



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Петар Милић

**ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ  
АРОНИЈЕ НА НАСТАНАК И РАЗВОЈ МЕТАБОЛИЧКОГ  
СИНДРОМА НА АНИМАЛНОМ МОДЕЛУ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Весна Вучић, научни саветник

Крагујевац, 2019. година

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Петар Милић
Датум и место рођења: 12.05.1966. године, Лесковац, Југославија
Садашње запослење: Академија васпитачко-медицинских струковних студија, одсек Ћуприја
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Испитивање ефеката дијете обogaћене екстрактом ароније на настанак и развој метаболичког синдрома на анималном моделу
Број страница: 106
Број слика: 12 слика, 21 графикон, 9 табела
Број библиографских података: 196
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): медицина
Ментор: Весна Вучић, научни саветник
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 17.05.2018. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-15/44 од 22.01.2019.године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармакологија и токсикологија</i>, председник;</li><li>2. Проф. Др Марина Томовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска технологија</i>, члан;</li><li>3. НС Александра Арсић, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Биохемија</i>, члан.</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармакологија и токсикологија</i>, председник;</li><li>2. Проф. Др Марина Томовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска технологија</i>, члан;</li><li>3. ВНС Александра Арсић, виши научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Биохемија</i>, члан.</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

Основн циљ ове студије био је да испита ефекте дијете обogaћене екстрактом ароније на настанак и развој метаболичког синдрома на анималном моделу. Наиме, 24 здравих пацова *Wistar albino* соја и 48 пацова истог соја, којима је претходно индукован метаболичким синдром, подвргнуто је различитим стратегијама које су подразумевале, исхрану са високих садржајем масти (*High Fat diet*, HFd) или стандардну исхрану (*Standard diet*, Sd) самостално, или у комбинацији са стандардизованим екстрактом ароније (*Standardized Aronia Extract*, SAE). SAE (у дози од 0,45 ml/kg дневно), као и наведени обрасци исхране примењивали су се током 4 недеље код пацова. У зависности од дијететског режима, пацови су насумично разврстани у шест група: здрави пацови храњени Sd (CTRL), здрави пацови храњени Sd уз примену екстракта (SAE), пацови са метаболичким синдромом храњени HFd (MetS+HFd), пацови са метаболичким синдромом храњени HFd уз примену екстракта (MetS+HFd+SAE), пацови са метаболичким синдромом храњени Sd (MetS+Sd), пацови са метаболичким синдромом храњени Sd уз примену екстракта (MetS+Sd+SAE). Резултати студије показали су да примењени екстракт ароније има способност да ублажи повећање телесне тежине код пацова са метаболичким синдромом, побољша функцију срца, допринесе бољој толеранцији на глукозу, повећа антиоксидационе и смањи прооксидационе параметре у системској циркулацији, ублажи промене на јетри и умањи нивое LDL холестерола код пацова са метаболичким синдромом. Међутим, битно је напоменути да су благотворнији ефекти испитиваног екстракта ароније бољи уколико се он комбинује са здравијим начином исхране, односно стандардном дијетом. Такође, промена дијететског режима са HFd на Sd са, или без примене испитиваног екстракта значајно је утицала на побољшање липидног профила и побољшање маснокиселинског профила код пацова, посебно омега 3 полинезасићених масних киселина (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), и односа омега 6 и омега 3 PUFA.

**Кључне речи:** метаболички синдром, стандардизовани екстракт ароније, оксидациони стрес, полинезасићене масне киселине

## ABSTRACT

The main objective of the present study was to investigate the effects of a diet enriched with Aronia extract on the development of metabolic syndrome in an animal model. Specifically, 24 healthy *Wistar albino* rats and 48 *Wistar albino* rats with induced metabolic syndrome, were subjected to different dietary strategies, which included high-fat diet (HFd) or standard diet (Sd) alone, or in combination with Standardized Aronia Extract (SAE). SAE (0.45 ml/kg daily), as well as the above-mentioned diet patterns, were administered in rats for 4 weeks. Depending on dietary regimen, rats were randomly classified into six groups: healthy rats fed with Sd (CTRL), healthy rats fed with Sd in combination with extract (SAE), rats with metabolic syndrome fed with HFd (MetS+HFd), rats with metabolic syndrome fed with HFd in combination with extract (MetS+HFd+SAE), rats with metabolic syndrome fed with Sd (MetS+Sd), rats with metabolic syndrome fed with Sd in combination with extract (MetS+Sd+SAE). The results of the study showed that applied Aronia extract can reduce weight gain in rats with metabolic syndrome, improve heart function, contribute to better glucose tolerance, increase antioxidant and reduce prooxidant in the systemic circulation, mitigate liver changes and decrease LDL cholesterol levels in rats with metabolic syndrome. However, it is important to note that obtained beneficial effects of SAE were more prominent in combination with a healthier diet (standard diet). Also, changing the dietary regimen from HFd to Sd with or without the extract consumption, significantly improve the lipid, and fatty acid profile in rats.

**Key words:** metabolic syndrome, standardized aronia extract, oxidative stress, polyunsaturated fatty acids

*Најсрдачније се захваљујем професору Владимиру Јаковљевићу, без чије помоћи израда ове докторске дисертације не би била могућа. Такође, хвала му што је препознао квалитет младих људи, мотивисао их и окупио у тим, који се, са великом одговорношћу, а пре свега љубављу баве науком. Стога, посебну захвалност дугујем члановима Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију, на енергији, времену и несебичности коју су уложили у реализацију овог пројекта.*

*Велику захвалност дугујем и свом ментору, научном саветнику Весни Вучић, на несебичној помоћи током израде ове докторске дисертације.*

*Такође, захваљујем се и члановима комисије, председнику професору Драгану Миловановићу, професорки Марини Томовић и вишем сараднику Александри Арсић, који су својим сугестијама допринели квалитету ове докторске дисертације.*

*Велико хвала компанији Phartanova на логистичкој подрици.*

*Хвала Христосу Алексопулосу на интересовању, подрици и помоћи током целокупног периода израде доктората.*

*Хвала Цици, мојој супрузи, која увек мене и моје обавезе ставља испред својих.*

*Петар Милић*

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b>	<b>2</b>
<b>1.1. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ</b>	<b>2</b>
1.1.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	3
1.1.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	4
1.1.3. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	5
1.1.4. КОМПЛИКАЦИЈЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	7
<b>1.2. ЛЕЧЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА</b>	<b>9</b>
1.2.1. НЕФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	9
1.2.1.1. Физичка активност у циљу лечења метаболичког синдрома	9
1.2.1.2. Промене у навикама исхране у циљу лечења метаболичког синдрома	10
1.2.1.3. Фитонутријенси и биоактивна једињења у циљу лечења метаболичког синдрома	13
1.2.1.4. Дијета обogaћена екстрактом ароније у циљу лечења метаболичког синдрома	17
1.2.1.4.1. Фармаколошки ефекти ароније	18
1.2.2. ФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА	20
<b>1.3. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС</b>	<b>21</b>
<b>2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b>	<b>24</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	<b>26</b>
<b>3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ</b>	<b>26</b>
<b>3.2. ХРОНИЧНИ ПРОТОКОЛ СТУДИЈЕ</b>	<b>26</b>
<b>3.3. ВАРИЈАБЛЕ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ</b>	<b>29</b>
3.3.1. ТЕЛЕСНА ТЕЖИНА ПАЦОВА	29
3.3.2. ФУНКЦИЈА СРЦА ПАЦОВА	29
3.3.3. ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ	32
3.3.4. ЛИПИДНИ ПРОФИЛ	32
3.3.5. МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ	32
3.3.6. НИВОИ ГВОЖЂА	33
3.3.7. ПАРАМЕТРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА	34
3.3.8. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА СРЦА, ЈЕТРЕ, БУБРЕГА И ПАНКРЕАСА	34
<b>3.4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА</b>	<b>35</b>
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>	<b>37</b>
<b>4.1. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ПРОМЕНУ ТЕЛЕСНЕ ТЕЖИНЕ ПАЦОВА</b>	<b>37</b>
<b>4.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>38</b>
<b>4.3. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ КОД ПАЦОВА</b>	<b>46</b>
<b>4.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА</b>	<b>48</b>
<b>4.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА</b>	<b>49</b>

<b>4.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА</b>	<b>- 57 -</b>
<b>4.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА</b>	<b>- 58 -</b>
<b>4.8. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ХИСТОПАТОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ ПОЈЕДИНИХ ТКИВА</b>	<b>- 65 -</b>
4.8.1. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ МИОКАРДА	- 65 -
4.8.2. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ЈЕТРЕ	- 67 -
4.8.3. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ БУБРЕГА	- 69 -
4.8.4. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ПАНКРЕАСА	- 71 -
<b>5. ДИСКУСИЈА</b>	<b>- 74 -</b>
<b>5.1. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ПРОМЕНУ ТЕЛЕСНЕ ТЕЖИНЕ ПАЦОВА</b>	<b>- 74 -</b>
<b>5.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА</b>	<b>- 74 -</b>
<b>5.3. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ КОД ПАЦОВА</b>	<b>- 77 -</b>
<b>5.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА</b>	<b>- 78 -</b>
<b>5.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА</b>	<b>- 79 -</b>
<b>5.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА</b>	<b>- 81 -</b>
<b>5.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА</b>	<b>- 82 -</b>
<b>5.8. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ХИСТОПАТОЛОГИЈУ ТКИВА МИОКАРДА, ЈЕТРЕ, БУБРЕГА И ПАНКРЕАСА</b>	<b>- 84 -</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b>	<b>- 87 -</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>- 89 -</b>

# I

## УВОД



## 1. УВОД

### 1.1. МЕТАБОЛИЧКИ СИНДРОМ

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

Према дефиницији Светске Здравствене Организације (*World Health Organization*) из 1994. године, дијагноза метаболичког синдрома може се поставити код пацијената који уз дијабетес мелитус тип 2 и/или инсулинску резистенцију или поремећену толеранцију на глукозу имају присутна два или више од следећих критеријума: триглицериди (TG)  $\geq 1,7$  mmol/L, липопротеин високе густине (HDL)  $< 0,9$  mmol/L код мушкараца, односно  $< 1,0$  mmol/L код жена; микроалбуминурија  $> 20$  ug/min, тј. однос албумина и креатина  $> 30$  mg/g; систолни крвни притисак (*systolic blood pressure*, SBP)  $\geq 140$  mmHg и дијастолни крвни притисак (*diastolic blood pressure*, DBP)  $\geq 90$  mmHg; централна гојазност коју карактерише BMI (*body mass index*)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> или однос струка и кукова  $> 0,90$  код мушкараца, односно  $> 0,85$  код жена (2). Европска група за инсулинску резистенцију (*European Group of Insulin Resistance*) је 1999. године објавила да се метаболички синдром може дијагностиковати код пацијената који уз инсулинску резистенцију имају још два од следећих критеријума: централна гојазност, односно обим струка  $\geq 94$  cm код мушкараца, односно  $\geq 80$  cm код жена; TG  $\geq 2,0$  mmol/L и HDL  $< 1,0$  mmol/L; SBP  $\geq 140$  mmHg и DBP  $\geq 90$  mmHg; глукоза наште  $\geq 6,1$  mmol/L (3). Према Националном програму за едукацију и третман холестерола (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*), који је објављен 2001. године, метаболички синдром се може дијагностиковати код пацијената са присутним, најмање три, од следећих критеријума: централна гојазност, односно обим струка  $\geq 102$  cm код мушкараца, односно  $\geq 88$  cm код жена; TG  $\geq 1,7$  mmol/L и HDL  $< 1,03$  mmol/L код мушкараца, односно  $< 1,3$  mmol/L код жена; SBP  $\geq 130$  mmHg и DBP  $\geq 85$  mmHg; глукоза наште  $\geq 6,1$  mmol/L (4). Ови критеријуми потврђени су и 2005. године од стране Америчке асоцијација за срце (*American Heart Association*) и Националног института за срце, плућа и крв (*National Heart, Lung, and Blood Institute*) (5). Исте године (2005.) Интернационална федерација за дијабетес (*International Diabetes Federation*) је пружила

своју дефиницију која се од претходне разликовала само у следећим критеријумима: обим струка  $\geq 94$  cm код мушкараца, односно  $\geq 80$  cm код жена; глукоза наше  $\geq 5,6$  mmol/L или постављена дијагноза за тип 2 дијабетес мелитуса (6).

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

### 1.1.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

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

Повишен крвни притисак, односно хипертензија је још једна од неизоставних карактеристика метаболичког синдрома која обично укључује сужење артерија и издваја се као најважнији фактор ризика за кардиоваскуларна, ренална и друга хронична, незаразна обољења. Постоје различите класификације хипертензије и оне се махом разликују само у граничним вредностима. Међутим, битно је напоменути да се у новијим класификацијама уводи и термин "предијабетес" који подразумева вредности SBP у опсегу од 120 до 139 mmHg и/или DBP у опсегу од 80 до 89 mmHg. Ово је посебно важно када је реч о метаболичком синдрому, јер већина пацијената заправо има прехипертензију или евентуално хипертензију првог степена (11, 12).

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

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

### 1.1.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

Имајући у виду да постоје различите дефиниције и критеријуми за постављање дијагнозе метаболичког синдрома, веома је тешко прецизно одредити преваленцију за овај синдром. На основу новијих података из литературе може се приметити да преваленција метаболичког синдрома расте паралелно уз гојазност, а посебно су погођене особе које живе у развијеним земљама, а имају нездраве животне навике, као

што су седентерни начин живота, конзумација цигарета и алкохола, нездрава исхрана, нижи социоекономски статус и друге (18, 19). Сматра се да данас широм света постоји пандемија гојазности, како код деце и адолесцената, тако и код одраслих. Ова пандемија није заобишла ни Србију, а посебно забрињава чињеница што је драстичан пораст преваленције у последњих неколико година примећен код деце. Наиме, преваленција за предгојазност код деце се повећала за десетак процената, док се преваленција за гојазност готово удвостручила у периоду од 2006. до 2013. године (20).

### 1.1.3. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

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

Према Светској Здравственој Организацији препоручена дневна количина воћа и поврћа је око 400 g, односно пет порција. Сматра се да уколико би се повећао унос воћа и поврћа, преваленција исхемијске болести би се смањила за 31%, а церебралног инсульта за 11%. Уз то, нездрава исхрана, махом сачињена од масти и шећера, доприноси развоју метаболичког синдрома, али и свих кардиометаболичких и малигних обољења. Промене у навикама исхране у многоме могу побољшати квалитет живота, али и спречити или допринети лечењу метаболичког синдрома (22).

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

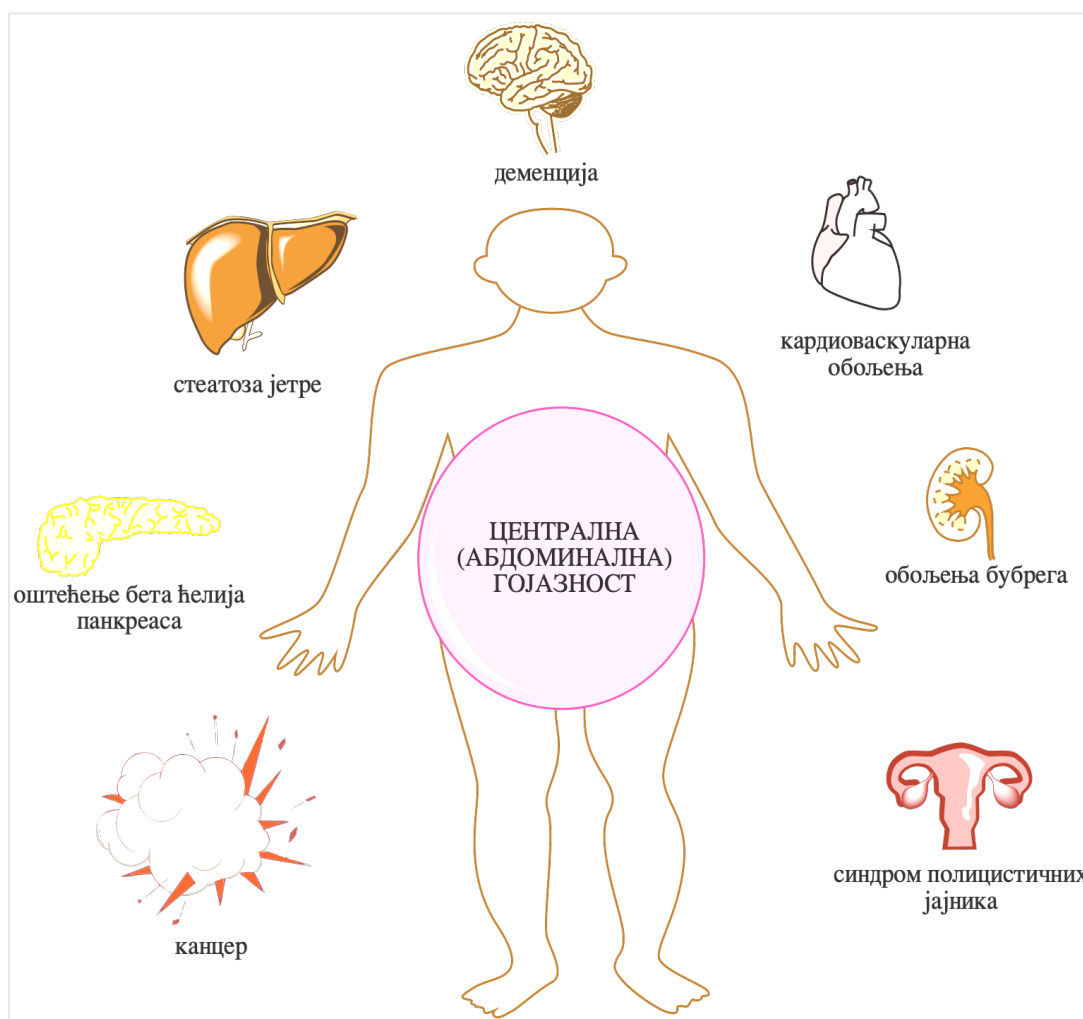
гојазност, дијабетес мелитус тип 2, обољења коштаног зглобног система, карциноме дебелог црева и дојке, депресију и друге психолошке болести (24).

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

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

## 1.1.4. КОМПЛИКАЦИЈЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

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



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

Сматра се да пацијенти са метаболичким синдромом имају и до три пута већи ризик за настанак кардиоваскуларних и обољења бубрега, од особа које немају метаболички синдром. Имајући у виду да све компоненте метаболичког синдрома директно или индиректно могу да погоршају морфологију и функцију срца, крвних судова и бубрега, ова чињеница је потпуно очекивана (28, 29).

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

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

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

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

Хронично повећање телесне тежине и адипоцита доводи до неурохормоналних промена и адаптацији кардиоваскуларног система. Као последице настају поремећаји у активацији ренин ангиотензин алдостерон система, повећане концентрације адипоцитокина, проинфламацијских цитокина и активације симпатичког нервног система. Такође, дисбаланс између прооксиданаса и антиоксиданаса који фаворизује настанак оксидационог стреса у комбинацији са инфламацијом блажег степена, одговоран је за бројне компликације и даљу прогресију свих компоненти метаболичког синдрома. Услед системске инфламације и хиперкоагубилности, може доћи до настанка плака који повећавају ризик од нежељених кардиоваскуларних обољења (38, 39). Када је реч о молекуларном механизму који је одговоран за наведене компликације, не сме се заборавити ни улога  $\text{Ca}^{2+}$  канала који утичу на функционалну експресију  $\text{Ca}^{2+}$  АТФ-азе саркоплазматског ретикулума (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium* ( $\text{Ca}^{2+}$ ) АТPase

2а - SERCA2а) и рианодинских рецептора који директно утичу на дисфункцију бета ћелија панкреаса (40, 41).

## 1.2. ЛЕЧЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

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

### 1.2.1. НЕФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

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

#### 1.2.1.1. Физичка активност у циљу лечења метаболичког синдрома

Према Програму за превенцију дијабтеса (*Diabetes Prevention Program regimen*) из 2000. године, физичка активност у трајању од 150 минута недељно уз здравије навике у исхрани, значајно може да утиче на смањење симптома метаболичког синдрома, као и да успори његов развој. Оно што је битно напоменути је да се код особа са метаболичким синдромом или код повећаог ризика од настанка, саветује умерена физичка активност која подразумева ходање, односно шетању, а у зависности од стања, година и других индивидуалних карактеристика пацијента, препоручује се и вожња бицикла, трчање, пливање и сличне активности. Сматра се да свака физичка активност у трајању од најмање 30 минута, која ангажује више група скелетних мишића представља добар почетак за све пацијенте који су гојазни, без обзира на њихове године (43).



### 1.2.1.2. Промене у навикама исхране у циљу лечења метаболичког синдрома

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

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

Медитеранска дијета је веома популарна последњих пар година, а подразумева повећан унос маслиновог уља уз исхрану богату воћем, поврћем, цералијама, легуминозама, орашастим плодовима, житарицама, умерену конзумацију млечних производа, рибе и црног вина и веома ретку конзумацију слаткиша и црвеног меса. Висока количина влакана уз антиоксидансе и антиинфламационе нутријенте (омега 3 масне киселине, олеинска киселина, фенолна једињења) су одговорни за све позитивне ефекте ове дијете (49, 50). Према многим објављеним научноистраживачким студијама, медитеранска дијета је веома ефикасна у превенцији и лечењу метаболичког синдрома јер смањује нивое LDL холестерола, TG, и повећава нивое HDL холестерола (51, 52). Поред тога што овакав начин исхране смањује ризик за настанак дијабетес мелитуса тип

2 и гојазности (53, 54), значајно се смањује и ризик за настанак кардиоваскуларних обољења (55).

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

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

Повећање броја obroka (*high mineral frequency pattern*) је један од новијих образаца исхране који је веома популаран код спортиста. Циљ овог начина исхране је да се дневни енергетски унос раздели у више мањих obroka који би се чешће конзумирали. У појединим студијама показано је да се на овај начин смањује телесна тежина, ВМІ, проценат масног ткива, које последично доводе до смањење ризика од настанка дијабетес мелитуса тип 2 и коронарних болести срца (63-65). Са друге стране, у појединим студијама је показано да овакав начин исхране не доводи до споменутих бенефита и све претпоставке о механизмима су оповргнуте (66, 67). Наиме, прво се претпоставило да се на овај начин повећава енергија која се троши у току дана, али је у појединим студијама доказано да ова претпоставка није тачна (68). Друга претпоставка

је била да се на основу повећања броја obroка смањују осцилације у нивоу глукозе и побољшава контрола апетита. Ова претпоставка је доказана, али само код гојазних пацијената, док код оних који нису имали проблема у тежини, резултати су и даље недоследни (69).

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

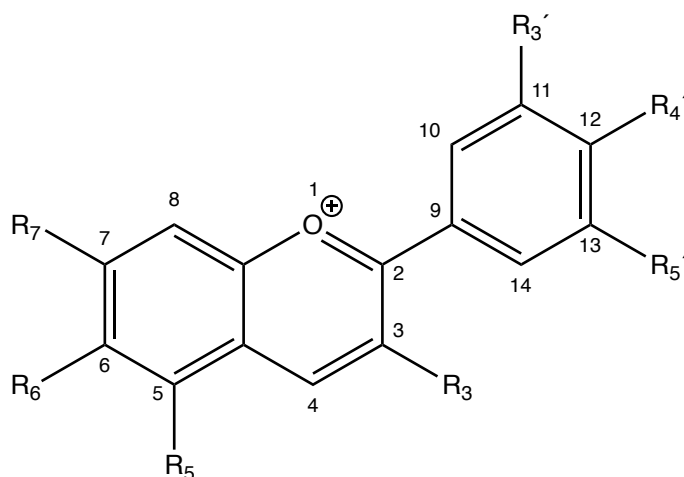
Протеинска дијета своје бенефите највероватније остварује кроз повећање термогенезе и повећање ситости. Повећање термогенезе се објашњава синтезом пептидних веза, повећаном продукцијом урее и глуконеогенезе, који захтевају утросак веће количине енергије, док се повећање ситости објашњава повећањем нивоа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

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

### 1.2.1.3. Фитонутријенси и биоактивна једињења у циљу лечења метаболичког синдрома

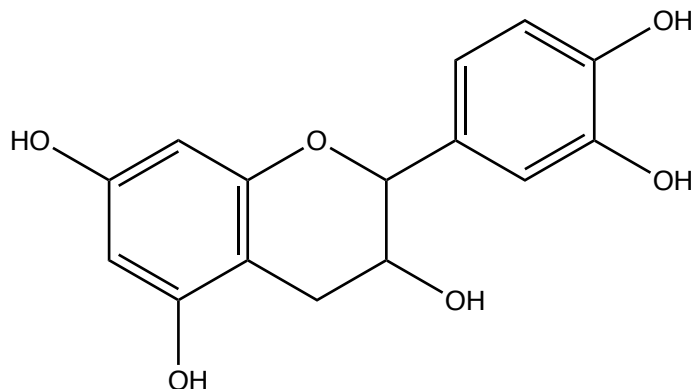
Према најновијим литературним подацима, последњих неколико година у фокусу научних истраживања налазе се биоактивна једињења, односно нутритијенти који су ефикасни у лечењу метаболичког синдрома и спречавању настанка компликација (77).

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



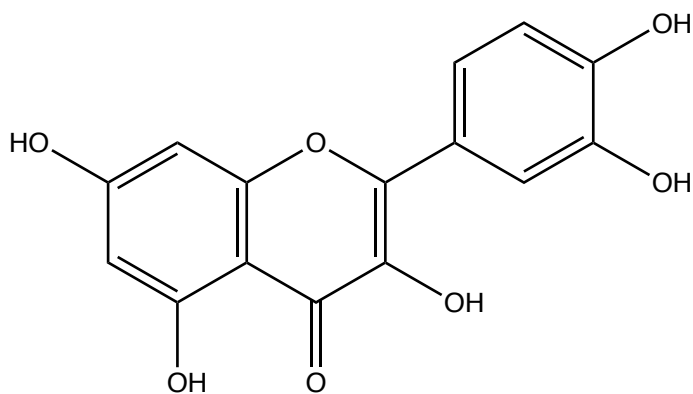
Слика 2. Општа структура антоцијанина

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



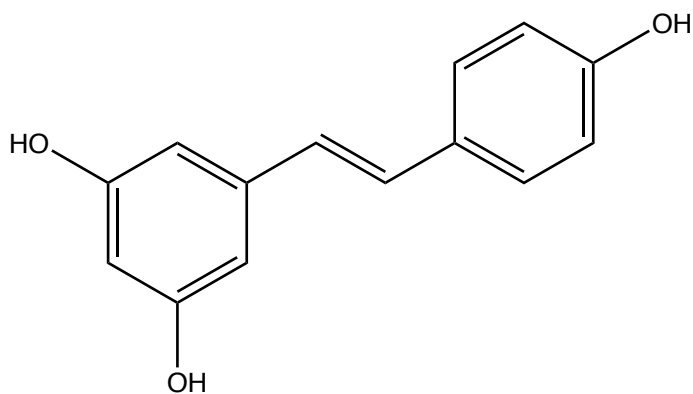
Слика 3. Структура катехина

Кверцетин је један од значајнијих биофлавоноида, често се сматра њиховим представником, а присутна је у већем броју воћа, поврћа, лишћа, житарица, као и у зеленом чају и црвеном вину (Слика 4). С обзиром да има велики број позитивних ефеката, сматра се да може да побољша симптоме метаболичког синдрома. Као један од најзначајнијих ефеката који постиже, издваја се антиоксидациони капацитет који постиже тако што инхибира липидну пероксидацију и повећава антиоксидационе параметре попут супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GSX) и редукованог глутатиона (GSH) (85). Антиинфламацијски ефекат постиже тако што умањује нивое NFκB, TNF-α, интерлеукина (6, 1 бета, 8), митогеном активирани протеин киназу (MAPK) и генску експресију за моноцитни хемоатрактантни протеин 1 (86). Позитивне ефекте на гојазност постиже јер активира AMP активирани протеин киназу и смањује експресију за ССААТ везујући протеин алфа (С/ЕВРα) и стерол регулаторни протеин 1 (SREBP-1) (87). Антидијабетски ефекат постиже тако што инхибира глукозни транспортер 2 (GLUT2) и фофатидилинозитол 3 киназу зависну од инсулина (PI3K) и блокира тирозин киназу (88). Са друге стране, антихипертензивни ефекат постиже тако што повећава концентрацију ендотелне азот моноксид синтазе (eNOS) и смањује агрегацију тромбоцита, чиме се директно побољшава функција ендотела (89).



Слика 4. Структура кверцетина

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

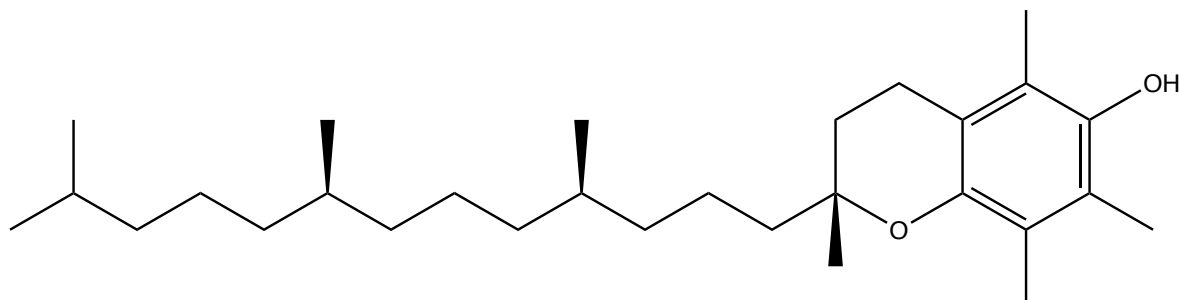


Слика 5. Структура ресвератрола

Поред споменутих полифенола значајне протективне улоге имају и различити витамини.

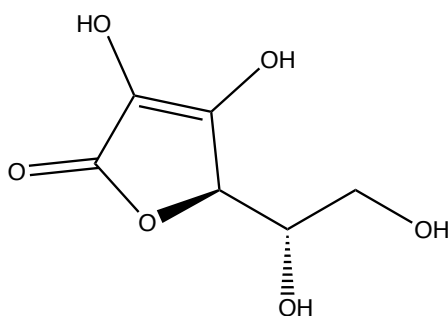
Токоферол, познат као витамин Е, убраја се у групу липосолубилних једињења који се могу пронаћи у уљима, орашастим плодовима и зрневљу (Слика 6). Витамин Е

спречава многа метаболичка обољења и убраја се у веома ефикасне антиоксидансе, инхибира пероксидацију фосфолипидне мембране и спречава продукцију слободних радикала (96). Показује и значајне антиоксидационе ефекте тако што смањује продукцију CRP, интерлеукина 8, цитокина, а уз то инхибира циклооксигеназу и протеин киназу C (97). Због ових протективних ефеката често се саветује његова употреба код пацијената са метаболичким синдромом или код повећаног ризика од његовог настанка (96-98).



Слика 6. Структура токоферола

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



Слика 7. Структура аскорбинске киселине

#### 1.2.1.4. Дијета обogaћена екстрактом ароније у циљу лечења метаболичког синдрома

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

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

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

*Aronia melanocarpa* је веома богата фармаколошки активним супстанцама међу којима су значајнији полифеноли, посебно антоцијанини (којих има од 0,6 до 2 %) и процијанидини (којих има од 0,66 до 5,18 %), затим фенолна киселина и танини. Такође, у себи садржи и значајну количину сахарозе (око 15 g на 100 g ароније), шећерног алкохола (сорбитол), дијететска влкна (око 5 g на 100 g ароније), масти (око 0,1 g на 100 g ароније) и протеина (око 0,7 g на 100 g ароније) (104, 105). *Aronia melanocarpa* значајан је извор минерала од којих се у највећој количини налазе калијум и цинк, а у мањим концентрацијама се налазе и натријум, калцијум, магнезијум и гвожђе. Од витамина најзначајније је присуство витамина B<sub>1</sub> (25-90  $\mu\text{g}$  на 100 ml ароније), B<sub>2</sub> (25-110  $\mu\text{g}$  на 100 ml ароније), B<sub>6</sub> (30-85  $\mu\text{g}$  на 100 ml ароније), витамина C (5-100  $\mu\text{g}$  на 100 ml ароније), ниацина (100-550  $\mu\text{g}$  на 100 ml ароније), пантотенске киселине (5-38  $\mu\text{g}$  на 100 ml ароније) и у мањим количинама су присутне и фолна киселина,  $\alpha$  и  $\beta$  токоферол и каротеноиди. Наведене концентрације највише зависе од облика у коме се примењује



али и од многих других особина које могу да утичу на квалитет биљке попут, поднебља у коме је расла, години, начину чувања и многих других (106, 107).

#### 1.2.1.4.1. Фармаколошки ефекти ароније

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

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

Као ефикасан антиоксидант, *Aronia melanocarpa* постиже значајне ефекте и на редокс равнотежу. Повећавајући активност редукованог глутатиона (GSH), аронија значајно штити срчано ткиво код мишева третираних доксорубицином (115). С обзиром да у себи садржи веће концентрације хлорогенске киселине, рутина, хиперозида и кверцетина, конзумирање ароније и екстракта богатих овим бобичастим воћем повезано је са смањењем липидне пероксидације и прооксидационог баланса уз повећање укупног антиоксидационог капацитета (116).

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

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

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

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

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

### 1.2.2. ФАРМАКОЛОШКИ ПРИСТУП У ЛЕЧЕЊУ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА

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

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

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

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

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

### 1.3. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС

Оксидациони стрес представља поремећај равнотеже између прооксиданаса и антиоксиданаса, која може настати као последица смањене антиоксидационе заштите и/или повећане продукције слободних радикала. Нестабилни и јако реактивни молекули, атоми или јони који у атомској орбитали садрже неспарене електроне, могу се понашати као оксидациона или редукциона средства, у зависности од тога да ли ће прихватити или доносити електрон. Ови секундарни гласници називају се слободни радикали, а настају током метаболичких реакција ћелија и као резултат излагања спољашњим факторима (126, 127). Слободни радикали интерагују са биомолекулима при чему долази до оксидационо-редукционог стреса ћелије који даље доводи до каскадних реакција и процеса.

Редокс стање ћелија има значајну улогу у регулацији функционисања ћелија и може покренути пролиферацију и активацију ћелија (позитиван утицај), или пак инхибицију раста и ћелијску смрт (негативан одговор) (126). Односно, у ниским, физиолошким концентрацијама имају улогу у сигнализацији и функционисању ћелија и митохондрија, а у високим концентрацијама нарушавају хомеостазу и оштећују ћелије. У биолошким системима прооксиданси су најчешће кисеоничне и азотне реактивне врсте, међу којима се разликују нерадикалске и радикалске честице (128). У реактивним врстама кисеоника, као радикалске честице издвајају се супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), хидроксил радикал ( $OH^{\cdot}$ ), пероксил радикал ( $ROO^{\cdot}$ ), алкоксил радикал ( $RO^{\cdot}$ ) и хидропероксил радикал ( $HOO^{\cdot}$ ), док се у нерадикалским честицама издвајају водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), хипохлорна киселина ( $HOCl$ ) и озон ( $O_3$ ). При чему је њихова главна улога у контроли продукције еритропоетина, релаксацији глатке мускулатуре и сигналној трансдукцији преко различитих мембранских рецептора (129). Са друге стране, у реактивним врстама азота, као радикалске честице издвајају се азот-моноксид радикал ( $NO^{\cdot}$ ) и азот-диоксид радикал ( $NO_2^{\cdot}$ ), док се у нерадикалским честицама издвајају пероксинитрит анјон ( $OONO^-$ ) и алкил пероксинитрит ( $ROONO$ ). Њихова главна улога је у релаксацији глатке мускулатуре, односно контроли васкуларног тонуса (130).

Да би се штетни ефекти прооксиданаса неутралисали, код аеробних организама развијен је ензимски и неензимски систем антиоксидационе заштите. Најзначајнији ензимски ендогени антиоксиданси су супероксид дизмутаза (SOD), каталаза (CAT),

глутатион пероксидаза (GPx) и глутатион редуктаза (GR), а неензимски  $\beta$ -каротен, витамин C, редуковани глутатион (GSH) и  $\alpha$ -токоферол. Од свих наведених, у примарној заштити организма учествују SOD, CAT и глутатиони (GPx, GR и GSH) (131, 132). Умањена ензимска функција код кардиоваскуларних обољења још увек није у потпуности разјашњена, али на основу епидемиолошких студија може се приметити да и генске варијације могу допринети развојем појединих обољења (133). Судаћи по резултатима бројних студија, оксидациони стрес повезан је са развојем кардиоваскуларних болести, али узрочно-последична веза и даље није потпуно разјашњена. Високе концентрације прооксиданаса оштећују макромолекуле, нарушавају сигнализације васкуларног зида и хомеостазу калцијума, што се манифестује аритмијама и срчаним ремоделовањем. Међутим, поред повећане продукције реактивних азотних и кисеоничних врста, смањене антиоксидационе резерве, такође представљају значајан фактор ризика за настанак бројних кардиоваскуларних обољења (133, 134).

**II**

**ЦИЉЕВИ**

**ИСТРАЖИВАЊА**

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

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

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

**III**  
**МАТЕРИЈАЛ**  
**И МЕТОДЕ**



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

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

Студија је спроведена на 72 пацова, *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 8 недеља, просечне телесне масе око  $200 \pm 20$  грама. Експерименталне животиње су биле чуване у строго контролисаним условима, при чему је температура у виваријуму износила  $25^{\circ}\text{C}$ , док се циклус светлост-тама мењао на 12-12 часова. Услови чувања су били према прописима Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

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

#### 3.2. ХРОНИЧНИ ПРОТОКОЛ СТУДИЈЕ

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

- **CTRL** – контролна група здравих пацова која је током читавог експерименталног периода храњена стандардном храном;
- **SAE** – контролна група здравих пацова која је храњена стандардном храном у комбинацији са екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола;
- **MetS+HFd** – група пацова са метаболичким синдромом која је током читавог експерименталног периода храњена храном обогаћеном липидима;
- **MetS+HFd+SAE** – група пацова са метаболичким синдромом која је током читавог експерименталног периода храњена храном обогаћеном липидима, а последње четири недеље у образац исхране је додат екстракт ароније са стандардизованим процентом полифенола;

- **MetS+Sd** – група пацова са метаболичким синдромом која је храњена храном обогаћеном липидима до тренутка изазивања метаболичког синдрома, а након тога се наставило са стандардном храном;
- **MetS+Sd+SAE** – група пацова са метаболичким синдромом која је храњена храном обогаћеном липидима до тренутка изазивања метаболичког синдрома, а након тога се наставило са стандардном храном у комбинацији са екстрактом ароније са стандардизованим процентом полифенола.



Слика 8. Протокол студије

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

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

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

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

Групе које су у свом називу имале MetS, заправо су чиниле пацови којима је претходно био изазван метаболички синдром (*Metabolic syndrome*, MetS). Метаболички синдром, изазиван је код пацова према добро проученом и више пута потврђеном протоколу. Наиме, пацови су током месец дана (од почетка прве до краја четврте недеље) храњени храном обogaћеном липидима (HFd) након чега им је интраперитонеално инјектован стрептозотоцин у дози од 25 mg/kg телесне тежине (135). Три дана након примене стрептозотоцина проверавано је да ли је изазван метаболички синдром код пацова. Само они пацови код којих су параметри били у следећем рангу SBP  $\geq$  140 mmHg, DBP  $\geq$  85 mmHg, гликемија наште  $\geq$  7 mmol/L, инсулин наште  $\geq$  150  $\mu$ U/ml, били су укључени у студију и сматрали су се пацовима са метаболичким синдромом.

### 3.3. ВАРИЈАБЛЕ МЕРЕНЕ У СТУДИЈИ

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

#### 3.3.1. ТЕЛЕСНА ТЕЖИНА ПАЦОВА

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

ВМІ индекс се израчунавао као однос измерене телесне тежине (g) и квадриране вредности телесне дужине (cm<sup>2</sup>). Телесна дужина се мерила између њушке и аналног отвора. *Lee* индекс се израчунавао као кубни корен односа телесне тежине (g) и телесне дужине (cm).

#### 3.3.2. ФУНКЦИЈА СРЦА ПАЦОВА

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

Репна плетизмографија представља неинвазивну методу за мерење крвног притиска пацова (*Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R)*, *IITC Life Science Inc. USA*) и помоћу ове методе добијене су вредности SBP, DBP као и фреквенца срца (HR) (136).

Ехокардиографија је спроведена на *Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, Massachusetts)* апарату, помоћу кога су добијене вредности дебљине зида

интервентрикуларног септума на крају дијастоле (*interventricular septal wall thickness at end diastole*, IVSd), унутрашње димензије леве коморе на крају дијастоле (*left ventricle internal dimension at end diastole*, LVIDd), дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле (*left ventricle posterior wall thickness at end diastole*, LVPWd), као и дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле (*interventricular septal wall thickness at end systole*, IVSs), унутрашња димензија леве коморе на крају систоле (*left ventricle internal dimension at end systole*, LVIDs), дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле (*left ventricle posterior wall thickness at end systole*, LVPWs) и проценат фракционог скраћења (*fractional shortening*, FS) (137).

Након хроничног протокола, животиње су анестезиране интраперитонеалном инјекцијом која је садржала комбинацију кетамина (10 mg/kg) и ксилазина (5 mg/kg) и жртвоване, а изолована срца су постављена на *Langendorff*-ов апарат за ретроградну перфузију. Срца су перфундована загрејаним (37 °C), гасираним (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> = 95:5) *Krebs-Henseleit*-овим раствором (pH 7,4) који је у себи имао адекватне количине NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O и глукозе.

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

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

Након периода стабилизације (период у коме се срце ”прилагођава” сензору и успоставља константне вредности свих параметара) отпочиње се са *ex vivo* протоколом на *Langendorff*-овом апарату. Најпре се коронарни перфузиони притисак (CPR) постављен на 60 cm воденог стуба (cmH<sub>2</sub>O), након чега се постепено повећава на 80 cmH<sub>2</sub>O, 100 cmH<sub>2</sub>O и 120 cmH<sub>2</sub>O, а онда смањује на 40 cmH<sub>2</sub>O и опет постепено повећава од 40 cmH<sub>2</sub>O до 120 cmH<sub>2</sub>O. Први циклус (60-80-100-120-40 cmH<sub>2</sub>O) назван је протокол промене притиска 1 (PCP 1), а други циклус (од 40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) назван је протокол промене притиска 2 (PCP 2). Приликом промене са једног на други притисак, води се рачуна да прође најмање 5 минута, односно да се на срце испољи ефекат промене

притиска. Упоредјујући вредности прилоком РСР 1 и РСР 2, добијају се информације о функцији срца. Да би се испитали ефекти различитих исхрана, поређено је процентуално смањење (-), односно процентуално повећање (+) између РСР 1 и РСР 2.

На сваком коронарном перфузионом притиску у епрувете је прикупљан коронарни венски ефлуент, који је до даљих анализа чуван на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Анализе коронарног венског ефлуента подразумевале су мерење прооксидационих параметара: нитрити ( $\text{NO}_2^-$ ), индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS), супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). С обзиром да су се за одређивање ових параметара користиле стандардне, више пута детаљно описане процедуре које се користе у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, само ће се кратко описати поступци и таласне дужине на којима су апсорбанце мерене.

Ниво нитрита је одређиван као индекс продукције азот монооксида у *Griess*-овом реагенсу. Ова метода је првенствено приказана у студији *Green* и сарадника који су детаљно описали протокол по коме се могу одредити нивои нитрита мерећи апсорбанцу узорка на таласној дужини од  $543\text{ nm}$  (138).

Индекс липидне пероксидације мерен је индиректно преко TBARS нивоа, према методи по *Ohkawa*-у која је подразумевала да се у 1% тиобардитурну киселину која се налазила у  $0,05\text{ M NaOH}$  пипетира адекватна количина плазме, након чега се такви узорци инкубирају на  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 15 минута, а апсорбанца мери на таласној дужини од  $530\text{ nm}$  (139).

Нивои супероксид анјон радикала мерени су у реакцији нитро тетразолијум плавог при чему настаје нитро формазон плави. Након реакције коју је омогућила есејна смеша која је додата у узорке, апсорбанца је мерена три пута на таласној дужини од  $550\text{ nm}$  уз мешање (140).

Мерење нивоа водоник пероксида у узорцима плазме, заснива се на оксидацији фенол црвеног у реакцији која је катализована *horseradish* пероксидазом. За одређивање водоник пероксида користи се модификована метода по *Pick*-у (141).

### 3.3.3. ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЋЕЊА ГЛУКОЗОМ

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

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

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

### 3.3.4. ЛИПИДНИ ПРОФИЛ

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

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

### 3.3.5. МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ

Маснокиселински профил одређиван је у плазми пацова модификованом методом *Glaser*-а и његових сарадника која је објављена 2010. године (142). Ова метода подразумева следеће кораке: у 100 µl плазме додато је 1,5 ml хлороводоничне киселине

која се налазила у метанолу (3 М HCl у метанолу), након тога су узорци икубирани 45 минута на 85 °C и остављени на собној температури да се охладе. У узорке је затим додато 1000  $\mu$ l хексана, а након пар секунди на вортексу, узорци су центрифугирани 10 минута на 1800 g. Слој са хексаном (око 600  $\mu$ l) је остављен да упари до сува, након чега је у њих додато још 100  $\mu$ l хексана. 10  $\mu$ l од овог узорка је инјектовано у гасни хроматограф (*Shimadzu 2014*) са капиларном колоном RESTEK Rtx 2330, 60 m, 0,25 mm, 0,2  $\mu$ m. Температура се кретала у одсегу од 140 до 210 °C током 3 минута.

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

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

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

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

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

### 3.3.6. НИВОИ ГВОЖЂА

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



### 3.3.7. ПАРАМЕТРИ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА

У плазми пацова одређивани су исти прооксидациони параметри као што су одређивани у коронарном венском ефлуенту:  $\text{NO}_2^-$ , TBARS,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Методе за одређивање ових параметара у плазми заснивале су се на методама које су коришћене за одређивање њихових нивоа у коронарном венском ефлуенту изолованог срца пацова (138-141), при чему су коришћени протоколи мало модификовани и прилагођени узорцима плазме.

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

Активност каталазе је мерена према методи по *Beutler*-у на таласној дужини 360 nm у узорцима који су били разблажени водом и етанолом да би се уклонио хемоглобин (143).

Активност супероксид дисмутазе је мерена епинефринском методом коју су у својој студији детаљно описали *Misra* и *Fridovich*, а подразумевала је мерење апсорбанце узорака на таласној дужини од 470 nm (144).

Метода за одређивање редукованог глутатиона заснивала се на GSH оксидацији преко 5,5-дитиобис-6,2-нитробензоеве киселине која је детаљно описана у студији *Beutler*-а и сарадника, а подразумевала је мерење апсорбанце на 420 nm (145).

