne kiseline - engl. *Monounsaturated Fatty Acids*
NBT – engl. *Nitro Blue Tetrazolium*
NCEP ATP3 – Nacionalni program za edukaciju o holesterolu, panel za odrasle III - engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*
NAFLD – engl. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*
OSI – indeks oksidativnog stresa – engl. *Oxidative Stress Index*
PAB – prooksidativno/antioksidativni balans
PCR – engl. *Polymerase Chain Reaction*
PG – prostaglandini
PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaze
PKC – protein kinaza C
PIPD – fosfatidil inositol zavisna protein kinaza
PON – paraoksonaza
PPAR α – engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α*
PUFA – polinezasićene masne kiseline - engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*
ROS – reaktivne kiseonične vrste - engl. *Reactive Oxygen Species*
SBP – sistolni krvni pritisak - engl. *Systolic Blood Pressure*
SFA – zasićene masne kiseline - engl. *Saturated Fatty Acids*
SOD – superoksid dismutaza - engl. *Superoxide Dismutase*
SREBP-2 – engl. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2*
SZO – Svetska zdravstvena organizacija
TAS – totalni antioksidativni status
TCA – trihlor sirćetna kiselina
TG – trigliceridi
TNF- α – faktor nekroze tumora- α - engl. *Tumor Necrosis Factor- α*
TOS – totalni oksidativni status
TRIS – tris-(hidroksimetil)-aminometan
TX – tromboksani
VLDL – lipoproteinske čestice veoma male gustine - engl. *Very-Low Density Lipoprotein*
VMT – visceralno masno tkivo

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Metabolički sindrom.....	1
1.1.1 Osnovne karakteristike metaboličkog sindroma.....	1
1.1.2 Insulinska rezistencija.....	2
1.2 Telesne masti	4
1.2.1 Masne kiseline	5
1.2.2 Uloga polinezasićenih masnih kiselina u procesu inflamacije	7
1.3 Oksidativni stres	8
1.3.1 Sistemi antioksidativne zaštite.....	9
1.4 Animalni model metaboličkog sindroma	10
1.5 Metabolizam masti	11
1.5.1 Biosinteza masti.....	11
1.5.2 Unos masti ishranom i njihov transport.....	11
1.6 Metabolizam fruktoze.....	13
1.7 Polifenoli	14
1.7.1 Polifenoli crne ribizle i drenjine	14
2. CILJEVI.....	16
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1 Analiza sokova	17
3.1.1 Osnovne karakteristike sokova	17
3.1.2. Analiza mikronutrijenata	17
3.1.3 Određivanje polifenolnog sastava sokova metodom HPLC-MS/MS.....	17
3.1.4 Određivanje ukupnih fenola, flavan-3-ola i antocijana u sokovima.....	18
3.1.5 Određivanje pojedinačnih fenolnih komponenti u sokovima.....	18
3.2 Eksperimentalne životinje i dizajn studije za razvoj animalnog modela metaboličkog sindroma	19
3.3 Eksperimentalne životinje i dizajn studije za ispitivanje uticaja soka drenjine i crne ribizle na prevenciju metaboličkog sindroma.....	20
3.4 Merenje krvnog pritiska	21
3.5 Intraperitonealni test opterećenja glukozom (IPGTT)	21
3.6 Uzorkovanje krvi i tkiva pacova	21
3.7 Biohemijske analize	22
3.8 Histološke analize.....	22
3.8.1 Priprema uzoraka za histološke analize	22
3.8.2 Hematoksilin – eozin bojenje tkivnih uzoraka	22

3.8.3 Imunohistohemijsko bojenje glukagona i insulina	22
3.9 Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	23
3.9.1 Priprema homogenata	23
3.9.2 Određivanje prooksidativno/antioksidativnog balansa (PAB)	23
3.9.3 Određivanje koncentracije sulfhidrilnih grupa (SHG)	23
3.9.4 Određivanje ishemijski modifikovanog albumina (IMA)	24
3.9.5 Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)	24
3.9.6 Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1 (PON1)	24
3.9.7 Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)	24
3.9.8 Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD)	25
3.9.9 Određivanje koncentracije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$).....	25
3.9.10 Određivanje ukupnog antioksidativnog statusa (TAS).....	25
3.9.11 Određivanje ukupnog oksidativnog statusa (TOS).....	25
3.10 Određivanje masnokiselinskog profila u ukupnim lipidima plazme i tkiva.....	26
3.10.1 Određivanje masnih kiselina u ukupnim lipidima plazme	26
3.10.2 Ukupni lipidi jetre.....	26
3.10.3 Ukupni lipidi iz masnog tkiva.....	26
3.10.4 Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom	26
3.11 Određivanje faktora inflamacije.....	27
3.11.1 Izolovanje ukupne RNK i reverzna transkripcija	27
3.11.2 Real-time PCR.....	27
3.12 Statistička obrada podataka	27
4. REZULTATI.....	28
4.1 Razvoj model sistema metaboličkog sindroma	28
4.1.1 Unos hrane, kalorijski unos i masa životinja	28
4.1.2 Biohemijski parametri	29
4.2 Koncentracija polifenola u ispitivanim sokovima.....	30
4.3 Uticaj matičnih sokova crne ribizle i drenjine na prevenciju metaboličkog sindroma	31
4.3.1 Unos tečnosti i hrane kod pacova	31
4.3.2 Uticaj sokova na telesnu masu, visceralno masno tkivo i biohemijske parametre.....	32
4.3.3 Uticaj sokova na krvni pritisak	33
4.3.4 Uticaj sokova na koncentraciju insulina i intraperitonealni test opterećenja glukozom.....	34
4.4 Histopatološke analize.....	34
4.4.1 Histopatološke analize jetre	34
4.4.2 Histopatološke analize visceralnog masnog tkiva	36
4.4.3 Histopatološke analize pankreasa	37
4.5 Količina iRNK za inflamatorne citokine u jetri	40

4.6 Analiza parametara oksidativnog stresa	40
4.6.1 Određivanje parametara oksidativnog stresa u plazmi	40
4.6.2 Određivanje parametara oksidativnog stresa u jetri.....	41
4.6.3 Određivanje parametara oksidativnog stresa u visceralnom masnom tkivu.....	41
4.6.4 Oksi-skorovi u različitim tkivima pacova.....	44
4.6.5 Multipla linearna regresija.....	46
4.7 Profil masnih kiselina u plazmi, jetri i masnom tkivu.....	48
5. DISKUSIJA	51
6. ZAKLJUČCI.....	62
LITERATURA.....	63
BIOGRAFIJA	79
Изјава о ауторству.....	80
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	81
Изјава о коришћењу.....	82

1. UVOD

1.1. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom (MetS) je skup faktora rizika za kardiometaboličke bolesti, s visokom prevalencom u odrasloj populaciji širom sveta. Iako još ne postoji konsenzus oko definicije i dijagnostičkih kriterijuma za MetS, ovaj sindrom obuhvata koegzistenciju nekoliko faktora rizika, poput abdominalne gojaznosti, visokog krvnog pritiska, hiperglikemije, niskog nivoa HDL holesterola (engl. *High-Density Lipoprotein*) i povećane koncentracije triacilglicerida (TG) u krvi [1]. Etiologija MetS nije u potpunosti razjašnjena, ali je izvesno da sedentarni način života i neuravnotežena ishrana, sa visokom zastupljenošću masti i šećera, a sa druge strane sa niskim sadržajem vlakana, značajno doprinose razvoju MetS [2]. Novija istraživanja ukazuju i na postojanje genetske predispozicije za razvoj MetS [3]. Usled globalnog širenja konzumerističkog stila života, MetS je poslednjih godina postao vodeća zdravstvena pretnja savremenog društva, a time i ogroman trošak sistemu zdravstvene zaštite. Iz godine u godinu procenat odraslih sa metaboličkim sindromom je sve veći i raste s porastom starosne dobi populacije [4]. Prema novijim procenama u proseku između 20 i 30% odraslog stanovništva najvećeg broja zemalja ima MetS [5]. Pojedinci sa niskim socio-ekonomskim položajem imaju veći rizik za razvoja ovog stanja [6], dok je najveći procenat populacije sa MetS zabeležen kod američkog i stanovništva regije istočnog Mediterana [7]. Prema podacima za period 2011-2018. taj procenat je iznosio 37,6-41,8% odrasle populacije [8]. U Srbiji ne postoje zvanični podaci o prevalenci metaboličkog sindroma, ali su studije u pojedinim regionima našeg područja zabeležile njegovo prisustvo kod visokog procenat (37,5-44,3%) ukupne populacije [9,10]. MetS povećava rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, moždanog udara i dijabetesa. Osobe sa dijagnostikovanim MetS imaju dva puta veći rizik od smrti izazvane srčanim udarom i pet puta su sklonije razvoju dijabetesa tipa II nego što je to slučaj kod zdravih pojedinaca. Takođe izložene su trostruko većem riziku od moždanog udara [11]. Pored toga, ukupni troškovi zdravstvene zaštite i gubitka potencijalne ekonomske aktivnosti koju MetS može izazvati mere se bilionima dolara [2]. Zbog toga su brojna istraživanja usmerena kako na prevenciju MetS, tako i na njegov tretman.

1.1.1 Osnovne karakteristike metaboličkog sindroma

Postoji više parametara čija dijagnostika ukazuje na prisustvo MetS, kao i veći broj definicija koje opisuju ovo stanje. Globalno priznate definicije su one date od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO), Međunarodne federacije za dijabetes (engl. *International Diabetes Federation - IDF*) i Nacionalnog programa edukacije o holesterolu, panel za tretman odraslih III (engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III - NCEP ATP3*) [12]:

Prema definiciji SZO, metabolički sindrom prati insulinska rezistencija ili koncentracija glukoze natašte $> 6,1$ mmol/l (110 mg/dl); koncentracija glukoze posle 2h od konzumiranja $> 7,8$ mmol (140 mg/dl), kao i prisustvo dva ili više od sledećih parametara:

1. koncentracija HDL holesterola $< 0,9$ mmol/l (35 mg/dl) kod muškaraca; $< 1,0$ mmol/l (40 mg/dl) kod žena
2. koncentracija triglicerida $> 1,7$ mmol/l (150 mg/dl)
3. obim struka > 94 cm za muškarce; > 80 cm za žene (kavkaski tip) ili BMI (engl. *Body Mass Index*) > 30 kg/m²
4. vrednost krvnog pritiska $> 140/90$ mmHg.

Definicija data od strane IDF kao glavni kriterijum uzima obim struka > 94 cm za muškarce ili > 80 cm za žene (kod određivanja ovog parametra mora se uzeti u obzir etnička pripadnost, a ove vrednosti se odnose na populaciju evropskog porekla) zajedno sa prisustvom dva ili više od sledećih parametara:

1. koncentracija glukoze > 5,6 mmol/L (100 mg/dl) ili dijagnostikovan dijabetes
2. koncentracija HDL holesterola < 1,0 mmol/L (40 mg/dl) kod muškaraca; < 1,3 mmol/L (50 mg/dl) kod žena ili terapija lekovima koji utiču na porast HDL holesterola
3. koncentracija triglicerida u krvi > 1,7 mmol/L (150 mg/dl) ili uzimanje terapije za povišene TG
4. vrednost krvnog pritiska > 130/85 mmHg ili uzimanje terapije za hipertenziju.

Za razliku od prethodnih definicija, NCEP ATP3 ne zahteva nijedan kriterijum ponaosob već prisustvo tri od pet dole navedenih faktora:

1. koncentracija glukoze > 5,6 mmol/L (100 mg/dl) ili uzimanje terapije za regulaciju glukoze
2. koncentracija HDL holesterola < 1,0 mmol/L (40 mg/dl) kod muškaraca; < 1,3 mmol/L (50 mg/dl) kod žena ili korišćenje lekova koji se prepisuju kod niskog HDL holesterola
3. koncentracija TG u krvi > 1,7 mmol/L (150 mg/dl) ili uzimanje lekova za snižavanje TG
4. obim struka 102 cm za muškarce ili > 88 cm za žene (kod određivanja ovog parametra mora se uzeti u obzir etnička pripadnost, a vrednosti se odnose na populaciju Sjedinjenih Američkih Država)
5. vrednost krvnog pritiska > 130/85 mmHg ili korišćenje lekova koji se prepisuju kao tretman za hipertenziju.

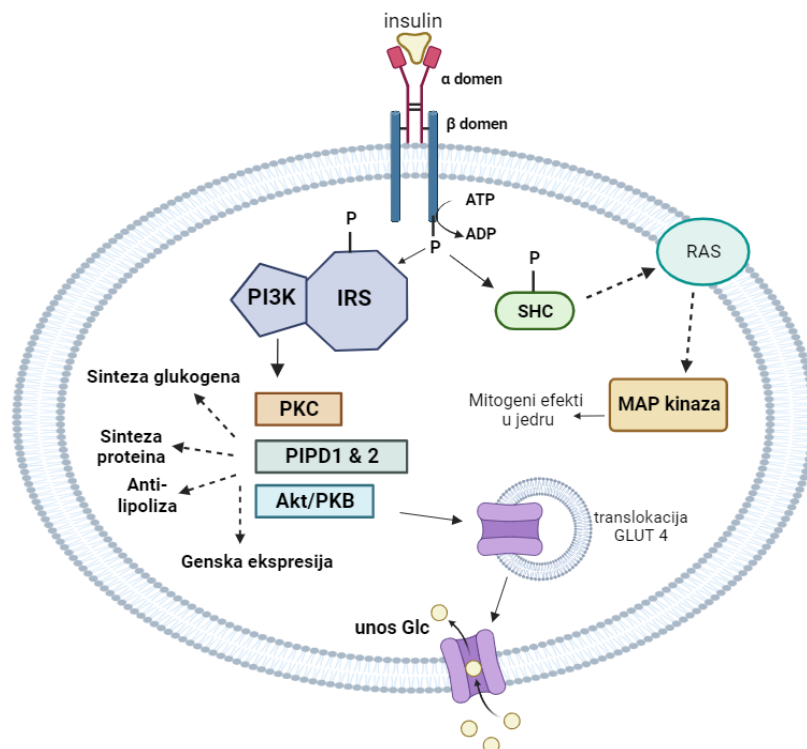
Kao što se može primetiti sve ove definicije su veoma slične i skreću pažnju na važnost promena načina ishrane i životnih navika kako bi se izbegao dalji razvoj bolesti.

1.1.2 Insulinska rezistencija

Osnovu MetS čine insulinska rezistencija i izmenjena funkcija masnog tkiva, dok je u isto vreme ovo stanje najčešće praćeno hroničnom inflamacijom [13] i oksidativnim stresom [14]. Insulinska rezistencija predstavlja neadekvatan ćelijski odgovor na prisustvo normalnog ili povišenog nivoa insulina. Insulin je peptidni hormon koji luče β ćelije, smeštene u Langerhansovim ostrvcima pankreasa, kao odgovor na povećanje koncentracije glukoze u krvi [15]. Kod insulinske rezistencije glukoza stimuliše oslobađanje insulina, ali on ne dovodi do njenog unosa u ćeliju. Zadržavanje povišene koncentracije glukoze u krvi signalizira da se nastavi oslobađanje insulina, njegova koncentracija raste i dolazi do hiperinsulinemije.

Ulazak glukoze u ćeliju je neophodan kako bi se njenom oksidacijom obezbedila energija u vidu ATP (adenozin trifosfata) i posredovan je proteinskim nosačima iz familije transportera za glukozu tipa (GLUT). Do sada je otkiveno 14 izoformi ovog proteina i sve one imaju posebnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata [16]. GLUT4 omogućava insulin-zavisani ulazak glukoze [17] (Slika 1). Ovaj proces otpočinje vezivanjem insulina za insulinski receptor (IR), što stimuliše mobilizaciju vezikula koje sadrže GLUT4 i njihovu ugradnju u ćelijsku membranu dovodeći do nesmetanog unosa glukoze. Nakon uspostavljanja glukozne homeostaze opada koncentracija insulina, a GLUT4 receptori se uklanjaju iz ćelijske membrane procesom endocitoze [18]. U odsustvu insulina, kretanje vezikula izostaje, glukozni transporteri ostaju zadržani unutar ćelije i nema ulaska glukoze u ćeliju.

Vezivanje insulina dovodi i do autofosforilacije IR, kao i fosforilacije različitih proteina citoplazme uključujući i familiju proteina poznatih kao supstrati insulinskog receptora (IRS), što preko dalje signalne kaskade dovodi do sinteze glikogena.



Slika 1. Šematski prikaz signalnog puta insulina. ATP – adozin trifosfat, ADP – adozin difosfat, PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza, IRS – supstrat insulinskog receptora (engl. *Insulin Receptor Substrate*), PKC – protein kinaza C, PIPD – fosfatidil inositol-zavisna protein kinaza, MAP – mitogen-aktivirana proteinska kinaza, Glc – glukoza, GLUT 4 – transporter za glukozu tipa 4.

Insulinska rezistencija može biti izazvana smanjenjem anfniteta insulinskih receptora za insulin, smanjenjem broja samih receptora (inhibicija ekspresije) kao i usled prekida signalnog puta uticajem na IRS [15].

Osim uloge u glukoznoj homeostazi, insulin učestvuje i u kontroli metabolizma lipida stimulišući njihovu sintezu u jetri i adipocitima, u isto vreme redukujući lipolizu [19]. Ishrana sa visokim sadržajem zasićenih masti dovodi do gojaznosti, dok sam porast količine masnog tkiva može uticati na smanjenje insulinske osetljivosti slabljenjem insulinske signalizacije. Uočeno je da nakon duže primene ishrane bogate mastima dolazi do smanjenja koncentracije IRS-1 i IRS-2 u adipocitima [20]. Studija iz 2011. godine je pokazala da je samo 72 h dijete obogaćene mastima (HFD, engl. *High Fat Diet*) dovoljno da dovede do značajnog smanjenja insulinske osetljivosti [21].

Iako ne postoji direktna veza fruktoze sa insulinom i regulacijom njegove sinteze, ona takođe ima važnu ulogu u nastanku hiperinsulinemije i insulinske rezistencije. Preterana konzumacija fruktoze dovodi do aktivacije ekspresije GLUT5 receptora čime se omogućava njen povećan unos u ćelije. Sa starenjem dolazi do smanjenja aktivnosti GLUT5 receptora što prouzrokuje još veću insulinsku rezistenciju i ukazuje na moguću vezu ovog receptora sa razvojem insulinske rezistencije. Takođe je kod pacova čija se ishrana zasnivala na > 60% fruktoze došlo do smanjene sinteze iRNK (informacione ribonukleinske kiseline) insulinskog receptora što je dovelo do smanjenja broja IR u ćelijama, te je i ovo jedan od načina na koji fruktoza može da utiče na smanjenje dejstva insulina [22].

1.2 Telesne masti

Adipozno tkivo se klasifikuje u dve kategorije – većinsko, belo masno tkivo, koje ima ulogu u skladištenju energije u vidu TG, endokrinom komunikaciji i insulinskoj osetljivosti, i mrko masno tkivo koje je zaduženo za održanje telesne temperature [23]. Belo masno tkivo može se deponovati u visceralne ili subkutane depoe. Njegovo prekomerno skladištenje u trbušnoj regiji dovodi do androidnog tipa gojaznosti, koja dovodi do razvoja insulinske rezistencije i metaboličkih oboljenja [24]. Kod gojaznosti primarna uloga energetskog depoa biva potisnuta, masno tkivo postaje disfunkcionalno i dobija novu ulogu koja ima sistemski uticaj na ceo organizam. Prekomerno nakupljanje masnog tkiva stvara pro-inflamatorno, hiperlipidemično i insulin-rezistentno okruženje koje doprinosi razvoju dijabetesa tipa 2 [25]. Ono sintetisuje veliki broj bioaktivnih molekula poput eksozoma, inflamatornih citokina i peptidnih hormona koji mogu imati parakrinu i endokrinu ulogu i koji su uključeni u razvoj poremećaja koji se dovode u vezu sa gojaznošću [26,27].

Leptin, adiponektin i rezistin su hormoni koje proizvodi masno tkivo i koji imaju ulogu u kontroli gladi, insulinskoj osetljivosti i imunskom odgovoru. Kod gojaznih osoba masno tkivo povećava ekspresiju leptina i rezistina i smanjuje sintezu adiponektina [28]. Adiponektin inhibira acetyl-CoA karboksilazu aktivacijom AMPK (engl. *AMP-Activated Protein Kinase*) što dovodi do povećanog glukoznog transporta i oksidacije masti u mišićima. Sa druge strane, njegova smanjena sinteza dovodi do usporavanja metabolizma glukoze i lipida, povećava oksidativni stress i inflamaciju i može biti jedan od pokretača razvoja MetS [29]. Povišen nivo leptina i rezistina takođe su jedni od markera MetS [30]. Njihova povišena sinteza izazvana gojaznošću, takođe utiče na pro/anti-inflamatornu ravnotežu, dovodeći do povećanja intenziteta inflamacije. Promene u hormonalnoj sintezi kod MetS u masnom tkivu dovode i do povećanja sinteze inflamatornih citokina, poput TNF- α i IL-1 β [31].

U normalnim uslovima insulin je antilipolitični hormon koji smanjuje aktivnost lipaze osetljive na hormone, a koja ima ulogu u oslobađanju uskladištenih masnih kiselina (MK) iz masnog tkiva. Sa razvojem ćelijske inflamacije može doći do oslobađanja viših koncentracija slobodnih MK, koje ulaze u cirkulaciju i bivaju preuzete od strane drugih tkiva poput jetre ili skeletnih mišića, a koja nisu u stanju da bezbedno skladište veće količine masti [32]. Zbog toga se insulinska rezistencija povezuje sa prekomernim nakupljanjem masti u ektopičnim tkivima i povećanim nivoom cirkulišućih slobodnih masnih kiselina [33]. Još nije u potpunosti razjašnjeno kako slobodne MK utiču na razvoj insulinske rezistencije, ali neke studije navode da njihov povišen nivo može narušiti funkciju β ćelija, dok druge dovode u vezu povišenu koncentraciju slobodnih MK sa smanjenjem osetljivosti ciljanih ćelija na insulin [34]. Masnokiselinski profil pojedinca uslovljen je navikama u ishrani, životnim stilom i metaboličkim varijablama. *FADS1* i *FADS2* polimorfizmi povezani su sa nepovoljnim odnosom eikozapentaenske kiseline i arahidonske kiseline (EPA/AA) u eritrocitima i doprinose razvoju MetS [35]. Kod osoba sa dijagnostikovanom MetS u plazmi su zabeležene viša koncentracija zasićenih MK i niža koncentracija polinezasićenih MK nego kod osoba kod kojih MetS nije dijagnostikovano. Što se pojedinačnih MK tiče, koncentracija 14:0, 16:0, 16:1n-7, kao i smanjena aktivnost enzima $\Delta 5$ desaturaze i povećane aktivnosti $\Delta 6$ i $\Delta 9$ desaturaza primećene su kod pacijenata sa MetS, dok je koncentracija linolne kiseline (LA, 18:2n-6) bila niža nego kod kontrolne grupe. Sa druge strane, u većem broju studija nije primećena značajna razlika u zastupljenosti mononezasićenih MK i dugolančanih polinezasićenih MK [36–38]. Ovo sugerisuje da pojedine MK plazme i njihove koncentracije mogu biti prediktori MetS.

1.2.1 Masne kiseline

Masne kiseline (MK) su ugljovodonični lanci na čijem se jednom kraju nalazi metil grupa, a na drugom karboksilna grupa. Sadrže od 4 do 28 atoma ugljenika (Tabela 1) i klasifikuju se prema broju dvostrukih veza. Zasićene masne kiseline (SFA, engl. *Saturated Fatty Acid*) ne sadrže dvostruke veze u ugljovodoničnom lancu, mononezasićene (MUFA, engl. *Monounsaturated Fatty Acid*) sadrže jednu, dok polinezasićene PUFA (engl. *Polyunsaturated Fatty Acid*) sadrže dve ili više dvostrukih veza [39].

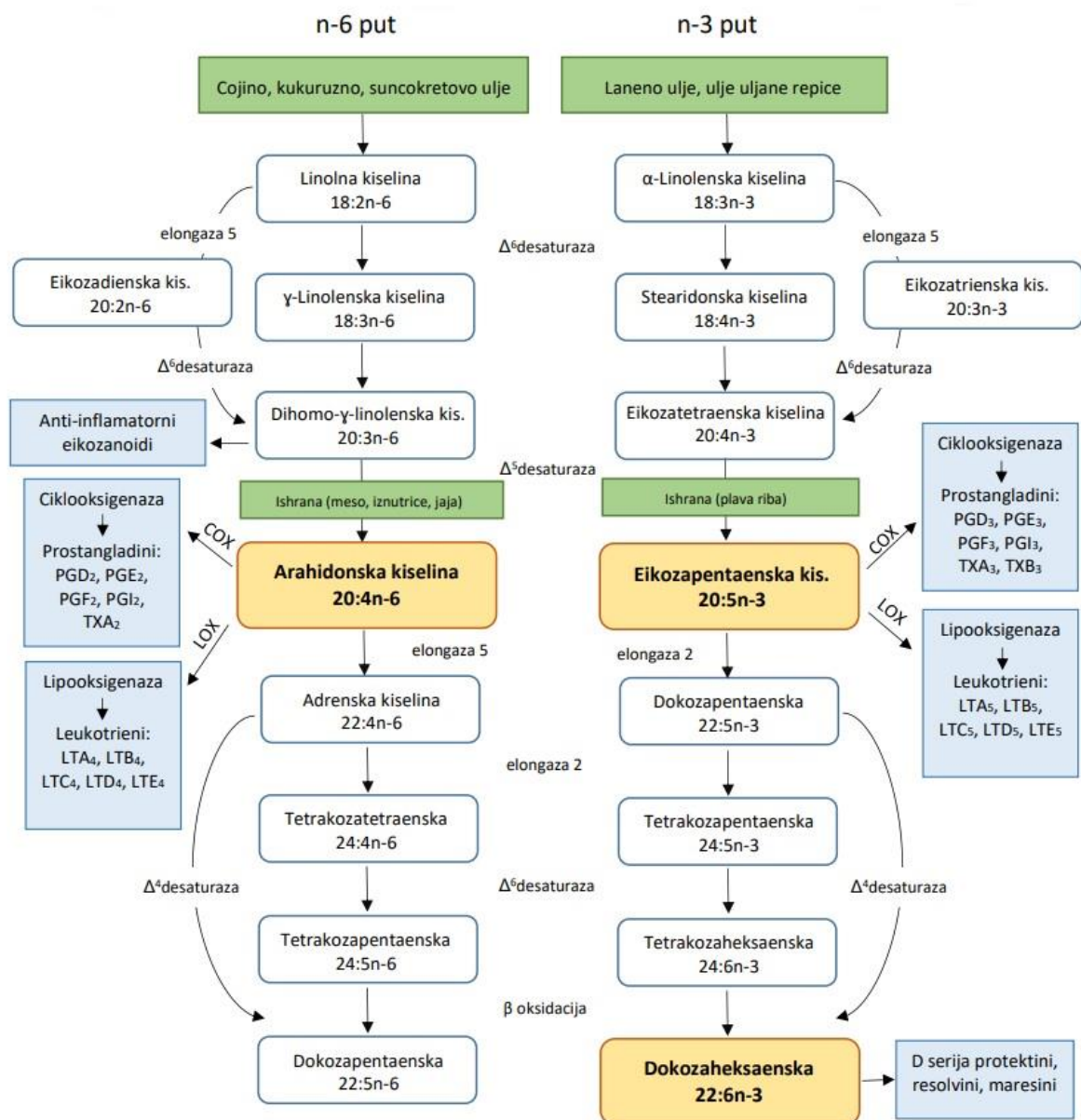
Tabela 1. Najvažnije masne kiseline zastupljene u životinjskim mastima

Trivijalni naziv	Hemijski naziv	Skraćena oznaka
Zasićene MK		
Buterna	Butanska	4:0
Kaprnska	Heksanska	6:0
Kaprilna	Oktanska	8:0
Kaprinska	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
Mononezasićene MK		
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
Polinezasićene MK		
Linolna	cis-9,12-oktadekadienska	18:2, n-6
γ -linolenska	cis-6,9,12-oktadekatrienska	18:3, n-6
α -linolenska	cis-9,12,15-oktadekatrienska	18:3, n-3
Dihomo- γ -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

PUFA se dalje dele na osnovu pozicije prve dvostruke veze počevši od metil (ω) kraja. Ovom klasifikacijom masne kiseline se dele na sledeće familije: omega-3 (n-3), omega-6 (n-6), omega-7 (n-7) i omega-9 (n-9). Nezasićene masne kiseline se sintetišu uvođenjem dvostrukih veza u masnokiselinske lance pomoću enzima $\Delta 12$ i $\Delta 15$ desaturaza [40]. Sisari ne poseduju enzime za *de novo* sintezu PUFA, zbog čega nisu u mogućnosti da sintetišu n-3 i n-6, pa se stoga ove masne kiseline smatraju esencijalnim i neophodno ih je unositi ishranom [41].

Sinteza n-3 dugolančanih masnih kiselina (LC-PUFA engl. *Long Chain PUFA*) počinje od α -linoleinske kiseline (ALA, 18:3n-3), koja se dejstvom elongaze 5 i $\Delta 6$ desaturaze dalje prevodi do eikozapentaenske kiseline (EPA, 20:5n-3), a nakon nje dejstvom elongaze 2 i $\Delta 4$ desaturaze do dokozaheksaenske kiseline (DHA, 22:6n-3) [42]. S druge strane, sinteza dugolančanih n-6 masnih kiselina kreće od linolne kiseline (LA, 18:2n-6) koja se prvo, dejstvom već pomenutih elongaza i desaturaza, prevodi u arahidonsku kiselinu (AA, 20:4n-6), a potom dalje do dekozapentaenske (DPA, 22:5n-6) kiseline (Slika 2) [41].

Sve navedene desaturaze pokazale su veći afinitet ka n-3 derivatima. Iako sisari poseduju enzime koji mogu konvertovati ALA u EPA i DHA, i dalje ih je neophodno unositi ishranom jer je ovaj vid sinteze u jetri veoma ograničen. Pojedine studije su pokazale da se ALA može konvertovati u EPA u prinosu do 8%, dok je konverzija u DHA gotovo zanemarljiva < 0,1% [43]. LC-PUFA su daleko aktivnije od svojih prekursora i njihov balansiran odnos neophodan je za održanje homeostaze.



Slika 2. Sinteza dugolančanih n-3 i n-6 PUFA, kao i pro- i anti-inflamatornih eikozanoida. PG – prostaglandin, TX – tromboksan, LT – leukotrien

1.2.2 Uloga polinezasićenih masnih kiselina u procesu inflamacije

Uloga PUFA je višestruka. Glavna su gradivna komponenta fosfolipida koji ulaze u sastav ćelijskih membrana, a ujedno učestvuju i u imunskom odgovoru [44]. PUFA su prekursori eikozanoida, signalnih molekula koji su uključeni u pokretanje, intenzitet i trajanje inflamatornog odgovora. Eikozanoidi nastali sintezom od n-6 PUFA deluju pro-inflamatorno, dok oni čiji su prekursori n-3 PUFA imaju anti-inflamatorno dejstvo. Zbog toga dijetarni unos n-6 i n-3, kao i njihov izbalansiran odnos, može značajno da utiče na patogenezu i manifestaciju mnogih hroničnih oboljenja koja su povezana sa „tihom“ inflamacijom [42].

Lipooksigenazni (LOX) i ciklooksigenazni (COX) posredovan metabolizam AA ključna je tačka u pokretanju većine inflamatornih bolesti. Dejstvom LOX i COX na AA i EPA dolazi do produkcije klase jedinjenja poznatih kao eikozanoidi, molekula u koje spadaju prostaglandini (PG),

tromboksani (TX), leukotrijeni (LT) epoksidi i oksilipini (Slika 2) [45]. Pro-inflamatorni leukotrijeni serije 4 i prostangladini serije 2 su derivati AA. Sa druge strane EPA se dejstvom ova dva enzimska kompleksa prevodi do leukotrijena serije 5, prostaglandina serije 3 i tromboksana. EPA i DHA su prekursori i za sintezu protektina i resolvina koji vode ka smanjivanju upalnih procesa, dok svi metaboliti AA imaju pro-inflamatorno dejstvo [46].

Desaturaze su pokazale veći afinitet za n-3 masne kiseline, zbog čega povećan unos ALA može dovesti do inhibicije sinteze AA iz LA i smanjenja proizvodnje pro-inflamatornih metabolita n-6 metaboličkog puta. Ovo ujedno vodi i ka povećanoj sintezi metabolita n-3 signalnog puta što rezultira smanjenjem inflamacije i faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) (Slika 2) [47,48].

Imunske i inflamatorne ćelije interaguju putem interleukina (IL), interferona, faktora nekroze tumora (TNF) i drugih proteina čija ekspresija raste tokom upalnih procesa. Do sada je okarakterisano preko 60 IL, sintetisanih od strane različitih ćelija, od kojih su prvobitni IL-1 i IL-2 pronađeni u monocitima i leukocitima [49]. Povišen nivo TNF- α , IL-6 i CRP (C reaktivnog proteina) u plazmi može biti indikator povećanog rizika od infarkta miokarda. Povišene koncentracije TNF- α i IL-6 u krvi javljaju se kod pacijenata sa hroničnom inflamacijom koju izazivaju oboljenja poput dijabetesa tipa 2, različitih tipova insulinske rezistencije i MetS [50–52].

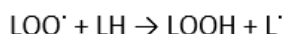
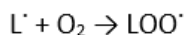
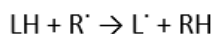
Iako se najčešće eksprimira kao odgovor na povećanu inflamaciju, IL-6 u nekim slučajevima pokazuje anti-inflamatorno dejstvo, poput izoforme koja se sintetiše u mišićima i koja deluje kao anti-inflamatorni citokin, a čija funkcija nije još u potpunosti razjašnjena [53]. Takođe, postoje i interleukini, poput IL-1ra, IL-2 i IL-10, čija je uloga isključivo anti-inflamatorna. Sinteza TNF- α i drugih citokina, bilo da su oni pro- ili anti-inflamatorni, može biti regulisana pojedinim klasama eikozanoida poput prostangladina, leukotrijena i tromboksana koji se, kao što je već napomenuto, sintetiše iz AA, EPA i DHA. Kako bi se smanjila upala važno je da ovaj odnos bude pomećen u pravcu n-3 metabolita [54]. Preporučeni dnevni unos n-6:n-3 MK je 1:1 do 4:1, međutim, kod velikog dela populacije, pogotovo kod onih čija se ishrana zasniva na zapadnjačkoj (engl. *Western Diet*) taj odnos je 15–20:1, dok je kod američke populacije čak 25:1 [55].

1.3 Oksidativni stres

Redoks homeostaza igra bitnu ulogu u očuvanju zdravlja ćelija i predstavlja fundamentalnu odrednicu fizioloških procesa. Zasniva se na održanju balansa između proizvodnje prooksidanata i aktivnosti sistema antioksidativne zaštite. Oksidativni stres je stanje do kog dolazi kada koncentracija prooksidanata prevaziđe kapacitet antioksidativne zaštite [56].

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) i reaktivne vrste azota lako reaguju sa većinom bioloških makromolekula, uključujući ugljene hidrate, proteine, nukleinske kiseline i lipide, dovodeći do njihove oksidativne modifikacije što na kraju rezultuje gubitkom funkcije. One nastaju od molekularnog kiseonika i azota kao rezultat normalnog ćelijskog metabolizma. Ukoliko sadrže jedan ili više nesparenih elektrona ovi molekuli spadaju u grupu slobodnih radikala [57], dok drugu grupu čine neradikalske vrste. U vrste od najvećeg fiziološkog značaja ubrajaju se superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidrosil radikal ($\cdot OH$), azot monoksid radikal (NO^{\cdot}), azot dioksid radikal (NO_2^{\cdot}), dok od neradikalskih treba pomenuti vodonik peroksid (H_2O_2), hipohloridnu kiselinu ($HOCl$) i peroksinitrit ($ONOO^-$) [58]. Akumulacija telesnih masnoća, posebno lipida u jetri, može povećati inflamaciju i izazvati proizvodnju ROS čime se gojaznost dovodi u direktnu vezu sa sistemskim povećanjem oksidacionog stresa [59].

Prekomerna akumulacija slobodnih radikala dovodi do narušavanja redoks balansa [56]. Interakcija slobodnih radikala i nezasićenih veza PUFA dovodi do peroksidacije. U prisustvu kiseonika generisani lipidni radikal stvara perokside, koji su sami nestabilni i reaktivni i pokreću autokatalitički lanac daljih radikalskih reakcija (Slika 3), što može rezultirati ozbiljnim oštećenjima membrana, organela i ćelija [60].

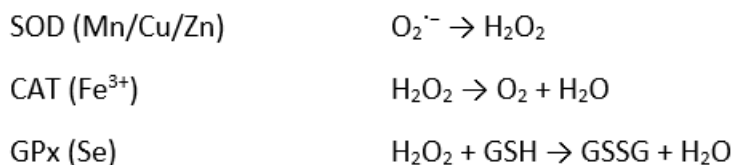


Slika 3. Lipidna peroksidacija u prisustvu slobodnih radikala. L – lipidni lanac PUFA. R[·] – slobodni radikal; L[·] – generisani PUFA radikal; LOO[·] – peroksi radikal; LOOH – lipidni vodonikperoksid; LO[·] – lipidni oksidni radikal

1.3.1 Sistemi antioksidativne zaštite

Budući da peroksidacija kao krajnji ishod može imati gubitak integriteta ćelijske membrane [61], prisustvo antioksidanasa je od izrazitog značaja. Antioksidansi su molekuli koji potpomažu eliminaciju slobodnih radikala i tako sprečavaju ili smanjuju oksidativni stres, a samim tim i potencijalna oštećenja biomolekula. Mogu se podeliti na enzimska i neenzimska endogena jedinjenja, ukoliko ih organizam sam stvara, kao i na egzogene antioksidanse koji se unose ishranom [57].

Organizam sam sebe štiti od oksidativnih oštećenja sintezom enzimskih antioksidanasa. Primeri su superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza (GPx) i paraoksonaze (PON). Oni smanjuju nivo vodonik peroksida (Slika 4) i stoga imaju veliki značaj na prevenciju lipidne peroksidacije [62]. Sva četiri enzima su metaloenzimi. Ukoliko je SOD zastupljena u citoplazmi kao kofaktore sadrži bakar i cink, dok je mitohondrijska SOD mangan zavisna [63]. Kao treća izoforma prisutna je i ekstracelularna SOD, koju ćelije sekretuju u ekstracelularni prostor i jedini je poznat antioksidativni enzim koji uklanja O₂^{·-} u ekstracelularnom prostoru [64]. Katalaza je hemoprotein, najvećim delom zastupljen u peroksizomima, dok je GPx selenoprotein zastupljen u citosolu i mitohondrijama [63]. PON se javlja u tri izoforme PON1, PON2 i PON3 koje su zastupljene u serumu, i predstavljaju kalcijum-zavisne hidrolitičke enzime. Ovi enzimi hidrolizuju različite tipove supstrata poput aril-estara, fosfortriestara, laktona i tiolaktona, ali su njihovi fiziološki supstrati i dalje nepoznati [65]. Reakcije katalizovane ovim enzimima prikazane su na Slici 4.



Slika 4. Enzimski antioksidansi i reakcije koje katalizuju. SOD – superoksid dizmutaza; CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza

Osim praćenja enzimске aktivnosti, oksidativni stres se može meriti i praćenjem koncentracija biomarkera nastalih procesima oksidacije, poput uznapredovalih proizvoda oksidacije proteina (AOPP), ishemijski modifikovanog albumina (IMA) i malondialdehida (MDA) [66]. U AOPP spadaju oksidativno modifikovani produkti proteina koji sadrže ditirozin, pentozitin i proteinske produkte sa karbonilnom grupom. Ova jedinjenja najčešće su generisana direktnom oksidacijom lizinskih, argininskih, treoninskih i prolinskih aminokiselinskih ostataka od strane ROS ili su nastala tokom mijeloperoksidazne aktivnosti tokom oksidativnog stresa. Povišena AOPP koncentracija zabeležena je kod pacijenata sa bolestima jetre i bubrega [67].

Hidroksi radikali generisani od strane ROS mogu dovesti do konformacionih promena na N kraju albumina što za posledicu ima proizvodnju IMA. IMA je jedan od markera infarkta miokarda, a njegova povišena koncentracija zabeležena je i kod hroničnih bolesti jetre [68]. MDA je jedan od krajnjih proizvoda peroksidacije PUFA i do njegove prekomerne produkcije dolazi tokom porasta koncentracije slobodnih radikala u organizmu. Predstavlja opšte poznati biomarker za određivanje oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa kod pacijenata sa različitim tipovima kancera, multiplom sklerozom i drugim bolestima [69–71]. Redoks balans se još može pratiti merenjem totalnog antioksidativnog statusa (TAS), totalnog oksidativnog statusa (TOS) ili izračunavanjem indeksa oksidativnog stresa (OSI) koji predstavlja odnos TOS/TAS [72]. Od nedavno, u radovima se sreće i globalni indikator oksidativnog stresa (OXY-SCORE) čija se vrednost dobija kombinovanjem pojedinačnih markera oksidativnih oštećenja i antioksidativnog kapaciteta. Računa se preko jednačine:

$$\text{OXYSCORE} = \text{SrVrednost (ANTIOXik - OXYim)n}$$

Gde je n – oznaka eksperimentalne grupe, i – pojedinačna vrednost antioksi skorova, k – parametri vezani za antioksi biomarkere i m – parametri vezani za oksi biomarkere [73]. Drugim rečima, OXYSCORE se računa kao srednja vrednost razlike svih antioksidantnih i prooksidantnih parametara grupe n .