### 3.3.8. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА СРЦА, ЈЕТРЕ, БУБРЕГА И ПАНКРЕАСА

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

од тренутка изоловања. За визуелизацију структура у хистолошким секцијама ткива спровело се бојење хематоксилин/еозин техником.

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

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

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

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

### 3.4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

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

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

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

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

**IV**

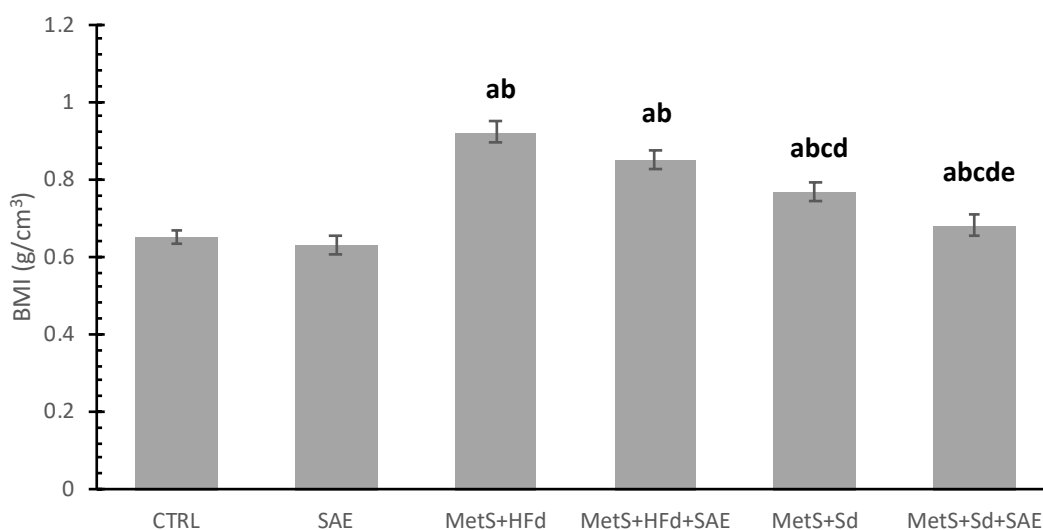
**РЕЗУЛТАТИ**

## 4. РЕЗУЛТАТИ

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

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

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

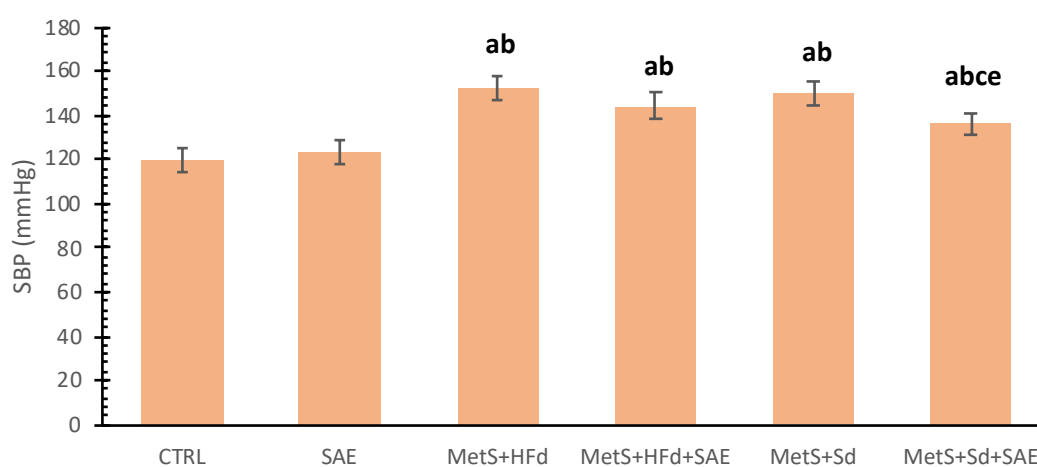


**Графикон 1.** ВМІ у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола.

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

## 4.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА

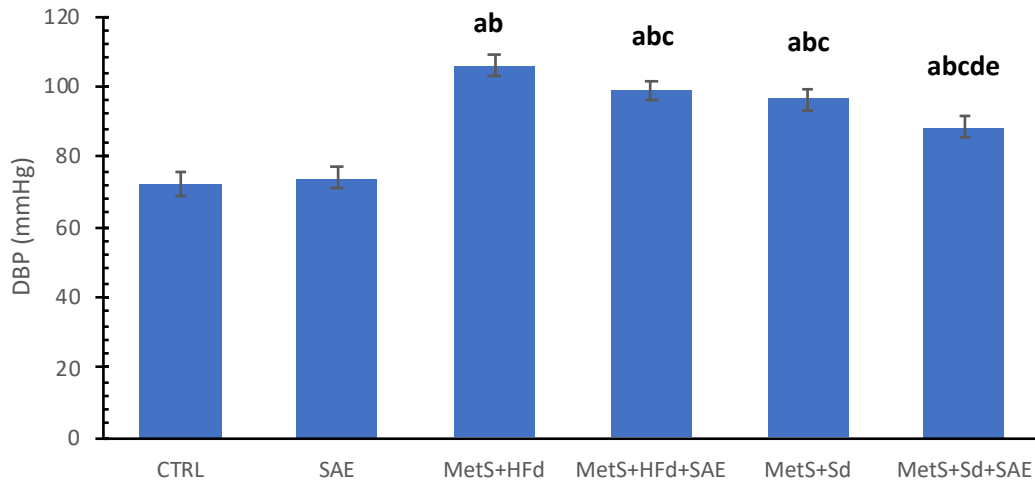
SBP, DBP, као и HR били су значајно повишени у групи пацова са метаболичким синдромом у односу на здраве пацове (Графикони 2-4). У групама пацова са метаболичким синдромом у којима је SAE у комбинацији са Sd уведен у исхрану, вредности SBP су се значајно смањиле у односу на вредности у MetS+Sd и MetS+HFd+SAE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



**Графикон 2.** SBP у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола.

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

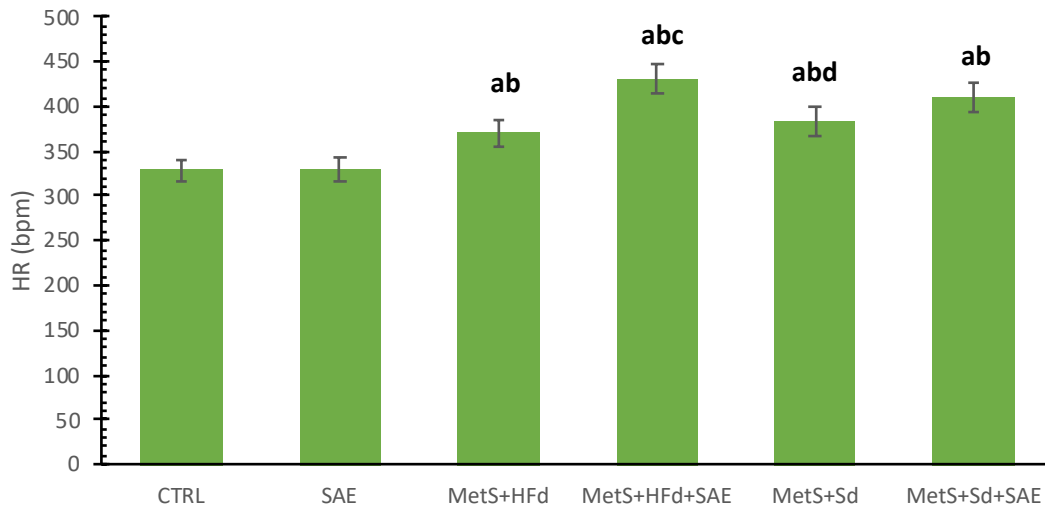
DBP је био значајно већи у MetS+HFd групи, у односу на MetS+HFd+SAE, MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групе, док је у MetS+Sd+SAE групи DBP вредност била значајно нижа него код осталих група пацова са метаболичким синдромом (**Графикон 3**).



**Графикон 3.** DBP у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола.

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

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



**Графикон 4.** HR у испитиваним групама након 8 недеља експерименталног протокола. <sup>a</sup>p<0,05 у односу на CTRL; <sup>b</sup>p<0,05 у односу на SAE; <sup>c</sup>p<0,05 у односу на MetS+HFd; <sup>d</sup>p<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; <sup>e</sup>p<0,05 у односу на MetS+Sd.

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

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

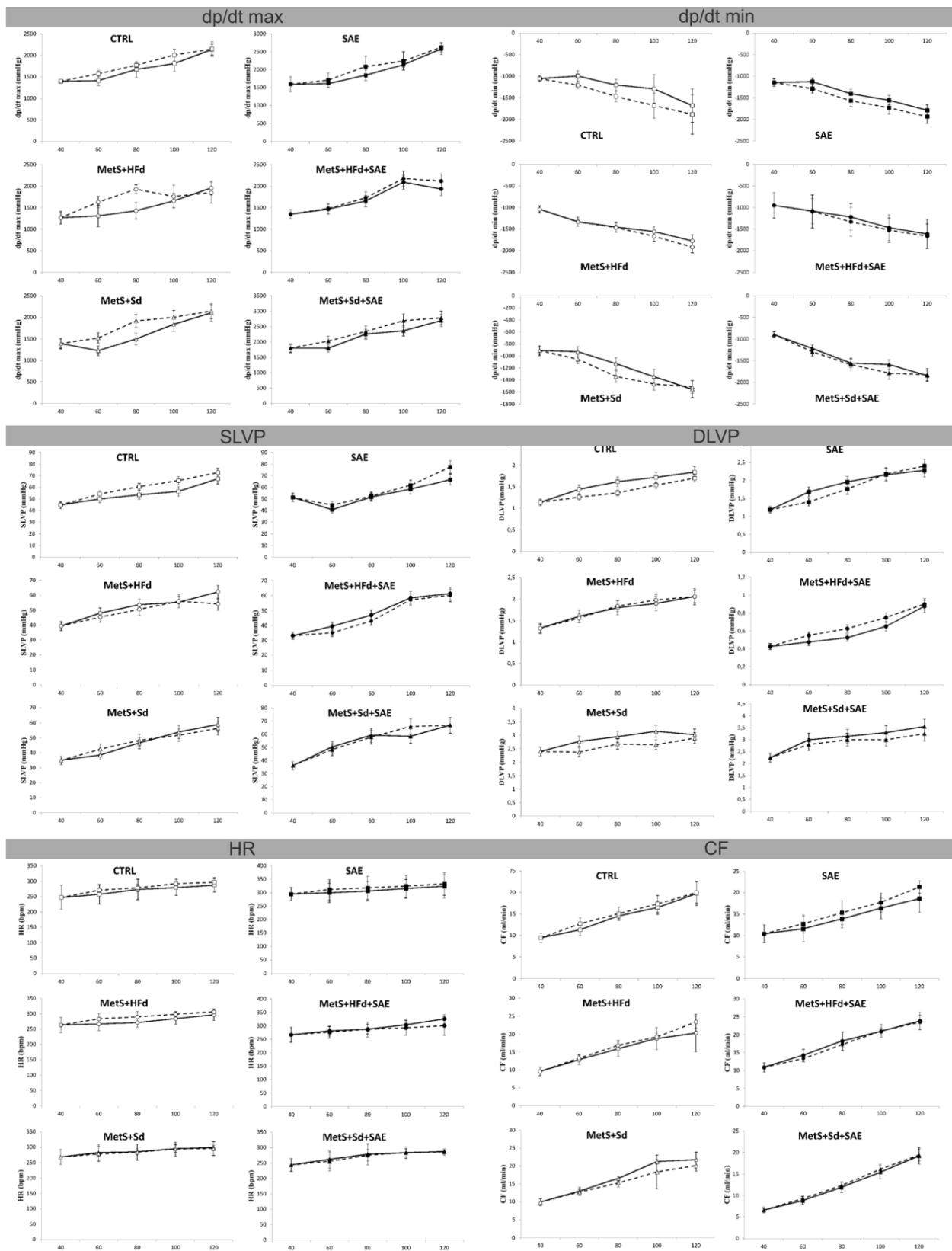
mm	CTRL	SAE	MetS+HFd	MetS+HFd+SAE	MetS+Sd	MetS+Sd+SAE
IVSd	1,22±0,2	1,89±0,2 <sup>a</sup>	1,28±0,3 <sup>b</sup>	1,34±0,2	1,58±0,2	1,59±0,2
LVIDd	6,80±0,4	5,73±0,2 <sup>a</sup>	6,23±0,4	6,70±0,4	5,53±0,3	7,93±0,4 <sup>e</sup>
LVPWd	1,94±0,4	3,45±0,4 <sup>a</sup>	2,22±0,1	1,72±0,1 <sup>b</sup>	1,88±0,2 <sup>b</sup>	1,93±0,2 <sup>b</sup>
IVSs	2,48±0,3	3,64±0,3 <sup>a</sup>	2,33±0,1 <sup>b</sup>	2,52±0,2	2,45±0,2 <sup>b</sup>	3,24±0,1 <sup>ace</sup>
LVIDs	3,20±0,5	2,03±0,2 <sup>a</sup>	3,24±0,2 <sup>b</sup>	3,16±0,1	2,48±0,2 <sup>acd</sup>	3,45±0,2 <sup>be</sup>
LVPWs	2,98±0,2	4,97±0,1 <sup>a</sup>	3,16±0,2	3,26±0,2	2,76±0,2 <sup>b</sup>	3,45±0,3
FS (%)	53,2±4,18	65,7±5,01 <sup>a</sup>	49,0±3,99 <sup>ab</sup>	52,2±4,32 <sup>b</sup>	51,4±4,19 <sup>b</sup>	56,3±4,21

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

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

Најзначајније разлике у вредностима dp/dt max присутне су на CPP = 60 cmH<sub>2</sub>O и 80 cmH<sub>2</sub>O у MetS+HFd (-24,77; -35,3) и MetS+Sd (-24,23; -28,11) групама. Код срца пацова са метаболичким синдромом којима је даван SAE, испитивани параметри се нису значајно мењали приликом два циклуса промене притиска. Вредности dp/dt min су се значајно мењале само код контролне групе пацова на CPP = 60 cmH<sub>2</sub>O, 80 cmH<sub>2</sub>O and 100 cmH<sub>2</sub>O (процентуалне разлике -21,25, -22,03, -29,7).



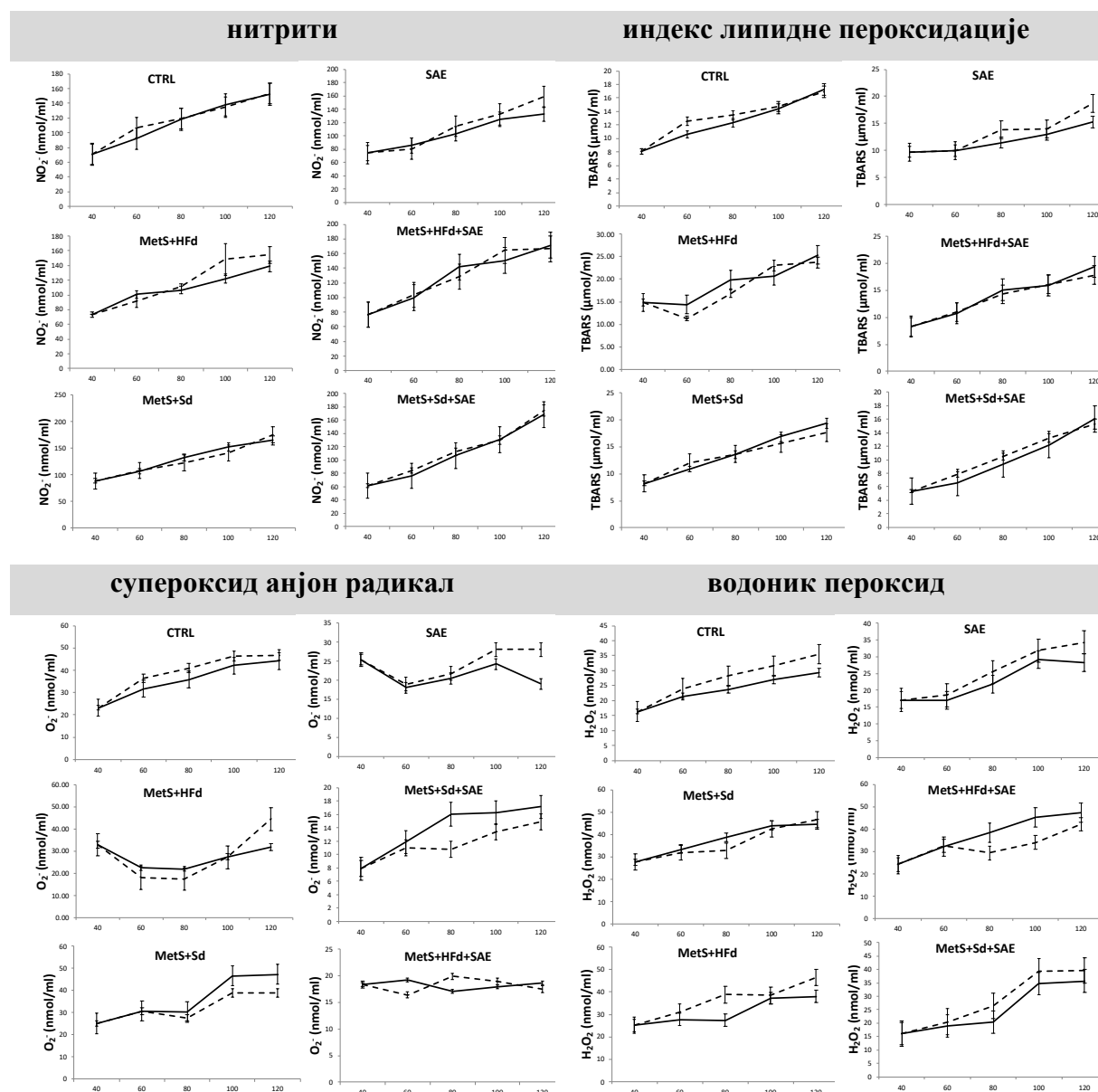


Графикон 5. *Ex vivo* праћени кардиодинамски параметри у испитиваним групама.

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

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

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



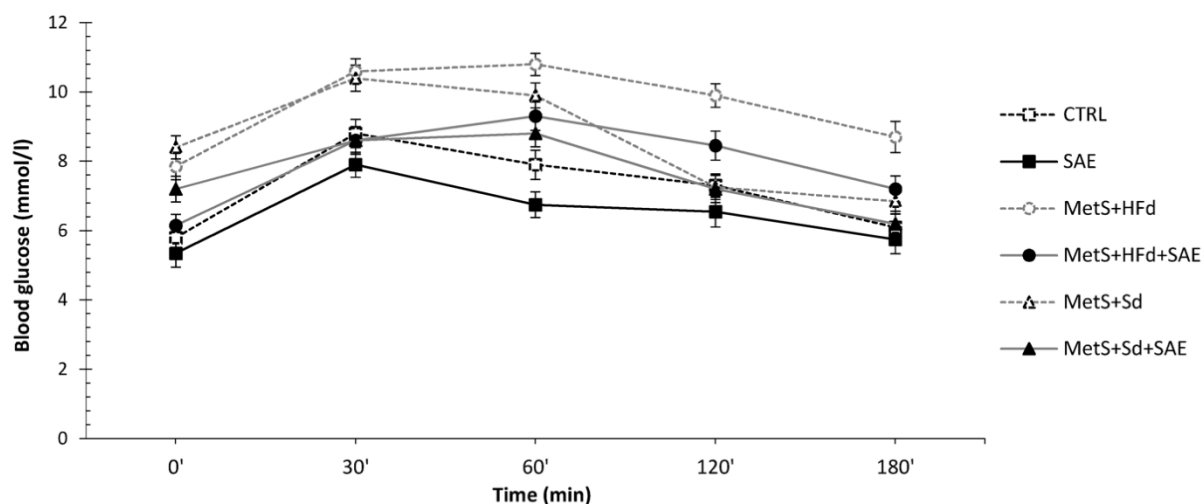
**Графикон 6.** Прооксидациони параметри у коронарном венском ефлуенту.

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

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

#### 4.3. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ТЕСТ ОРАЛНОГ ОПТЕРЕЂЕЊА ГЛУКОЗОМ КОД ПАЦОВА

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



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

**Графикон 7.** Вредности глукозе током ОГТ теста.

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

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

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

**Табела 6.** Вредности инсулина током ОГТТ.

	0'	180'
<b>CTRL</b>	122,9±6,76	123,7±6,61
<b>SAE</b>	106,9±6,04 <sup>a</sup>	113,8±6,51
<b>MetS+HFd</b>	185,1±7,78 <sup>ab</sup>	129,3±6,38
<b>MetS+HFd+SAE</b>	180,3±8,02 <sup>ab</sup>	131,1±7,13 <sup>b</sup>
<b>MetS+Sd</b>	205,8±9,87 <sup>abcd</sup>	145,2±7,65 <sup>b</sup>
<b>MetS+Sd+SAE</b>	182,1±9,32 <sup>abcde</sup>	127,3±6,72 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>p<0,05 у односу на CTRL; <sup>b</sup>p<0,05 у односу на SAE; <sup>c</sup>p<0,05 у односу на MetS+HFd;

<sup>d</sup>p<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; <sup>e</sup>p<0,05 у односу на MetS+Sd.

#### 4.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА

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

**Табела 7.** Вредности липидних параметара мерених након хроничног протокола.

	<i>CTRL</i>	<i>SAE</i>	<i>MetS+HFd</i>	<i>MetS+HFd+SAE</i>	<i>MetS+Sd</i>	<i>MetS+Sd+SAE</i>
<i>TC (mmol/L)</i>	1,61±0,14	1,71±0,11	2,01±0,23 <sup>ab</sup>	1,82±0,19 <sup>ac</sup>	1,98±0,33 <sup>ab</sup>	1,91±0,25 <sup>ab</sup>
<i>TG (mmol/L)</i>	0,35±0,10	0,40±0,07	0,62±0,19 <sup>ab</sup>	0,56±0,15 <sup>ab</sup>	0,47±0,10 <sup>abcd</sup>	0,43±0,05 <sup>cd</sup>
<i>HDL (mmol/L)</i>	1,30±1,19	1,28±1,23	1,10±0,10 <sup>ab</sup>	1,20±0,07	1,25±0,10	1,49±0,26 <sup>e</sup>
<i>LDL (mmol/L)</i>	0,44±0,16	0,40±0,17	0,88±0,03 <sup>ab</sup>	0,57±0,14 <sup>c</sup>	0,73±0,03 <sup>abd</sup>	0,63±0,02 <sup>ce</sup>

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

#### 4.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА

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

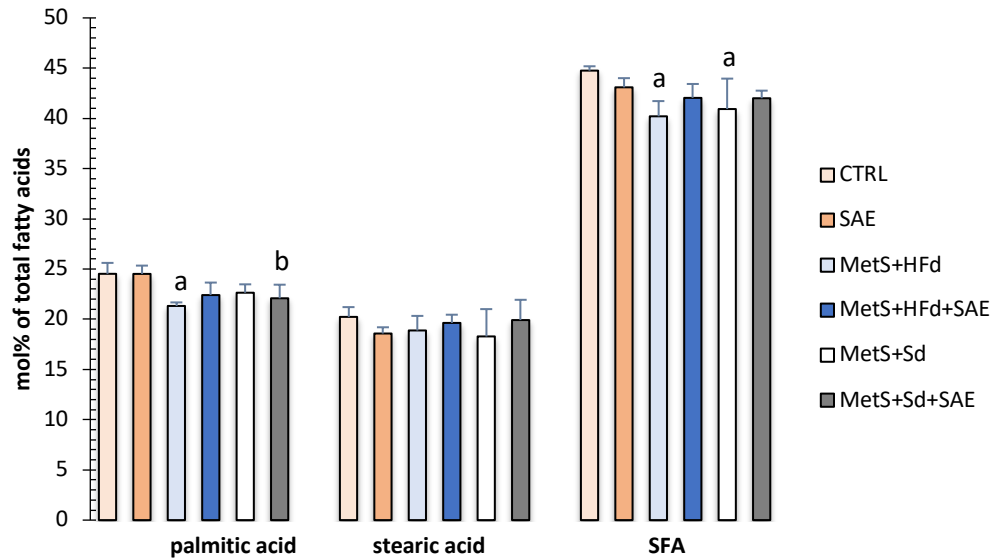
**Табела 8.** Заступљеност масних киселина (mol% од укупних масних киселина) у Sd и HFd.

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

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



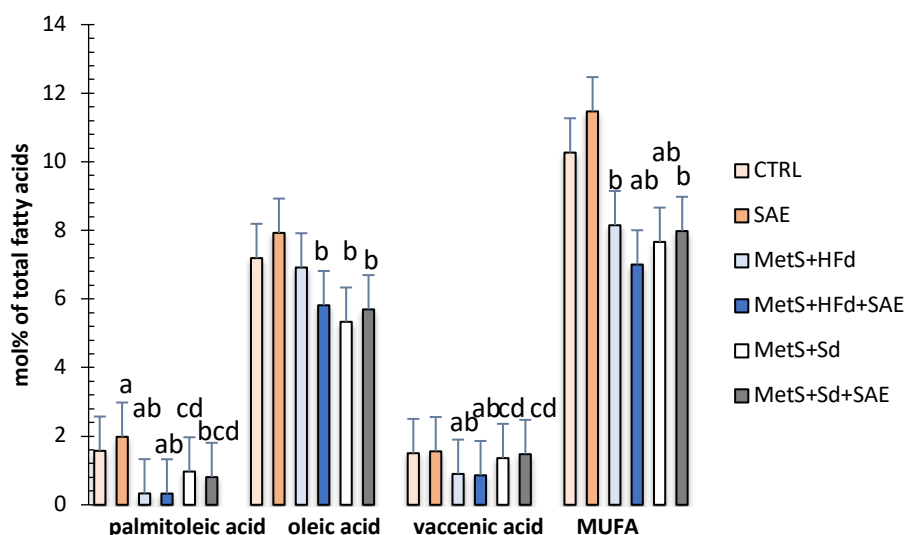
Ниво палмитинске засићене масне киселине значајно је смањен у MetS+HFd и у MetS+Sd+SAE групи, у односу на CTRL и SAE групе (**Графикон 8**). Ниво SFA био је значајно нижи код пацова са метаболичким синдромом којима није даван SAE у односу на CTRL групу.



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

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

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

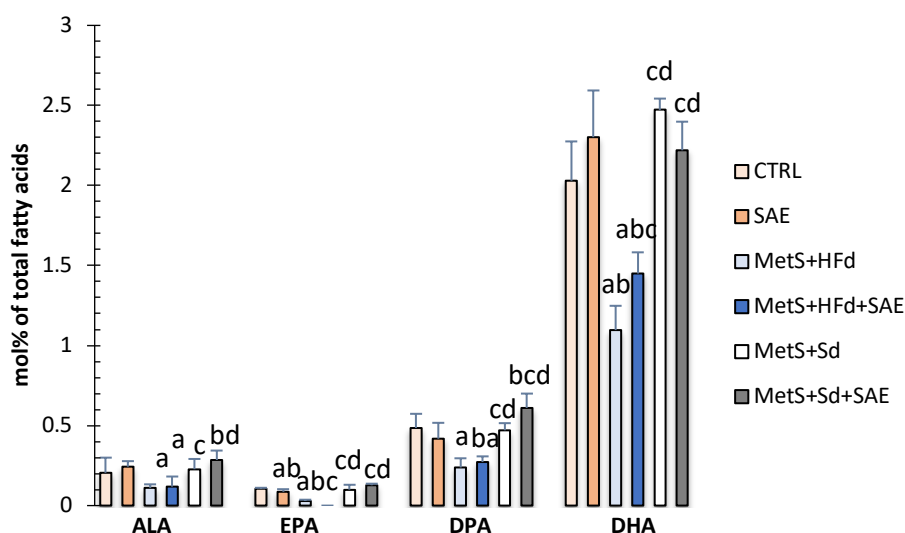


**Графикон 9.** Процент индивидуалних и укупних мононезасићених масних киселина (MUFA).

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

Додатак SAE у исхрану, није утицао на нивое индивидуалних n-3 масних киселина код здравих пацова: алфа линоленска киселина (ALA, 18:3 n-3), еикозапентаенска киселина (EPA, 20:5n-3), докозапентаенска киселина (DPA, 22:5n-3) и

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

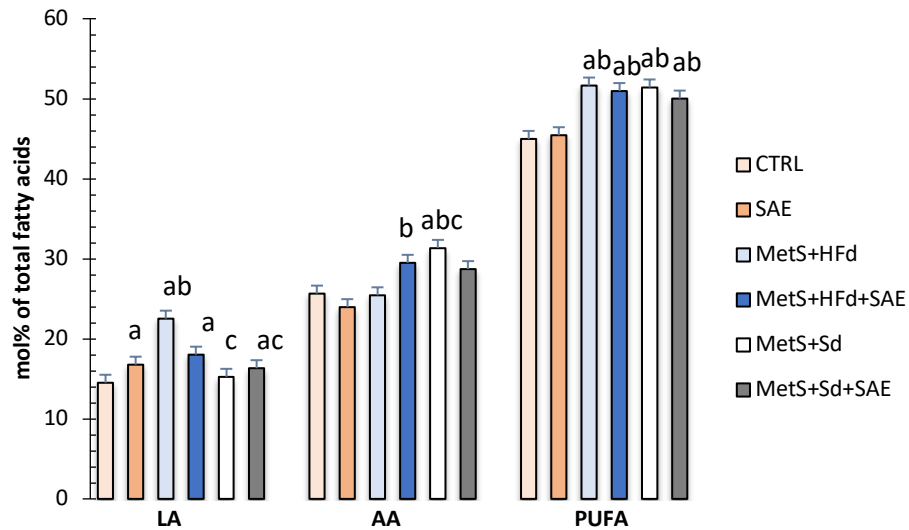


**Графикон 10.** Процент индивидуалних n-3 полинезасићених масних киселина.

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

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

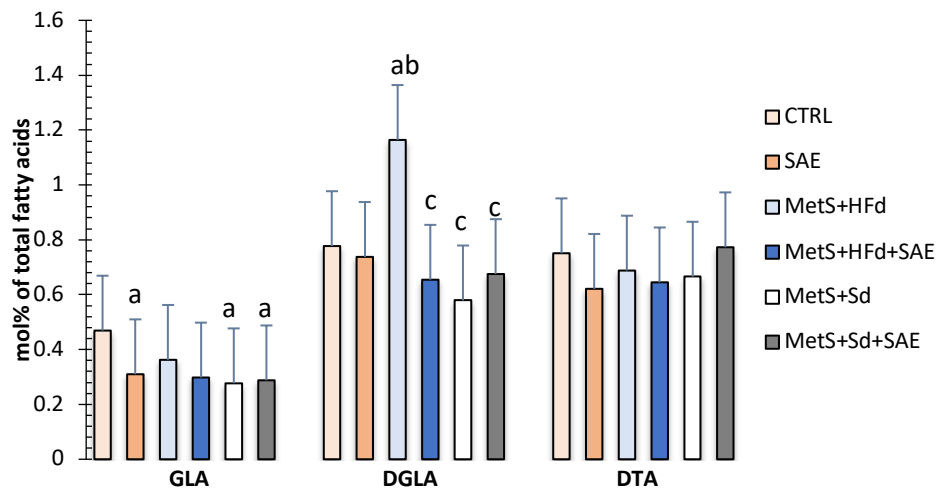
групама у односу на MetS+HFd групу. Поред тога, ниво АА био је значајно виши у MetS+HFd+SAE групи у односу на SAE групу, као и у MetS+Sd групи у односу на CTRL, SAE и MetS+HFd групе.



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

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

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

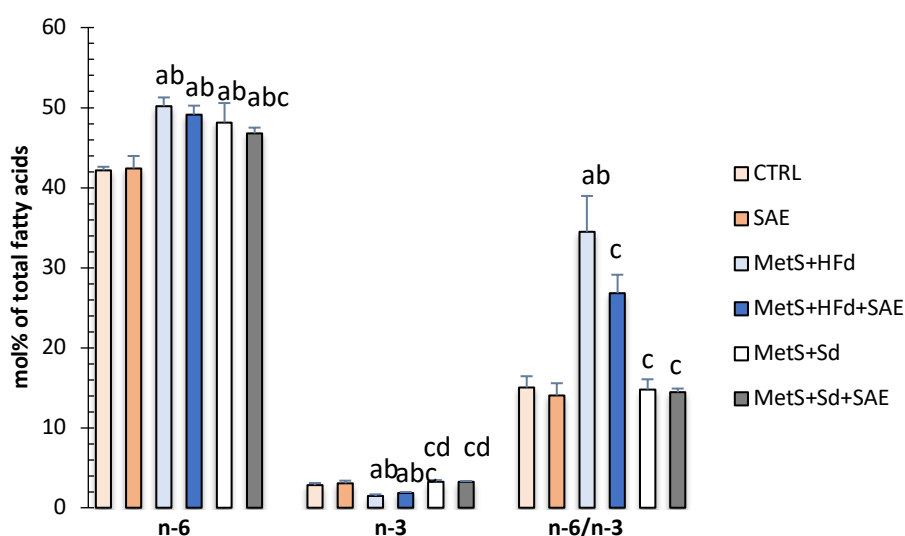


**Графикон 12.** Процент индивидуалних n-6 полинезасићених масних киселина.

<sup>a</sup>p<0,05 у односу на CTRL; <sup>b</sup>p<0,05 у односу на SAE; <sup>c</sup>p<0,05 у односу на MetS+HFd;

<sup>d</sup>p<0,05 у односу на MetS+HFd+SAE; <sup>e</sup>p<0,05 у односу на MetS+Sd.

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



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

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

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

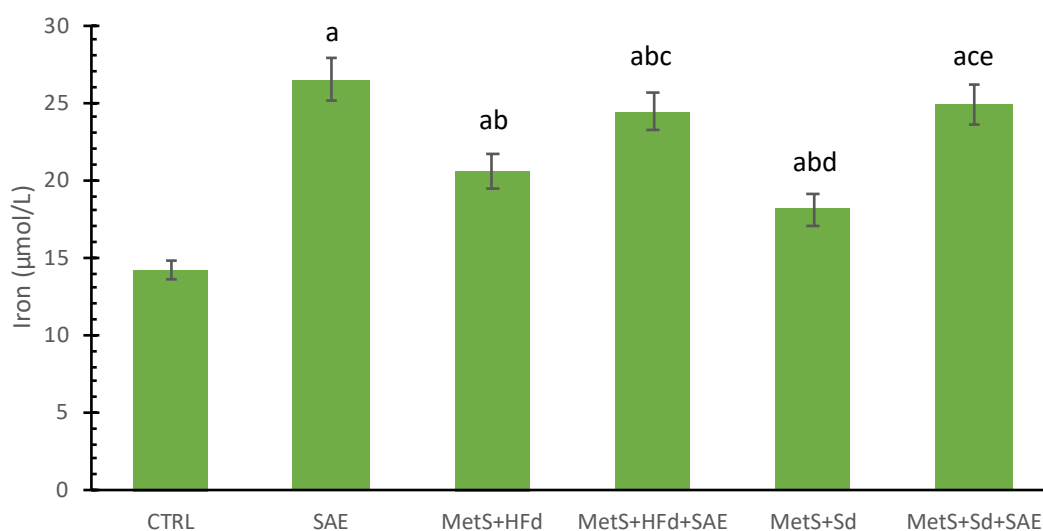
**Табела 9.** Индекси десатураза и елонгаза у плазми

<i>FA</i>	<i>CTRL</i>	<i>SAE</i>	<i>MetS+HFd</i>	<i>MetS+HFd+SAE</i>	<i>MetS+Sd</i>	<i>MetS+Sd+SAE</i>
<i>SCD-1</i> <i>16:1n-7/16:0</i>	0,06±0,01	0,08±0,01 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>ab</sup>	0,01±0,00 <sup>ab</sup>	0,04±0,03 <sup>ab</sup>	0,04±0,02 <sup>ab</sup>
<i>SCD-2</i> <i>18:1n-9/18:0</i>	0,36±0,01	0,43±0,03	0,37±0,09	0,30±0,05	0,30±0,12	0,29±0,05
<i>D6</i> <i>18:3n-6/18:2n-6</i>	0,03±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±00	0,02±0,01
<i>D5</i> <i>20:4n-6/20:3n-6</i>	33,03±1,32	32,61±3,98	22,00±3,33 <sup>a</sup>	46,20±8,09 <sup>c</sup>	50,12±12,24 <sup>abc</sup>	43,05±6,87 <sup>ab</sup>
<i>ELONG</i> <i>18:0/16:0</i>	0,83±0,08	0,76±0,04	0,89±0,07	0,88±0,06	0,81±0,12	0,91±0,15

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

#### 4.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА

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



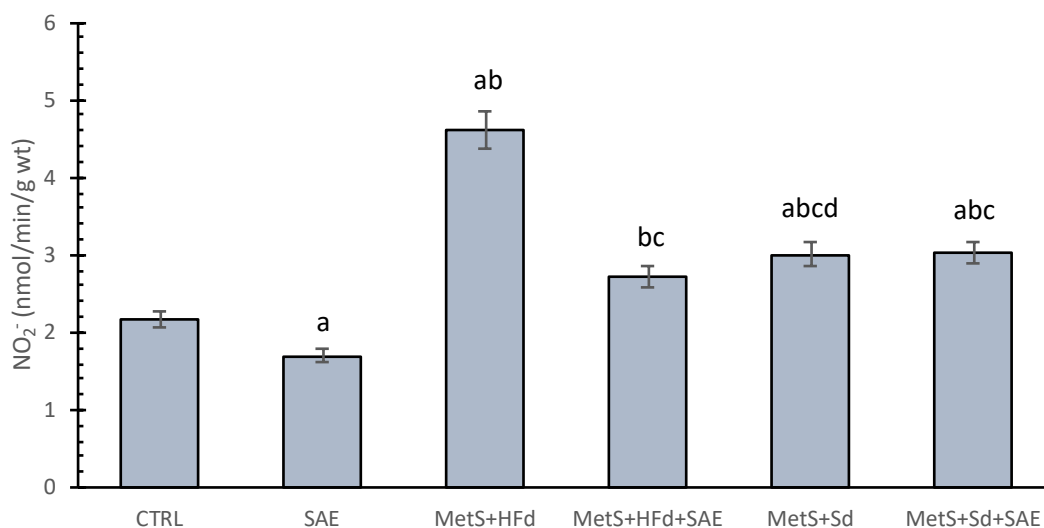
**Графикон 14.** Нивои гвожђа у серуму испитиваних група пацова.

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



#### 4.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА

Ниво  $\text{NO}_2^-$  био је значајно снижен у SAE групи у односу на CTRL групу и значајно повишен код свих група пацова са метаболичким синдромом у односу на групе здравих пацова (CTRL и SAE групе). Највише вредности  $\text{NO}_2^-$  биле су забележене у MetS+HFd групи, док су се са додатком SAE у HFd или Sd исхрану ове вредности значајно смањиле. Такође, интересантно је да су пацови из MetS+Sd групе имали значајно више вредности  $\text{NO}_2^-$  у односу на MetS+HFd+SAE групу (**Графикон 15**).

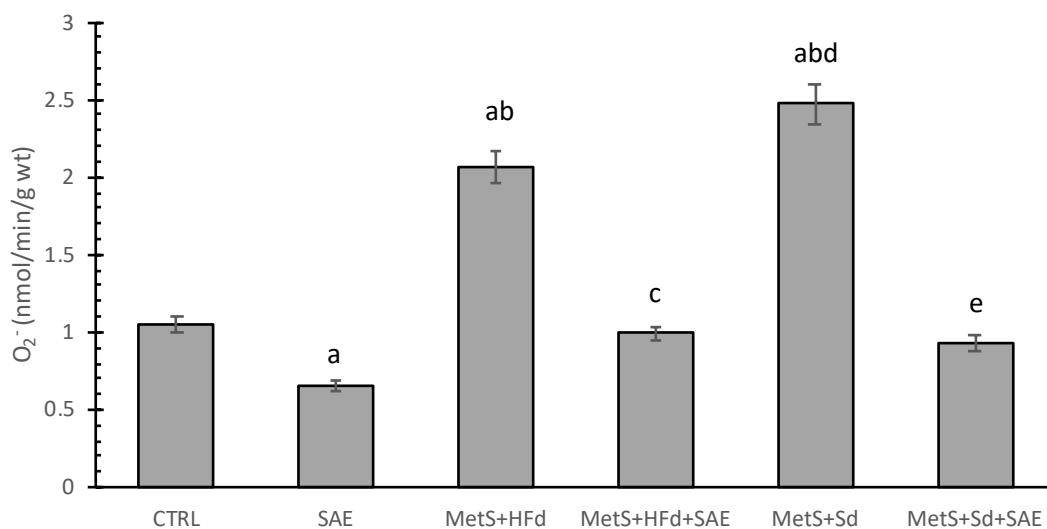


**Графикон 15.** Нивои нитрита у плазми испитиваних група пацова.

<sup>a</sup> $p < 0,05$  у односу на CTRL; <sup>b</sup> $p < 0,05$  у односу на SAE; <sup>c</sup> $p < 0,05$  у односу на MetS+HFd;

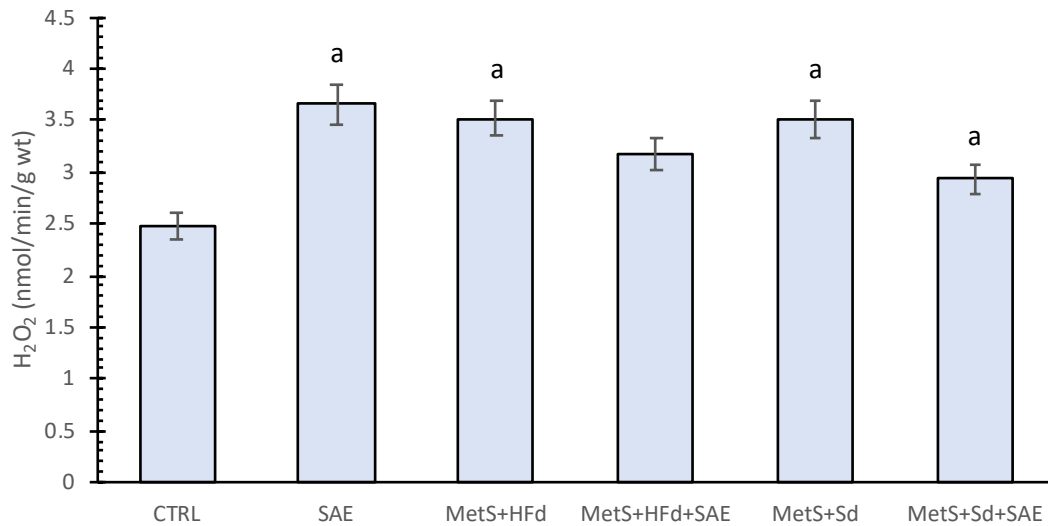
<sup>d</sup> $p < 0,05$  у односу на MetS+HFd+SAE; <sup>e</sup> $p < 0,05$  у односу на MetS+Sd.

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



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

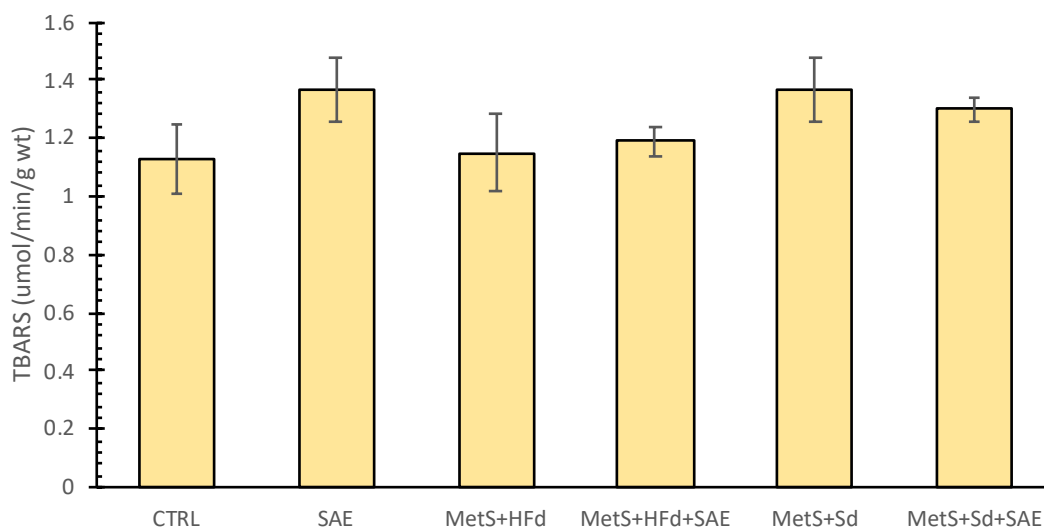
Нивои водоник пероксида били су значајно повишени у свим испитиваним групама (осим у MetS+HFd+SAE групи) у односу на нивое који су измерени у CTRL групи (**Графикон 17**).



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

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

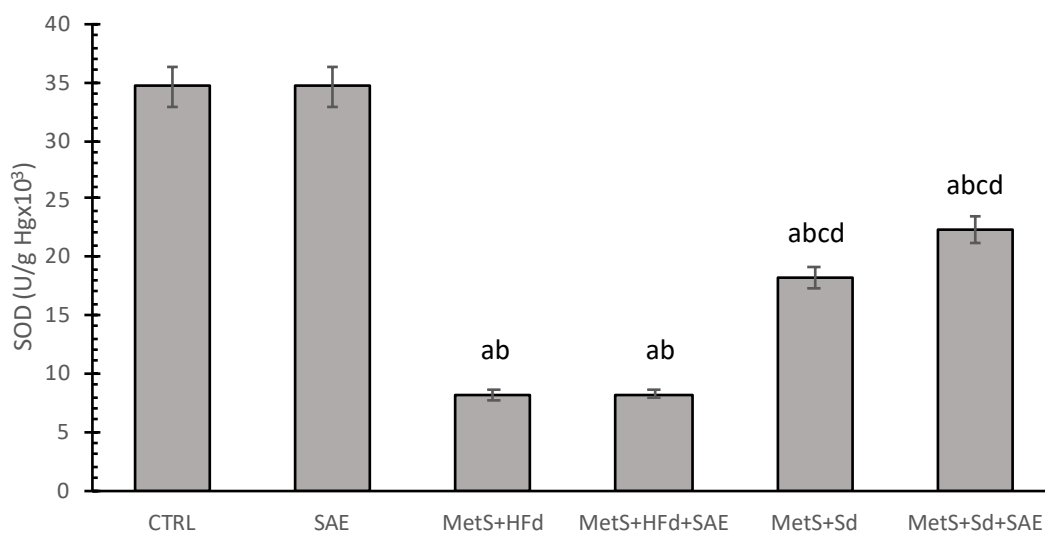
Вредности индекса липидне пероксидације који је мерен преко TBARS, нису се значајно разликовале између испитиваних група након хроничног протокола (Графикон 18).