Primeri prirodnih antioksidanasa su vitamini C, E i A, flavonoidi, karotenoidi, glutation, melatonin, bilirubin, poliamini i polifenoli. Neki od njih su hidrosolubilni i kao takvi najviše prisutni u citosolu, dok se ostali, liposolubilni, najčešće sreću u ćelijskim membranama [74]. Hidrosolubilni antioksidansi poput vitamina C, svoje antioksidativno dejstvo ispoljavaju u unutarćelijskoj i vanćelijskoj sredini, eliminacijom ROS, dok liposolubilni, poput vitamina E i A štite membrane od oksidativnih oštećenja [75]. Karotenoidi i polifenoli reaguju tako što inaktiviraju sam nastanak ili deaktiviraju već nastale slobodne radikale (peroksil radikal, hidroksil radikal, superoksid anjon radikal) i njihove prekursore. Najčešće deluju kao hvatači radikala u lančanim reakcijama peroksidacije, čime se dalja inicijacija prekida [76].

Generalno, svi prirodni antioksidansi, posebno polifenoli i karotenoidi, pokazuju širok spektar bioloških efekata, poput anti-inflamatornog, antibakterijskog i antivirusnog dejstva. Njihov svakodnevni unos dovodi do prevencije starenja i smanjuje faktor rizika za razvoj različitih tipova kancera [77].

1.4 Animalni model metaboličkog sindroma

Jedan od glavnih problema humanih studija je heterogenost grupe koja potiče od različitih genetskih predispozicija, etničkog porekla, životnih navika, kulturoloških razlika, religijskih uverenja, kao i ostalih faktora spoljašnje sredine. Sve to može biti razlog izostanka uporedivih i

pouzdanih rezultata, uprkos desetinama godina istraživanja i značajnim uloženim resursima. Osim toga, humane studije su često povezane sa problemom etičnosti, naročito kada su u pitanju ispitivanja efikasnosti i bezbednosti potencijalnih lekova i različitih kliničkih intervencija. Zbog toga se javila potreba za model sistemima koji će služiti kao brzi skriningi za terapiju ili nutritivnu intervenciju i za nekoliko meseci dati rezultate na osnovu kojih se stiže uvid u to da li neka ideja ima perspektivu za dalja klinička ispitivanja i ulaganja.

Veliki broj istraživanja usmeren je na animalne modele, prvenstveno na miševе i pacove. Dok je *Sprague-Dawley* soj pacova pokazao veliku razliku u lokomotornim sposobnostima između pojedinačnih jedinki, pri čemu su visoko aktivne jedinke otpornije na razvoj gojaznosti usled prilagođene ishrane u odnosu na slabo aktivne [78], *Wistar* soj se pokazao kao uniformniji model, pa samim tim i pogodniji za proučavanje MetS. Parametri MetS kod *Wistar* pacova slični su onima koji se dijagnostikuju kod ljudi sa ovim sindromom, dok je njihovu indukciju moguće postići nutritivnom intervencijom koja oponaša ljudsku ishranu. Osim toga, pacovi su kao vrsta pogodni za ovaj tip studije jer se relativno lako uzgajaju i razmnožavaju.

Kod pacova se MetS najčešće indukuje uvođenjem ishrane sa visokim sadržajem šećera, visokim procentom masti ili kombinacijom dijete koja sadrži i masti i šećere [79]. Najčešće se koristi model u kom se prosti šećeri poput fruktoze i saharoze kombinuju sa visokim procentom masti i koji imitira model nezdrave „zapadnjačke“ ishrane [80]. Podaci iz literature ukazuju na to da postoje različiti odnosi šećera i masti koji se koriste u ishrani, zatim različita starosna dob pacova na početku eksperimenta, kao i razlika u trajanju tretmana, koji se kreću u rasponu od dve nedelje do čak šest meseci [81–84]. Zbog toga, definisana univerzalna ishrana koja bi dovela do indukovanja MetS, kao ni saglasnost o dužini trajanja tretmana i dalje ne postoje.

1.5 Metabolizam masti

1.5.1 Biosinteza masti

Masne kiseline su primarna komponenta triglicerida i fosfolipida, a njihova sinteza se odvija prvenstveno u jetri, a potom i u masnom tkivu, plućima i mozgu. Acetil-CoA je prekursor za sintezu MK i nastaje oksidacionom dekarboksilacijom piruvata, nastalog razgradnjom aminokiselina i šećera, a može biti i produkt β oksidacije [85], koji se dalje ireverzibilnim procesom u prisustvu acetyl-CoA karboksilaze prevodi do malonil-CoA [86]. Oba molekula se kovalentno vezuju za po jednu sulfhidrilnu grupu acil nosećeg proteina (engl. *Acyl Carrier Protein, ACP*) nakon čega nastaju acetyl-ACP i malonil-ACP. Obe grupe aktiviraju se tioestrom što ih čini dostupnim za dalje delovanje sintaza [87]. Masnokiselinske sintaze su enzimi koji katalizuju dalju elongaciju masnokiselinskog lanca putem reakcije od četiri koraka (elongacija, redukcija, dehidratacija i ponovna redukcija). U svakom koraku acil lanac se produžava za dva ugljenikova atoma koje donira aktivirani malonat uz oslobađanje CO₂. Ovaj ciklus se ponavlja do sinteze palmitinske kiseline koja se dejstvom tioesteraze oslobađa u citosol [88] nakon čega se daljim dejstvom elongaza prevodi do LC-PUFA i/ili pakuje sa apolipoproteinima u VLDL i transportuje do adipocita. Sinteza LC-PUFA i njihovih daljih metabolita detaljnije je opisana u poglavlju 1.2.1.

1.5.2 Unos masti ishranom i njihov transport

Masti unete ishranom dospevaju do tankog creva, gde se dalje pomoću žučnih kiselina emulguju kako bi bile lakše dostupne digestivnim lipazama. Žučne kiseline su prirodni emulgatori

koji se sintetišu iz holesterola u jetri, a skladište u žučnoj kesi. Nakon obroka bogatog mastima luče se u lumen tankog creva i rastvaraju lipide na sitnije kapljice, omogućujući lipazama da deluju. Dejstvom lipaza oslobađaju se masne kiseline i monogliceridi, što omogućava dalju apsorpciju masti [89]. Lipidi apsorbovani od strane epitela se vraćaju u formu TG, a potom pakuju sa holesterolom i specifičnim proteinima (apolipoproteinima) u lipoproteine različite gustine i funkcije [90]. Hilomikroni su lipoproteinske partikule najmanje veličine i proizvode ih ćelije epitela tankog creva [91]. Imaju ulogu u daljem transportu TG unetih ishranom do masnog tkiva gde mogu biti skladišteni u vidu energetskog depoa ili do drugih tkiva gde će se β oksidacijom proizvesti potrebna energija. ApoC II koji ulazi u sastav hilomikrona aktivira lipaze u kapilarima, adipocitima i mišićima i tako omogućava oslobađanje MK u ova tkiva. Nakon transporta TG, ostaci hilomikrona, koji i dalje sadrže holesterol i apoproteine, transportuju se do jetre, gde ih ona preuzima endocitozom zahvaljujući prepoznavanju od strane apoE receptora, nakon čega se razgrađuju [92].

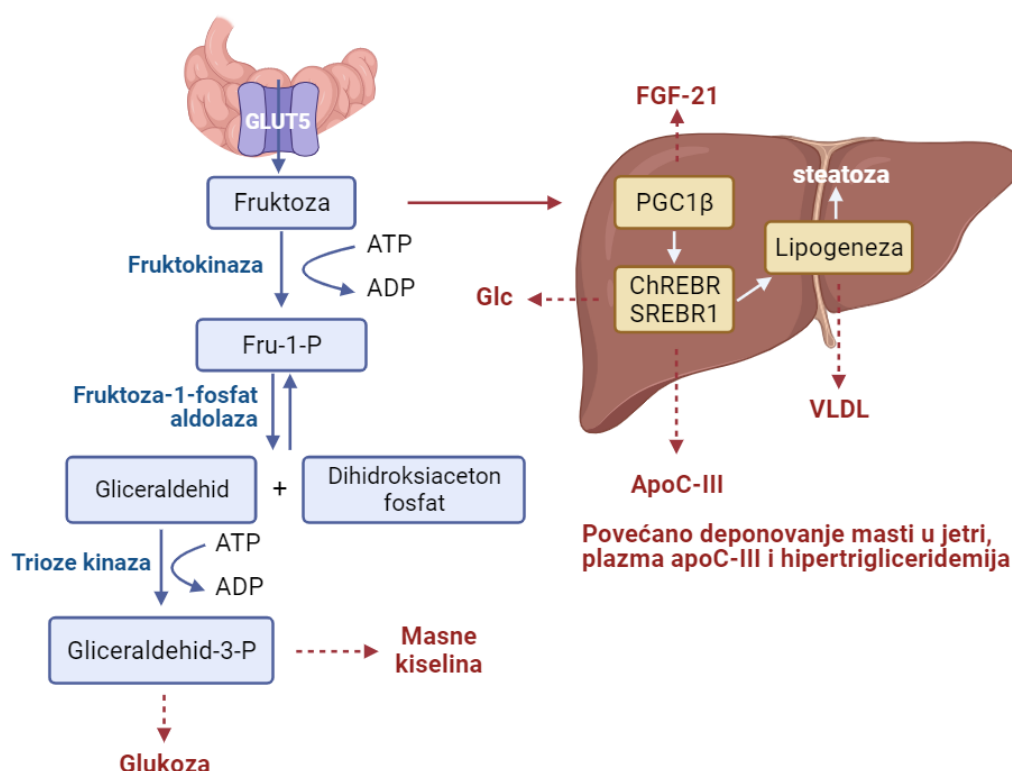
Ukoliko ishrana sadrži više masti nego što je potrebno za zadovoljavanje energetskih potreba organizma jetra ih prevodi u TG i pakuje u lipoproteinske čestice vrlo niske gustine (engl. *Very Low-Density Lipoprotein*, VLDL), koje osim TG sadrže i određenu količinu holesterol estera. VLDL prenosi TG do ostalih tkiva, a najvećim delom do adipocita koji ih skladište [93]. Produkcija VLDL je povećana i kod ishrane sa velikim količinama šećera, jer dovodi do *de novo* lipogeneze [94]. Predajom TG tkivima, jezgro VLDL se smanjuje i prelazi u IDL (engl. *Intermediate-Density Lipoprotein*, IDL), čestice koje preuzima jetra vezivanjem za ApoB-100 i ApoE ili u prisustvu hepatične lipaze gube ApoE i prelaze u LDL. LDL ima ulogu u prenosu holesterola do različitih tkiva, a komunikaciju ostvaruju putem ApoB-100 proteina i njegovog receptora, koji kod VLDL čestica nije izložen, pa je samim tim i nedostupan za međucelijsku komunikaciju. Povećana koncentracija LDL u krvi posledica je povećane koncentracije holesterola, koji preostaje nakon što su ćelije zadovoljile svoje energetske potrebe za istim i može dovesti do formiranja ateroskleroznih plakova koji vode ka daljem razvoju aterosklerozne patologije, zbog čega se visok nivo ovog parametara smatra nepovoljnim [95].

U poslednju klasu lipoproteinskih čestica spada HDL, zastupljen u jetri i tankom crevu, karakterističan po tome što je za razliku od prethodnih klasa izrazito bogat proteinima. Njegova uloga je da skuplja holesterol iz ostataka hilomikrona i VLDL, gradi holesterol estere i transportuje ih u jetru gde će biti razgrađeni ili prevedeni u žučne kiseline, smanjujući tako nivo holesterola u cirkulaciji [96], pa se njegove visoke koncentracije u krvi smatraju pozitivnim, dok je smanjenje njegove koncentracije karakteristično za određena pogoršanja zdravstvenog stanja, uključujući i MetS [97].

Kao što je napomenuto, jetra predstavlja centralni organ metabolizma masnih kiselina, koje u nju dospevaju preuzimanjem iz plazme ili *de novo* sintezom. Kod duže izloženosti ishrani sa visokim sadržajem masti i prostih šećera, koja najčešće rezultira gojaznošću, dolazi do promena u metabolizmu MK što dovodi do nakupljanja TG unutar hepatocita i razvoja nealkoholne masne jetre (engl. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) [98]. Prisustvo NAFLD dovodi do poremećaja u metabolizmu glukoze, što uključuje povećanje nivoa glukoze u krvi i insulinsku rezistenciju. Takođe, ono utiče na metabolizam masnih kiselina, uzrokujući povećanu sintezu i smanjenu razgradnju masti u jetri. Pored toga, NAFLD izaziva dislipidemiju, odnosno povećanje količine triglicerida i LDL holesterola, uz smanjenje količine HDL holesterola. Ove promene su praćene hroničnom inflamacijom u jetri i povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti i MetS [99].

1.6 Metabolizam fruktoze

Fruktoza je šećer koji je prirodno zastupljen u voću, voćnim sokovima, pojedinom povrću i medu. Gradivni je element saharoze, “belog” šećera, a takođe je glavna komponenta visokofruktoznog kukuruznog sirupa koji se koristi kao zaslađivač u industriji hrane i napitaka [100]. Fruktoza se unosi iz lumena tankog creva putem GLUT5 transportera [101], a potom se dejstvom kinaza i aldolaza prevodi do gliceraldehida i dihidroksiaceton fosfata. Gliceraldehid se dalje fosforilizuje u prisustvu trioza kinaze do gliceraldehid-3-fosfata (GAP). GAP i drugi trioza fosfati se mogu metabolisati do laktata i acetil-CoA koji se oksiduje ili, kod unosa koji prevazilazi energetske potrebe organizma, koristi za liponeogenezu i deponovanje masti [102]. Višak GAP može se i glukoneogenezom metabolisati do glukoze, što dovodi do povećanja njene koncentracije u krvi, što je izrazito opasno za ljude sa dijabetesom, zbog čega unos fruktoze mora biti u kontrolisanim dozama [103] (Slika 5).



Slika 5. Unos fruktoze i njen metabolizam u tankom crevu i jetri. Fruktoza se unosi iz creva putem GLUT5 transportera i u prisustvu različitih klasa enzima prevodi do gliceraldehid-3-fosfata. Ukoliko je unos fruktoze prekomeran dolazi do sinteze masnih kiselina i njihovog deponovanja u jetri što najčešće rezultuje steatozom. Gliceraldehid-3-fosfat se dalje može prevesti do glukoze i dovesti do povećanja njene koncentracije u krvotoku. U jetri višak fruktoze dovodi do liponeogeneze i može rezultovati steatozom.

Prekomerna konzumacija fruktoze utiče na lipidni metabolizam, dovodi do povećanja *de novo* lipogeneze i smanjenja β oksidacije u jetri, što rezultira steatozom i povećanjem nivoa TG u cirkulaciji u vidu VLDL [104]. U jetri fruktoza aktivira transkripcione faktore ChREBP (engl. *Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein*) i SREBP1c (engl. *Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1c*) [105]. ChREBP igra ključnu ulogu u metabolizmu lipida i ugljenih hidrata, koordinišući fruktolizu, glikolizu, glukoneogenezu, lipogenezu, povećava ekspresiju apoC-III (inhibitora lipoproteinske lipaze i “čistača” lipoproteinskih ostataka) u jetri, što dalje dovodi do povećanja njegove koncentracije u plazmi, a takođe aktivira i sekreciju VLDL. Osim toga, ChREBP, utiče i na ekspresiju GLUT5 u tankom crevu, čime se reguliše sam unos fruktoze [106]. SREBP1c

indukuje *de novo* lipogenezu, a njegovu sintezu regulišu nutrijenti i hormoni. Iako fruktoza ne stimuliše lučenje insulina, njeno dugotrajno konzumiranje može dovesti do hiperinsulinemije što dalje dovodi do povišene ekspresije i aktivacije SREBP1c u jetri. Takođe SREBP1c se može aktivirati i samom fruktozom [107].

1.7 Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji su prirodno zastupljeni u voću, povrću i žitaricama. Pojedine vrste voća, poput grožđa, jabuka, krušaka, višanja i bobičastog voća sadrže 200-300 mg polifenola na 100 g svežih plodova. Proizvodi dobijeni iz ovog voća takođe sadrže polifenole u značajnim količinama [108]. Pored svoje antioksidativne aktivnosti, polifenoli su pokazali mnoge druge benefite po opšte zdravlje. Veliki broj istraživanja pokazao je da redovno konzumiranje hrane i napitaka bogatih polifenolima doprinosi regulaciji glukoze homeostaze i osetljivosti na insulin [109], utiče preventivno na razvoj različitih tipova kancera, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti kao i dijabetesa tipa 2 [110,111]. Takođe su brojne animalne i humane studije dokazale pozitivno dejstvo polifenola na redukciju simptoma MetS [112] kao i prevenciju njegovog razvoja [113].

1.7.1 Polifenoli crne ribizle i drenjine

Crna ribizla (CR) je drvenasta biljka koja vodi poreklo iz severnog dela Evrope i severne i centralne Azije. Zbog visokog sadržaja soka, intenzivne boje i organoleptičkih svojstava, plodovi crne ribizle su od velikog značaja za prehrambenu industriju [114]. Bobice crne ribizle sadrže različite polifenolne komponente koje imaju pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje [115]. Posebno su bogate antocijaninima, proantocijanidinima, kvercetinom, miricetinom, izorhamnetinom i fenolnim kiselinama. Ova jedinjenja su pokazala inhibitorno dejstvo na razvoj određenih tipova karcinoma, kardiovaskularnih poremećaja, kao i poremećaja koji se dovode u vezu sa inflamacijom [116–118].

Drenjina (D) je žbunasta biljka, koja se sreće u istočnim i južnim regionima Evrope, kao i u zapadnoj Aziji [119]. Ova biljka rađa crvene bobice, slatko-kiselog ukusa, koje su bogate polifenolima i drugim bioaktivnim jedinjenjima sa farmakološkim i terapijskim efektima, i kao takva se od davnina koristi u srpskoj narodnoj medicini [120]. Plodovi drene takođe predstavljaju bogat izvor polifenola i drugih bioaktivnih jedinjenja, prvenstveno antocijana i iridoida, koji su u dosadašnjim studijama pokazali antiarterogena, anti-inflamatorna i neuroprotektivna svojstva [121]. Zbog svojih potencijalnih zdravstvenih efekata na različite tipove oboljenja, efekti obe vrste bobica se sve više ispituju.

Kao što je već napomenuto, plodovi obe biljke sadrže različite biološki aktivne fitohemikalije, poput fenola, organskih kiselina i vitamina [122,123]. Studije su pokazale da suplementacija proizvodima od crne ribizle i drenjine može dovesti do ublažavanja određenih parametara MetS poput hiperglikemije, hipertenzije, dislipidemije i gojaznosti [124,125]. Čak su i kratkoročne suplementacije gojaznih ispitanika ekstraktom CR, u trajanju sedam do osam dana, pokazale značajno poboljšanje osetljivosti na insulin i redukciju sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska u poređenju sa placebo grupom [126]. Ovo je važno jer relativno mala smanjenja sistolnog (10-12 mmHg) i dijastolnog pritiska (5-6 mmHg) mogu smanjiti rizik od razvoja koronarnih srčanih bolesti za 16%, a od srčanog udara za čak 40% [127]. Takođe, visoke koncentracije antocijana i iridoida u bobicama drenjine i njihovo sinergističko dejstvo mogu uticati na prevenciju razvoja ateroskleroze [128]. Ova

kardioprotektivna uloga polifenola može se pripisati njihovom uticaju na oksidativni stres i inflamaciju [129]. Budući da je za polifenole dobro poznato da pokazuju antioksidativno dejstvo, konzumacija ova dva soka može da bude korisna za održanje redoks homeostaze organizma. Gojazne osobe često su izložene hroničnim sistemskim inflamacijama niskog nivoa, do kojih dolazi usled hroničnog sistemskog oksidativnog stresa [14]. Akumulacija masti predstavlja okidač za povećanje koncentracije ROS u adipocitima do čega najverovatnije dolazi usled stimulacije NOX i redukcijom enzima antioksidativne zaštite. Izloženost masnog tkiva oksidativnom stresu nadalje dovodi do smanjenja anti-inflamatornog adiponektina i povećanja sinteze inflamatornih citokina [130]. Oba ova procesa dovode do narušavanja insulinskog signaliziranja putem indukcije fosforilacije insulinskog receptora i inhibicije translokacije glukoznog transportera 4 (GLUT4) i njegove genske transkripcije što može dovesti do razvoja insulinske rezistencije [131]. Sa druge strane, suplementacija određenim klasama polifenola može uticati na sintezu i sekreciju visfatina [132], leptina [133], adiponektina [134] i drugih adipokina, čime se utiče na regulisanje i prevenciju gojaznosti, kao i poremećaja koji se sa njom dovode u vezu [135].

2. CILJEVI

Opšti cilj:

Uspostaviti animalni model metaboličkog sindroma i ispitati efekte konzumiranja matičnih sokova crne ribizle i drenjine na prevenciju razvoja metaboličkog sindroma kod pacova na ishrani obogaćenoj mastima i fruktozom.

Specifični ciljevi:

- odrediti podsoj *Wistar* pacova, *Kyoto* ili *Hannover*, koji je podložniji razvoju metaboličkog sindroma pod uticajem ishrane obogaćene mastima 25% (suncokretovo ulje) i fruktozom 20% (HFHF ishrana),
- odrediti uzrast pacova, osam nedelja ili četiri meseca, koji je podložniji razvoju metaboličkog sindroma pod uticajem HFHF ishrane,
- odrediti dužinu trajanja nutritivnog tretmana HFHF ishranom, koja je potrebna za razvoj animalanog modela metaboličkog sindroma,
- odrediti potrebu za dodavanjem farmakoliških sredstava (holne kiseline) u HFHF ishranu, za razvoj animalanog modela metaboličkog sindroma,

U slučaju da istraživanja vezana za ostvarivanje prethodno navedenih ciljeva pokažu da HFHF ishrana sama po sebi nije dovoljna za razvoj animalanog modela metaboličkog sindroma, predviđeno je da se u nastavku istraživanja koristi HFHF ishrana dodatno modifikovana dodavanjem 0,1% holne kiseline (HFF ishrana).

Ispitati efekte svakodnevnog desetonedeljnog konzumiranja 20% matičnih sokova crne ribizle i drenjine na prevenciju razvoja metaboličkog sindroma kod pacova na ishrani obogaćenoj mastima i fruktozom sa 0,1% dodatka holne kiseline na:

- antropometrijske i biohemijske parametre,
- vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska,
- prevenciju razvoja insulinske rezistencije,
- parametre oksidativnog stresa (enzime pro- i antioksidativne zaštite) u plazmi, jetri i masnom tkivu,
- histopatološke promene u jetri, pankreasu i masnom tkivu,
- lučenje insulina i glukagona u pankreasu,
- faktore inflamacije u jetri,
- masnokiselinski profil ukupnih lipida jetre, masnog tkiva i plazme.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Analiza sokova

3.1.1 Osnovne karakteristike sokova

U studiji su korišćeni komercijalni matični sokovi od crne ribizle i drenjine. Sokovi su nabavljeni od lokalnog proizvođača i dostupni su u slobodnoj prodaji. Osnovne informacije o nutritivnoj i energetske vrednosti sokova preuzete su sa etikete i prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2. Nutritivna vrednost matičnih sokova crne ribizle i drenjine na 100 ml

Nutritivna vrednost	Crna ribizla	Drenjina
Ugljeni hidrati (g)	14	12
Masti (g)	1	0.19
Proteini (g)	0,3	0,48
Enetgetska vrednost (kcal)	63	52

1 kcal = 4,18 kJ

3.1.2. Analiza mikronutrijenata

U sertifikovanoj laboratoriji za kontrolu kvaliteta i kvantiteta robe “REA LAB” (d.o.o. Beograd) urađena je analiza odabranih mikronutrijenata: vitamina C, kalijuma, kalcijuma, magnezijuma i gvožđa (Tabela 3).

Tabela 3. Koncentracija mikronutrijenata u sokovima crne ribizle i drenjine

Ispitivani parametar	Crna ribizla	Drenjina	Oznaka metode
Vitamin C (mg/l)	60,8	ND	DM-213
Gvožđe (mg/kg)	ND	ND	SRPS EN 16943:2017
Magnezijum (mg/kg)	70,7	86,3	SRPS EN 16943:2017
Kalcijum (mg/kg)	126,2	143,2	SRPS EN 16943:2017
Kalijum (mg/kg)	1959	2954	SRPS EN 16943:2017

ND – ispod granica detekcije

3.1.3 Određivanje polifenolnog sastava sokova metodom HPLC-MS/MS

Za analizu su korišćeni sokovi crne ribizle i drenjine iz tri različite serije. Do upotrebe svi uzorci sokova su čuvani u frižideru na temperaturi od 4 °C. Uzorci su centrifugirani pri 14 000 × g tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim filtrirani pomoću 0.45 µm filtera (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Nemačka) pre daljih analiza.

HPLC-MS/MS analiza je vršena prema metodi opisanoj od strane Debetića i saradnika [136]. Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Pursuit 3 PFP kolona dimenzija 150 × 4,6 mm sa veličinom čestica od 3 µm (Agilent Technologies, Amstelveen, Holandija). Podešen je protok od 800 µl/min. Kao pokretna faza korišćen je rastvarač A (0,1% mravlja kiselina) i rastvarač B (acetonitril)

uz primenu gradijentnog sistema eluiranja: 0 min/5%, 22 min/35%, 24 min/100% i 25 min/5%, nakon čega je sledilo 5 minuta ekvibracije kolone sa 5% rastvaračem B. Injekciona zapremina sokova iznosila je 5 µl (oba uzorka su pre analize razblažena 10 puta). Fotodiodna detekcija vršena je u UV rasponu od 200 nm do 400 nm. Nakon HPLC razdvajanja, eluent je uveden u zagrejani elektrosprej jonizacioni izvor (HESI) trokvadrupolnog masenog analizatora TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, SAD). MS analiza je vršena u negativnom jonizacionom režimu uz sledeće MS parametre: napon raspršivanja 2500 V; temperatura vaporajzera 400 °C; temperatura kapilare 300 °C; azot; *sheath* gas (50 jedinica) i *auxiliary* gas (10 jedinica); helijum; i kolizijski gas pri pritisku od 1,5 mTorr. Integracija vrhova i kalibracija su rađeni korišćenjem LC Quan™ softvera.

3.1.4 Određivanje ukupnih fenola, flavan-3-ola i antocijana u sokovima

Ukupna koncentracija fenola određivana je pomoću brzog mikrotesta Folin-Ciocalteu-ovom metodom [137]. Kao standard korišćena je galna kiselina (GAE). GAE i sokovi su razblaživani 50 puta, a zatim je u bunariće mikrotitar pločice pipetirano po 10 µl standarda i ispitivanog uzorka. Usledilo je dodavanje 100 µl komercijalnog Folin–Ciocalteu reagensa i 80 µl 1 M Na₂CO₃ nakon čega su rastvori inkubirani 60 minuta u mraku. Apsorpcija je merena na 630 nm (BIOTEK, Santa Clara, CA, SAD, ELx800 Absorpcioni mikrotitar čitač) i izražavana kao mg ekvivalenata galne kiseline po litru soka (mg GAE/l). Kao slepa proba korišćena je destilovana voda.

Određivanje ukupnog sadržaja flavan-3-ola rađeno je pomoću mikroeseja i p-dimetilaminocinamaldehida (DMAC), metodom opisanom od strane Payne i saradnika [138]. Kao standardni rastvor korišćen je procijanidin B1. Za ovu analizu je sok od crne ribizle razblažen 100 puta, dok je sok od drenjine razblažen 10 puta. Zapremina od 50 µl uzorka i standarda, mešana je sa 250 µl DMAC rastvora. Reakciona smeša u mikrotitarskoj pločici očitavana je na 630 nm, na temperaturi od 25 °C. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata procijanidina B1 po litru soka (mg PB1E/l). Kao slepa proba korišćen je etanol.

Ukupan sadržaj antocijana meren je diferencijalnom pH metodom, koja se zasniva na sposobnosti antocijana da promene boju kod promene pH vrednosti. Navedeni protokol je opisan od strane Diasonease i saradnika [139]. Pripremana su po dva razblaženja od oba soka, prvo u rastvoru kalijum-hlorida (25 mM, pH 1,0) i drugo u acetatnom puferu (0,4 M, pH 4,5). Nakon 15 minuta inkubacije apsorbancija je očitavana na 510 nm i 700 nm na UV-vis J.P. SELECTA spektrofotometru (Barselona, Španija). Ukupan sadržaj antocijana računat je prema formuli:

$$\text{sadržaj antocijana (mg/l)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / \epsilon \times L$$

$A = (A_{510 \text{ nm pH } 1,0} - A_{700 \text{ nm pH } 1,0}) - (A_{510 \text{ nm pH } 4,5} - A_{700 \text{ nm pH } 4,5})$; MW = molekulska masa cijanidin 3-galaktozida (484,84 g/mol); DF = faktor razblaživanja; ϵ = molarna apsorptivnost cijanidin 3-galaktozida u metanol/HCl ($34.300 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$); L = dužina puta svetlosti (1 cm).

Kao slepe probe korišćeni su rastvori bez dodatka soka.

3.1.5 Određivanje pojedinačnih fenolnih komponenti u sokovima

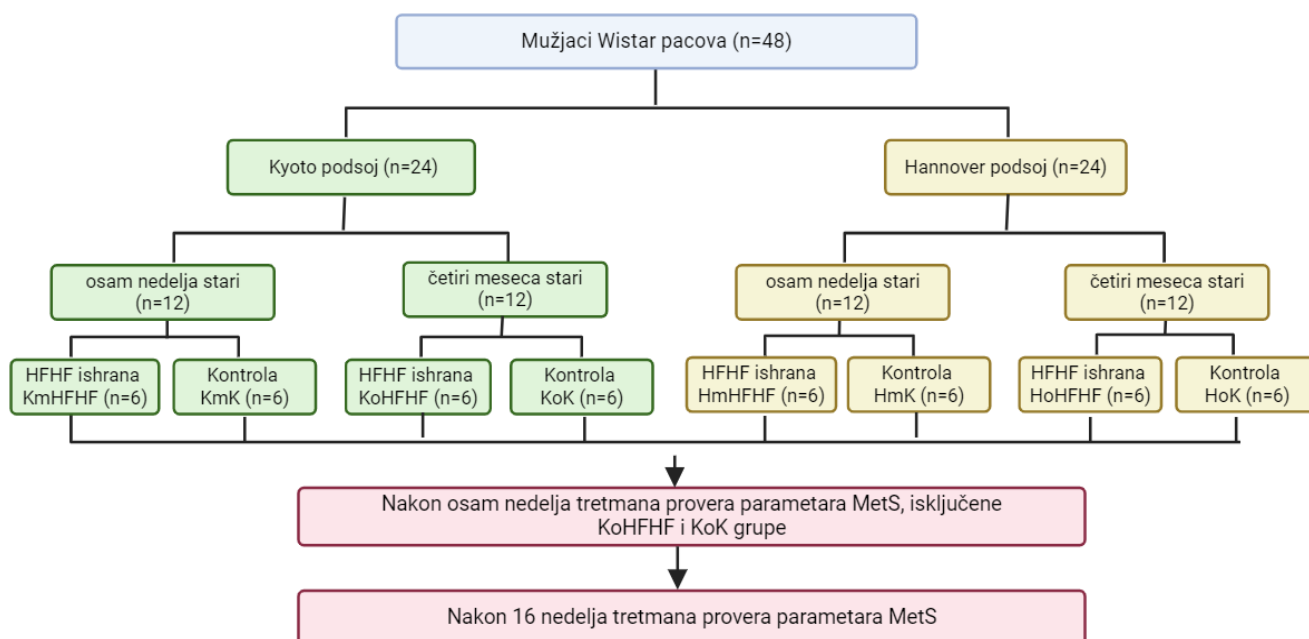
Pojedinačna fenolna jedinjenja su identifikovana upoređivanjem njihovih retencionih vremena i masenih spektara sa standardima. Njihovo kvantifikovanje je vršeno pomoću eksternih kalibracionih krivih generisanih integracijom površina apsorpcionih vrhova.

3.2 Eksperimentalne životinje i dizajn studije za razvoj animalnog modela metaboličkog sindroma

Tokom svih eksperimenata urađenih u sklopu ove teze pacovi su boravili u kontrolisanom okruženju koje je karakterisala stabilna sobna temperatura (21 ± 2 °C), vlažnost ($55 \pm 10\%$) i smena dana i noći od 12 sati svetla i 12 sati mraka.

Studija je sprovedena u skladu sa ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) protokolom za laboratorijske životinje, Nacionalnim zakonima o pravima životinja ("Sl. gl. RS" 41/09 i 39/10) i Direktivom 2010/63/EU. Dizajn studije je odobren od strane Etičkog komiteta Instituta za medicinska istraživanja, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu i Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije. Broj etičke dozvole je 323-07-08846/2021-05, a datum izdavanja 10. septembar 2021. godine.

U studiji su korišćeni mužjaci dva podsoja *Wistar* pacova *Kyoto* i *Hannover*, od svakog podsoja dve starosne grupe: životinje stare osam nedelja, koje još nisu ušle u odrasli period i životinje stare četiri meseca, odrasle jedinke. *Kyoto* pacovi su gajeni u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, dok su *Hannover* pacovi poreklom iz Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Životinje iste starosti i podsoja su nasumično deljene u dve grupe, grupu koja je konzumirala standardnu hranu i grupu koja je stavljena na modifikovanu ishranu sa visokim sadržajem masti i fruktoze (engl. *High-Fat High-Fructose*, HFHF). Sastav modifikovane hrane bio je: standardni mleveni pelet (50%) [140], suncokretovo ulje (25%), fruktoza (20%) i voda (5%). Svi sastojci su pomešani nakon čega je smeša homogenizovana i ponovo peletirana. U eksperiment je ušlo ukupno 48 životinja, podeljenih u osam grupa od po šest životinja (tri životinje po kavezu): 1. grupa – *Kyoto* mladi na standardnoj ishrani (KmK), 2. grupa – *Kyoto* mladi na HFHF ishrani (KmHFHF), 3. grupa – *Kyoto* odrasli na standardnoj ishrani (KoK), 4. grupa – *Kyoto* odrasli na HFHF ishrani (KoHFHF), 5. grupa – *Hannover* mladi na standardnoj ishrani (HmK), 6. grupa – *Hannover* mladi na HFHF ishrani (HmHFHF), 7. grupa – *Hannover* odrasli na standardnoj ishrani (HoK), 8. grupa – *Hannover* odrasli na HFHF ishrani (HoHFHF) (Shema 1). Nakon osam nedelja provedenih na eksperimentalnoj ishrani sve grupe su testirane na parametre karakteristične za MetS, a tretman je produžen na 16 nedelja kod onih grupa kod kojih je došlo do promene merenih parametara.



Shema 1. Shematski prikaz eksperimenta. Prikazuje grupe koje su ušle u studiju navodeći podsoj, starost i dužinu trajanja eksperimenta. HFHF - ishrana sa visokim sadržajem masti (25% suncokretovog ulja) i fruktoze (20%); MetS – metabolički sindrom; KmK - *Kyoto* mladi na standardnoj ishrani; KmHFHF - *Kyoto* mladi na HFHF ishrani; KoK - *Kyoto* odrasli na standardnoj ishrani; KoHFHF - *Kyoto* odrasli na HFHF ishrani; HmK – *Hannover* mladi na standardnoj ishrani; HmHFHF – *Hannover* mladi na HFHF ishrani; HoK – *Hannover* odrasli na standardnoj ishrani; HoHFHF – *Hannover* odrasli na HFHF ishrani

3.3 Eksperimentalne životinje i dizajn studije za ispitivanje uticaja soka drenjine i crne ribizle na prevenciju metaboličkog sindroma

Trideset šest mužjaka *Wistar Hannover* pacova starosti četiri meseca nabavljeno je od Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Nakon perioda prilagođavanja od deset dana, pacovi su podeljeni na četiri grupe od po devet životinja (tri životinje po kavezu). Tri grupe su stavljene na modifikovani režim ishrane u trajanju od deset nedelja, dok je jedna grupa bila na standardnoj ishrani. Modifikovani režim ishrane podrazumevao je ishranu peletom sa visokim sadržajem masti i fruktoze i 0,1% holne kiseline – HFF pelet.

1. Kontrolna grupa (K) hranjena je standardnim peletom, i pila je vodu sa česme.
2. Grupa HFF je hranjena HFF peletom i pila je vodu sa česme.
3. Grupa CR je hranjena HFF peletom i umesto vode pila je 20% sok crne ribizle.
4. Grupa D je hranjena HFF peletom i umesto vode pila je 20% sok drenjine.

HFF pelet je pravljen tako što je 500 g mlevenog standardnog peleta mešano sa 250 g suncokretovog ulja, 200 g fruktoze, 1 g holne kiseline (Sigma-Aldrich, Kanada, Ltd) i 50 ml vode. Smeša je homogenizovana, peletirana i čuvana u frižideru na 4 °C do upotrebe. Nova količina HFF peleta pripremana je na svaka tri dana. Dvadeset procentni rastvor soka pripreman je mešanjem komercijalno dostupnog matičnog soka sa česmenskom vodom u zapreminskom odnosu 1:4. Svež rastvor soka pravljen je i menjan svako jutro. Sve životinje su imale *ad libitum* pristup hrani i tečnosti.

Unos hrane i tečnosti meren je tri puta nedeljno, a na kraju svake nedelje računat je prosečan unos hrane i tečnosti po kavezu. Masa životinja merena je jednom nedeljno.

3.4 Merenje krvnog pritiska

Krvni pritisak je meren kod svesnih životinja, prethodno priviknutih na metodu povremenim držanjem u imobilizatorima u trajanju od 20-30 minuta. Pritisak je meren neinvazivnom metodom, preko repne arterije, uređajem specijalizovanim za tu namenu (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems – MRBP-R, IITC Life Science Inc. USA). Ukratko, nakon 20 minuta u inkubatoru na 37 °C radi širenja repne arterije, životinje su pojedinačno fiksirane u prozirnog akrilnom imobilizatoru, a rep im je provlačen kroz manžetnu koja služi za merenje visine pritiska. Merenje je vršeno tri puta, a kao vrednost sistolnog i dijastolnog pritiska je beležen prosečni rezultat. Temperatura prostorije održavana je konstantnom na 23 °C, radi omogućavanja preciznosti u radu instrumenta.

3.5 Intraperitonealni test opterećenja glukozom (IPGTT)

Intraperitonealni test opterećenja glukozom rađen je tri dana pre kraja tretmana. Četiri sata pre testa pacovima je uklanjana hrana i sok je menjan vodom. Neanesteziranim životinjama je intraperitonealno ubrizgavan rastvor glukoze koncentracije 500 mg/ml (2 g/kg telesne mase životinje), nakon čega je merena promena koncentracije glukoze u krvi u trajanju od dva sata. Krv je uzorkovana odsecanjem vrha repa i nivo glukoze meren je pre tretmana, kao i u 15, 30, 60, 90 i 120 minutu, korišćenjem glukometra (Contour Plus, Bayer, Germany). Površina ispod glikemijske krive je izračunata korišćenjem trapezoidnog pravila (AUC glucose 0-120 min, mmol/l vs. najniža vrednost).

3.6 Uzorkovanje krvi i tkiva pacova

Nakon deset nedelja tretmana životinjama je uklanjana hrana i sok je menjan vodom, kako bi se omogućilo prekončno gladovanje koje prethodi žrtvovanju. Životinje su pre žrtvovanja anestezirane 4% izofuranom (IITC Life Science, Woodland Hills, USA). Anesteziranim životinjama je uzorkovana krv iz srca, do uginuća, kardiopunkcijom upotrebom heparinizovane 20G igle. Krv je sakupljena u kivete sa etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom. Plazma je odvajana centrifugiranjem na 3000 x g, 20 minuta na 4 °C. Dobijena količina je alikvotirana na različite zapremine i skladištena na -80 °C za dalje analize.

Jetra i visceralno masno tkiva su izdvajani i merena im je masa. Vrednost mase ovih organa korišćena je za izračunavanje procenta njihove mase u odnosu na ukupnu masu životinje. Za potrebe analiza gena uzorci su odmah zamrzavani u tečnom azotu, dok su za ostale analize (oksidativni stres i masnokiselinski profil) skladišteni na -80 °C.

3.7 Biohemijske analize

Sve biohemijske analize, koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola, uree, kreatinina, alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST), rađene su iz plazme na biohemijskom analizatoru Cobas c111 (Roche, Basel, Switzerland), korišćenjem laboratorijskih komercijalno dostupnih kitova (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) prema uputstvu proizvođača.

3.8 Histološke analize

3.8.1 Priprema uzoraka za histološke analize

Uzorci jetre, pankreasa i masnog tkiva eksperimentalnih životinja su fiksirani u 4% neutralnom formalinu tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon procesa fiksacije tkiva su ispirana u tekućoj vodi tokom 24 h, a zatim, tokom naredna 24 h, dehidrirana u serijama alkohola od 70% i 96%. Nakon toga je usledilo ispiranje tkiva u apsolutnom alkoholu dva puta po 2 h. Tako dehidrirana tkiva su prosvetljavana u ksilolu dva puta po 15 minuta i kalupljena u parafin. Nakon toga, uzorci su postavljani na nosače i sečeni na mikrotomu Leica RM2065 (Leica, Germany) na preseke debljine 5 μm koji su sušeni u termocentru na temperaturi od 56 $^{\circ}\text{C}$, 1 h.

3.8.2 Hematoksilin – eozin bojenje tkivnih uzoraka

Tkivni preseci jetre, pankreasa i masnog tkiva eksperimentalnih životinja su rehidratirani pomoću ksilola i serije alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96% i 70%) po 5 minuta, nakon čega su ispirani u tekućoj vodi. Uzorci su potom bojani u rastvoru hematoksilin – eozina u trajanju od 15 minuta, ispirani vodom, a zatim tretirani zakišljenim alkoholom 1 minut i amonijačnom vodom 1 minut. Nakon ovog procesa tkivni uzorci su ispirani u tekućoj vodi 20 minuta i bojani u rastvoru eozina u trajanju od 2 minuta. Na kraju su ponovo ispirani u ksilolu i seriji alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%) i montirani korišćenjem kanada balsama.

Obojeni tkivni preseci jetre, pankreasa i masnog tkiva su posmatrani na Olympus AX70 mikroskopu (Hamburg, Nemačka) pod uveličanjem x20 ili x40 i fotografisani kamerom visoke rezolucije (Olympus DP50, Tokyo, Japan). Za merenje dijametra adipocita u svakom uzorku su korišćena tri vizuelna polja. Prosečan prečnik ćelija izračunat je za svaku grupu pojedinačno i predstavljen u μm .

3.8.3 Imunohistohemijsko bojenje glukagona i insulina

Za imunohistohemijsku analizu glukagona i insulina primenjivana je LSAB+ imunohistohemijska metoda i korišćeni su isti uzorci tkiva pankreasa, kao i za rutinske analize. Tkivni preseci debljine 5 μm postavljani su na staklene pločice na koje je prethodno nanošen jak adheziv, kako bi se u toku postupka demaskiranja antigena izbeglo njihovo odlepljivanje. Demaskiranje antigena vršeno je rastvoru za demaskiranje – 10 mM citratnom puferu pH 6 (Code No. S 1700, Dako Co, Denmark), u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 21 minut. Nakon demaskiranja antigena, u svrhu detekcije insulinskih i glukagonskih imunopozitivnih ćelija u pankreasnim ostrvcima, preseci su

tretirani odgovarajućim primarnim antitelima na insulin (Novocastra, NCL-INSULIN, 1:100) i glukagon (Novocastra, NCL-GLUCp, 1:100). Nakon kratkog ispiranja u PBS, imunohistohemijsko bojenje je vršeno korišćenjem streptavidin-biotin tehnike i DAB supstrata/hromogena (Novocastra Peroxidase Detection System kit, Leica Biosystems, Wetzlar, Nemačka) sistema za vizuelizaciju. Paralelno su rađeni i kontrolni uzorci bez upotrebe primarnog antitela. Semikvantitativna analiza ekspresije glukagona i insulina vršena je određivanjem intenziteta bojenja (0 – ništa, 1 –slabo, 2 – umereno, 3 – intenzivno) i broja imunoreaktivnih ćelija (1 – $\leq 50\%$, 2 – od 51 do 100%).

3.9 Određivanje parametara oksidativnog stresa

3.9.1 Priprema homogenata

Tkivo jetre i visceralno masno tkivo su homogenizovani u fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.4 uz 1.15% KCl) u odnosu 1:9 – masa tkiva (g) prema zapremini pufera (ml). Homogenizacija je vršena na ledu, ručnim homogenizatorom (Tissue grind pstl LC, Reynosa, Mexico). Homogenati su centrifugirani na 4 °C, prvo na 800 x g u trajanju od 10 minuta, a potom na 9500 x g 20 minuta, čime su dobijeni postmitohondijski supernatanti koji su korišćeni za dalje analize.

Sve analize parametara oksidativnog stresa rađene su na ELISA čitaču (Pharmacia LKB, Wien, Austria) ili iLab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy).

3.9.2 Određivanje prooksidativno/antioksidativnog balansa (PAB)

Određivanje PAB aktivnosti utvrđivano je modifikovanom metodom koju su razvili Alamdari i saradnici [141]. U normalni sud odmeravano je 200 μ l TMB/DMSO, a potom je dodavan 50 mM acetatni pufer, pH 5,6, do ukupne zapremine od 10 ml. Od pripremljenog rastvora, alikvotiran je 1 mL, a zatim je u isti dodat 1mL TMB katjona. Pripremljen rastvor je mešan na magnetnoj mešalici u trajanju od 6 minuta. Dobijeni rastvor (“plavi katjon”) je fotosenzitivan i tokom celog eksperimenta bio je zaštićen od svetlosti.

U bunarčice ELISA pločice je pipetirano 10 μ l uzorka. Uzorcima je dodavano 180 μ l plavog katjona nakon čega je sledila inkubacija na šejkeru u trajanju od 10 minuta. Nakon inkubacije reakcija je zaustavljena dodavanjem 40 μ l 2M HCl i merena je absorbanca na 450 nm. Za slepu probu korišćena je dH₂O. Dobijene vrednosti su izražavane u jedinicama U/l plazme ili tkivnog homogenata.

3.9.3 Određivnje koncentracije sulfhidrilnih grupa (SHG)

Koncentracija sulfhidrilnih grupa određivana je Ellman-ovom metodom [142]. Za ovu analizu pripreman je rastvor 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeve kiseline) (DTNB), rastvaranjem 0,04g DTNB u 10 ml 10 mM fosfatnog pufera, pH 7,0. Rastvor je fotosenzitivan i mogao se koristiti do 24 h nakon pripreme, uz čuvanje u frižideru.

Pipetirano je po 15 μ l uzorka na ELISA pločicu. Nakon toga je dodavano po 270 μ l 200 mM fosfatnog pufera sa dodatkom 2 mmol/l EDTA, pH 9,0 i 10 μ l DTNB reagensa. Tako nalivena pločica inkubirana je na tamnom mestu 25 minuta, nakon čega je merena absorbanca na 412 nm. Za slepu probu korišćena je dH₂O. Rezultat je izražavan u mmol/L plazme ili tkivnog homogenata.

3.9.4 Određivanje ishemijski modifikovanog albumina (IMA)

Vrednost IMA je određena Bar-Or-ovom metodom [143]. U ELISA pločicu je pipetirano 35 μ l uzorka, a zatim dodavano 10 μ l 0,1% rastvora CoCl_2 . Uzorak je blago mešan i inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se kobalt vezao za albumin. Nakon inkubacije dodavano je 10 μ l 10 mM rastvora DTT čime je otpočinjala reakcija koju je bilo potrebno zaustaviti nakon 2 minuta dodavanjem 175 μ l fiziološkog rastvora. Absorbancija je merena na 470 nm, a kao slepa proba korišćena je dH_2O , bez dodatog DTT. Za postizanje željene zapremine u slepu probu dodavan je fiziološki rastvor. Dobijene vrednosti su izražavane kao jedinice absorbance (ABSU).

Vrednosti absorbance veće od 0,400 su pozitivne na ishemiju (manje je vezivanje kobalta), dok su vrednosti manje od 0,400 negativne na ishemiju.

3.9.5 Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Određivanje koncentracije MDA rađeno je metodom koju su razvili Girroti i saradnici [144]. Za ovaj eksperiment, 300 μ l uzorka mešano je sa 600 μ l TBA reagensa (15% rastvor TCA, 0,375% TBA i 0,25 M HCl). Dobijeni rastvor inkubiran je u vodenom kupatilu na 100 °C u trajanju od 5 minuta. Nakon toga je naglo hlađen stavljanjem stakla sa epruvetama u ledeno kupatilo. Novonastali talog odvajan je centrifugiranjem na 10000 x g, 10 minuta na 4 °C, nakon čega je merena absorbancija supernatanta na 535 nm. Za slepu probu korišćena je dH_2O . Dobijene vrednosti izražavane su kao $\mu\text{mol/l}$ plazme ili tkivnog homogenata.

3.9.6 Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1 (PON1)

Paraoksonazna aktivnost određivana je praćenjem delovanja PON1 enzima iz plazme na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do njegove konverzije u p-nitrofenol. Praćena je brzina promene. Analiza je rađena prema Richter i Furlong-ovoj metodi [145]. Za određivanje PON1 aktivnosti uzorak je razblažen diluentnim puferom (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,5, 2 mmol/l CaCl_2) u odnosu 1:10. U radnom puferu (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, uz 2 M NaCl i 2 mM CaCl_2) pripremljen je 1,2 mM rastvor paraokson supstrata. Mešano je 50 μ l razblaženog seruma sa 500 μ l rastvora paraokson supstrata. Brzina konverzije supstrata je praćena na 405 nm, na temperaturi od 25 °C u trajanju od 3 minuta. Kao slepa proba korišćena je dH_2O . Dobijeni rezultati su izražavani u jedinicama U/l plazme ili homogenata tkiva.

3.9.7 Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)

Za određivanje koncentracije AOPP korišćena je metoda razvijena od strane Witko-Sarsatja i saradnika [146]. Uzorci su razblaženi 20 mM fosfatnim puferom pH 7,4 u odnosu 1:5. U epruvetu je pipetirano 400 μ l razblaženog uzorka, 40 μ l koncentrovane sirćetne kiseline i 20 μ l 1,16 M kalijum-jodida u destilovanoj vodi. Rastvor je mešan na vorteksu nakon čega je merena absorbancija na 340 nm. Kao slepa proba korišćen je fosfatni pufer. Koncentracija je izražavana kao $\mu\text{mol/L}$ plazme ili tkivnog homogenata.

3.9.8 Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD)

Aktivnost SOD u plazmi i tkivima određivana je originalnom metodom koju su razvili Misra i Fridovich [147]. Metoda je zasnovana na sposobnosti SOD da inhibira spontanu oksidaciju adrenalina u baznoj sredini. SOD uklanja $O_2^{\cdot-}$ i tako inhibira ovu reakciju. U 10 μ l uzorka dodavano je 700 μ l karbonatnog pufera pH 10,4 (u koji je dodata EDTA do koncentracije 1 mM) i 50 μ l 10 mM adrenalina rastvorenog u 20 mM HCl. Reakciona smeša je mešana i stavljena na tamno mesto 3 minuta na 25 °C. Smanjenje brzine autooksidacije adrenalina mereno je na svakih 60 sekundi u trajanju od 3 minuta na 470 nm. Za slepu probu korišćen je karbonatni pufer. Dobijeni rezultati izražavani su u jedinicama U/l plazme ili homogenata.

3.9.9 Određivanje koncentracije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$)

Koncentracija $O_2^{\cdot-}$ određivana je modifikovanom Auclair i Voisin-ovom metodom [148]. Ova kinetička metoda se zasniva na merenju brzine stvaranja redukovano NBT (engl. *Nitro Blue Tetrazolium*). U kivetu je odmeravano 50 μ l plazme i 1 ml radnog reagensa (1 M NBT rastvoren u sveže spremljenom 50 mM forfatnom puferu pH 8,6 uz dodatak 0,1 mM EDTA i 0,1 mg/ml želatina). Nakon dodavanja reagensa praćeno je povećanje apsorbance na 515 nm, svakih 15 s u trajanju od jednog minuta, nakon čega je reakcija završena. Računata je vrednost $\Delta A/\Delta t$. Za slepu probu korišćena je dH₂O. Dobijena vrednost je izražavana kao μ mol NBT/min/l.

3.9.10 Određivanje ukupnog antioksidativnog statusa (TAS)

Ukupan antioksidativni status određivan je metodom prema Erel-u [149]. U bunariće ELISA pločice je odmeravano 20 μ l Reagens 1 (0,4 M acetatni pufer pH 5,8), 12,5 μ l uzorka i 37,5 μ l Reagens 2 (pripreman je mešanjem 30 ml 30 mM acetatnog pufera, pH 3,6, 70 mL 2 mM H₂O₂ i 0,549 g ABTS, čime je dobijen 10 mM ABTS koji je inkubiran 1 h na sobnoj temperaturi pre upotrebe). Pločica je inkubirana 5 minuta na 37 °C, nakon čega je očitana apsorbancija na 660 nm. Kao slepa proba je korišćena dH₂O. TAS koncentracija izražavana je kao μ mol/l plazme ili tkivnog homogenata.

3.9.11 Određivanje ukupnog oksidativnog statusa (TOS)

Ukupan oksidativni status određivan je prema protokolu razvijenom od strane Erela [150]. Na pločicu je pipetirano 225 μ l Reagens 1 (rastvoreno je 114 mg ksilelol-oranža i 8,18 g NaCl u 900 ml 25 mM H₂SO₄, pa dodato još 100 ml glicerola, pH 1,75) i 11 μ l Reagens 2 (rastvoreno 1,96 g feroamonijum sulfata i 3,17 g o-dianizidin dihidrohlorid u 1000 ml 25 mM H₂SO₄). Nakon toga dodavano je 35 μ l uzorka, inkubirano 3-4 minuta, a apsorbancija je očitavana na 560 nm. Za slepu probu je korišćena dH₂O. Dobijena vrednost je izražavana kao μ mol/l plazme ili tkivnog homogenata.

3.10 Određivanje masnokiselinskog profila u ukupnim lipidima plazme i tkiva

3.10.1 Određivanje masnih kiselina u ukupnim lipidima plazme

Masne kiseline u ukupnim lipidima plazme određivane su po modifikovanoj metodi Glasera i saradnika [151]. Metoda se zasniva na direktnoj transesterifikaciji karboksilnih grupa, bez prethodnog izolovanja lipida. Metilacija je izvođena mešanjem 1,5 ml 3 M HCl u metanolu sa dodatkom 50 mg/l butilhidroksitoluena (BHT), koji je dodavan kako bi se sprečila oksidacija lipida, i 100 µl plazme. Dobijeni rastvor je zatim inkubiran sat vremena na 85 °C, nakon čega je dodat 1 ml heksana. Smeša je centrifugirana 10 minuta na 3000 x g. Dobijeni supernatant je odvajan, uparavan do suva u struji azota, i čuvan za dalju analizu na -20 °C.

3.10.2 Ukupni lipidi jetre

Postupak izolovanja ukupnih lipida jetre trajao je 2 dana:

Prvi dan: Oko 500 mg jetre homogenizovano je u avanu sa tučkom uz dodatak 5 ml Rastvora 1 (hloroform-metanol u odnosu 2:1 v/v sa dodatkom BHT 50 mg/l). Nakon toga homogenatu je dodavano 5 ml Rastvora 2 (hloroform-metanol u odnosu 1:2 v/v sa dodatkom BHT 5mg/l). U poslednjem, trećem koraku homogenatu je dodavano 5 ml Rastvora 3 (hloroform-metanol u odnosu 1:1 v/v sa dodatkom BHT 5 mg/l) nakon čega je ostavljen 24h na -20 °C.

Drugi dan: Homogenat je propuštan kroz filter papir i dobijeni rastvor je uparavan do suva na vakuum uparivaču, na temperaturi od 40 °C. Suvi ostatak je rastvaran u 3 ml Rastvora 1. Korišćeno je 500 µl dobijene suspenzije za metilaciju, a postupak je opisan u odeljku 3.10.1.

3.10.3 Ukupni lipidi iz masnog tkiva

Oko 200 mg masnog tkiva homogenizovano je u avanu sa tučkom uz dodatak 5 ml Rastvora 2 (hloroform-metanol u odnosu 1:2 v/v sa dodatkom BHT 5 mg/L). Homogenat je centrifugiran 20 min na 3200 x g. Odvojeni supernatant uparavan je na vakuum uparivaču do suva, na temperaturi od 40 °C. Talog je rastvaran u 5 ml Rastvora 1 (hloroform-metanol u odnosu 2:1 v/v i BHT u koncentraciji 5 mg/l) sa dodatkom 1 ml 0,1 M KCl, nakon čega je centrifugiran 20 min na 3200 x g. Odvajan je donji sloj, lipidni ekstrakt, koji je ponovo uparavan do suva, nakon čega je suvi ostatak rastvaran u 5 ml Rastvora 1. Korišćeno je 500 µl dobijene suspenzije za metilaciju, a postupak metilacije je opisan u odeljku 3.10.1.

3.10.4 Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom

Analiza dobijenih metil estara iz ukupnih lipida plazme i tkiva rađena je gasno-tečnom hromatografijom na Shimadzu 2014 (Kjoto, Japan) uređaju. Korišćena je kapilarna kolona (Rtx 2330, RESTEK, USA) dužine 60 m, prečnika 25 µm ID, dok je debljina filma stacionarne faze iznosila 0.20 µm. Za noseći gas korišćen je helijum sa protokom od 5 ml/min, dok je protok vazduha bio 320 ml/min, a vodonika 30 ml/min. Temperaturni profil metode podešen je na početnih 140 °C i

temperatura je podizana do 190 °C brzinom od 3 °C/minuti, nakon čega je održavana na tom nivou narednih 20 minuta. Temperature detektora i injektora iznosile su 240 °C i 220 °C. Uzorci pripremljenih metil estara rastvarani su u 18 µl (plazma), 45 µl (jetra) i 60 µl (masno tkivo) heksana. Injekciona zapremina autoinjektora iznosila je 1 µl. Dobijeni pikovi metil estara su identifikovani upoređivanjem sa retencionim vremenima metil estara komercijalnog standarda masnih kiselina PUFA-2 (Supelco, Inc., Bellefonte, Pa., USA). Na taj način identifikovano je 20 različitih masnih kiselina, a rezultati su izražavani u procentima u odnosu na ukupne masne kiseline.

3.11 Određivanje faktora inflamacije

3.11.1 Izolovanje ukupne RNK i reverzna transkripcija

Ukupna RNK izolovana je iz jetre upotrebom TRIzol® Reagent (AmBion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) prema uputstvu proizvođača. Kvantitativna i kvalitativna evaluacija izolovane RNK rađena je spektrofotometrijski ($OD_{260/280} > 1,8$ je smatrano zadovoljavajućim) i na 2% agaroznom gelu. Pre cDNK sinteze, uklanjana je kontaminirajuća DNK upotrebom DNKaze I (Fermentas, Burlington, ON, Canada). Reverzna transkripcija je rađena upotrebom high-capacity cDNA Reverse Transcription Kita (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) po uputstvima proizvođača. Dobijena cDNK je do upotrebe skladištena na -80 °C.

3.11.2 Real-time PCR

Kvantifikacija genske ekspresije TNF- α , IL-1 β and IL-6 u jetri rađena je primenom TaqMan® lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (eng. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Korišćeni su setovi sledećih oznaka: TNF- α (Rn01525859_g1), IL-1 β (Rn00580432_g1) i IL-6 (Rn01410330_m1). Kvantitativna normalizacija cDNK svakog uzorka rađena je korišćenjem TBP (Rn01455646_m1*) kao endogene kontrole, a sve je nabavljeno od Applied Biosystems Assay-on Demand Gene Expression Products. Real-time PCR je rađen korišćenjem QuantStudio™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Relativna kvantifikacija genske ekspresije je utvrđivana komparativnom $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodom opisanom od strane Livaka i Schmittgena [152]. Rezultati su analizirani putem QuantStudio™ Design and Analysis v1.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sa pouzdanošću od 95% ($p \leq 0.05$).

3.12 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je rađena pomoću SPSS 23.0 softvera (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Za proveru distribucije normalnosti korišćen je Shapiro-Wilk test. Kod parametara oksidativnog stresa ustanovljeno je odstupanje od normalne raspodele, zbog čega su rezultati prikazivani kao mediana (interkvartilni opseg, odnosno 25-75 postotka). Shodno tome korišćeni su neparametrijski testovi, Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U test kao *post hoc* test. Ostali rezultati su prikazivani kao srednja vrednost \pm SD. Kod podataka kod kojih je ustanovljena normalna distribucija korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) praćena Tukey's *post hoc* testom. Kao statistički značajna vrednost uzimana je $p \leq 0.05$. Za procenu bivarijantne korelacije korišćena je Spearman neparametrijska korelacija. Analiza višestruke linearne regresije (MLR) sa selekcijom unazad je korišćena za definisanje najznačajnijih modela prediktora za procenat visceralne masti.

4. REZULTATI

4.1 Razvoj model sistema metaboličkog sindroma

4.1.1 Unos hrane, kalorijski unos i masa životinja

U cilju utvrđivanja uticaja HFHF ishrane na razvoj parametara MetS kod *Wistar* pacova analiziran je količinski i kalorijski unos hrane tokom celog trajanja eksperimenta. Takođe je poređena početna masa životinja, kao i promena njihovih masa nakon 8 i 16 nedelja tretmana. Rezultati su prikazani u Tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Količinski i kalorijski unos hrane i masa *Kyoto* pacova

	KmK	KmHFHF	KoK	KoHFHF
Unos hrane 0-8 nedelja (g/dan/kavez)	45,1 ± 1,7	32,7 ± 1,7***	61,6 ± 1,1	50,6 ± 4,6***
Unos hrane 9-16 nedelja (g/dan/kavez)	58,7 ± 1,0	41,0 ± 0,6***	/	/
Energetska vrednost 0–8 nedelja (g/dan/kavez)	495,8 ± 19,0	592,9 ± 31,3***	677,3 ± 12,4	916,5 ± 84,3***
Energetska vrednost 9–16 nedelja (g/dan/kavez)	646,0 ± 11,6	742,4 ± 10,9***	/	/
0 nedelja, početna masa (g)	104 ± 11,4	97 ± 5,9	235 ± 11	235 ± 9,8
8 nedelja masa (g)	230 ± 7,8	193 ± 11,6 **	280 ± 12,8	267 ± 17,8
16 nedelja masa (g)	280 ± 12,4	261 ± 16,5	/	/

KmK – *Kyoto* mladi na standardnoj ishrani, KmHFHF – *Kyoto* mladi na HFHF ishrani, KoK – *Kyoto* odrasli na standardnoj ishrani, KoHFHF – *Kyoto* odrasli na HFHF ishrani. U tabeli nedostaju podaci za odraslu *Kyoto* grupu, jer je ta grupa isključena iz daljeg eksperimenta, s obzirom da podaci dobijeni nakon 8 nedelja tretmana nisu bili statistički značajni. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n = 6, 3 pacova po kavezu). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u poređenju s odgovarajućom kontrolom.

Tabela 5. Količinski i kalorijski unos hrane i masa *Hannover* pacova

	HmK	HmHFHF	HoK	HoHFHF
Unos hrane 0-8 nedelja (g/dan/kavez)	63,6 ± 2,6	40,4 ± 8,3***	69,2 ± 5,2	65,4 ± 8,5
Unos hrane 9-16 nedelja (g/dan/kavez)	67,6 ± 5,3	49,2 ± 2,7***	98,7 ± 9,7	82,7 ± 4,6***
Energetska vrednost 0–8 nedelja (g/dan/kavez)	699,6 ± 28,9	731,6 ± 150,9	761,5 ± 56,9	1186 ± 154,7***
Energetska vrednost 9–16 nedelja (g/dan/kavez)	744,2 ± 58,6	892,0 ± 49,0***	814,3 ± 80,0	1125 ± 62,6***
0 nedelja, početna masa (g)	221 ± 18	216 ± 16,5	391 ± 18,9	398 ± 13,8
8 nedelja masa (g)	366 ± 8,7	302 ± 22**	488 ± 28,8	491 ± 29,3
16 nedelja masa (g)	415 ± 20,9	384 ± 34,1	520 ± 33,6	561 ± 31,6

HmK – *Hannover* mladi na standardnoj ishrani, HmHFHF – *Hannover* mladi na HFHF ishrani, HoK – *Hannover* odrasli na standardnoj ishrani, HoHFHF – *Hannover* odrasli na HFHF ishrani. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (n = 6, 3 pacova po kavezu). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u poređenju s kontrolom.

U poređenju sa kontrolnim grupama, grupe koje su bile na HFHF ishrani smanjile su količinski unos hrane, dok je u isto vreme došlo do povećanog kalorijskog unosa s obzirom na to da HFHF pelet ima veću kalorijsku vrednost. Ipak, uprkos većem kalorijskom unosu, nakon osam

nedelja provedenih na modifikovanoj ishrani pacovi iz grupa KmHFHF i HmHFHF imali su manju telesnu masu u poređenju sa grupom na kontrolnoj ishrani. Do kraja studije mase svih eksperimentalnih životinja su se ujednačile, tako da nakon 16 nedelja ni kod jedne grupe na HFHF dijeti nije zabeležena razlika u masi u odnosu na odgovarajuće kontrole.

4.1.2 Biohemijski parametri

Vrednosti biohemijskih parametara merenih nakon osam i 16 nedelja trajanja studije prikazane su u Tabelama 6 i 7. Porast koncentracije glukoze u krvi zabeležen je samo kod KmHFHF grupe nakon osam nedelja tretmana, ali se nakon produženja eksperimenta na 16 nedelja koncentracija glukoze kod ove grupe vratila na normalne vrednosti (Tabela 6). Kod KmHFHF grupe nakon 16 nedelja tretmana zabeležen je i porast vrednosti HDL holesterol (HDL-C) i TG. Sa druge strane, kod KoHFHF grupe nakon osam nedelja tretmana nije zabeležena promena nijednog od ključnih parametara metaboličkog sindroma (Tabela 6), zbog čega je ova grupa isključena iz daljeg eksperimenta.

Tabela 6. Promene biohemijskih parametara kod *Kyoto* pacova nakon 8 and 16 nedelja tretmana.

	KmK	KmHFHF 8 nedelja	KmHFHF 16 nedelja	KoK	KoHFHF 8 nedelja
Glc (mmol/l)	5,54 ± 0,93	8,86 ± 1,02***	6,30 ± 0,50##	6,05 ± 0,55	5,71 ± 1,01
TC (mmol/l)	1,06 ± 0,12	0,96 ± 0,05	1,35 ± 0,14	1,01 ± 0,14	1,17 ± 0,12
HDL-C (mmol/l)	0,65 ± 0,15	0,65 ± 0,04	0,80 ± 0,09*#	0,72 ± 0,08	0,81 ± 0,10
LDL-C (mmol/l)	0,10 ± 0,11	1,13 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,15 ± 0,06	0,11 ± 0,07
TG (mmol/l)	0,69 ± 0,23	0,53 ± 0,28	0,94 ± 0,18*###	0,65 ± 0,05	0,71 ± 0,24
Urea (mmol/l)	8,06 ± 1,35	5,88 ± 0,93**	6,85 ± 1,83**	6,86 ± 0,44	5,00 ± 0,54*
AST (IU/l)	177,6 ± 23,8	125,6 ± 15,3	131,2 ± 14,1	88,5 ± 24,7	76,8 ± 13,3
ALT (IU/l)	71,7 ± 21,6	86,6 ± 32,6	49,4 ± 6,0	68,6 ± 23,3	45,5 ± 6,6

KmK – *Kyoto* mladi na standardnoj ishrani, KmHFHF – *Kyoto* mladi na HFHF ishrani, KoK – *Kyoto* odrasli na standardnoj ishrani, KoHFHF – *Kyoto* odrasli na HFHF ishrani. Glc – glukoza, TC – ukupni holesterol, HDL-C – lipoproteini velike gustine-holesterol, LDL-C – lipoproteini male gustine-holesterol, TG – trigliceridi, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (n = 6, 3 pacova po kavezu). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u poređenju s kontrolnom grupom; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ u poređenju sa osam nedelja na HFHF ishrani.

Kada je *Hannover* podsoj u pitanju, kod HmHFHF zabeležen je pad koncentracije LDL-C u plazmi nakon osam nedelja tretmana, koji se zadržao i nakon 16 nedelja, dok je kod HoHFHF došlo do porasta koncentracije LDL-C i pada koncentracije TG nakon osam nedelja, kao i snižavanja vrednosti koncentracija TC i HDL-C nakon 16 nedelja tretmana (Tabela 7). Kod svih grupa na HFHF ishrani, u poređenju sa kontrolnim grupama, zabeležen je pad vrednosti uree u plazmi i to u obe vremenske tačke, osam i 16 nedelja.

Tabela 7. Promene biohemijskih parametara kod *Hannover* pacova nakon 8 i 16 nedelja tretmana

	HmK	HmHFHF 8 nedelja	HmHFHF 16 nedelja	HoK	HoHFHF 8 nedelja	HoHFHF 16 nedelja
Glc (mmol/l)	7,22 ± 1,90	6,75 ± 1,17	6,25 ± 1,49	6,65 ± 0,80	6,95 ± 1,17	6,87 ± 1,67
TC (mmol/l)	1,86 ± 0,47	1,45 ± 0,22	1,32 ± 0,33	1,84 ± 0,20	1,47 ± 0,28	1,34 ± 0,28*
HDL-C (mmol/l)	1,00 ± 0,22	0,94 ± 0,25	0,72 ± 0,24	1,13 ± 0,22	0,77 ± 0,21	0,63 ± 0,19**
LDL-C (mmol/l)	0,51 ± 0,21	0,14 ± 0,10*	0,32 ± 0,08*	0,21 ± 0,16	0,39 ± 0,05*	0,35 ± 0,19
TG (mmol/l)	0,76 ± 0,15	0,86 ± 0,07	0,93 ± 0,19	0,85 ± 0,26	0,68 ± 0,14*	0,77 ± 0,26
Urea (mmol/l)	8,25 ± 0,92	5,54 ± 1,08*	3,90 ± 0,45***	6,41 ± 0,76	4,73 ± 1,01**	3,84 ± 0,48***
AST (IU/l)	184,4 ± 50,26	177,3 ± 18,08	161,6 ± 8,91	112,4 ± 46,05	119,9 ± 63,87	154,1 ± 101,9
ALT (IU/l)	56,20 ± 14,76	57,34 ± 12,14	60,40 ± 2,40	42,54 ± 5,87	37,08 ± 7,22	38,44 ± 9,84

HmK – *Hannover* mladi na standardnoj ishrani, HmHFHF – *Hannover* mladi na HFHF ishrani, HoK – *Hannover* odrasli na standardnoj ishrani, HoHFHF – *Hannover* odrasli na HFHF ishrani. Glc – glukoza, TC – ukupni holesterol, HDL-C – lipoproteini velike gustine-holesterol, LDL-C – lipoproteini male gustine-holesterol, TG – trigliceridi, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (n = 6, 3 pacova po kavezu). **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.2 Koncentracija polifenola u ispitivanim sokovima

HPLC-MS/MS analizom određene su koncentracije tri različite klase polifenola i jedanaest pojedinačnih fenolnih komponenti u sokovima CR i D. Analize su pokazale da je sok crne ribizle znatno bogatiji gotovo svim ispitivanim polifenolima (Tabela 8).

Tabela 8. Kvantifikacija fenolnih jedinjenja u sokovima crne ribizle i drenjine

Ukupni sadržaj	Crna ribizla	Drenjina
Ukupni polifenoli (mg GAE/l)	1392 ± 215	996 ± 95
Ukupni flavan-3-oli (mg B1E/l)	1043 ± 60	187 ± 18
Ukupni antocijani (mg Cy3GE/l)	89 ± 10	51 ± 8
Pojedinačne komponente	Crna ribizla	Drenjina
Vinska kiselina (mg/l)	ND	101,2 ± 8,7
Malinska kiselina (mg/l)	472,2 ± 28,2	778,4 ± 47,5
Limunska kiselina (mg/l)	1481 ± 169	50,8 ± 8,1
Galna kiselina (mg/l)	1,1 ± 0,2	8,9 ± 1,9
Protohatekuinska kiselina (mg/l)	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Epigalokatehin galat (mg/l)	7,9 ± 0,1	ND
Katehin (mg/l)	6,0 ± 0,3	ND
Epikatehin (mg/l)	5,6 ± 0,3	ND
Procijanidin B1 (mg/l)	0,6 ± 0,1	ND
Procijanidin B2 (mg/l)	3,1 ± 0,4	ND
Rutin (mg/l)	0,3 ± 0,02	0,03 ± 0,01

ND – nedetektabilno (koncentracija ispod granice detekcije)

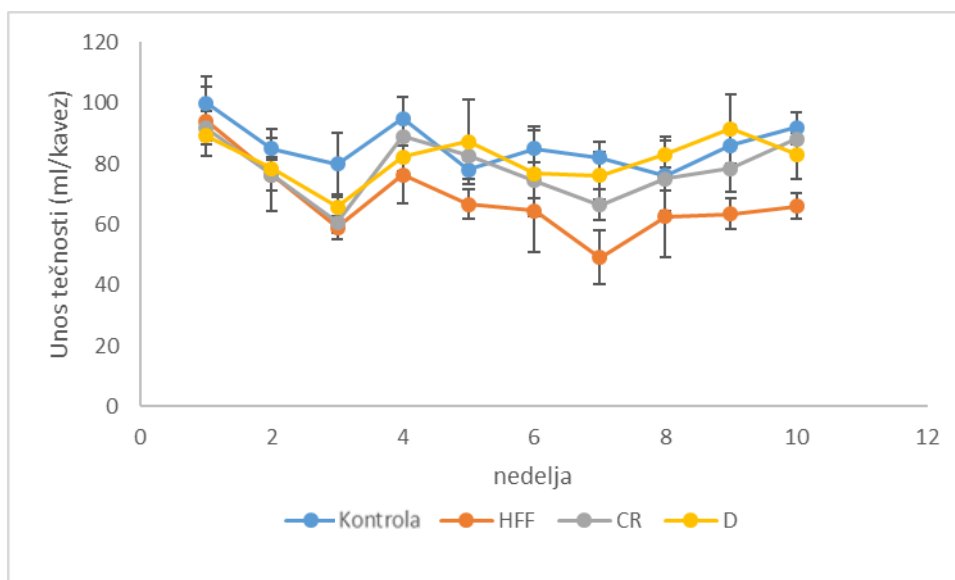
Ukupna koncentracija polifenola (UP) u soku CR iznosila je prosečno 1,39 g GAE/l, dok je kod D bila oko 1 g GAE/l. Koncentracija ukupnih flavan-3-ola iznosila je 1,04 g naspram 0,19 g B1E/l, a ukupnih antocijana 89 mg naspram 59 mg Cy3GE/l, u CR i D, tim redosledom. Koncentracija vinske, malinske i galne kiseline bila je veća u soku D. Vinska kiselina bila je detektabilna samo u soku D, u koncentraciji od 0,1 g/l, dok su koncentracije malinske i galne kiseline iznosile 0,78 g/l i 8,9 mg/l. U soku CR njihove vrednosti su bile 0,47 g/l (malinska) i 1,1 mg/l (galna).

Sa druge strane, izmerena koncentracija protokatehuinske kiseline bila je duplo manja kod CR nego D (0,3 vs. 0,6 mg/l), dok je koncentracija limunske kiseline bila skoro trideset puta veća (1481 prema 50,8 mg/l). Pojedinačne klase flavon-3-ola, poput epigalokatehin galata, katehina, epikatehina, procijanidina B1 i procijanidina B2, kvantifikovani su samo kod CR, jer je njihova koncentracija u soku D bila ispod granice detekcije. Izmerena koncentracija rutina bila je 10 puta viša kod CR nego D, 0,3 mg/l naspram 0,03 mg/l (Tabela 8).

4.3 Uticaj matičnih sokova crne ribizle i drenjine na prevenciju metaboličkog sindroma

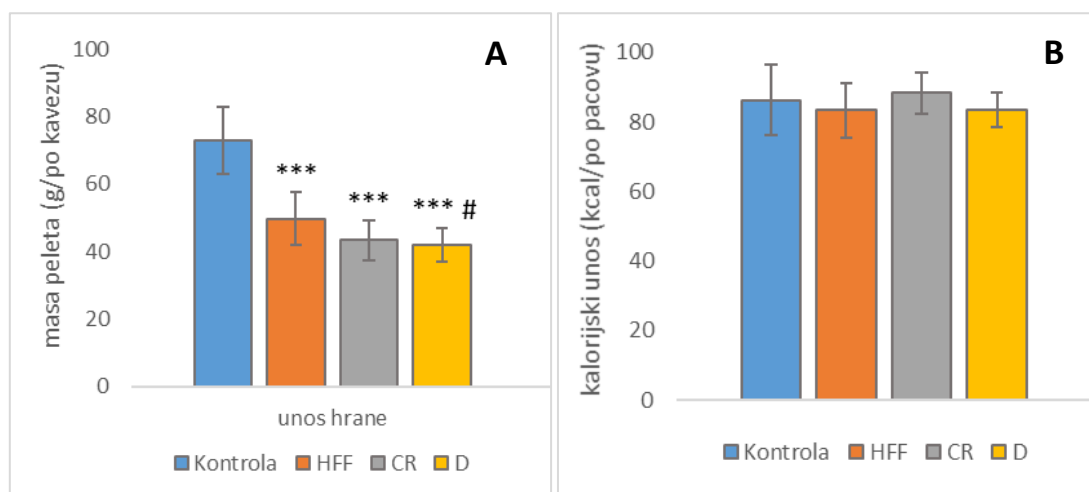
4.3.1 Unos tečnosti i hrane kod pacova

Prosečan dnevni unos tečnosti po kavezu (tri životinje u kavezu) tokom deset nedelja tretmana prikazan je na Slici 6. Unos soka nije se značajno menjao tokom trajanja tretmana i bio je ujednačen, oko 80 ml dnevno po kavezu. I unos vode je tokom trajanja tretmana bio ujednačen, kod kontrolne grupe blago povećan, a kod HFF grupe nešto manji od 80 ml.



Slika 6. Dnevni unos tečnosti po kavezu, tokom deset nedelja tretmana. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD.

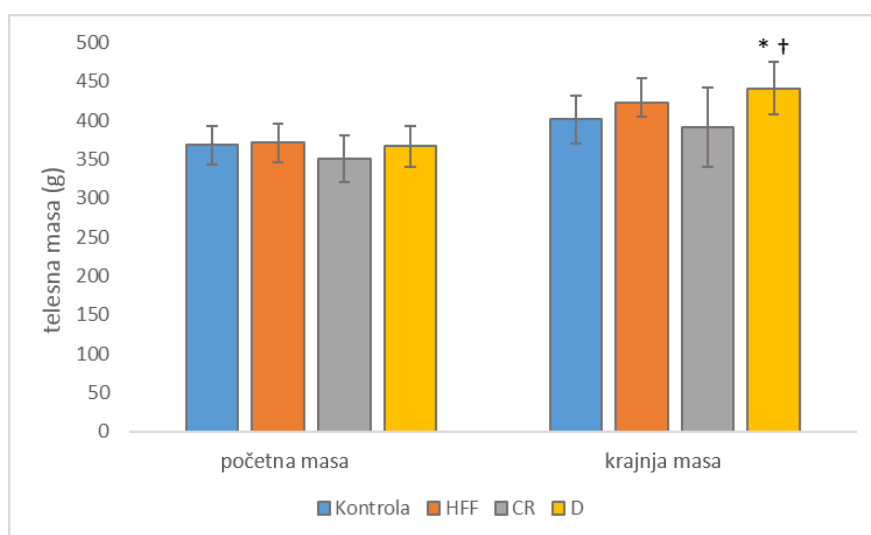
Sve tri grupe koje su se hranile HFF peletom znatno su smanjile unos hrane u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 7A). Sa druge strane, između eksperimentalnih grupa nisu detektovane statistički značajne razlike u prosečnom dnevnom unosu kalorija (Slika 7B).



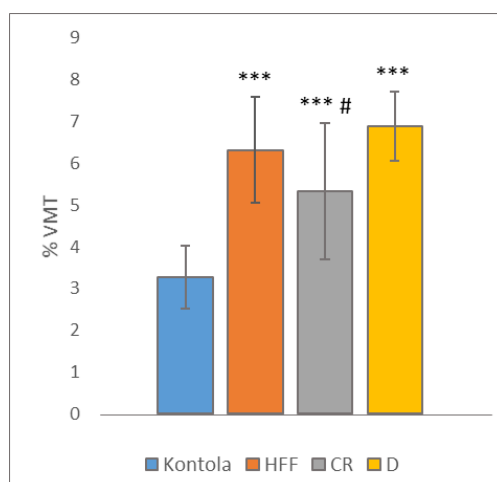
Slika 7. A) prosečan dnevni unos hrane po kavezu, B) prosečan dnevni kalorijski unos po tretiranoj životinji. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0.1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD. *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolom; # $p < 0,05$ u poređenju sa HFF grupom.

4.3.2 Uticaj sokova na telesnu masu, visceralno masno tkivo i biohemijske parametre

HFF ishrana nije dovela do statistički značajnog povećanja mase životinja. U poređenju s kontrolom veću masu je imala samo D grupa, čija je krajnja masa bila znatno veća i od CR grupe (Slika 8). Nasuprot tome, kod sve tri grupe na modifikovanoj ishrani zabeležen je znatan porast udela visceralnog masnog tkiva (VMT) (Slika 9) u poređenju sa grupom na standardnoj ishrani. Suplementacija sokom CR dovela je do manjeg deponovanja VMT u odnosu na grupu koja je bila samo na HFF ishrani.



Slika 8. Telesna masa pacova pre i nakon deset nedelja modifikovane ishrane. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom; † $p < 0,05$ u poređenju sa CR grupom.



Slika 9. Procenat visceralnog masnog tkiva u odnosu na ukupnu masu kod pacova na različitim ishranama. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine, VMT – visceralno masno tkivo. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD. *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolom; # $p < 0,05$ u poređenju sa HFF grupom.

Daljim analizama biohemijskih parametara ustanovljeno je da nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama glukoze u krvi, kao ni koncentracijama TG između grupa. Koncentracija HDL-holesterola bila je niža kod svih ispitivanih grupa u poređenju sa kontrolnom. Konzumiranje sokova bogatih polifenolima dovelo je i do značajnog smanjenja koncentracije ukupnog holesterola u krvi, dok je kod CR grupe zabeleženo i povećanje koncentracije LDL-holesterola u poređenju sa kontrolom (Tabela 9).