**Графикон 18.** Нивои TBARS у плазми испитиваних група пацова.

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

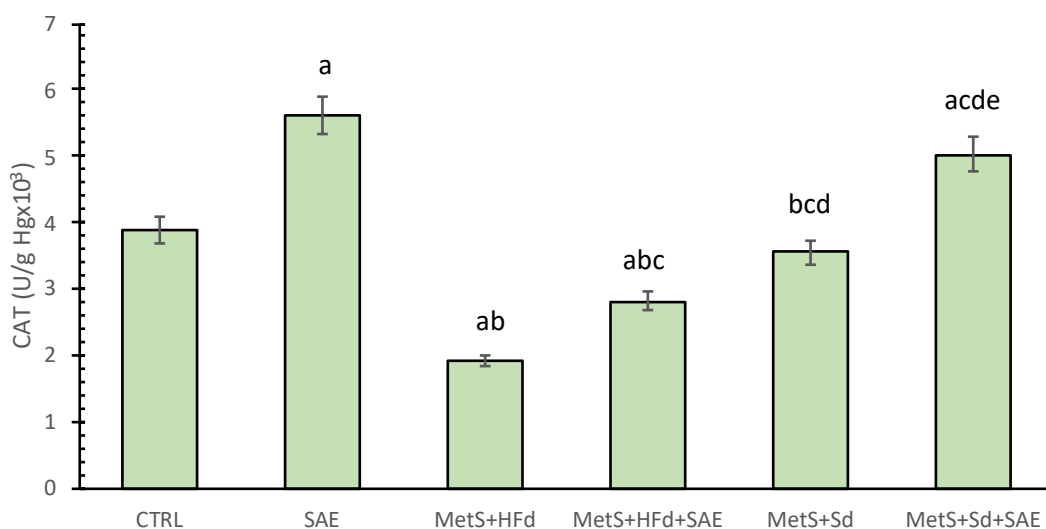
Активност SOD значајно је смањена код пацова са метаболичким синдромом у односу на њену активност код здравих пацова. Промена са масне на стандардну исхрану са или без SAE довела је до повећања активности супероксид дисмутазе у MetS+Sd и MetS+Sd+SAE групама (**Графикон 19**).



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

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

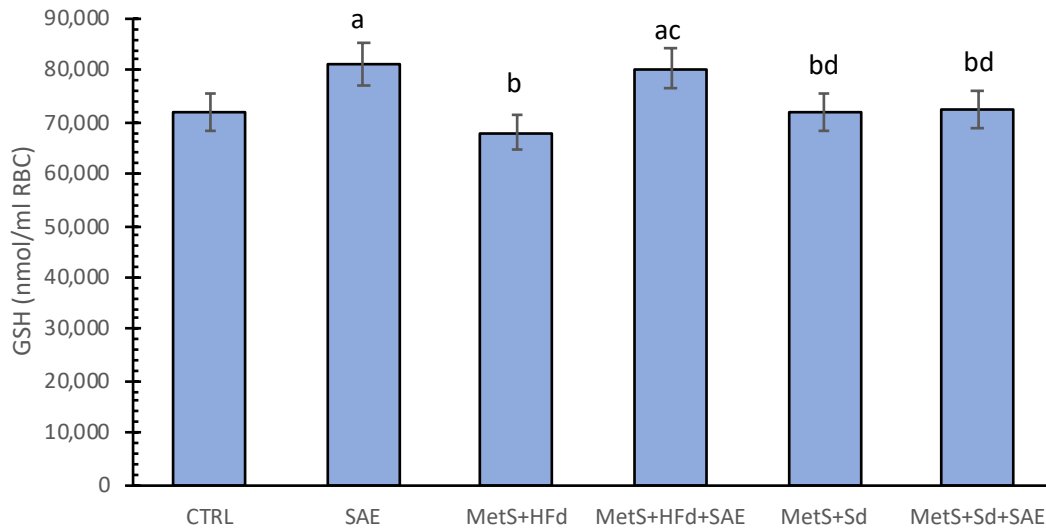
Активност калалазе била је значајно виша у SAE групи, у односу на друге испитиване групе (осим у MetS+Sd+SAE групи). Са друге стране овај параметар је у CTRL групи био значајно виши у односу на MetS+HFd и MetS+HFd+SAE групу и значајно нижи у односу на MetS+Sd+SAE групу. Додатак SAE у исхрану пацова са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



**Графикон 20.** Активност каталазе у лизираним еритроцитима испитиваних група пацова.

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

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



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

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

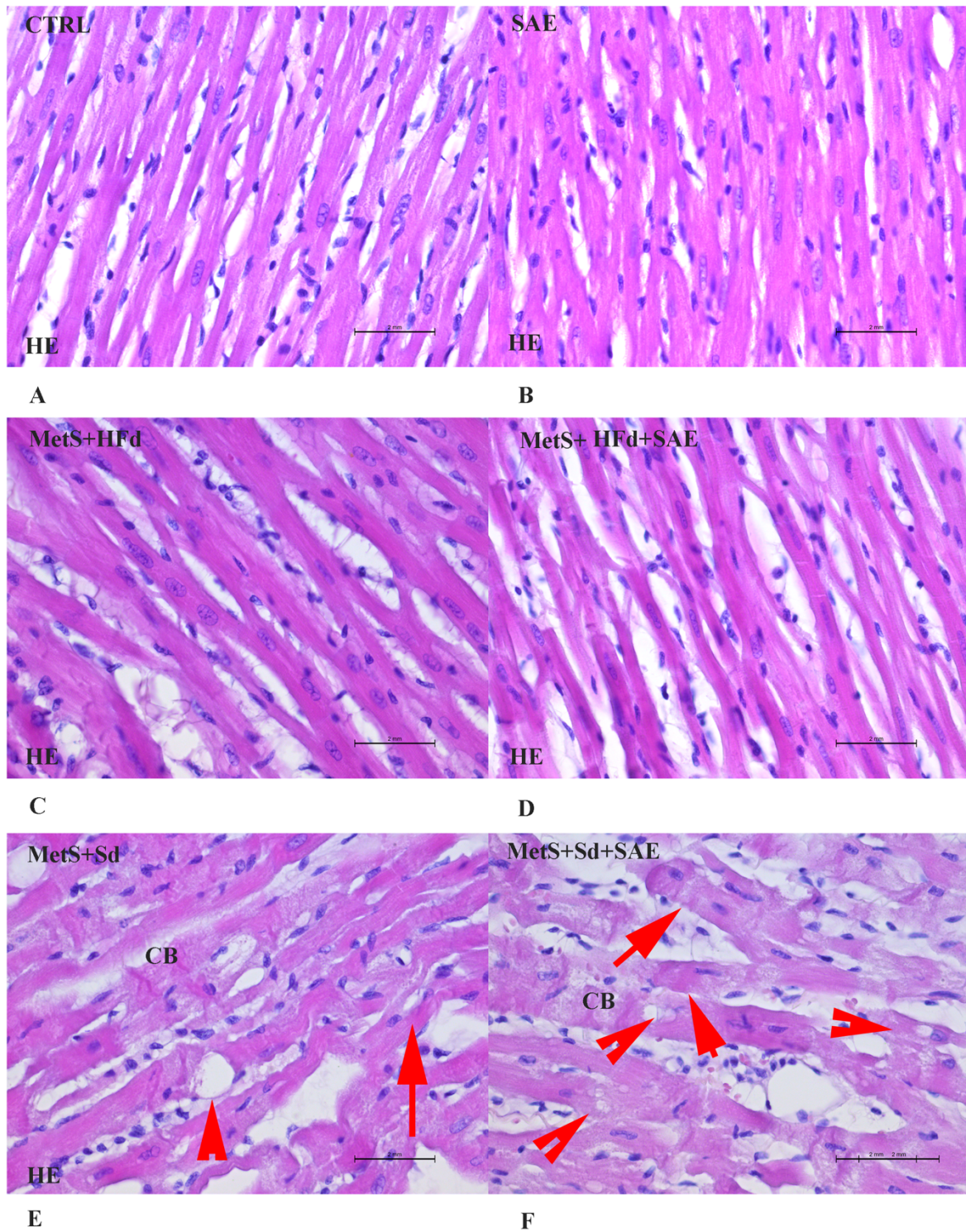
#### **4.8. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ХИСТОПАТОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ ПОЈЕДИНИХ ТКИВА**

##### **4.8.1. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ МИОКАРДА**

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

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



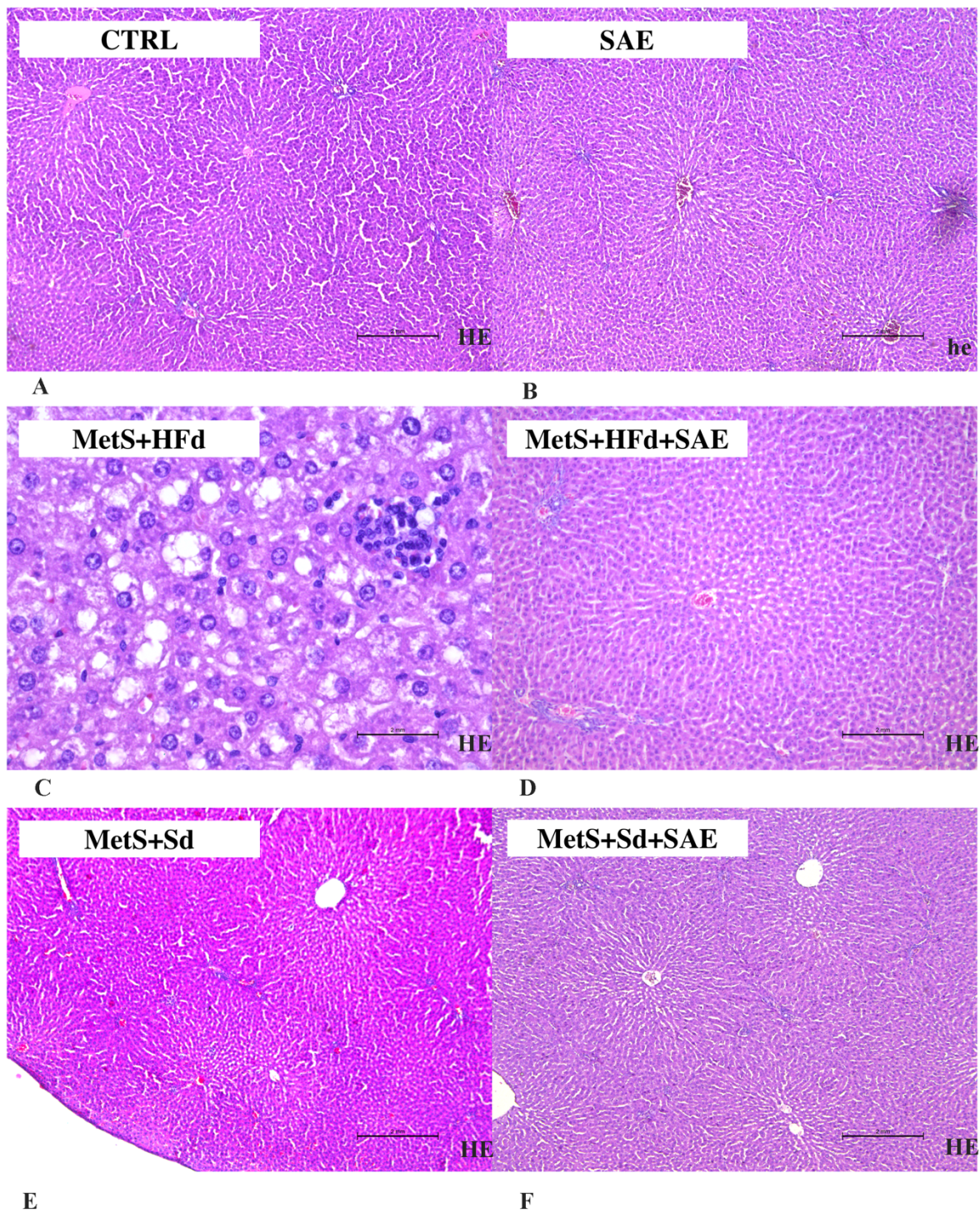


Слика 9. Мишићна ткива миокарда обојена хематоксилин/еозином

#### 4.8.2. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ЈЕТРЕ

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

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

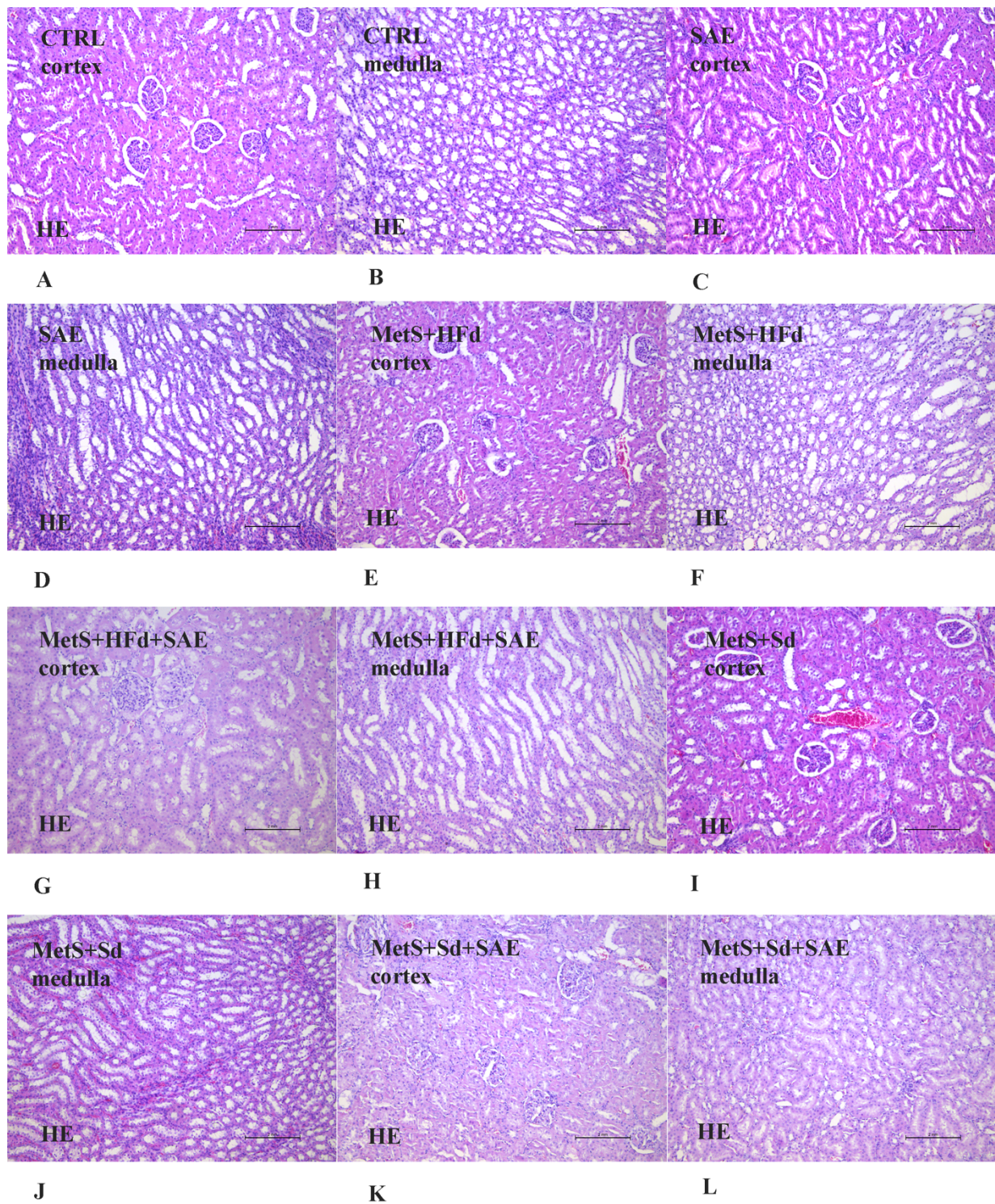


Слика 10. Ткива јетре обојена хематоксилин/еозином

#### 4.8.3. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ БУБРЕГА

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

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

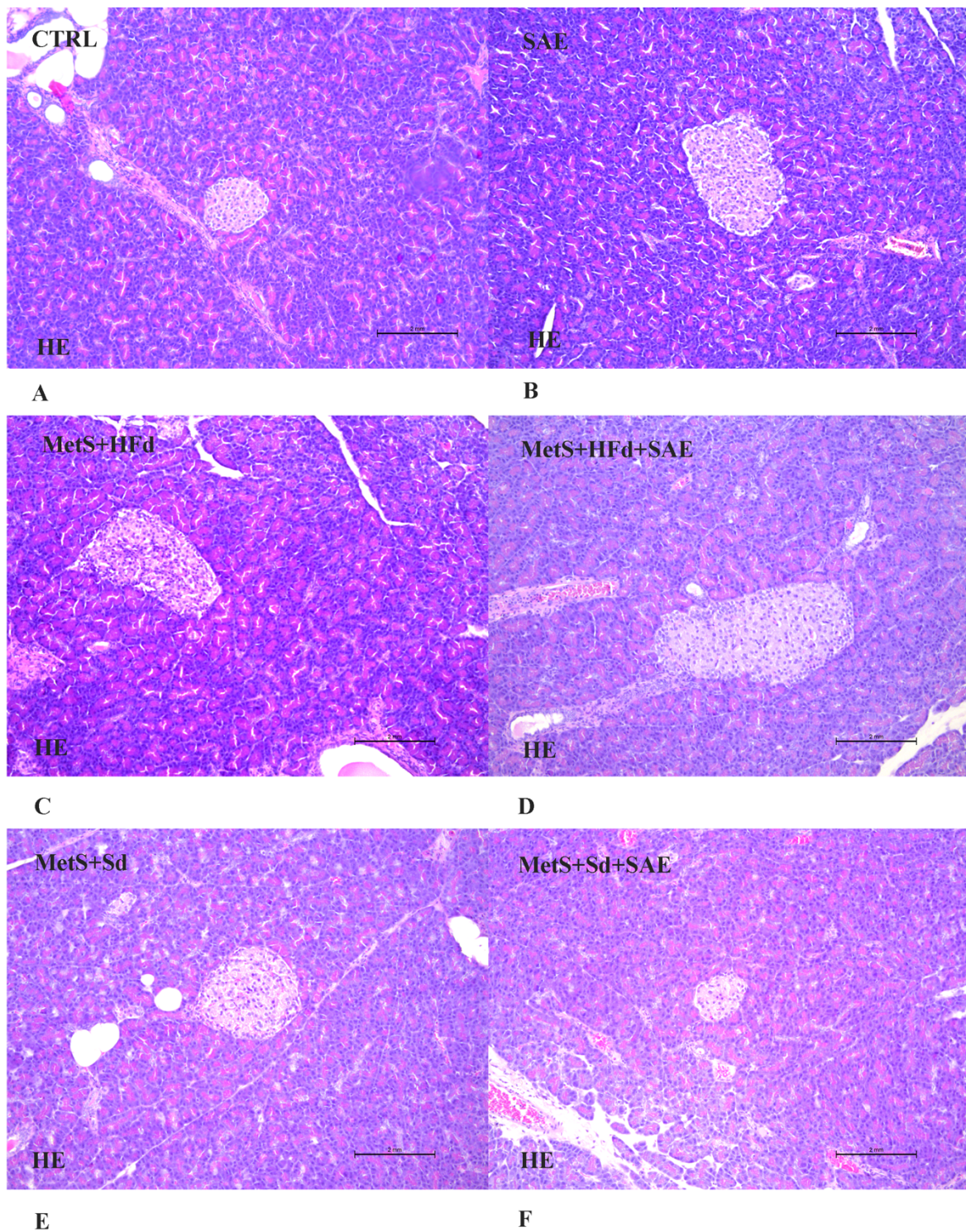


Слика 11. Ткива бубрега (медуле и кортекса) обојена хематоксилин/еозином

#### 4.8.4. ЕФЕКТИ НА ТКИВУ ПАНКРЕАСА

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

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



Слика 12. Ткива панкреаса обојена хематоксилин/еозином

**V**

**ДИСКУСИЈА**



## 5. ДИСКУСИЈА

### 5.1. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ПРОМЕНУ ТЕЛЕСНЕ ТЕЖИНЕ ПАЦОВА

Наши резултати јасно указују да је највећи пораст ВМІ примећен код пацова са метаболичким синдромом који су храњени масном храном и након индукције метаболичког синдрома (MetS+HFd група). Ови резултати су у складу са очекивањима и у корелацији са већ објављеним радовима, чији резултати сведоче да услед хроничне исхране обogaћене мастима долази до значајног повећања телесне тежине, како код људи, тако и код животиња (146, 147).

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

### 5.2. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ФУНКЦИЈУ СРЦА ПАЦОВА

Узимајући у обзир да су кардиоваскуларне компликације веома честе код оболелих од метаболичког синдрома, један од циљева ове дисертације био је да се детаљно испитају ефекти дијета обogaћених аронијом на функцију миокарда која је праћена *in vivo* и *ex vivo*, крвни притисак, као и параметре оксидационог стреса у коронарном венском ефлуенту.

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

садржајем липида (MetS+HFd+SAE група). Са друге стране, четворонедељна примена екстракта ароније код здравих, нормотензивних пацова није утицала на крвни притисак. Наши резултати су у складу са литературним подацима, чији резултати сведоче да плодови ароније и полифенолни екстракт ароније ефикасно смањују систолни и дијастолни крвни притисак код спонтано хипертензивних пацова (148). Механизам одговоран за хипотензивни ефекат испитиваног екстракта ароније, највероватније укључује инхибицију бубрежног ренин-ангиотензин алдостерон система (149). Значајн хипотензивни ефекат *Aronia melanocarpa* потврђен је и у студијама на моделу хипертензије (150-152). С обзиром да је хипотензивни ефекат примећен приликом уноса хране богате флавоноидима, сматра се да су и они одговорни за снижење систолног и дијастолног притиска (153, 154). Хипотензивни ефекат ароније потврђен је и у клиничким студијама код пацијената са метаболичким синдромом и код пацијената са хипертензијом (155, 156).

Током мерења крвног притиска у нашој студији, код пацова је регистрована и фреквенца срца. Повећање фреквенце срца у групама пацова са метаболичким синдромом највероватније настаје као резултат повећања активности симпатичког нервног система који је испровоциран масном исхраном (157). Имајући то на уму, уочено смањење фреквенце срца код пацова који су након индукције метаболичког синдрома храњени стандардном храном, потпуно је логично и очекивано. Међутим, значајне промене у фреквенци срца нису уочене када је екстракт ароније додат у режим исхране код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном храном, док је повећање фреквенце примећено у MetS+HFd+SAE групи. На основу наших резултата може се рећи да је екстракт ароније са стандардизованим процентом полифенола очувао функцију и контрактилност миокарда и није утицао на промену броја откуцаја код здравих пацова. Слични резултати на фреквенцу срца су добијени и у претходним истраживањима у којима су испитивани ефекти екстракта који у себи садрже полифеноле (158).

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

ефекат екстракта ароније примећен је код здравих пацова јер је довео до побољшања систолне функције, која се манифестовала кроз значајно повећање фракционог скраћења (FS) у односу на скоро све друге групе. Сличне вредности *in vivo* мерених кардиодинамских параметара у CTRL, MetS+Sd+SAE и MetS+HFd+SAE групама, указује на то да је исхрана обogaћена екстрактом ароније била ефикасна у побољшању фракционог скраћења, без обзира на дијететски режим којим су пацови са метаболичким синдромом били подвргнути. У складу са нашим резултатима, у раније објављеним студијама је показано да полифеноли и биљке богате полифенолима имају ефекат у смањењу патолошких промена фракционог скраћења које настају услед развоја кардиометаболичких обољења (159). Смањење системског крвног притиска након третмана екстрактом ароније може повећати фракционо скраћење, што резултира повећаном контрактилношћу миокарда (160).

Слични резултати добијени су и током *ex vivo* ретроградне перфузије миокарда. Контрактилност миокарда, процењивана кроз максималну и минималну стопу промене притиска у левој комори ( $dp/dt$  max and  $dp/dt$  min), била је очувана код пацова са метаболичким синдромом који су у својој исхрани (стандардна или масна дијета) имали екстракт ароније. Овај ефекат је посебно присутан у условима нормоксије, односно када је коронарни перфузиони притисак био у опсегу између 60 и 80 cmH<sub>2</sub>O. Исхрана обogaћена екстрактом ароније код здравих пацова допринела је побољшању релаксације срца (вредности су биле боље него у CTRL групи). Током промене притиска на *Langendorff*-овом апарату, нису уочене значајне разлике, ни у једној од испитиваних срца пацова. Ови резултати су очекивани, узимајући у обзир да су животиње са метаболичким синдромом праћене само 4 недеље и да није било довољно времена да синдром изазове промене на срцу које би довеле до оштећења *ex vivo* испитиване функције срца.

Са друге стране, приликом праћења промене прооксидационих параметара у коронарном венском ефлуенту, примећено је да су вредности свих испитиваних параметара били приближно исте у оба циклуса промене притиска. Ови резултати потврђују претходне наводе да је *ex vivo* испитивана функција срца очувана, као и да аронија и њени екстракти остварују кардиопротективне ефекте, највероватније услед значајног антиоксидационог, антиинфламацијског, вазорелаксантног и анти тромботичког ефекта (152).

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

Да би се проценило да ли екстракт ароније, који је испитиван у нашем истраживању, може да утиче на нивое глукозе у крви, сви пацови су били подвргнути ОГТ тесту. Наши резултати указују да екстракт ароније није утицао на нивое глукозе наше код здравих пацова, док је код пацова са метаболичким синдромом уочен значајан хипогликемијски ефекат. Сличан тренд забележен је и 30-ом, 60-ом, 120-ом и 180-ом минути након администрације глукозе, осим чињенице да у 120. и у 180. минути није било разлике у нивоу глукозе између MetS+Sd и MetS+Sd+SAE група. Иако у себи садржи сахарозу, овај екстракт није довео до повећања нивоа гликемије ни у једној од испитиваних група пацова, што сведочи у прилог томе да количина сахарозе у њему је у безбедном опсегу и нема бојазни да може да промовише дијабетес.

Када је реч о концентрацији инсулина наше, она је била значајно нижа код здравих пацова који су у својој исхрани имали SAE у односу на здраве пацове који су храњени само стандардном храном. Високи нивои инсулина у MetS+HFd групи нису снижени ни када је SAE екстракт уведен у исхрану. Са друге стране, код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном храном у комбинацији са екстрактом ароније нивои инсулина били су нижи (у обе мерене тачке током ОГТТ) у односу на пацове који су храњени само стандардном храном. У складу са нашим резултатима који сведоче да се боља толеранција глукозе постиже код пацова који су храњени SAE екстрактом, постоје и студије других научника у којима су показани корисни ефекти екстракта *A. melanocarpa* на нивое инсулина код гојазних мишева (161). С обзиром да је ризик од настанка метаболичког синдрома повечан код гојазних, смањујући ниво инсулина, директно се и одлаже или чак спречава настанак овог синдрома. Протективни ефекти највероватније настају као последица инхибиције дипептидил пептидазе IV и активности глукозидаза (117, 120). Ензим дипептидил пептидаза IV је присутан на великом броју ћелијских мембрана и учествује у регулацији имуног одговора, највероватније је и ово механизам преко кога испитивани екстракт остварује антиинфламационе ефекте (117).

#### **5.4. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА ЛИПИДНИ ПРОФИЛ ПАЦОВА**

Приликом проучавања доступне научне литературе, примећено је да је повећање нивоа глукозе у крви код метаболичког синдрома најчешће праћено повећањем укупног холестерола, TG, LDL и VLDL холестерола, као и смањењем HDL холестерола (162). Различити екстракти базирани на аронији могу ефикасно да утичу на липидни статус, што је и потврђено у претходно објављеним истраживањима (116, 150). Слични резултати добијени су и у нашој студији.

Код пацова са метаболичким синдромом, који су храњени дијетом обogaћеном липидима примећене су највише вредности липидних параметара, док је са променом исхране (са масне на стандарду исхрану) са или без додатка екстракта ароније уочен значајан позитиван ефекат на ове параметре. Важно је истаћи да су вредности укупног холестерола биле најниже код метаболичких пацова храњених комбинацијом масне хране и екстракта ароније, док су вредности TG, HDL и LDL холестерола биле најниже у групи где је здравија исхрана комбинована са испитиваним екстрактом ароније. Наши резултати су у корелацији са претходним у којима је показано да је конзумација сока ароније повезана са снижењем нивоа липида код пацова који су храњени дијетом богатом фруктозом (163). Побољшања липидног статуса изазвана аронијом пронађена су и код пацијената са благом хиперхолестеролемијом и/или метаболичким синдромом, али и код спортиста (164-166). Као што је раније сугерисано, смањење нивоа триглицерида у серуму услед конзумације ароније, највероватније је повезано са повећањем серумске липазе, која хидролизује триглицериде у масне киселине (167). Поред тога, зна се да екстракти базирани на полифенолима могу да потискују експресију појединих гена који су одговорни за липогене ензиме и који доводе до снижења синтезе триглицерида у јетри (168). Поред тога, регулација липидног статуса у крви највероватније настаје као последица способности флавоноида да инхибира активност панкреасне липазе и повећа активност лецитин ацил трансферазе. Лецитин ацил трансфераза је значајна јер је то један од ензима који су одговорни за уклањање укупног холестерола из крви (169, 170). Такође, уочено је да екстракти базирани на аронији могу да смање експресију гена који су одговорни за метаболизам липида и липопротеина, који укључују синтезу масних киселина и ацил коензим А оксидазу (171).

## 5.5. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ ПАЦОВА

Да би се проценило да ли промене у исхрани (масна/стандарда храна, екстракт ароније) могу да побољшају маснокиселински профил код пацова са метаболичким синдромом, у нашој студији, мерени су њихови нивои у плазми свих пацова који су били укључени у студију. У бројним клиничким и експерименталним студијама више пута је потврђено да су нивои појединих масних киселина (пре свега палмитинске, палмитолеинске и олеинске) повезани са снижењем крвног притиска, као и нивоа инсулина и глукозе (172). У нашем истраживању, проценат засићене палмитинске масне киселине смањен је у MetS+HFd и MetS+Sd+SAE групама у поређењу са здравим пацовима, док је проценат стеаринске киселине био приближно исти у свим испитиваним групама. Ови резултати су изненађујући и неочекивани, јер је у HFd показано да се налази значајно виши ниво палмитинске и олеинске киселине у односу на нивое који су пронађени у Sd. Ипак, сличне резултате добила је истраживачка група *Liu* и сарадника, који су показали је да исхрана обogaћена липидима довела до смањења нивоа палмитинске киселине у триацилглицеролу и слободних масних киселина у серуму пацова (173). Механизми који су одговорни за ове промене су још увек непознати, али се сматра да је смањење процента палмитинске/SFA и олеинске киселине, као и последично повећање процента PUFA довело до повећаног флукса SFA и MUFA. Због оваквих резултата, неопходна су даља истраживања која би детаљно објаснила све промене.

Што се тиче MUFA, палмитолеинска и ваксенска киселина биле су смањене код пацова на дијети обogaћеној липидима. Са друге стране, проценат олеинске киселине био је нижи код пацова са метаболичким синдромом који су храњени стандардном дијетом (MetS+Sd), али и код пацова са метаболичким синдромом који су уз дијету обogaћену липидима храњени екстрактом ароније (MetS+HFd+SAE), што сугерише да метаболички синдром, сам по себи доводи до снижења олеинске киселине (174). У складу с тим, *Liu* и његови сарадници су у свом истраживању такође су показали смањен ниво олеинске киселине, као и ниже процењене активности оба индекса SCD у фракцијама триацилглицерола у серуму, након тронедељне конзумације HFd (173). Показано је да полифеноли могу повећати експресију ензима који су укључени у

оксидацију масти, као што је ензим из митохондрија јетре CPT1A1, као и смањити експресију липогених ензима, попут синтазе масних киселина (FAS) (175).

Епидемиолошке студије показале су да омега-3 PUFA имају повољне ефекте на метаболички синдром. У овој студији, проценат свих омега-3 PUFA у групи пацова храњених високим садржајем липида (MetS+HFd група) био је значајно нижи него код пацова на стандардној дијети (MetS+Sd група). Имајући у виду да DHA у својој структури има чак шест двоструких веза, чиме се издваја као масна киселина са највише незасићења, представља главно место за напад слободних радикала и липидне пероксидације. Додатак екстракта ароније у исхрану пацова са метаболичким синдромом довео је до значајног повећања нивоа DHA, што последично највероватније доводи и до смањења липидне пероксидације (176). Ово је од посебног значаја јер је виши ниво омега-3 PUFA у директној корелацији са смањеним ризиком од кардиоваскуларних обољења, реуматоидног артритиса, а побољшава и параметре метаболичког синдрома (177-180).

Удео омега-6 PUFA је такође у дисбалансу код оболелих од метаболичког синдрома. У нашој студији највиши ниво линолне киселине, LA, детектован је у MetS+HFd групи. LA је есенцијална масна киселина и прекурсор свих осталих омега-6 PUFA, а многобројне студије истичу њену улогу у инфламацији (181-183). С обзиром да је код пацова храњених масном храном, примећен порас удела LA, највероватније је системска инфламација присутна код пацова из ове групе. Поред тога, у истој групи пацова примећен је и највиши ниво DGLA, први производ конверзије LA, а додатак екстракта ароније у исхрану смањује ову конверзију. Ипак, најважнији производ конверзије LA је арахидонска киселина, која је главни прекурсор за синтезу липидних инфламаторних медијатора еикозаноида, леукотријена и тромбоксана (183). Највиши ниво AA пронађен је у MetS+Sd групи. Имајући у виду да су у групи MetS+Sd+SAE детектовани нижи нивои AA, као и група здравих пацова, може се закључити да екстракт ароније супримира конверзију LA у AA. Овај резултат је посебно значајан ако се има у виду да виши ниво LA доводе до смањења хипертриглицеридемије, гојазности и ризика од кардиоваскуларних болести (184).

Последица наведених промена у пропорцијама омега-3 и омега-6 PUFA довела је и до промена у односу n-6 и n-3. Овај однос је повишен у разним инфламаторним стањима и Светска здравствена организација препоручује да дијетарни унос PUFA буде максимално 4:1, како би се смањио исти однос и у крви (185).

## 5.6. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА НИВОЕ ГВОЖЂА

Имајући у виду да је гвожђе есенцијални елемент који је укључен у одржавање хомеостазе у организму, разумевање утицаја нашег екстракта ароније у комбинацији са различитим режимима исхране на његов ниво у серуму је од великог значаја.

Највиши ниво гвожђа примећен је у групи здравих пацова у чију исхрану је уведен и SAE, а уз то је и повећан ниво гвожђа пронађен у свим групама са метаболичким синдромом у поређењу са здравим пацовима. У претходно објављеној студији, *Lee* и сарадници су показали да је повећан ниво гвожђа повезан са метаболичким синдромом (186). Промена у навикама исхране, односно промена са масне на стандардну храну није довела до промене у нивоима гвожђа, док је стандардна исхрана обogaћена екстрактом ароније изазвала значајан пораст у нивоима гвожђа. Ови резултати су у складу са другим истраживањима у којима је такође показано да суплементација соком од ароније повећава ниво гвожђа у серуму гојазних мишева (187). Објашњење за овакве резултате је нејвероватније то што поједини флавоноиди имају потенцијал да хелирају гвожђе и смање његову апсорпцију механизмом који је независан од хормона који је укључен у хомеостазу гвожђа, хепцидина (188). С друге стране, за поједине флавоноиде показано је и да могу да смање активност хепцидина тако што доводе до повећања апсорпције и нивоа гвожђа у серуму (188, 189), што такође може бити објашњење за повећање нивоа гвожђа у групама пацова које су конзумирале испитивани екстракт ароније. Овај резултат се издваја као један од интересантнијих, који су добијени у овој студији и за прецизнија објашњења захтева даља истраживања која би се бавила променама на молекулском нивоу.



## 5.7. ЕФЕКТИ ДИЈЕТЕ ОБОГАЋЕНЕ ЕКСТРАКТОМ АРОНИЈЕ НА РЕДОКС СТАТУС ПАЦОВА

С обзиром да се зна да услед метаболичког синдрома код пацијената долази до повећања оксидационог стреса, постоји повећана потреба за конзумирањем антиоксиданата, или исхраном која је обogaћена оксидансима, који би повећали нивое антиоксидационих молекула и индиректно смањили нивое реактивних азотних и кисеоничних врста. Као најадекватнији и најбољи издвајају се природни антиоксиданси, који би се у организам уносили путем исхране (190, 191). Зато је у нашој студији испитиван утицај четворонедељне примене екстракта ароније са стандардизованим процентом полифенола у комбинацији са стандардном или масном исхраном на редокс хомеостазу код пацова.

Добијени резултати показују да је у групама пацова којима је примењиван екстракт дошло до снижења нивоа нитрита и супероксид анјон радикала, док су антиоксидациони параметри попут редукованог глутатиона и каталазе били повећани. Повећана активност САТ највероватније је одговорна за катализирање и убрзавање реакције којом се водоник пероксид претвара у воду и кисеоник, чиме концентрације водоник пероксида у плазми остају непромењене. Као што је и очекивано, повећана производња прооксидационих параметара и смањена активност антиоксидационих ензима SOD и САТ уочена је у MetS+HFd групи у поређењу са контролном, CTRL групом. Узимајући у обзир да је у више научно-истраживачких радова показано да је метаболички синдром повезан са повећаним оксидационим стресом (134), ови резултати су у потпуности очекивани. Увођење три различите стратегије исхране, као што је конзумирање SAE, прелазак на стандардну исхрану или комбинација стандардне дијете са SAE, довела је до снижења нивоа NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у односу на нивое који су измерени код пацова из MetS+HFd групе. Ови резултати иду у прилог томе да, је за повољне ефекте на прооксидационе параметре, довољно и само да се измене животне навике, које ће допринети и побољшању манифестације метаболичког синдрома. Међутим, највећи утицај на повећање активности антиоксидационих ензима примећен је у случају када је стандардна исхрана била обogaћена SAE. Повећавајући нивое антиоксидационих параметара, показано је да поједини полифеноли могу и да сакупљају и отклањају слободне радикале. Самим тим не само да повећавају нивое антиоксидационих параметара, већ и смањују нивое прооксидационих параметара, чиме се ефекат на

системски редокс баланс значајно побољшава. Хелирање јона гвожђа, чиме се омогућава катализовање појединих реакција које стварају слободне радикале је један од механизма који се налази у основи антиоксидационих ефеката полифенола (192-194). Узимајући у обзир да се оксидациони стрес налази у основи великог броја обољења и компликација, конзумација испитиваног екстракт који је обогаћен стандардизованим нивоима полифенола, могао би да буде ефикасан и у другим обољењима (193).

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

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

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

Са друге стране, најуочљивије промене на ткиву примећене су у јетри. Наиме, код пацова са метаболичким синдромом, који су храњени храном са високим садржајем липида уочена је измењена структура ткива јетре, која се манифестује као микровезикуларна стеатоза јетре. Међутим, код пацова који су уз HFd храњени и

екстрактом ароније, као и код пацова који су након индукције метаболичког синдрома пребачени на стандардну исхрану са или без додатка екстракта, значајно су нормализоване промене у ткиву јетре. Способност антоцијана који се налазе у аронији да смањи стеатозу јетре која је изазвана метаболичким синдромом и раније је документована (194, 195), тако да може да се претпостави да су антоцијани одговорни за пројективне ефекте нашег испитиваног екстракта. Резултати појединих студија сведоче и о позитивним ефектима *Aronia melanocarpa* на акумулацију липида у јетри, тако што долази до инхибиције експресије PPAR $\gamma$ 2 заједно са побољшањем телесне тежине, функције јетре, липидног профила и антиоксидационе способности. Петходно објављени и наши резултати указују на значајан потенцијал *Aronia melanocarpa* и њених екстраката на потенцијалну терапеутску ефикасност код стеатозе јетре (195, 196). Да би се испитали детаљи, неопходна су даља истраживања у чијем фокусу би било ово обољење.

**VI**

**ЗАКЉУЧЦИ**

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата наше студије могу се извести следећи закључци:

- 1) конзумирање екстракта ароније са стандардизованим процентом полифенола ублажило је повећање телесне тежине код пацова са метаболичким синдромом;
- 2) четворонедељни унос испитиваног екстракта ароније показао је значајне кардиопротективне и повољне ефекте на функцију миокарда;
- 3) промена дијететског режима са HFd на Sd, са или без примене испитиваног екстракта, значајно је утицала на побољшање липидног профила, а додаток екстракта ароније је смањио ниво LDL холестерола код пацова са метаболичким синдромом;
- 4) четворонедељни унос екстракта ароније са стандардизованим процентом полифенола, допринео је бољој толеранцији на глукозу у ОГТ тесту;
- 5) индукција метаболичког синдрома довела је до значајних промена у маснокиселинском саставу липида плазме; промена дијететског режима са HFd на Sd, са или без примене испитиваног екстракта, значајно је утицала на побољшање маснокиселинског профила код пацова, посебно n-3 PUFA, и односа n-6 и n-3 PUFA;
- 6) испитивани екстракт ароније побољшао је системску редокс равнотежу тако што је повећао антиоксидационе и смањио прооксидационе параметре у системској циркулацији;
- 7) стеатоза јетре, до које је дошло код пацова са метаболичким синдромом, значајно је умањена код пацова који су током четири недеље храњени и екстрактом ароније;
- 8) благотворнији ефекти испитиваног екстракта ароније бољи су уколико се он комбинује са здравијим начином исхране (стандардном дијетом).

**VII**

**ЛИТЕРАТУРА**

## 7. ЛИТЕРАТУРА

- 1) Ferranini E, Haffner SM, Mitchell BD, Stern MP. Hyperinzulinemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia*. 1991;34:416–422.
- 2) Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* 1998;15:539–553.
- 3) Fugger G, Dold M, Bartova L, et al. Major depression and comorbid diabetes-Findings from the European Group for the Study of Resistant Depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019;109638.
- 4) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) *JAMA*. 2001;285:2486–2497.
- 5) Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735–2752.
- 6) Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—A new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059–1062.
- 7) Ballard KD, Mah E, Guo Y, Pei R, Volek JS, Bruno RS. Low-fat milk ingestion prevents postprandial hyperglycemia-mediated impairments in vascular endothelial function in obese individuals with metabolic syndrome. *J. Nutr.* 2013;143:1602–1610.
- 8) Russell WR, Baka A, Bjorck I, et al. Impact of Diet Composition on Blood Glucose Regulation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016;56:541–590.
- 9) Pugliese G, Solini A, Bonora E, et al. Distribution of cardiovascular disease and retinopathy in patients with type 2 diabetes according to different classification systems for chronic kidney disease: A cross-sectional analysis of the renal insufficiency and cardiovascular events (RIACE) Italian multicenter study. *Cardiovasc. Diabetol.* 2014;13:59.
- 10) Asif M. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. *J. Educ. Health Promot.* 2014;3:1.



- 11) James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8) JAMA. 2014;311:507–520.
- 12) Thomas G, Shishehbor M, Brill D, Nally JV Jr. New hypertension guidelines: One size fits most? *Clevel. Clin. J. Med.* 2014;81:178–188.
- 13) Selassie M, Sinha AC. The epidemiology and aetiology of obesity: A global challenge. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2011;25:1–9.
- 14) Bosomworth NJ. Approach to identifying and managing atherogenic dyslipidemia: A metabolic consequence of obesity and diabetes. *Can. Fam. Phys.* 2013;59:1169–1180.
- 15) Alsheikh-Ali AA, Lin JL, Abourjaily P, Ahearn D, Kuvin JT, Karas RH. Prevalence of low high-density lipoprotein cholesterol in patients with documented coronary heart disease or risk equivalent and controlled low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol.* 2007;100:1499–1501.
- 16) Cominacini L, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, De Santis A, Pasini C, Pastorino AM, Bosello O. High-density lipoprotein lipases in obesity. *Ann Nutr Metab.* 1993;37:175–184.
- 17) Depres JP. Dyslipidaemia and obesity. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab.* 1994;8:629–659.
- 18) Bales CW, Kraus WE. Caloric restriction: Implications for human cardiometabolic health. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* 2013;33:201–208.
- 19) Lee EG, Choi JH, Kim KE, Kim JH. Effects of a Walking Program on Self-management and Risk Factors of Metabolic Syndrome in Older Korean Adults. *J. Phys. Ther. Sci.* 2014;26:105–109.
- 20) MZRS. Istraživanje zdravlja stanovnika Republike Srbije za 2013. godinu. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2014.
- 21) Kanungasukkasem U, Ng N, Minh HV, et al. Fruit and vegetable consumption in rural adults population in INDEPTH HDSS sites in Asia, *Global Health Action.* 2009;35:1.
- 22) Cavill N, Kahlmeier S, Racioppi F. Physical activity and health in Europe: evidence for action, WHO. 2006;7.
- 23) Pedersen PK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16:3–63.

- 24) Lock K, Pomerleau J, Causer L, Altmann DR, McKee M. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. *Bull WHO*. 2005;83:100-8.
- 25) Kotseva K, Wood D, De Backer G, De Bacquer D, Pyorala K, Keil U. EUROASPIRE III: a survey on the lifestyle, risk factors and use of cardioprotective drug therapies in coronary patients from 22 European countries. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16:121–137.
- 26) Opie LH, Lecour S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur Heart J*. 2007;28:1683–1693.
- 27) Rosell M, De Faire U, Hellénus ML. Low prevalence of the metabolic syndrome in Wine drinkers - is it the alcohol beverage or the lifestyle? *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:227–234.
- 28) van Dijk CG, Oosterhuis NR, Xu YJ, et al. Distinct Endothelial Cell Responses in the Heart and Kidney Microvasculature Characterize the Progression of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in the Obese ZSF1 Rat With Cardiorenal Metabolic Syndrome. *Circ Heart Fail*. 2016;9:e002760.
- 29) Schlaich M, Straznicki N, Lambert E, Lambert G. Metabolic syndrome: a sympathetic disease? *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3:148–157.
- 30) Parthasarathy S, Litvinov D, Selvarajan K, Garelnabi M. Lipid peroxidation and decomposition—Conflicting roles in plaque vulnerability and stability. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008;1781:221–231.
- 31) McGrowder D, Riley C, Morrison EY, Gordon L. The role of high-density lipoproteins in reducing the risk of vascular diseases, neurogenerative disorders, and cancer. *Cholesterol*. 2011;2011:496925.
- 32) Tune JD, Goodwill AG, Sassoon DJ, Mather KJ. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl Res*. 2017;183:57-70.
- 33) Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, WHO. 2011
- 34) Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med*. 2003;4:S11–S18.
- 35) Ervin BR. Prevalence of Metabolic Syndrome Among Adults 20 Years of Age and Over, by Sex, Age, Race and Ethnicity, and Body Mass Index: United States, 2003–2006 National Health Statistics Reports. 2009:13.

- 36) Legetic B, Campbell N. Reducing salt intake in the Americans: Pan American Health Organization actions. *J Health Commun.* 2011;16:37–48.
- 37) Ballestri S, Zona S, Targher G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2016;31:936–944.
- 38) Soares R, Costa C. *Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome.* Springer; Heidelberg, Germany:2009.
- 39) Ferri N, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and metabolic syndrome: Insights on insulin resistance, inflammation, and atherogenic dyslipidemia. *Endocrine.* 2016;doi:10.1007/s12020-016-0939-0.
- 40) Sassoon DJ, Goodwill AG, Noblet JN, et al. Obesity alters molecular and functional cardiac responses to ischemia/reperfusion and glucagon-like peptide-1 receptor agonism. *Basic Res Cardiol.* 2016;111:43.
- 41) Zibadi S, Vazquez R, Moore D, Larson DF, Watson RR. Myocardial lysyl oxidase regulation of cardiac remodeling in a murine model of diet-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H976–982.
- 42) Williams CL, Hayman LL, Daniels SR, et al. Cardiovascular health in childhood: a statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation.* 2002;106:143–160.
- 43) Diabetes Prevention Program (DPP) Research Group. The Diabetes Prevention Program (DPP): description of lifestyle intervention. *Diabetes Care.* 2002;25:2165–2171.
- 44) Bales CW, Kraus WE. Caloric restriction: Implications for human cardiometabolic health. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* 2013;33:201–208.
- 45) Grams J, Garvey WT. Weight Loss and the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes Using Lifestyle Therapy, Pharmacotherapy, and Bariatric Surgery: Mechanisms of Action. *Curr. Obes. Rep.* 2015;4:287–302.
- 46) Tay J, Thompson CH, Luscombe-Marsh ND, et al. Effects of an energy-restricted low-carbohydrate, high unsaturated fat/low saturated fat diet versus a high-carbohydrate, low-fat diet in type 2 diabetes: A 2-year randomized clinical trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2018;20:858-871.

- 47) Gomes JM, Costa JDA, Alfenas RC. Effect of increased calcium consumption from fat-free milk in an energy-restricted diet on the metabolic syndrome and cardiometabolic outcomes in adults with type 2 diabetes mellitus: a randomised cross-over clinical trial. *British Journal of Nutrition*. 2018;119:422-430.
- 48) Fleming JA, Kris-Etherton PM. The evidence for alpha-linolenic acid and cardiovascular disease benefits: Comparisons with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv. Nutr.* 2014;5:863S–876S.
- 49) Davis C, Bryan J, Hodgson J, Murphy K. Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review. *Nutrients*. 2015;7:9139–9153.
- 50) Salas-Salvadó J, Guasch-Ferré M, Lee CH, et al. Protective effects of the Mediterranean diet on type 2 diabetes and metabolic syndrome. *The Journal of nutrition*. 2015;146:920S-927S.
- 51) Michielsen CC, Hangelbroek RW, Feskens EJ, Afman LA. Disentangling the Effects of Monounsaturated Fatty Acids from Other Components of a Mediterranean Diet on Serum Metabolite Profiles: A Randomized Fully Controlled Dietary Intervention in Healthy Subjects at Risk of the Metabolic Syndrome. *Molecular nutrition & food research*. 2019;63:1801095.
- 52) Garcia-Silva J, Navarrete NN, Peralta-Ramírez MI, et al. Efficacy of Cognitive Behavioral Therapy in Adherence to the Mediterranean Diet in Metabolic Syndrome Patients: A Randomized Controlled Trial. *Journal of nutrition education and behavior*. 2018;50;896-904.
- 53) Esposito K, Maiorino MI, Bellastella G, et al. A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: A systematic review with meta-analyses. *BMJ Open*. 2015;5:e008222.
- 54) Mayneris-Perxachs J, Sala-Vila A, Chisaguano M, et al. Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk. *PLoS ONE*. 2014;9:e85202.
- 55) Koloverou E, Esposito K, Giugliano D, Panagiotakos D. The effect of Mediterranean diet on the development of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of 10 prospective studies and 136,846 participants. *Metab. Clin. Exp.* 2014;63:903–911.
- 56) Schwingshackl L, Missbach B, König J, Hoffmann G. Adherence to a Mediterranean diet and risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr.* 2015;18:1292–1299.

- 57) Lopez-Huertas E. The effect of EPA and DHA on metabolic syndrome patients: A systematic review of randomised controlled trials. *Br. J. Nutr.* 2012;107:185–194.
- 58) Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, et al. Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2018;58:1–16.
- 59) EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J.* 2010;8:1461–1566.
- 60) Mancini FR, Affret A, Dow C, et al. Dietary antioxidant capacity and risk of type 2 diabetes in the large prospective E3N-EPIC cohort. *Diabetologia.* 2018;61:308–316.
- 61) Sotoudeh G, Abshirini M, Bagheri F, et al. Higher dietary total antioxidant capacity is inversely related to prediabetes: a case-control study. *Nutrition.* 2018;46:20–25.
- 62) World Health Organization. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic.* WHO; Geneva, Switzerland: 2000. (World Health Organization Technical Report Series). Report of a WHO Consultation.
- 63) Schwarz NA, Rigby BR, La Bounty P, Shelmadine B, Bowden RG. A review of weight control strategies and their effects on the regulation of hormonal balance. *J. Nutr. Metab.* 2011;2011:237932.
- 64) Bhutani S, Varady KA. Nibbling versus feasting: Which meal pattern is better for heart disease prevention? *Nutr. Rev.* 2009;67:591–598.
- 65) Ekmekcioglu C, Touitou Y. Chronobiological aspects of food intake and metabolism and their relevance on energy balance and weight regulation. *Obes. Rev.* 2011;12:14–25.
- 66) Cameron JD, Cyr MJ, Doucet E. Increased meal frequency does not promote greater weight loss in subjects who were prescribed an 8-week equi-energetic energy-restricted diet. *Br. J. Nutr.* 2010;103:1098–1101.
- 67) Leidy HJ, Tang M, Armstrong CL, Martin CB, Campbell WW. The effects of consuming frequent, higher protein meals on appetite and satiety during weight loss in overweight/obese men. *Obesity.* 2011;19:818–824.
- 68) Smeets AJ, Lejeune MP, Westerterp-Plantenga MS. Effects of oral fat perception by modified sham feeding on energy expenditure, hormones and appetite profile in the postprandial state. *Br. J. Nutr.* 2009;101:1360–1368.

- 69) Perrigue MM, Drewnowski A, Wang CY, Neuhaus ML. Higher Eating Frequency Does Not Decrease Appetite in Healthy Adults. *J. Nutr.* 2016;146:59–64.
- 70) Bellastella G, Bizzarro A, Aitella E, et al. Pregnancy may favour the development of severe autoimmune central diabetes insipidus in women with vasopressin cell antibodies: Description of two cases. *Eur. J. Endocrinol.* 2015;172:K11–K17.
- 71) de Mello Fontanelli M, Sales CH, Carioca AA, et al. The relationship between carbohydrate quality and the prevalence of metabolic syndrome: challenges of glycemic index and glycemic load. *European journal of nutrition.* 2018;57:1197–1205.
- 72) Livesey G, Taylor R, Livesey HF, et al. Dietary glycemic index and load and the risk of type 2 diabetes: Assessment of causal relations. *Nutrients.* 2019;11:1436.
- 73) Bendtsen LQ, Lorenzen JK, Bendtsen NT, Rasmussen C, Astrup A. Effect of dairy proteins on appetite, energy expenditure, body weight, and composition: A review of the evidence from controlled clinical trials. *Adv. Nutr.* 2013;4:418–438.
- 74) Koppes LL, Boon N, Nooyens AC, van Mechelen W, Saris WH. Macronutrient distribution over a period of 23 years in relation to energy intake and body fatness. *Br. J. Nutr.* 2009;101:108–115.
- 75) Gregory SM, Headley SA, Wood RJ. Effects of dietary macronutrient distribution on vascular integrity in obesity and metabolic syndrome. *Nutr. Rev.* 2011;69:509–519.
- 76) De Jonge L, Bray GA, Smith SR, et al. Effect of diet composition and weight loss on resting energy expenditure in the POUNDS LOST study. *Obesity.* 2012;20:2384–2389.
- 77) Rios-Hoyo A, Cortes MJ, Rios-Ontiveros H, Meaney E, Ceballos G, Gutierrez-Salmean G. Obesity, Metabolic Syndrome, and Dietary Therapeutical Approaches with a Special Focus on Nutraceuticals (Polyphenols): A Mini-Review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2014;84:113–123.
- 78) Joshi Y, Goyal B. Anthocyanins: a lead for anticancer drugs, *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry.* 2011;1:1119–1126.
- 79) Mazza G. Anthocyanins and heart health, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità.* 2007;43:369–374.
- 80) Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytother. Res.* 2016;30:1265–1286.
- 81) Jiang X, Li X, Zhu C, Sun J, Tian L, Chen W, Bai W. The target cells of anthocyanins in metabolic syndrome. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2019;59:921–946.

- 82) Naseri R, Farzaei F, Haratipour P, et al. Anthocyanins in the management of metabolic syndrome: A pharmacological and biopharmaceutical review. *Frontiers in pharmacology*. 2019;9.
- 83) Thielecke F, Boschmann M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome—a review. *Phytochemistry*. 2009;70:11–24.
- 84) Hibi M, Takase H, Iwasaki M, Osaki N, Katsuragi Y. Efficacy of tea catechin-rich beverages to reduce abdominal adiposity and metabolic syndrome risks in obese and overweight subjects: a pooled analysis of 6 human trials. *Nutrition research*. 2018;55:1–10.
- 85) Rubio-Ruiz ME, Guarner-Lans V, Cano-Martínez A, et al. Resveratrol and Quercetin Administration Improves Antioxidant DEFENSES and reduces Fatty Liver in Metabolic Syndrome Rats. *Molecules*. 2019;24:1297.
- 86) Ostadmohammadi V, Milajerdi A, Ayati E, Kolahdooz F, Asemi Z. Effects of quercetin supplementation on glycemic control among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytotherapy Research*. 2019;33:1330–1340.
- 87) Tabrizi R, Tamtaji OR, Mirhosseini N, et al. The effects of quercetin supplementation on lipid profiles and inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2019;1–14.
- 88) Amiot MJ, Riva C, Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obesity Reviews*. 2016;17:573–586.
- 89) Rubio-Ruiz ME, Okonny E, Klinge CM. Mechanisms of Resveratrol and Estrogen in Cardioprotective Function. 2018:9.
- 90) Chaplin A, Carpené C, Mercader J. Resveratrol, metabolic syndrome, and gut microbiota. *Nutrients*. 2018;10:1651.
- 91) Rubio-Ruiz ME, Guarner-Lans V, Cano-Martínez A, et al. Resveratrol and Quercetin Administration Improves Antioxidant DEFENSES and reduces Fatty Liver in Metabolic Syndrome Rats. *Molecules*. 2019;24:1297.
- 92) Sheen JM, Yu HR, Tain YL, et al. Combined maternal and postnatal high-fat diet leads to metabolic syndrome and is effectively reversed by resveratrol: A multiple-organ study. *Scientific reports*. 2018;8:5607.

- 93) Walker JM, Eckardt P, Aleman JO, et al. The effects of trans-resveratrol on insulin resistance, inflammation, and microbiota in men with the metabolic syndrome: A pilot randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of clinical and translational research*. 2019;4:122.
- 94) Hou CY, Tain YL, Yu HR, Huang LT. The Effects of Resveratrol in the Treatment of Metabolic Syndrome. *International journal of molecular sciences*. 2019;20:535.
- 95) Tain YL, Hsu CN. Developmental programming of the metabolic syndrome: can we reprogram with resveratrol?. *International journal of molecular sciences*. 2018;19:2584.
- 96) Traber MG, Buettner GR, Bruno RS. The relationship between vitamin C status, the gut-liver axis, and metabolic syndrome. *Redox biology*. 2018;10:1091.
- 97) Hayashi D, Shirai Y. Protective Role of Alpha-Tocopherol in Diabetic Nephropathy. In *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. Academic Press. 2018;375–383.
- 98) Bruno RS. Vitamin E and Metabolic Syndrome. In *Vitamin E in Human Health*. Humana Press, Cham. 2019;295–310.
- 99) Beydoun MA, Chen X, Jha K, Beydoun HA, Zonderman AB, Canas JA. Carotenoids, vitamin A, and their association with the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition reviews*. 2019;77:32–45.
- 100) Park S, Ham JO, Lee BK. Effects of total vitamin A, vitamin C, and fruit intake on risk for metabolic syndrome in Korean women and men. *Nutrition*. 2015;31:111–118.
- 101) Taheri R, Connolly BA, Brand MH, Bolling BW. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61:8581–8588.
- 102) Szopa A, Kokotkiewicz A, Kubica P, et al. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. × prunifolia* and their antioxidant activities. *European Food Research and Technology*. 2017;243:1645–1657.
- 103) Oszmiański J, Wojdyło A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 2015;221:809–813.
- 104) Tanaka T, Tanaka A. Chemical components and characteristics of black chokeberry. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)*. 2001.



- 105) Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, et al. Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Molecules*. 2017;22:944.
- 106) Lazarova MP, Dimitrov KI, Nikov IS, Dzhonova DB. Polyphenols extraction from black chokeberry wastes. *Bulgarian Chemical Communications*. 2016;48,:442–445.
- 107) Denev P, Ciz M, Kratchanova M, Blazheva D. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food chemistry*. 2019;284:108–117.
- 108) Santhakumar AB, Battino M, Alvarez-Suarez JM. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;113:49–65.
- 109) Takahashi A, Shimizu H, Okazaki Y, et al. Anthocyanin-rich Phytochemicals from *Aronia* Fruits Inhibit Visceral Fat Accumulation and Hyperglycemia in High-fat Diet-induced Dietary Obese Rats. *J Oleo Sci*. 2015;64:1243–1250.
- 110) Kim B, Park Y, Wegner CJ, Bolling BW, Lee J. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in caco-2 cells. *J. Nutr. Biochem*. 2013;24:1564–1570.
- 111) Park CH, Kim JH, Lee EB, et al. *Aronia melanocarpa* extract ameliorates hepatic lipid metabolism through PPAR $\gamma$ 2 downregulation. *PloS one*. 2017;12:e0169685.
- 112) Loo BM, Erlund I, Koli R, et al. Consumption of chokeberry (*Aronia mitschurinii*) products modestly lowered blood pressure and reduced low-grade inflammation in patients with mildly elevated blood pressure. *Nutrition research*. 2016;36:1222–1230.
- 113) Pokimica B, García-Conesa MT, Zec M, et al. Chokeberry juice containing polyphenols does not affect cholesterol or blood pressure but modifies the composition of plasma phospholipids fatty acids in individuals at cardiovascular risk. *Nutrients*. 2019;11:850.
- 114) Some AA, Belemnaba L, Belemtougri RG, Nikiema M, Ouedraogo S. Endothelium dependent and endothelium independent activity of ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) on porcine coronary arteries and its underlying mechanisms of vasorelaxation. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2016;5:259–264.
- 115) Pavlova V, Sainova I, Alexieva B, Valkova I, Markova T, Nikolova E. Antioxidant effect of *aronia melanocarpa* extract after doxorubicin. *Bulg. J. Agric. Sci*. 2014;20:188–192.
- 116) Kardum N, Konic-Ristic A, Savikin K, et al. Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on antioxidant/pro-oxidant status in healthy subjects. *J Med Food*. 2014;17:869–874.

- 117) Yamane T, Imai M, Handa S, et al. Reduction of blood glucose and HbA1c levels by cyanidin 3, 5-diglucoside in KKAY mice. *Journal of Functional Foods*. 2019;58:21–26.
- 118) Cheyner V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:223S–229S.
- 119) Jurgonski A, Juskiewicz J, Zdunczyk Z. Comparison of the effects of chokeberry fruit extract, chicory flour and their dietary combination on blood parameters and antioxidant status of healthy and diabetic rats. *Pol J Food Nutr Sci*. 2008;58:273–278.
- 120) Braunlich M, Slimestad R, Wangensteen H, Brede C, Malterud KE, Barsett H. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients*. 2013;5:663–678.
- 121) Wu T, Grootaert C, Pitart J, et al. *Aronia (Aronia melanocarpa) Polyphenols Modulate the Microbial Community in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and Decrease Secretion of Proinflammatory Markers in a Caco-2/endothelial Cell Coculture Model*. *Molecular nutrition & food research*. 2018;62:1800607.
- 122) Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. FDA-approved anti-obesity drugs in the United States. *The American journal of medicine*. 2016;129:879.
- 123) Kopin L, Lowenstein CJ. Dyslipidemia. *Annals of internal medicine*. 2017;167:ITC81-ITC96.
- 124) Wright JM, Musini VM, Gill R. First-line drugs for hypertension. *Cochrane Database of systematic reviews*. 2018;4.
- 125) Ahrén B, Masmiquel L, Kumar H, et al. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide versus once-daily sitagliptin as an add-on to metformin, thiazolidinediones, or both, in patients with type 2 diabetes (SUSTAIN 2): a 56-week, double-blind, phase 3a, randomised trial. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5:341–354.
- 126) Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990;9:235–243.
- 127) Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000;5:415–418.
- 128) Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;279:L1005–L1028.

- 129) Razavi A, Baghshani MR, Rahsepar AA. Association between C-reactive protein, pro-oxidant-antioxidant balance and traditional cardiovascular risk factors in an Iranian population. *Annals of clinical biochemistry*. 2013;50:115–121.
- 130) Hoarau E, Chandra V, Rustin P, Scharfmann R, Duvillie B. Pro-oxidant/antioxidant balance controls pancreatic  $\beta$ -cell differentiation through the ERK1/2 pathway. *Cell death & disease*. 2014;5:e1487.
- 131) Liu F, Ng TB. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life sciences*. 2000;66:725–735.
- 132) Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical chemistry*. 1997;43:562–568.
- 133) Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24:816–823.
- 134) Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism*. 1995;44:363–368.
- 135) Ghelani H, Razmovski-Naumovski V, Nammi S. Chronic treatment of (R)- $\alpha$ -lipoic acid reduces blood glucose and lipid levels in high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced metabolic syndrome and type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. *Pharmacology research & perspectives*. 2017;5.
- 136) Rabadan-Chavez GM, Reyes-Maldonado E, Quevedo-Corona L, et al. The prothrombotic state associated with obesity-induced hypertension is reduced by cocoa and its main flavanols. *Food & function*. 2016;7:4880–4888.
- 137) Chang RL, Nithiyantham S, Huang CY, et al. Synergistic cardiac pathological hypertrophy induced by high-salt diet in IGF-IIR $\alpha$  cardiac-specific transgenic rats. *PLoS one*. 2019;14:e0216285.
- 138) Janjusevic L, Pejin B, Kaisarevic S, et al. Trametes Versicolor Ethanol Extract, a Promising Candidate for Health-Promoting Food Supplement. *Natural Product Research*. 2018;32:963–967.
- 139) Dayana K, Manasa MR. Evaluation of the Effect of Ceftriaxone on Lipid Peroxidation and Antioxidant Levels in Mice. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2019;12:245–250.

- 140) Cheng CW, Chen LY, Chou CW, Liang JY. Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015;48:262–267.
- 141) Pick E, Keisari YA simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal Immunological Methods*. 1980;38:161–170.
- 142) Glaser C, Demmelmair H, Koletzko B. High-Throughput Analysis of Total Plasma Fatty Acid Composition with Direct In Situ Transesterification. *PLoS ONE*. 2010;5:e12045.
- 143) Hadwan MH. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC biochemistry*. 2018;19:7.
- 144) Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247:3170–3175.
- 145) Greenwald RA. *Handbook Methods For Oxygen Radical Research: 0*. CRC press. 2018.
- 146) Mansoor N, Vinknes KJ, Veierod MB, Retterstol K. Effects of low-carbohydrate diets v. low-fat diets on body weight and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*. 2016;115:466–479.
- 147) Atamni HJAT, Mott R, Soller M, Iraqi FA. High-fat-diet induced development of increased fasting glucose levels and impaired response to intraperitoneal glucose challenge in the collaborative cross mouse genetic reference population. *BMC genetics*. 2016;17:10.
- 148) Hellstrom JK, Shikov AN, Makarova MN, et al. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii* var. Viking). *J Funct Foods*. 2010;2:163–169.
- 149) Yamane T. Beneficial Effects of Anthocyanin from Natural Products on Lifestyle-Related Diseases Through Inhibition of Protease Activities. In *Studies in Natural Products Chemistry*. 2018;58:245–264.
- 150) Kardum N, Milovanovic B, Savikin K, et al. Beneficial effects of polyphenol-rich chokeberry juice consumption on blood pressure level and lipid status in hypertensive subjects. *Journal of medicinal food*. 2015;18:1231–1238.
- 151) Cebova M, Klimentova J, Janega P, Pechanova O. Effect of bioactive compound of *Aronia melanocarpa* on cardiovascular system in experimental hypertension. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017.
- 152) Parzonko A, Naruszewicz M. Cardioprotective effects of *Aronia melanocarpa* anthocyanins. From laboratory experiments to clinical practice. *Current pharmaceutical design*. 2016;22:174–179.

- 153) Sureda A, Silva AS, Sanchez-Machado DI, et al. Hypotensive effects of genistein: From chemistry to medicine. *Chemico-biological interactions*. 2017;268:37–46.
- 154) Bouaziz A, Abdalla S, Baghiani A, Charef N. Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015;5:19–28.
- 155) Sikora J, Broncel M, Mikiciuk-Olasik E. *Aronia melanocarpa* Elliot reduces the activity of angiotensin i-converting enzyme-in vitro and ex vivo studies. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:739721.
- 156) Naruszewicz M, Laniewska I, Millo B, Dłużniewski M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). *Atherosclerosis*. 2007;194:e179–e184.
- 157) Kanthe PS, Patil BS, Bagali SC, Reddy RC, Aithala MR, Das KK. Protective effects of Ethanolic Extract of *Emblica officinalis* (amla) on Cardiovascular Pathophysiology of Rats, Fed with High Fat Diet. *J Clin Diagn Res*. 2017;11:CC05–CC09.
- 158) Jo E, Lewis KL, Higuera D, et al. Dietary caffeine and polyphenol supplementation enhances overall metabolic rate and lipid oxidation at rest and after a bout of sprint interval exercise. *Journal of strength and conditioning research*. 2016;30:1871–1879.
- 159) Pan SL, Lin H, Luo HQ, et al. Effects of yellow wine polyphenols on cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy rats. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi= Zhongguo yingyong shenglixue zazhi= Chinese journal of applied physiology*. 2017;33:431–435.
- 160) Yadegari M, Khamesipour F, Talebiyan R, Katsande S. Echocardiography findings after intravenous injection of *Achillea millefolium* (Yarrow) extract in the dog. *Malaysian Applied Biology* 2015;44:85–91.
- 161) Kim NH, Jegal J, Kim YN, et al. Chokeberry Extract and Its Active Polyphenols Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Modulates Fat Accumulation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*. 2018;10:E1734.
- 162) Mitra SK, Gopumadhavan S, Muralidhar TS, Anturlikar SD, Sujatha MB. Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated hemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. *Indian J Exp Biol*. 1995;33:798–800.

- 163) Qin B, Anderson RA. An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Brit J Nutr.* 2012;108:581–587.
- 164) García-Flores LA, Medina S, Gómez C, et al. Aronia-citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: a lipidomic approach using representative oxylipins in urine. *Food Funct.* 2018;9:463–475.
- 165) Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M. In vivo influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monit.* 2012;8:CR569–CR574.
- 166) Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit.* 2010;16:CR28–CR34.
- 167) Heeren J, Niemeier A, Merkel M, Beisiegel U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *Journal of molecular medicine.* 2002;80:576–584.
- 168) Odbayar TO, Badamhand D, Kimura T, Takahashi Y, Tsushida T, Ide T. Comparative studies of some phenolic compounds (quercetin, rutin, and ferulic acid) affecting hepatic fatty acid synthesis in mice. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2006;54;8261–8265.
- 169) Frémont L, Gozzelino MT, Linard A. Response of plasma lipids to dietary cholesterol and wine polyphenols in rats fed polyunsaturated fat diets. *Lipids.* 2000;35:991–999.
- 170) Ohta Y, Sami M, Kanda T, Saito K, Osada K, Kato H. Gene expression analysis of the anti-obesity effect by apple polyphenols in rats fed a high fat diet or a normal diet. *Journal of Oleo Science.* 2006;55:305–314.
- 171) Kim B, Park Y, Wegner CJ, Bolling BW, Lee J. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in caco-2 cells. *J Nutr Biochem.* 2013;24:1564–1570.
- 172) Kotronen A, Velagapudi VR, Yetukuri L, et al. Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia.* 2009;52:684–690.

- 173) Liu TW, Heden TD, Matthew Morris E, Fritsche KL, Vieira-Potter VJ, Thyfault JP. High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity Prone Rats: Implications for In Vitro Studies. *Lipids*. 2015;50:997–1008.
- 174) Milic P, Jeremic J, Zivkovic V, et al. Effects of different dietary regimes alone or in combination with standardized *Aronia melanocarpa* extract supplementation on lipid and fatty acids profiles in rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 2019;461:141–150.
- 175) Rafiei H, Omidian K, Bandy B. Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an in vitro model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function. *Nutrients*. 2019;11:541
- 176) Turnic NT, Arsic A, Vucic V, et al. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors differentially modulate plasma fatty acids in rats with diet-induced-hyperhomocysteinemia: Is  $\omega$ -3 fatty acids supplementation necessary? *Frontiers in physiology*. 2019;10:892.
- 177) Piñeiro-Corrales G, Lago Rivero N, Culebras-Fernández JM. Role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease prevention. *Nutr Hosp*. 2013;28:1–5.
- 178) Veselinovic M, Vasiljevic D, Vucic V, et al. Clinical benefits of n-3 PUFA and  $\alpha$ -linolenic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrients*. 2017;9:325.
- 179) Ristic-Medic D, Vucic V, Takic M, Karadzic I, Glibetic M. Polyunsaturated fatty acids in health and disease. *J Serb Chem Soc*. 2013;78:1269.
- 180) Simopoulos AP. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2013;5:2901–2923.
- 181) Yang B, Ding F, Yan J, et al. Exploratory serum fatty acid patterns associated with blood pressure in community-dwelling middle-aged and elderly Chinese. *Lipids Health Dis*. 2016;15:58.
- 182) Gao M, Ma Y, Liu D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS ONE*. 2015;3:e0119784.
- 183) Vucic V. The role of dietary polyunsaturated fatty acids in inflammation. *SJECR*. 2013;14:93–99.
- 184) Mayneris-Perxachs J, Guerendiain M, Castellote AI, 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.

- 185) Martin MA, Almeida VV, Ruiz MR, et al. Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids: Importance and Occurrence in Foods. *Revista de Nutrição*. 2016;19:761–770.
- 186) Lee HJ, Jang HB, Park JE, et al. Relationship between Serum Levels of Body Iron Parameters and Insulin Resistance and Metabolic Syndrome in Korean Children. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014;5:204–210.
- 187) Yamane T, Kozuka M, Konda D, et al. Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and  $\alpha$ -glucosidase. *J Nutr Biochem*. 2016;31:106–112.
- 188) Imam MU, Zhang S, Ma J, Wang H, Wang F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients* 2017;9:E671.
- 189) Mu M, An P, Wu Q, et al. The dietary flavonoid myricetin regulates iron homeostasis by suppressing hepcidin expression. *J Nutr Biochem*. 2016;30:53–61.
- 190) Davi G, Santilli F, Patrono C. Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010;28:216–226.
- 191) Mahmoud AM, Wilkinson FL, Sandhu MA, Dos Santos JM, Alexander MY. Modulating Oxidative Stress in Drug-Induced Injury and Metabolic Disorders: The Role of Natural and Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019.
- 192) Yu H, Guo Z, Wang S, et al. Fabrication of hybrid materials from titanium dioxide and natural phenols for efficient radical scavenging against oxidative stress. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019.
- 193) Gulcin I, Tel AZ, Goren AC, Taslimi P, Alwasel SH. Sage (*Salvia pilifera*): determination of its polyphenol contents, anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2019;1-13.
- 194) Sharma H, Chawla N, Dhatt AS. Nutraceutical content and free radical scavenging capacity of brinjal (*Solanum melongena* L.) genotypes. *Scientia horticulturae*. 2019;244:294-303.
- 195) Sangsefidi ZS, Hosseinzadeh M, Ranjbar AM, Akhondi-Meybodi M, Fallahzadeh H, Mozaffari-Khosravi H. The effect of total anthocyanin-base standardized (*Cornus mas* L.) fruit extract on liver function, tumor necrosis factor  $\alpha$ , malondealdehyde, and adiponectin in patients with non-alcoholic fatty liver: a study protocol for a double-blind randomized clinical trial. *Nutrition Journal*. 2019;18:39.



- 196) Haga S, YiMin Yamaki H, Jin S, Sogon T, Morita N, Ozaki M. Extracts of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits improve liver steatosis and injury in mice by preventing lipid accumulation and cell death. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2019.

## БИОГРАФИЈА

### 1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Име и презиме: Петар Милић

Датум и место рођења: 12.05.1966. године, Лесковац, Југославија

Адреса: Мутапова 48, Врачар, Београд

Телефон: +381641100777

### 2. ОБРАЗОВАЊЕ

Основне студије на Технолошком факултету у Лесковцу (биохемијски одсек, прехранбени смер), дипломирао 1990. године.

Основне студије на Фармацеутском факултету у Београду (смер - дипломирани фармацеут), дипломирао 2000. године.

Специјалистичке студије (област - фармакоепидемиологија и фармацеутска легислатива) на Фармацеутском факултету у Београду, завршио је 2007. године.

Докторске студије на Технолошком факултету у Лесковцу, студијски програм Технолошко инжењерство, завршио је 2014. године, одбранивши докторску дисертацију „Оптимизација и моделовање кинетике екстракције резиноида и минералних материја из белог ивањског цвећа (*Galium mollugo* L.)“.

Специјалистичке студије из Козметологије на Фармацеутском факултету у Београду започео је 2009. године.

### 3. РАДНО ИСКУСТВО

Од марта 2009. до октобра 2012. године био је у радном односу у Високој хемијско-технолошкој школи струковних студија у Крушевцу, где је био ангажован као предавач на предметима Технологија фармацеутских производа 1, Технологија фармацеутских производа 2, Козметологија и Савремени фармацеутски облици.

Радни однос у Високој медицинској школи струковних студија у Ћуприји засновао је октобра 2012. године, где је био ангажован као професор струковних студија на предметима Фармакологија, Фармакологија са фармакокинетиком, Фармацеутска технологија са биофармацијом, Хомеопатија.

Тренутно ради на Академији васпитачко-медицинских струковних студија, одсек Ћуприја, где је ангажован као професор струковних студија на предметима Фармакологија, Фармакологија са фармакокинетиком, Фармацеутска технологија са биофармацијом, Хомеопатија.

**БИБЛИОГРАФИЈА**

## РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ВОДЕЋИМ МЕЂУНАРОДНИМ ЧАСОПИСИМА (M21)

1. Jakovljevic V, **Milic P**, Bradic J, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2019;20:doi:10.3390/ijms20010006.
2. **Milic SP**, Rajkovic MK, Stamenkovic SO, Veljkovic BV. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20:525–534.
3. **Milic SP**, Rajkovic MK, Bekric MD, Stamenkovic SO, Veljkovic BV. The kinetic and thermodynamic analysis of ultrasound-extraction of minerals from aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.), *Chemical Engineering Research and Design*. 2013; doi: 10.1016/j.cherd.2013.10.024.
4. Rajkovic MK, Avramovic MJ, **Milic SP**, Stamenkovic SO, Veljkovic BV. Optimization of ultrasound-assisted base-catalyzed methanolysis of sunflower oil using response surface and artificial neural network methodologies, *Chemical Engineering Journal*. 2013;215-216:82-89.
5. Stamenkovic SO, Rajkovic MK, Ana V. Velickovic, **Milic SP**, Veljkovic BV. Optimization of base-catalyzed ethanolysis of sunflower oil by regression and artificial neural network models, *Fuel Technology Processing*. 2013;114:101-108.
6. Kostic MD, Jokovic MN, Stamenkovic SO, Rajkovic MK, **Milic SP**, Veljkovic BV. Optimization of hempseed oil extraction by *n*-hexane, *Industrial Crops and Products*. 2013;48:133-143.
7. Avramovic JM, Velickovic AV, Stamenkovic OS, Rajkovic KM, **Milic PS**, Veljkovic VB. Optimization of sunflower oil ethanolysis catalyzed by calcium oxide: RSM versus ANN-GA. *Energy Conversion and Management*. 2015;105:1149-1156.
8. Stamenkovic OS, Velickovic AV, Kostic MD, Jokovic NM, Rajkovic KM, **Milic PS**, Veljkovic VB. Optimization of KOH-catalyzed methanolysis of hempseed oil (2015) *Energy Conversion and Management*. 2015;103:235-243.

9. Kostic MD, Jokovic NM, Stamenkovic OS, Rajkovic KM, **Milic PS**, Veljkovic VB. The kinetics and thermodynamics of hempseed oil extraction by n-hexane. *Industrial Crops and Products*. 2014;52:679-686.

## РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ВОДЕЋИМ МЕЂУНАРОДНИМ ЧАСОПИСИМА (M23)

1. **Milic P**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Bradic J, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Arsic A, Mitrovic M, Jakovljevic V, Vucic V. 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;461:141–150.
2. **Milic PS**, Rajkovic KM, Stamenkovic OS, Bekric DM, Arsic-Arsenijevic V, Jovanovic PD, Veljkovic VB. Statistical modeling and optimization of classical and ultrasound-assisted extraction of the minerals from *Galium mollugo* L. by response surface methodology and genetic algorithm. *Journal of food processing and preservation*. 2018;42(3):e13552.
3. **Milic SP**, Stanojevic PLj, Rajkovic MK, Milic MS, Nikolic DV, Nikolic BLjL, Veljkovic BV. Antioxidant activity of *Galium mollugo* L. extracts obtained by different recovery techniques, *Hem. Ind.* 2013;67:89-94.
4. **Milic SP**, Rajkovic MK, Milicevic MP, Milic MS, Brdaric PT, Pavelkic MV. Comparison, artificial neural network modeling and genetic algorithm optimization of the resinoid and potassium yields from white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.) by conventional, reflux and ultrasound-assisted aqueous-ethanolic extraction, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 2013;19:141-152.
5. **Milic SP**, Bekric MD, Milic MS, Rajkovic MK. Ispitivanje kinetike ekstrakcije minerala iz belog ivanjskog cveca (*Galium mollugo* L.) primenom veštačke neuronske mreže, *Hem. Ind.* 2011;65:313-321.
6. **Milic P**, Milic S. Istorijat prve apoteke u leskovackom kraju, *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2011;139:700-704.
7. **Milic P**, Milic S. Razvoj farmacije u leskovačkom kraju u periodu od oslobodjenja od Turaka do drugog svetskog rata, *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2013;141:11-12.
8. Rajkovic MK, Jeremic S, **Milic SP**, Kostic M, Arsic-Arsenijevic V, Gavrilovic M, Krstic B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Total Extractive Substances from *Galium verum* L., *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. DOI: 10.3311/PPch.9580.

## САОПШТЕЊА СА МЕЂУНАРОДНОГ СКУПА ШТАМПАНА У ИЗВОДУ (М34)

1. Zivanovic I, Arsic-Arsenijevic V, Mitrovic S, **Milic P**. Fluorescent stain blankophor (BP) – a cost-benefit step in forward detection of fungi, ISPOR Serbia chapter, First International Conference, 2009, Beograd.
2. **Milic P**, Zivanovic I, Colovic I, Arsic-Arsenijevic V. Therapy of urinary infections-pharmaco-economic analysis, ISPOR Serbia Chapter, First International Conference, Beograd, 2009.
3. **Milic P**, Vujacic V. Primena standarda kvaliteta i bezbednosti hrane u proizvodnji mlečnih proizvoda, područje Vlasina, IV Međunarodna konferencija, zdravstveno bezbedna hrana, Novi Sad, 2006.

## САОПШТЕЊА СА МЕЂУНАРОДНОГ СКУПА ШТАМПАНА У ИЗВОДУ (М64)

1. Milic SM, Milic J, **Milic P**, Radulovic N, Todorovic Z, Arsenijevic VA. Formulation and characterization of ear drops whit essential eucalyptus oil. V Congress of pharmacists of Serbia, Beograd, 2010.
2. **Milic P**, Rajkovic K, Milic S, Veljkovic V. Modeling the kinetics of resinoids extraction from the aerial parts of white ladi's bedstraw (*Galium mollugo L.*), XXII congress of Society Chemists and Tehnologists of Macedonia, Ohrid, 2012.
3. **Milic P**, Rajkovic K, Bekric D, Veljkovic V. The use of artificial neural network for prediction of the resinoids extraction yield from *Hypericum perforatum L.*, XXII congress of Society Chemists and Tehnologists of Macedonia, Ohrid, 2012.

## ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Петар С. Милић, Оптимизација и моделовање кинетике екстракције резиноида и минералних материја из белог ивањског цвећа (*Galium mollugo L.*), Универзитет у Нишу, Технолошки факултет, Лесковац, 2014.

## BIOGRAPHY

### 1. PERSONAL DATA

Name: Petar Milic

Date and place of birth: May 12, 1966, Leskovac, Yugoslavia

Address: 48 Mutapova, Vracar, Belgrade

Phone: +381641100777

### 2. EDUCATION

Faculty of Technology in Leskovac (biochemical department, nutrition), graduated in 1990.

Faculty of Pharmacy in Belgrade (pharmacist), graduated in 2000.

Specialisation at the Faculty of Pharmacy in Belgrade (field - pharmacoepidemiology and pharmaceutical legislation), finished in 2007.

Doctoral studies at the Faculty of Technology in Leskovac in the study program Technological Engineering in 2014, defending his doctoral dissertation "Optimization and modeling of the kinetics of extraction of resinoids and minerals from white ivory flowers (*Galium mollugo* L.)".

Specialisation in Cosmetology at the Faculty of Pharmacy in Belgrade from 2009 - present.

### 3. WORK EXPERIENCE

From March 2009 to October 2012 he was employed at Chemical Technology School of Professional Studies in Krusevac, where he was engaged as a lecturer for the subjects Technology of pharmaceutical products 1, Technology of pharmaceutical products 2, Cosmetology and Modern pharmaceutical forms.

He started working at the Medical School of Professional Studies in Cuprija in October 2012, where he was engaged as a professor of professional studies in the subjects Pharmacology, Pharmacology with pharmacokinetics, Pharmaceutical technology with biopharmacy, Homeopathy.

He is currently working at the Academy of Educational and Medical Vocational Studies, Department of Cuprija, where he is engaged as a professor of vocational studies in the subjects Pharmacology, Pharmacology with pharmacokinetics, Pharmaceutical technology with biopharmacy, Homeopathy.

**LIST OF PUBLICATIONS**

## ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS (M21)

1. Jakovljevic V, **Milic P**, Bradic J, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2019;20:doi:10.3390/ijms20010006.
2. **Milic SP**, Rajkovic MK, Stamenkovic SO, Veljkovic BV. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrasonics Sonochemistry.* 2013;20:525–534.
3. **Milic SP**, Rajkovic MK, Bekric MD, Stamenkovic SO, Veljkovic BV. The kinetic and thermodynamic analysis of ultrasound-extraction of minerals from aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.), *Chemical Engineering Research and Design.* 2013; doi: 10.1016/j.cherd.2013.10.024.
4. Rajkovic MK, Avramovic MJ, **Milic SP**, Stamenkovic SO, Veljkovic BV. Optimization of ultrasound-assisted base-catalyzed methanolysis of sunflower oil using response surface and artificial neural network methodologies, *Chemical Engineering Journal.* 2013;215-216:82-89.
5. Stamenkovic SO, Rajkovic MK, Ana V. Velickovic, **Milic SP**, Veljkovic BV. Optimization of base-catalyzed ethanolysis of sunflower oil by regression and artificial neural network models, *Fuel Technology Processing.* 2013;114:101-108.
6. Kostic MD, Jokovic MN, Stamenkovic SO, Rajkovic MK, **Milic SP**, Veljkovic BV. Optimization of hempseed oil extraction by *n*-hexane, *Industrial Crops and Products.* 2013;48:133-143.
7. Avramovic JM, Velickovic AV, Stamenkovic OS, Rajkovic KM, **Milic PS**, Veljkovic VB. Optimization of sunflower oil ethanolysis catalyzed by calcium oxide: RSM versus ANN-GA. *Energy Conversion and Management.* 2015;105:1149-1156.
8. Stamenkovic OS, Velickovic AV, Kostic MD, Jokovic NM, Rajkovic KM, **Milic PS**, Veljkovic VB. Optimization of KOH-catalyzed methanolysis of hempseed oil (2015) *Energy Conversion and Management.* 2015;103:235-243.
9. Kostic MD, Jokovic NM, Stamenkovic OS, Rajkovic KM, **Milic PS**, Veljkovic VB. The kinetics and thermodynamics of hempseed oil extraction by *n*-hexane. *Industrial Crops and Products.* 2014;52:679-686.

## ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS (M23)

1. **Milic P**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Bradic J, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Arsic A, Mitrovic M, Jakovljevic V, Vucic V. 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;461:141–150.
2. **Milic PS**, Rajkovic KM, Stamenkovic OS, Bekric DM, Arsic-Arsenijevic V, Jovanovic PD, Veljkovic VB. Statistical modeling and optimization of classical and ultrasound-assisted extraction of the minerals from Galium mollugo L. by response surface methodology and genetic algorithm. *Journal of food processing and preservation.* 2018;42(3):e13552.
3. **Milic SP**, Stanojevic PLj, Rajkovic MK, Milic MS, Nikolic DV, Nikolic BLjL, Veljkovic BV. Antioxidant activity of Galium mollugo L. extracts obtained by different recovery techniques, *Hem. Ind.* 2013;67:89-94.
4. **Milic SP**, Rajkovic MK, Milicevic MP, Milic MS, Brdaric PT, Pavelkic MV. Comparison, artificial neural network modeling and genetic algorithm optimization of the resinoid and potassium yields from white lady's bedstraw (*Galium mollugo L.*) by conventional, reflux and ultrasound-assisted aqueous-ethanolic extraction, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 2013;19:141-152.
5. **Milic SP**, Bekric MD, Milic MS, Rajkovic MK. Ispitivanje kinetike ekstrakcije minerala iz belog ivanjskog cveca (*Galium mollugo L.*) primenom veštačke neuronske mreže, *Hem. Ind.* 2011;65:313-321.
6. **Milic P**, Milic S. Istorijat prve apoteke u leskovackom kraju, *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2011;139:700-704.
7. **Milic P**, Milic S. Razvoj farmacije u leskovačkom kraju u periodu od oslobodjenja od Turaka do drugog svetskog rata, *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2013;141:11-12.
8. Rajkovic MK, Jeremic S, **Milic SP**, Kostic M, Arsic-Arsenijevic V, Gavrilovic M, Krstic B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Total Extractive Substances from Galium verum L., *Periodica Polytechnica Chemical Engineering.* DOI: 10.3311/PPch.9580.



## INTERNATIONAL CONFERENCES (M34)

1. Zivanovic I, Arsic-Arsenijevic V, Mitrovic S, **Milic P**. Fluorescent stain blankophor (BP) – a cost-benefit step in forward detection of fungi, ISPOR Serbia chapter, First International Conference, 2009, Beograd.
2. **Milic P**, Zivanovic I, Colovic I, Arsic-Arsenijevic V. Therapy of urinary infections-pharmaco-economic analysis, ISPOR Serbia Chapter, First International Conference, Beograd, 2009.
3. **Milic P**, Vujacic V. Application of food quality and safety standards in dairy production, Vlasina, IV International Conference, Health Food, Novi Sad, 2006.

## INTERNATIONAL CONFERENCES (M64)

1. Milic SM, Milic J, **Milic P**, Radulovic N, Todorovic Z, Arsenijevic VA. Formulation and characterization of ear drops whit essential eucalyptus oil. V Congress of pharmacists of Serbia, Beograd, 2010.
2. **Milic P**, Rajkovic K, Milic S, Veljkovic V. Modeling the kinetics of resinoids extraction from the aerial parts of white ladi's bedstraw (*Galium mollugo L.*), XXII congress of Society Chemists and Tehnologists of Macedonia, Ohrid, 2012.
3. **Milic P**, Rajkovic K, Bekric D, Veljkovic V. The use of artificial neural network for prediction of the resinoids extraction yield from *Hypericum perforatum L.*, XXII congress of Society Chemists and Tehnologists of Macedonia, Ohrid, 2012.

## DOCTORAL DISSERTATION

Petar S. Milić, Optimization and Modeling of Extraction Kinetics of Resinoids and Minerals of *Galium mollugo L.*, University of Niš, Faculty of Technology, Leskovac, 2014.

## ПРИЛОГ

### КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

#### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број - РБ:**

**Идентификациони број - ИБР:**

**Тип документације - ТД:** Монографска документација

**Тип записа - ТЗ:** Текстуални штампани материјал

**Врста рада - ВР:** Докторска дисертација

**Аутор - АУ:** Петар Милић

**Ментор/коментор - МН:** Весна Вучић, научни саветник

**Наслов рада - НР:** Испитивање ефеката дијете обogaћене екстрактом ароније на настанак и развој метаболичког синдрома на анималном моделу

**Језик публикације - ЈП:** Српски (ћирилица)

**Језик извода - ЈИ:** Српски/Енглески

**Земља публикавања - ЗП:** Република Србија

**Уже географско подручје - УГП:** Шумадијски округ

**Година - ГО:** 2019.

**Издавач - ИЗ:** Ауторски репринт

**Место и адреса - МС:** 34000 Крагујевац, Србија, Улица Светозара Марковића 69

**Физичи опис рада - ФО:** 106 страна, 12 слика, 21 графикона, 9 табела, 196 референци

**Научна област - УДК:** Медицина

**Научна дисциплина - ДИ:** Клиничка и експериментална фармакологија

**Предметна одредница/ кључне речи - ПО:** метаболички синдром, стандардизовани екстракт ароније, оксидациони стрес, полинезасићене масне киселине

**Чува се - ЧУ:** У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Светозара Марковића 69, Република Србија

**Важна напомена- МН:**

**Извод - ИД:**

**Циљ:** Основн циљ ове студије био је да испита ефекте дијете обogaћене екстрактом ароније на настанак и развој метаболичког синдрома на анималном моделу.