Tabela 9. Vrednosti glukoze, holesterola i triglicerida u plazmi pacova na kraju studije.

	Kontrola	HFF	CR	D
Glukoza (mmol/l)	5,22 \pm 0,33	5,56 \pm 0,49	5,20 \pm 0,40	5,75 \pm 0,97
Ukupni holesterol (mmol/l)	1,56 \pm 0,23	1,53 \pm 0,20	1,23 \pm 0,23***#	1,30 \pm 0,14**
HDL holesterol (mmol/l)	0,98 \pm 0,13	0,83 \pm 0,16*	0,62 \pm 0,12***#	0,66 \pm 0,14***#
LDL holesterol (mmol/l)	0,18 \pm 0,12	0,32 \pm 0,15	0,38 \pm 0,16*	0,35 \pm 0,17
Trigliceridi (mmol/l)	0,77 \pm 0,25	0,64 \pm 0,21	0,51 \pm 0,20	0,66 \pm 0,26

HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0.1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolom; # $p < 0,05$ u poređenju sa HFF grupom.

4.3.3 Uticaj sokova na krvni pritisak

Krvni pritisak je statistički značajno porastao u svim grupama u odnosu na kontrolu, bez obzira da li su životinje konzumirale sok ili nisu (Tabela 10).

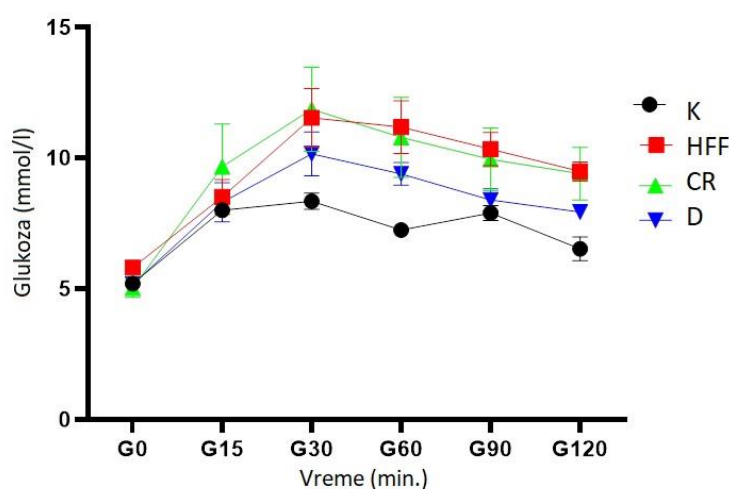
Tabela 10. Izmerene vrednosti krvnog pritiska kod pacova

	Kontrola	HFF	CR	D
Sistolni pritisak (mmHg)	128 \pm 8	151 \pm 10*	145 \pm 10*	147 \pm 11*
Dijastolni pritisak (mmHg)	78 \pm 9	87 \pm 11	87 \pm 8	87 \pm 10

HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0.1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.3.4 Uticaj sokova na koncentraciju insulina i intraperitonealni test opterećenja glukozom

Između eksperimentalnih grupa nije zabeležena razlika u koncentraciji insulina u krvi nakon prekonocnog gladovanja. Sa druge strane, kod HFF grupe primećen je razvoj glukozne intolerancije u odnosu na kontrolnu grupu, budući da je tokom IPGTT testa kod HFF grupe zabeležena znatno veća oblast ispod krive (engl. *Area Under the Curve*, AUC) (Slika 10). Kod grupe koja je pila CR sok zabeležen je trend pada AUC u odnosu na HFF grupu ($p = 0,056$), dok upotreba soka D nije imala taj efekat.

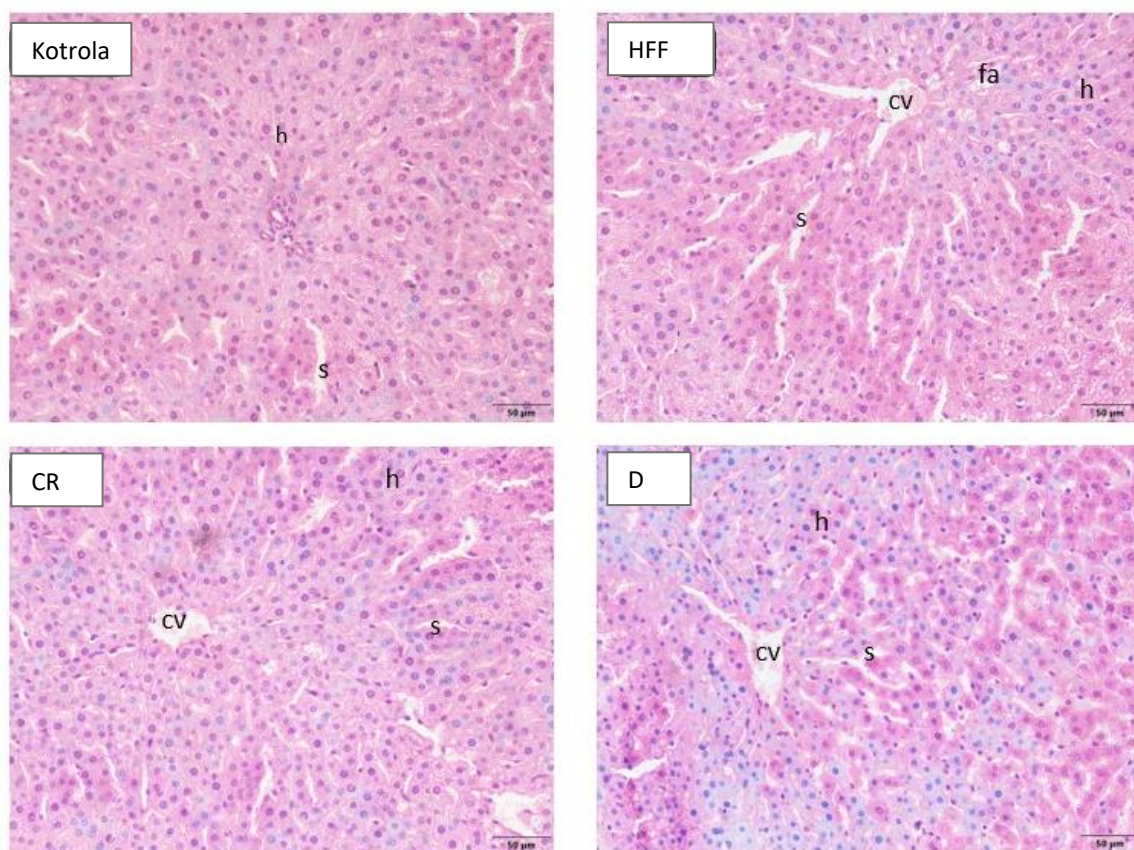


Slika 10. Intraperitonealni test opterećenja glukozom. K – kontrola, standardna ishrana i voda, HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SEM.

4.4 Histopatološke analize

4.4.1 Histopatološke analize jetre

Na osnovu histoloških analiza tkiva eksperimentalnih životinja primećeno je da je u kontrolnoj grupi pacova, kao i kod onih koji su osim HFF ishrane pili sok od crne ribizle ili drenjine, bila prisutna jasna lobularna građa jetre: vena u centru lobulusa predstavlja centralnu venu, dok je na periferiji prisutan portalni, interlobularni prostor. Na uzorcima su bili jasno uočljivi binukleusni i mononukleusni hepatociti. Većina hepatocita u uzorcima bila je poligonalnog oblika, ružičaste citoplazme i centralno ili paracentralno lokalizovanog jedra. Razlika u građi delova jetre tj. perivenularne, intermedijarne i periportne zone nije bila uočljiva. Hepatociti su imali trabekularni raspored sa sinusoidnim kapilarima između njih. Ovi kapilari bili su pokriveni glatkim endotelnim i Kupferovim ćelijama, ovoidnih jedara i izrazito svetle nukleoplazme. Izgled krvnih sudova je takođe potpuno histološki nepromenjen. Struktura same jetre je očuvana. Takođe, u poređenju sa pacovima koji su bili samo na HFF dijeti, kod preostale tri grupe uočeno je odsustvo vakuolarne degeneracije, dok su pojedinačni sitni adipociti bili vrlo retko prisutni između hepatocita (Slika 11).

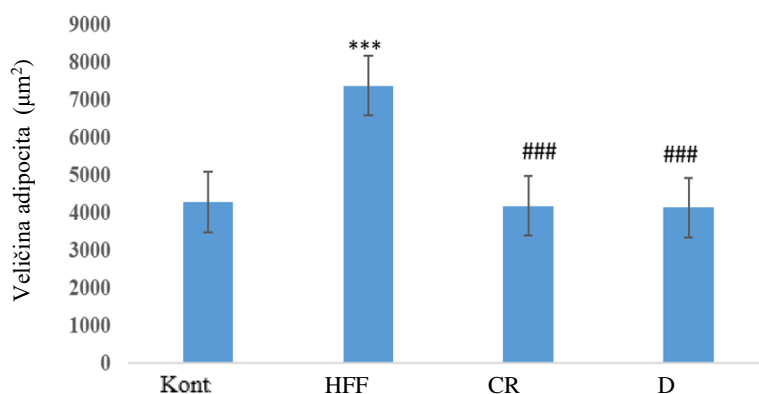
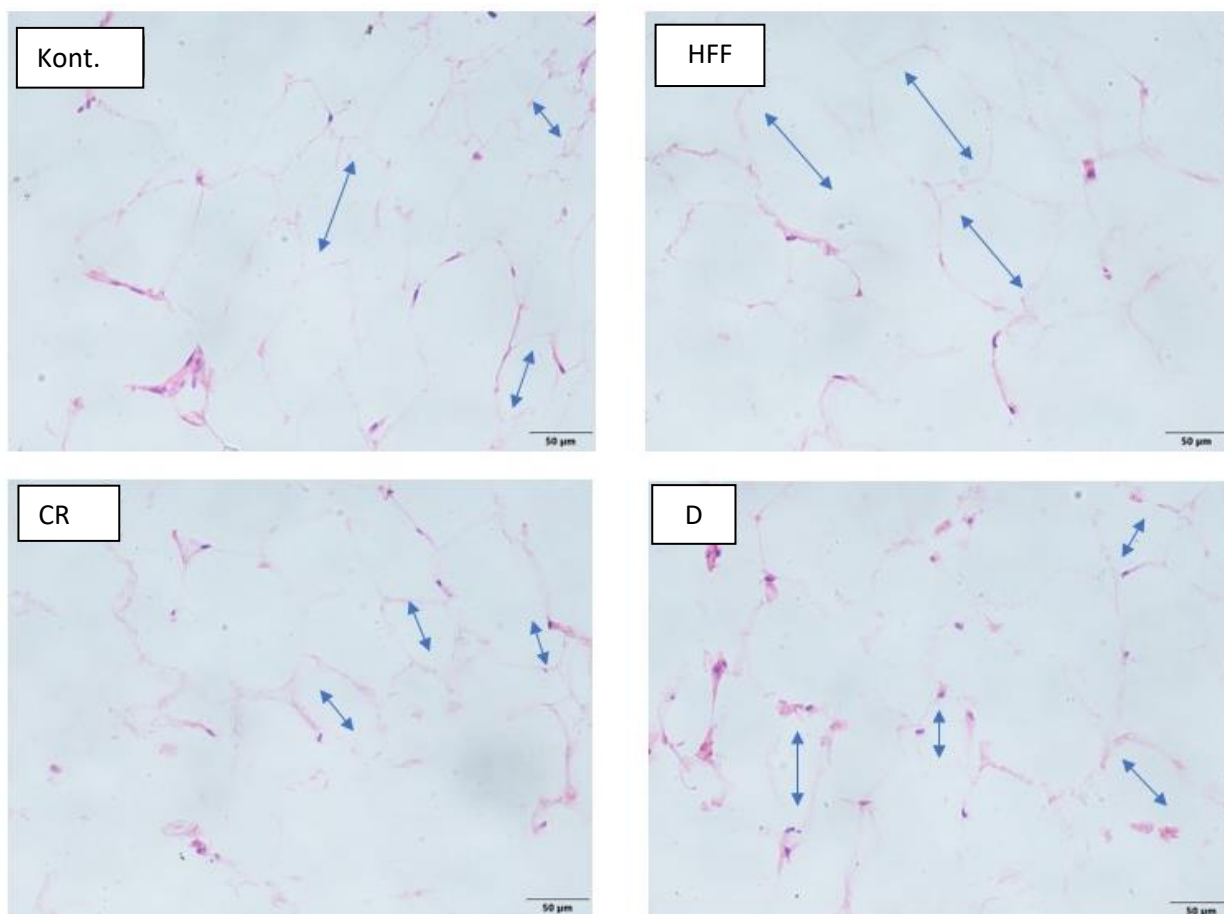


Slika 11. Promene u histologiji jetre nakon 10 nedelja HFF ishrane i suplementacije CR i D matičnim sokovima. Kontrola – standardna ishrana i voda, HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. CV – centralna vena, h – hepatociti, s – sinusoid, fa – akumulacija masti (engl. *fat accumulation*); uvećanje x 20.

Za razliku od jetre pacova CR i D grupe, kod jetre HFF pacova došlo je do značajne promene u histološkoj strukturi i samoj arhitekturi pojedinačnih zona. Osim toga, bila je jasno uočljiva vakuolarna degeneracija, što je ukazivalo na akumulaciju masti u jetri i hepatocitima. Promene su bile vidljive u svim zonama, naročito u strukturi samih hepatocita koji su kod HFF bili svetliji, trabekularnog i izduženo-nepravilnog oblika, značajno razdvojeni pojedinačnim adipocitima. Takođe, kada poredimo HFF sa kontrolnom, CR i R grupom, kod HFF su bili vidljivi jasno izraženi sinusoidi između hepatocita, kao i naglašeni kapilari sa velikim brojem eritrocita nepravilnog oblika (Slika 11).

4.4.2 Histopatološke analize visceralnog masnog tkiva

Dijametar adipocita masnog tkiva pacova HFF grupe bio je povećan u poređenju sa životinjama iz ostalih grupa (K, CR i D). U proseku, površina adipocita kod životinja koje su bile na HFF ishrani ($7400 \pm 210 \mu\text{m}^2$) bila je skoro duplo veća u poređenju sa površinom kod eksperimentalnih životinja koje su tretirane sokom CR ($4200 \pm 120 \mu\text{m}^2$) i D ($4154 \pm 190 \mu\text{m}^2$), kao i u poređenju sa kontrolnom grupom ($4300 \pm 110 \mu\text{m}^2$) (Slika 12). Takođe, pored većeg dijametra, kod HFF grupe bila je uočljiva narušena struktura samih adipocita i njihove mreže, što nije slučaj kod ostale tri grupe životinja. Pored toga, zabeležen je jasno uočljiv manji broj adipocita na preseku kod K, CR i D grupa u poređenju sa tkivima životinja iz HFF grupe.

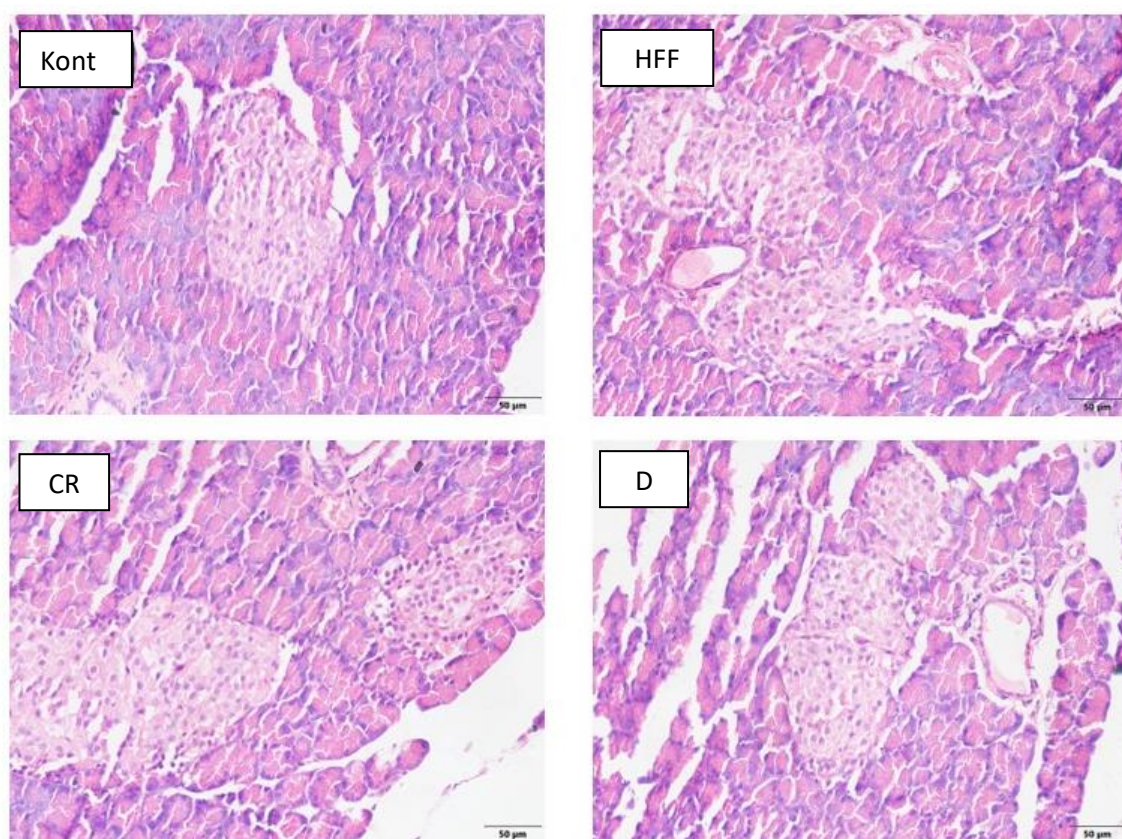


Slika 12. Promene u histologiji adipocita nakon deset nedelja HFF ishrane i suplementacije CR i D matičnim sokovima. Kont. – kontrola, standardna ishrana i voda, HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle,

D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Plave strelice prikazuju lumen adipocita; uvećanje x 20. *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolom; ### $p < 0,001$ u poređenju sa HFF grupom.

4.4.3 Histopatološke analize pankreasa

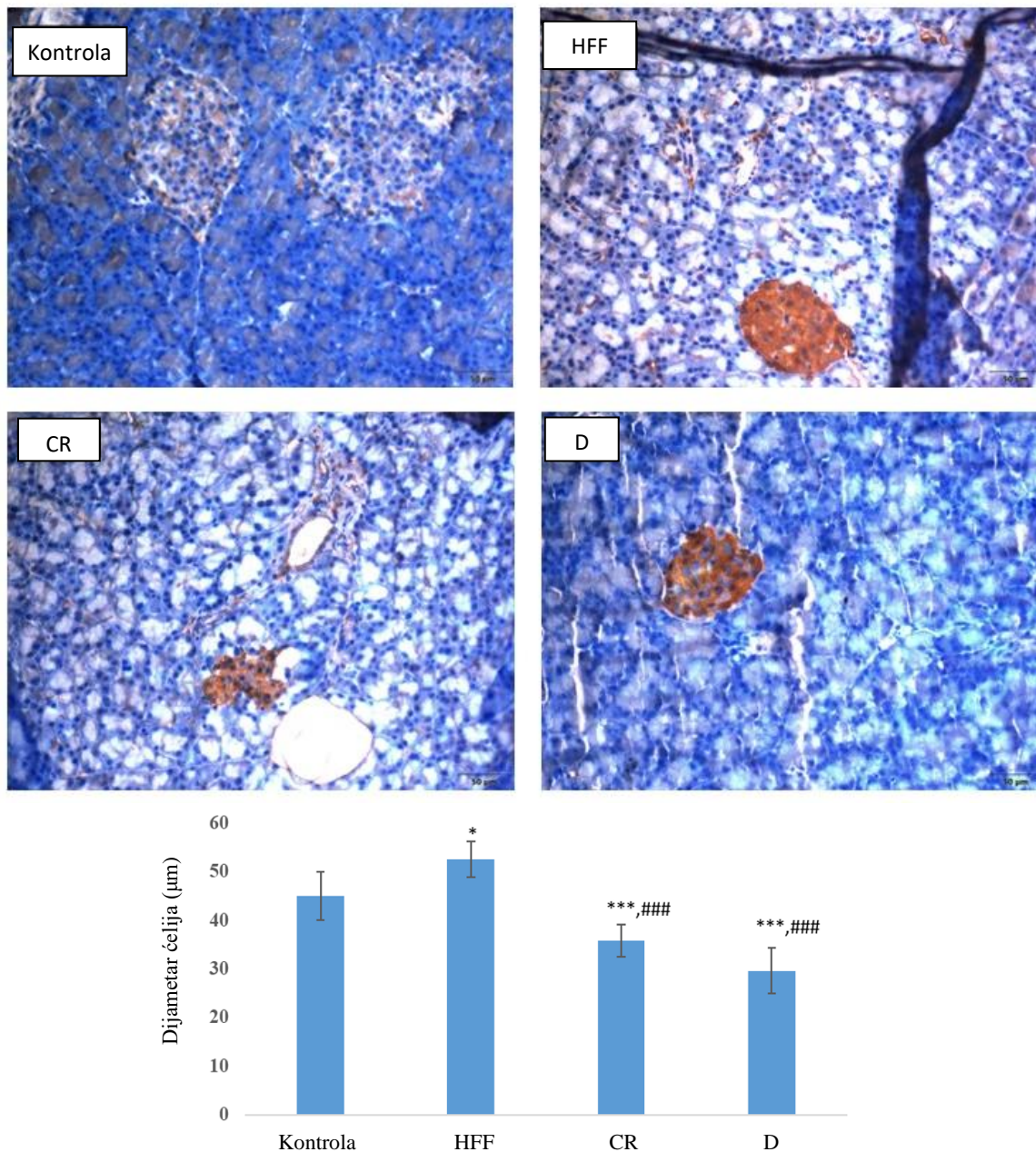
Kod eksperimentalnih životinja koje su tretirane samo HFF ishranom ustanovljene su patološke promene u egzokrinim i endokrinim komponentama pankreasa. Acinusne ćelije su bile povećanog dijametra, a male vakuole su primećene u gotovo svim acinusnim ćelijama. Interlobularni kanali su bili obloženi spljoštenim epitelom. Kod HFF grupe takođe je uočen i smanjen broj beta ćelija, kao i značajna degeneracija samih Langerhansovih ostrvaca u poređenju sa pacovima kontrolne grupe i CR i D grupa. Osim toga, u ovoj grupi uočeni su i širi intralobularni i interlobularni kanali (Slika 13).



Slika 13. Morfologija Langerhansovih ostrvaca kod pacova na različitim ishranama. Kont – kontrola, standardna ishrana i voda, HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine; uvećanje x 20.

Kod pacova koji su tretirani sokom drenjine i crne ribizle egzokrina komponenta pankreasa je vrlo očuvana i skoro nepromenjena. Činile su je gusto pakovane acinusne ćelije koje su grupisane u male režnjeve. Zapaženo je da su režnjevi pankreasa odvojeni nepromenjenim i očuvanim intralobularnim i interlobularnim pregradama vezivnog tkiva. Ćelije ostrvaca su izmešane sa acinusnim ćelijama, dok su sama ostrvca svetlije obojena od okolnih acinusnih ćelija. Jedna od posebno uočljivih promena kod životinja tretiranih sokom CR jeste značajno uvećanje samih Langerhansovih ostrvaca, kao i prisustvo velikog broja krvnih sudova (Slika 14).

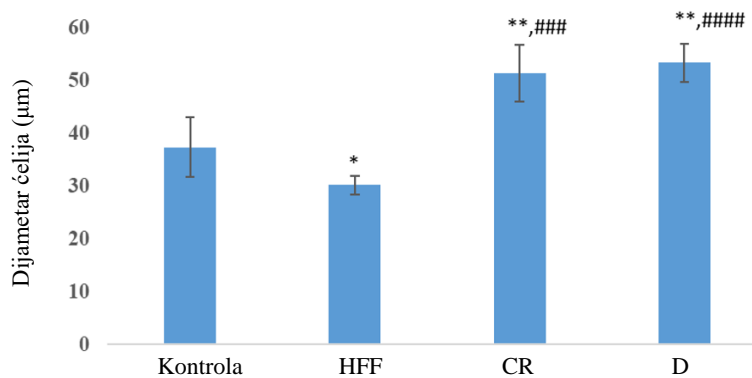
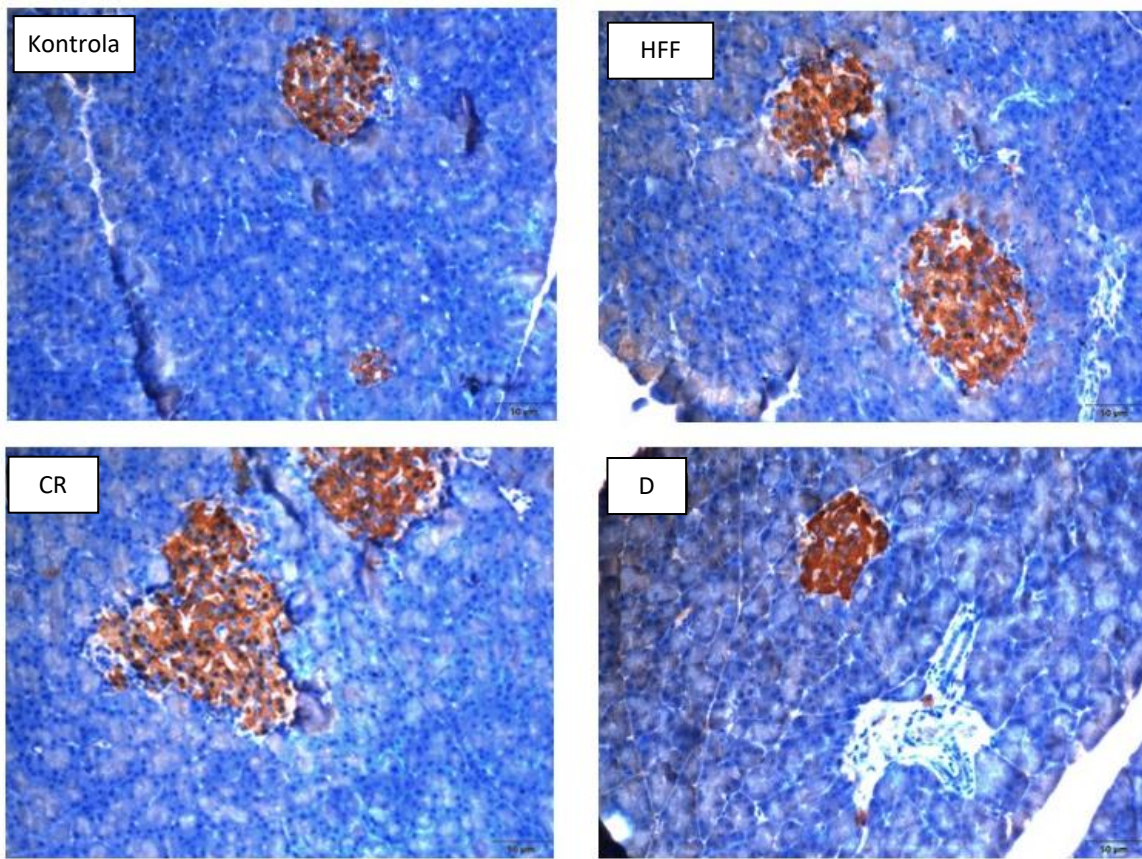
Kada govorimo o imunohistohemijskim analizama može se primetiti da je stepen ekspresije glukagonskih imunoreaktivnih ćelija bio značajno veći kod pacova koji su bili na HFF ishrani ($52,6 \pm 3,6 \mu\text{m}$) u poređenju sa kontrolnom grupom ($45 \pm 5,7 \mu\text{m}$), kao i onima koji su bili na suplementaciji sokom CR ($35,8 \pm 3,3 \mu\text{m}$) i D ($29,6 \pm 4,7 \mu\text{m}$). Oba soka pokazala su pozitivno dejstvo na smanjenje ekspresije glukagona čije je povećano lučenje izazvala desetonedeljna HFF ishrana (Slika 14).



Slika 14. Imunohistohemijsko bojenje glukagon imunoreaktivnih ćelija Langerhansovih ostrvaca. Kont – kontrola, standardna ishrana i voda, HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D - pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolom; ### $p < 0,001$ u poređenju sa HFF grupom; uvećanje x 20.

Kada je koncentracija insulina u pitanju, zabeležena je slična situacija. Suplementacija sokovima je imala pozitivno dejstvo i pospešila njegovo lučenje, koje je kod HFF grupe bilo znatno niže u poređenju sa kontrolom. Razlika u stepenu ekspresije insulina između kontrolnih i

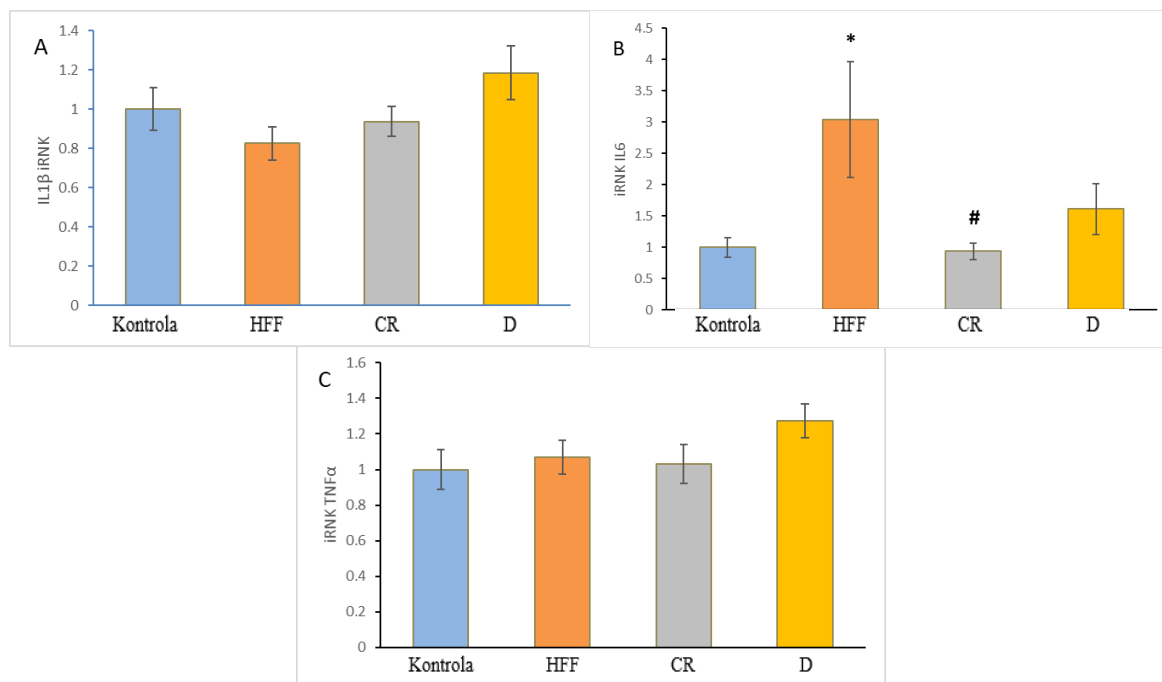
eksperimentalnih životinja bila manje izražena nego što je to bio slučaj kod razlike zabeležene u ekspresiji glukagona, HFF ($30,2 \pm 1,7 \mu\text{m}$), CR ($51,4 \pm 5,4 \mu\text{m}$) i D ($53,4 \pm 3,6 \mu\text{m}$) (Slika 15).



Slika 15. Imunohistohemijsko bojenje insulin-imunoreaktivnih ćelija Langerhansovih ostrvaca. Kontrola - standardna ishrana i voda, HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolom; ### $p < 0,001$ u poređenju sa HFF grupom; uvećanje x 20.

4.5 Količina iRNK za inflamatorne citokine u jetri

Razlike u ekspresiji gena za inflamatorne citokine TNF- α , IL-1 β i IL-6 u jetri \llcorner acova na razliĉitim ishranama prikazane su na Slici 16. Nije zabeleŹena znaĉajna razlika u ekspresiji iRNK za TNF- α i IL-1 β izmeĉu grupa. Sa druge strane, poveĉana ekspresija iRNK za IL-6 zabeleŹena je u jetri pacova koji su proveli deset nedelja na HFF ishrani u poreĉenju sa grupom na kontrolnoj ishrani. Suplementacija sokom CR uz HFF ishranu pokazala je anti-inflamatorni potencijal buduĉi da je u ovoj grupi zabeleŹena znatno niŹa ekspresija iRNK IL-6 u poreĉenju sa HFF grupom. Suplementacija sokom D takoĉe je pokazala trend anti-inflamatornog dejstva na ekspresiju gena za ovaj interleukin, ali dobijeni rezultati nisu bili statistiĉki znaĉajni.



Slika 16. Koncentracija iRNK za A) IL-1 β , B) IL-6 i C) TNF- α u jetri pacova nakon deset nedelja tretmana, HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SEM. * $p < 0,05$ u poreĉenju sa kontrolnom grupom; # $p < 0,05$ u poreĉenju sa HFF grupom.

4.6 Analiza parametara oksidativnog stresa

4.6.1 Odreĉivanje parametara oksidativnog stresa u plazmi

HFF ishrana dovela je do znaĉajnog sniŹenja vrednosti PAB u plazmi i nije uticala na ostale analizirane parametre. Konzumacija oba soka uz HFF ishranu dovela je do prevencije smanjenja PAB vrednosti, tako da se one u CR i D grupama nisu razlikovale u poreĉenju sa kontrolom. Sa druge strane, vrednost ovog parametra kod CR grupe bila je veĉa u poreĉenju sa HFF grupom. Takoĉe je kod obe grupe koje su pile sokove zabeleŹena niŹa koncentracija AOPP u plazmi u poreĉenju sa kontrolnom grupom. Kod grupe koja je pila sok drenjine je zabeleŹena i znaĉajno niŹa koncentracija O $_2^{\cdot-}$ i viŹa koncentracija MDA u plazmi u poreĉenju sa kontrolnom i sa HFF grupom (Tabela 11).

Tabela 11. Razlika u parametrima oksidativnog stresa izazvana HFF ishranom i suplementacijom sokovima CR i D u plazmi pacova

Parametri	Kontrolna grupa	HFF	CR	D	p
O ₂ ⁻ (μmol NBT/min/l)	48 (37–51)	51 (44–57)	49 (46–55)	41 (39–47)#†	0,111
PAB (U/l)	118 (112–123)	96 (93–109)*	119 (112–126)#	109 (99–115)	0,029
MDA (μmol/l)	2,93 (2,59–3,19)	2,74 (2,52–2,89)	2,70 (2,44–3,04)	3,41 (2,89–3,70)#†	0,058
AOPP (μmol/l)	57,7 (53,6–61,2)	54,4 (45,9–63,1)	50,2 (46,4–53,9)**	49,9 (43,4–54,3)*	0,052
IMA (ABSU)	0,050 (0,046–0,060)	0,052 (0,046–0,057)	0,048 (0,045–0,057)	0,081 (0,039–0,301)	0,664
SOD (U/l)	141 (139–144)	141 (140–142)	141 (139–142)	142 (141–144)	0,639
SHG (mmol/l)	0,216 (0,173–0,222)	0,216 (0,190–0,262)	0,199 (0,182–0,225)	0,184 (0,148–0,277)	0,803

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i analizirani Mann-Whitney U-testom i Kruskal-Wallis testom. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom; # $p \leq 0,05$ u poređenju sa HFF grupom; † $p \leq 0,05$ u poređenju sa CR grupom; NBT – engl. *Nitro Blue Tetrazolium*; PAB – pro-oksidativni antioksidativni balans; MDA – malondialdehid; AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina; IMA – ishemijski modifikovani albumin; SOD – superoksid dismutaza; SHG– sulfhidrilne grupe; p – p vrednost dobijena primenom Kruskal–Wallis testa.

4.6.2 Određivanje parametara oksidativnog stresa u jetri

Svi analizirani efekti sokova bogatih polifenolima na oksidativni status u jetri pacova prikazani su u Tabeli 12. HFF ishrana dovela je do značajnog povećanja TOS, kao i SOD i PON1 aktivnosti i smanjenja TAS u jetri u poređenju sa grupom na kontrolnoj ishrani. Nasuprot tome, konzumacija soka crne ribizle dovela je do statistički značajnog povećanja TAS, koncentracije AOPP i aktivnosti PAB, PON1 i SOD, kao i smanjenja koncentracije O₂⁻ i TAS u poređenju sa kontrolnom grupom. Kada poredimo CR i HFF grupe, kod CR je zabeležen porast koncentracije AOPP i PON1 aktivnosti, uz smanjenje koncentracije O₂⁻. Sa druge strane, konzumacija soka drenjine uz HFF ishranu dovela je do povećanja aktivnosti PON1 i SOD, uz smanjenje koncentracije MDA u poređenju sa grupom na kontrolnoj ishrani. U poređenju sa HFF grupom, u jetri D pacova zabeležena je niža koncentracija MDA, povišena aktivnost PON1 i viši TAS. Na kraju, poređenjem CR i D grupe, kod D pacova su ustanovljeni značajno niži TOS i koncentracija AOPP, dok su izmerene vrednosti TAS bile više.

4.6.3 Određivanje parametara oksidativnog stresa u visceralnom masnom tkivu

U poređenju sa kontrolnom grupom, u visceralnom masnom tkivu HFF grupe zabeležen je porast TAS, dok su ostali ispitivani parametri oksidativnog stresa ostali nepromenjeni. Sa druge strane, konzumiranje soka CR uz HFF ishranu dovelo je do smanjenja TOS i TAS, koncentracije MDA i aktivnosti PON1. Sličan efekat zabeležen je i kod konzumacije soka D gde su zabeležene niže vrednosti TOS i koncentracije IMA, dok su PAB aktivnost i odnos TAS/TOS bili viši u poređenju sa HFF grupom. Na kraju, poređenjem CR i D grupe ustanovljena je znatno niža koncentracija IMA kod pacova koji su pili sok drenjine. Sve gore pomenute vrednosti prikazane su u Tabeli 13.

Tabela 12. Razlika u parametrima oksidativnog stresa izazvana HFF ishranom i suplementacijom sokovima CR i D u jetri pacova

Parametri	Kontrolna grupa	HFF	CR	D	<i>p</i>
TOS (μmol/L)	772 (686–815)	841 (794–890)*	887 (863–1228)**	777 (750–854)†	0,014
O ₂ ⁻ (μmol NBT/min/L)	2440 (2310–2580)	2425 (2310–2760)	2230 (2000–2310)*##	2230 (2110–2440)	0,042
PAB (U/L)	226 (206–246)	234 (230–259)	259 (244–265)*	230 (209–237)†	0,060
MDA (μmol/L)	93,3 (83,0–119)	97,4 (88,2–120,7)	79,3 (60,7–103,7)	64,1 (54,1–81,8)*#	0,065
AOPP (μmol/L)	1381 (1355–1475)	1506 (1384–1604)	1741 (1676–1869)**##	1526 (1418–1680)†	0,003
IMA (ABSU)	0,543 (539–595)	0,622 (0,559–0,638)	0,654 (0,551–0,681)	0,591 (0,542–0,628)	0,234
PON1 (U/L)	0 (0–0)	85 (30–330)**	430 (360–490)**##	400 (340–410)**##	<0,001
TAS (μmol/L)	14010 (13780–14220)	11345 (10790–11520)***	11420 (11230–12240)***	13160 (12420–14010)###†	<0,001
SOD (U/L)	210 (0–240)	1260 (1180–1320)***	860 (810–1290)***	1320 (1300–1345)***	<0,001
SHG (mmol/L)	8,71 (8,38–9,89)	8,60 (7,50–10,3)	8,44 (8,09–9,06)	8,27 (7,77–8,64)	0,589
TAS/TOS	18,4 (16,2–20,4)	13,2 (12,3–14,3)***	12,6 (9,3–13,6)**	17,9 (15,3–18,2)##††	<0,001

Podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i analizirani Mann-Whitney U-testom i Kruskal-Wallis testom. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ u poređenju sa HFF grupom; † $p \leq 0,05$; †† $p \leq 0,01$ u poređenju sa CR grupom; TOS – ukupni oksidativni status; NBT – engl. *Nitro Blue Tetrazolium*; PAB – pro-oksidativni antioksidativni balans; MDA – malondialdehid; AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina; IMA – ishemijski modifikovani albumin; PON1 – paraoksonaza 1; TAS – ukupni antioksidativni status; SOD – superoksid dismutaza; SHG – sulfhidrilne grupe; *p* – *p* vrednost dobijena primenom Kruskal–Wallis testa.

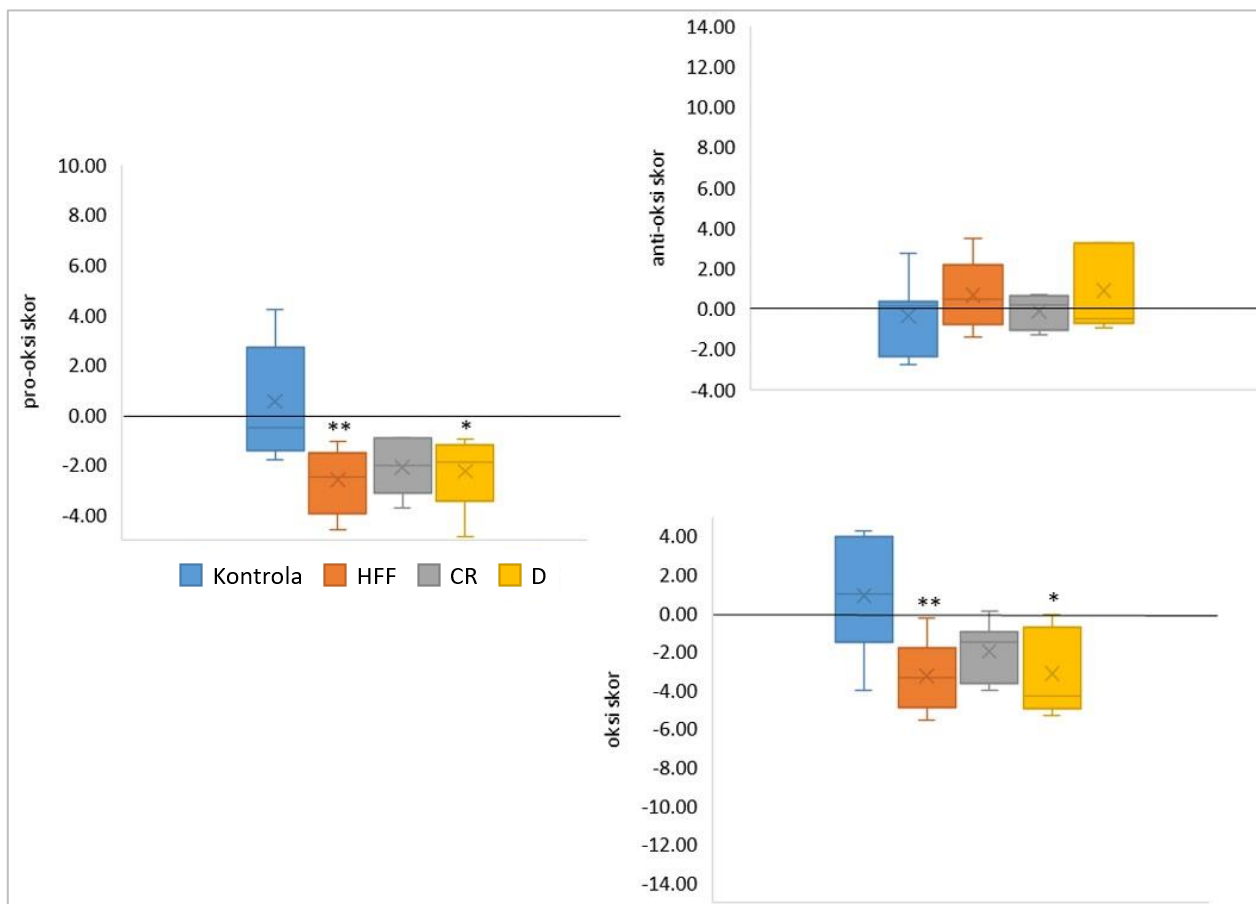
Tabela 13. Razlika u parametrima oksidativnog stresa izazvana HFF ishranom i suplementacijom sokovima CR i D u visceralnom masnom tkivu pacova

Parametri	Kontrolna grupa	HFF	CR	D	<i>p</i>
TOS (μmol/L)	24,5 (22,0–27,5)	38,0 (24,0–39,0)	20,0 (14,5–20,0)##	16,0 (14,0–19,0)*###	0,003
O ₂ ⁻ (μmol NBT/min/L)	160 (150–160)	160 (150–160)	160 (145–160)	160 (150–160)	0,954
PAB (U/L)	386 (373–392)	380 (378–386)	385 (381–397)	388 (387–389)#	0,213
MDA (μmol/L)	11,5 (8,89–15,6)	13,7 (11,1–17,0)	9,26 (8,52–10,4)#	11,1 (7,04–12,6)	0,110
AOPP (μmol/L)	376 (347–392)	319 (296–363)	298 (283–343)	319 (305–354)	0,169
IMA (ABSU)	0,528 (0,497–0,538)	0,526 (0,513–0,550)	0,542 (0,504–0,545)	0,486 (0,460–0,516)#†	0,103
PON1 (U/L)	15 (0–30)	10 (10–20)	5 (0–10)#	0 (0–0)*###	0,010
TAS (μmol/L)	1955 (1830–2030)	2375 (2170–2450)*	2025 (1790–2245)#	2180 (2110–2180)	0,027
SOD (U/L)	1275 (1250–1310)	1225 (1210–1240)	1245 (1235–1275)	1240 (1200–1290)	0,221
SHG (mmol/L)	0,319 (0,174–0,450)	0,334 (0,232–0,406)	0,246 (0,210–0,276)	0,218 (0,174–0,304)	0,254
TAS/TOS	75,4 (72,4–91,8)	58,6 (50,8–102,1)	107 (85,4–135)	132 (120–141)*###	0,010

Rezultati su prikazani kao medijana (interkvartilni raspon) i analizirani Mann-Whitney U-testom i Kruskal-Wallis testom. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. * $p \leq 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom; # $p \leq 0,05$; ### $p \leq 0,01$; #### $p \leq 0,001$ u poređenju sa HFF grupom; † $p \leq 0,05$ u poređenju sa CR grupom; TOS – ukupni oksidativni status; NBT – engl. *Nitro Blue Tetrazolium*; PAB – pro-oksidativni antioksidativni balans; MDA – malondialdehid; AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina; IMA – ishemijski modifikovani albumin; PON1 – paraoksonaza 1; TAS – ukupni antioksidativni status; SOD – superoksid dismutaza; SHG – sulfhidrilne grupe; $p - p$ vrednost dobijena primenom Kruskal-Wallis testa.

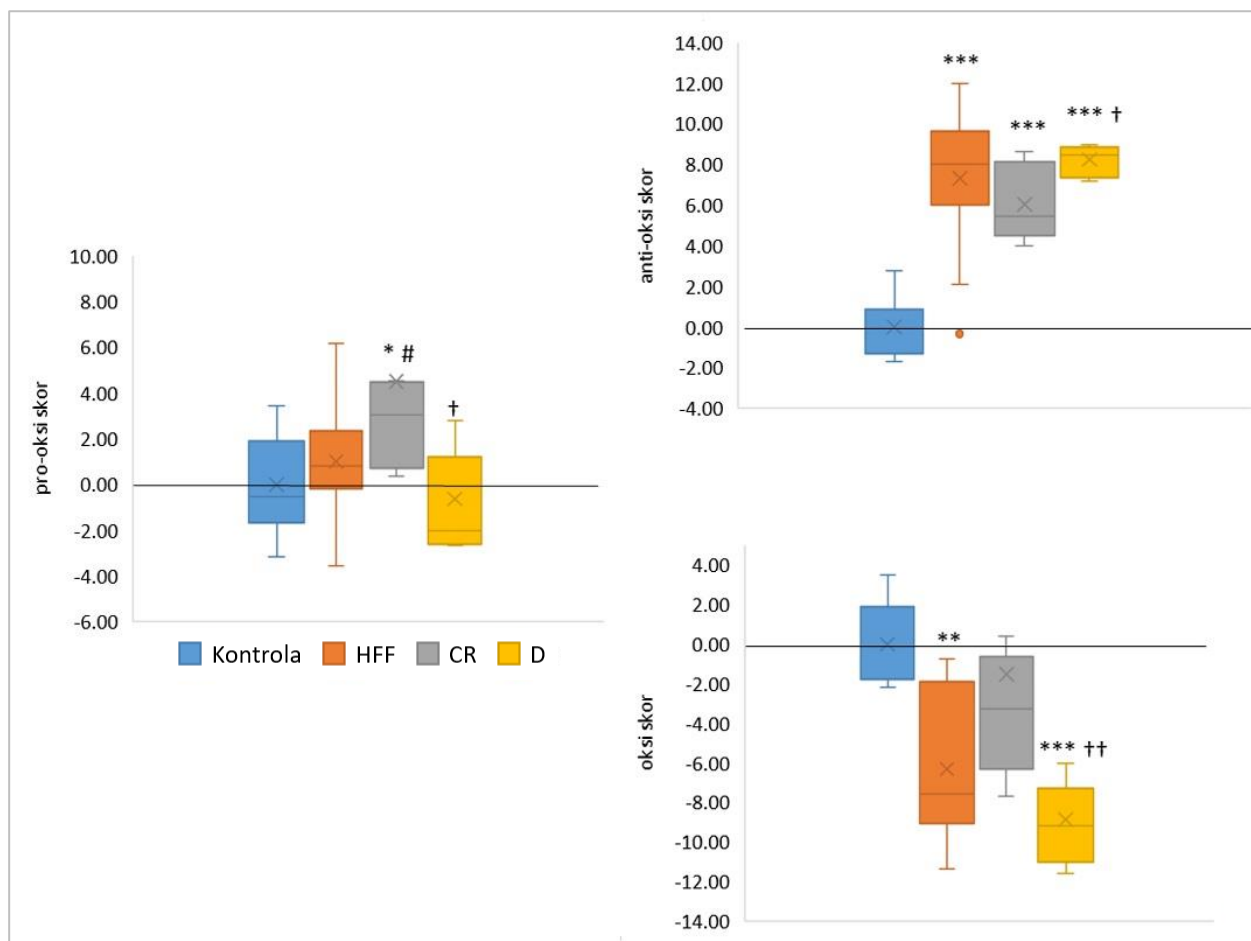
4.6.4 Oksi-skorovi u različitim tkivima pacova

Oksi skor predstavlja dve primarne komponente oksidativnog stresa – akumulaciju oksidativnog oštećenja i opadanje antioksidativne zaštite. Razlike između pro-oksi, anti-oksi i oksidativnog skorova u plazmi, jetri i VMT različitih eksperimentalnih grupa prikazane su na Slikama 17, 18 i 19.



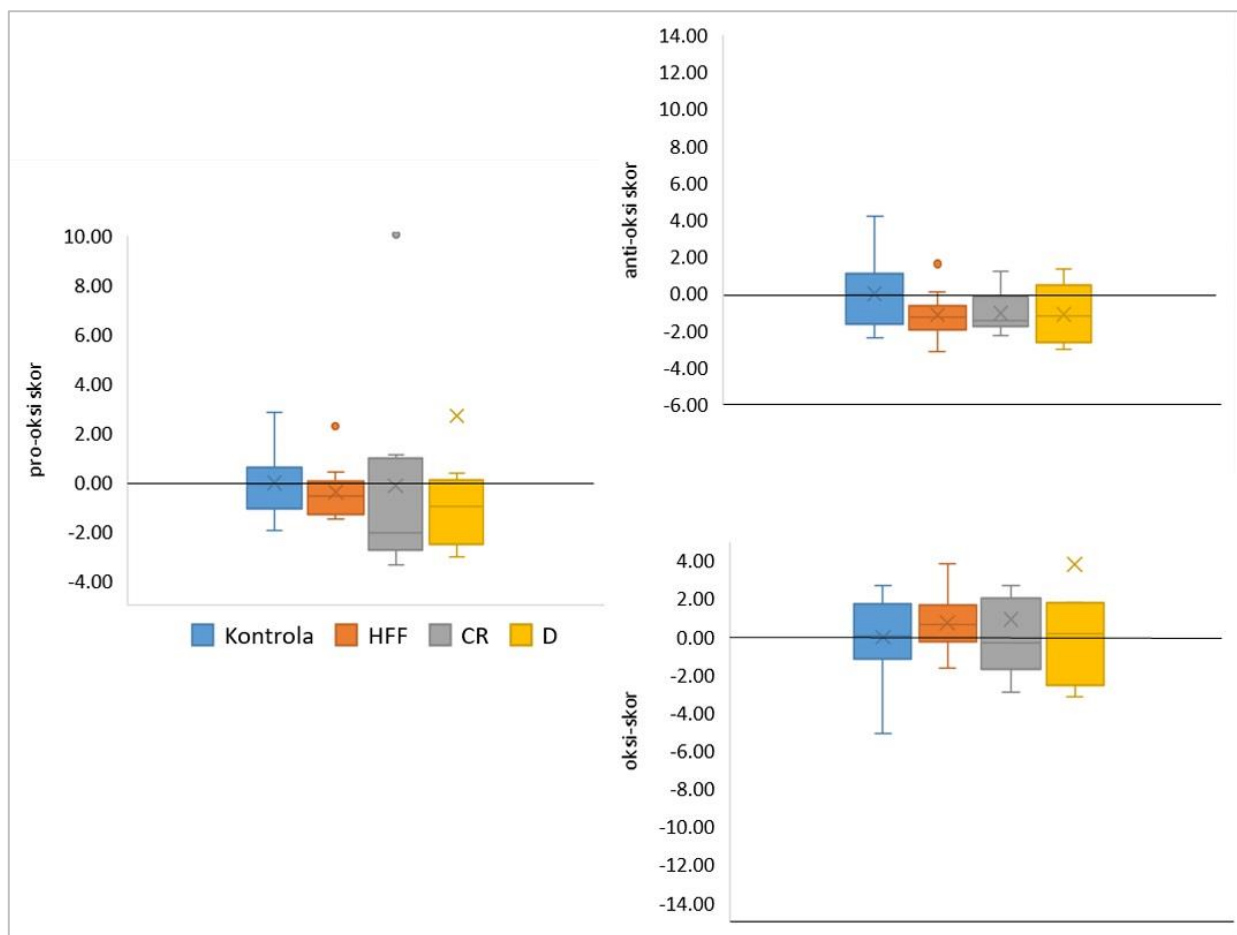
Slika 17. Pro-oksi, anti-oksi i oksidativni skorovi u plazmi pacova na različitim tipovima ishrane. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnim sokom crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom.

Analiza plazme pokazala je smanjenje nivoa pro-oksidanasa, nastalih kao posledica masne ishrane, nakon suplementacije sokovima bogatim polifenolima. Suplementacija nije dovela do značajnih promena antioksidanasa u krvi, dok je oksidativni skor dao slične rezultate poput pro-oksi skora kod sve četiri eksperimentalne grupe. Najizraženije redoks skor promene zapažene su u jetri (Slika 18), gde je CR tretman znatno povećao pro-oksi skor u poređenju sa kontrolnom i HFF grupom, što nije postignuto D tretmanom.



Slika 18. Pro-oksi, anti-oksi i oksi skorovi u jetri pacova na različitim tipovima ishrane. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ u poređenju sa HFF grupom; † $p \leq 0,05$; †† $p \leq 0,01$ u poređenju sa CR grupom.

Dobijeni rezultati su dodatno potvrđeni opštim smanjenjem oksi skora, koji je bio najviše izražen kod D grupe. Iako je zabeleženo nekoliko značajnih promena redoks parametara u VMT, u tom tkivu su redoks skorovi ipak ostali nepromenjeni, odnosno izbalansirani su (Slika 19).



Slika 19. Pro-oksi, anti-oksi i oksi skorovi u visceralnom masnom tkivu pacova na različitim tipovima ishrane. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiselne i vodi, CR - pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D - pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine.

Analizom plazme ustanovljen je znatno niži pro-oksi i oksi skor u HFF i D grupi u poređenju sa kontrolom. Nije bilo razlika u skorovima između HFF i grupa koje su konzumirale sok. U jetri je zabeležena razlika u pro-oksi skorovima između CR grupe i K i HFF grupa, kod CR grupe je ta vrednost bila značajno viša. U isto vreme vrednost pro-oksi skora D grupe bila je znatno niža u poređenju sa CR grupom. Sve tri grupe su imale viši anti-oksi skor u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je D grupa imala viši anti-oksi skor od CR grupe. Što se oksi skora tiče, kod HFF i D grupe je bio znatno niži nego kod kontrolne grupe, a zabeležena je statistički značajna razlika i između CR i D grupa, gde je oksi skor kod grupe koja je pila sok od drenjine bio niži. Kao što je napomenuto, nije bilo statistički značajnih razlika u skorovima između grupa kada se u razmatranje uzme masno tkivo.

4.6.5 Multipla linearna regresija

Kako bi se utvrdilo koji parameter redoks statusa i tip tretmana je najbolji indikator procenta visceralne masti na kraju studije urađena je multipla linearna regresiona (MLR) analiza (sa selekcijom unazad). Kao najbolji indikatori porasta VMT pokazali su se SOD i PAB parametri iz plazme, koji objašnjavaju % masti sa 56% varijabilnosti (Tabela 14). Najbolji indikator % VMT od parametara merenih u jetri bio je SOD, a nakon njega $O_2^{\cdot-}$ sa marginalnim značajem za model, odnosno 52%

varijabilnosti. Kao najznačajniji indikatori pokazali su se parametri iz masnog tkiva, SOD, AOPP, TOS i TAS, čija je varijabilnost koja objašnjava % VMT bila 57% (Tabela 14).

Tabela 14. Multipla linearna regresiona analiza za zavisnost procentna visceralnog masnog tkiva i parametara oksidativnog stresa u različitim tkivima

Plazma				
Indikatori	Zavisna varijabla visceralno masno tkivo %, $F = 11,3$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,617$; prilagođeni (engl. <i>adjusted</i>) $R^2 = 0,563$			
	Nestandardizovano		Standardizovani koeficijenti	
	B	Standardna greška	β	p
Eksperimentalna grupa	0,821	0,243	0,486	0,003
SOD (U/L)	0,190	0,093	0,291	0,054
PAB (U/L)	-0,044	0,017	-0,348	0,020
Jetra				
Indikatori	Zavisna varijabla visceralno masno tkivo %, $F = 9,6$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,552$; <i>adjusted</i> $R^2 = 0,523$			
	Nestandardizovano		Standardizovani koeficijenti	
	B	Standardna greška	β	p
SOD (U/L)	0,002	0,000	0,639	<0,001
O ₂ ⁻ (μmol NBT/min/L)	-0,002	0,001	-0,225	0,087
Masno tkivo				
Indikatori	Zavisna varijabla visceralno masno tkivo %, $F = 19,1$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,633$; <i>adjusted</i> $R^2 = 0,567$			
	Nestandardizovano		Standardizovani koeficijenti	
	B	Standardna greška	β	p
Eksperimentalna grupa	1,291	0,212	0,818	<0,001
SOD (U/L)	-0,012	0,004	-0,343	0,008
AOPP (μmoL/L)	-0,002	0,001	-0,258	0,036
TOS (μmoL/L)	0,060	0,020	0,422	0,006
TAS (μmoL/L)	-0,002	0,001	-0,327	0,015

SOD – superoksid dizmutaza, O₂⁻ – superoksid anjon radikal, PAB – pro-oksidativni antioksidativni balans, AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina, TAS – ukupni antioksidativni status, TOS – ukupni oksidativni status, NBT– engl. *Nitro Blue Tetrazolium*.

4.7 Profil masnih kiselina u plazmi, jetri i masnom tkivu

Analizom masnokiselinskog profila plazme eksperimentalnih grupa ustanovljeno je da je HFF ishrana dovela do smanjenja ukupnih SFA, ukupnih n-3 PUFA (kao i smanjenja pojedinačnih 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3) i 20:4n-6 (Tabela 15) kod sve tri grupe koje su konzumirale HFF pelet u trajanju od deset nedelja u poređenju sa kontrolom, bez obzira da li su bile na suplementaciji sokom ili ne. Takođe je u plazmama HFF grupe zabeležena veća koncentracija ukupnih MUFA, a ta razlika je bila još izraženija kod CR i D grupe kada ih poredimo sa kontrolom. Osim toga, u plazmama HFF, CR i D grupa su zabeležene niže vrednosti 16:0, 16:1n-7, 18:1n-7 i viša vrednost 22:4n-6 MK u poređenju sa kontrolnom grupom. Kada je reč o 20:3n-6, ona je bila znatno viša u plazmi HFF grupe, dok je konzumacija oba soka predupredila porast njene koncentracije. Takođe je koncentracija 18:1n-7 kod CR i D grupa, iako i dalje znatno niža od kontrole, bila značajno viša u poređenju sa HFF grupom. Sam odnos n-6/n-3 bio je znatno viši kod svih životinja na modifikovanoj ishrani, a isto važi i za aktivnost D9 desaturaze i elongaza. Sa druge strane, aktivnost D5 desaturaze bila je znatno niža kod HFF grupe u poređenju sa preostale tri grupe.

Tabela 15. Profil masnih kiselina u plazmi pacova na različitim ishranama

Masne kiseline	Kontrola	HFF	CR	D
16:0	22,55 ± 0,93	18,57 ± 0,97***	19,04 ± 0,71***	19,12 ± 1,19***
18:0	16,98 ± 1,30	17,93 ± 1,34	17,03 ± 1,19	17,48 ± 2,30
SFA	39,53 ± 1,57	36,50 ± 1,88**	36,07 ± 1,24***	36,60 ± 2,96**
16:1n-7	1,22 ± 0,21	0,45 ± 0,29***	0,44 ± 0,22***	0,45 ± 0,11***
18:1n-9	6,43 ± 0,76	10,15 ± 1,78***	10,69 ± 1,02***	10,83 ± 1,68***
18:1n-7	2,35 ± 0,26	1,18 ± 0,10***	1,34 ± 0,04***#	1,37 ± 0,14***#
MUFA	10,00 ± 1,33	11,78 ± 2,03*	12,47 ± 1,08**	12,65 ± 1,79**
18:2n-6	19,00 ± 1,65	25,25 ± 2,51***	25,98 ± 2,15***	25,07 ± 3,05***
18:3n-6	0,42 ± 0,14	0,46 ± 0,12	0,40 ± 0,05	0,38 ± 0,07
20:3n-6	0,66 ± 0,22	0,98 ± 0,30**	0,50 ± 0,06###	0,56 ± 0,16###
20:4n-6	25,85 ± 1,34	22,64 ± 3,22**	22,15 ± 1,90***	22,29 ± 1,59**
22:4n-6	0,60 ± 0,10	1,10 ± 0,17***	1,22 ± 0,26***	1,12 ± 0,13***
n-6 PUFA	46,51 ± 1,89	50,43 ± 2,20***	50,26 ± 1,02***	49,40 ± 2,15**
18:3n-3	0,38 ± 0,08	0,09 ± 0,06***	0,09 ± 0,03***	0,11 ± 0,04***
20:5n-3	0,26 ± 0,09	0,04 ± 0,04***	0,04 ± 0,05***	0,04 ± 0,04***
22:5n-3	0,54 ± 0,10	0,20 ± 0,08***	0,19 ± 0,13***	0,18 ± 0,03***
22:6n-3	2,78 ± 0,37	0,97 ± 0,19***	0,88 ± 0,13***	1,02 ± 0,15***
n-3 PUFA	3,97 ± 0,28	1,29 ± 0,28***	1,20 ± 0,21***	1,35 ± 0,17***
PUFA	50,48 ± 2,07	51,72 ± 2,00	51,46 ± 0,94	50,75 ± 2,08
n-6/n-3 odnos	11,76 ± 0,63	40,93 ± 9,50***	43,06 ± 7,58***	37,25 ± 5,62***
D9	0,38 ± 0,06	0,57 ± 0,12**	0,63 ± 0,09***	0,64 ± 0,19***
D6	0,023 ± 0,009	0,019 ± 0,006	0,016 ± 0,005*	0,014 ± 0,005*
D5	45,30 ± 22,36	25,12 ± 8,94**	44,86 ± 6,17##	43,70 ± 14,75##
elongaze	0,76 ± 0,07	0,97 ± 0,08***	0,90 ± 0,08**	0,92 ± 0,12***

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. SFA – zasićene masne kiseline (engl. *Saturated Fatty Acids*), MUFA – mononezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated Fatty Acids*), PUFA – polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ u poređenju sa HFF grupom.

Analizom MK u ukupnim lipidima jetre ustanovljena je viša zastupljenost ukupnih n-6 PUFA, kao i pojedinačnih 18:1n-9, 18:2n-6 i 22:4n-6 MK kod HFF, CR i D grupe u poređenju sa

grupom na standardnoj ishrani. Koncentracija 16:0 bila je veća kod HFF grupe nego kod kontrole, dok je koncentracija MUFA bila veća kod CR i D grupe nego kod kontrole. Sve tri grupe koje su konzumirale HFF pelet imale su niže vrednosti 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3, a samim tim i ukupne n-3 PUFA u poređenju sa grupom na standardnoj ishrani. Takođe su kod ove tri grupe vrednosti 18:1n-7, 18:3n-6 i 20:4n-6 bile znatno niže od vrednosti izmerenih kod kontrole. Konzumiranje CR i D soka sprečilo je porast 20:3n-6 koji je zabeležen kod HFF grupe. Sve tri grupe na modifikovanoj ishrani imale su povećanu aktivnost D9 i smanjenu aktivnost D6 desaturaze, kao i izraženo povećan n-6/n-3 odnos MK u jetri. Sa druge strane, aktivnost D5 desaturaze bila je smanjena samo kod HFF grupe u poređenju sa ostale tri eksperimentalne grupe, dok je aktivnost elongaza bila izraženija kod HFF i D grupe u poređenju sa kontrolom (Tabela 16).

Tabela 16. Profil masnih kiselina u jetri pacova na različitim ishranama

Masne kiseline	Kontrola	HFF	CR	D
16:0	19,75 ± 0,57	18,80 ± 0,75*	19,04 ± 0,71	19,12 ± 1,19
18:0	16,42 ± 0,78	17,90 ± 1,43	17,03 ± 1,19	17,48 ± 2,30
SFA	36,17 ± 0,44	36,70 ± 1,91	36,07 ± 1,24	36,60 ± 2,96
16:1n-7	0,70 ± 0,43	0,44 ± 0,31	0,44 ± 0,22	0,45 ± 0,11
18:1n-9	6,77 ± 0,52	9,90 ± 1,73***	10,69 ± 1,02***	10,83 ± 1,68***
18:1n-7	2,80 ± 0,59	1,17 ± 0,10***	1,34 ± 0,04***	1,37 ± 0,14***
MUFA	10,26 ± 1,45	11,51 ± 1,99	12,47 ± 1,08**	12,65 ± 1,79**
18:2n-6	20,83 ± 1,63	24,90 ± 2,43**	25,98 ± 2,15***	25,07 ± 3,05***
18:3n-6	0,59 ± 0,22	0,46 ± 0,13*	0,40 ± 0,05**	0,38 ± 0,07**
20:3n-6	0,70 ± 0,18	0,99 ± 0,32**	0,50 ± 0,06####	0,56 ± 0,16####
20:4n-6	25,07 ± 0,95	23,02 ± 3,21*	22,15 ± 1,90**	22,29 ± 1,59**
22:4n-6	0,78 ± 0,14	1,12 ± 0,18***	1,22 ± 0,26***	1,12 ± 0,13***
n-6 PUFA	47,97 ± 1,39	50,47 ± 2,35**	50,26 ± 1,02*	49,40 ± 2,15
18:3n-3	0,38 ± 0,06	0,10 ± 0,06***	0,09 ± 0,03***	0,11 ± 0,04***
20:5n-3	0,28 ± 0,03	0,04 ± 0,05***	0,04 ± 0,05***	0,04 ± 0,04***
22:5n-3	0,77 ± 0,13	0,18 ± 0,06***	0,19 ± 0,13***	0,18 ± 0,03***
22:6n-3	4,17 ± 0,35	1,00 ± 0,18***	0,88 ± 0,13***	1,02 ± 0,15***
n-3 PUFA	5,60 ± 0,42	1,31 ± 0,28***	1,20 ± 0,21***	1,35 ± 0,17***
PUFA	53,57 ± 1,26	51,79 ± 2,12*	51,46 ± 0,94*	50,75 ± 2,08**
n-6/n-3 odnos	8,61 ± 0,79	40,25 ± 9,92***	43,06 ± 7,58***	37,25 ± 5,62***
D9	0,42 ± 0,05	0,56 ± 0,12*	0,63 ± 0,09**	0,64 ± 0,19**
D6	0,029 ± 0,011	0,019 ± 0,006**	0,016 ± 0,005***	0,014 ± 0,005***
D5	37,50 ± 7,63	25,66 ± 9,40*	44,86 ± 6,17####	43,70 ± 14,75####
elongaze	0,83 ± 0,06	0,95 ± 0,07**	0,90 ± 0,08	0,92 ± 0,12*

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR - pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D - pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. SFA – zasićene masne kiseline (engl. *Saturated Fatty Acids*), MUFA – mononezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated Fatty Acids*), PUFA – polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom; #### $p \leq 0,001$ u poređenju sa HFF grupom.

Kada je reč o profilu masnih kiselina u visceralnom masnom tkivu, konzumacija HFF peleta dovela je do smanjenja količine SFA i n-3 PUFA i povećanja količine MUFA, PUFA, n-6 PUFA, a samim tim i n-6/n-3 odnosa kod sve tri grupe u poređenju sa kontrolnom. Takođe je kod ovih grupa zabeležena i niža koncentracija pojedinačnih zasićenih 16:0 i 18:0 MK. Kod sve tri grupe niže su bile i koncentracije 16:1n-7, 18:1n-7, 18:3n-6, 20:4n-6, 22:4n-6 i svih pojedinačnih n-3 PUFA (18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3) u poređenju sa kontrolnom grupom. Sa druge strane, koncentracija 18:1n-9 i 18:3n-6 bila je niža kod životinja koje su provele deset nedelja na HFF peletu u poređenju sa pacovima na standardnoj ishrani. Koncentracija MUFA bila je značajno niža u adipocitima D grupe

u poređenju sa CR grupom, dok je zastupljenost 18:2n-6 i ukupnih n-6 PUFA u ovoj grupi bila viša nego ona izmerena kod HFF grupe. Kod CR grupe je zabeležena niža koncentracija 20:3n-6, 18:3n-3 i ukupnih n-3 PUFA, kao i viši n-6/n-3 odnos u poređenju sa HFF grupom. Takođe je kod svih grupa na modifikovanoj ishrani zabeležen porast aktivnosti D9 desaturaze i elongaza, i smanjena aktivnost D6 desaturaze u poređenju sa grupom na standardnoj ishrani (Tabela 17).

Tabela 17. Profil masnih kiselina u masnom tkivu pacova na različitim ishranama

Masne kiseline	Kontrola	HFF	CR	D
16:0	19,99 ± 1,18	13,49 ± 1,23***	12,48 ± 1,17***	12,42 ± 1,27***
18:0	3,19 ± 0,42	2,87 ± 0,33*	2,79 ± 0,13**	2,77 ± 0,16**
SFA	23,18 ± 1,53	16,35 ± 1,17***	15,27 ± 1,15***	15,19 ± 1,28***
16:1n-7	2,91 ± 0,49	1,51 ± 0,56***	1,19 ± 0,48***	1,11 ± 0,37***
18:1n-9	23,59 ± 1,03	30,10 ± 1,26***	30,63 ± 0,68***	29,99 ± 0,83***
18:1n-7	2,62 ± 0,22	1,69 ± 0,16***	1,71 ± 0,10***	1,60 ± 0,21***
MUFA	29,12 ± 1,09	33,30 ± 0,97***	33,52 ± 0,31***	32,70 ± 0,69***†
18:2n-6	43,34 ± 2,32	48,46 ± 1,92***	49,95 ± 1,32***	50,29 ± 1,39***#
18:3n-6	0,27 ± 0,13	0,12 ± 0,06***	0,08 ± 0,02***	0,08 ± 0,02***
20:3n-6	0,24 ± 0,03	0,34 ± 0,37	0,15 ± 0,02#	0,16 ± 0,03
20:4n-6	1,64 ± 0,55	0,80 ± 0,18**	0,59 ± 0,24**	0,70 ± 0,14**
22:4n-6	0,28 ± 0,10	0,14 ± 0,04***	0,11 ± 0,02***	0,11 ± 0,02***
n-6 PUFA	45,77 ± 2,01	49,85 ± 1,88***	50,88 ± 1,17***	51,69 ± 1,35***#
18:3n-3	1,59 ± 0,27	0,49 ± 0,18***	0,30 ± 0,04***#	0,39 ± 0,14***
20:5n-3	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,00***	0,00 ± 0,00***	0,00 ± 0,00***
22:5n-3	0,14 ± 0,10	0,01 ± 0,01***	0,01 ± 0,01***	0,01 ± 0,01***
22:6n-3	0,17 ± 0,07	0,03 ± 0,02***	0,02 ± 0,01***	0,02 ± 0,01***
n-3 PUFA	1,94 ± 0,28	0,50 ± 0,16***	0,33 ± 0,05***#	0,42 ± 0,16***
PUFA	47,70 ± 2,21	50,34 ± 1,78**	51,21 ± 1,13***	52,11 ± 1,35***#
n-6/n-3 odnos	23,96 ± 2,81	112 ± 42,78***	158,26 ± 25,39***##	137 ± 47,43***
D9	7,51 ± 1,05	10,59 ± 0,93***	11,01 ± 0,47***	10,87 ± 0,75***
D6	0,006 ± 0,003	0,002 ± 0,002***	0,002 ± 0,001***	0,001 ± 0,001***
D5	6,85 ± 1,80	3,55 ± 1,42	4,21 ± 1,66	4,17 ± 1,52
elongaze	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,04***	0,22 ± 0,03***	0,23 ± 0,02***

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. HFF – pacovi na ishrani sa dodatih 25% suncokretovog ulja, 20% fruktoze i 0,1% holne kiseline i vodi, CR – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku crne ribizle, D – pacovi na HFF ishrani i 20% matičnom soku drenjine. SFA – zasićene masne kiseline (engl. *Saturated Fatty Acids*), MUFA – mono nezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated Fatty Acids*), PUFA – poli nezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom; # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ u poređenju sa HFF grupom; † $p \leq 0,05$ u poređenju sa CR grupom.

5. DISKUSIJA

Dosadašnja saznanja potvrđuju da kod dijagnostikovanog metaboličkog sindroma, osim dislipidemije, visceralne gojaznosti i smanjene insulinske osetljivosti, najčešće srećemo promenjen lipidni profil plazme i smanjenu antioksidativnu zaštitu koja je često praćena povećanom inflamacijom [153–155]. Usvajanje određenih navika u ishrani u ovoj fazi razvoja poremećaja može dovesti do sveobuhvatnog poboljšanja opšteg zdravstvenog stanja i sprečiti razvoj dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti. Zbog visoke zastupljenosti polifenola, bobičasto voće, kao i njegovi proizvodi (sokovi, džemovi, kaše), su poznati po svom blagotvornom dejstvu na opšte zdravlje [156]. Drenjina i crna ribizla se vekovima koriste u srpskoj narodnoj medicini, ali i dalje ne postoji dovoljno naučnih dokaza koji bi potvrdili sve lekovite efekte koji im se pripisuju. Poznato je da određene klase polifenola koje su takođe u velikoj meri zastupljene u plodovima ove dve biljke imaju inhibitorni efekat na razvoj određenih vrsta karcinoma, kardiovaskularnih poremećaja i stanja povezanih sa hroničnom inflamacijom, kao i da njihov unos može znatno smanjiti oksidativni stres indukovani ishranom bogatom mastima i šećerima, tzv. zapadnjačkom ishranom [157–160]. Jedna od prednosti komercijalno dostupnih matičnih sokova je u tome što su dostupni tokom cele godine, tako da njihovo korišćenje nije ograničeno samo na letnju sezonu kada su dostupni sami plodovi, pa je pretpostavka da bi njihova upotreba mogla da nadomesti smanjeni unos svežih plodova.

Kako bi što preciznije ispitali dejstvo ovih sokova na prevenciju razvoja MetS i svih propratnih negativnih simptoma, prvi deo ove studije imao je za cilj pronalazak najadekvatnijeg animalnog model sistema za dalje sprovođenje eksperimenta. U prvom delu studije testirana su dva podsoja *Wistar* pacova, podeljenih u po dve starosne grupe, a ujedno je ispitivana i optimalna dužina trajanja tretmana. Nakon postizanja adekvatnog model sistema ispitivan je uticaj svakodnevne konzumacije komercijalno dostupnih matičnih sokova CR i D na prevenciju razvoja parametara karakterističnih za MetS. To je obuhvatilo antropometrijske, hematološke i biohemijske parametre, MK profile plazme, masnog tkiva i jetre, aktivnost enzima antioksidativne zaštite u plazmi i tkivima, faktore inflamacije, kao i praćenje histoloških promena u jetri, masnom tkivu i pankreasu.

Dva podsoja *Wistar* pacova, koja su korišćena za uspostavljanje model sistema bili su *Hannover* i *Kyoto*. Svaki podsoj obuhvatio je dve grupe – adolescentne jedinke starosti osam nedelja i odrasle jedinke starosti četiri meseca. U studiju su bili uključeni samo mužjaci kako bi se izbegla fiziološka varijabilnost povezana sa estrusnim ciklusom kod ženki. Životinje starosti osam nedelja su još uvek u periodu intenzivnog rasta, što znači da i dalje dobijaju na telesnoj masi, te se smatraju adolescentima, dok su pacovi starosti četiri meseca dostigli period u kom je telesni rast završen, što ih svrstava u mlade odrasle jedinke [161]. MetS je kod eksperimentalnih životinja izazvan ishranom bogatom šećerima i mastima (HFHF), a sa niskim sadržajem vlakana, koja je kao takva bila namenjena da imitira široko rasprostranjenu “zapadnjačku dijetu”. Prema našim saznanjima do sada dostupna istraživanja nisu poredila podložnost različitih podsojeva *Wistar* pacova razvoju MetS, štaviše, samo manji broj radova uopšte spominje koji je podsoj korišćen u sličnim studijama [162]. Takođe, dosadašnja istraživanja nisu definisala optimalnu starost životinja, dužinu trajanja tretmana, kao ni tačan energetske sastav peletirane hrane koja treba da bude korišćena za razvijanje MetS kod pacova.

Kada su u pitanju podsojevi *Wistar* pacova, podaci iz raspoložive literature ukazuju na uočene razlike u podložnosti nastanku i progresiji pojedinih neuroloških poremećaja, razvoju bubrežnih bolesti, oštećenju krvnih sudova i hipertenziji [163], kao i u odgovoru na određene farmakološke supstance [164].

Dobro je poznato da HFHF ishrana uzrokuje prekomernu telesnu masu, dovodi do razvoja gojaznosti, hiperlipidemije i steatoze jetre, kao i da indukuje inflamaciju i povećava sistemski

oksidativni stres [165,166]. Istovremeno prisustvo nekoliko ovih parametara ukazuje na razvijen MetS. Tokom naše studije parametri iz krvi karakteristični za MetS proveravani su nakon osam i 16 nedelja HFHF tretmana, dok su unos hrane i telesna masa praćeni na nedeljnom nivou. Nakon osmonedelnog preseka kod mladih pacova oba podsoja, KmHFHF i HmHFHF, uočena je znatno manja telesna masa nego kod kontrolnih grupa. Ta razlika je prestala da se uočava prolongiranjem tretmana na 16 nedelja (Tabela 4 i Tabela 5). Budući da HFHF ishrana ima niži sadržaj proteina od standardnog peleta kojim se hranila kontrolna grupa, postoji mogućnost da ona nije zadovoljila fiziološke potrebe intenzivnog rasta kod životinja u adolescentnom periodu [167]. Dodatno, sve grupe koje su bile na HFHF ishrani su znatno smanjile unos hrane u poređenju sa svojim kontrolama. Isti efekat je zabeležen u ranijim studijama koje su za indukovanje MetS koristile hranu sa visokim procentom masti u kombinaciji sa različitim prostim šećerima [168]. Razlog smanjenja količine unete HFHF hrane je pre svega njena visoka kalorijska vrednost, zbog čega su i manje konzumirane količine bile dovoljne da zadovolje dnevne potrebe za energijom. Štaviše, ukupan energetske unos kod gotovo svih životinja na HFHF ishrani bio je značajno viši od onog kod kontrole. Postoje literaturni podaci koji ukazuju na to da smanjeni unos proteina dovodi do povećanog kalorijskog unosa, kao i da je to povećanje praćeno istovremenim porastom energetske potrošnje. Iako u takvoj situaciji nije došlo do povećanja telesne mase, uočen je porast u količini deponovanog visceralnog masnog tkiva (VMT) [169], što je u skladu sa rezultatima dobijenim u našoj studiji. Još jedna promena koja je takođe zabeležena kod svih grupa pacova koji su konzumirali HFHF pelet je smanjenje koncentracije uree u plazmi. Urea je metabolički produkt razgradnje proteina i pojavljuje se u krvi ubrzo nakon njihovog unošenja hranom [170]. Stoga se niži nivo uree kod HFHF grupa može pripisati nižem sadržaju proteina u HFHF peletu u odnosu na standardnu ishranu. Što se tiče ostalih parametara MetS, zabeležen je porast glikemije, ali samo kod KmHFHF grupe nakog osam nedelja tretmana, dok je produženje studije na 16 nedelja rezultovalo gubitkom razlike u ovom parametru između kontrolne i KmHFHF grupe. Održanje stabilne koncentracije glukoze u krvi uprkos primeni visokokalorijske dijetne sreće se i u drugim radovima [171,172], s tim da u nekim slučajevima autori iznose pretpostavku da bi se povećanje koncentracije glukoze verovatno moglo detektovati daljim prolongiranjem tretmana. Ovde treba napomenuti da pacovi pokazuju znake starenja i promene u ponašanju, poput smanjene aktivnosti i porasta aksioznosti, već od 6.-7. meseca života [173], te da bi produženje tretmana van granica ovog vremenskog okvira moglo da dovede u pitanje validnost dobijenih rezultata.