**Метод:** 24 здравих пацова *Wistar albino* и 48 пацова истог соја, којима је претходно индукован метаболичким синдромом, подвргнуто је различитим дијеталним стратегијама које су подразумевале, исхрану са високих садржајем масти (*High Fat diet*, HFd) или стандардну исхрану (*Standard diet*, Sd) самостално, или у комбинацији са стандардизованим екстрактом ароније (*Standardized Aronia Extract*, SAE). SAE (у дози од 0,45 ml/kg дневно), као и наведени обрасци исхране примењивали су се током 4 недеље код пацова. У зависности од дијететског режима, пацови су насумично разврстани у шест група: здрави пацови храњени Sd (CTRL), здрави пацови храњени Sd уз примену екстракта (SAE), пацови са метаболичким синдромом храњени HFd (MetS+HFd), пацови са метаболичким синдромом храњени HFd уз примену екстракта (MetS+HFd+SAE), пацови са метаболичким синдромом храњени Sd (MetS+Sd), пацови са метаболичким синдромом храњени Sd уз примену екстракта (MetS+Sd+SAE).

**Резултати:** Резултати студије показали су да примењени екстракт ароније има способност да ублажи повећање телесне тежине код пацова са метаболичким синдромом, побољша функцију срца, допринесе бољој толеранцији на глукозу, повећа антиоксидационе и смањи прооксидационе параметре у системској циркулацији, ублажи промене на јетри и умањи нивое LDL холестерола код пацова са метаболичким синдромом. Међутим, битно је напоменути да су благотворнији ефекти испитиваног екстракта ароније бољи уколико се он комбинује са здравијим начином исхране, односно стандардном дијетом. Такође, промена дијететског режима са HFd на Sd са, или без примене испитиваног екстракта значајно је утицала на побољшање липидног профила и побољшање маснокиселинског профила код пацова, посебно омега 3 полинезасићених масних киселина (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), и односа омега 6 и омега 3 PUFA.

**Закључак:** Обећавајући ефекти испитиваног екстракта ароније пружају основу за будућа истраживања која би додатно сагледала терапијске могућности и објаснила механизме путем којих овај екстракт остварује протективне ефекте.

**Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП:** 26.12.2018. године

**Датум одбране - ДО:**

**Чланови комисије - КО:**

Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, председник;

Проф. Др Марина Томовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска технологија*, члан;

НС Александра Арсић, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област *Биохемија*, члан.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number - ANO:**

**Identification number - INO:**

**Documentation type - DT:** Monographic publication

**Type of record - TR:** Textual material, printed

**Contents code - CC:** PhD thesis

**Author - AU:** Petar Milic

**Menthor/co-mentor - MN:** Vesna Vucic, Full Research Professor

**Title - TI:** Investigation of the effects of a diet enriched with aronia extract on the onset and development of metabolic syndrome in an animal model

**Language of text - LT:** Serbian (cyrillic)

**Language of abstract:** Serbian/English

**Country of publication - CP:** Republic of Serbia

**Locality of publication - LP:** Sumadija municipality

**Publication year - PY:** 2019

**Publisher - PU:** Author`s reprint

**Publication place - PP:** 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica Street, 69

**Physical description - PD:** 106 pages, 12 pictures, 21 graphs, 9 tables, 196 references

**Scientific field - SF:** Medicine

**Scientific discipline - SD:** Clinical and Experimental Pharmacology

**Subject/key words - SKW:** metabolic syndrome, standardized aronia extract, oxidative stress, polyunsaturated fatty acids

**UDC:** medicine

**Holding data:** Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Svetoyara Markovica Street 69, Republic of Serbia

**Note - N:**

**Abstract -AB:**

**Objective:** The main objective of the present study was to investigate the effects of a diet enriched with Aronia extract on the development of metabolic syndrome in an animal model.

**Methods:** 24 healthy Wistar albino rats and 48 Wistar albino rats with induced metabolic syndrome, were subjected to different dietary strategies, which included high-fat diet (HFd) or standard diet (Sd) alone, or in combination with Standardized Aronia Extract (SAE). SAE (0.45 ml/kg daily), as well as the above-mentioned diet patterns, were administered in rats for 4 weeks. Depending on dietary regimen, rats were randomly classified into six groups: healthy rats fed with Sd (CTRL), healthy rats fed with Sd in combination with extract (SAE), rats with metabolic syndrome fed with HFd (MetS+HFd), rats with metabolic syndrome fed with HFd in combination with extract (MetS+HFd+SAE), rats with metabolic syndrome fed with Sd (MetS+Sd), rats with metabolic syndrome fed with Sd in combination with extract (MetS+Sd+SAE).

**Results:** The results of the study showed that applied Aronia extract can reduce weight gain in rats with metabolic syndrome, improve heart function, contribute to better glucose tolerance, increase antioxidant and reduce prooxidant in the systemic circulation, mitigate liver changes and decrease LDL cholesterol levels in rats with metabolic syndrome. However, it is important to note that obtained beneficial effects of SAE were more prominent in combination with a healthier diet (standard diet). Also, changing the dietary regimen from HFd to Sd with or without the extract consumption, significantly improve the lipid, and fatty acid profile in rats.

**Conclusion:** The promising effects of extract offers a basis for future research which would further explore the therapeutic possibilities and explain underlying mechanisms for pharmacological activity.

**Accepted by the Scientific Board on - ASB:** 26.12.2018.

**Defended on - DE:**

**Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:**

Full professor Dragan Milovanovic, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain Pharmacology and toxicology, chairman;

Associate professor Marina Tomovic, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific domain Pharmaceutical technology, member;

Associate research professor Aleksandra Arsic, PhD, Institute for Medical Research, Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism, University of Belgrade, member.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Петар Милић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ  
АРОНИЈЕ НА НАСТАНАК И РАЗВОЈ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА  
НА АНИМАЛНОМ МОДЕЛУ

која је одбрањена на Факултету медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 15.11.2019. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Петар Милић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ДИЈЕТЕ ОБОГАЂЕНЕ ЕКСТРАКТОМ  
АРОНИЈЕ НА НАСТАНАК И РАЗВОЈ МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА  
НА АНИМАЛНОМ МОДЕЛУ

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

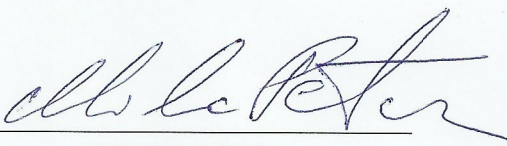
не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 15.11.2019. године,

  
\_\_\_\_\_

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



### Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације

1. **Milic P**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Bradic J, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Arsic A, Mitrovic M, Jakovljevic V, Vucic V. 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;461:141–150.
2. Jakovljevic V, **Milic P**, Bradic J, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2019;20:doi:10.3390/ijms20010006.
3. **Milic SP**, Rajkovic MK, Stamenkovic SO, Veljkovic BV. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrasonics Sonochemistry.* 2013;20:525–534.

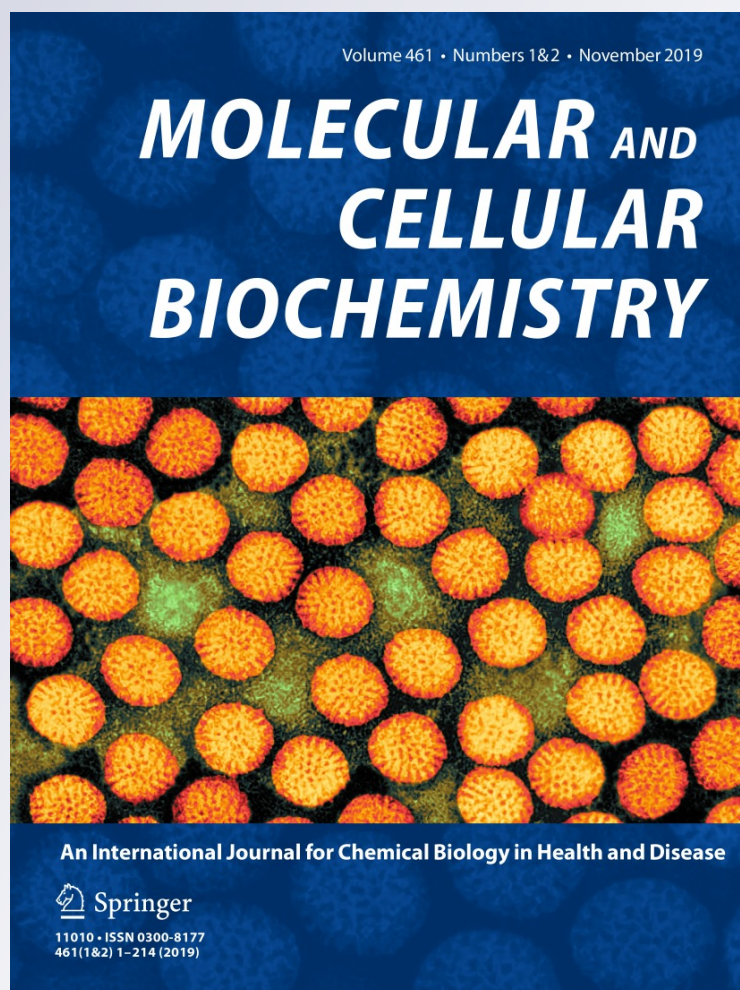
*Effects of different dietary regimes alone or in combination with standardized Aronia melanocarpa extract supplementation on lipid and fatty acids profiles in rats*

**Petar Milic, Jovana Jeremic, Vladimir Zivkovic, Ivan Srejovic, Nevena Jeremic, Jovana Bradic, Tamara Nikolic Turnic, Isidora Milosavljevic, et al.**

**Molecular and Cellular Biochemistry**  
An International Journal for Chemical  
Biology in Health and Disease

ISSN 0300-8177  
Volume 461  
Combined 1-2

Mol Cell Biochem (2019) 461:141-150  
DOI 10.1007/s11010-019-03597-6



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Effects of different dietary regimes alone or in combination with standardized *Aronia melanocarpa* extract supplementation on lipid and fatty acids profiles in rats

Petar Milic<sup>1</sup> · Jovana Jeremic<sup>2</sup> · Vladimir Zivkovic<sup>3</sup> · Ivan Srejovic<sup>3</sup> · Nevena Jeremic<sup>2</sup> · Jovana Bradic<sup>2</sup> · Tamara Nikolic Turnic<sup>2</sup> · Isidora Milosavljevic<sup>2</sup> · Sergey Bolevich<sup>4</sup> · Stefani Bolevich<sup>5</sup> · Milica Labudovic Borovic<sup>6</sup> · Aleksandra Arsic<sup>7</sup> · Miroslav Mitrovic<sup>8</sup> · Vladimir Jakovljevic<sup>3,4</sup> · Vesna Vucic<sup>7</sup>

Received: 15 March 2019 / Accepted: 22 July 2019 / Published online: 29 July 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

This study investigated different dietary strategies, high-fat (HFd), or standard diet (Sd) alone or in combination with standardized *Aronia melanocarpa* extract (SAE), as a polyphenol-rich diet, and their effects on lipids and fatty acids (FA) in rats with metabolic syndrome (MetS). *Wistar albino* rats were randomly divided into two groups: healthy and rats with MetS, and then depending on dietary patterns on six groups: healthy rats fed with Sd, healthy rats fed with Sd and SAE, rats with MetS fed with HFd, rats with MetS fed with HFd and SAE, rats with MetS fed with Sd, and rats with MetS fed with Sd and SAE. 4 weeks later, after an overnight fast (12–14 h), blood for determination of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), index of lipid peroxidation (measured as TBARS), and FA was collected. Increased FA and lipid concentration found in MetS rats were reduced when changing dietary habits from HFd to Sd with or without SAE consumption. Consumption of SAE slightly affects the FA profiles, mostly palmitoleic acid in healthy rats and PUFA in MetS + HFd rats. Nevertheless, in a high-fat diet, SAE supplementation significantly decreases *n-6/n-3* ratio, thereby decreasing systemic inflammation. Further researches are warranted to confirm these effects in humans.

**Keywords** *Aronia melanocarpa* · Fatty acids · Lipid profiles · Metabolic syndrome · Dietary pattern

## Introduction

Metabolic syndrome (MetS), also known as insulin resistance syndrome, dysmetabolic syndrome, or syndrome X is a characterized by the cooccurrence of upper body adiposity (android or male-type obesity), atherogenic dyslipidemia,

hypertension, insulin resistance, and type-2 diabetes mellitus (T2DM) [1]. As one of the leading noncommunicable diseases in most parts of the world, MetS probably imposes an unprecedented global burden of cardiometabolic diseases and premature mortality [2]. Although the detailed reason for the global epidemic of MetS has not been well

✉ Vladimir Jakovljevic  
drvkladakbg@yahoo.com

<sup>1</sup> High Medical School of Professional Studies in Cuprija, Lole Ribara 1/2, Cuprija 35 000, Serbia

<sup>2</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia

<sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia

<sup>4</sup> Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya street 8, Moscow, Russia 119991

<sup>5</sup> Department of Pathophysiology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya street 8, Moscow, Russia 119991

<sup>6</sup> Institute of Histology and Embryology “Aleksandar Dj. Kostic”, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Dr Subotic 8, Belgrade 11 000, Serbia

<sup>7</sup> Institute for Medical Research, Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism, University of Belgrade, Tadeusa Kosciuska 1, Belgrade 11 129, Serbia

<sup>8</sup> Pharmanova, Generala Anrija 6, Belgrade 11 010, Serbia

established, there is general agreement that genetic predisposition (mainly polygenic abnormalities) and environmental factors are essential for the causation of the syndrome. After decades of research, there was no doubt that lifestyle changes are crucial components in delaying the onset of or preventing MetS in patients with compromised glucose tolerance [3]. Physical activity, weight reduction, and several “healthy” dietary patterns followed by pharmacological interventions are global approaches to MetS treatment with reduced comorbidity. Diet strategies recommend increased consumption of fruits, vegetables, whole grains, legumes, and nuts with high content of bioactive compounds, monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA), and polyphenols [4, 5]. Flavonoids found ubiquitously in most edible vegetables and fruits constituting a major portion of micronutrients in diet have been known to possess good antidiabetic and antihyperlipidemic activities. Therefore, numerous publications are examining diets with plant extracts rich in antioxidants such as anthocyanins, quercetin, and other compounds [6].

*Aronia melanocarpa* (*A. melanocarpa*, black chokeberry) is widely recognized as a valuable source of antioxidants related to high levels of anthocyanins, vitamins, mineral elements, carotenoids, pectins, organic acids, and lower amounts of carbohydrates [7]. Due to notable nutritive dietary components, *A. melanocarpa* has a remarkable position among other berry crops [8]. The latest studies have focused attention on *A. melanocarpa* due to its effectiveness in the treatment of chronic diseases associated with oxidative stress, especially diabetes, and cardiovascular diseases [9, 10]. Consistent with these, a previous study from our group showed the cardioprotective effects of highly concentrated *A. melanocarpa* extract standardized with polyphenol content (SAE) against high-fat induced MetS [11].

According to our knowledge, there are no reports dealing with a combination of impacts of different diets on fatty acid (FA) and lipid status in animal models of MetS. Consequently, the aim of our study was to examine different dietary strategies, high-fat (HFd), or standard diet (Sd) alone, or in combination with SAE (polyphenol-rich diet) and their potential hypolipidemic effects and well-balanced FA in rats with MetS.

## Materials and methods

### Used plant extract

Standardized *Aronia* extract (SAE) is the official product of the pharmaceutical company Pharmanova (Belgrade, Serbia). The extraction procedure was done by EU-Chem company (Belgrade, Serbia) [11].

### Chemical analysis of standardized *Aronia* extract (SAE)

Identification and quantitation of individual phenolics (flavonoids and anthocyanins) in SAE was performed using the high-performance liquid chromatography–diode array detector (HPLC–DAD) based on C-18 reversed phase column separation according to previously described method [12].

### Study design

Male *Wistar albino* rats weighing  $200 \pm 30$  g, 6 weeks old, were used in this study. They were maintained under environmentally controlled conditions (temperature  $22 \pm 2$  °C) with 12/12 h of light/dark cycles and free access to drinking water.

At the beginning of our study, 60 rats were randomly selected and divided into two groups depending on diet. Twenty healthy rats were fed with Sd which contains 9% fat, 20% protein, 53% starch, and 5% fiber, while forty rats were fed with HFd which contains 25% fat, 15% protein, 51% starch, and 5% fiber during 4 weeks. After 1 month on their respective diets, a group of rats fed with HFd received streptozotocin (prepared *ex tempore* and dissolved in citrate buffer) intraperitoneally at a dose of 25 mg/kg body weight after 6–8 h of starvation. Combination of HFd with low dose of streptozotocin was used to induce MetS [13]. After 72 h of streptozotocin injection and 12 h after starvation-fasting glucose, insulin level, and blood pressure were measured. Only animals in which MetS had been successfully induced were included in the study: rats with value of systolic blood pressure  $> 140$  mmHg, diastolic blood pressure  $> 85$  mmHg, fasting glucose level  $> 7.0$  mmol/L, and fasting insulin level  $> 150$   $\mu$ LU/mL [11]. Animal model which involves high-fat diet and treatment with streptozotocin is suitable for mimicking the pathology of human type-2 diabetes [14, 15].

Healthy rats were divided into two groups: CTRL—healthy rats, fed with a Sd for 4 weeks, and SAE—healthy rats, fed with Sd and SAE in the dose rate of 0.45 mL/kg/day by oral gavage for 4 weeks. Rats with MetS were divided into four groups: MetS + HFd—rats with MetS, fed with HFd for 4 weeks; MetS + HFd + SAE—rats with MetS, fed with HFd and treated with SAE (0.45 mL/kg/day, per os) for 4 weeks; MetS + Sd—rats with MetS, fed with a Sd for 4 weeks; MetS + Sd + SAE—rats with MetS, fed with an Sd and treated with SAE (0.45 mL/kg/day, per os) for 4 weeks.

On the 29th day, after an overnight fast (12–14 h), blood was collected from rats by submandibular puncture under

anesthesia for determination of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), TBARS, and FA. The collected blood was centrifuged immediately after which plasma and serum were stored in deep freezing ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) until the analyses of the above parameters were taken up.

### Serum biochemical parameters

The following serum biochemical parameters TC, TG, HDL, and LDL were analyzed using spectrophotometry and commercial kits (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. Frimley, Camberley, UK) on an automatic biochemical analyzer (Dimension Xpand, Siemens).

### Determination of lipid peroxidation product

Index of lipid peroxidation was estimated in the plasma samples by measuring Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) according to the method of Ohkawa. Thiobarbituric acid (1% in 0.05 NaOH) was incubated with the plasma sample at  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 min and measured at 530 nm. Distilled water served as a blank probe [16].

### Determination of fatty acid

FA profile in standard diet, high-fat, and plasma total lipids was determined by method of Glaser et al., with some modifications [17]. Briefly, in  $100\text{ }\mu\text{l}$  of plasma was added 1.5 ml HCl in methanol (3 M HCl in methanol) and heated to  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 45 min. After cooling to room temperature, 1 ml hexane added, vortexed for 30 s, and centrifuged for 10 min on  $1800\times g$ . Hexane layer, about  $600\text{ }\mu\text{l}$ , was evaporated to dry in the nitrogen stream. Sample was dissolved in  $10\text{ }\mu\text{l}$  of hexane and  $1\text{ }\mu\text{l}$  injected in gas chromatograph SHIMADZU 2014. Gas chromatograph was equipped with capillary column (RESTEK Rtx 2330, 60 m, 0.25 mm, 0.2  $\mu\text{m}$ ). Temperature program was  $140\text{--}210\text{ }^{\circ}\text{C}$  for  $3^{\circ}/\text{min}$ . Individual FA was identified, by comparing with retention time of FA methyl esters of commercial standards, PUFA-2 (Supelco, Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA). The results are presented as percentage of total FA composition.

### Desaturases and elongases

Product-to-precursor ratios were used to estimate the activities of certain enzymes involved in FA biosynthesis: 18:0/16:0 for elongase activity, 18:3 $n$ -6/18:2 $n$ -6 ratio for delta-6-desaturase (D6-desaturase index) and, 20:4 $n$ -6/20:3 $n$ -6 ratio for delta-5-desaturase (D5-desaturase index) activity. To assess activity of  $\Delta 9$  desaturase, also known as Stearoyl-CoA desaturase or SCD, we calculated two different SCD indices by dividing the percentage of 16:1

to 16:0 (SCD-1) and 18:1 to 18:0 (SCD-2) in total lipids from plasma.

### Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 20.0 Desktop for Windows was used for statistical analysis. Distribution of data was checked by Shapiro–Wilk test. For normally distributed variables, statistical comparisons were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) tests with a Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were used for comparisons of nonnormally distributed variables. Values of  $p < 0.05$  were considered to be statistically significant.

## Results

### HPLC–DAD analysis of SAE

Quantitative and qualitative analyses of the anthocyanins and flavonoids found in SAE are V presented in Table 1.

### Fatty acids composition of the diets

The FA compositions of Sd and HFd are presented in Table 2. Since SAE contains no fatty acids, supplementation with SAE did not influence the composition of the diets.

### Lipid profile

The concentrations of TC, TG, HDL, LDL, and TBARS are expressed in standard units and are presented in Table 3. TC and TG values were statistically higher in rats with MetS than in healthy rats, except in MetS + HFd + SAE group in which level of TC was similar to SAE group. It is important

**Table 1** Quantitative and qualitative analyses of individual compounds found in SAE expressed as mg/ml of extract

	Concentration in SAE
Anthocyanins	
Cyanidin 3-galactoside	2.68
Cyanidin 3-glucoside	0.16
Cyanidin 3-arabinoside	0.66
Cyanidin 3-xyloside	0.14
Flavonoids	
Rutin	0.12
Hyperoside	0.27
Isoquercetin	0.15

SAE standardized *Aronia melanocarpa* extract

**Table 2** Fatty acid composition (mol % of total fatty acids) of the standard diet (Sd) and high-fat diet (HFd)

Fatty acid	Sd	HFd
C12:0	0.05	0.02
C14:0	0.51	0.94
C16:0	13.55	40.61
C16:1 <i>n</i> -7	1.04	0.29
C18:0	2.30	4.52
C18:1 <i>n</i> -9	24.95	38.33
C18:2 <i>n</i> -6	49.93	14.33
C18:3 <i>n</i> -3	1.17	0.13
C18:3 <i>n</i> -6	0.19	0.06
C20:1 <i>n</i> -9	3.25	0.36
C20:2 <i>n</i> -6	0.13	ND
C20:3 <i>n</i> -3	0.72	0.08
C20:3 <i>n</i> -6	0.12	ND
C20:5 <i>n</i> -3	0.06	ND
C22:6 <i>n</i> -3	0.58	0.06
C24:0	1.38	0.15
SFA	17.87	46.10
MUFA	29.24	38.98
PUFA	52.90	14.66
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 PUFA	19.90	51.50

SFA saturated fatty acids, MUFA monounsaturated fatty acids, PUFA polyunsaturated fatty acids

to note that with the addition of Sd, especially in combination with SAE supplementation in rats with MetS, levels of TG were significantly decreased compared to MetS + HFd and MetS + HFd + SAE. HDL was significantly reduced only in the MetS + HFd group compared to healthy rats (Sd and SAE groups), while the combined diet of Sd and SAE significantly increased levels of HDL in rats with MetS,

especially compared to the MetS + HFd group. The highest level of LDL was noticed in MetS groups untreated with SAE extract. Moreover, SAE supplementation significantly reduced LDL levels in both healthy and rats with MetS.

### Fatty acids profile

Level of saturated palmitic acid decreased in MetS + HFd and in MetS + Sd + SAE in comparison to both control and SAE group, respectively (Fig. 1). SAE supplementation significantly increased the level of palmitoleic acid (PLA, 16:1*n*-7) in healthy rats (SAE group) compared to CTRL group. The level of SFA was significantly lower in MetS groups without SAE than in the CTRL group. On the other hand, levels of total MUFA (Fig. 2) were significantly lower in all MetS groups (MetS + HFd, MetS + HFd + SAE, MetS + Sd and MetS + Sd + SAE) than in healthy rats treated with SAE. MUFA was also lower in MetS + HFd + SAE and in MetS + Sd than in the CTRL group. Further, the percentages of individual MUFA (PLA and vaccenic acid (VA, 18:1*n*-7)) were decreased in MetS + HFd and MetS + HFd + SAE groups compared to both healthy groups of rats, and to rats with MetS but on standard diet. Oleic acid (OA, 18:1*n*-9) was significantly decreased in MetS groups supplemented with SAE as well as in MetS + Sd group compared to healthy group fed with SAE. Also, the level of PLA was significantly lower in rats with MetS + Sd + SAE than in healthy rats treated with SAE (Fig. 2).

The supplementation of SAE didn't influence on levels of individual *n*-3 FA in healthy rats:  $\alpha$ -linolenic (ALA, 18:3*n*-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5*n*-3), docosapentaenoic acid (DPA, 22:5*n*-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6*n*-3), but in MetS rats who consumed HFd and HFd + SAE, levels of all these *n*-3 PUFA were decreased

**Table 3** Biochemical parameters at the end of the study

	CTRL	SAE	MetS + HFd	MetS + HFd + SAE	MetS + Sd	MetS + Sd + SAE
TC (mmol/L)	1.61 ± 0.14	1.71 ± 0.11	2.01 ± 0.23 <sup>ab</sup>	1.82 ± 0.19 <sup>ac</sup>	1.98 ± 0.33 <sup>ab</sup>	1.91 ± 0.25 <sup>ab</sup>
TG (mmol/L)	0.35 ± 0.10	0.40 ± 0.07	0.62 ± 0.19 <sup>ab</sup>	0.56 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.10 <sup>abcd</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>cd</sup>
HDL (mmol/L)	1.30 ± 1.19	1.28 ± 1.23	1.10 ± 0.10 <sup>ab</sup>	1.20 ± 0.07	1.25 ± 0.10	1.49 ± 0.26 <sup>c</sup>
LDL (mmol/L)	0.44 ± 0.16	0.40 ± 0.17	0.88 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.57 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.73 ± 0.03 <sup>abd</sup>	0.63 ± 0.02 <sup>ce</sup>
TBARS (μmol/mL)	1.13 ± 1.12	1.37 ± 0.11	1.15 ± 0.03	1.19 ± 0.05	1.37 ± 0.11	1.30 ± 0.04

Data are shown as mean ± SD, *n* = 8 per group

TC total cholesterol, TG triglycerides, HDL high-density lipoprotein cholesterol, LDL low-density lipoprotein cholesterol, TBARS thiobarbituric acid reactive species. CTRL control group, SAE standardized *Aronia melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet

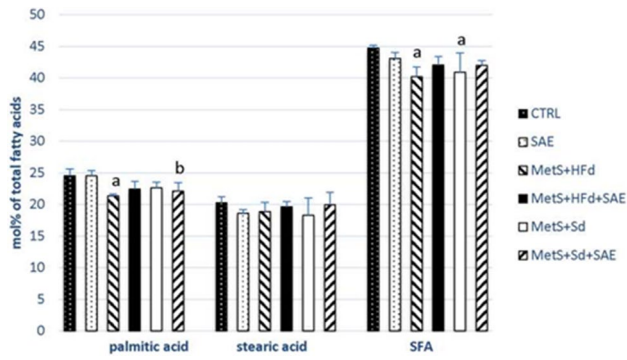
<sup>a</sup>*p* < 0.05 compared with CTRL

<sup>b</sup>*p* < 0.05 compared with SAE

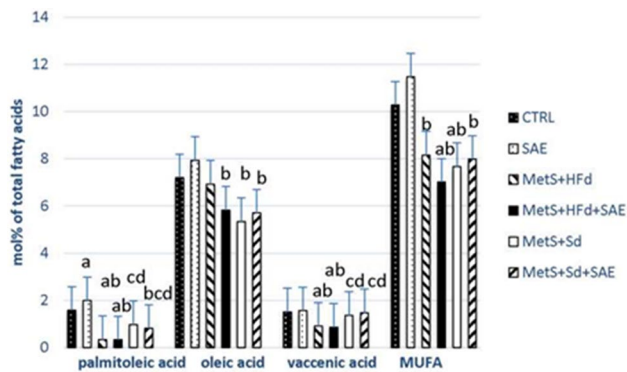
<sup>c</sup>*p* < 0.05 compared with MetS + HFd

<sup>d</sup>*p* < 0.05 compared with MetS + HFd + SAE

<sup>e</sup>*p* < 0.05 compared with MetS + Sd



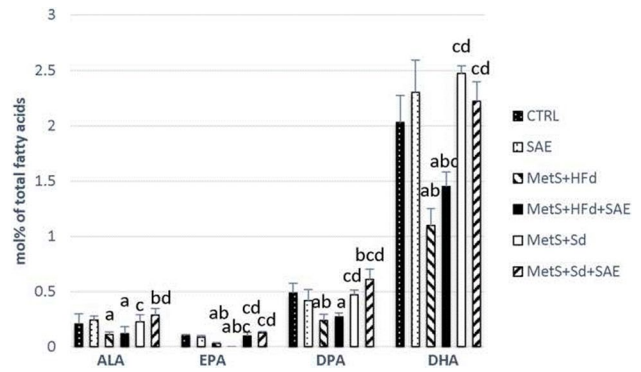
**Fig. 1** The percentages of individual and total saturated fatty acids (SFA) in plasma lipids. Data are shown as mean ± SD,  $n=8$  per group. CTRL control group, SAE standardized *A. melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet. <sup>a</sup> $p < 0.05$  compared with CTRL, <sup>b</sup> $p < 0.05$  compared with SAE



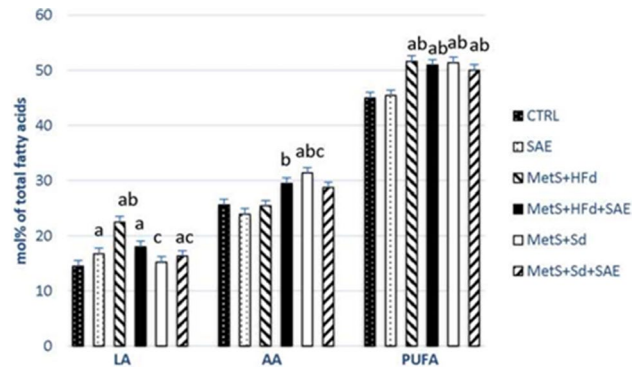
**Fig. 2** The percentages of individual and total monounsaturated fatty acids (MUFA) in plasma lipids. Data are shown as mean ± SD,  $n=8$  per group. CTRL control group, SAE standardized *A. melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet. <sup>a</sup> $p < 0.05$  compared with CTRL, <sup>b</sup> $p < 0.05$  compared with SAE, <sup>c</sup> $p < 0.05$  compared with MetS + HFd, <sup>d</sup> $p < 0.05$  compared with MetS + HFd + SAE

compared to the control group. Moreover, levels of EPA and DHA were lower in these groups than in the SAE group, as well as DPA in MetS + HFd group. In addition, EPA was lower in MetS + HFd + SAE than in the MetS + HFd group, but DHA level was significantly higher. When compared rats with MetS on Sd and HFd, it can be seen that EPA, DPA and DHA were significantly higher in Sd groups than in HFd groups. ALA was higher in MetS + Sd than in the MetS + HFd diet, and in MetS + Sd + SAE than in both SAE and MetS + HFd + SAE group (Fig. 3).

Figure 4 shows changes in the percentage of the most abundant *n*-6 PUFA, such as linoleic acid (LA, 18:2*n*-6) and arachidonic acid (AA, 20:4*n*-6), and total PUFA in all examined groups. Our results showed that supplementation with SAE significantly increased the level of LA in all



**Fig. 3** The percentage of individual *n*-3 polyunsaturated fatty acids in plasma lipids. Data are shown as mean ± SD,  $n=8$  per group. CTRL control group, SAE standardized *A. melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet. ALA  $\alpha$  linolenic acid, EPA eicosapentaenoic acid, DPA docosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid (C22:6 *n*-3). <sup>a</sup> $p < 0.05$  compared with CTRL, <sup>b</sup> $p < 0.05$  compared with SAE, <sup>c</sup> $p < 0.05$  compared with MetS + HFd, <sup>d</sup> $p < 0.05$  compared with MetS + HFd + SAE

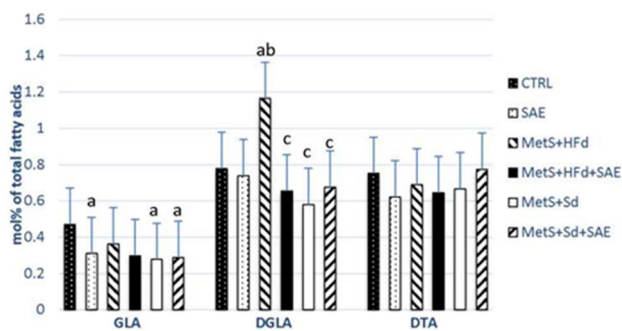


**Fig. 4** The percentages of linoleic acid (LA), arachidonic acid (AA), and total polyunsaturated fatty acids (PUFA) in plasma lipids. Data are shown as mean ± SD,  $n=8$  per group. CTRL control group, SAE standardized *A. melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet. <sup>a</sup> $p < 0.05$  compared with CTRL, <sup>b</sup> $p < 0.05$  compared with SAE, <sup>c</sup> $p < 0.05$  compared with MetS

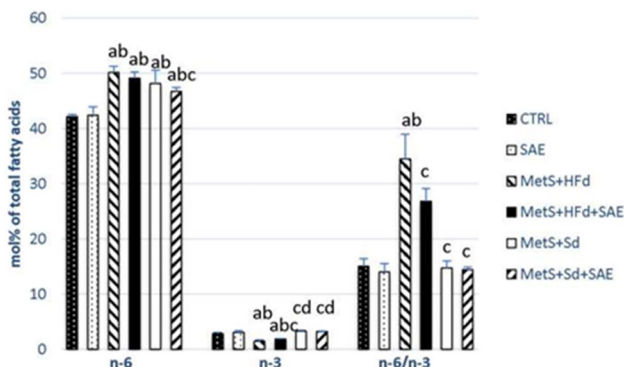
supplemented groups and in MetS + HFd, but level of this FA in MetS + Sd and MetS + Sd + SAE groups is lower compared with MetS + HFd group. In addition, level of AA was significantly higher in MetS + HFd + SAE compared to that in SAE group and in MetS + Sd group compared to CTRL, SAE, and MetS + HFd groups (Fig. 4). Total PUFA in all MetS groups was higher than that in the groups of healthy rats (CTRL and SAE).

The highest level of dihomo-gamma-linolenic acid (DGLA, 20:3*n*-6) was found in MetS + HFd group, significantly higher than that in all other groups, while the level of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA, 18:3*n*-6) was higher in CTRL group than that in SAE, MetS + Sd group, and MetS + Sd + SAE (Fig. 5).





**Fig. 5** The percentage of individual *n*-6 polyunsaturated fatty acids in plasma lipids. Data are shown as mean ± SD, *n* = 8 per group. CTRL control group, SAE standardized *A. melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet. GLA  $\alpha$ -linolenic acid, DGLA dihomo-gama-linolenic acid, DTA docosatraenoic acid. <sup>a</sup>*p* < 0.05 compared with CTRL, <sup>b</sup>*p* < 0.05 compared with SAE, <sup>c</sup>*p* < 0.05 compared with MetS + HFd



**Fig. 6** The percentages of total *n*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids and *n*-6/*n*-3 ratio in plasma lipids. Data are shown as mean ± SD, *n* = 8 per group. CTRL control group, SAE standardized *A. melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet. <sup>a</sup>*p* < 0.05 compared with CTRL, <sup>b</sup>*p* < 0.05 compared with SAE, <sup>c</sup>*p* < 0.05 compared with MetS + HFd + SAE

Similar to total PUFA, level of *n*-6 was significantly higher in rats with MetS (all 4 groups), than in healthy rats—CTRL and SAE. The lowest level of *n*-3 PUFA was found in rats with MetS + HFd which was significantly lower than in all other groups. In addition, rats with MetS fed with Sd had higher *n*-3 PUFA levels than rats on HFd. In accordance, *n*-6/*n*-3 ratio was the highest in MetS + HFd group (Fig. 6).

The desaturase and elongase indices are shown in Table 4. The supplementation of SAE leads to significantly increased estimated activity of SCD-1 in healthy rats. In addition, we found that all MetS groups have significantly lower index of SCD-1 than that in both CTRL and SAE groups. The lowest activity of D5 desaturase was found in MetS + HFd, significantly lower than those in CTRL, MetS + HFd + SAE, and MetS + Sd group. Also, estimated activity of this enzyme was significantly higher in rats with MetS on standard diet (MetS + Sd and MetS + Sd + SAE) than that in CTRL and SAE groups (Table 4).

### Discussion

The alterations of lipid parameters and FA profiles present the risk factors for cardiovascular complications in MetS [18]. Numerous studies have demonstrated that chokeberries or its extract can improve biomarkers of cardiovascular risk [19, 20]. The present study was designed to examine anti-hyperlipidemic efficacy and potential protective effects on FAs due to different dietary regime alone or in combination with SAE in rats with MetS.

Generally viewed, in MetS, the increase in blood glucose levels is accompanied by an increase in serum TC, TG, LDL and VLDL and decreases in HDL [21], whereas chokeberry extracts effectively influence the lipid metabolism [22]. It was previously revealed that 30-days chokeberry extract consumption prevented rise in TC, LDL and TG in rats fed the 4% cholesterol-containing diet, which is in correlation with our findings [22]. However, in addition to the mentioned

**Table 4** Desaturases and elongase indices in plasma

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

Data are shown as mean ± SD, *n* = 8 per group

CTRL control group, SAE standardized *Aronia melanocarpa* extract, MetS metabolic syndrome, Sd standard diet, HFd high-fat diet

<sup>a</sup>*p* < 0.05 compared with CTRL

<sup>b</sup>*p* < 0.05 compared with SAE

<sup>c</sup>*p* < 0.05 compared with MetS + HFd

parameters, we also examined FA profile and TBARS values, which enabled more detailed and precise understanding of antihyperlipidemic effects of this plant species. Previously conducted studies provided information referring to beneficial effects of chokeberry extract intake on lipid status during sustained fructose-rich diet or cholesterol-containing diet on animal models or during state of hypercholesterolemia or MetS in humans [22–25]. Nevertheless, present study investigated whether supplementation with SAE might achieve similar effects or at least potentiate effects of transition of high caloric to normal diet on serum lipid values. In that sense, we provided new insight and advances to existing data regarding the influence of *Aronia* extract intake in combination with dietary habits on lipid profile. Our results illustrated that the most prominent decrease in TC levels was achieved by HFd in combination with SAE consumption, while the decreases in TG and LDL levels and the increase in HDL were achieved by the combination of healthier diet and SAE supplementation. As previously suggested, the reduction in serum TG caused by *Aronia* may be associated with an increase in endothelial lipoprotein lipase, which hydrolyzes TG into FA [26]. In addition, polyphenol-based extracts suppress the expression of some genes for lipogenic enzymes and lead to reduced hepatic triglycerides synthesis [27]. According to our previously published paper, SAE extract exerted hypoglycemic effects in the presence of MetS and didn't alter glucose level in healthy rats [11]. These findings together with the revealed hypolipidemic effects of SAE in the current study confirmed once again significant link between lipid and glucose metabolism [28].

It has been reported that rutin intake, as one of the most abundant compounds in applied SAE extract, might alleviate fat accumulation in liver of hypercholesterolaemic rats. In addition, protective effects of rutin are also reflected through the action of its metabolite quercetin, with proven impact on lowering 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase activity and decreasing absorption of dietary cholesterol [29]. Moreover, among other polyphenols, rutin was found to exert the strongest effect in suppressing adipocyte differentiation and also decreasing glycerol-3-phosphate dehydrogenase, enzyme with a crucial role in lipogenesis in adipose cells [30]. Chemical analysis of SAE indicates the high concentration of anthocyanins, which are previously found to improve leptin and adiponectin secretions and lead to upregulation of adipocyte-specific gene expressions in both animal and human adipocytes [31]. This is of a great importance taking into consideration significant role of adipocytes in the regulation of systemic nutrient and energy homeostasis [32]. Furthermore, regulation of blood lipids status was probably attributed to flavonoids' ability to inhibit pancreatic lipase activity and enhance activity of lecithin acyl transferase, one of the enzymes responsible for removing TC

from the blood [33]. Regarding all above-mentioned data, we may hypothesize that the obtained beneficial effects of SAE on the lipid profile in our model may be due to synergistic and additive effects of all presented bioactive compounds in extract, with probably the greatest contributions of rutin, hyperoside, and anthocyanins.

*Aronia* extracts was found to reduce the expression of genes for lipid metabolism and the lipoprotein assembly, which includes FA synthesis and acyl-CoA oxidase [34]. In that sense, we aimed to estimate if changes in diet and consumption of SAE might improve FA profile in rats with MetS by measuring their levels in plasma. Numerous human and animal studies have been well documented that palmitic, palmitoleic, and oleic FA correlated positively with blood pressure, insulin, and glucose [35]. In our study, the percentage of a saturated palmitic FA was decreased in MetS + HFd and MetS + Sd + SAE as compared to healthy rats, while there were no differences in stearic acid between examined groups. This was surprising, since HFd contained higher levels of palmitic and oleic acid (which is also decreased in HFd groups) in comparison to the Sd. Similar to our results, Liu et al. showed that HF feeding led to decreased levels of palmitic acid in triacylglycerol and free fatty acids in serum, in rats [36]. The mechanism of these alterations is unknown, and the authors speculated that decreased palmitic/SFA and oleic acid, and consequently increased percentage of PUFA, resulted from increased fluxes of SFA and MUFA to storage or oxidative pathways. We can agree with this speculation, but these unexpected changes in FA profiles after HFd clearly deserve further investigations.

On the other hand, the percentages of individual and total MUFA significantly changed with changes in dietary patterns. One of the MUFAs, palmitoleic FA, was significantly decreased in rats with MetS fed with HFd alone or in combination with SAE, while the transition to Sd has decreased these changes. Similar changes were detected in vaccenic acid. Since the rats on HFd had significantly lower levels of these MUFA, it can be concluded that these changes can be attributed to the diet. The major MUFA, oleic acid, was lower in MetS rats on Sd and MetS + HFd + SAE compared to SAE group of healthy animals, suggesting that MetS leads to lower oleic acid [37]. In line with this, the study by Liu et al. also showed a decreased level of oleic acid, as well as the lower estimated activities of both SCD indices in triacylglycerol fraction in serum, after 3-weeks of high-fat feeding [34]. Addition of SAE in healthy rats without changing the diet significantly increased only the percentage of palmitoleic acid and the estimated activity of SCD-1. It has been shown that polyphenols may increase the expression of enzymes involved in fat oxidation, such as the hepatic mitochondrial enzyme CPT1A1, as well as decreased expression of lipogenic enzymes, such as fatty acid synthetase (FAS) [38].

A study by Park et al. showed that consumption of *A. melanocarpa* extract in mice on HFd, decrease the accumulation of hepatic triacylglycerols, FAS activity as well as hepatic PPAR $\gamma$ 2 mRNA expression, and protein production. PPAR $\gamma$ , the master transcription regulator of lipid metabolism, which is involved in steps such as induction of adipogenesis, preadipocyte differentiation, modification of lipoprotein metabolism, and lipolysis, also affects the activity of SCD [39]. In agreement with the above, our results have revealed that SAE consumption increased the activity of SCD-1 and level of palmitoleic acid in healthy rats. However, SCD1 index decreased in all groups with MetS. Previous studies have shown that SCD-1 indices correlated positively with obesity and MetS, as well as with decreased fat oxidation and increased fatty acid synthesis [40, 41]. Although the reason for the decreased SCD-1 indices in our study is unclear, a possible explanation is that HFd contains less carbohydrates than Sd, and diets with 70–75% of carbohydrates increased SCD-1 index in comparison to an HFd in humans [42].

Bearing in mind that several epidemiological studies suggested beneficial effects of *n*-3 PUFA in MetS [43], we wanted to examine how changes in diet affect the percentage of these FA. Our results undoubtedly show decreases in the percentage of individual *n*-3 PUFA in MetS groups fed with HFd. In our study, high-fat diet used to induce MetS in rats contained a lower proportion of *n*-6 and *n*-3 PUFA than the standard diet. Therefore, rats with MetS who consumed HFd during the experiment, had significantly lower level of all examined *n*-3 PUFA (ALA, EPA, DPA and DHA), compared with healthy rats and also with rats with MetS on standard diet, as a consequence of lower dietary intake. Interestingly, SAE supplementation to HFd (MetS + HFd + SAE) led to a higher level of DHA as compared to MetS + HFd. This is important since it has been shown that the higher amount of *n*-3 PUFA is associated with a decreased risk of cardiovascular diseases [44] and other states such as rheumatoid arthritis [45] and metabolic syndrome [46, 47]. Furthermore, a reduced level of *n*-3 PUFA content in the erythrocyte membrane, especially in dyslipidemia and hypertension, leads to increased metabolism of proinflammatory mediators [48].

In a study by Kardum et al., the level of *n*-3 PUFA in erythrocytes was significantly increased after 3 months of chokeberry juice consumption in 25 healthy women [49]. The authors suggest that an increase in the amount of total *n*-3 PUFA in their study is most probably caused by an increase in DHA, which has also been documented. This result could be a strong indicator of oxidative damage attenuation caused by chokeberry juice consumption, as DHA is the fatty acid with the highest content of unsaturated bonds, and the main site of free radical attack. However, in a study by Petrovic et al., consumption of the same chokeberry juice for 4 weeks in young male and female handball players affected significantly neither DHA nor other PUFA [50]. In our study animals treated with

SAE did not have increased DHA when compared with the appropriate controls, except in the HFd groups. This suggests that SAE attenuated lipid peroxidation in the pro-oxidative and pro-inflammatory state caused by a HFd.

In addition to HFd, supplementation with SAE significantly altered the levels of individual and total *n*-6 PUFA. There are data referring to the beneficial effects of flavonoid administration manifested as an increase in PUFAs and attenuation of central adiposity in rats with MetS [51, 52]. Moreover, in support with our findings, it has been reported that anthocyanins can elevate concentration of PUFA, thus acting protectively on vascular function. It seems that cardioprotective potential of extracts rich in anthocyanins, which was proven in our previous research, might be in part mediated by impact on FA composition [11, 53]. We assume that flavonoids, especially hyperoside, rutin and isoquercetin, contributed significantly to increase in PUFA noticed after SAE supplementation.