Jedan od parametara MetS je i dislipidemija koju karakterišu nizak nivo HDL-C i povišena koncentracija TG u krvi. U našoj studiji, povišeni nivoi TG zabeleženi su samo kod KmHFHF nakon 16 nedelja provedenih na HFHF ishrani (Tabela 6). Povećanje koncentracije TG u krvi usled HFHF ishrane je očekivano ako uzmemo u obzir visoki procenat masnoće u peletu, a pored toga, povećana konzumacija fruktoze najčešće dovodi do *de novo* lipogeneze [174]. Što se tiče ostalih eksperimentalnih grupa, nije došlo do povećanja koncentracije TG u krvi kao posledice primene HFHF ishrane, što ukazuje na to da na povećanje vrednosti ovog parametra ne utiče samo HFHF ishrana. Niži nivo HDL-C zabeležen je samo kod HoHFHF grupe, s tim da je trend smanjenja uočen već nakon osam nedelja, dok se produženjem tretmana na 16 nedelja pojavila statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Tabela 7). HDL-C ima ključnu ulogu u transportu viška holesterola iz perifernih tkiva do jetre, gde holesterol biva uklonjen iz cirkulacije, zbog čega dijetetski izazvano smanjenje nivoa HDL-C može negativno uticati na ukupni metabolizam holesterola, direktno dovodeći do razvoja različitih zdravstvenih poremećaja poput ateroskleroze [175]. S druge strane, povećani HDL-C u grupi KmHFHF, i smanjen LDL-holesterol u HmHFHF, bili su neočekivani rezultati koji dodatno dovode u pitanje pouzdanost upotrebe HFHF ishrane u uspostavljanju MetS, posebno kod mladih jedinki. Ovi rezultati na mladima, zajedno sa već pomenutim smanjenjem nivoa HDL-C kod nekih odraslih, ukazuju da bi starije jedinke mogle biti bolji izbor za ovaj tip eksperimenta. Što se literaturnih podataka o uticaju HFHF ishrane na HDL-C tiče, oni su takođe raznoliki. Pojedine studije su, slično našoj, zabeležile značajno smanjenje HDL-C kod odraslih *Sprague-Dawley* pacova koji su hranjeni ishranom bogatom mastima i šećerom u

trajanju od 12-48 nedelja [176]. Nasuprot tome, druga studija pokazala je da HFHF ishrana nema uticaja na dislipidemiju i sniženje HDL-C kod pacova koji su ušli u eksperiment sa 12 nedelja starosti [177].

Kada smo sumirali rezultate dobijene poređenjem efekata HFHF ishrane sa 25% masti (suncokretovo ulje) i 20% fruktoze na dva soja Wistar pacova i dva uzrasta, uočili smo da ovaj tretman nije bio dovoljno efikasan da u navedenom vremenskom periodu izazove MetS kod pacova. To nas je navelo da zaključimo da je za postizanje brže indukcije i efikasnijeg razvoja MetS, potrebno dodatno modifikovati eksperimentalnu ishranu dodavanjem određenih količina potencijalno efikasnih komponenti. U tu svrhu ranije su korišćeni holesterol, kako bi se direktno uticalo na njegovu koncentraciju u krvi i dovelo do hiperholesterolemije [178], holna kiselina u manjim količinama, kako bi se maksimalno povećala apsorpcija masti u crevima [179], NaCl, kako bi se izazvala hipertenzija [180], kao i pojedini lekovi, poput streptozotocina, koji primenjen u niskim dozama uz HFHF ishranu, utiče na sekreciju insulina [83].

Bazirano na rezultatima dobijenim u prvoj fazi istraživanja, opredelili smo se za korišćenje odraslih jedinki muškog pola podsoja *Hannover* u sledećoj eksperimentalnoj fazi. Ova grupa životinja pokazala je najveću podložnost za razvoj dislipidemije indukovane HFHF ishranom. Takođe smo se odlučili za dodatak holne kiseline u HFHF hranu, jer ona direktno utiče na apsorpciju masti i time doprinosi bržem razvoju i intenzitetu dislipidemije, što je ujedno omogućilo skraćivanje perioda nutritivne intervencije sa 16 na deset nedelja. Primena HFHF ishrane uz dodatak 0.1% holne kiseline (HFF ishrana) u periodu od deset nedelja uspešno je indukovala MetS. To je potvrđeno razvojem hipertenzije, smanjenjem insulinske osetljivosti, razvojem dislipidemije, abdominalne gojaznosti, povećanjem sistemskog oksidativnog stresa i inflamacije, kao i histopatološkim promenama u masnom tkivu, jetri i pankreasu, praćenim narušenom sekrecijom glikogena i insulina. S druge strane, oba naša suplementa, sok od crne ribizle i sok od drenjine pokazala su se efikasna u prevenciji razvoja MetS kod pacova na HFF ishrani, o čemu će dalje biti reči.

Iako je veliki broj studija pokazao da konzumacija proizvoda i ekstrakata lista i ploda CR i D može imati hipolipidemičko, hipoglikemijsko i anti-inflamatorno dejstvo [124,125,181,182], prema našim saznanjima, ova studija je prva koja se bavila ispitivanjem potencijala njihovih komercijalno dostupnih sokova u prevenciji nastanka MetS. Prikazani rezultati su pokazali preventivni efekat konzumiranja hladno ceđenih sokova CR i D na veći broj parametara MetS indukovanog HFF ishranom, uključujući gojaznost, poboljšanu toleranciju na glukozu, inflamaciju, oksidativni stres, prevenciju histopatoloških promena u jetri, adipoznom tkivu i pankreasu, kao i pozitivni uticaj na regulaciju sekrecije insulina i glukagona. Tokom desetonedeljne modifikovane ishrane, sve tri grupe koje su konzumirale HFF pelet su smanjile količinski unos hrane (Slika 7A). Iako je HFF ishrana bila značajno kaloričnija u odnosu na standardni pelet za pacove, zbog smanjene konzumacije nije imala efekat na ukupni kalorijski unos, pa je on ostao ujednačen u svim eksperimentalnim grupama (Slika 7B). Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima gde su pacovi na različitim ishranama sa visokim sadržajem šećera i masti spontano smanjivali unos hrane, tako da je dnevni kalorijski unos kod pacova na visokokaloričnom peletu bio uporediv sa kalorijskim unosom pacova na standardnom peletu [168,183]. Zbog ujednačenog kalorijskog unosa nije zabeležena statistički značajna razlika u masama između različitih grupa pacova na kraju tretmana (Slika 8). Sa druge strane, ono što je zabeleženo je značajno povećanje količine ukupnog visceralnog masnog tkiva (VMT) kod sve tri grupe koje su bile na HFF peletu u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 9). Dakle, iako je kod naših životinja izostao efekat na sam porast telesne mase, nepovoljan efekat HFF odrazio se na porast adipoznosti. Kada je u pitanju efekat sokova, suplementacija sokom CR imala je preventivni uticaj na akumulaciju masnog tkiva tokom konzumacije visoko kalorične hrane, tako da je količina VMT kod suplementiranih životinja bila znatno manja nego kod onih iz grupe koja je bila samo na HFF ishrani. Ovaj trend nije primećen kod suplementacije sokom D. Različiti uticaj sokova na akumulaciju VMT može biti posledica različite koncentracije ukupnih polifenola u ova dva soka, kao i razlika u

zastupljenosti njihovih pojedinačnih klasa. Urađene analize su pokazale da je sok CR, korišćen u našoj studiji, sadržao pet puta više TF3C od soka D (Tabela 8). Postoje podaci da ova klasa polifenola ima stimulatorni efekat na enzime koji učestvuju u β oksidaciji, dovodeći do povećane lipolize, što dalje rezultira redukcijom u deponovanju masnog tkiva [184]. Osim toga, polifenoli poreklom iz različitih izvora mogu inhibirati apsorpciju lipida i skroba, uticati na aktivaciju AMP kinaze, enzima koji smanjuje lipolizu i aktivira lipogenezu, kao i dovesti do inhibicije diferencijacije adipocita, te na taj način uticati na prevenciju gojaznosti [185,186]. Pored toga, polifenoli putem inhibicije ekspresije SREBP-1c, transkripcionog faktora koji reguliše gene uključene u sintezu MK i metabolizam TG, dovode do redukcije *de novo* lipogeneze i učestvuju u regulaciji deponovanja masti i koncentracije lipida u krvi, dok se u isto vreme aktivira ekspresija PPAR α i stimuliše β oksidacija [187,188]. Pomenuti mehanizmi inhibicije lipogeneze i stimulacije lipolize, mogu biti jedno od objašnjenja rezultata dobijenih kod životinja na suplementaciji.

Osim smanjenja ukupnog procenta masnog tkiva, konzumacija oba soka dovela je do redukcije veličine adipocita u poređenju sa HFF grupom i ta promena je zabeležena za oba soka (Slika 12). Budući da je visceralna gojaznost jedan od kriterijuma za dijagnostikovanje MetS, dobijeni rezultati sugerišu da konzumiranje soka CR možda može biti korisno osobama sa nezdravim navikama u ishrani kako bi se sprečio razvoj MetS. Ipak, za potvrdu ove hipoteze neophodne su studije na humanom modelu.

Već je pomenuto da je dislipidemija još jedan od simptoma MetS, do kog dolazi usled dugotrajnog konzumiranja hrane sa visokim sadržajem masti i šećera [189]. Karakteriše je lipidni disbalans, odnosno porast koncentracije ukupnog holesterola, TG i LDL-C i snižena koncentracija HDL-C u krvi [190]. U našoj studiji, dugotrajna HFF ishrana indukovala je smanjenje nivoa HDL-C, koje nije moglo biti sprečeno suplementacijom odabranim sokovima (Tabela 9). Ovde treba napomenuti da postoji značajna razlika u zastupljenosti hilomikronskih frakcija kod pacova i kod ljudi. Naime, dok je kod pacova HDL-C dominantna frakcija, kod ljudi on čini samo jednu četvrtinu ukupnog holesterola [191]. Stoga, bez obzira na приметно nižu koncentraciju HDL-C, može se očekivati da je njegova fiziološka uloga kod životinja suplementiranih sokom CR i D i dalje očuvana. Iz istog razloga, teško je rezultate efekta sokova na holesterol ekstrapolirati sa animalnog modela na humanu populaciju.

Kao što je ranije naglašeno, veliki broj studija dovodi u vezu HFHF ishranu sa povišenim nivoom glukoze u krvi i razvojem insulinske rezistencije [192–194]. Iako u ovoj studiji nisu uočene značajne razlike u koncentraciji glukoze u krvi natašte, kao ni u koncentraciji insulina između eksperimentalnih grupa, ustanovljeno je da dolazi do značajne razlike u porastu koncentracije glukoze u krvi tokom IPGT testa. Primećena intolerancija na glukozu najverovatnije je posledica povećanog deponovanja VMT kod životinja hranjenih HFF peletom. Jedan od načina delovanja masnog tkiva na razvoj insulinske rezistencije je stimulacija lučenja i nagomilavanje adipokina, što utiče na insulinsku osetljivost tkiva poput jetre i mišića. Iako merenje adipokina nije obuhvaćeno ovom studijom, radi se o mehanizmu koji može biti prisutan i kod naših HFF hranjenih životinja [195]. Takođe, s povećanjem gojaznosti dolazi do hipoksije, hipertrofije i nekroze adipocita, što predstavlja signal za migraciju makrofaga iz krvi u masno tkivo, nakon čega dolazi do oslobađanja inflamatornih citokina i dodatnog snižavanja osetljivosti na insulin [196]. U svakom slučaju, kod pacova suplementiranih sokom CR porast nivoa glukoze tokom IPGT testa je bio manji u poređenju sa HFF grupom (Slika 10), što možemo smatrati još jednim povoljnim efektom prisutnih polifenola. Postoji više mehanizama delovanja polifenola na regulaciju koncentracije glukoze u krvi, uključujući uticaj na GLUT4 receptore, funkciju β ćelija, lučenje insulina, kao i inhibiciju glukoneogeneze u jetri preko AMPK signalnog puta [197,198].

Pored prethodno pomenutih efekata na telesni sastav, lipidni profil i osetljivost na insulin, HFF ishrana primenjena u našoj studiji imala je još jedan zdravstveno nepovoljan efekat u smislu

razvoja hipertenzije kod HFF tretiranih životinja. Istovremeno, suplementacija odabranim sokovima nije uspela da spreči porast krvnog pritiska, tako da je hipertenzija registrovana i kod CR i D grupa (Tabela 10). Iako neka jedinjenja iz soka, poput vinske, malinske, galne, protokatehuinske kiseline i epigalokatehina imaju dokazano antihipertenzivno dejstvo [199–201], moguće je da njihova koncentracija u korišćenim komercijalnim sokovima nije bila dovoljna da dovede do takvog učinka, pa stoga kod grupa koje su uz HFF ishranu konzumirale i neki od sokova, nisu zabeležene vrednosti krvnog pritiska značajno niže u odnosu na grupu koja je konzumirala samo HFF pelet. U prilog tome govori i nešto niža vrednost krvog pritiska u grupama koje su konzumirale sokove u odnosu na HFF grupu.

U ovoj studiji ispitivali smo i uticaj HFF ishrane i suplementacije sokovima na nastanak histopatoloških promena u tri tkiva posebno osetljiva na razvoj MetS, masnom tkivu, jetri i pankreasu. O porastu količine masnog tkiva i promenama na adipocitima bilo je govora u prethodnim poglavljima, tako da ćemo se u nastavku osvrnuti na efekte u jetri i pankreasu. Što se uticaja na jetru tiče, kod grupe na HFF ishrani nađena je akumulacija masti i steatoza jetre, zapažena su oštećenja hepatocita, došlo je do aktivacije Kupffer-ovih ćelija i lobularne inflamacije (Slika 11), što su sve promene koje vode ka razvoju NAFLD (engl. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*). Konzumacija oba soka dovela je do prevencije oštećenja hepatocita i akumulacije lipidnih kapi, ukazujući na potencijalno zaštitni efekat od razvoja NAFLD. Ova saznanja su u skladu sa pređašnjim studijama koje su takođe pokazale da ishrana bogata polifenolima, kao i suplementacija proizvodima na njihovoj bazi, može dovesti do prevencije razvoja NAFLD [202,203]. Steatoza jetre obično je povezana sa inflamacijom, praćenom infiltracijom makrofaga poreklom iz monocita i aktivacijom rezidentnih Kupffer-ovih ćelija, kao i povećanjem nivoa pro-inflamatornih i sniženjem anti-inflamatornih citokina [204]. Ishrana sa visokim sadržajem šećera i/ili masti osim što može dovesti do razvoja steatoze, često dovodi do intrahepatične inflamacije i hepatocelularnih oštećenja [205]. Jedan od mogućih načina na koji polifenoli štite od razvoja NAFLD je inhibicija inflamacije i smanjenje sistemskog oksidativnog stresa kojima je organizam izložen kod nezdravih navika u ishrani [206,207].

Histopatološke promene nastale u jetri kao posledica HFF ishrane bile su praćene porastom inflamacije. U poređenju sa kontrolnom grupom, u jetri pacova na HFF ishrani nađena je značajno viša ekspresija iRNK za pro-inflamatorni citokin IL-6 (Slika 16). IL-6 signalizacija može biti jedan od ključnih faktora za indukovanje akutno faznog odgovora i odbrane od infekcija. Sa druge strane, česta aktivacija signalnog puta IL-6 može imati štetno dejstvo i dovesti do razvoja tumora, dok kod hronične inflamacije selektivna inhibicija IL-6 signalnih puteva može preventivno uticati na razvoj različitih patogeneza jetre [208]. U našoj studiji, povišena ekspresija IL-6 može biti posledica adaptacije jetre na hepatocelularna oštećenja koja indukuje HFF. Povišene koncentracije IL-6 zabeležene su i u drugim studijama kao jedan od kompenzacijskih mehanizama odbrane koji sprečava pojavu steatoze jetre u ranim fazama NAFLD [209]. Sa druge strane, trajna aktivacija IL-6 u jetri dovodi do regulacije supresora citokinskih signala 3 (SOCS3), što pak ometa insulinom posredovan signalni put u jetri i smanjuje kako perifernu tako i sistemsku osetljivost na insulin [210]. U ovoj studiji, sok CR je smanjio ekspresiju iRNK za IL-6 i poboljšao glukoznu regulaciju, čime je pokazao anti-inflamatorni efekat na jetru i potencijal za prevenciju steatoze i glukozne intolerancije indukovane HFF ishranom. Ekspresija iRNK za IL-6 kod D grupe je takođe bila manja nego kod HFF grupe, međutim ova razlika nije dosegla nivo statističke značajnosti. U slučaju druga dva pro-inflamatorna citokina, TNF- α i IL-1 β , ispitivana u našoj studiji, ni kod jedne grupe nije zabeležena razlika u genskoj ekspresiji, odnosno nivu iRNK za TNF- α i IL-1 β u poređenju sa kontrolnom grupom.

Sokovi su imali benefitno dejstvo i na ćelije pankreasa. Poznato je da polifenoli imaju citoprotektivni efekat na β -ćelije pankreasa aktiviranjem anti-apoptotskih i inhibiranjem pro-apoptotskih signalnih puteva, kao i povećanjem otpornosti ćelija na oksidativna oštećenja [211]. Naše

istraživanje pokazalo je da su oba soka bogata polifenolima, CR i D, imala pozitivan uticaj na sprečavanje histopatoloških promena i gubitka β -ćelija pankreasa tokom razvoja MetS kod pacova. Suplementacija sokovima je u određenoj meri sprečila porast sekrecije glukagona i ublažila negativne efekte HFF ishrane. Takođe, kod grupa koje su bile na suplementaciji nije došlo do značajnog smanjenja sekrecije insulina, što je zabeleženo kod HFF grupe. (Slika 14 i Slika 15). Kontrola sekrecije glukagona je pozitivan efekat budući da je to hormon koji proizvode α -ćelije pankreasa i koji je direktno odgovoran za povećanje koncentracije glukoze u krvi [212], dok je njegova povećana proizvodnja najčešće posledica disfunkcije α -ćelija karakteristične za dijabetes [213].

Važan pokazatelj zdravlja i opšteg stanja organizma su i masnokiselinski profili u različitim tkiva, koji su prvenstveno zavisni od količine i vrste masnih kiselina prisutnih u konzumiranoj hrani. U našoj studiji određivali smo profil masnih kiselina u plazmi, masnom tkivu i jetri. Optimalni odnos n-6 i n-3 PUFA u ishrani je između 1:1 i 4:1, međutim kod populacije čija se ishrana zasniva na “zapadnjačkom” obrascu taj odnos je 15:1 do 20:1, dok je kod USA populacije on čak 25:1 u korist n-6. Pomeranje ovog odnosa u pravcu n-6 dovodi do povećanja faktora rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti, različitih tipova kancera, inflamatornih i autoimunskih oboljenja [55]. Takođe je uporednom analizom masnokiselinskog profila u plazmi osoba sa MetS i zdravih individua ustanovljeno da postoje značajne razlike u odnosima pojedinih masnih kiselina između ove dve grupe ljudi [38]. U ovoj studiji modifikovana ishrana je sadržala značajan udeo suncokretovog ulja, koje se sastojalo od oko 63% 18:1n-9, 27% 18:2n-6 i 10% SFA [214]. Upotreba ovog ulja pomerila je n-6/n-3 odnos u plazmi sa 12:1, koliko je zabeleženo kod kontrolne grupe, na preko 40:1, zabeleženo kod grupa koje su bile na HFF peletu. Suplementacija sokovima nije značajno uticala na smanjenje ovog odnosa.

U plazmi je zabeleženo smanjenje ukupnih SFA izazvano prvenstveno smanjenjem koncentracije 16:0, i višim nivoom ukupnih MUFA i ukupnih n-6 kod sve tri grupe na HFF u poređenju sa kontrolom (Tabela 15). Takođe, sve tri grupe na HFF peletu, bez obzira na suplementaciju, imale su viši nivo 18:1n-9, 18:2n-6, i nižu koncentraciju 18:1n-7, kao i svih pojedinačnih n-3 masnih kiselina. Takav rezultat se mogao očekivati, s obzirom na prisustvo suncokretovog ulja u HFF hrani i visoku zastupljenost n-6 u njegovom sastavu. Kada su u pitanju n-7 i n-9 masne kiseline, treba naglasiti da se njihova sinteza odvija aktivnošću iste grupe enzima, tako da je zbog visokog procenta 18:1n-9 unete iz ulja, došlo do potiskivanja sinteze n-7 i njene zastupljenosti u plazmi, uz istovremeni porast n-9. Koncentracija 20:3n-6 je bila znatno povišena u HFF grupi u odnosu na kontrolnu, međutim u slučaju ove masne kiseline suplementacija sokovima je imala preventivni efekat i sprečila je porast 20:3n-6 kod CR i D grupe. Zbog povišene koncentracije 20:3n-6 kod HFF grupe moglo se očekivati da će doći i do povišenog nivoa AA koja je njen direktni proizvod, međutim nivo AA je kod sve tri grupe koje su konzumirale HFF pelet bio niži u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama kod kojih je suplementacija LA dovela do povećanja 18:2n-6 koncentracije u plazmi, ali nije dovela do porasta AA u tkivima i krvi ili je čak dovela do njenog smanjenja [215–217]. AA je prekursor za sintezu brojnih eikozanoida, regulatora različitih fizioloških odgovora i patoloških procesa, posebno onih uključenih u regulaciju imunskog i inflamatornog odgovora [218]. Povišena sinteza pojedinih prostaglandina (posebne klase eikozanoida) stimuliše ekspresiju gena za IL-6 [219]. Dakle, uočeni porast koncentracije 20:3n-6 uz istovremeni pad koncentracije 20:4n-6, moguće je objasniti utroškom 20:4n-6 za sintezu prostaglandina, koji dalje pokreću inflamatorne procese i dovode do povišene ekspresije iRNK za IL-6, što je rezultat zabeležen u jetri i kod naše HFF grupe u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama. Inače, masnokiselinski profili u jetri naših životinja pokazivali su sličan trend promena kao oni u plazmi, s tim da je smanjenje nivoa 16:0 zabeležen samo u HFF grupi, dok je njena koncentracija kod CR i D grupa bila očuvana u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 16). Takođe, uočena je i promena u nivou 18:3n-6 koja je u sve tri grupe na HFF peletu bila niža nego kod kontrole. Ishrana se najviše odrazila na promene u masnokiselinskom profilu VMT, što je bilo očekivano, budući da je ovo tkivo glavno mesto deponovanja lipida u organizmu. Kada su u pitanju pojedinačne masne kiseline, u sve tri grupe na HFF peletu došlo je do smanjenja koncentracije deponovanih 16:0 i 18:0

zasićenih masnih kiselina i značajnog povećanja koncentracije 18:1n-9 i 18:2n-6 (Tabela 17). Istovremeno, u VMT je zabeleženo smanjenje nivoa svih ostalih dugolančanih n-6, kao i svih ispitivanih masnih kiselina klasa n-7 i n-3. Ove promene je takođe moguće objasniti sastavom suncokretovog ulja. Naime, isti enzimi su uključeni u biosintezu n-6 i n-3 klase MK [220], tako da su njihovi prekursori u direktnoj kompeticiji pa, budući da su n-6 bile znatno dostupnije iz ishrane, njihova biosinteza je bila favorizovana na uštrb biosinteze n-3 masnih kiselina.

Pored zastupljenosti pojedinačnih masnih kiselina, značajan pokazatelj modulacije metabolizma lipida je i aktivnost specifičnih enzima koji učestvuju u njihovoj biosintezi: $\Delta 9$ desaturaze koja prevodi 18:0 u 18:1n-9, $\Delta 6$ desaturaza koja prevodi 18:2n-6 u 18:3n-6 i $\Delta 5$ koja prevodi 20:3n-6 u 20:4n-6 masnu kiselinu [221]. Literaturni podaci pokazuju da je kod osoba sa dijagnostikovanim MetS nađena viša procenjena aktivnost $\Delta 6$ i $\Delta 9$ desaturaza i elongaze, dok je aktivnost $\Delta 5$ desaturaze bila niža u odnosu na onu kod uslovno zdravih osoba. [222]. Rezultati dobijeni u našoj studiji u skladu su sa pređašnjim saznanjima, budući da smo u sva tri tkiva kod svih HFF grupa detektovali značajno viši nivo 18:1n-9 i višu procenjenu $\Delta 9$ aktivnost u poređenju sa kontrolnom. S druge strane, aktivnost $\Delta 5$ desaturaze bila je niža samo kod HFF grupe bez suplementacije u odnosu na kontrolu, što je rezultat koji se dovodi u vezu sa razvijenom insulinskom rezistencijom [223]. Suplementacija sokom CR i D uticala je na održanje $\Delta 5$ aktivnosti u plazmi i jetri, pa je ona bila statistički značajno viša u suplementiranim grupama u poređenju sa HFF grupom, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima gde je suplementacija polifenolima takođe očuvala aktivnost $\Delta 5$ desaturaze [224]. Za razliku od plazme i jetre, u VMT nije bilo razlika u aktivnosti $\Delta 5$ između grupa na HFF sa i bez suplementacije, dok su aktivnosti ostalih desaturaza i elongaza pratile trend ustanovljen u prethodno pomenutim tkivima.

Studija je obuhvatila i ispitivanje razlike u oksidativnom odgovoru plazme, jetre i VMT. Izmerene vrednosti su pokazale da HFF ishrana dovodi do oksidativnog stresa prvenstveno u jetri, gde je nađeno povećanje nivoa TOS zajedno sa sniženim nivoima TAS i OSI. Međutim, antioksidativni enzimi, kao što su SOD i PON1 su u jetri takođe bili viši, što je barem u nekoj meri uticalo na pro/antioksidativni balans. U plazmi i masnom tkivu ukupan uticaj HFF ishrane na oksidativne parametre nije bio značajan.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da VMT ima najdelotvorniji mehanizam zaštite od oksidativnog stresa (Tabela 13), dok su sa druge strane najveće promene oksidativnih parametara zabeležene u jetri. U skladu sa tim, desetonedeljno konzumiranje HFF peleta dovelo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti PON1 samo u jetri (Tabela 12). PON1 je antioksidativni enzim koji ima značajan uticaj na HDL-C, jer sprečava njegovu oksidaciju i time omogućava njegovu dalju nesmetanu funkciju [225]. Takođe, od oksidacije štiti i membranske lipide i LDL-C, tako da njegova zaštitna uloga rezultira smanjenjem nivoa lipidnih peroksida [226]. Pretpostavlja se da oksidativna oštećenja lipoproteina, posebno HDL-C, dovode do smanjenja aktivnosti PON1, a budući da je jedna od karakteristika MetS snižena koncentracija HDL, smanjena aktivnost PON1 može se dovesti u vezu sa smanjenjem koncentracije HDL [227]. Štaviše, kako su pojedine studije zabeležile redukovanu aktivnost ovog enzima kod dece i adolescenata sa dijagnostikovanim MetS, PON1 se može smatrati novim nezavisnim markerom MetS [228]. Ovaj enzim je zastupljen u velikom broju tkiva, poput jetre, mozga, pluća, srca, bubrega, tankog creva, aorte i drugih [229–231], a njegovu aktivnost mogu da regulišu različiti nutritivni i farmakološki modulatori. Aktivnost ovog enzima takođe može biti uslovljena genetskim polimorfizmima i redoks homeostazom [232]. Zasićene, mononezasićene, i u nekim slučajevima, polinezasićene masne kiseline mogu povećati aktivnost PON1 [233]. Sa druge strane, ima studija koje govore da unos PUFA nema uticaj na aktivnost PON1 [234] ili čak da dovodi do njenog smanjenja [233]. Dodatno, aktivnost PON1 je zavisna i od koncentracije intracelularnog ROS, jer njegovo nakupljanje u ćeliji dovodi do povećanja oksidativnog stresa, zbog čega aktivnost PON kao dela antioksidativnog odgovora u cilju održanja ćelijske homeostaze raste. U skladu s tim, porast aktivnosti PON1 zapažen u našoj studiji verovatno je indukovano nezasićenim masnim

kiselinama iz suncokretovog ulja u HFF peletu, kao i povećanom proizvodnjom ROS koju izaziva ishrana. Aktivacija ovog enzima rezultirala je ujedno i održavanjem nivoa markera kasne faze oksidativnog oštećenja, MDA [235,236]. MDA je toksičan proizvod koji nastaje iz aldehida tokom lipidne peroksidacije u jetri, a njegova povišena koncentracija često se javlja kod osoba sa MetS [237]. Što se tiče CR i D grupa, kod njih je zabeležen znatno veći porast aktivnosti PON1 u poređenju sa HFF grupom, što se može pripisati suplementaciji polifenolima i sposobnosti pojedinih klasa polifenola da povećaju i aktivnost i samu ekspresiju ovog enzima [235,236].

Aktivnost SOD, jednog od najmoćnijih enzimskih antioksidanasa u ćelijama, obično je smanjena u MetS. Kao posledica toga, $O_2^{\cdot-}$ se akumulira u mitohondrijskom intermembranskom prostoru, inhibira proizvodnju ATP i smanjuje sekreciju insulina, što dovodi do insulinske rezistencije i akumuliranja visceralnog masnog tkiva [238]. Međutim, u našoj studiji, HFF ishrana je značajno povećala aktivnost SOD u jetri, što je u skladu sa pređašnjim literaturnim podacima, gde je HFF ishrana takođe dovela do povećanja proizvodnje intracelularnog ROS i do povećanja enzimske antioksidativne zaštite [239]. Shodno tome, povišena aktivnost SOD verovatno dovodi do suzbijanja produkcije ROS, što se naročito odnosi na proizvodnju $O_2^{\cdot-}$, zbog čega je njegova vrednost u jetri ostala nepromenjena.

U jetri HFF grupe je dijagnostikovano i visok nivo TOS, što odražava povećane ukupne pro-oksidente i niže nivoe TAS, parametra koji predstavlja nekoliko biomolekula sa redukujućim antioksidativnim kapacitetom. Dugoročna HFF ishrana je imala za posledicu promenu oksidativnog statusa koja je dovela do smanjenja ukupnog antioksidativnog indeksa (AOI), izračunatog kao odnos TAS/TOS u jetri. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima koje su predstavili Selvi i saradnici, koji su takođe ustanovili značajan porast koncentracije TOS i smanjenje TAS u jetri pacova na ishrani koja je sadržala visoki udeo masnoća i fruktoze [240]. Suprotno rezultatima naše studije, oni su zabeležili i povećan nivo MDA u jetri. Prekomerna proizvodnja slobodnih radikala u ćelijama dovodi do aktivacije ne samo antioksidativnih enzima, već i endogenih enzimskih i neenzimskih antioksidativnih sistema, koji štite ćelije od oksidativnog stresa [241]. U skladu s tim, dijagnostikovano povećan nivo TAS u visceralnom masnom tkivu može se smatrati indukovanim kompenzacijskim mehanizmom za neutralizaciju ROS.

U ovoj studiji su izračunati i oksidacioni skorovi (OS), koji predstavljaju razliku između ukupnih pro-oksidativnih i anti-oksidativnih skorova (Slike 17, 18 i 19). Prema našim rezultatima, HFF ishrana dovela je do značajnog smanjenja OS u jetri u poređenju sa kontrolnom grupom, uprkos povećanju TOS i smanjenju TAS (Slika 18). Mogući razlog može biti povećana aktivnost drugih antioksidativnih enzima u jetri (koji nisu proučavani u ovoj studiji) kao način zaštite od pro-oksidanasa, čiji nastanak podstiče način ishrane primenjen u ovoj studiji i povećano deponovanje masti.

Iako su promene u parametrima oksidativnog stresa indukovane HFF ishranom bile male, ispitali smo PAB kao potencijalno bolji pokazatelj prirodne ravnoteže između pro-oksidanasa i antioksidanasa. Aktivnost PAB u plazmi je bila smanjena kod HFF grupe u poređenju sa ostalim grupama (Tabela 11), dok je u jetri i VMT ostala nepromenjena. Zabeležena niža aktivnost PAB verovatno je rezultat veće količine mokraćne kiseline koja nastaje kao proizvod metabolizma fruktoze [242]. Iako je smanjenje PAB generalno korisno, HFF indukovano smanjenje PAB u ovoj studiji je najverovatnije posledica povećane koncentracije mokraćne kiseline i može biti štetno u nekim stanjima, jer sama mokraćna kiselina doprinosi nastanku slobodnih radikala i može izazvati citosolski i mitohondrijski oksidativni stres, a njena povišena koncentracija u plazmi jedan je od faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti [243,244].

Ustanovljena je i pozitivna korelacija između SOD i PON1 što ukazuje na pozitivnu vezu između HFF ishrane i sistema antioksidativne zaštite jetre. Ova veza je ranije zabeležena u drugim

tkivima [245]. Osim toga, pozitivna korelacija između SOD i TOS pokazala je da visok nivo prooksidativnih parametara dovodi do povećane aktivnosti antioksidativnih enzima, dok negativna korelacija između SOD i odnosa TAS/TOS ukazuje na to da visok nivo AOI smanjuje potrebu za povećanom aktivnošću antioksidativnih enzima. Takođe postoji pozitivna korelaciju nivoa TAS sa nivoom MDA u masnom tkivu, što ukazuje na to da nivo lipidne peroksidacije u adipocitima raste sa ukupnim antioksidativnim statusom. Ovo može biti u vezi sa kompenzacijskim povećanjem nivoa reduktanata, gde se jedno jedinjenje oksiduje dok se drugo istovremeno redukuje, pri čemu se ukupna promena do koje je došlo meri kao TAS. Negativna korelacija plazma PAB i procenta masti ukazala je na blisku vezu između prooksidativno–antioksidativnog balansa i prekomerne telesne mase i gojaznosti. Moguće je da se radi o posledici brze razgradnje H_2O_2 do hidroksilnih radikala i reaktivnih slobodnih radikala, što se odražava u smanjenju aktivnosti PAB. Istovremeno, iako sama njihova koncentracija nije merena, primećeno je da hidroksilni radikali dovode do oksidacije lipida u masnom tkivu.

Poznato je da polifenoli iz sokova igraju ključnu ulogu kod uklanjanja slobodnih radikala čime dovode do prevencije oksidativnih oštećenja lipida i proteina. Ovo istraživanje je pokazalo da redovno konzumiranje matičnih sokova CR i D dovodi do prevencije porasta oksidativnog stresa u različitim tkivima ublažavajući negativne efekte HFF ishrane. Konzumiranje sokova uporedo sa HFF ishranom dovodi do daljeg povećanja aktivnosti PON1 u jetri i time je štiti od oksidativnih oštećenja. Studija u kojoj su pacovima na HFF ishrani davani sušeni plodovi drenjine takođe je ustanovila porast aktivnosti PON1 u plazmi i mozgu [246]. Trend porasta PON1 aktivnosti zabeležen je i kod konzumiranja svežeg soka nara, takođe izrazito bogatog polifenolima [247]. Nasuprot tome, u našem istraživanju konzumacija oba soka dovela je do smanjenja aktivnosti PON1 u masnom tkivu. Dobijeni rezultati sugerišu da na sistem oksidativne zaštite utiče ne samo vrsta sokova, već i trajanje studija i izbor animalnog modela.

Iako je HFF ishrana indukovala povećanje aktivnost SOD u jetri, konzumacija ni jednog od naša dva soka nije dovela do njene značajne redukcije. Sa druge strane, suplementacija sokovima dovela je do smanjenja koncentracije $O_2^{\cdot-}$ u jetri kod CR grupe u poređenju sa kontrolom i HFF grupom i smanjene koncentracije u plazmi kod D grupe u poređenju sa HFF i CR grupom. Važno je napomenuti da u biološkim sistemima, polifenoli deluju na različite načine. Oni mogu prekinuti proces lipidne peroksidacije, ukloniti H_2O_2 tako što će ga prevesti u H_2O , smanjiti proizvodnju superoksidnih anjona i modulirati aktivnosti enzima, uključujući enzime antioksidativne odbrane [129]. Smanjenje koncentracije $O_2^{\cdot-}$ u jetri bez promena aktivnosti SOD ukazuje na snažni antioksidativni potencijal oba soka, koji je nešto izraženiji kod CR, i njihovu sposobnost da uklone $O_2^{\cdot-}$. Ipak, i ako je SOD imao značajnu ulogu u sva tri MLR modela (plazme, jetre i VMT), kao potencijalni pokazatelj oksidativnog stresa merenjem aktivnosti samog enzima, imao je statistički značaj samo kod jetre. To ne bi trebalo da iznenađuje jer je ovo pretežno ćelijski enzim, čija je aktivnost najčešće povezana sa ćelijama, te stoga nema izraženo ekstracelularno dejstvo, zbog čega nisu očekivane značajne promene njegove aktivnosti u plazmi. Ako govorimo o VMT, aktivnosti SOD nisu se razlikovale kod životinja sa većim sadržajem visceralnog masnog tkiva u poređenju sa onima sa manjim sadržajem ovog tkiva (uzimajući 75. percentila VMT kao vrednost preseka). Međutim, ovaj parametar se u MLR pokazao kao najbolji prediktor za predviđanje procenta VMT na kraju studije, objašnjavajući 57% varijabilnosti u odnosu na procenat VMT (Tabela 14). Ovo govori u prilog povećanja antioksidativne zaštite sa porastom oksidativnog stresa u VMT. Najvažniji parametri osim SOD, koji preko MLR objašnjavaju odnos između oksidativnog stresa i razvoja metaboličkog sindroma, procenjeni kroz povećanje visceralne gojaznosti, su još AOPP, TOS i TAS. Sva četiri parametra statusa oksidacije pokazala su se značajna u modelu kojim se može predvideti povećanje VMT. Promene parametara masnog tkiva povećane su sa povećanjem procenta VMT (za AOPP i TOS) i nisu promenjene za TAS, što implicira značajno niži odnos TAS/TOS u masnom tkivu životinja sa najvećom količinom VMT, većom od 75. postotka za celu grupu. To nas dovodi do zaključka da su oksidativni procesi sa najvećom aktivnošću prisutni u masnom tkivu, naročito u onim

delovima gde dominira najveći procenat VMT, i da disbalans redoks sistema ima ulogu u nagomilavanju visceralne masti, verovatno podstičući oksidaciju polinezasićenih veza.

Konзумiranje soka CR zajedno s HFF dijetom nije uticalo na nivoe TAS i TOS u jetri, dok je kod grupe na D suplementaciji TAS bio znatno niži u poređenju sa HFF grupom. Ovo je suprotno od rezultata studije sa ekstraktom lista drenjine, u kojoj je ustanovljeno da suplementacija zdravih pacova utiče na povećanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta jetre, bez promena u aktivnosti antioksidativnih enzima i lipidnoj peroksidaciji [248]. Sa druge strane, sok od CR u kombinaciji s HFF dijetom smanjio je visok nivo TAS u masnom tkivu izazvan HFF peletom, dok su oba soka dovela do značajnog smanjenja nivoa TOS u masnom tkivu. Pomenuti efekti su ukazali na jak antioksidativni potencijal ispitivanih sokova, kao i da različita tkiva mogu imati različit odgovor na suplementaciju antioksidansima.

Iako HFF ishrana nije povećala nivo MDA u ispitivanim tkivima, konzumacija soka zajedno s HFF peletom dovela je do promena u ovom parametru. Sok od CR doveo je do značajnog smanjenja nivoa MDA u visceralnom masnom tkivu u poređenju sa HFF grupom, dok je sok od D pokazao smanjenje samo u jetri u poređenju s obe HFF i kontrolnom grupom. Smanjenje TOS, koji predstavlja koncentraciju H_2O_2 i hidroperoksida, i smanjenje nivoa MDA (kao krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije), ukazuje na potencijal sokova CR i D za uklanjanje ili neutralizaciju lipidnih peroksida (LOO). Ovi rezultati su u skladu s prethodnim studijama koje su pokazale da upotreba ekstrakta CR doprinosi eliminaciji prekomerne koncentracije ROS [249] i pruža zaštitu od indukovane lipidne peroksidacije u bubrezima pacova tretiranih ugljenik tetrahloridom [250]. Takođe, došlo je do povećanja nivoa MDA u plazmi D grupe u poređenju s HFF i CR grupom. Analiza sokova u našoj studiji pokazala je visoku zastupljenost TF3C u ukupnoj koncentraciji izmerenih polifenola. TF3C pokazuje izuzetne sposobnosti u uklanjanju ROS, uključujući LOO i $O_2^{\cdot-}$. Budući da je sadržaj TF3C u CR 5,5 puta veći nego u D soku može se zaključiti da ovaj sok ima znatno veći antioksidativni potencijal, a samim tim i izraženiju zaštitnu ulogu u lipidnoj peroksidaciji, što je dodatno potvrđeno analizama u masnom tkivu i plazmi.

Povišene koncentracije ROS i RNS u tkivima dovode do post-transkripcionih oksidativnih modifikacija proteina. Neke od ovih promena su ireverzibilne i uzrokuju gubitak aktivnosti i funkcije proteina, što može uticati na ćelijski transport i redoks signalizaciju. AOPP, kao mera visoko oksidativnog oštećenja proteina u plazmi, krajnji je proizvod reakcije između albumina i hipohloraste kiseline. Formiranje AOPP može dovesti do oštećenja tkiva i u bliskoj je vezi sa endotelnom disfunkcijom i razvojem ateroskleroze. Povećanje nivoa ovog parametra već je zabeleženo kod pacijenata sa visokim faktorom rizika za razvoj MetS [251,252]. Konzumacija oba soka imala je zaštitni efekat na proteine plazme, pa i sam albumin, budući da je nivo AOPP kod ove dve grupe bio niži nego kod kontrole. Nasuprot tome, kod CR grupe nivo AOPP u jetri bio je značajno viši u poređenju sa ostale tri grupe. Razlog zašto sok CR ima različite efekte na koncentracije ovog parametra u plazmi i jetri nije jasan, ali se može pretpostaviti da na nivo AOPP u jetri utiču dodatni egzogeni i endogeni faktori, koji mogu izazvati oštećenje jetre i dovode do njegove dodatne produkcije [253]. S druge strane, koncentracija ukupnih -SH grupa (drugi marker za procenu oksidacije proteina) bila je niža u plazmi i masnom tkivu kod grupa na suplementaciji sokom u poređenju sa HFF grupom, međutim ove razlike nisu bile statistički značajne.