As already mentioned, the highest level of linoleic acid (18:2*n*-6, LA) was detected in MetS + HFd group. Knowing that LA acid is an essential fatty acid and the precursor of *n*-6 PUFA family, generally recognized to have a role in onset of inflammation [54], the increase of LA we observed could be related to inflammatory response in HF-fed animals [55]. With this in line, MetS + HFd also had the highest level of LA successors DGLA, while addition of SAE with HFd decreased the levels of these PUFA. However, their downstream biosynthetic product, arachidonic acid (AA, 20:4*n*-6), was higher in MetS + HFd + SAE compared to that in SAE group, and the highest AA level was detected in MetS + Sd group. Since AA is the main precursor of inflammatory eicosanoids, it is possible that SAE decreased conversion of AA into these eicosanoids. It is important to note that, although DGLA itself adds to the emergence of different anti-inflammatory mediators, it is enzymatically turned into AA which has an opposite effect [56]. In addition, elevated contents of LA were detected in SAE and MetS + Sd + SAE groups, showing that *Aronia* extract could decrease the conversion of LA to AA. Prominent increase in LA due to anthocyanins intake was noticed earlier as well, and might be an indicator that the observed effect of SAE is a consequence of biological activity of cyanidin 3-galactoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-arabinoside, and cyanidin 3-xyloside [57]. The result about upregulation of LA as a part of SAE health effect is even more significant in terms of the fact that this FA is known to be connected with the decreasing hypertriglyceridemia, obesity, and cardiovascular disease risk [58]. In contrast to LA and DGLA alternations in HFd fed animals, their intermediate GLAs significantly decreased in both MetS + Sd groups and healthy SAE. No significant connection between GLA and metabolic risk factors was found by Mayneris-Perxachs and coworkers in their study on CVD [58], while they found FA to be useful in the

management of diabetic disorder, such as diabetic neuropathy [59]. However, SAE-induced decrease of GLA, detected in our study, might be beneficial in terms of decreasing inflammation caused by MetS.

Due to the highest level of *n*-6 PUFA and the lowest level of *n*-3 PUFA, the ratio *n*-6/*n*-3 is the highest in MetS + HfD, but adding SAE into this group significantly decreased this unfavorable ratio by increasing the DHA and consequently *n*-3 PUFA. Giving that *n*-6/*n*-3 ratio contributes to chronic systemic inflammation as a potential sensor for the activation of a number of mechanisms involved in inflammatory responses, which is underlying many chronic noncommunicable diseases [56], SAE intake could be important in preventing adverse consequences of an improper high-fat diet.

## Conclusion

In conclusion, the increased plasma lipid concentrations found in MetS rats were reduced when changing dietary habits from HfD to Sd with or without SAE consumption. MetS itself and the diet significantly affect the FA status in plasma lipids. Consumption of SAE slightly affects the FA profiles, mostly palmitoleic acid in healthy rats and PUFA in MetS + HfD rats. Nevertheless, in a high-fat diet, SAE supplementation significantly decreases *n*-6/*n*-3 ratio, thereby decreasing the systemic inflammation. Further researches are warranted to confirm these effects in humans.

## Compliance with ethical standards

**Conflicts of interest** The authors declare they have no conflicts of interest.

**Ethical approval** This study was conducted in the laboratory for Cardiovascular Physiology (Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia). Animals treatment and protocol employed were approved by the Ethical Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences at the University of Kragujevac, Serbia on July 30, 2017 (number: 119-01-5/14/2017-09). The experimental procedures have been carried out in accordance with the EU Directive for the welfare of laboratory animals (86/609/EEC) and the principles of Good Laboratory Practice.

## References

- Kaur JA (2014) Comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
- Grundy SM (2016) Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med* 26:364–373
- Nestel P (2003) Metabolic syndrome: multiple candidate genes, multiple environmental factors—multiple syndromes? *Int J Clin Pract* 134:3–9
- Brown L, Poudyal H, Panchal SK (2015) Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. *Obes Rev* 16:914–941
- Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, Estruch R et al (2015) Benefits of the Mediterranean diet: insights from the PREDIMED study. *Prog Cardiovasc Dis* 58:50–60
- Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Aguilera CM, Gil A (2015) A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: phenolic compounds. *Nutrients* 7:5177–5216
- Borowska S, Brzoska MM (2016) Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and their products as a possible means for the prevention and treatment of noncommunicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 15:982–1017
- Hakkinen SH, Karenlampi SO, Heinonen IM, Mykkanen HM, Torronen AR (1999) Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 47:2274–2279
- Daskalova E, Delchev S, Peeva Y et al (2015) Antiatherogenic and cardioprotective effects of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice in aging rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:717439
- Rodriguez-Mateos A, Heiss C, Borges G, Crozier A (2013) Berry (poly) phenols and cardiovascular health. *J Agric Food Chem* 62:3842–3851
- Jakovljevic V, Milic P, Bradic J et al (2019) Standardized *Aronia melanocarpa* extract as novel supplement against metabolic syndrome: a rat model. *Int J Mol Sci* 20:6
- Orcic D, Franciskovic M, Bekvalac K et al (2014) Performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem* 143:48–53
- Suman RK, Ray Mohanty I, Borde MK, Maheshwari U, Deshmukh YA (2016) Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. *Adv Pharmacol Sci*. <https://doi.org/10.1155/2016/9463476>
- Skovsø S (2014) Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig* 5(4):349–358
- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P (2005) Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 52:313–320
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Glaser C, Demmelmair H, Koletzko B (2010) High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification. *PLoS ONE* 5:e12045
- Aristizabal JC, Barona J, Gonzalez-Zapata LI, Deossa GC, Estrada A (2016) Fatty acid content of plasma triglycerides may contribute to the heterogeneity in the relationship between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat D* 14:311–317
- Poreba R, Skoczynska A, Gac P et al (2009) Drinking of chokeberry juice from the ecological farm Dzieciolowo and distensibility of brachial artery in men with mild hypercholesterolemia. *Ann Agric Environ Med* 16:305–308
- Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jezierska J (2010) *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 16:CR28–CR34
- Mitra SK, Gopumadhavan S, Muralidhar TS, Anturlikar SD, Sujatha MB (1995) Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated hemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. *Indian J Exp Biol* 33:798–800
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Mihova V, Krasnaliev I, Borisova P, Belcheva A (2007) Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods Hum Nutr* 62:19–24

23. Qin B, Anderson RA (2012) An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Brit J Nutr* 108:581–587
24. Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M (2012) In vivo influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monit* 8:CR569–CR574
25. Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jezierska J (2010) *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 16:CR28–CR34
26. Devi R, Sharma DK (2004) Hypolipidemic effect of different extracts of *Clerodendron colebrookianum* Walp in normal and high-fat diet fed rats. *J Ethnopharmacol* 90:63–68
27. Gnani GV, Paglialonga G (2009) Resveratrol inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat hepatocytes. *Eur J Clin Invest* 39:211–218
28. Parhofer KG (2015) Interaction between glucose and lipid metabolism: more than diabetic dyslipidemia. *Diabetes Metab J* 39:353–362
29. Ziaee A, Zamansoltani F, Nassiri-Asl M, Abbasi E (2009) Effects of rutin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104:253–258
30. Choi I, Park Y, Choi H, Lee EH (2006) Anti-adipogenic activity of rutin in 3T3-L1 cells and mice fed with high-fat diet. *BioFactors* 26:273–281
31. Kawser Hossain M, Abdal Dayem A, Han J et al (2016) Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *Int J Mol Sci* 17:569
32. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE (2016) Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab* 23:770–784
33. Katara C, Saxena S, Agrawal S et al (2014) Lipid-lowering and antioxidant functions of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) extract in human dyslipidemia. *J Evid Based Complement Altern Med* 19:112–118
34. Kim B, Park Y, Wegner CJ, Bolling BW, Lee J (2013) Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells. *J Nutr Biochem* 24:1564–1570
35. Kotronen A, Velagapudi VR, Yetukuri L et al (2009) Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia* 52:684–690
36. Liu TW, Heden TD, Matthew Morris E, Fritsche KL, Vieira-Potter VJ, Thyfault JP (2015) High-fat diet alters serum fatty acid profiles in obesity prone rats: implications for in vitro studies. *Lipids* 50:997–1008
37. Vucic V, Tepsic J, Arsic A, Popovic T, Debeljak-Martacic J, Glibetic M (2012) Fatty acid content of vegetable oils and assessment of their consumption in Serbia. *Acta Aliment* 41:343–350
38. Rafiei H, Omidian K, Bandy B (2019) Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an in vitro model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function. *Nutrients* 11:541
39. Park CH, Kim JH, Lee EB et al (2018) *Aronia melanocarpa* extract ameliorates hepatic lipid metabolism through PPAR $\gamma$ 2 downregulation. *PLoS ONE* 12:e0169685
40. Warensjo E, Riserus U, Vessby B (2005) Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia* 48:1999–2005
41. Bjermo H, Riserus U (2010) Role of hepatic desaturases in obesity-related metabolic disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:703–708
42. Chong MF, Hodson L, Bickerton AS et al (2008) Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. *Am J Clin Nutr* 87:817–823
43. Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ (2006) n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 83:1499S–1504S
44. Piñeiro-Corrales G, Lago Rivero N, Culebras-Fernández JM (2013) Role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease prevention. *Nutr Hosp* 28:1–5
45. Veselinovic M, Vasiljevic D, Vucic V et al (2017) Clinical benefits of n-3 PUFA and  $\alpha$ -linolenic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrients* 9:325
46. Ristic-Medic D, Vucic V, Takic M, Karadzic I, Glibetic M (2013) Polyunsaturated fatty acids in health and disease. *J Serb Chem Soc* 78:1269
47. Simopoulos AP (2013) Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 5:2901–2923
48. Novgorodtseva TP, Kantar TA, Karaman YK, Antonyuk MV, Zhukova NV (2011) Modification of fatty acids composition in erythrocyte lipids in arterial hypertension associated with dyslipidemia. *Lipids Health Dis* 10:18
49. Kardum N, Takic M, Savikin K et al (2014) Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J Funct Foods* 9:89–97
50. Petrovic S, Arsic A, Glibetic M, Cikriz N, Jakovljevic V, Vucic V (2016) The effects of polyphenol-rich chokeberry juice on fatty acid profiles and lipid peroxidation of active handball players: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Can J Physiol Pharmacol* 94:1058–1063
51. Peredo-Escárcega AE, Guarner-Lans V, Pérez-Torres I et al (2015) The combination of resveratrol and quercetin attenuates metabolic syndrome in rats by modifying the serum fatty acid composition and by upregulating SIRT 1 and SIRT 2 expression in white adipose tissue. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:474032
52. Toufektsian MC, Salen P, Laporte F, Tonelli C, de Lorgeril M (2011) Dietary flavonoids increase plasma very long-chain (n-3) fatty acids in rats. *J Nutr* 141:37–41
53. Graf D, Seifert S, Jaudszus A, Bub A, Watzl B (2013) Anthocyanin-rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in Fischer rats. *PLoS ONE* 8:e66690
54. Yang B, Ding F, Yan J et al (2016) Exploratory serum fatty acid patterns associated with blood pressure in community-dwelling middle-aged and elderly Chinese. *Lipids Health Dis* 15:58
55. Gao M, Ma Y, Liu D (2015) High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS ONE* 3:e0119784
56. Vucic V (2013) The role of dietary polyunsaturated fatty acids in inflammation. *SJECR* 14:93–99
57. Graf D, Seifert S, Jaudszus A, Bub A, Watzl B (2013) Anthocyanin-rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in Fischer rats. *PLoS ONE* 8:e66690
58. Mayneris-Perxachs J, Guerdina M, Castellote AI et al (2014) 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* 33:90–97
59. Horrobin DF (1997) Essential fatty acids in the management of impaired nerve function in diabetes. *Diabetes* 46:S90–S93

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

# Standardized *Aronia melanocarpa* Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model

Vladimir JAKOVLJEVIC <sup>1,2,\*</sup> , Petar Milic <sup>3</sup>, Jovana Bradic <sup>4</sup>, Jovana Jeremic <sup>4</sup>, Vladimir Zivkovic <sup>1</sup>, Ivan Srejsovic <sup>1</sup>, Tamara Nikolic Turnic <sup>4</sup> , Isidora Milosavljevic <sup>4</sup>, Nevena Jeremic <sup>4</sup>, Sergey Bolevich <sup>2</sup>, Milica Labudovic Borovic <sup>5</sup>, Miroslav Mitrovic <sup>6</sup> and Vesna Vucic <sup>7</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; vladimirziv@gmail.com (V.Z.); ivan\_srejsovic@hotmail.com (I.S.)

<sup>2</sup> Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya street 8, Moscow 119991, Russia; bolevich2011@yandex.ru

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, High Medical School of Professional Studies in Cuprija, Lole Ribara 1/2, 35000 Cuprija, Serbia; milic.milic@gmail.com

<sup>4</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia; jovanabradickg@gmail.com (J.B.); jovana.jeremic@medf.kg.ac.rs (J.J.); tamara.nikolic@medf.kg.ac.rs (T.N.T.); isidora.stojic@medf.kg.ac.rs (I.M.); nbarudzic@hotmail.com (N.J.)

<sup>5</sup> Institute of Histology and Embryology "Aleksandar Dj. Kostic", Faculty of Medicine, University of Belgrade, Dr Subotic 8, 11000 Belgrade, Serbia; milica.borovic@supremalab.rs

<sup>6</sup> Pharmanova, Generala Anrija 6, 11010 Belgrade, Serbia; miroslav.mitrovic@pharmanova.com

<sup>7</sup> Institute for Medical Research, Centre of Research Excellence in Nutrition and Metabolism, University of Belgrade, Tadeusa Kosuska 1, 11129 Belgrade, Serbia; vesna.vucic.imr@gmail.com

\* Correspondence: drvladakgbg@yahoo.com; Tel.: + 381-34-306-800

Received: 30 November 2018; Accepted: 12 December 2018; Published: 20 December 2018



**Abstract:** The aim of our study was to examine the effects of different dietary strategies, high-fat (HFd) or standard diet (Sd) alone or in combination with standardized oral supplementation (0.45 mL/kg/day) of *Aronia melanocarpa* extract (SAE) in rats with metabolic syndrome (MetS). SAE is an official product of pharmaceutical company Pharmanova (Belgrade, Serbia); however, the procedure for extraction was done by EU-Chem company (Belgrade, Serbia). Rats were divided randomly into six groups: control with Sd, control with Sd and SAE, MetS with HFd, MetS with HFd and SAE, MetS with Sd and MetS with Sd and SAE during 4 weeks. At the end of the 4-week protocol, cardiac function and liver morphology were assessed, while in the blood samples glucose, insulin, iron levels and systemic redox state were determined. Our results demonstrated that SAE had the ability to lower blood pressure and exert benefits on in vivo and ex vivo heart function. Moreover, SAE improved glucose tolerance, attenuated pathological liver alterations and oxidative stress present in MetS. Obtained beneficial effects of SAE were more prominent in combination with changing dietary habits. Promising potential of SAE supplementation alone or in combination with different dietary protocols in triggering cardioprotection should be further examined in future.

**Keywords:** metabolic syndrome; *Aronia melanocarpa*; standardized extract; dietary strategies; supplementation

## 1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) represents one of the metabolic disorders characterized by abdominal obesity, dyslipidemia, hypertension, insulin resistance and diabetes mellitus (DM) type 2 [1,2]. There is

a great concern since MetS directly promotes the development of cardiovascular disorders, possibly because it results in increased oxidative stress and low-grade inflammation [3]. Therapeutic approaches involve dietary restriction or a combination of synthetic antidiabetic and hypolipidemic drugs [4]. However, increasing incidence of MetS associated with the undesirable side-effects and high cost of available drugs indicates the need to discover new, less harmful herbal medicines efficient in controlling both blood glucose and lipids [4,5]. Therefore, a lot of plant extracts as well as plant-derived biomolecules such as polyphenols, have been under research for the prevention and therapy of MetS [1]. It has been well documented that polyphenols, especially anthocyanins and quercetin, exert the potential to enhance the glucose uptake by muscle and adipocyte cells, thus exerting antidiabetic effect [6].

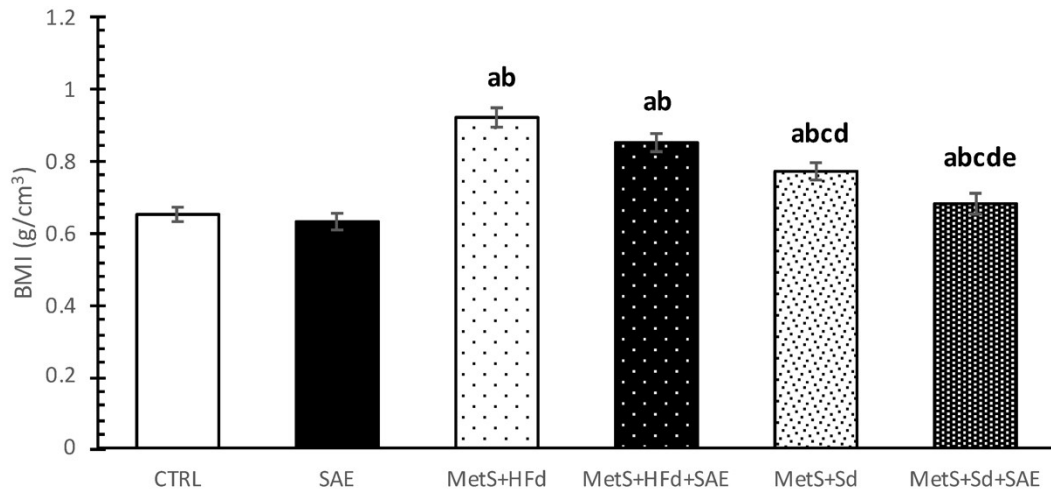
*Aronia melanocarpa* (*A. melanocarpa*) or black chokeberry is a fruit/plant which belongs to the *Rosaceae* family and is native to North America [7]. However, it has been commonly used in Europe as ingredient for juices, wine, jams, teas and cordial liqueurs [8,9]. *A. melanocarpa* represents one of the richest sources of polyphenols among fruits, with anthocyanins and flavonoids identified as major components responsible for its therapeutic potential [10,11]. Recent researches have focused attention on *A. melanocarpa* due to its numerous health benefits in a broad range of pathological conditions [12]. It has been reported that fruit and extracts of *A. melanocarpa* exert gastroprotective, hepatoprotective, antiinflammatory and antiproliferative activity [12,13]. Furthermore, the health-promoting effects of extracts of this plant involve antiatherosclerotic, antiplatelet and hypoglycemic properties [7,14]. Moreover, it was previously confirmed that *A. melanocarpa* extract may reduce systolic and diastolic pressure and be useful in the management of DM [5,13]. However, to our best knowledge, the effectiveness of *A. melanocarpa* extract in combination with different diet regimens in the treatment of MetS has been not investigated so far.

Therefore, the aim of our study was to examine different dietary strategies, high-fat (HFd) or standard diet (Sd) alone or in combination with standardized *A. melanocarpa* extract (SAE) supplementation, and their potential benefits in the prevention and treatment of various complications in rats with MetS.

## 2. Results

### 2.1. Body Mass Index (BMI) of Healthy and Rats with MetS after 4-Weeks of Dietary Changes

BMI was statistically higher in groups with MetS (MetS + HFd, MetS + HFd + SAE, MetS + Sd, MetS + Sd + SAE) than in healthy rats (CTRL, SAE). However, 4 weeks after dietary regime, MetS + Sd and MetS + Sd + SAE groups had significantly lower BMI levels than MetS + HFd and MetS + HFd + SAE, while MetS + Sd + SAE had significantly lower BMI level than MetS + Sd (Figure 1).

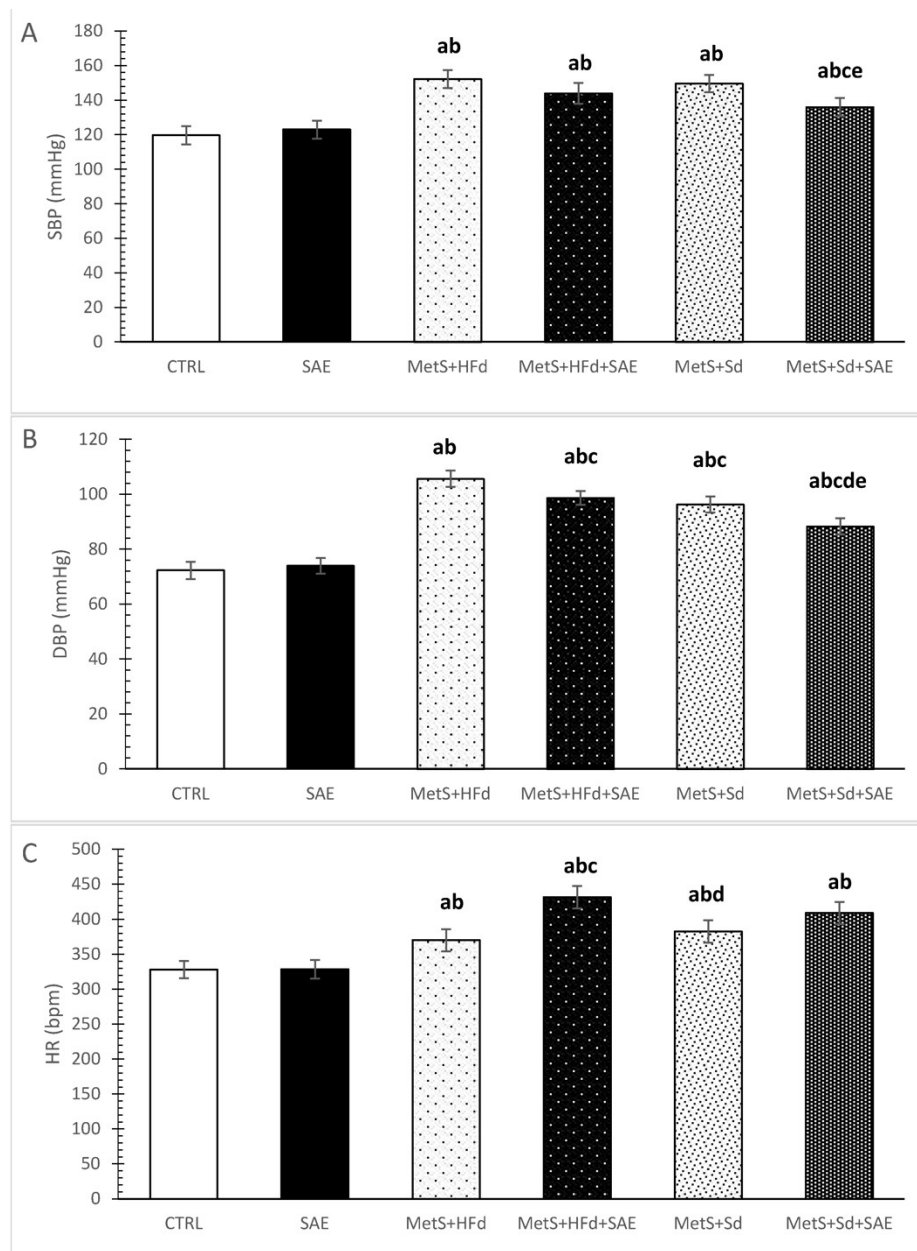


**Figure 1.** BMI in examined groups 4 weeks after dietary changes. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Statistical significance in relation to control (CTRL) group; <sup>b</sup> Statistical significance in relation to standardized *A. melanocarpa* extract (SAE) group; <sup>c</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd group; <sup>d</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; <sup>e</sup> Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

## 2.2. Changes in Blood Pressure and Heart Rate in Healthy and Rats with MetS on the Different Diet Regime

Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP), as well as heart rate (HR) were increased in rats with MetS compared to healthy rats, as expected (Figure 2A–C). More interesting was that with the addition of SAE and Sd in rats with MetS, SBP was statistically decreased compared to MetS + Sd and MetS + HFd + SAE (Figure 2A). DBP was significantly increased in MetS + HFd in comparison with MetS + HFd + SAE, MetS + Sd and MetS + Sd + SAE, while in MetS + Sd + SAE group DBP was significantly lower than in other MetS groups (Figure 2B). SAE treatment in MetS + HFd + SAE group induced significant increase of HR compared to MetS + HFd and MetS + Sd groups (Figure 2C).





**Figure 2.** Changes in blood pressure and heart rate in healthy and rats with MetS on the different diet regime: (A) systolic blood pressure (SBP, mmHg); (B) diastolic blood pressure (DBP, mmHg); (C) heart rate (HR, bpm). Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Statistical significance in relation to CTRL group; <sup>b</sup> Statistical significance in relation to SAE group; <sup>c</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd group; <sup>d</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; <sup>e</sup> Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

### 2.3. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS in In Vivo Cardiac Function

SAE supplementation in healthy rats significantly increased interventricular septal wall thickness at end diastole (IVSd), left ventricle posterior wall thickness at end diastole (LVPWd), interventricular septal wall thickness at end systole (IVSs), left ventricle posterior wall thickness at end systole (LVPWs), fractional shortening (FS) and reduced left ventricle internal dimension at end systole (LVIDs) and left ventricle internal dimension at end diastole (LVIDd) compared to control. On the other hand, IVSd and IVSs were significantly decreased while LVIDd was significantly increased in MetS + HFd compared

to SAE group. More importantly, FS was statistically decreased in MetS + HFd compared to CTRL and SAE, as well as in MetS + HFd + SAE and MetS + Sd compared to SAE. SAE supplementation in rats with MetS fed with Sd significantly increased LVIDd, IVSs and LVIDs compared to MetS + Sd group (Table 1).

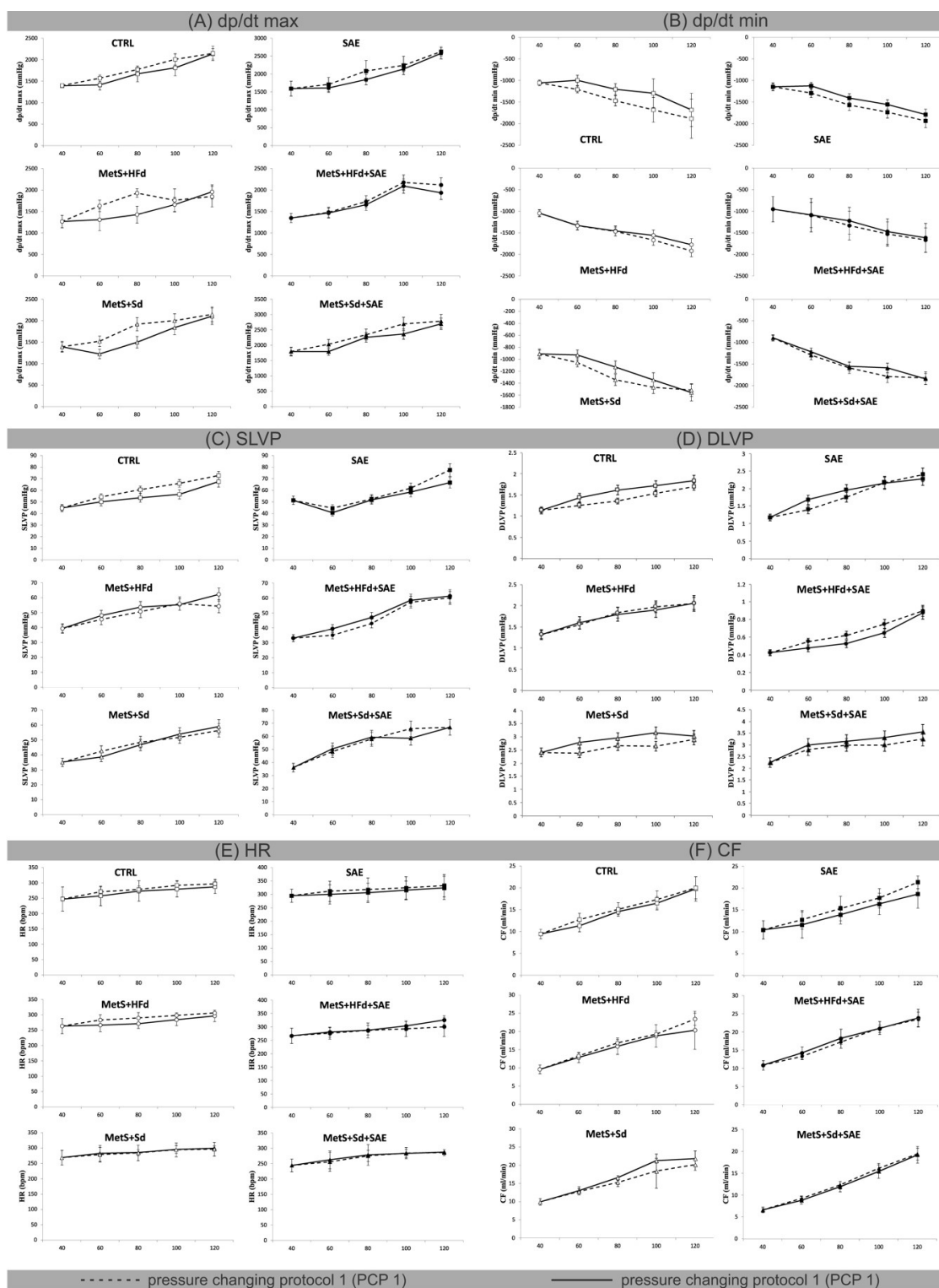
**Table 1.** Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on in vivo cardiac function.

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

Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Statistical significance in relation to CTRL group; <sup>b</sup> Statistical significance in relation to SAE group; <sup>c</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd group; <sup>d</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; <sup>e</sup> Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

#### 2.4. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS on Ex Vivo Cardiac Function

Figure 3 shows the values of ex vivo measured cardiac function parameters and coronary flow, during pressure changing protocols (PCPs) on the Langendorff apparatus. To examine the potential difference due to various dietary habits, we compared the percentage of decrease (−) or increase (+) between PCP 1 and PCP 2 in the group (Table 2).



**Figure 3.** Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on cardiac function parameters, measured ex vivo: (A) values of  $dp/dt$  max within each of 6 groups during pressure changing protocol 1 (PCP 1) and pressure changing protocol 2 (PCP 2); (B) values of  $dp/dt$  min within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (C) values of SLVP within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (D) values of diastolic left ventricular pressure (DLVP) within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (E) values of HR within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2; (F) values of CF within each of 6 groups during PCP 1 and PCP 2. All values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation for each group.

**Table 2.** Percentage differences between PCP 1 and PCP 2 during ex vivo perfusion on Langendorff apparatus.

CPP	CTRL	SAE	MetS + HFd	MetS + HFd + SAE	MetS + Sd	MetS + Sd + SAE
dp/dt max						
60	-11.05	-5.99	-24.77	-1.07	-24.23	-13.13
80	-6.11	-12.90	-35.30	-4.41	-28.11	-3.77
100	-10.88	-4.79	-6.22	-4.08	-8.80	-14.02
120	-0.63	-1.91	5.62	-9.39	-2.06	-3.24
dp/dt min						
60	-21.25	-14.81	-0.46	-0.62	-13.64	-6.36
80	-22.03	-11.53	-0.80	-9.03	-18.90	-2.32
100	-29.70	-11.43	-7.04	-3.81	-9.14	-12.42
120	-12.04	-8.14	-8.08	-3.15	2.63	1.16
SLVP						
60	-8.35	-9.49	5.37	10.80	-10.58	4.06
80	-13.11	-1.66	5.70	8.55	-4.18	2.44
100	-16.81	-5.81	-1.22	2.15	3.72	-12.46
120	-7.79	-16.29	12.60	1.99	4.12	-0.07
DLVP						
60	12.50	16.67	2.50	-15.79	14.41	6.67
80	16.05	10.20	-2.22	-19.05	9.32	4.76
100	10.47	-0.93	-4.21	-15.38	15.87	9.09
120	7.61	-5.26	0.00	-2.86	4.13	8.45
HR						
60	-5.29	-4.01	-6.26	1.59	1.39	2.51
80	-1.96	-3.85	-6.82	0.23	0.41	1.10
100	-4.58	-2.77	-5.04	3.66	0.31	-0.37
120	-3.41	-2.63	-3.21	7.85	1.02	0.61
CF						
60	-12.37	-10.07	-3.11	6.74	1.93	-4.55
80	-3.57	-10.40	-5.78	5.48	7.88	-3.36
100	-5.10	-8.33	-2.55	-0.57	13.44	-4.55
120	-1.21	-14.66	-14.96	1.51	7.59	-1.04

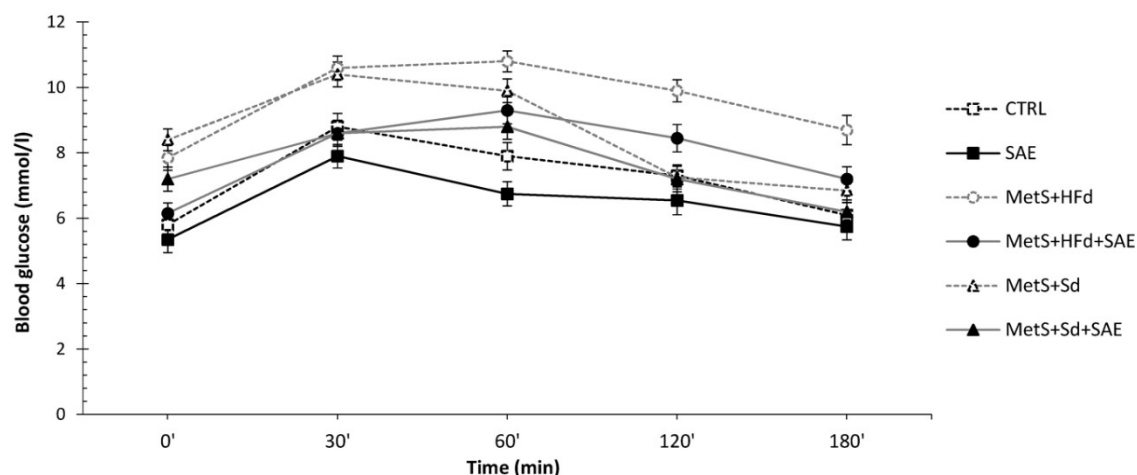
Major changes in maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max) in PCP 1 versus PCP 2 were observed at coronary perfusion pressure (CPP) = 60 cm H<sub>2</sub>O and 80 cm H<sub>2</sub>O in MetS + HFd (-24.77; -35.3) and MetS + Sd (-24.23; -28.11) groups. In MetS groups that were fed with combination of mentioned diets and SAE, this parameter was not changed during pressure changing protocols. On the other hand, the most significant differences in minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min) were observed in CTRL group at CPP = 60 cm H<sub>2</sub>O, 80 cm H<sub>2</sub>O and 100 cm H<sub>2</sub>O (-21.25; -22.03; -29.7), while during the PCPs there were no significant changes in systolic left ventricular pressure (SLVP), HR, and coronary flow (CF) in any of the examined groups (Figure 3, Table 2).

### 2.5. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS on Glucose and Insulin Levels during Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

#### 2.5.1. Effects on Glucose Levels during OGTT

The average blood glucose values during an OGTT were present in Figure 4. Fasting blood glucose concentrations were significantly increased in all MetS groups compared to healthy groups, except in MetS + HFd + SAE where glucose level was the lowest among the MetS groups. In addition,

glucose level was lower in MetS + Sd + SAE than in MetS + Sd. The similar trend was maintained during 30, 60 and 120 min, while in 180' the highest level was in MetS + HFd.



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

**Figure 4.** Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on glucose levels during OGTT. Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Statistical significance in relation to CTRL group; <sup>b</sup> Statistical significance in relation to SAE group; <sup>c</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd group; <sup>d</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; <sup>e</sup> Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

### 2.5.2. Effects on Insulin Levels during OGTT

Table 3 shows the insulin concentration measured during the OGTT. The SAE group had the lowest, while MetS + Sd group had the highest insulin concentration measured fasting (0'), as well as 3 h after glucose administration (180'). In MetS groups fasting insulin concentration was significantly higher than in CTRL group. Moreover, insulin concentration was significantly lower in MetS + Sd + SAE than in MetS + Sd group, in both measured moments of interest.

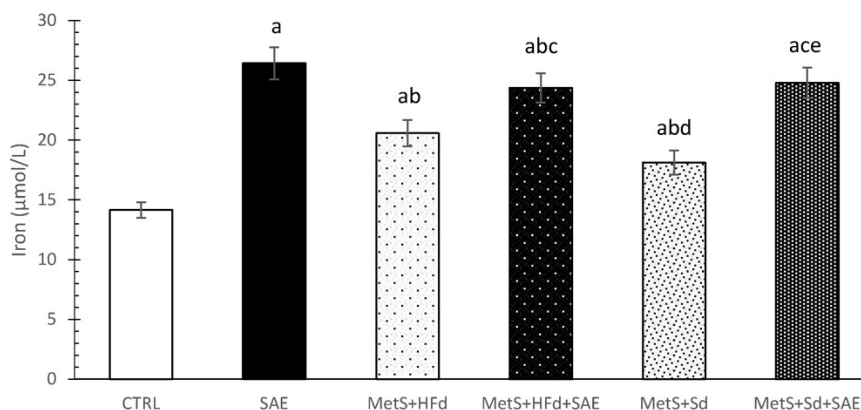
**Table 3.** Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on insulin levels during OGTT.

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

Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Statistical significance in relation to CTRL group; <sup>b</sup> Statistical significance in relation to SAE group; <sup>c</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd group; <sup>d</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; <sup>e</sup> Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

### 2.6. Effect of Dietary Changes in Healthy and Rats with MetS on Serum Iron Levels

SAE supplementation significantly increased iron levels in serum of healthy and rats with MetS fed with HFd or Sd than in non-treated groups. CTRL group had the lowest values of iron in relation to all other examined groups (Figure 5).



**Figure 5.** Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on serum iron levels. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Statistical significance in relation to CTRL group; <sup>b</sup> Statistical significance in relation to SAE group; <sup>c</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd group; <sup>d</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; <sup>e</sup> Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

### 2.7. Evaluation of Systemic Redox State

Level of nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) was significantly decreased in SAE group compared to CTRL group, and significantly increased in MetS groups compare to CTRL and SAE groups. The highest values of  $\text{NO}_2^-$  were observed in MetS + HFd group, while with the addition of SAE in HFd or Sd these values drop dramatically. Interestingly, MetS + Sd had significantly higher  $\text{NO}_2^-$  levels compare to MetS + HFd + SAE group (Figure 6A).

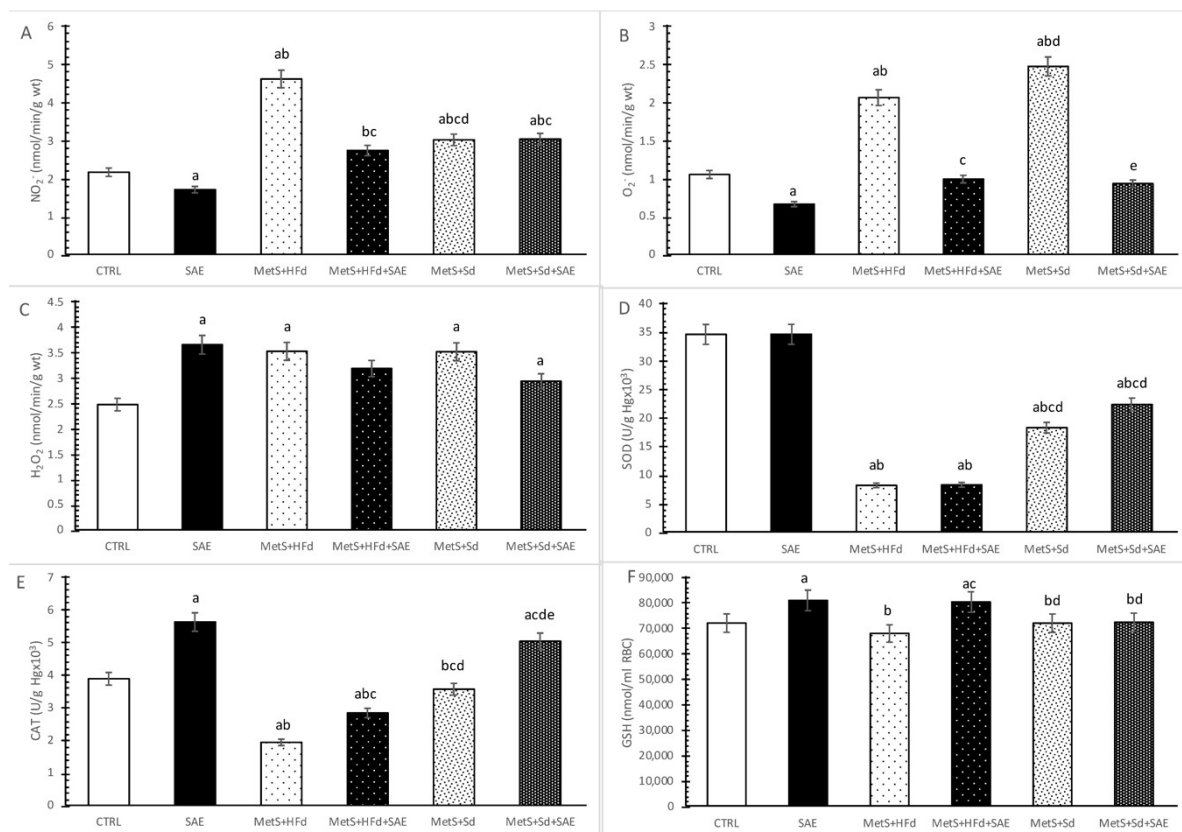
The highest level of superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ) was noticed in MetS groups untreated with SAE extract. Moreover, SAE supplementation in healthy and rats with MetS significantly reduced  $\text{O}_2^-$  levels (Figure 6B).

Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) levels were significantly increased in all examined group (except in MetS + HFd + SAE) compared to CTRL (Figure 6C).

Superoxide dismutase (SOD) activity was significantly reduced in rats with MetS, compare to healthy rats. The transition to a standard food with or without SAE supplementation led to a significant increase of SOD activity (Figure 6D).

Catalase (CAT) activity was significantly higher in SAE group compared to other examined groups, except MetS + Sd + SAE. On the other hand, in CTRL group this parameter was significantly increased compared to MetS + HFd and MetS + HFd + SAE and significantly decreased compared to MetS + Sd + SAE. With the addition of SAE in diet of rats with MetS, we observed significant increasement of CAT activity in comparison to MetS rats untreated with SAE (Figure 6E).

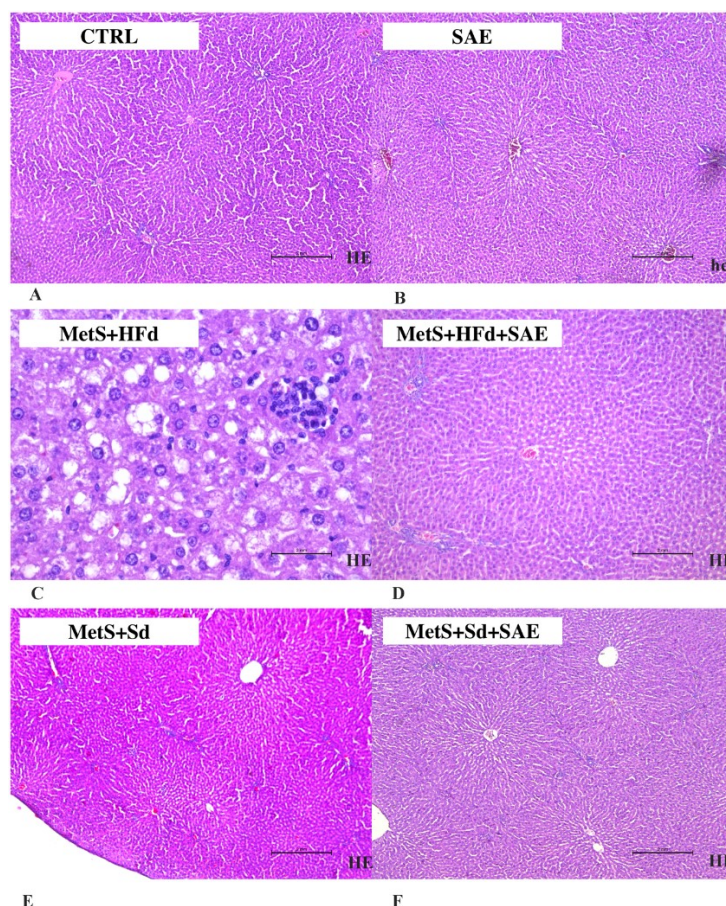
Reduced glutathione (GSH) levels were significantly increased in SAE and MetS + HFd + SAE compared to other observed groups (Figure 6F).



**Figure 6.** Effect of dietary changes in healthy and rats with MetS on systemic oxidative stress parameters: (A) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (B) O<sub>2</sub><sup>-</sup>; (C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (D) SOD; (E) CAT; (F) GSH. Values are expressed as mean ± standard deviation for 10 animals, for each group. For statistical significance were considered values  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Statistical significance in relation to CTRL group; <sup>b</sup> Statistical significance in relation to SAE group; <sup>c</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd group; <sup>d</sup> Statistical significance in relation to MetS + HFd + SAE group; <sup>e</sup> Statistical significance in relation to MetS + Sd group.

### 2.8. Histological Analysis of Liver Tissue

As shown in Figure 7, in CTRL, SAE, MetS + HFd + SAE, MetS + Sd and MetS + Sd + SAE liver tissue is a common feature. Liver lobulus is fully preserved. Hepatocytes are correctly arranged in the liver plates, without change. Sinusoidal capillaries are common characteristics, also without change. Fibrosis as well as inflammation have not been detected. On the other hand, in MetS + HFd there was a microvesicular steatosis (fatty change).



**Figure 7.** Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining photos of liver tissue (for sub-figures A, B, D, E and F original magnification is 100 $\times$  and scale bar is 2 mm, while in sub-figure C magnification is 400 $\times$  and scale bar is 2 mm) in: (A) CTRL, (B) SAE, (C) MetS + HFd, (D) MetS + HFd + SAE, (E) MetS + Sd and (F) MetS + Sd + SAE groups.

### 3. Discussion

Several epidemiologic studies have implicated visceral fat as a major risk factor for insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, stroke, metabolic syndrome and death [15]. Taking into consideration increasing incidence of MetS and its related complications we wanted to estimate the effectiveness of HFd cessation and introduction of polyphenol-rich extract (SAE) on weight gain, cardiac function, glucose tolerance, serum insulin and iron levels, as well as systemic redox state and morphological characteristic of the liver.

Our results clearly show that the highest increase in BMI was observed in MetS + HFd, which was expected as many data suggest weight gain in rats exposed to HFd for different periods [16–18]. Introduction of Aronia extract in MetS + HFd group suppressed the body weight gain and decreased BMI; however changing dietary habits from high-fat to standard food had better anti-obesity effect when compared to MetS + HFd group. Moreover, the most prominent reduction in body weight and BMI was achieved by standard diet associated with consumption of SAE extract.

Taking into account, that cardiovascular complications in MetS are very common, we wanted to examine cardiovascular effects such as their ability to affect blood pressure as well as in vivo and ex vivo cardiac function, after dietary changes. Transition from a high caloric to normal fat diet-induced a decline in diastolic blood pressure. Nevertheless, the highest hypotensive effect in rats with MetS, evidenced with a drop in both systolic and diastolic pressure was reached when this regimen was combined with Aronia extract. Extract of Aronia was able to induce a drop in diastolic pressure even in rats who were fed with high-fat food continuously. On the contrary, in healthy rats SAE did not affect



blood pressure. This is in line with the data that both Aronia berries and Aronia polyphenol extracts reduce quite effectively both SBP and DBP in spontaneously hypertensive rats [19]. The proposed mechanism might be through inhibition of the kidney renin-angiotensin system [20]. Others also found that *A. melanocarpa* extract decreases blood pressure in experimental model of hypertension [21,22]. Growing evidence suggests that the flavonoid-rich foods intake is related with decline in SBP and DBP, so we assume that the blood pressure-lowering effect of SAE is attributed to polyphenols [22,23]. Hypotensive effect was confirmed in patients with metabolic syndrome as well [24].

During blood pressure measuring, HR was also registered. Increase in HR in groups with MetS compared to healthy rats may be explained by an increase in sympathetic nervous system activity induced by HFd [25]. In that sense obtained decrease in HR after the transition to standard diet in MetS + Sd group appears to be logical. However, there was no change in HR when SAE was added to a dietary regimen in rats with MetS who were on a Sd, while we noticed an increase in rats on HFd. Moreover, Aronia extract did not alter heart rate in healthy rats, reflecting preserved myocardial function and contractility. Similar results were found in previous investigations regarding the effects of polyphenol-containing extracts on HR [26].

An echocardiographic examination illustrated that the highest impact of Aronia extract on in vivo myocardial functions was found in healthy rats, where we observed significant increase in IVSd, LVPWd, IVSs, LVPWs, FS and decrease in LVIDs compared to CTRL. On the other hand, addition of Aronia extract in rats with MetS during both HFd and Sd did not significantly affect cardiac function compared to MetS + HFd group. The greatest benefit of SAE involves improvement in systolic function, manifested as a significant increase in fractional shortening (FS) in healthy rats relative to almost all other groups. Similar values in healthy and MetS + Sd + SAE and MetS + HFd + SAE group suggest that Aronia extract was capable of improving fractional shortening during both high-calorie and standard dietary conditions in the presence of metabolic syndrome. In accordance with our findings, it has been previously reported that polyphenolics and plants rich in polyphenolics had effect in lessening the pathological alterations in FS promoted by MetS [27–29]. A decrease in systemic blood pressure after Aronia extract treatment may increase fractional shortenings, resulting in increased myocardial contractility [30].

Similar results were obtained during ex vivo, retrograde perfusion on Langendorff. Cardiac contractility, estimated by maximum and minimum rate of left ventricle pressure development, ( $dp/dt$  mSAE and  $dp/dt$  min), was preserved in MetS groups treated with SAE in combination with HFd or Sd, especially in normoxic conditions (CPP = 60 and 80 cm H<sub>2</sub>O). Furthermore, addition of Aronia extract in healthy rats significantly improved heart relaxation (for the CPP values from 60–100 cm H<sub>2</sub>O) compared to CTRL group. These results confirm the assumption that Aronia extract triggers cardioprotection, most probably because of its antioxidant, antiinflammatory, vasorelaxant and antithrombotic effects [31].

To estimate if SAE extract might improve glucose tolerance, which is strongly related to insulin resistance and insulin secretion, we performed oral glucose tolerance (OGT) test. Our results highlighted that SAE extract did not affect fasting glucose level in healthy rats, while it exerted hypoglycemic effect in animals with MetS on both HFd and Sd. The similar trend was noticed during 30, 60, 120 and 180 min, except the fact that in 120 and 180 min there was no difference in glucose level between MetS + Sd and MetS + Sd + SAE. Regarding the concentration of insulin, it was the lower in group of healthy rats receiving SAE group compared to healthy untreated group in 0'. Moreover, higher insulin concentration in MetS + HFd group wasn't diminished after adding SAE extract. On the other hand, this extract potentiates effect of standard food on lowering insulin, as evidenced by a decrease in insulin concentration in MetS + Sd + SAE compared to MetS + Sd group in 0' and 180'. In line with our observation, better glucose tolerance achieved by treatment with SAE extract was confirmed by several papers. Other authors showed the beneficial effects of *A. melanocarpa* extract on attenuating insulin resistance and improving insulin sensitivity in HFd-induced obese mice [32]. Furthermore, glucose lowering potential was confirmed in patients with DM as well [33]. Proposed mechanism

though which Aronia exerts hypoglycemic effect involve inhibition of dipeptidyl peptidase IV and  $\alpha$ -glucosidase activities [34].

Since iron is an essential trace element that has been involved in maintenance of regular homeostasis, understanding the influence of SAE alone or in combination with different dietary regiments its serum levels would be of a great importance [35]. We found the highest level of iron in group of healthy animals receiving SAE, while increased level of iron was found in all groups with MetS compared to healthy rats. Previous study indicates that increased iron stores have been associated with MetS [36]. Changing dietary habits from high-fat to standard food did not result in change of iron, while addition of SAE in this group induced significant rise when compared to MetS group. This is in agreement with other research which showed that supplementation with Aronia juice increased serum level of iron [34]. In fact, certain flavonoids have potential to chelate iron and decrease iron absorption through mechanism independent of the hepcidin, a hormone included in iron homeostasis [35,37]. On the other hand, other flavonoids may decrease the activity of hepcidin resulting in increased iron uptake and serum iron levels, which may be an explanation for the SAE extract-induced increase in our research [35,38].

Increased oxidative stress has been linked with pathogenesis of MetS, thus indicating the need for consuming natural antioxidants from food sources in treatment of MetS-related diseases [39]. In that sense, in order to test if 4-week SAE supplementation alters systemic redox homeostasis we determined levels of pro-oxidants, as well as capacity of antioxidant defense system in blood samples. Our results demonstrated that SAE consumption led to a drop in  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{O}_2^-$  and rise in CAT and GSH in healthy rats. Increase in CAT activity which catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen support unchanged values of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As it was expected increased generation of pro-oxidants and decreased activity of antioxidant enzymes SOD and CAT were noticed in MetS + HFd group compared to control. Introduction of three different dietary strategies such as consumption of SAE or transition to standard diet or its combination induced decline only in  $\text{NO}_2^-$  compared to MetS + HFd. Regarding the antioxidant status, the highest impact of increase in activities of antioxidant enzymes was noticed when standard diet was combined with SAE treatment. Striking evidence indicate that polyphenols might increase antioxidant capacity via rise in activities of SOD, CAT and GSH-peroxidase and act as direct free radical scavengers as well [40,41]. Chelation of iron ions which catalyze several free radical-generating reactions is one of the mechanisms underlying antioxidant effects of polyphenols. Nevertheless, rise in iron level induced by SAE in our research lead us to a hypothesis that enhanced activity of antioxidant enzymes and direct scavenging rather than iron chelation were responsible for antioxidant potential of applied extract. However, poor bioavailability of polyphenols through food intake suggests necessity for polyphenol-enriched foods or supplements treatment such as our extract [42].

MetS in combination with high-fat altered structure of liver tissue manifested as microvesicular hepatic steatosis. Nevertheless, transition from high-fat to standard food and combined approach which involved SAE extract consumption associated with both dietary protocols significantly normalized liver changes in MetS groups. Obtained positive effects in those groups are evidenced by the absence of fibrosis and inflammation. Ability of anthocyanins in Aronia to diminish liver steatosis induced by MetS was documented before, so we may hypothesize that these bioactive compounds are responsible for the beneficial effects in our study [43,44]. Some results show beneficial effects of *A. melanocarpa* against hepatic lipid accumulation through the inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) expression along with improvements in body weight, liver functions, lipid profiles and antioxidant capacity suggesting the potential therapeutic efficacy of *A. melanocarpa* on nonalcoholic fatty liver disease [45]. Recently, it was showed clearly an increase in acetylcholinesterase (AChE) and butyryl cholinesterase activity and disruption of lipid metabolism in patients with MetS. After supplementation of MetS patients with *A. melanocarpa* extract, a decrease in AChE activity and oxidative stress was noted [46].

## 4. Material and Methods

### 4.1. Ethical Approval

This research was carried out in the laboratory for cardiovascular physiology of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The study protocol was approved (number: 119-01-5/14/2017-09, date: 30 June 2017) by the Ethical Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All experiments were performed according to EU Directive for welfare of laboratory animals (86/609/EEC) and principles of Good Laboratory Practice.

### 4.2. Animals

Sixty *Wistar albino* rats (males, six weeks old, body-weight  $200 \pm 30$  g, on beginning of experiments) were included in the study. They were housed at temperature of  $22 \pm 2$  °C, with 12 h of automatic illumination daily. The rats were randomly divided into two groups: healthy animals ( $n = 20$ ), fed with Sd which contains 9% fat, 20% protein, 53% starch, 5% fiber and animals with MetS ( $n = 40$ ), fed with HFd which contains 25% fat, 15% protein, 51% starch and 5% fiber during 4 weeks. After one month on their respective diets, rats from MetS group after 6–8 h of starvation received one dose of streptozotocin intraperitoneally. Streptozotocin was prepared *ex tempore* by dissolving in citrate buffer and, depending on the body weight, it was administered in a dose of 25 mg/kg body weight [47]. Three days (72 h) after streptozotocin treatment and 12 h after starvation fasting glucose and insulin level as well as blood pressure, were measured. Animals with systolic blood pressure greater than 140 mmHg, diastolic blood pressure more than 85 mmHg, fasting glucose level above 7.0 mmol/L and fasting insulin level over 150  $\mu$ LU/mL were included in the study and were used in the study as rats with MetS.

Healthy and rats with MetS were divided into 6 groups as follows: CTRL—healthy rats, fed with a Sd for 4 weeks; SAE—healthy rats, fed with a Sd and treated with highly concentrated Aronia extract standardized with polyphenol content—SAE in the dose 0.45 mL/kg/day per os for 4 weeks; MetS + HFd—rats with MetS, fed with HFd for 4 weeks; MetS + HFd + SAE—rats with MetS, fed with HFd and treated with SAE (0.45 mL/kg/day, per os) for 4 weeks; MetS + Sd—rats with MetS, fed with a Sd for 4 weeks; MetS + Sd + SAE—rats with MetS, fed with a Sd for 4 weeks and treated with SAE (0.45 mL/kg/day, per os) for 4 weeks.

Standardized Aronia extract (SAE) is official product of pharmaceutical company Pharmanova (Belgrade, Serbia); however procedure of extraction was done by EU-Chem company (Belgrade, Serbia).

### 4.3. Measurement of BMI

At the end of the study protocol, body weight and body length were measured. Body length represents nose-anus length. Those parameters were used to calculate the BMI of the rats as follows:

$$\text{Body mass index (BMI)} = \text{body weight (g)} / \text{length}^2 (\text{cm}^2) \quad (1)$$

### 4.4. Evaluation of Blood Pressure and Heart Rate

A day before sacrificing animals, the blood pressure and heart rate were measured by a tail-cuff noninvasive method BP system (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R), IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA) [48].

### 4.5. Evaluation of *in vivo* Cardiac Function

After accomplishing 4-week treatment, transthoracic echocardiograms were performed. Mixture of ketamine—50 mg/kg and xylazine—10 mg/kg intraperitoneally was used as anesthesia. Echocardiograms were performed using a Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, MA, USA) sector scanner equipped with a 15.0-MHz phased-array transducer as previously described [49]. From the

parasternal long-axis view in 2-dimensional mode, and M-mode cursor was positioned perpendicularly to the interventricular septum and posterior wall of the left ventricle (LV) at the level of the papillary muscles and M-mode images were obtained. Interventricular septal wall thickness at end diastole (IVSd), LV internal dimension at end diastole (LVIDd), LV posterior wall thickness at end diastole (LVPWd), interventricular septal wall thickness at end systole (IVSs), LV internal diameter at end systole (LVIDs) and LV posterior wall thickness at end systole (LVPWs) were recorded with M-mode. Fractional shortening percentage (FS%) was calculated from the M-mode LV diameters using the equation:  $[(LVEDd - LVESd) / LVEDd] \times 100\%$ . Where LVEDd is left ventricular end diastolic diameter and LVESd is left ventricular end systolic diameter.

#### 4.6. Evaluation of ex vivo Cardiac Function

Following 4-week protocol, after short-term narcosis induced by intraperitoneal application of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and premedication with heparin as an anticoagulant, animals were sacrificed by decapitation. Then the chest was opened via midline thoracotomy, hearts were immediately removed and immersed in cold saline and aortas were cannulated and retrogradely perfused according to *Langendorff* technique, under gradually increasing coronary perfusion pressure (CPP) from 40 to 120 cm H<sub>2</sub>O [50]. The composition of Krebs-Henseleit buffer used for retrograde perfusion was as follows (mmol/L): NaCl 118 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 1.7 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 25 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O 2.5 mmol/L, glucose 11 mmol/L, pyruvate 2 mmol/L, equilibrated with 95% O<sub>2</sub> plus 5% CO<sub>2</sub> and warmed to 37 °C (pH 7.4).

After placing the sensor (transducer BS473-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) in the left ventricle, the following parameters of myocardial function have been measured: maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max), minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min), systolic left ventricular pressure (SLVP), diastolic left ventricular pressure (DLVP), heart rate (HR). Coronary flow (CF) was measured flowmetrically. Following the establishment of heart perfusion, the hearts were stabilized within 30 min with a basal coronary perfusion pressure of 70 cm H<sub>2</sub>O. To examine the heart function, after stabilization period, the perfusion pressure was gradually decreased to 60, and then increased to 80, 100 and 120 cm H<sub>2</sub>O and reduced to 40 cm H<sub>2</sub>O (pressure changing protocol 1, PCP 1) and again gradually increased from 40 to 120 cm H<sub>2</sub>O (pressure changing protocol 1, PCP 1).

#### 4.7. Oral Glucose Tolerance Test

Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the end of 4-week protocol and a day before sacrificing animals. After overnight (12–14h) fasted animals, the blood sample was taken by tail bleeding to determine the fasting blood glucose and insulin level (0 min) and then glucose was administered orally in a dose of 2 g/kg body weight and blood samples were taken at 30, 60, 120 and 180 min after glucose loading. Glucose levels were determined in 0, 30, 60, 120 and 180 min, using glucometer (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) with its corresponding strips. At 0 and 180 min, insulin levels were assessed in plasma samples by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method as previously described [51].

#### 4.8. Evaluation of Serum Iron Levels and Systemic Redox State

In the moment of sacrificing animals blood samples were collected from jugular vein in order to estimate serum iron levels and systemic oxidative stress response. The levels of serum iron (SI) was determined on a biochemical analyzer (Dimension, Dade Behring, Milton Keynes, UK, USA) and the results were expressed in µg/L.

In plasma the following pro-oxidants were determined: the levels of nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Parameters of antioxidative defence system, such as activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and level of reduced glutathione (GSH) were determined in erythrocytes samples.

$\text{NO}_2^-$  was determined as an index of NO production with Griess reagent. The method for detection nitrate in plasma is based on the Green and coworkers proposal and measured spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm [52]. The concentration of  $\text{O}_2^-$  in plasma was measured at 530 nm, after the reaction of nitro blue tetrazolium in TRIS buffer [53]. The measurement of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is based on the oxidation of phenol red by hydrogen peroxide, in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRPO) as previously described by Pick and colleagues. The level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was measured at 610 nm [54].

For determination of antioxidant parameters, isolated erythrocytes were prepared according to McCord and Fridovich [54]. CAT activity were determined at 360 nm toward to Beutler [55]. Lysates were diluted with distilled water (1:7 *v/v*) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 *v/v*) to remove hemoglobin [51]. SOD activity was determined by the epinephrine method of Misra and Fridovich. Detection was performed at 470 nm [56]. Level of GSH is based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid as previously described by Beutler. Measuring was performed at 420 nm [57].

#### 4.9. Histological Analysis of Liver Tissue

Liver tissue samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde solution and immersed in paraffin. Afterwards 4-micrometre-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) [43].

#### 4.10. Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics 20.0 Desktop for Windows was used for statistical analysis. Distribution of data was checked by Shapiro–Wilk test. Where distribution between groups was normal, statistical comparisons were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) tests with a Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Kruskal–Wallis was used for comparison between groups where the distribution of data was different than normal. Values of  $p < 0.05$  were considered to be statistically significant.

## 5. Conclusions

Our results highlighted cardioprotective potential of SAE in treatment of MetS, involving lowering blood pressure and favorable effects on heart function. Furthermore, SAE effectively suppressed the body weight gain, improved glucose tolerance and attenuated liver steatosis and oxidative stress present in MetS, thus indicating its promising role in management of MetS-related diseases. Moreover, increase in iron concentration indicates its health benefits in iron deficiency. Obtained beneficial effects would be more prominent in c combination with changing dietary habits. This research may be a starting point for further experimental and clinical investigations which would fully evaluate the effects of SAE alone or in combination with different dietary protocols in various models of chronic diseases.

**Author Contributions:** Conceptualization, V.J. and M.M.; methodology, I.M.; validation, N.J. and T.N.T.; formal analysis, J.J. and J.B.; investigation, I.S., M.L.B. and J.J.; writing—original draft preparation, J.B. and J.J.; writing—review and editing, V.Z.; visualization, P.M. and S.B.; supervision, V.J. and V.V.; project administration, V.Z. and I.S.

**Funding:** This research received no external funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Tabatabaei-Malazy, O.; Larijani, B.; Abdollahi, M. Targeting metabolic disorders by natural products. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2015**, *14*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Moore, J.X.; Chaudhary, N.; Akinyemiju, T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012. *Prev. Chronic Dis.* **2017**, *14*, E24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Bernabé, J.; Mulero, J.; Marhuenda, J.; Cerdá, B.; Avilés, F.; Abellán, J.; Zafrilla, P. Changes in Antioxidant Enzymes in Metabolic Syndrome Patients after Consumption a Citrus-Based Juice Enriched with Aronia Melanocarpa. *J. Nutr. Disorders Ther.* **2015**, *5*, 4.
4. Nammi, S.; Sreemantula, S.; Roufogalis, B.D. Protective effects of ethanolic extract of Zingiber officinale rhizome on the development of metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *104*, 366–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ranasinghe, P.; Mathangasinghe, Y.; Jayawardena, R.; Hills, A.P.; Misra, A. Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: A systematic review. *BMC Public Health* **2017**, *17*, 101. [[CrossRef](#)]
6. De la Iglesia, R.; Loria-Kohen, V.; Zulet, M.A.; Martinez, J.A.; Reglero, G.; Ramirez de Molina, A. Dietary Strategies Implicated in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Daskalova, E.; Delchev, S.; Peeva, Y.; Vladimirova-Kitova, L.; Kratchanova, M.; Kratchanov, C.; Denev, P. Antiatherogenic and Cardioprotective Effects of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Juice in Aging Rats. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2015**, 2015. [[CrossRef](#)]
8. Kokotkiewicz, A.; Jaremicz, Z.; Luczkiewicz, M. Aronia plants: A review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J. Med. Food* **2010**, *13*, 255–269. [[CrossRef](#)]
9. Ochmian, I.; Grajkowski, J.; Smolik, M. Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj Napoca* **2012**, *40*, 253–260. [[CrossRef](#)]
10. Tolić, M.T.; Landeka Jurčević, I.; Panjkota Krbavčić, I.; Marković, K.; Vahčić, N. Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products. *Food Technol. Biotechnol.* **2015**, *53*, 171–179. [[CrossRef](#)]
11. Cebova, M.; Klimentova, J.; Janega, P.; Pechanova, O. Effect of Bioactive Compound of *Aronia melanocarpa* on Cardiovascular System in Experimental Hypertension. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 2017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jurikova, T.; Mlcek, J.; Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Sochor, J.; Hlavacova, I.; Snopek, L.; Orsavova, J. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules* **2017**, *22*, 944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lupascu, N.; Cadar, E.; Cherim, M.; Erimia, C.L.; Sîrbu, R. Research Concerning the Efficiency of Aronia Melanocarpa for Pharmaceutical Purpose. *Eur. J. Interdiscip. Stud.* **2016**, *4*, 115–121. [[CrossRef](#)]
14. Borowska, S.; Brzóska, M.M. Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and Their Products as a Possible Means for the Prevention and Treatment of Noncommunicable Diseases and Unfavorable Health Effects Due to Exposure to Xenobiotics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 982–1017. [[CrossRef](#)]
15. Finelli, C.; Sommella, L.; Gioia, S.; La Sala, N.; Tarantino, G. Should visceral fat be reduced to increase longevity? *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 996–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yin, Y.; Yu, Z.; Xia, M.; Luo, X.; Lu, X.; Ling, W. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur. J. Clin. Investig.* **2012**, *42*, 1189–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wang, Y.; Wang, P.Y.; Qin, L.Q.; Davaasambu, G.; Kaneko, T.; Xu, J.; Murata, S.; Katoh, R.; Sato, A. The development of diabetes mellitus in Wistar rats kept on a high-fat/low-carbohydrate diet for long periods. *Endocrine* **2003**, *22*, 85–92. [[CrossRef](#)]
18. Auberval, N.; Dal, S.; Bietiger, W.; Pinget, M.; Jeandidier, N.; Maillard-Pedracini, E.; Schini-Kerth, V.; Sigrist, S. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2014**, *6*, 130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hellström, J.K.; Shikov, A.N.; Makarova, M.N.; Pihlanto, A.M.; Pozharitskaya, O.N.; Ryhänen, E.L.; Kivijärvi, P.; Makarov, V.G.; Mattila, P.H. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii* var. Viking). *J. Funct. Foods* **2010**, *2*, 163–169. [[CrossRef](#)]
20. Yamane, T.; Kozuka, M.; Imai, M.; Yamamoto, Y.; Ohkubo, I.; Sakamoto, T.; Nakagaki, T.; Nakano, Y. Reduction of blood pressure by aronia berries through inhibition of angiotensin-converting enzyme activity in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Funct. Food Health Dis.* **2017**, *7*, 280–290.
21. Ciocoiu, M.; Badescu, M.; Badulescu, O.; Tutunaru, D.; Badescu, L. Polyphenolic extract association with renin inhibitors in experimental arterial hypertension. *J. Biomed. Sci. Eng.* **2013**, *6*, 493–497. [[CrossRef](#)]

22. Naruszewicz, M.; Laniewska, I.; Millo, B.; Dłuzniewski, M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infarction (MI). *Atherosclerosis* **2007**, *194*, e179–e184. [CrossRef] [PubMed]
23. Tjelle, T.E.; Holtung, L.; Bøhn, S.K.; Aaby, K.; Thoresen, M.; Wiik, S.Å.; Paur, I.; Karlsen, A.S.; Retterstøl, K.; Iversen, P.O.; Blomhoff, R. Polyphenol-rich juices reduce blood pressure measures in a randomised controlled trial in high normal and hypertensive volunteers. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 1054–1063. [CrossRef] [PubMed]
24. Broncel, M.; Kozirog, M.; Duchnowicz, P.; Koter-Michalak, M.; Sikora, J.; Chojnowska-Jeziarska, J. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med. Sci. Monit.* **2010**, *16*, CR28–CR34. [PubMed]
25. Kanthe, P.S.; Patil, B.S.; Bagali, S.C.; Reddy, R.C.; Aithala, M.R.; Das, K.K. Protective effects of Ethanolic Extract of *Embllica officinalis* (amla) on Cardiovascular Pathophysiology of Rats, Fed with High Fat Diet. *J. Clin. Diagn. Res.* **2017**, *11*, CC05–CC09. [CrossRef] [PubMed]
26. El-Sayyad, S.M.; Makboul, M.A.; Ali, R.M.; Farag, S.F. Hypotensive effect of *Ficus sycomorus* L. on the arterial blood pressure of rabbits. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2016**, *4*. Available online: [https://www.researchgate.net/publication/309610756\\_Hypotensive\\_effect\\_of\\_Ficus\\_sycomorus\\_L\\_on\\_the\\_arterial\\_blood\\_pressure\\_of\\_rabbits](https://www.researchgate.net/publication/309610756_Hypotensive_effect_of_Ficus_sycomorus_L_on_the_arterial_blood_pressure_of_rabbits) (accessed on 28 November 2018).
27. Cherniack, E.P. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition* **2011**, *27*, 617–623. [CrossRef]
28. Leung, L.; Martin, J.B.; Lawmaster, T.; Arthur, K.; Broderick, T.L.; Al-Nakkash, L. Sex-Dependent Effects of Dietary Genistein on Echocardiographic Profile and Cardiac GLUT4 Signaling in Mice. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2016**, *2016*, 1796357. [CrossRef]
29. Razmaraii, N.; Babaei, H.; Mohajjel Nayebi, A.; Assadnassab, G.; Ashrafi-Helan, J.; Azarmi, Y. Cardioprotective Effect of Grape Seed Extract on Chronic Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Wistar Rats. *Adv. Pharm. Bull.* **2016**, *6*, 423–433. [CrossRef]
30. Yadegari, M.; Khamesipour, F.; Talebiyan, R.; Katsande, S. Echocardiography findings after intravenous injection of *Achillea millefolium* (Yarrow) extract in the dog. *Malays. Appl. Biol.* **2015**, *44*, 85–91.
31. Parzonko, A.; Naruszewicz, M. Cardioprotective effects of *Aronia melanocarpa* anthocyanins. From laboratory experiments to clinical practice. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 174–179. [CrossRef]
32. Kim, N.H.; Jegal, J.; Kim, Y.N.; Heo, J.D.; Rho, J.R.; Yang, M.H.; Jeong, E.J. Chokeberry Extract and Its Active Polyphenols Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Modulates Fat Accumulation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients* **2018**, *10*, 1734. [CrossRef]
33. Simeonov, S.B.; Botushanov, N.P.; Karahanian, E.B.; Pavlova, M.B.; Husianitis, H.K.; Troev, D.M. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med.* **2002**, *44*, 20–23.
34. Yamane, T.; Kozuka, M.; Konda, D.; Nakano, Y.; Nakagaki, T.; Ohkubo, I.; Ariga, H. Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and  $\alpha$ -glucosidase. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *31*, 106–112. [CrossRef] [PubMed]
35. Imam, M.U.; Zhang, S.; Ma, J.; Wang, H.; Wang, F. Antioxidants Mediate Both Iron Homeostasis and Oxidative Stress. *Nutrients* **2017**, *9*, 671. [CrossRef]
36. Lee, H.J.; Jang, H.B.; Park, J.E.; Park, K.H.; Kang, J.H.; Park, S.I.; Song, J. Relationship between Serum Levels of Body Iron Parameters and Insulin Resistance and Metabolic Syndrome in Korean Children. *Osong Public Health Res. Perspect.* **2014**, *5*, 204–210. [CrossRef] [PubMed]
37. Skarpańska-Stejnborn, A.; Basta, P.; Sadowska, J.; Pilaczyńska-Szcześniak, L. Effect of supplementation with chokeberry juice on the inflammatory status and markers of iron metabolism in rowers. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2014**, *11*, 48. [CrossRef]
38. Mu, M.; An, P.; Wu, Q.; Shen, X.; Shao, D.; Wang, H.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Yao, H.; Min, J.; et al. The dietary flavonoid myricetin regulates iron homeostasis by suppressing hepcidin expression. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *30*, 53–61. [CrossRef] [PubMed]
39. Gregório, B.M.; De Souza, D.B.; de Moraes Nascimento, F.A.; Pereira, L.M.; Fernandes-Santos, C. The potential role of antioxidants in metabolic syndrome. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 859–869. [CrossRef]
40. Louis, X.L.; Thandapilly, S.J.; Kalt, W.; Vinqvist-Tymchuk, M.; Aloud, B.M.; Raj, P.; Yu, L.; Le, H.; Netticadan, T. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1785–1794. [CrossRef]

41. Mattera, R.; Benvenuto, M.; Giganti, M.G.; Tresoldi, I.; Pluchinotta, F.R.; Bergante, S.; Tettamanti, G.; Masuelli, L.; Manzari, V.; Modesti, A.; et al. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. *Nutrients* **2017**, *9*, 523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Brglez Mojzer, E.; Knez Hrnčič, M.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **2016**, *21*, 901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kotronen, A.; Westerbacka, J.; Bergholm, R.; Pietiläinen, K.H.; Yki-Järvinen, H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 3490–3497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bhaswant, M.; Shafie, S.R.; Mathai, M.L.; Mouatt, P.; Brown, L. Anthocyanins in chokeberry and purple maize attenuate diet-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrition* **2017**, *41*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Park, C.H.; Kim, J.H.; Lee, E.B.; Hur, W.; Kwon, O.J.; Park, H.J.; Yoon, S.K. *Aronia melanocarpa* extract ameliorates hepatic lipid metabolism through PPAR $\gamma$ 2 downregulation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Duchnowicz, P.; Ziobro, A.; Rapacka, E.; Koter-Michalak, M.; Bukowska, B. Changes in Cholinesterase Activity in Blood of Adolescent with Metabolic Syndrome after Supplementation with Extract from *Aronia melanocarpa*. *BioMed Res. Int.* **2018**. [[CrossRef](#)]
47. Pari, L.; Chandramohan, R. Modulatory effects of naringin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced diabetes in rats. *Gen Physiol Biophys* **2017**, *36*, 343–352. [[CrossRef](#)]
48. Feng, M.; Whitesall, S.; Zhang, Y.; Beibel, M.; D'Alecy, L.; DiPetrillo, K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am. J. Hypertens.* **2008**, *21*, 1288–1291. [[CrossRef](#)]
49. Joffe, I.I.; Travers, K.E.; Perreault-Micale, C.L.; Hampton, T.; Katz, S.E.; Morgan, J.P.; Douglas, P.S. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: Noninvasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1999**, *34*, 2111–2119. [[CrossRef](#)]
50. Zivkovic, V.; Jakovljevic, V.; Djordjevic, D.; Vuletic, M.; Barudzic, N.; Djuric, D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *370*, 59–67. [[CrossRef](#)]
51. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138. [[CrossRef](#)]
52. Auclair, C.; Voisin, E. Nitroblue tetrazolium reduction. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*; Greenvald, R.A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1985; pp. 123–132.
53. Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* **1980**, *38*, 161–170. [[CrossRef](#)]
54. McCord, J.M.; Fridovich, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6056–6063. [[PubMed](#)]
55. Beutler, E. Catalase. In *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*; Beutler, E., Ed.; Grune and Stratton: New York, NY, USA, 1982; pp. 105–106.
56. Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175.
57. Beutler, E. Reduced glutathione (GSH). In *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*; Beutler, E., Ed.; Grune and Stratton: New York, NY, USA, 1975; pp. 112–114.







## Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.)

Petar S. Milić<sup>a</sup>, Katarina M. Rajković<sup>a</sup>, Olivera S. Stamenković<sup>b</sup>, Vlada B. Veljković<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> High Chemical and Technological School for Professional Studies, Kruševac, Serbia

<sup>b</sup> Faculty of Technology, University of Niš, 16000 Leskovac, Bulevar Oslobođenja 124, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 February 2012

Received in revised form 24 July 2012

Accepted 26 July 2012

Available online 3 August 2012

#### Keywords:

Artificial neural network

*Galium mollugo* L.

Maceration

optimization

Response surface methodology

Ultrasound-assisted extraction

### ABSTRACT

In this paper, extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.) using an aqueous ethanol solution (50% by volume) was studied at different temperatures in the absence and the presence of ultrasound. This study indicated that ultrasound-assisted extraction was effective for extracting the resinoid and gave better resinoid yields at lower extraction temperature and in much shorter time than the maceration. A phenomenological model was developed for modeling the kinetics of the extraction process. The model successfully describes the two-step extraction consisting of washing followed by diffusion of extractable substances and shows that ultrasound influences only the first step. The extraction process was optimized using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) models. For the former modeling, the second-order polynomial equation was applied, while the second one was performed by an ANN-GA combination. The high coefficient of determination and the low MRPD between the ANN prediction and the corresponding experimental data proved that modeling the extraction process in the absence and the presence of ultrasound using ANN was more accurate than RSM modeling. The optimum extraction temperature was determined to be 80 and 40 °C, respectively for the maceration and the ultrasound-assisted extraction, ensuring the highest resinoid yield of 22.0 g/100 g in 4 h and 25.1 g/100 g in 30 min, which agreed with the yields obtained experimentally for the same time (21.7 and 25.3 g/100 g, respectively).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Solid–liquid extraction, also called leaching, has been widely used for recovering bioactive compounds from different parts of many plants by appropriate solvent. This process is based on diffusion of extractable bioactive compounds through the plant particles followed by their dissolution in the bulk of the extracting solvent. Solutions of bioactive compounds are usually evaporated to get dry extracts. Containing valuable bioactive compounds of the original plant materials without undesirable insoluble fibers and cellulose, the plant extracts are used as ingredients and additives in many industries such as food, pharmaceutical, cosmetic and others. Since concentrations of bioactive compounds in extracts are usually low, efforts are made to increase the extract yield while keeping the process cost as low as possible. From the technological point of view, the important operating variables such as extracting solvent, solvent to solid ratio, temperature, and extraction time should be optimized for increasing the extraction yield from a certain plant material. For a pair of plant material and solvent, extraction temperature and extraction time are commonly

focused operating variables. In recent years, solid–liquid extractions are improved in the presence of ultrasound, which increases the extract yield in much shorter time. The primary benefits of sonication are disruption of cell walls, particle size reduction and increased overall mass transfer of the intracellular content via cavitation bubble collapse [1,2], as well as hydration of plant tissue [3].

The first step needed for optimization of a solid–liquid extraction from a particular plant material is to select appropriate solvent, solvent-to-solid ratio, temperature and agitation intensity [4]. Modeling followed by optimization can then contribute to its further improvement by increasing the extract yield. Different methodologies combining mathematical principles and experimental studies can be used to describe the variation of extract yield with time or to evaluate the effect of extraction operating variables (independent variables or factors) on the extract yield and the overall process rate (dependent variables or responses). For these purposes, both physical and empirical models are used. The former models are commonly based on the mechanism of mass transfer assumed, while the latter ones are only mathematical description of the variation of extract yield with time or extraction operating variables. In the last decade, two methodologies, namely response surface (RSM) and artificial neural network

\* Corresponding author. Tel.: +381 16 247203; fax: +381 16 242859.

E-mail address: [veljkovicvb@yahoo.com](mailto:veljkovicvb@yahoo.com) (V.B. Veljković).

(ANN), have been often used for modeling and especially optimization of various extraction processes. Both methodologies do not account for the phenomena governing the extraction process and have the shortcoming to extrapolate outside the investigated range, but they can measure the effects of the extraction operating variables on the extract yield.

Physical kinetic models are based on the phenomena of mass transfer through solid plant particles and from their surfaces into the bulk of the solvent. As they can be very complex, they are usually simplified. The unsteady diffusion through the plant material and the film theory are the most frequently used simplified kinetic models [5–8]. Different types of empirical kinetic models have been recently compared by Kitanović et al. [9].

The RSM is a collection of statistical and mathematical techniques, which generates models describing the dependence of the extract yield on the extraction operating variables and their interactions. If adequately used, the RSM is powerful in providing the optimal conditions for a process [10]. Different extraction techniques have been optimized, such as classical maceration [11,12], as well as ultrasound-assisted [13–15], microwave-assisted [16,17] and supercritical carbon-dioxide [18] extractions. Usually, the second-order polynomial equation is used to present the relationship between the extract yield and the extraction operating variables. When including the extraction time as an independent variable, this model can describe the variation of the extract yield with the progress of the extraction process under certain operating conditions.

ANNs have been applied to the modeling of different extraction processes in recent years, although not as often as RSMs. ANNs do not produce a model equation but represent the nonlinearities better than the second-order polynomial equation. An ANN works as the human brain and estimates the response based on the trained data. ANN models have been mainly used for optimization of supercritical fluid extractions [19–25]. They are also employed for modeling maceration [12,26], ultrasound-assisted [27] and pressurized solvent [28] extractions. Being simple, convenient and accurate, ANNs have many advantages over RSMs such as their abilities to learn by reproducing the output from a given input by measuring and minimizing the error, to handle incomplete data and to relate inputs and outputs with no explicit function in the prediction process. The limitation of ANNs in process optimization can be overcome by their combination with genetic algorithms (GAs) [29–31].

The plant genus *Galium* species are used in food manufacturing and folk medicine all over the world. The flowers of Lady's bedstraw (*Galium verum* L.) are utilized in yogurt- and cheese-making and as a yellow dye in some regions [32]. For medicinal purposes, the aerial parts are collected in the blossoming period and are used as diuretics, cholagogues, against diarrhea, sedatives, spasmolytics, etc. Yellow lady's bedstraw has been studied chemically [33–37], while there are a few data on the composition of white lady's bedstraw (*Galium mollugo*) [26,37]. Lakić et al. [35] have proven that the antioxidative activity of yellow bedstraw extracts is caused by the presence of flavonoids. The white lady's bedstraw contains flavonoids, but their yield is three times less than that of yellow lady's bedstraw [37].

Various techniques, including conventional (maceration), reflux and ultrasound-assisted extraction, have already been used for recovering extractive substances from the *Galium* species. Maceration is the main extraction technique applied in one to four days at different temperatures (from room to boiling temperature) and solid-to-solvent ratios (from 1:1 to 1:20 g/mL), while a relatively new ultrasound-assisted extraction has been used for obtaining mineral extracts from the *G. mollugo* aerial parts [26]. Methanol has been mostly employed as an extracting solvent to recover the extractable substances from *Galium* species [35,38–41]. Ethanol [42,43],

hexane, chloroform [35], dichloromethane and acetone [43] have been also used. The yield of extractable substances depends on the extraction technique, the type of plant material, type of solvent, the solid-to-solvent ratio, the operating temperature and the time duration of the extraction.

The present work dealt with maceration and ultrasound extraction of total extractive substances (resinoid) from aerial parts of white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.) by an aqueous ethanol solution (50% by volume) at different extraction temperatures. The main goals were to develop the kinetic and optimization models, which has not been done for the extraction of white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.).

## 2. Experimental part

### 2.1. Materials

The aerial parts of white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.) were collected during the blooming period in the foot of the Vlasina Mountain, Southeast Serbia. The plant material was dried in a shadow. It was ground immediately before the extraction. The mean particle size of the ground plant material was 0.75 mm. Ethanol (96% vol.) was from Zorka Pharma (Šabac, Serbia).

### 2.2. Extraction equipment and procedures

An ultrasonic bath (Sonic, Niš, Serbia, power 120 W, frequency 40 kHz) was used for indirect ultrasonication. Water was circulated through the ultrasonic bath by a pump from a thermostated water bath, which was kept at a constant temperature. For ultrasound-assisted extraction the ultrasonic generator was switched on, while for maceration it was switched off. The maceration was carried out at 23 °C in 24 h, and at 50, 65 and 80 °C in 4 h, while the ultrasound-assisted extraction was performed at 23, 30, 35 and 40 °C in 80 min. An aqueous ethanol solution (50% by volume) was used as an extracting solvent.

The ground plant material (7.5 g) and the aqueous ethanol solution (150 g) were put in an Erlenmeyer flask, equipped with a reflux condenser. The flask was immediately immersed in the bath for a predetermined time which was dependent on the extraction technique and the extraction temperature (maceration at 23 °C: 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 600, 720 and 1440 min; for maceration at 50, 65 and 80 °C: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 min; and for ultrasound-assisted extraction: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 and 80 min). At the end of the predetermined time, the suspension of plant particles in the solvent was cooled to the room temperature, taken from the flask and filtered under vacuum to separate the liquid extract from the solid residue. The solvent was then evaporated in a rotary vacuum evaporator until a half-solid residue was obtained, which was then dried at 60 °C to constant weight. The dry residue represents the total ethanol extract known as resinoid. Each experiment was repeated twice. The MRPD values of resinoid yield were  $\pm 1.77\%$  (66 data) and  $\pm 1.02\%$  (64 data) for the maceration and the ultrasound-assisted extraction, respectively, indicating a good reproducibility of the resinoid yield measurements.

The calorimetric method [44], based on monitoring the increase of temperature due to conversion of the ultrasonic energy into heat, was used to measure the ultrasonic power input to the suspension of plant material in the aqueous solution of ethanol. The temperature increase was followed by a type-K thermocouple after switching on the ultrasonic generator. The ultrasonic power input was  $7.3 \pm 0.3$  W.

### 2.3. Mathematical models

Three mathematical models were developed to connect the resinoid yield with extraction temperature and time: (1) a phenomenological model; (2) the second-order polynomial equation and (3) a non-parameter ANN model. A factorial design of experiments  $n^2$ , where  $n$  is the number of levels, with two replications was employed. The experimental design was consisted of two factors, namely extraction temperature and extraction time, while the number of levels of extraction time depended on the extraction technique and the model applied.

The performances of the models developed were statistically measured by mean squared error (MSE), mean relative percent deviation (MRPD) and/or coefficient of determination ( $R^2$ ), which were computed using the following equations:

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_{a,i} - y_{p,i})^2 \quad (1)$$

$$MRPD = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_{pi} - y_{ai}}{y_{ai}} \right| \quad (2)$$

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{p,i} - y_{a,i})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{p,i} - y_m)^2} \quad (3)$$

where  $y_{p,j}$  and  $y_{a,i}$  are the predicted and actual values of the resinoid yield,  $y_m$  is the mean value of resinoid yield, and  $n$  is the number of experimental runs.

#### 2.3.1. Phenomenological model

This model involves two main processes [5]: (1) dissolution of the soluble bioactive compounds located on or near surfaces of solid plant particles (so called, washing), and (2) mass transfer of soluble bioactive compounds from the plant particles into the solution by diffusion and osmotic process (so called slow extraction). Both processes were here assumed to be exponential and to occur simultaneously from the beginning:

$$y = y_{\infty} [1 - f \exp(-k_1 t) - (1 - f) \exp(-k_2 t)] \quad (4)$$

where  $y$  is the resinoid yield,  $y_{\infty}$  is the resinoid yield at saturation,  $t$  is the extraction time,  $f$  is the fraction of the resinoid washed from broken plant cells on the particle surfaces and  $k_1$  and  $k_2$  are the rate constants for washing and diffusion, respectively. The fraction of the resinoid that will be dissolved by washing is assumed to be constant. It is assumed that the washing step is faster than the diffusion step, i.e.  $k_1$  is greater than  $k_2$ . The same model had been previously derived for the recovery of essential oils from plant materials by hydrodistillation where the constant  $f$  is assumed to be the fraction of broken cells [45].

The rate constants are dependent on extraction temperature according to the Arrhenius equation:

$$k = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \quad (5)$$

If washing is much faster than diffusion ( $k_1 \gg k_2$ ), then Eq. (4) is simplified:

$$y = y_{\infty} [1 - (1 - f) \exp(-k_2 t)] \quad (6)$$

This model was previously developed for extraction of extractable substances from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), assuming that washing occurs instantaneously [5]. The model was verified for the ultrasound-assisted extraction of extractable substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage [8].

If  $f = 0$ , which means that washing does not occur, then the resinoid yield increases exponentially due to diffusion:

$$y = y_{\infty} [1 - \exp(-k_2 t)] \quad (7)$$

The coefficients of Eqs. (4), (6), and (7) were estimated by the multiple nonlinear regression method using all measured values of resinoid yield.

#### 2.3.2. Second-order polynomial model

The second-order polynomial model is presented by the following equation:

$$y = b_0 + b_1 T + b_2 t + b_{12} Tt + b_{11} T^2 + b_{22} t^2 \quad (8)$$

where  $y$  is the resinoid yield,  $T$  is the extraction temperature,  $t$  is the extraction time,  $b_i$  and  $b_{ij}$  ( $i = 0, 1, 2$  and  $j = 1, 2$ ) are the parameters of Eq. (8) obtained using the multiple nonlinear regression method by help of a computer program. The statistical significance of the independent variables and their interactions was estimated by the analysis of variance (ANOVA). A number of optimization points, where the maximum values of resinoid yield were achieved for a set of extraction operating variables were also found by the same computer program.

The coefficients of Eq. (8) were estimated by the multiple nonlinear regression method using the values of resinoid yield measured at 30, 60, 120 and 240 min for the maceration at 23, 50 and 80 °C as well as at 10, 15, 20, 30, 45, 60 and 80 min for the ultrasound-assisted extraction at 23, 30 and 40 °C. Values of resinoid yield achieved by maceration and ultrasound-assisted extraction at 65 and 35 °C, respectively were used to test the second-order polynomial model.

#### 2.3.3. ANN model

A back-propagation multilayer ANN was developed in MATLAB 7.1 (Demo version) package. The ANN model was performed using Levenberg–Marquardt (LM) algorithm [46] and a set of input–output data to correlate the resinoid yield with the extraction operating variables. The performance of the ANN was evaluated using MSE. The selected ANN had three layers of neurons: an input layer, a hidden layer and an output layer, as can be seen in Fig. 1. The number of the input layer neurons was 2, which constituted the input data vector of the proposed ANN. The output layer had one neuron, and it was the resinoid yield. The number of hidden neurons was determined by a heuristic procedure consisted of testing a different number of neurons until the MSE of the output data was minimized. The main characteristics of the ANN model are presented in Table 1.

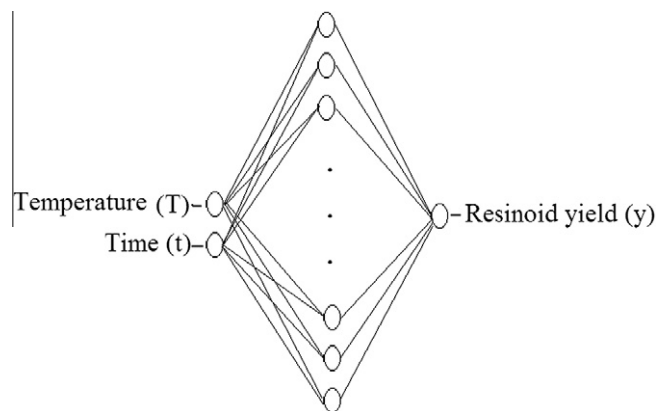


Fig. 1. Multilayer ANN.

**Table 1**  
The training parameters of ANN model.

Property	Value/comment
Algorithm	Levenberg–Marquardt back-propagation
Minimized	MSE
Learning	Supervised
Input layer	No transfer function is used
Hidden layer	Hyperbolic tangent transfer function
Output layer	Hyperbolic tangent transfer function
Number of date	50 <sup>a</sup> 48 <sup>b</sup>
Number of training iterations	23 <sup>a</sup> 15 <sup>b</sup>
Number of best iterations	17 <sup>a</sup> 9 <sup>b</sup>
Number of input neurons	2 <sup>c</sup>
Number of hidden neurons	1–20
Number of output neurons	1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Maceration.

<sup>b</sup> Ultrasound extraction.