Albuminov N kraj je takođe podložan biohemijskim modifikacijama i degradacijama izazvanim hidroksilnim radikalima, što može dovesti do formiranja IMA. Povišena IMA je zabeležena kod različitih tipova bolesti povezanih s ishemijskim stresom [254]. Primenjena HFF ishrana nije izazvala promene u nivou IMA. Promene nisu zabeležene ni kod CR grupe, ali je sok od D doveo do smanjenja nivoa IMA u masnom tkivu. Postoje dokazi da galna kiselina, koja se nalazi u soku D (u našoj studiji, sok od drenjine sadržao je više od osam puta veću količinu ove kiseline nego sok od CR) najefikasnije eliminiše peroksilne radikale identifikovane u

lipidnim medijima [255], što bi moglo objasniti zašto je konzumacija soka D dovela do smanjenja IMA u masnom tkivu.

Treba uzeti u obzir da je kod MetS funkcija masnog tkiva izmenjena. Pored primarne funkcije energetskog depoa, ono postaje aktivan endokrini organ. Stoga je ovde neophodno spomenuti i ulogu adipokina, hormona koje u fiziološkim uslovima luči masno tkivo, ali čija se sekrecija menja tokom patologija izazvanih oksidativnim stresom. Povećano lučenje leptina, koje je ujedno jedan od markera MetS [256], indukuje stvaranje ROS, poput H_2O_2 i hidroksil radikala, što dovodi do smanjenja aktivnosti PON1 i povećava koncentraciju MDA i peroksida u plazmi [257,258]. Slično tome, visfatin, čije je lučenje takođe povišeno kod individua sa dijagnostikovanim MetS, ima prooksidativni efekat, indukujući proizvodnju $O_2^{\cdot-}$ i povećavajući aktivnost SOD i katalaze [259]. Adiponektin, s druge strane, povećava produkciju NO i inhibira oslobađanje ROS, međutim, njegova sekrecija je kod MetS inhibirana [260]. Suplementacija polifenolima pospešuje ekspresiju adipokina (povećavajući koncentraciju adiponektina u plazmi), povećava osetljivost ciljnog tkiva na leptin i smanjuje sekreciju visfatina [132,133]. Stoga bi jedan od vidova pozitivnog delovanja suplementacije sokovima CR i D na prevenciju MetS moglo biti i zadržavanje koncentracije adipokina u fiziološkom opsezu.

Kada govorimo o razvoju i prevenciji ishranom izazvanog MetS, ne treba zanemariti ulogu crevnog mikrobioma. Dijeta bogata mastima, između ostalog, menja mikrobiom u crevima i na taj način doprinosi razvoju MetS, dok unos polifenola može imati zaštitno dejstvo i doprineti očuvanju zdravog profila crevnog mikrobioma, utičući tako na prevenciju metaboličkih poremećaja [64]. Iako istraživanja na temu mikrobioma nisu obuhvaćena ovom tezom, ranije studije su ustanovile da ishrana bogata vlaknima, u kombinaciji sa sokovima koji sadrže dosta polifenola pokazuje potencijal za prevenciju razvoja MetS kod ljudi [65].

U našoj studiji, životinje su unosile oko 20 mg polifenola po kg telesne mase dnevno, što se, u nekim pređašnjim studijama takođe pokazalo kao doza sa korisnim zdravstvenim efektima [261,262]. Za ispitivane sokove, ekvivalent primenjen na ljudsku upotrebu bila bi količina od 200-250 ml, odnosno jedna bočica dnevno. Prema podacima iz 2019. godine Instituta za javno zdravlje Srbije, 9,3% građana svakodnevno konzumira zaslađena nealkoholna pića, dok voće redovno jede manje od 40% stanovništva. Upotreba sokova od CR i D, po karakteristikama sličnih ovima iz naše studije, obezbedila bi dnevni unos od 200-300 mg bioaktivnih polifenola i tako poboljšala ishranu osoba koje nemaju naviku da jedu voće, nisu sklone zdravoj ishrani ili nisu spremne da menjaju navike u ishrani, čime bi se moglo uticati i na smanjenje faktora rizika za razvoj MetS. Umerena konzumacija hladno ceđenih sokova (75–224 ml dnevno) kao način da se unapredi ishrana i doprinese unosu zdravstveno korisnih nutrijenata već je uvrštena u preporuke za ishranu mnogih zemalja [263,264]. Stoga je uvođenje ovih sokova u ishranu jedan od mogućih načina za poboljšanje navika u ishrani bez drastičnih promena u uobičajenom načinu života.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, rezultati dobijeni u ovoj tezi upućuju na sledeće zaključke:

- HFHF ishrana u maksimalnom trajanju od 16 nedelja nije dovoljna za razvoj MetS kod *Wistar* pacova. Za ispoljavanje većeg broja parametara MetS potrebno je prisustvo još nekog farmakološkog agensa, što je u našem slučaju bila holna kiselina
- *Hannover* podsoj se pokazao podložniji razvoju dislipidemije indukovane HFHF ishranom
- Životinje uzrasta četiri meseca pokazale su se podložnije razvoju metaboličkog sindroma pod uticajem ishrane, u odnosu na životinje starosti osam nedelja.

Svakodnevna konzumacija soka crne ribizle ili soka drenjine u trajanju od deset nedelja dovela je do:

- sniženja koncentracije ukupnog holesterola u krvi;
- očuvanja histomorfologije jetre, adipoznog tkiva i tkiva pankreasa;
- pospešivanja lučenja insulina i redukcije lučenja glukagona;
- održavanja nivoa 20:3n-6 u plazmi i jetri na nivou kontrole, dok je u HFF grupi došlo do povećanja njihove količine;
- održanja procenjene aktivnosti $\Delta 5$ desaturaze u plazmi i jetri na nivou kontrole, dok je u HFF grupi došlo do smanjenja desaturazne aktivnosti;
- prevencije narušavanja redoks balansa plazme i tkiva (smanjenje koncentracije $O_2^{\cdot-}$ u plazmi (D) i jetri (CR), smanjenja aktivnosti PON1 i smanjenja nivoa TOS u masnom tkivu i AOPP u plazmi (oba soka), povećanje aktivnosti PON1 u jetri (oba soka), s tim što je sok CR u tom smislu pokazao znatno veći potencijal.

Dodatno, svakodnevna konzumacija soka crne ribizle pokazala je efekat i na:

- smanjenje akumuliranja adipoznog tkiva u trbušnoj regiji (visceralnog masnog tkiva);
- poboljšanje tolerancije na glukozu;
- smanjenje genske ekspresije iRNK za IL-6 u jetri i time na smanjenje sistemske inflamacije.

* * *

Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju da bi dugotrajna konzumacija umerene količine (~ 250 ml/dan) matičnog soka crne ribizle i/ili drenjine mogla doprineti sprečavanju razvoja MetS i redukciji oksidativnog stresa kod osoba čija ishrana sadrži značajne količine masti i šećera. Na taj način ovi sokovi bi učestvovali u ublažavanju štetnih efekata široko rasprostranjene “zapadnjačke dijete” bogate rafinisanim ugljenim hidratima, zasićenim mastima i procesuiranom hranom. Važno je napomenuti da, konzumacija sokova bogatih polifenolima ne može biti zamena za pridržavanje zdravih navika u ishrani. Zdrava ishrana, poput mediteranske dijete ili ishrane bogate namirnicama biljnog porekla, i umerena fizička aktivnost i dalje su ključni faktori u prevenciji MetS.

LITERATURA

1. Ap, Y.; BN, G.; A, K.; GF, M. Risk Factors Associated with Metabolic Syndrome by Enriched Food in Pig Fat in the Wistar Rats. *J. Diabetes, Metab. Disord. Control.* **2018**, *5*, 216–220, doi:10.15406/jdmdc.2018.05.00169.
2. Elabbassi, W.N.; Haddad, H.A. The Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Saudi Med. J.* **2005**, *26*, 373–375.
3. Abou Ziki, M.D.; Mani, A. Metabolic syndrome: genetic insights into disease pathogenesis. *Curr. Opin Lipidol.* **2016**, *27*(2), 162–171. doi:10.1097/MOL.0000000000000276.
4. Haverinen, E.; Paalanen, L.; Palmieri, L.; Padron-monedero, A.; Noguier-zambrano, I. Comparison of Metabolic Syndrome Prevalence Using Four Different Definitions – a Population-Based Study in Finland. *Arch. Pub. Health.* **2021**, 1–9, doi: 10.1186/s13690-021-00749-3.
5. Huang, C.; Zhang, J.; Huang, J.; Li, H.; Wen, K.; Bao, J.; Wu, X. Proteomic and Functional Analysis of HDL Subclasses in Humans and Rats : A Proof - of - Concept Study. *Lipids Health Dis.* **2023**, 1–19, doi:10.1186/s12944-023-01829-9.
6. Hoveling, L.A.; Liefbroer, A.C.; Bültmann, U.; Smidt, N. Understanding Socioeconomic Differences in Metabolic Syndrome Remission among Adults : What Is the Mediating Role of Health Behaviors ? *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2021**, 1–10, doi:10.1186/s12966-021-01217-5.
7. Noubiap, J.J.; Nansseu, J.R.; Lontchi-Yimagou, E.; Nkeck, J. R.; Nyaga, U. F.; Ngouo, A. T.; Tounouga, D. N.; Tianyi, F. L.; Foka, A. J.; Ndoadoumgue, A. L.; Bigna, J. J. Geographic distribution of metabolic syndrome and its components in the general adult population: A meta-analysis of global data from 28 million individuals. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* **2022**, *188*, 109924, doi:10.1016/j.diabres.2022.109924.
8. Liang, X.; Or, B.; Tsoi, MF.; Cheung, C.L.; Cheung, B.M.Y. Prevalence of metabolic syndrome in the United States National Health and Nutrition Examination Survey 2011-18. *Postgrad. Med. J.* **2023**, *99*(1175), 985–992, doi:10.1093/postmj/qgad008.
9. Petrovic, V.; Tesanovis, G.; Stanivuk, L. Prevalence of Metabolic Syndrome and the Association with Sociodemographic Characteristics in Adult Population of Banja Luka. *Vojnosanit. Pregl.* **2018**, *75*(5), 447–452, doi:10.2298/VSP160716346P.
10. Đokić, B.; Đonović, N.; Tadić, B.; Nikolić, D. FACTORS AND ESTIMATION OF RISK FOR CARDIOVASCULAR DISEASES AMONG PATIENTS IN PRIMARY HEALTH CARE IN CENTRAL SERBIA. *Cent. Eur. J. Public Health* **2015**, *23*, 195–199, doi:10.21101/cejph.a4009.
11. Lone, S.; Lone, K.; Khan, S.; Pampori, R.A. Assessment of metabolic syndrome in Kashmiri population with type 2 diabetes employing the standard criteria's given by WHO, NCEPATP III and IDF. *J. Epidemiol. Glob. Health.* **2017**, *7*(4), 235–239, doi:10.1016/j.jegh.2017.07.00412.
12. Epidemiology, F.; Heart, N.; Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.; James, W.P.T.; et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome International Atherosclerosis Society ; and International Association for the Study of Obesity. *Circ.* **2009**, 1640–1645, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
13. Anderson, P.J.; Critchley, J.A.J.H.; Chan, J.C.N.; Cockram, C.S.; Lee, Z.S.K.; Thomas, G.N.; Tomlinson, B. Factor Analysis of the Metabolic Syndrome: Obesity vs Insulin Resistance as the Central Abnormality. *Int. J. Obes.* **2001**, *25*, 1782–1788, doi:10.1038/sj.ijo.0801837.
14. Carrier, A. Metabolic Syndrome and Oxidative Stress : A Complex Relationship. *Antioxid. Redox. Signal.* **2017**, *26*(9), 429–431. doi:10.1089/ars.2016.6929
15. Roberts, C.K.; Hevener, A.L.; Barnard, R.J. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. *Compr. Physiol.* **2013**, *3*, 1–58, doi:10.1002/cphy.c110062.

16. Kapogiannis, D.; Avgerinos, K.I. *Brain Glucose and Ketone Utilization in Brain Aging and Neurodegenerative Diseases*. Brain glucose and ketone utilization in brain aging and neurodegenerative diseases, 1st ed.; Elsevier Inc., 2020; Vol. 154, 81–101.
17. Krycer, J.R.; Yugi, K.; Hirayama, A.; Soga, T.; Kuroda, S.; James, D.E. Dynamic Metabolomics Reveals That Insulin Primes the Adipocyte for Glucose Metabolism Article Dynamic Metabolomics Reveals That Insulin Primes the Adipocyte for Glucose Metabolism. *CellReports* **2017**, *21*, 3536–3547, doi:10.1016/j.celrep.2017.11.085.
18. Fargion, S.; Dongiovanni, P.; Guzzo, A.; Bo, S.C.; Valenti, L.; Nzani, A.L.F. Iron and Insulin Resistance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2005**, *2*, 61–63. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02599.x.
19. Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin Signalling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. *Nature*. **2001**, *414*, 799–806, doi:10.1038/414799a.
20. Wali, J.A.; Jarzebska, N.; Raubenheimer, D.; Simpson, S.J.; Rodionov, R.N.; Sullivan, J.F.O. Cardio-Metabolic Effects of High-Fat Diets and Their Underlying Mechanisms — A Narrative Review. *Nutrients*. **2020**, *12*(5), 1505. doi:10.3390/nu12051505.
21. Clegg, D.J.; Gotoh, K.; Kemp, C.; Wortman, M.D.; Stephen, C.; Brown, L.M.; Alessio, D.D.; Tso, P.; Seeley, R.J.; Woods, C. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol. Behav.* **2011**, *103*(1), 10–16. doi:10.1016/j.physbeh.2011.01.010
22. Dornas, W.C.; de Lima, W.G.; Pedrosa, M.L.; Silva, M.E. Health implications of high-fructose intake and current research. *Adv. Nutr.* **2015**, *6*(6), 729–737, doi: 10.3945/an.114.008144. PMID: 26567197.
23. Richard, A.J.; White, U.; Elks, C.M.; Stephens, J.M. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., eds. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; April 4, **2020**.
24. Ghaben, A.L.; Scherer, P.E. Adipogenesis and Metabolic Health. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**. *20*, 242–258, doi:10.1038/s41580-018-0093-z.
25. Chait, A.; Hartigh, L.J. Den Adipose Tissue Distribution , Inflammation and Its Metabolic Consequences , Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **2020**, *7*, 1–41, doi:10.3389/fcvm.2020.00022.
26. Fasshauer, M.; Blu, M. Adipokines in Health and Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 461–470, doi:10.1016/j.tips.2015.04.014.
27. Luo, L.; Liu, M. Adipose Tissue in Control of Metabolism. *J. Endocrinol.* **2016**, *231*(3), 77–99, doi:10.1530/JOE-16-0211.
28. Abd-elreheem, M.T.; Soliman, A.S.; Rasheed, W.I.; Jawad, A.M.; Abd-elreheem, N.T. The Association between Resistin , Leptin and Adiponectin with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Med. J. Cairo Univ.* **2019**, *87*, 4227–4237, doi:10.21608/mjcu.2019.77411.
29. Ghadge, A.A.; Khaire, A.A.; Kuvalekar, A.A. Graphical Abstract SC. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2018**, *39*, 151–158, doi:10.1016/j.cytogfr.2018.01.004.
30. Lee, K.W.; Shin, D. Prospective Associations of Serum Adiponectin, Leptin, and Leptin-Adiponectin Ratio with Incidence of Metabolic Syndrome: The Korean Genome and Epidemiology Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2020**, *17*(9), 3287, doi:10.3390/ijerph17093287
31. Laclaustra, M.; Corella, D.; Ordovas, J.M. Metabolic Syndrome Pathophysiology : The Role of Adipose Tissue. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*(2), 125–139, doi:10.1016/j.numecd.2006.10.005.
32. Sears, B.; Perry, M. The Role of Fatty Acids in Insulin Resistance. *Lipids Health Dis.* **2015**, *1*–9, doi:10.1186/s12944-015-0123-1.
33. Wondmkun, Y.T. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **2020**, *13*, 3611–3616. doi:10.2147/DMSO.S275898.

34. Xin, Y.; Zhao, S. Elevated Free Fatty Acid Level Is Associated with Insulin-Resistant State in Nondiabetic Chinese People. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **2019**, *12*, 139–147. doi:10.2147/DMSO.S186505..
35. Chmurzynska, A.; Muzsik, A.; Jele, H.H. Institute of Human Nutrition and Dietetics , Poznań University of Life Sciences , 60 -624 Institute of Food Technology of Plant Origin , Poznań University of Life Sciences , 60 -634. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* **2020**, *159*, 102155, doi:10.1016/j.plefa.2020.102155.
36. Mayneris-Perxachs, J.; Guerendiain, M.; Castellote, A.I.; Estruch, R.; Covas, M.I.; Fitó, M.; Salas-Salvadó, J.; Martínez-González, M.A.; Aros, F.; Lamuela-Raventós, R.M.; et al. Plasma Fatty Acid Composition, Estimated Desaturase Activities, and Their Relation with the Metabolic Syndrome in a Population at High Risk of Cardiovascular Disease. *Clin. Nutr.* **2014**, *33*, 90–97, doi:10.1016/j.clnu.2013.03.001.
37. Kawashima, A.; Sugawara, S.; Okita, M.; Akahane, T.; Fukui, K.; Hashiuchi, M.; Kataoka, C.; Tsukamoto, I. Plasma Fatty Acid Composition, Estimated Desaturase Activities, and Intakes of Energy and Nutrient in Japanese Men with Abdominal Obesity or Metabolic Syndrome. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **2009**, *55*, 400–406, doi:10.3177/jnsv.55.400.
38. Lee, E.; Lee, S.; Park, Y. N -3 Polyunsaturated Fatty Acids and Trans Fatty Acids in Patients with the Metabolic Syndrome : A Case – Control Study in Korea. *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*(3), 609–614, doi:10.1017/S0007114508925435.
39. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed., W.H. Freeman, **2017**.
40. Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.S.; Stankova, B.; Zak, A. Fatty Acids as Biocompounds: Their Role in Human Metabolism, Health and Disease - a Review. Part 1: Classification, Dietary Sources and Biological Functions. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 117–130, doi:10.5507/bp.2011.038.
41. Saini, R.K.; Keum, Y.S. Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids: Dietary Sources, Metabolism, and Significance — A Review. *Life Sci.* **2018**, *203*, 255–267, doi:10.1016/j.lfs.2018.04.049.
42. Vucic, V. The Role of Dietary Polysaturated Fatty Acids. *Serb. J. Exp. Clin. Res.* **2013**, *14*, 93–99, doi:10.5937/SJECR14.
43. Brenna, J.T.; Salem, N.; Sinclair, A.J.; Cunnane, S.C. Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids a -Linolenic Acid Supplementation and Conversion to n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **2009**, *80*, 85–91, doi:10.1016/j.plefa.2009.01.004.
44. Harayama, T.; Shimizu, T. Roles of Polyunsaturated Fatty Acids, from Mediators to Membranes. *J. Lipid Res.* 2020, *61*(8), 1150–1160, doi:10.1194/jlr.R120000800.
45. Gaddi, A.; Cicero, A.F.G.; Pedro, E.J. Clinical Perspectives of Anti-Inflammatory Therapy in the Elderly: The Lipoxigenase (LOX)/ Cyclooxygenase (COX) Inhibition Concept. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **2004**, *38*, 201–212, doi:10.1016/j.archger.2003.10.001.
46. Wang, B.; Wu, L.; Chen, J.; Dong, L.; Chen, C. Metabolism Pathways of Arachidonic Acids : Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*(1), 94, doi:10.1038/s41392-020-00443-w.
47. Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Diwan, V.; Brown, L. Omega-3 Fatty Acids and Metabolic Syndrome: Effects and Emerging Mechanisms of Action. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 372–387, doi:10.1016/j.plipres.2011.06.003.
48. Bertoni, C.; Abodi, M.; D’Oria, V.; Milani, G.P.; Agostoni, C.; Mazzocchi, A. Alpha-Linolenic Acid and Cardiovascular Events: A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14319, doi: 10.3390/ijms241814319.
49. Akdis, M.; Aab, A.; Altunbulakli, C.; Azkur, K.; Costa, R.A.; Cramer, R.; Duan, S.; Eiwegger, T.; Eljaszewicz, A.; Ferstl, R.; et al. Fundamentals of Allergy and Immunology Interleukins (from IL-1 to IL-38), Interferons, Transforming Growth Factor β , and TNF- α : Receptors, Functions, and Roles in Diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*(4), 984–1010. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.033.

50. Kreiner, F.F.; Kraaijenhof, J.M.; Herrath, M. Von; Kees, G.; Hovingh, K.; Scholten, B.J. Von; Flindt, F.; Kraaijenhof, J.M.; Herrath, M. Von; Kees, G.; et al. Expert Review of Clinical Immunology Interleukin 6 in Diabetes , Chronic Kidney Disease , and Cardiovascular Disease : Mechanisms and Therapeutic Perspectives ABSTRACT. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2022**, *18*, 377–390, doi:10.1080/1744666X.2022.2045952.
51. Swaroop, J.J.; Rajarajeswari, D.; Naidu, J.N. Student IJMR Association of TNF- α with Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J. Med. Res.* **2012**, *135*(1), 127–130. doi:10.4103/0971-5916.93435.
52. Mohammadi, M.; Gozashti, M.H.; Aghadavood, M. Clinical Significance of Serum IL-6 and TNF- α Levels in Patients with Metabolic Syndrome. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *6*(1), 74–79.
53. Nara, H.; Watanabe, R. Anti-Inflammatory Effect of Muscle-Derived Interleukin-6 and Its Involvement in Lipid Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *13*, 22(18), 9889. doi: 10.3390/ijms22189889.
54. Pedersen, B.K.; Fischer, C.P. Beneficial Health Effects of Exercise - the Role of IL-6 as a Myokine. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 152–156, doi:10.1016/j.tips.2007.02.002.
55. Søbørg, K.; Bouzinova, E. V ScienceDirect The Importance of n-6/n-3 Fatty Acids Ratio in the Major Depressive Disorder. *Medicina (B. Aires).* **2016**, *52*, 139–147, doi:10.1016/j.medici.2016.05.003.
56. Kotur-Stevuljević, J.; Savić, J.; Simić, M.; Ivanišević, J. Redox Homeostasis, Oxidative Stress and Antioxidant System in Health and Disease: The Possibility of Modulation by Antioxidants. *Arh. farm.* **2023**, *73*(4), 251–263, doi: 10.5937/arhfarm73-45369.
57. Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5*(1), 9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
58. Meo, S. Di; Reed, T.T.; Venditti, P.; Victor, V.M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1245049. doi:10.1155/2016/1245049.
59. Snezhkina, A. V; Kudryavtseva, A. V; Kardymon, O.L.; Savvateeva, M. V; Melnikova, N. V; Krasnov, G.S.; Dmitriev, A.A. Review Article ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 6175804. doi:10.1155/2019/6175804.
60. P, S.R.; Kalva, S.; Yerramilli, A.; Mamidi, S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals Antioxidants.* **2011**, *1*, 2–7, doi:10.5530/ax.2011.4.2.
61. Dias, C.; Nylandsted, J. Plasma Membrane Integrity in Health and Disease : Significance and Therapeutic Potential. *Cell Discov.* **2021**, *7*, 4, doi:10.1038/s41421-020-00233-2.
62. Balasaheb, S.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 27986–28006, doi:10.1039/C4RA13315C.
63. Rasheed, A.; Fathima, R.; Azeez, A. A Review on Natural Antioxidants. *Traditional and Complementary Medicine (IntechOpen, Rjeka).* **2019**, *5*, 82636, 10.5772/intechopen.82636.
64. Yan, Z.; Spaulding, H.R. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise. *Redox Biol.* **2020**, *32*, 101508, doi:10.1016/j.redox.2020.101508.
65. Taler-Verčič, A.; Goličnik, M.; Bavec, A. The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and -3. *Molecules.* **2020**, *25*, 5980. doi:10.3390/molecules25245980.
66. Stanojkovic, I.; Kotur-Stevuljevic, J.; Milenkovic, B. Pulmonary Function , Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Severe COPD Exacerbation. *Respir. Med.* **2011**, *105*, 31–37, doi:10.1016/S0954-6111(11)70008-7.
67. Gryszyńska, B.; Formanowicz, D.; Budzyń, M.; Wanic-Kossowska, M.; Pawliczak, E.; Formanowicz, P.; Majewski, W.; Strzyżewski, K.W.; Kasprzak, M.P; Iskra, M. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 4975264.

doi:10.1155/2017/4975264.

68. Xiao, L.L.; Zhang, F.; Zhao, Y.L.; Zhang, L.J.; Xie, Z.Y. Using Advanced Oxidation Protein Products and Ischaemia - Modified Albumin to Monitor Oxidative Stress Levels in Patients with Drug - Induced Liver Injury. *Sci. Rep.* **2020**, 1–10, doi:10.1038/s41598-020-75141-2.
69. Yerizel, E.; Astria, N.; Khambri, D. ROLE OF MALONDIALDEHYDE (MDA) IN PATIENTS WITH BREAST CANCER DISEASES. *Acta Biochimica Indones.* **2019**, 2, 2. doi:10.32889/actabioina.v2i2.41.
70. Lepara, Z.; Lepara, O.; Fajkić, A.; Rebić, D.; Alić, J.; Spahović, H. Serum Malondialdehyde (MDA) Level as a Potential Biomarker of Cancer Progression for Patients with Bladder Cancer. *Rom. J. Intern. Med.* **2020**, 58(3), 146–152, doi:10.2478/rjim-2020-0008.
71. Ghonimi, N.A.M.; Elsharkawi, K.A.; Khyal, D.S.M.; Abdelghani, A.A. Serum Malondialdehyde as a Lipid Peroxidation Marker in Multiple Sclerosis Patients and Its Relation to Disease Characteristics. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2021**, 51, 102941, doi:10.1016/j.msard.2021.102941.
72. Sevindik, M.; Akgül, H.; Bal, C. Determination of Oxidative Stress Status of Ompholatus olearius Gathered from Adana and Antalya Provinces in Turkey. *SAUJS.* 2017, 21(3), 324–327. doi:10.16984/saufenbilder.298974.
73. Markers, A.; Veglia, F.; Cavalca, V.; Tremoli, E. Chapter 14 OXY-SCORE : A Global Index to Improve Evaluation of Oxidative Stress by Combining. *594*, doi:10.1007/978-1-60761-411-1.
74. Moussa, Z.; Judeh, Z.M.A.; Ahmed, S.A. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. *Free Radical Medicine and Biology (IntechOpen, Rijeka)*, **2019**, 6, doi:10.5772/intechopen.87778.
75. Traber, M.G.; Stevens, J.F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, 51(5), 1000-1013. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017.
76. Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* **2010**, 2(12), 1231–1246, doi:10.3390/nu2121231.
77. Xu, D.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Zhang, J. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants : Extraction , Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18(1), 96, doi:10.3390/ijms18010096.
78. Perez-Leighton, C.E.; Boland, K.; Billington, C.J.; Kotz, C.M. High and low activity rats: elevated intrinsic physical activity drives resistance to diet-induced obesity in non-bred rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2013, 21(2), 353–360. doi:10.1002/oby.20045.
79. Angelova, P.; Boyadjiev, N. A Review on the Models of Obesity and Metabolic Syndrome in Rats. *TJS.* **2013**, 11, 5–12.
80. Brown, L.; Panchal, S.K. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 2011, 351982, doi:10.1155/2011/351982.
81. Perez-Leighton, C.E.; Lockridge, A.D.; Teske, J.A.; Alejandro, E.U.; Klotz, C.M. Rat Models of Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes. *Academic Press.* **2020**, 2020, 987–1002, doi:10.1016/B978-0-12-814338-4.00027-1.
82. Ghezzi, A.C.; Cambri, L.T.; Botezelli, J.D.; Ribeiro, C.; Dalia, R.A.; Alice, M.; Mello, R. De Metabolic Syndrome Markers in Wistar Rats of Different Ages. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2012**, 4, 16, doi:10.1186/1758-5996-4-16.
83. Gunawan, S.; Aulia, A.; Soetikno V. Development of rat metabolic syndrome models: A review. *Vet. World.* **2021**, 14(7), 1774–1783, doi:10.14202/vetworld.2021.1774-1783.
84. Man, A.; Chan, L.; Min, A.; Ng, H.; Heikal, M.; Yunus, M.; Bt, R.; Idrus, H.; Law, J.X.; Yazid, M.D.; et al. Recent Developments in Rodent Models of High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome : A Systematic Review. *Nutrients.* **2021**, 13(8), 2497. doi:10.3390/nu13082497.
85. Shi, L.; Tu, B.P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, 33, 125–131, doi:10.1016/j.ceb.2015.02.003.
86. Clarke, S.D.; Nakamura, M.T. Fatty Acid Structure and Synthesis. *Encyclopedia of Biological*

- Chemistry*. **2013**, *2013*, 285–289, doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00038-4.
87. Wakil, J.S. Mechanism of Fatty Acid Synthesis*. *J. Lipid Res.* **1960**, *2*, 1–24, doi:10.1016/S0022-2275(20)39034-9.
 88. Burdge, G.C.; Calder, P.C. Introduction to Fatty Acids and Lipids. *World Rev. Nutr. Diet.* **2015**, *112*, 1–16, doi:10.1159/000365423.
 89. Chiara, M.; Cautela, J.; Galantini, L. Physiology and Physical Chemistry of Bile Acids. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*(4), 1780, doi:10.3390/ijms22041780.
 90. Ros, E. Intestinal Absorption of Triglyceride and Cholesterol . Dietary and Pharmacological Inhibition to Reduce Cardiovascular Risk. *Atherosclerosis.* **2000**, *151*, 357–379, doi:10.1016/s0021-9150(00)00456-1.
 91. Engelking, L.R. Chapter 64 Chylomicrons. *Text Book of Veterinary Physiological Chemistry*. Updated 2nd edition; Elsevier: UK, **2015**, 411–415.
 92. Mansbach, C.M.; Siddiqi, S.A. The biogenesis of chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 315–333. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135801
 93. Huang, J.; Lee, H-C. Emerging Evidence of Pathological Roles of Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL). *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*(8), 4300, doi: 10.3390/ijms23084300
 94. Schwarz, J.; Mulligan, K. Conversion of Sugar to Fat: Is Hepatic de Novo Lipogenesis Leading to Metabolic Syndrome and Associated Chronic Diseases? *J. Am. Osteopath. Assoc.* **2017**, *117*, 520–527, doi:10.7556/jaoa.2017.102.
 95. Juarez Casso, F.M.; Farzam, K. Biochemistry, Very Low Density Lipoprotein. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; December 4, **2022**.
 96. März, W.; Kleber, M.E.; Scharnagl, H.; Speer, T.; Zewinger, S.; Ritsch, A.; Parhofer, K.G.; Eckardstein, A. Von; Landmesser, U.; Laufs, U. HDL Cholesterol : Reappraisal of Its Clinical Relevance. *Clin. Res. Cardiol.* **2017**, *106*, 663–675, doi:10.1007/s00392-017-1106-1.
 97. Mani, P.; Ren, H.; Neeland, I.J.; Mcguire, D.K.; Ayers, C.R.; Khera, A.; Rohatgi, A. The association between HDL particle concentration and incident metabolic syndrome in the multi-ethnic Dallas Heart Study. *Diabetes. Metab. Syndr.* **2017**, *11*(1), 175–179, doi:10.1016/j.dsx.2016.12.028.
 98. Fabbrini, E.; Sullivan, S.; Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology.* **2010**, *51*(2), 679–689. doi:10.1002/hep.23280.
 99. Pouwels, S.; Sakran, N.; Graham, Y.; Leal, A.; Pintar, T.; Yang, W.; Kassir, R.; Singhal, R.; Mahawar, K.; Ramnarain, D. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocr. Disord.* **2022**, *22*(1), 63, doi: 10.1186/s12902-022-00980-1. PMID: 35287643; PMCID: PMC8919523..
 100. Kit, B.K.; Fakhouri, T.H.I.; Park, S.; Nielsen, S.J.; Ogden, C.L. Trends in Sugar-Sweetened Beverage Consumption among Youth and Adults in the United States : 1999 – 2010 1 – 4. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 180–188, doi:10.3945/ajcn.112.057943.180.
 101. Jang, C.; Hui, S.; Lu, W.; Cowan, A.J.; Morscher, R.J.; Liu, W.; Tesz, G.J.; Birnbaum, M.J.; Rabinowitz, J.D. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab.* **2019**, *27*, 351–361, doi:10.1016/j.cmet.2017.12.016.
 102. Taskinen, M.; Packard, C.J.; Bor, J. Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients.* **2019**, *11*(9), 1987, doi:10.3390/nu11091987.
 103. Hannou, S.A.; Haslam, D.E.; Mckeown, N.M.; Herman, M.A. Fructose Metabolism and Metabolic Disease Fructose Metabolism and Metabolic Disease. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*(2), 545–555, doi:10.1172/JCI96702.
 104. Inci, M.K.; Park, S.H.; Helsley, R.N.; Attia, S.L.; Softic, S. Fructose impairs fat oxidation: Implications for the mechanism of western diet-induced NAFLD. *J. Nutr. Biochem.* **2023**, *114*, 109224. doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109224.
 105. Linden, A.G.; Li, S.; Choi, H.Y.; Fang, F.; Fukasawa, M.; Uyeda, K.; Hammer, R.E.; Horton, J.D.; Engelking, L.J.; Liang, G. Interplay between ChREBP and SREBP-1c Coordinates Postprandial Glycolysis and Lipogenesis in Livers of Mice. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*(3), 475–

- 487, doi:10.1194/jlr.M081836.
106. Lee, H.J.; Cha, J.Y. Recent insights into the role of ChREBP in intestinal fructose absorption and metabolism. *BMB Rep.* **2018**, *51*(9), 429–436, doi:10.5483/BMBRep.2018.51.9.197.
 107. Herman, M.A.; Birnbaum, M.J. Review Molecular Aspects of Fructose Metabolism and Metabolic Disease. *Cell Metab.* **2021**, *33*, 2329–2354, doi:10.1016/j.cmet.2021.09.010.
 108. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2009**, *2*, 270–278, doi:10.4161/oxim.2.5.9498.
 109. Kim, Y.; Keogh, J.B.; Clifton, P.M. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients.* 2016, *8*, 17, doi:10.3390/nu8010017..
 110. Williamson, G. The Role of Polyphenols in Modern Nutrition. *Nutr. Bull.* **2017**, *42*(3), 226–235, doi:10.1111/nbu.12278.
 111. Behl, T.; Bungau, S.; Kumar, K.; Zengin, G.; Khan, F.; Kumar, A.; Kaur, R.; Venkatachalam, T.; Tit, D.M.; Vesa, C.M.; et al. Pleiotropic Effects of Polyphenols in Cardiovascular System. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *130*, 110714, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110714.
 112. Kojadinovic, M.; Arsic, A.; Debeljak-Martacic, J.; Konic-Ristic, A.; Kardum, N.; Popovic, T.; Glibetic, M. Consumption of pomegranate juice decreases blood lipid peroxidation and levels of arachidonic acid in women with metabolic syndrome. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*(6), 1798–1804, doi:10.1002/jsfa.7977
 113. Francini-Pesenti, F.; Spinella, P.; Calò, L.A. Syndrome Prevention and Therapy Potential Role of Phytochemicals in Metabolic Syndrome Prevention and Therapy. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **2019**, *12*, 1987–2002, doi:10.2147/DMSO.S214550.
 114. Cortez, R.E.; Mejia, E.G. De Blackcurrants (*Ribes Nigrum*): A Review on Chemistry, Processing, and Health Benefits. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 2387–2401, doi:10.1111/1750-3841.14781.
 115. Basu, A.; Lyons, T.J. Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: clinical perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 2012, *60*(23), 5687–5692. doi:10.1021/jf203488k.
 116. Branković, S.; Miladinović, B.; Radenković, M.; Gočmanac-Ignjatović, M.; Kostić, M.; Šavikin, K.; Kitić, D. Hypotensive, cardiodepressant, and vasorelaxant activities of black currant (*Ribes nigrum* 'Ben Sarek') juice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2016, *94*(10), 1102–1105. doi:10.1139/cjpp-2015-0584.
 117. Olejnik, A.; Kaczmarek, M.; Olkowicz, M.; Kowalska, K.; Juzwa, W. ROS-,Modulating Anticancer e Ff Ects of Gastrointestinally Digested *Ribes Nigrum* L. Fruit Extract in Human Colon Cancer Cells. *J. Funct. Foods.* **2018**, *42*, 224–236, doi:10.1016/j.jff.2018.01.011.
 118. Karjalainen, R.; Anttonen, M.; Saviranta, N. A Review on Bioactive Compounds in Black Currants (*Ribes Nigrum* L.) and Their Potential Health-Promoting Properties. *Acta Horticulturae.* **2009**, 301–308, doi:10.17660/ActaHortic.2009.839.38.
 119. Szczepaniak, O.M.; Kobus, J.; Weronika, C.; Monika, K. Functional Properties of Cornelian Cherry (*Cornus Mas* L .): A Comprehensive Review. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 2071–2087, doi:10.1007/s00217-019-03313-0.
 120. Natić, M.; Pavlović, A.; Lo, F.; Nemanja, B.; Dragana, S.; Zagorac, D. Nutraceutical Properties and Phytochemical Characterization of Wild Serbian Fruits. *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, *245*, 469–478, doi:10.1007/s00217-018-3178-1.
 121. Szczepaniak, O.M.; Kobus, J.; Weronika, C.; Monika, K. Functional Properties of Cornelian Cherry (*Cornus Mas* L .): A Comprehensive Review. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 2071–2087, doi:10.1007/s00217-019-03313-0.
 122. Szot, I.; Łysiak, G.P. The Beneficial Effects of Anthocyanins from Cornelian Cherry (*Cornus Mas* L.) Fruits and Their Possible Uses: A Review. *Agriculture.* **2024**, *14*(1), 57, doi:10.3390/agriculture14010052
 123. Mattila, P.H.; Hellström, J.; Mcdougall, G.; Dobson, G.; Pihlava, J.; Tiirikka, T.; Stewart, D.; Karjalainen, R. Polyphenol and Vitamin C Contents in European Commercial Blackcurrant Juice Products. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1216–1223, doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.129.
 124. Mohammadi, K.; Alizadeh Sani, M.; Nattagh-Eshtivani, E.; Yaribash, S.; Rahmani, J.;

- Shokrollahi Yancheshmeh, B.; Julian McClements, D. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Impact of Cornelian Cherry Consumption on Blood Lipid Profiles. *Food Sci. Nutr.* **2021**, *9*, 4629–4638, doi:10.1002/fsn3.2416.
125. Park, J.H.; Kho, M.C.; Kim, H.Y.; Ahn, Y.M.; Lee, Y.J.; Kang, D.G.; Lee, H.S. Blackcurrant Suppresses Metabolic Syndrome Induced by High-Fructose Diet in Rats. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 385976, doi:10.1155/2015/385976.
 126. Haswell, C.; Ali, A.; Page, R.; Hurst, R.; Rutherford-Markwick, K. Potential of Beetroot and Blackcurrant Compounds to Improve Metabolic Syndrome Risk Factors. *Metabolites* **2021**, *11*, doi:10.3390/metabo11060338.
 127. Mcinnes, G.T. Lowering Blood Pressure for Cardiovascular Risk Reduction. *J. Hypertens. Suppl.* **2005**, *23*(1), 3–8, doi:10.1097/01.hjh.0000165622.34192.fd.
 128. Sozański, T.; Kucharska, A.Z.; Rapak, A.; Szumny, D.; Merwid-Łąd, A.; Stanisław, D.; Tomasz, P.; Piórecki, N.; Szeląg, A. Iridoid–loganic acid versus anthocyanins from the Cornus mas fruits (cornelian cherry): Common and different effects on diet-induced atherosclerosis, PPARs expression and inflammation. *Atherosclerosis* **2016**, *254*, 151–160, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.001.
 129. Grabež, M.; Škrbić, R.; Stojiljković, M.P.; Vučić, V.; Grujić, V.R.; Jakovljević, V.; Djuric, D.M.; Suručić, R.; Šavikin, K.; Bigović, D.; et al. A Prospective, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Polyphenols on the Outcomes of Inflammatory Factors and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Rev. Cardiovasc. Med.* **2022**, *23*(2), 57, doi:10.31083/j.rcm2302057.
 130. Spahis, S.; Borys, J.; Levy, E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. *Antioxid. Redox. Signal.* **2017**, *26*, 445–461, doi:10.1089/ars.2016.6756.
 131. Bloch-Damti, A.; Bashan, N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* **2005**, *7*(11-12), 1553–1567. doi:10.1089/ars.2005.7.1553
 132. Derdemezis, C.S.; Kiortsis, D.N.; Tsimihodimos, V.; Petraki, M.P.; Vezyraki, P.; Elisaf, M.S.; Tselepis, A.D. Effect of Plant Polyphenols on Adipokine Secretion from Human SGBS Adipocytes. *Biochem. Res. Int.* **2011**, *2011*, 285618, doi:10.1155/2011/285618.
 133. Ibars, M.; Aragonès, G.; Ardid-ruiz, A.; Gibert-ramos, A.; Arola-arnal, A.; Suárez, M.; Bladé, C. Seasonal Consumption of Polyphenol-Rich Fruits Affects the Hypothalamic Leptin Signaling System in a Photoperiod-Dependent Mode. *Sci. Rep.* **2018**, *8*(1), 13572, doi:10.1038/s41598-018-31855-y.
 134. Fortunato, I.M.; dos Santos, T.W.; Ferraz, L.F.C.; Santos, J.C.; Ribeiro, M.L. Effect of Polyphenols Intake on Obesity-Induced Maternal Programming. *Nutrients*. **2021**, *13*, 2390. doi:10.3390/nu13072390.
 135. Mamun, M.A.A.; Rakib, A.; Mandal, M.; Kumar, S.; Singla, B.; Singh, U.P. Polyphenols: Role in Modulating Immune Function and Obesity. *Biomolecules*. **2024**, *14*, 221. doi:10.3390/biom14020221.
 136. Dabetic, N.; Todorovic, V.; Malenovic, A.; Sobajic, S.; Markovic, B. Optimization of Extraction and HPLC–MS/MS Profiling of Phenolic Compounds from Red Grape Seed Extracts Using Conventional and Deep Eutectic Solvents. *Antioxidants* **2022**, *11*, doi:10.3390/antiox11081595.
 137. Attard, E. A Rapid Microtitre Plate Folin-Ciocalteu Method for the Assessment of Polyphenols. *Open Life Sci.* **2013**, *8*, 48–53, doi:10.2478/s11535-012-0107-3.
 138. Payne, M.J.; Hurst, W.J.; Stuart, D.A.; Ou, B.; Fan, E.; Ji, H.; Kou, Y. Determination of Total Procyanidins in Selected Chocolate and Confectionery Products Using DMAC. *J. AOAC Int.* **2010**, *93*, 89–96, doi:10.1093/jaoac/93.1.89.
 139. Diaconeasa, Z.; Leopold, L.; Rugină, D.; Ayvaz, H.; Socaciu, C. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin Rich Extracts from Blueberry and Blackcurrant Juice. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 2352–2365, doi:10.3390/ijms16022352.
 140. Ranković, S.; Popović, T.; Martačić, J.D.; Petrović, S.; Tomić, M.; Ignjatović, Đ.; Tovilović-