<sup>c</sup> T – temperature, t – extraction time.

<sup>d</sup> Y – resinoid yield.

The use of the ANN with the LM comprised three phases based on a set of input and output data of the design of experiments with replication, which was divided into three subsets (training, testing and validation). In the first, training phase, about 70% of the data were randomly selected from the starting data set, and the weighted parameters of the connections were determined through a number of iterations necessary to achieve the minimal value of MSE between the calculated (by the ANN) and measured values of resinoid yield. During the second, testing phase, 15% of the total data were used to test the “trained” ANN. In this phase, the ANN used the weighted parameters determined during the first phase. The last phase is a validation of the network on the remaining data subset (15% of the total data). The validation phase presented the final prediction of resinoid yields by the ANN developed in the two previous phases, using a new data subset.

The values of resinoid yield obtained by maceration at 23, 50 and 80 °C and by ultrasound-assisted extraction at 23, 30 and 40 °C were used in developing the ANN model. Values of resinoid yield achieved by maceration and ultrasound-assisted extraction at 65 and 35 °C, respectively were used to test the developed ANN model.

### 2.3.4. Genetic algorithm – GA

The input space of the developed ANN model was optimized to search for the optimal operating conditions for extracting the resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw by using GA [29,30]. The input vector of the ANN model's independent variables became the decision variable for the GA, which performed the optimization through repeating a simple loop until convergence [29]. First, solution populations, called chromosomes, were initialized. Then, fitness was computed based on the objective function and the best chromosomes were selected. Finally, genetic propagation of the selected parent chromosomes was performed using genetic operators (crossover and mutation) to create the new population of chromosomes. The objective function used to maximize the resinoid yield in the ranges of extraction variables applied to the experiment is as follows:

$$\text{Maximize } y = f(T, t) \quad (9)$$

where  $y$  is the resinoid yield (ANN values),  $T$  is the extraction temperature, and  $t$  is the extraction time. This process was carried out until a suitable result was achieved, ensuring the minimum mean fitness square error (MFSE), whereas the best string obtained was the solution to Eq. (9). The MFSE was defined as follows [31]:

$$MFSE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f_i - f_m)^2 \quad (10)$$

where  $N$  is the number of population strings, and  $f_i$  and  $f_m$  are individual and mean fitness values of  $N$  population strings, respectively.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Kinetic modeling of extraction

#### 3.1.1. Kinetics of maceration and ultrasound-assisted extraction

Fig. 2 illustrates the variation of the resinoid yield with the progress of the extraction of the aerial parts of white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.) by the aqueous ethanol solution at different temperatures in the absence and the presence of ultrasound. The resinoid yield increased with extraction time and the extraction temperature independently of the extraction technique applied. It was also obvious that the resinoid yield of the ultrasound-assisted extraction was higher than that of the maceration at lower temperatures and in much shorter time. As in previous studies [8], ultrasound promoted the resinoid extraction, enhancing both the overall process rate and the resinoid yield, which could be attributed to the well-known positive effects of cavitation bubble collapses [1–3]. The increase of resinoid yield with increasing the temperature was attributed to the enhanced solubilities of extractable substances.

The mechanism of resinoid extraction consisted of fast washing and slow diffusion was also proven. The suspension contained both particles with part of the extractable substances deposited on their surface and particles with uniformly distributed extractable substances. The extractable substances within the cells with broken walls, located at plant particle surfaces, were rapidly extracted in the initial stage, while the extractable substances from intact cells diffused slowly to the particle surface. This observance was important for subsequent modeling the extraction kinetics. It seemed that the extraction temperature increased the initial extraction (washing) rate both in the absence and the presence of ultrasound.

#### 3.1.2. Phenomenological model

Values of parameters of Eq. (4) for two extraction techniques applied are presented in Table 2. All models were statistically significant at the level of  $p < 0.0001$ . Fig. 2 shows that the model equations (Eq. (4)) fitted the experimental data very well. This was also indicated by the  $R^2$ -values close to unity (Table 2).

The predicted and experimental values of the resinoid yield at saturation,  $y_\infty$ , agreed very well to each other ( $MRPD = \pm 1.9\%$ ). The resinoid yield at saturation increased with increasing the extraction temperature, independently of the extraction technique applied, due to increasing the solubility of extractable substances. It is higher for the ultrasound-assisted extraction than for the maceration at lower bulk temperatures due to a high local temperature generated by the collapses of cavitation bubbles.

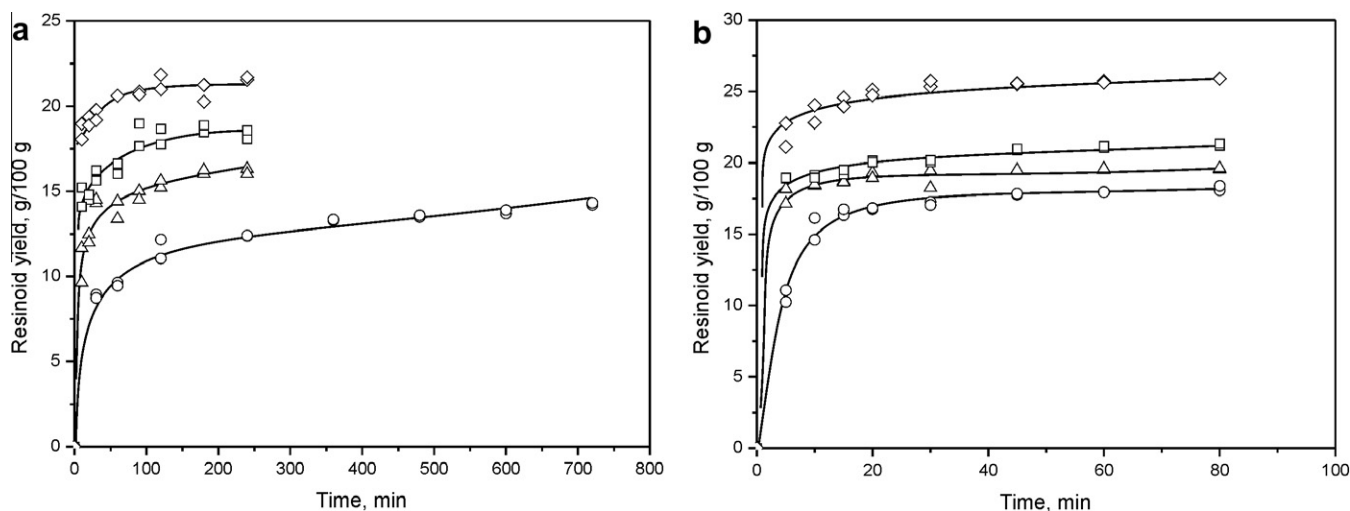
The fraction of extractable substances that were washable,  $f$ , increased with increasing the extraction temperature for the maceration ( $R^2 = 0.979$ ):

$$f = 3.46 \times 10^{-3}T + 0.544 \quad (11)$$

However, for the ultrasound-assisted extraction the fraction of extractable substances that were washable was independent of extraction temperature, i.e.:

$$f = 0.880 \pm 0.024 \quad (12)$$

Its values were higher for the ultrasound-assisted extraction at lower extraction temperatures than for those for the maceration, indicating the influence of ultrasound on the washing process.



**Fig. 2.** Kinetic of resinoid extraction from white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.) by the aqueous ethanol solution at different temperatures in (a) the absence (23 °C: ○, 50 °C: △, 65 °C: □ and 80 °C: ◇; model, Eq. (4): —) and (b) the presence of ultrasound (23 °C: ○, 30 °C: △, 35 °C: □ and 40 °C: ◇; model, Eq. (4): —).

The extractable substances contained within plant particles could be liberated because of disrupting walls of the cells, located at the external surfaces and deeper in the plant materials [47], and became more easily accessible for dissolution into the solvent.

As can be seen in Fig. 3a, the predicted and experimental values of the resinoid yield for both extraction techniques agreed very well to each other, as indicated by the MRPD value of  $\pm 3.3\%$ . The predicted values of resinoid yield were calculated by help of Eq. (4), using  $y_{\infty, cal}$  from Table 2,  $f$  calculated by Eq. (11) for maceration and  $f = 0.880$  for ultrasound extraction and rate constants,  $k_1$  and  $k_2$ , calculated by the Arrhenius equation (Eq. (5)) with parameters taken from Table 3.

The rate constants increased with increasing temperature according to the Arrhenius equation, as can be seen in Fig. 4. Values of the parameters of the Arrhenius equation are given in Table 3. All  $R^2$  values were proven to be significant at the level  $p < 0.001$  by statistical Student  $t$ -test. From the  $E_a$ -values, it was concluded that ultrasound affected the washing process but not the diffusion through the solid plant particles. The ultrasonic increase of extraction rate constant could be attributed not only to disruption of cell walls but also to mass transfer intensification and possible particle size reduction [47].

The developed kinetic model was judged with the data of the similar extraction systems taken from the literature [8]. For this purpose, the results of applying the developed model for describing the kinetics of ultrasound-assisted extraction of extractable substances from two other plant materials (garden sage and glutinous sage) using water and aqueous solution of ethanol (70%) are

presented in Table 4. The model equations were statistically significant at the level  $p < 0.0001$ . These results proved that the kinetic model was valid for different extraction systems.

Two simpler models, namely the pseudo-first order model and the model based on instantaneous washing followed by diffusion, described by Eq. (7) and (6), respectively were also analyzed for the purpose of comparison with the phenomenological model (Eq. (4)). The parameters of these simpler models are presented in Table 5. The pseudo-first order model had small  $R^2$ -values and relatively high MRPD-values, independently of the extraction technique and the extraction temperature. Therefore, this model was inadequate for describing the kinetics of extraction from aerial parts of white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.). The model based on instantaneous washing followed by diffusion had relatively high  $R^2$ -values and small MRPD-values, indicating that it could be useful for modeling the kinetics of the studied extraction process. However, values of  $R^2$  and MRPD for this model were higher than those for the phenomenological model for the same extraction techniques (Table 2). Thus, the phenomenological model better described the variation of resinoid yield with time than the simpler models and could be recommended for modeling the extraction kinetics.

### 3.1.3. Optimization of extraction

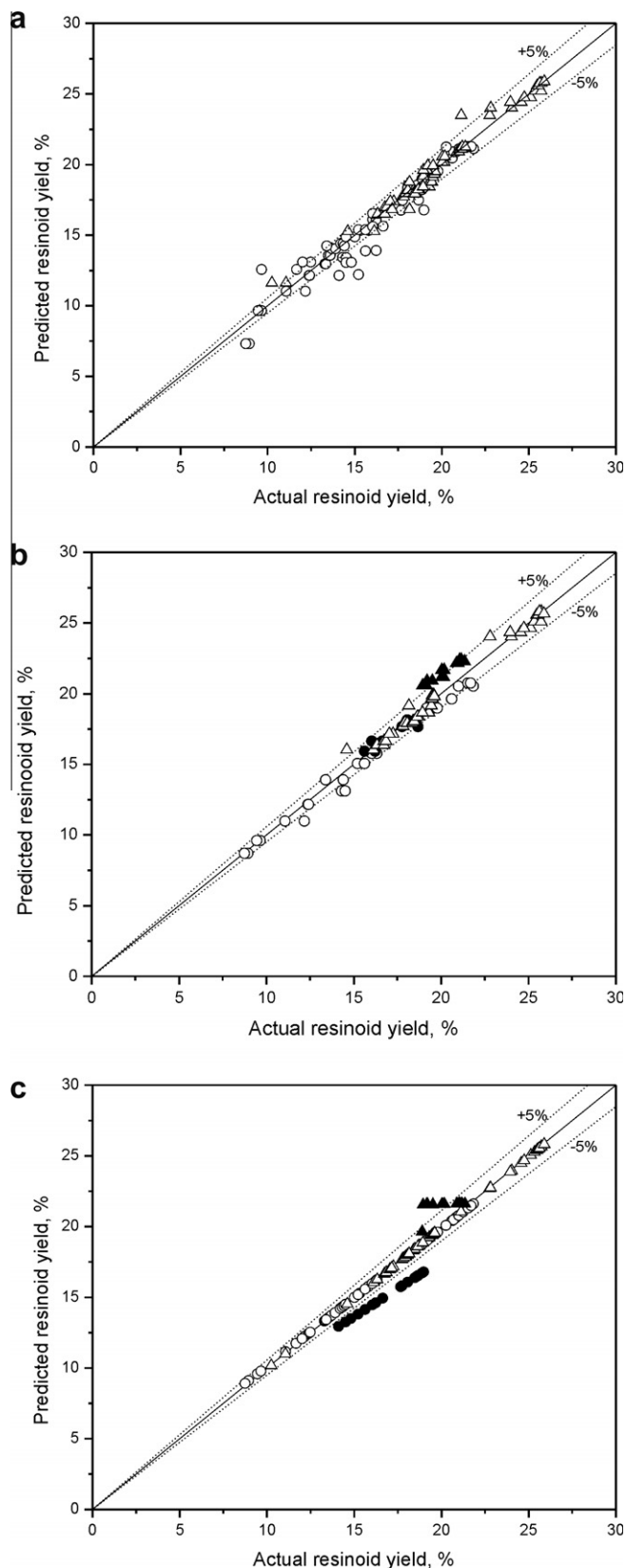
**3.1.3.1. Second-order polynomial equation.** The extraction operating variables affecting the resinoid yield in the maceration and the ultrasound-assisted extraction variables were screened out by the ANOVA. The main results are given in Tables 6 and 7,

**Table 2**

Parameters of phenomenological model for extraction of resinoid from lady's bedstraw (extracting solvent: aqueous solution of ethanol, 50% by vol.).

Extraction technique	Temperature (°C)	$Y_{\infty}$ (g/100 g)		$f$	$k_1 \times 10^1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2 \times 10^2$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$	MRPD (%)
		Cal.	Exp.					
Maceration	23	15.58 <sup>a</sup> ± 0.05	15.56 ± 0.24	0.623 ± 0.015	0.626 ± 0.005	0.230 ± 0.009	0.992 ± 0.003	±2.7
	50	17.28 ± 0.38	16.17 ± 0.15	0.725 ± 0.057	1.58 ± 0.05	0.695 ± 0.015	0.995 ± 0.001	±5.7
	65	18.67 ± 0.09	18.32 ± 0.26	0.750 ± 0.007	15.84 ± 0.11	1.585 ± 0.025	0.990 ± 0.001	±2.8
	80	21.30 ± 0.02	21.61 ± 0.08	0.830 ± 0.025	49.11 ± 0.11	2.505 ± 0.024	0.997 ± 0.002	±1.6
Ultrasound-assisted extraction	23	18.56 ± 0.20	18.22 ± 0.16	0.895 ± 0.015	2.13 ± 0.13	1.995 ± 0.055	0.997 ± 0.001	±1.8
	30	19.72 ± 0.01	19.57 ± 0.04	0.913 ± 0.018	6.69 ± 0.02	3.473 ± 0.093	0.998 ± 0.001	±1.1
	35	21.37 ± 0.07	21.26 ± 0.08	0.850 ± 0.004	12.33 ± 0.04	3.893 ± 0.021	0.999 ± 0.000	±0.8
	40	25.95 ± 0.21	25.89 ± 0.00	0.860 ± 0.004	18.31 ± 0.06	4.415 ± 0.075	0.995 ± 0.003	±1.7

<sup>a</sup> Value of a parameter ± standard deviation.



**Fig. 3.** Comparison of predicted and experimental values of resinoid yield: (a) phenomenological model; (b) second-order polynomial model and (c) ANN model (values of resinoid yield predicted by the developed models: open symbols; values of resinoid yield obtained at 35 and 65 °C by maceration and ultrasound-assisted extraction, respectively which were used for testing the developed models: black symbols; maceration – ○; and ultrasound-assisted extraction – △).

**Table 3**  
Parameters of Arrhenius equation.

Extraction technique		$A$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$E_a$ (KJ/mol)	$R^2$
Maceration	$k_1$	$3.79 \times 10^{10}$	67.8	0.897*
	$k_2$	$7.84 \times 10^3$	37.1	0.992*
Ultrasound-assisted maceration	$k_1$	$5.89 \times 10^{16}$	98.6	0.980*
	$k_2$	$4.02 \times 10^4$	35.5	0.909*

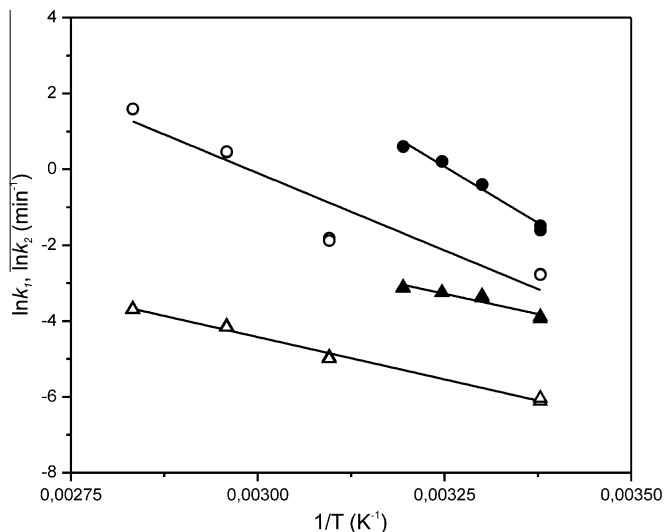
\*  $p < 0.001$ .

respectively. The results of the ANOVA were valid since no problem with the normality of the experimental data was observed. The values of the Cook's distance were small enough, implying that there was no outlier value in the experimental data sets. The statistical significance of the models, the operating variables and their interaction for the resinoid yield were assessed from their  $F$ -values and  $p$ -values. The  $p$ -value less than 0.05 would indicate significant operating variables and their interaction. The  $F_{model}$ - and  $p$ -values for both fitted models indicated that they were statistically significant. Since there was no significance in the lack of fit ( $p > 0.05$ ) in the two models, they could be used to predict the resinoid yield. For both extraction techniques applied, the  $p$ -values of both operating variables and their squares were less than 0.05, implying that they were statistically significant at the 95% confidence level, while their interaction had no statistical significance. The extraction temperature is more important than the extraction time, independently of the extraction technique.

The results obtained in the present study agree generally with previously published observations on the effects of extraction operating variables on extract yields from different plant materials achieved in the absence and the presence of ultrasound. Only several examples are presented here such as the maceration extraction of resinoid from St. John's wort (*H. perforatum* L.) [12] and bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) [11], as well as the ultrasound-assisted extraction of seed oil from *Isatis indigotica* Fort [13] and flavonoids compounds from hawthorn seed [14]. The resinoid yield increases with increasing the extraction temperature and the solid-to-solvent ratio as well as with decreasing the concentration of ethanol solution and the mean plant particle size [12]. The major variables influencing the yield of bioactive compounds from defatted marigold were extraction temperature and ethanol concentration [11]. The extraction temperature plays also the most important role for recovering seed oil from *I. indigotica* Fort [13]. Among the extraction operating variables, ultrasonic time, ethanol concentration and extraction temperature were identified as the most significant variables influencing the flavonoids compounds yield from hawthorn seeds [14].

The experimental data on resinoid yield were analyzed by the multiple nonlinear regression model based on the actual levels of the operating variables, whereas the second-order polynomial equation, Eq. (8), was used to fit the resinoid yield data. Values of the coefficients of Eq. (8) for the two extraction techniques are given in Table 8. The values of  $R$  and  $R$ -adj close to unity proved a good fit by the second-order polynomial equation for both the maceration and the ultrasound-assisted extraction. This was also confirmed by the small values of MRPD of  $\pm 3.5\%$  and  $\pm 1.5\%$  for the equations corresponded to the maceration and the ultrasound-extraction, respectively (Fig. 3b). The values of  $Adeq.Precision$ , which measure the signal to noise ratio, are much greater than 4, so the two models can be used to navigate the design space.

The second-order polynomial model was tested by using the values of resinoid yield achieved by maceration and ultrasound-assisted extraction at 65 and 35 °C, respectively. Since the MRPD was  $\pm 3.8\%$  and  $\pm 6.6\%$  for maceration and ultrasound-assisted



**Fig. 4.** Dependence of  $\ln k_1$  and  $\ln k_2$  on  $1/T$  (maceration: open symbols; ultrasound extraction: black symbols; washing –  $\circ$ ; and diffusion –  $\Delta$ ).

**Table 4**  
Ultrasound-assisted extraction of resinoid from garden and glutinous sage at 40 °C.<sup>a</sup>

Plant	Solvent	$y_\infty$ (g/ 100 g)	$f$	$k_1$ $\times 10^1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_2$ $\times 10^2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	MRPD (%)
Garden sage ( <i>S. officinalis</i> L.)	Ethanol (70%)	11.9	0.629	5.07	1.82	0.998	$\pm 1.5$
	Water	22.0	0.570	4.35	1.08	0.999	$\pm 1.4$
Glutinous sage ( <i>S. glutinosa</i> L.)	Ethanol (70%)	10.6	0.523	4.65	2.39	1.000	$\pm 0.5$
	Water	18.30	0.629	6.03	2.68	1.000	$\pm 1.9$

<sup>a</sup> From Veličković et al. [8].

extraction, respectively the generalization ability of the regression model was proven in the applied ranges of extraction temperature.

The maximum predicted values of the resinoid yield were found through the optimization (desired target: maximum). For the maceration, the maximum predicted resinoid yield was 21.7 g/100 g and corresponded to the extraction temperature of 80 °C and the extraction time from 192 to 208 min. From the techno-economical point of view, these extraction conditions are with no practical importance, especially when their performance is compared to that of the ultrasound-assisted extraction. The highest predicted resinoid yield for the ultrasound-assisted extraction was 25.8 g/100 g, which was achieved at 40 °C in between 56 and 64 min. This value agreed with the resinoid yield obtained at 40 °C in 60 min (25.7 g/100 g), verifying the developed model.

**Table 5**

Parameters of pseudo-first order model and model based on instantaneous washing followed by diffusion for extraction of resinoid from lady's bedstraw (extracting solvent: aqueous solution of ethanol, 50% by vol.).

Extraction technique	Temperature (°C)	Pseudo-first order model			Model based on instantaneous washing followed by diffusion			
		$k_2 \times 10^2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	MRPD, %	$f$	$k_2 \times 10^2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	MRPD, %
Maceration	23	0.357	0.482	$\pm 28.43$	0.613	0.223	0.969	$\pm 4.0$
	50	2.499	0.572	$\pm 21.18$	0.830	1.18	0.784	$\pm 7.4$
	65	2.470	0.122	$\pm 24.57$	0.794	1.26	0.891	$\pm 3.6$
	80	2.596	0.245	$\pm 24.72$	0.805	1.66	0.827	$\pm 2.0$
Ultrasound-assisted extraction	23	7.70	0.573	$\pm 15.90$	0.811	4.17	0.956	$\pm 6.7$
	30	10.96	0.152	$\pm 13.91$	0.917	5.37	0.759	$\pm 1.4$
	35	8.88	0.405	$\pm 15.99$	0.818	5.21	0.952	$\pm 1.0$
	40	10.42	0.179	$\pm 13.67$	0.883	5.31	0.752	$\pm 1.8$

**Table 6**  
Results of ANOVA: maceration.

Source <sup>a</sup>	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value Prob > F
Model	443.31	5	88.66	359.33	<0.0001
A–A <sup>a</sup>	370.81	1	370.81	1502.81	<0.0001
B–B	23.46	1	23.46	95.08	<0.0001
AB	1.66	1	1.66	6.71	0.0185
A <sup>2</sup>	1.07	1	1.07	4.32	0.0523
B <sup>2</sup>	2.58	1	2.58	10.47	0.0046
Residual	4.44	18	0.25		
Lack of fit	2.56	6	0.43	2.73	0.0653
Pure error	1.88	12	0.16		
Cor total	447.76	23			

<sup>a</sup> A – extraction temperature; B – extraction time.

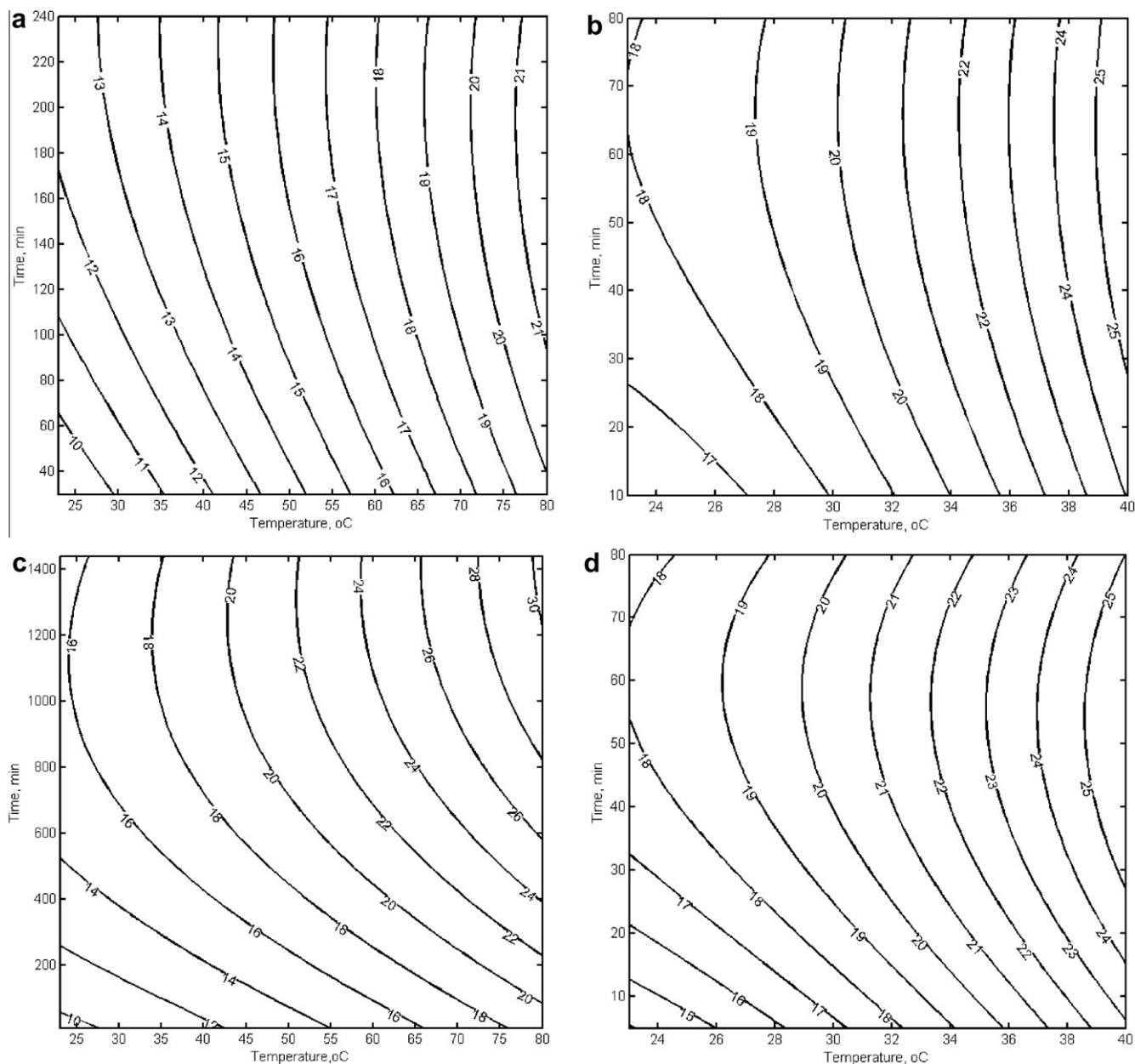
**Table 7**  
Results of ANOVA: Ultrasound-assisted extraction.

Source <sup>a</sup>	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value Prob > F
Model	495.26	5	99.05	468.94	<0.0001
A–A	415.94	1	415.94	1969.19	<0.0001
B–B	18.18	1	18.18	86.05	<0.0001
AB	0.059	1	0.059	0.28	0.6000
A <sup>2</sup>	15.17	1	15.17	71.80	<0.0001
B <sup>2</sup>	3.17	1	3.17	15.01	0.0004
Residual	7.60	36	0.21		
Lack of fit	4.29	15	0.29	1.81	0.1034
Pure error	3.32	21	0.16		
Cor total	502.87	41			

<sup>a</sup> A – extraction temperature; B – extraction time.

**Table 8**  
Coefficients of actual extraction operating variables.

Operating variables	Coefficient	
	Maceration	Ultrasound-assisted extraction
Intercept	4.47	21.22
A	$1.37 \times 10^{-1}$	$-6.79 \times 10^{-1}$
B	$3.96 \times 10^{-2}$	$8.57 \times 10^{-2}$
AB	$-1.40 \times 10^{-4}$	$-2.25 \times 10^{-4}$
A <sup>2</sup>	$5.52 \times 10^{-4}$	$1.83 \times 10^{-2}$
B <sup>2</sup>	$-7.40 \times 10^{-5}$	$-5.95 \times 10^{-4}$
R	0.990	0.985
R-adj	0.987	0.983
C.V.%	3.22	2.25
Adeq.Precision	50.8	56.2
MRPD (%)	$\pm 3.5$	$\pm 1.5$



**Fig. 5.** Contour plots based on the second-order polynomial equation for resinoid yield as a function of the extraction temperature and the extraction time for the maceration (a and c) and the ultrasound-assisted extraction (b and d) based on the RSM (a and b) and ANN (c and d) model.

The contour plots for resinoid yield as a function of the extraction temperature and the extraction time are presented in Fig. 5a and b for the maceration and the ultrasound-assisted extraction, respectively. Their shape confirmed the weak interaction between the two operating variables.

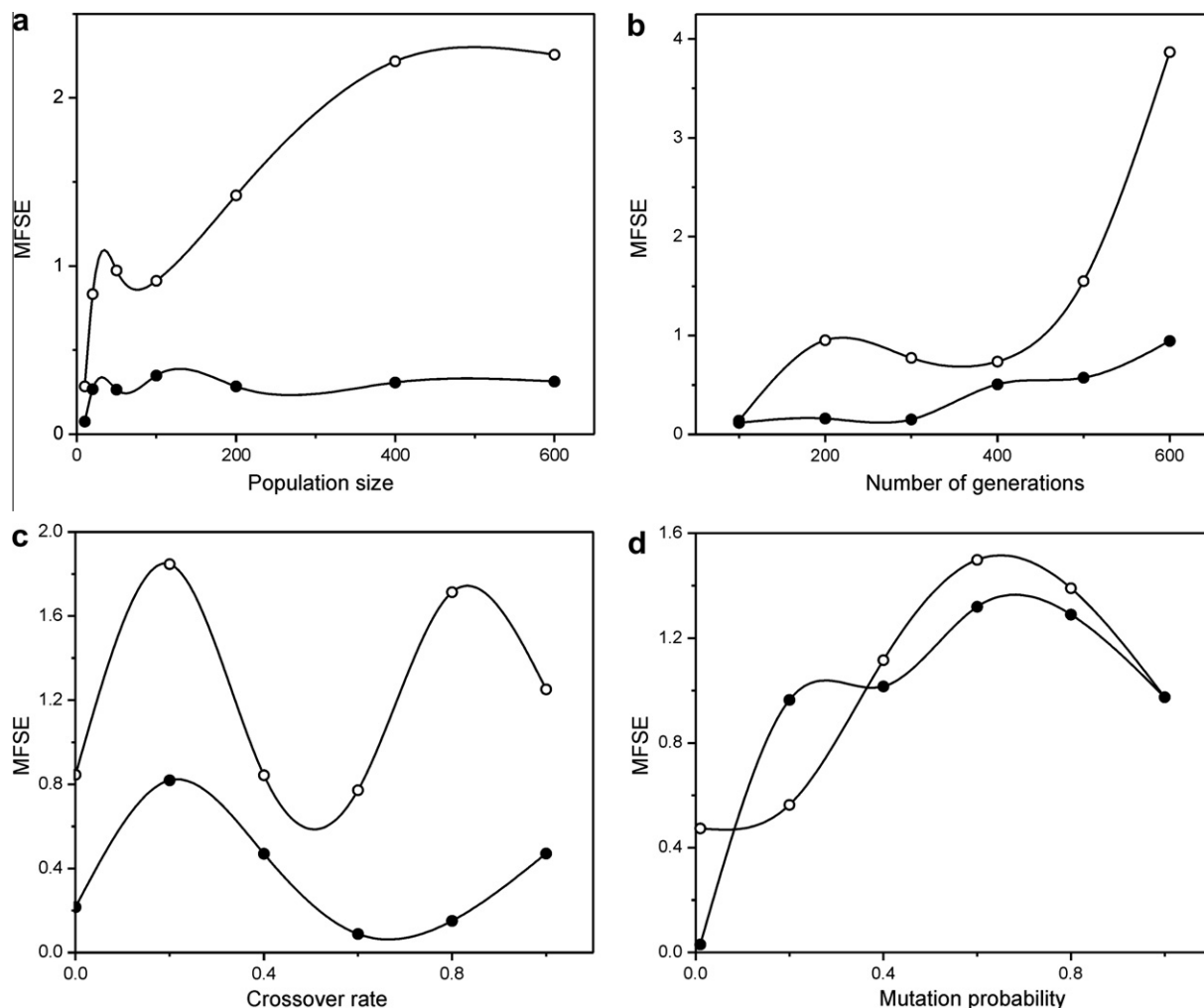
### 3.1.4. ANN modeling

**3.1.4.1. Development of ANN model.** The resinoids yield was predicted by the ANN with the LM algorithm consisted of one output and two input layer neurons (Fig. 1). The optimum number of hidden neurons was found to be 10 when the lowest values of MSE for training, testing and validation were determined (for maceration: 0.43, 0.19 and 0.27, respectively; and for ultrasound extraction: 0.18, 0.24 and 0.17, respectively). It was observed that the MSE value decreased quickly with increasing the number of epochs. The best validation performances were determined to be 0.19 at epoch

17 and 0.24 at epoch 7 for maceration and ultrasound-assisted extraction, respectively.

**3.1.4.2. Prediction of resinoid yield.** The ANN with the 2-10-1 topology was found to have the highest *R*-values for both maceration (0.987) and ultrasound-assisted extraction (0.993). Fig. 3c compares the predicted and experimental values of the resinoid yield for maceration and ultrasound-assisted extraction of the developed ANN with the 2-10-1 topology. An excellent agreement between the predicted and experimental values of the resinoid yield was observed as the MRPD values for maceration and ultrasound-assisted extraction were only  $\pm 0.6\%$  and  $\pm 0.4\%$ , respectively. Fig. 5c and d present the contour plots for the resinoid yield estimated by the ANN as a function of the extraction temperature and the extraction time for the maceration and the ultrasound-assisted extraction, respectively. One can easily observe that the contour plots for maceration and ultrasound-assisted extraction





**Fig. 6.** Variation of MFSE with (a) population size (number of generations of 100, crossover rate of 0.8 and mutation probability of 0.01), (b) number of generations (population size of 10, crossover rate of 0.8 and mutation probability of 0.01), (c) crossover rate (population size of 10, generations of 100 and mutation probability of 0.01) and (d) mutation probability (population size of 10, generations of 100 and crossover rate of 0.6); (maceration: open symbols; ultrasound extraction: black symbols).

obtained by the ANN model are very similar to those obtained by RSM model.

The developed ANN model was tested by using the values of resinoid yield achieved by maceration and ultrasound-assisted extraction at 65 and 35 °C, respectively. The generalization ability of the ANN model was demonstrated in the ranges of extraction temperature applied since the MRPD was  $\pm 10.2\%$  and  $\pm 6.9\%$  for maceration and ultrasound-assisted extraction.

**3.1.4.3. Optimization by ANN-GA.** Before executing the developed GA coupled with ANN for optimizing, the GA parameters were optimized by the sensitivity analysis [31]. The variations of the MFSE with the GA parameters such as population size, number of generations, crossover rate and mutation probability, are shown in Fig. 6. Each parameter was varied at a time while keeping the others constant, followed by evaluating the fitness of end population at each time. For instance, 51 runs were carried out for each population size (10–600) while the other three GA parameters were kept constant at the default values (number of generations, crossover rate and mutation probability were 100, 0.8 and 0.01, respectively). The minimum MFSE-values corresponded to population size, number of generations, crossover rate and mutation probability were 10, 100, 0.6 and 0.01, respectively.

The maximum predicted values of the resinoid yield were found through the optimization by the ANN-GA model. Within the ranges of the extraction variables applied in developing the model for the maceration, the highest resinoid yield of 22.0 g/100 g corresponded to the extraction temperature of 80 °C and the extraction time of 240 min and agreed well with the actual resinoid yield (21.7 g/100 g) obtained under the same extraction conditions. For the ultrasound-assisted extraction, the highest predicted resinoid yield was 25.1 g/100 g, which was achieved at 40 °C in 30 min. This value agreed with the resinoid yield obtained at 40 °C in 30 min (25.3 g/100 g), verifying the developed model.

#### 4. Conclusion

This study indicated that ultrasound-assisted extraction was effective for extracting the resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.) and gave better resinoid yields at lower extraction temperature and in much shorter time than the maceration. Using a phenomenological model, developed for modeling the kinetics of the extraction process, it was demonstrated that ultrasound influenced washing but not diffusion of extractable substances. Because of its generalization ability, this kinetic model should not be ignored in the future modeling of the kinetics of extraction from plant materials. Both the second-order polynomial

equation and an ANN-GA combination were effective and reliable in determining the optimum extraction conditions for both extraction techniques employed, but the latter was more accurate than the former. Thus, the ANN technique deserves greater attention for the future optimization of extraction processes. Finally, the result of this study can be useful for the development of industrial extraction processes for recovering the total extract from white lady's bedstraw (*G. mollugo* L.), which has been proven to contain bioactive compounds having antioxidative and antimicrobial activities. The techno-economical analysis should be performed to prove the advantage of the ultrasound-assisted extraction over the maceration, which was demonstrated by higher resinoid yield in a shorter time.

## References

- [1] L. Paniwnyk, E. Beaufoy, J.P. Lorimer, T.J. Mason, The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 299–301.
- [2] M. Vinatoru, M. Toma, O. Radu, P.I. Filip, D. Lazarca, T.J. Mason, The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials, *Ultrason. Sonochem.* 4 (1997) 135–139.
- [3] M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T.J. Mason, Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 137–142.
- [4] V.D. Ponomaryov, Medicinal Herbs Extraction, *Medicina*, Moscow, 1976 (in Russian).
- [5] V.B. Veljković, D.M. Milenović, Extraction of resinoids from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). II. Modeling of extraction kinetics, *Hem. Ind.* 56 (2002) 60–67.
- [6] M.Z. Stanković, M.D. Cakić, D.M. Cvetković, V.B. Veljković, Kinetics of resinoids from overground parts of sweet clover (*Meilotos officinalis* L.), *J. Serb. Chem. Soc.* 59 (1994) 735–741.
- [7] I. Stanisavljević, S. Lakićević, D. Veličković, M. Lazić, V. Veljković, The extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 13 (2007) 41–50.
- [8] D.T. Veličković, D.M. Milenović, M.S. Ristić, V.B. Veljković, Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 150–156.
- [9] S. Kitanović, D. Milenović, V.B. Veljković, Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), *Biochem. Eng. J.* 41 (2008) 1–11.
- [10] D. Bas, I.H. Boyaci, Modeling and optimization. I. Usability of response surface methodology, *J. Food Eng.* 78 (2007) 836–845.
- [11] Y. Gong, Z. Hou, Y. Gao, Y. Xue, X. Liu, G. Liu, Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology, *Food Bioprod. Proces.* 90 (2012) 9–16.
- [12] D. Milenović, V.B. Veljković, B. Todorović, M. Stanković, Extraction of resinoids from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). I. Efficiency and optimization of extraction, *Hem. Ind.* 56 (2002) 54–59.
- [13] T. Li, X.-Y. Qu, Q.-A. Zhang, Z.-Z. Wang, Ultrasound-assisted extraction and profile characteristics of seed oil from *Isatis indigotica* Fort, *Ind. Crops Prod.* 35 (2012) 98–104.
- [14] G. Pan, G. Yu, C. Zhu, J. Qiao, Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS), *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 486–490.
- [15] A. Zhu, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Ottelia Acuminata* (Gagnep.) Dandy using RSM, *Adv. Mater. Res.* 396–398 (2012) 292–296.
- [16] H.-K. Kim, J.-R. Do, T.-S. Lim, K. Akram, S.-R. Yoon, J.-H. Kwon, Optimization of microwave-assisted extraction for functional properties of *Vitis coignetiae* extract by response surface methodology, *J. Sci. Food Agric.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5546>.
- [17] H. Li, Z. Deng, T. Wu, R. Liu, S. Loewen, R. Tsao, Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes, *Food Chem.* 130 (2012) 928–936.
- [18] H. Wang, Y. Liu, S. Wei, Z. Yan, Application of response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn, *Food Chem.* 132 (2012) 582–587.
- [19] M. Fullana, F. Trabelsi, F. Recasens, Use of neural net computing for statistical and kinetic modelling and simulation of supercritical fluid extractors, *Chem. Eng. Sci.* 55 (2000) 79–95.
- [20] M. Izadifar, F. Abdolahi, Comparison between neural network and mathematical modeling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of black pepper essential oil, *J. Supercrit. Fluid.* 38 (2006) 37–43.
- [21] P. Mitra, P.C. Barman, K.S. Chang, Coumarin extraction from *Cuscuta reflexa* using supercritical fluid carbon dioxide and development of an artificial neural network model to predict the coumarin yield, *Food Bioprocess Technol.* 4 (2011) 737–744.
- [22] A. Moghadassi, S.M. Hosseini, F. Parvizian, I. Al-Hajri, M. Talebbeigi, Predicting the supercritical carbon dioxide extraction of *Oregano bract* essential oil, *Songklanakaraj. J. Sci. Technol.* 33 (2011) 531–538.
- [23] A. Shokria, T. Hatamib, M. Khamforoush, Near critical carbon dioxide extraction of Anise (*Pimpinella anisum* L.) seed: mathematical and artificial neural network modeling, *J. Supercrit. Fluid.* 58 (2011) 49–57.
- [24] J.-Z. Yin, Q.-Q. Xu, W. Wei, A.-Q. Wang, Experiments and numerical simulations of supercritical fluid extraction for *Hippophae rhamnoides* L. seed oil based on artificial neural networks, *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (2005) 7420–7427.
- [25] G. Zahedi, A. Azarpour, Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora seed oil*, *J. Supercrit. Fluid.* 58 (2011) 40–48.
- [26] P.S. Milić, D.M. Bekrić, S.M. Milić, K.M. Rajković, A study of the extraction kinetics of the minerals from the white Lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.) by using an artificial neural network, *Hem. Ind.* 65 (2011) 313–321.
- [27] A. Alupului, V. Lavric, Ultrasound extraction of active principles with hypoglycaemic activity from medicinal plants, *Chem. Eng. Transact.* 14 (2008) 83–90.
- [28] F. Pouralinzara, M.A.C. Yunusa, G. Zahed, Pressurized liquid extraction of *Orthosiphon stamineus* oil: experimental and modeling studies, *J. Supercrit. Fluid.* 62 (2012) 88–95.
- [29] K.M. Desai, S.A. Survase, P.S. Saudagar, S.S. Lele, R.S. Singhal, Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: case study of fermentative production of scleroglucan, *Biochem. Eng. J.* 41 (2008) 266–273.
- [30] N. Marchitana, C. Cojocarub, A. Mereutaa, Gh. Ducac, I. Cretescud, M. Gonta, Modeling and optimization of tartaric acid reactive extraction from aqueous solutions: a comparison between response surface methodology and artificial neural network, *Sep. Purif. Technol.* 75 (2010) 273–285.
- [31] M. Rajendra, P.C. Jena, H. Raheman, Prediction of optimized pretreatment process parameters for biodiesel production using ANN and GA, *Fuel* 88 (2009) 868–875.
- [32] N.G. Bisset, M. Wichtl, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2001.
- [33] D.V. Banthorpe, J.J. White, Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*, *Phytochemistry* 38 (1995) 107–111.
- [34] T.V. Ilina, A.M. Kovaleva, O.V. Goryachaya, Essential oil from *Galium verum* flowers, *Chem. Nat. Compd.* 45 (2009) 587–588.
- [35] N.S. Lakić, N.M. Mimica-Dukić, J.M. Isak, B.N. Božin, Antioxidant properties of *Galium verum* L. (*Rubiaceae*) extracts, *Cent. Eur. J. Biol.* 5 (2010) 331–337.
- [36] A. Shafaghat, F. Salimi, N. Aslaniyan, Z. Shoaei, Flavonoids and an ester derivative isolated from *Galium verum* L., *World Appl. Sci. J.* 11 (2010) 473–477.
- [37] M. Tamas, D. Stana, S. Timis, Comparative phytochemical research of *Galium verum* G. *mollugo* L., *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 34 (2006) 18–20.
- [38] P. Bolivar, C. Cruz-Paredes, L.R. Hernández, Z.N. Juárez, E. Sánchez-Arreola, Y. Av-Gay, H. Bach, Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 141–147.
- [39] L.O. Demirezer, F. Gurbuz, Z. Guvenalp, K. Stroch, A. Zecek, Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*, *Turk. J. Chem.* 30 (2006) 525–534.
- [40] S. De Rosa, C. Iodice, M. Mitova, N. Handjieva, S. Popov, M. Anchev, Triterpene saponins and iridoid glucosides from *Galium rivale*, *Phytochemistry* 54 (2000) 751–756.
- [41] Z. Guvenalp, N. Kilic, C. Kazaz, Y. Kaya, L.O. Demirezer, Chemical Constituents of *Galium tortumense*, *Turk. J. Chem.* 30 (2006) 515–523.
- [42] D. Delormant, I. Calis, F. Ergun, Iridoids from *Galium aparine*, *Pharm. Biol.* 39 (2001) 234–235.
- [43] L. Rafaël, S. Héron, W. Nowik, A. Tchaplá, Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes, *Dyes Pigments* 77 (2008) 191–203.
- [44] T. Kimura, T. Sakamoto, J.-M. Leveque, H. Sohmiya, M. Fujita, S. Ikeda, T. Ando, Standardization of ultrasonic power for sonochemical reaction, *Ultrason. Sonochem.* 3 (1996) 157–161.
- [45] H. Sovova, S.A. Aleksovski, Mathematical model for hydrodistillation of essential oils, *Flavour Fragr. J.* 21 (2006) 881–889.
- [46] P.S. Milić, K.M. Rajković, P.M. Milićević, S.M. Milić, T.P. Brdarić, V.M. Pavelkić, Comparison, artificial neural network modeling and genetic algorithm optimization of the resinoid and potassium yields from white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.) by conventional, reflux and ultrasound-assisted aqueous-ethanolic extraction, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* (2012), <http://dx.doi.org/10.2298/CICEQ120316049M>.
- [47] M. Vinatoru, M. Toma, T.J. Mason, Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents, *Adv. Sonochem.* 5 (1999) 209–247.