- Kovačević, G.; Glibetić, M. Liver Phospholipids Fatty Acids Composition in Response to Different Types of Diets in Rats of Both Sexes. *Lipids Health Dis.* **2017**, *16*, 1–11, doi:10.1186/s12944-017-0483-9.
141. Hamidi, D.; Paletas, K.; Pegiou, T.; Sarigianni, M.; Befani, C.; Koliakos, G. A Novel Assay for the Evaluation of the Prooxidant – Antioxidant Balance , before and after Antioxidant Vitamin Administration in Type II Diabetes Patients. *Clin. Biochem.* **2007**, *40*, 248–254, doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.10.017.
 142. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*(1), 70–77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6.
 143. Bar-Or, D.; Lau, E.; Winkler, J. V. A Novel Assay for Cobalt-Albumin Binding and Its Potential as a Marker for Myocardial Ischemia - A Preliminary Report. *J. Emerg. Med.* **2000**, *19*, 311–315, doi:10.1016/S0736-4679(00)00255-9.
 144. Girotti, M.J.; Khan, N.; McLellan, B.A. Early Measurement of Systemic Lipid Peroxidation Products in the Plasma of Major Blunt Trauma Patients. *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care* **1991**, *31*, 32–35, doi:10.1097/00005373-199101000-00007.
 145. Kotur-Stevuljevic, J.; Bogavac-Stanojevic, N.; Jelic-Ivanovic, Z.; Stefanovic, A.; Gojkovic, T.; Joksic, J.; Sopic, M.; Gulan, B.; Janac, J.; Milosevic, S. Oxidative Stress and Paraoxonase 1 Status in Acute Ischemic Stroke Patients. *Atherosclerosis* **2015**, *241*, 192–198, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.016.
 146. Witko-Sarsat, V.; Friedlander, M.; Capeillère-Blandin, C.; Nguyen-Khoa, T.; Nguyen, A. T.; Zingraff, J.; Jungers, P.; Descamps-Latscha, B. Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Uremia. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1304–1313, doi:10.1038/ki.1996.186.
 147. Misra, H.P.; Fridovich, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175, doi:10.1016/s0021-9258(19)45228-9.
 148. Baralić, K.; Jorgovanović, D.; Živančević, K.; Buha Djordjević, A.; Antonijević Miljaković, E.; Miljković, M.; Kotur-Stevuljević, J.; Antonijević, B.; Đukić-Ćosić, D. Combining in Vivo Pathohistological and Redox Status Analysis with in Silico Toxicogenomic Study to Explore the Phthalates and Bisphenol A Mixture-Induced Testicular Toxicity. *Chemosphere* **2021**, *267*, 129296, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129296.
 149. Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 277–285, doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
 150. Erel, O. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 1103–1111, doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.
 151. Glaser, C.; Demmelmair, H.; Koletzko, B. High-Throughput Analysis of Total Plasma Fatty Acid Composition with Direct In Situ Transesterification. *PLoS One.* **2010**, *5*, 12045, doi:10.1371/journal.pone.0012045.
 152. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **2001**, *25*(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.
 153. Reddy, P.; Lent-schochet, D.; Ramakrishnan, N.; Mclaughlin, M. Clinica Chimica Acta Metabolic Syndrome Is an in Fl Ammatory Disorder : A Conspiracy between Adipose Tissue and Phagocytes. *Clin. Chim. Acta.* **2019**, *496*, 35–44, doi:10.1016/j.cca.2019.06.019.
 154. Zhu, Y.; Vogelpohl, F.A.; Heiner-fokkema, M.R.; Pranger, I.G.; Minovi, I. Plasma Phospholipid Fatty Acid Profile , Estimated Desaturase Activities and Prevalence of the Metabolic Syndrome in a General Population Cohort : A Cross-Sectional Study. *Nutr. Health. Aging.* **2022**, *7*, 135–146, doi:10.3233/NHA-220155.
 155. Monserrat-Mesquida, M.; Quetglas-llabr, M.; Cap, X.; Bouzas, C.; Mateos, D.; Pons, A.; Tur, J.A.; Sureda, A. Metabolic Syndrome Is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State. *Antioxidants.* **2020**, *9*(3), 236, doi: 10.3390/antiox9030236.

156. Venturi, S.; Marino, M.; Cioffi, I.; Martini, D.; Bo, C. Del; Perna, S.; Riso, P.; Klimis-Zacas, D.; Porrini, M. Berry Dietary Interventions in Metabolic Syndrome: New Insights. *Nutrients*. **2023**, *15*(8), 1906, doi:10.3390/nu15081906.
157. Jiang, H.; Zhang, W.; Li, X.; Xu, Y.; Cao, J.; Jiang, W. The Anti-Obesogenic Effects of Dietary Berry Fruits: A Review. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110539, doi:10.1016/j.foodres.2021.110539.
158. Nosal, B.M.; Sakaki, J.R.; Mofrad, M.D.; Macdonald, Z.; Mahoney, K.J.; Thornton, S.N.; Patel, D.; Drossman, J.; Lee, E.C.; Chun, O.K. Blackcurrant Anthocyanins Improve Blood Lipids and Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Healthy Women in Menopause Transition without Changing Body Composition. *Biomedicines*. **2023**, *11*(10), 2834, doi:10.3390/biomedicines11102834.
159. Danielewski, M.; Gomułkiewicz, A.; Kucharska, A.Z.; Matuszewska, A.; Szel, A.; Dzi, P. Cornelian Cherry (*Cornus Mas L.*) Iridoid and Anthocyanin-Rich Extract Reduces Various Oxidation, Inflammation, and Adhesion Markers in a Cholesterol-Rich Diet Rabbit Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3890, doi:10.3390/ijms24043890.
160. Bishayee, A.; Háznagy-Radnai, E.; Mbimba, T.; Sipos, P., Morazzoni, P.; Darvesh, A. S.; Bhatia, D.; Hohmann, J. Anthocyanin-rich black currant extract suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*(10), 1613–1618.
161. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int. J. Prev. Med.* **2013**, *4*, 624–630.
162. Maria, R.; Sousa, L.; Liberal, N.; Ribeiro, X.; Araújo, B.; Pinto, S.; Sanches, J.R.; Uchôa, M.; Fernando, C.; Coêlho, F.; et al. Long-Term High-Protein Diet Intake Reverts Weight Gain and Attenuates Metabolic Dysfunction on High-Sucrose-Fed Adult Rats. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2018**, *15*, 53, doi:10.1186/s12986-018-0290-y.
163. Zhang-James, Y.; Middleton, F.A.; Faraone, S. V Genetic Architecture of Wistar-Kyoto Rat and Spontaneously Hypertensive Rat Substrains from Different Sources. *Physiol. Genomics* **2013**, *45*, 528–538, doi:10.1152/physiolgenomics.00002.2013.
164. Drábková, N.; Hojná, S.; Zicha, J.; Vaněčková, I. Contribution of Selected Vasoactive Systems to Blood Pressure Regulation in Two Models of Chronic Kidney Disease. *Physiol. Res.* **2020**, *69*, 405–414, doi:10.33549/physiolres.934392.
165. Fouret, G.; Gaillet, S.; Lecomte, J.; Bonafos, B.; Djohan, F.; Barea, B.; Badia, E.; Coudray, C.; Feillet-Coudray, C. 20-Week Follow-up of Hepatic Steatosis Installation and Liver Mitochondrial Structure and Activity and Their Interrelation in Rats Fed a High-Fat-High-Fructose Diet. *Br. J. Nutr.* **2018**, *119*, 368–380, doi:10.1017/S0007114517003713.
166. Gilles, C.F.; Claire, F.; Béatrice, V.; Bernard, B.; Blachnio-zabielska, A.; Rieusset, J.; Casas, F.; Gaillet, S. Long-Term Measures of Dyslipidemia, Inflammation, and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat / High-Fructose Diet. *Lipids*. **2019**, *54*(1), 81–97. doi:10.1002/lipd.12128.
167. Even, P.C.; Gehring, J.; Tomé, D. What does self-selection of dietary proteins in rats tell us about protein requirements and body weight control?. *Obes. Rev.* **2021**, *22*(6), e13194. doi:10.1111/obr.13194.
168. Moreno-Fernández, S.; Garcés-Rimón, M.; Vera, G.; Astier, J.; Landrier, J.F.; Miguel, M. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. *Nutrients* **2018**, *10*, 1502, doi:10.3390/nu10101502.
169. Chaumontet, C.; Azzout-marniche, D.; Blais, A.; Piedcoq, J.; Tomé, D.; Gaudichon, C.; Even, P.C.; Chaumontet, C.; Blais, A.; Piedcoq, J.; et al. Low-Protein and Methionine, High-Starch Diets Increase Energy Intake and Expenditure, Increase FGF21, Decrease IGF-1, and Have Little Effect on Adiposity in Mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2023**, *1986*, 486–501, doi:10.1152/ajpregu.00316.2018.
170. Bilancio, G.; Cavallo, P.; Ciacci, C.; Cirillo, M. Dietary Protein, Kidney Function and Mortality: Review of the Evidence from Epidemiological Studies. *Nutrients* **2019**, *11*, 196, doi:10.3390/nu11010196.
171. Panchal, S.K.; Poudyal, H.; Iyer, A.; Nazer, R.; Alam, A.; Diwan, V.; Kauter, K.; Sernia, C.;

- Campbell, F.; Ward, L.; et al. High-Carbohydrate High-Fat Diet–Induced Metabolic Syndrome and Cardiovascular Remodeling in Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2011**, *57*, 51–64, doi:10.1097/FJC.0b013e3181feb90a.
172. Gancheva, S.; Zhelyazkova-Savova, M. Are Bisphosphonates Associated with Adverse Metabolic and Cognitive Effects? A Study in Intact Rats and Rats Fed High-Fat High-Fructose Diet. *Calcif. Tissue Int.* **2020**, *107*, 41–51, doi:10.1007/s00223-020-00684-5.
 173. Sudakov, S.K.; Alekseeva, E.V.; Nazarova, G.A.; Bashkatova, V.G. Age-Related Individual Behavioural Characteristics of Adult Wistar Rats. *Animals (Basel)*. **2021**, *11*, 2282, doi:10.3390/ani11082282.
 174. Geidl-Flueck, B.; Gerber, P.A. Fructose drives de novo lipogenesis affecting metabolic health. *J. Endocrinol.* **2023**, *257*(2), e220270, doi:10.1530/JOE-22-0270.
 175. Zhou, J.M.; Wang, H.M.; Lv, Y.Z.; Wang, Z.Z.; Xiao, W. Biomedicine & Pharmacotherapy Anti-Atherosclerotic effect of Longxuetongluo Capsule in High Cholesterol Diet Induced Atherosclerosis Model Rats. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 793–801, doi:10.1016/j.biopha.2017.08.141.
 176. Zhou, X.; Han, D.; Xu, R.; Li, S.; Wu, H.; Qu, C. A Model of Metabolic Syndrome and Related Diseases with Intestinal Endotoxemia in Rats Fed a High Fat and High Sucrose Diet. *PLoS One*. **2014**, *9*(12), e115148, doi:10.1371/journal.pone.0115148.
 177. Guilherme, U.; Castro, M. De; Augusto, R.; Silva, M.E.; Lima, W.G. De; Campagnole-santos, M.J.; Alzamora, A.C. Age-Dependent Effect of High-Fructose and High-Fat Diets on Lipid Metabolism and Lipid Accumulation in Liver and Kidney of Rats. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 136, doi:10.1186/1476-511X-12-136.
 178. Cunha, L.F.; Barschak, A.G. Modelling Hypercholesterolaemia in Rats Using High Cholesterol Diet. *Int. J. Exp. Pathol.* **2021**, *102*(2), 74–79, doi:10.1111/iep.12387.
 179. Yamada, S.; Kawaguchi, H.; Yamada, T.; Guo, X.; Matsuo, K.; Hamada, T. Cholic Acid Enhances Visceral Adiposity, Atherosclerosis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Microminipigs. *Atheroscler. Thromb.* **2017**, *24*(11), 1150–1166, doi:10.5551/jat.39909.
 180. Raut, S.; Bandawane, D. A Systematic Review on Animal Models of Metabolic Syndrome. *Int. J. Pharma. Res. Health Sci.* **2018**, *6*, 2089–2098, doi:10.21276/ijprhs.2018.01.04.
 181. Moldovan, B.; Filip, A.; Clichici, S.; Suharoschi, R.; Bolfa, P.; David, L. Antioxidant Activity of Cornelian Cherry (*Cornus Mas L.*) Fruits Extract and the in Vivo Evaluation of Its Anti-Inflammatory Effects. *J. Funct. Foods* **2016**, *26*, 77–87, doi:10.1016/j.jff.2016.07.004.
 182. Tabart, J.; Franck, T.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Serteyn, D.; Defraigne, J.; Dommès, J. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Ribes Nigrum Extracts. *Food Chem.* **2012**, *131*, 1116–1122, doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.076.
 183. Theodoro, J.M.V.; Grancieri, M.; Gomes, M.J.C.; Toledo, R.C.L.; de São José, V.P.B.; Mantovani, H.C.; Carvalho, C.W.P.; da Silva, B.P.; Martino, H.S.D. Germinated Millet (*Pennisetum Glaucum* (L.) R. Br.) Flour Improved the Gut Function and Its Microbiota Composition in Rats Fed with High-Fat High-Fructose Diet. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*(22), 15217, doi:10.3390/ijerph192215217.
 184. Osakabe, N.; Hoshi, J.; Kudo, N.; Shibata, M. The Flavan-3-Ol Fraction of Cocoa Powder Suppressed Changes Associated with Early-Stage Metabolic Syndrome in High-Fat Diet-Fed Rats. *Life Sci.* **2014**, *114*, 51–56, doi:10.1016/j.lfs.2014.07.041.
 185. Boccellino, M.; Angelo, S.D. Anti-Obesity Effects of Polyphenol Intake: Current Status and Future Possibilities. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(16), 5642, doi: 10.3390/ijms21165642
 186. Luna-Vital, D.; Luzardo-Ocampo, I.; Cuellar-Núñez, M.L.; Loarca-Piña, G. Maize Extract Rich in Ferulic Acid and Anthocyanins Prevents High-Fat-Induced Obesity in Mice by Modulating SIRT1, AMPK and IL-6 Associated Metabolic and Inflammatory Pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *79*, 108343, doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108343.
 187. Rodriguez-Ramiro, I.; Vauzour, D.; Miniñane, A.M. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* **2016**, *75*(1), 47–60. doi:10.1017/S0029665115004218.

188. Feldman, F.; Koudoufio, M.; Desjardins, Y.; Spahis, S.; Delvin, E.; Levy, E. Efficacy of Polyphenols in the Management of Dyslipidemia: A Focus on Clinical Studies. *Nutrients* **2021**, *13*(2), 672, doi:10.3390/nu13020672.
189. Houttu, V.; Grefhorst, A.; Cohn, D.M.; Levels, J.H.M.; Roeters van Lennep, J.; Stroes, E.S.G.; Groen, A.K.; Tromp, T.R. Severe Dyslipidemia Mimicking Familial Hypercholesterolemia Induced by High-Fat, Low-Carbohydrate Diets: A Critical Review. *Nutrients* **2023**, *15*, 962, doi:10.3390/nu15040962.
190. Berberich, A.J.; Hegele, R.A. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr. Rev.* **2022**, *43*, 611–653, doi:10.1210/endrev/bnab037.
191. Comparative structures of rat and human plasma lipoproteins. *Nutr. Rev.* **1983**, *41*, 254–255, doi:10.1111/j.1753-4887.1983.tb07191.x.
192. Ibitoye, O.B.; Ajiboye, T.O. Dietary Phenolic Acids Reverse Insulin Resistance, Hyperglycaemia, Dyslipidaemia, Inflammation and Oxidative Stress in High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome Rats. *Arch. Physiol. Biochem.* **2018**, *124*(5), 410–417, doi:10.1080/13813455.2017.1415938.
193. Huang, B.; Chiang, M.; Yao, H.; Chiang, W. The Effect of High-Fat and High-Fructose Diets on Glucose Tolerance and Plasma Lipid and Leptin Levels in Rats. *Diabetes. Obes. Metab.* **2004**, *6*(2), 120–126, doi:10.1111/j.1462-8902.2004.00323.x.
194. Lozano, I.; Werf, R. Van Der; Bietiger, W.; Seyfritz, E.; Peronet, C.; Pinget, M.; Jeandidier, N.; Maillard, E.; Marchioni, E.; Sigrist, S.; et al. Disorders in Rats: Impact on Diabetes Risk, Hepatic and Vascular Complications. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2016**, *13*, 15, doi:10.1186/s12986-016-0074-1.
195. Hardy, O.T.; Czech, M.P.; Corvera, S. What causes the insulin resistance underlying obesity?. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **2012**, *19*(2), 81–87. doi:10.1097/MED.0b013e3283514e13.
196. Kawai, T.; Autieri, M.V.; Scalia, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2021**, *320*(3), C375-C391, doi:10.1152/ajpcell.00379.2020
197. Aryaeian, N.; Sedehi, S.K.; Arablou, T. Polyphenols and Their Effects on Diabetes Management: A Review. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **2017**, *31*, 134, doi:10.14196/mjiri.31.134.
198. Williamson, G.; Sheedy, K. Effects of Polyphenols on Insulin Resistance. *Nutrients* **2020**, *12*(10), 3135, doi: 10.3390/nu12103135.
199. Safaeian, L.; Hajhashemi, V.; Haghjoo, S. The Effect of Protocatechuic Acid on Blood Pressure and Oxidative Stress in Glucocorticoid-Induced Hypertension in Rat. *Iran. J. Pharm. Res.* **2016**, *15*, 83–91.
200. Yan, X.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Han, X.; Guo, S.; Li, H. Gallic Acid Attenuates Angiotensin II- Induced Hypertension and Vascular Dysfunction by Inhibiting the Degradation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1121, doi:10.3389/fphar.2020.01121.
201. Kousar, M.; Salma, U.; Khan, T.; Shah, A.J. Antihypertensive Potential of Tartaric Acid and Exploration of Underlying Mechanistic Pathways. *Dose. Response.* **2022**, *20*(4), 15593258221135728, doi:10.1177/15593258221135728.
202. Yang, K.; Chen, J.; Zhang, T. Efficacy and Safety of Dietary Polyphenol Supplementation in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 949746, doi:10.3389/fimmu.2022.949746.
203. Abenavoli, L.; Larussa, T.; Corea, A.; Procopio, A.C.; Boccuto, L.; Dallio, M.; Federico, A.; Lizza, F. Dietary Polyphenols and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* **2021**, *13*(2), 494. doi:10.3390/nu13020494.
204. Tilg, H.; Moschen, A.R. Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis. *Hepatology* **2010**, *52*(5), 1836–1846, doi:10.1002/hep.24001.
205. Lee, J.S.; Jun, D.W.; Kim, E.K.; Jeon, H.J.; Nam, H.H.; Saeed, W.K. Histologic and Metabolic

- Derangement in High-Fat , High-Fructose , and Combination Diet Animal Models. *ScientificWorldJournal* **2015**, 2015, 306326, doi:10.1155/2015/306326.
206. Hong, T.; Chen, Y.; Li, X.; Lu, Y. Review Article The Role and Mechanism of Oxidative Stress and Nuclear Receptors in the Development of NAFLD. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2021**, 2021, 6889533, doi:10.1155/2021/6889533.
 207. Rudrapal, M.; Khairnar, S.J.; Khan, J.; Dukhyil, A. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism (s) of Action. *Front. Pharmacol.* **2022**, 13, 806470, doi:10.3389/fphar.2022.806470.
 208. Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S. IL-6 Pathway in the Liver: From Physiopathology to Therapy. *J. Hepatol.* **2016**, 64, 1403–1415, doi:10.1016/j.jhep.2016.02.004.
 209. Miller, A. M.; Wang, H.; Bertola, A.; Park, O.; Horiguchi, N.; Ki, S. H.; Yin, S.; Lafdil, F.; Gao, B. Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. *Hepatology* **2011**, 54(3), 846–856, doi:10.1002/hep.24517.
 210. Ueki, K.; Kondo, T.; Kahn, C.R. Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 Cause Insulin Resistance through Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins by Discrete Mechanisms Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 Cause Insulin Resistance through Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins by Discrete Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, 24(12), 5434–5446, doi:10.1128/MCB.24.12.5434.
 211. Papuc, C.; Goran, G. V; Predescu, C.N.; Tudoreanu, L.; Ștefan, G.; Papuc, C.; Goran, G. V; Predescu, C.N.; Tudoreanu, L. Plant Polyphenols Mechanisms of Action on Insulin Resistance and against the Loss of Pancreatic Beta Cells. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, 62(2), 325–352, doi:10.1080/10408398.2020.1815644.
 212. Holst, J.J.; Christensen, M.; Lund, A.; Heer, J. De; Svendsen, B.; Kielgast, U.; Knop, F.K. Regulation of Glucagon Secretion by Incretins. *Diabetes. Obes. Metab.* 2011, 13(1), 89–94. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01452.x.
 213. Marroquí, L.; Alonso-Magdalena, P.; Merino, B.; Fuentes, E.; Nadal, A.; Quesada, I. Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes. *Nutr. Res. Rev.* **2014**, 27(1), 48–62, doi:10.1017/S0954422414000031.
 214. Vucic, V.; Tepsic, J.; Arsic, A.; Popovic, T. Fatty Acid Content of Vegetable Oils and Assessment of Their Consumption in Serbia and Assessment of Their Consumption in Serbia. *Acta Alimentaria* **2012**, 41(3), 343–350, doi:10.1556/AAlim.41.2012.3.6.
 215. Adam, O.; Wolfram, G.; Zöllner, N. Influence of Dietary Linoleic Acid Intake with Different Fat Intakes on Arachidonic Acid Concentrations in Plasma and Platelet Lipids and Eicosanoid Biosynthesis in Female. *Ann. Nutr. Metab.* **2003**, 47(1), 31–36, doi:10.1159/000068906.
 216. Rett, B.S.; Whelan, J. Increasing Dietary Linoleic Acid Does Not Increase Tissue Arachidonic Acid Content in Adults Consuming Western-Type Diets: A Systematic Review. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2011**, 8, 36, doi:10.1186/1743-7075-8-36.
 217. Liou, Y.A.; Á, S.M.I. Dietary Linoleic Acid Has No Effect on Arachidonic Acid , but Increases n-6 Eicosadienoic Acid , and Lowers Dihomo- g -Linolenic and Eicosapentaenoic Acid in Plasma of Adult Men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2009**, 80, 201–206, doi:10.1016/j.plefa.2009.02.003.
 218. Yui, K.; Imataka, G.; Nakamura, H.; Ohara, N.; Naito, Y. Eicosanoids Derived From Arachidonic Acid and Their Prostaglandins and Cyclooxygenase in Psychiatric Disorders. *Curr. Neuropharmacol.* **2015**, 13, 776–785, doi:10.2174/1570159x13666151102103305
 219. Hinson, R.M.; Williamst, J.A.; Shacter, E. Elevated Interleukin 6 Is Induced by Prostaglandin E2 in a Murine Model of Inflammation: Possible Role of Cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1996**, 93, 4885–4890, doi: 10.1073/pnas.93.10.4885.
 220. Fraeye, I.; Bruneel, C.; Fraeye, I.; Bruneel, C.; Lemahieu, C.; Buyse, J.; Muylaert, K.; Foubert, I. Dietary Enrichment of Eggs with Omega-3 Fatty Acids: A Review. *Food. Res. Int.* **2012**, 48,

- 961–969, doi:10.1016/j.foodres.2012.03.014.
221. Aoun, M.; Michel, F.; Fouret, G.; Casas, F.; Jullien, M.; Wrutniak-cabello, C.; Ramos, J.; Cristol, J.; Coudray, C.; Carbonneau, M.; 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), 1760–1770, doi:10.1017/S0007114510002850.
 222. Warensjö, E.; Risérus, U.; Vessby, B. Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia* **2005**, *48*, 1999–2005, doi:10.1007/s00125-005-1897-x.
 223. Aoun, M.; Michel, F.; Fouret, G.; Schlermitzauer, A.; Ollendorff, V.; Wrutniak-Cabello, C.; Cristol, J.; Carbonneau, M.; Coudray, C.; Feillet-coudray, C.; et al. A Grape Polyphenol Extract Modulates Muscle Membrane Fatty Acid Composition and Lipid Metabolism in High-Fat – High-Sucrose Diet-Fed Rats. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*(4), 491–501, doi:10.1017/S0007114511000602.
 224. Milic, P.; Jeremic, J.; Zivkovic, V.; Srejovic, I.; Jeremic, N.; Bradic, J. Effects of Different Dietary Regimes Alone or in Combination with Standardized Aronia Melanocarpa Extract Supplementation on Lipid and Fatty Acids Profiles in Rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2019**, *461*(1-2), 141–150. doi:10.1007/s11010-019-03597-6.
 225. Farbstein, D.; Levy, A.P. The genetics of vascular complications in diabetes mellitus. *Cardiol. Clin.* **2010**, *28*(3), 477–496, doi:10.1016/j.ccl.2010.04.005.
 226. Tisato, V.; Romani, A.; Tavanti, E.; Melloni, E.; Milani, D.; Bonaccorsi, G.; Sanz, J.M.; Gemmati, D.; Passaro, A.; Cervellati, C. Crosstalk Between Adipokines and Paraoxonase 1: A New Potential Axis Linking Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2019**, *8*, 287, doi:10.3390/antiox8080287.
 227. Dullaart, R.P.F.; Kwakernaak, A.J.; Dallinga-thie, G.M. The Positive Relationship of Serum Paraoxonase-1 Activity with Apolipoprotein E Is Abrogated in Metabolic Syndrome. *Atherosclerosis* **2013**, *230*, 6–11, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.06.019.
 228. Adhe-Rojekar, A.; Mogarekar, M.R.; Rojekar, M.V. Paraoxonase Activity in Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Caspian. J. Intern. Med.* **2018**, *9*, 116–120, doi:10.22088/cjim.9.2.116.
 229. Noeman, S.A.; Hamooda, H.E.; Baalash, A.A. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2011**, *3*, 17, doi:10.1186/1758-5996-3-17.
 230. Mackness, B.; Beltran-debon, R.; Aragonés, G.; Joven, J.; Camps, J.; Mackness, M.; Biomedica, C.D.R.; Universitari, H.; Joan, D.S.; N, C.S.J.S. Human Tissue Distribution of Paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 480–482, doi:10.1002/iub.347.
 231. Litvinov, D.; Mahini, H.; Garelnabi, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases. *N. Am. J. Med. Sci.* **2012**, *4*, 523–532, doi:10.4103/1947-2714.103310.
 232. Mackness, M.; Mackness, B. Human Paraoxonase-1 (PON1): Gene Structure and Expression, Promiscuous Activities and Multiple Physiological Roles. *Gene* **2015**, *567*, 12–21, doi:10.1016/j.gene.2015.04.088.
 233. Zanini, B. M.; Burkert, L.; Dos Santos, F. G.; Masternak, M. M.; Crespo-Ribeiro, J. A.; Barros, C. C.; Valle, S. C.; Schneider, A. The effect of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms T(-107)C and L55M and diet composition on serum PON1 activity in women. *Arch. Endocrinol. Metab.* **2021**, *65*(6), 787–793, doi:10.20945/2359-3997000000416.
 234. Camps, J.; Ferna, J.; Arija, V.; Murphy, M.M.; Ceruelo, S.; Biarne, E.; Vilella, E.; Tous, M.; Joven, J. Regulation of Serum Paraoxonase Activity by Genetic , Nutritional , and Lifestyle Factors in the General Population. *Clin. Chem.* **2003**, *49*(9), 1491–1497.
 235. Gouédard, C.; Barouki, R.; Morel, Y. Dietary Polyphenols Increase Paraoxonase 1 Gene Expression by an Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 5209–5222, doi:10.1128/MCB.24.12.5209.

236. Martini, D.; Bo, C. Del; Porrini, M.; Ciappel, S.; Riso, P. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *48*, 1–8, doi:10.1016/j.jnutbio.2017.06.002.
237. Wu, S.; Kor, C.; Chen, T.; Liu, K.; Shih, K.; Su, W.; Wu, H. Relationships between Serum Uric Acid, Malondialdehyde Levels, and Carotid Intima-Media Thickness in the Patients with Metabolic Syndrome. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 6859757, doi:10.1155/2019/6859757.
238. Sato, A.; Shiraishi, Y.; Kimura, T.; Osaki, A.; Kagami, K.; Ido, Y.; Adachi, T. Resistance to Obesity in SOD1 Deficient Mice with a High-Fat/High-Sucrose Diet. *Antioxidants (Basel)* **2022**, *11*(7), 1403, doi: 10.3390/antiox11071403.
239. Mazzoli, A.; Crescenzo, R.; Cigliano, L.; Spagnuolo, M.S.; Cancelliere, R.; Gatto, C.; Iossa, S. Early Hepatic Oxidative Stress and Mitochondrial Changes Following Western Diet in Middle Aged Rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 2670, doi:10.3390/nu11112670.
240. MAITHILI KARPAGA SELVI, N.; SRIDHAR, M.G.; SWAMINATHAN, R.P.; SRIPRADHA, R. Curcumin Attenuates Oxidative Stress and Activation of Redox-Sensitive Kinases in High Fructose- and High-Fat-Fed Male Wistar Rats. *Sci. Pharm.* **2015**, *83*, 159–175. doi:10.3797/scipharm.1408-16.
241. Mirończuk-Chodakowska, I.; Witkowska, A.M.; Zujko, M.E. Endogenous Non-Enzymatic Antioxidants in the Human Body Iwona Miro N. *Adv. Med. Sci.* **2018**, *63*, 68–78, doi:10.1016/j.advms.2017.05.005.
242. Ahmadnezhad, M.; Arefhosseini, S. R.; Parizadeh, M. R.; Tavallaie, S.; Tayefi, M.; Darroudi, S.; Ghazizadeh, H.; Moohebbati, M.; Ebrahimi, M.; Heidari-Bakavoli, A.; et al. Association between Serum Uric Acid, High Sensitive C-Reactive Protein and pro-Oxidant-Antioxidant Balance in Patients with Metabolic Syndrome. *Biofactors* **2018**, *44*(3), 263–271, doi:10.1002/biof.1424.
243. Lanaspá, M.A.; Sánchez-lozada, L.G.; Choi, Y.; Cicerchi, C.; Kanbay, M.; Roncal-Jimenez, C.A.; Ishimoto, T.; Li, N.; Marek, G.; Duranay, M.; et al. Uric Acid Induces Hepatic Steatosis by Generation of Mitochondrial Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40732–40744, doi:10.1074/jbc.M112.399899.
244. Chang, C.C.; Wu, C.H.; Liu, L.K.; Chou, R.H.; Kuo, C. S.; Huang, P. H.; Chen, L. K.; Lin, S. J. Association between Serum Uric Acid and Cardiovascular Risk in Nonhypertensive and Nondiabetic Individuals: The Taiwan I-Lan Longitudinal Aging Study. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5234, doi:10.1038/s41598-018-22997-0.
245. Skrzep-Poloczek, B.; Poloczek, J.; Chełmecka, E.; Dulská, A.; Romuk, E.; Idzik, M.; Kazura, W.; Nabrdalik, K.; Gumprecht, J.; Jochem, J.; et al. The Oxidative Stress Markers in the Erythrocytes and Heart Muscle of Obese Rats: Relate to a High-Fat Diet but Not to DJOS Bariatric Surgery. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, *9*, doi:10.3390/antiox9020183.
246. Francik, R.; Kryczyk, J.; Krośniak, M.; Berköz, M.; Sanočka, I.; Francik, S. The Neuroprotective Effect of Cornus MAS on Brain Tissue of Wistar Rats. *ScientificWorldJournal.* **2014**, *2014*, 847368, doi:10.1155/2014/847368.
247. Otocka-Kmieciak, A. Effect of Carotenoids on Paraoxonase-1 Activity and Gene Expression. *Nutrients* **2022**, *14*(14), 2842, doi:10.3390/nu14142842.
248. Celep, E.; Aydın, A.; Kırmızıbekmez, H.; Yesilada, E. Appraisal of in vitro and in vivo antioxidant activity potential of cornelian cherry leaves. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 448–455, doi:10.1016/j.fct.2013.09.001.
249. Jia, N.; Li, T.; Diao, X.; Kong, B. Protective Effects of Black Currant (*Ribes Nigrum* L.) Extract on Hydrogen Peroxide-Induced Damage in Lung Fibroblast MRC-5 Cells in Relation to the Antioxidant Activity. *J. Funct. Foods* **2014**, *11*, 142–151, doi:10.1016/j.jff.2014.09.011.
250. Haghi, M.E.; Dehghan, G.; Banihabib, N.; Zare, S.; Mikaili, P.; Panahi, F. Protective Effects of Cornus Mas Fruit Extract on Carbon Tetrachloride Induced Nephrotoxicity in Rats. *Indian J. Nephrol.* **2014**, *24*, 291–296, doi:10.4103/0971-4065.133000.
251. Zurawska-Plaksej, E.; Grzebyk, E.; Marciniak, D.; Szymańska-Chabowska, A.; Piwowar, A.

- Oxidatively modified forms of albumin in patients with risk factors of metabolic syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* **2014**, *37*(9), 819–827, doi:10.1007/s40618-014-0111-8.
252. Venturini, D.; Hellen, C.; Alves, R.; Aparecida, S.; Souza, F. De; Barbosa, D.S. Increased Oxidative Stress According to Number of Risk Factors in Metabolic Syndrome Patients. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2015**, *7*, 1–2, doi:10.1186/1758-5996-7-S1-A134.
 253. Zhao, Y.; Fan, L.; Ouyang, X.; Jiang, Z.; Xie, Z.; Fan, L.; Zhu, D.; Li, L. Advanced Oxidation Protein Products Play Critical Roles in Liver Diseases. *J. Clin. Invest.* **2019**, *49*(6), e13098, doi:10.1111/eci.13098.
 254. Shevtsova, A.; Gordiienko, I.; Tkachenko, V.; Ushakova, G. Ischemia-Modified Albumin: Origins and Clinical Implications. *Dis. Markers* **2021**, *2021*, 9945424, doi:10.1155/2021/9945424.
 255. Marino, T.; Galano, A.; Russo, N. Radical Scavenging Ability of Gallic Acid toward OH and OOH Radicals. Reaction Mechanism and Rate Constants from the Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. B.* **2014**, *118*, 10380–10389, doi:10.1021/jp505589b.
 256. Obeidat, A.A.; Ahmad, M.N.; Haddad, F.H.; Azzeh, F.S. Leptin and Uric Acid as Predictors of Metabolic Syndrome in Jordanian Adults. *Nutr. Res. Pract.* **2016**, *10*, 411–417, doi:10.4162/nrp.2016.10.4.411.
 257. Bel, J.; Wójcicka, G.; Jamroz, A. Leptin Decreases Plasma Paraoxonase 1 (PON1) Activity and Induces Oxidative Stress: The Possible Novel Mechanism for Proatherogenic Effect of Chronic Hyperleptinemia. **2003**, *170*, 21–29, doi:10.1016/S0021-9150(03)00236-3.
 258. Mahbouli, S.; Vartanian, A. Der; Ortega, S.; Rougé, S.; Vasson, M.; Rossary, A. Leptin Induces ROS via NOX5 in Healthy and Neoplastic Mammary Epithelial Cells. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 3254–3264, doi:10.3892/or.2017.6009.
 259. Cheleschi, S.; Tenti, S.; Mondanelli, N.; Corallo, C.; Barbarino, M.; Giannotti, S.; Gallo, I.; Giordano, A.; Fioravanti, A. MicroRNA-34a and MicroRNA-181a Mediate Visfatin-Induced Apoptosis and Oxidative Stress via NF- κ B Pathway in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Cells* **2019**, *8*, 874, doi:10.3390/cells8080874.
 260. Choi, H.M.; Doss, H.M.; Kim, K.S. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1219, doi:10.3390/ijms21041219.
 261. Mishra, N.; Mohammed, A.; Rizvi, S.I. Efficacy of *Lepidium Sativum* to act as an anti-diabetic agent, *Prog. Health Sci.* **2017**, *7*(1), 44–53, doi:10.5604/01.3001.0010.1811.
 262. Kim, H.Y.; Okubo, T.; Juneja, L.R.; Yokozawa, T. The Protective Role of Amla (*Emblica Officinalis Gaertn.*) against Fructose-Induced Metabolic Syndrome in a Rat Model. *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 502–512, doi:10.1017/S0007114509991978.
 263. Ruxton, C.H.S.; Myers, M. Fruit Juices: Are They Helpful or Harmful? An Evidence Review. *Nutrients* **2021**, *13*, 1815, doi: 10.3390/nu13061815.
 264. Agarwal, S.; Fulgoni III, V.L.; Welland, D. Intake of 100% Fruit Juice Is Associated with Improved Diet Quality of Adults: NHANES 2013–2016 Analysis. *Nutrients* **2019**, *11*, 2513, doi:10.3390/nu11102513.

BIOGRAFIJA

Marija Paunović rođena je 27. juna 1990. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Školske 2009/2010 godine upisala je osnovne studije na Hemijskom fakultetu, smer Biohemija. Diplomirala je 8. oktobra 2014. godine, sa prosečnom ocenom 8.74, čime je stekla zvanje diplomirani biohemičar. Doktorske akademske studije upisala je školske 2017/2018. godine na modulu Integrisane nauke o ishrani na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od januara 2019. godine je zaposlena na Institutu za medicinska istraživanja, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u decembru 2021. godine. Dosadašnji naučno-istraživački rad Marije Paunović se odvijao u okviru projekata: „Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji“ (III 41030) i „Anti-inflamatorni dijetarni pristup kod pacijentkinja sa rakom dojke na terapiji inhibitorima aromataza - AID“, finansiranim od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija. Autorka je i koautorka 13 radova publikovanih u međunarodnim časopisima, od kojih 3 rada čine deo doktorske disertacije. Autorka je i koautorka 14 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova i skupova nacionalnog značaja. Dobitnica je godišnje nagrade za naučni rad mladog istraživača „Dr Vera i dr Dušan Kentera“ za 2023. godinu, koju dodeljuje Institut za medicinska istraživanja. Član je Društva za ishranu Srbije, Biohemijskog društva Srbije, kao i Evropskog udruženja za istraživanje raka (EACR).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Пауновић

број индекса Б3031/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање утицаја комерцијалних матичних сокова дрењине (*Cornus mas*) и црне рибизле (*Ribes nigrum*) на превенцију развоја метаболичког синдрома код пацова *Wistar* соја

- 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, 3. 9. 2024.

Рашковић М.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Пауновић

Број индекса Б3031/2017

Студијски програм Интегрисане науке о исхрани

Наслов рада

Испитивање утицаја комерцијалних матичних сокова дрењине (*Cornus mas*) и црне рибизле (*Ribes nigrum*) на превенцију развоја метаболичког синдрома код пацова *Wistar* соја

Менторке др Ива Лакић и др Сњежана Петровић

Потписане _____

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, 3. 9. 2024.

Јашмина М.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање утицаја комерцијалних матичних сокова дрењине (*Cornus mas*) и црне рибизле (*Ribes nigrum*) на превенцију развоја метаболичког синдрома код пацова *Wistar* соја

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прерада
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 3.9.2024.

Рашиновић М.

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 прерада.** 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 прерада.** 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.