



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLINIČKA MEDICINA

**ANALIZA KOMINE GROŽĐA I DIJETETSKIH
SUPLEMENATA NA BAZI GROŽĐA I JAPANSKOG
TROSKOTA I ISPITIVANJE UTICAJA SUPLEMENTACIJE
KOD EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori: Prof. dr Jelena Cvejić Hogervorst

Kandidat: Veljko Čučuz

Prof. dr Ljilja Torović

Novi Sad, 2019. godine

Zahvaljujem se mojim mentorima prof. dr Jeleni Cvejić Hogervorst i prof. dr Ljilji Torović na svemu naučenom tokom izrade ove doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandru Raškoviću na podršci i ukazanom poverenju. Zahvaljujem se na saradnji i stručnim savetima prof. dr Ljiljani Gojković-Bukarici, doc. dr Miri Mikulić, doc. dr. Milici Atanacković-Krstonošić, dr Ani Tomas, prof. dr Nebojši Stilinoviću i dr Jeleni Ačevskoj. Na omogućavanju praktične izrade ovog rada zahvalnost dugujem projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (broj TR31020) čiji sam bio stipendista. Na pomoći oko eksperimentalnog rada veliko hvala Slavenu Šuputu, Mari Katić, Dragici Marić i Katarini Kocki.

Zahvaljujem se mojoj porodici i prijateljima na podršci, strpljenju i razumevanju.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Veljko Čučuz
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Jelena Cvejić Hogervorst, redovni profesor Dr Ljilja Torović, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Analiza komine grožđa i dijetetskih suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota i ispitivanje uticaja suplementacije kod eksperimentalnih životinja
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija

Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 7 / stranica 132 / slika 8 / grafikona 11 / tabela 20 / shema 3 / referenci 222 / priloga -
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Instrumentalna farmaceutska analiza; Farmakologija; Bromatologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	fenoli; resveratrol; dijetetski suplementi; grožđe; biljni ekstrakti; tečna hromatografija pod visokim pritiskom; dijabetes mellitus tip 2; hiperlipidemije; pacovi; eksperimenti na životinjama Ne MeSH: komina grožđa
UDK	547.56:663.26]:543.544.5 615.322.07:612.085
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Doktorsku disertaciju čine tri celine kojima je zajednički element ispitivanje fenola, u pogledu njihovog sadržaja i dostupnosti u dijetetskim suplementima na bazi grožđa i japanskog troskota, ispitivanja uticaja suplementacije kod eksperimentalnih životinja, odnosno mogućnosti ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz komine grožđa.

	<p>Osnovni ciljevi prvog dela bili su ispitivanje bezbednosti i kvaliteta 14 suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota u pogledu ujednačenosti mase, sadržaja i brzine rastvorljivosti. U drugom delu je radi provere terapijske delotvornosti suplementa koji sadrži čist resveratrol ispitan njegov uticaj na glikemiju i lipidni status eksperimentalnih životinja. Treći deo je obuhvatio analizu pet različitih komina grožđa i razvoj metode ekstrakcije fenola iz odabrane komine kako bi se dobili ekstrakti sa što je moguće većim prinosom, koristeći rastvarače koji su bezbedni po ljudsko zdravlje.</p> <p>Rezultati su pokazali da dva od četrnaest suplemenata nisu ispunila zahteve farmakopeje za lekove u pogledu ujednačenosti mase i sadržaja aktivne komponente, dok ni jedan suplement nije ispunio zahteve u pogledu brzine rastvorljivosti aktivne supstance, zbog čega se postavlja pitanje delotvornosti ispitanih suplemenata. Ni kod jednog suplementa nisu kvantifikovani ostaci pesticida ni toksični metali, čime je potvrđena njihova bezbednost. Farmakodinamska ispitivanja na pacovima pokazala su antioksidantna, anti-dijabetska i hipolipidemijska svojstva dijetetskog suplementa na bazi resveratrola, čime je potvrđena njegova delotvornost. Za potvrdu delotvornosti suplementa na ljudima neophodno je sprovesti dobro dizajnirano kliničko ispitivanje na dovoljnom broju ispitanika. Analiza pet različitih komina grožđa pokazala je da ovaj nusprodukt proizvodnje vina sadrži različite fenole, od kojih je samo katehin bio prisutan u značajnoj količini. Kvalitativan i kvantitativan sastav komine značajno varira zavisno od sorte i berbe grožđa, kao i od primenjenog tehnološkog procesa proizvodnje vina. Imajući u vidu sveobuhvatne kriterijume u pogledu efikasnosti ekstrakcije, zaključeno je da su 55% etanol, odnos uzorak / rastvarač 1:40, pH 4,5, T 55°C i vreme od 30 min optimalni eksperimentalni uslovi za ekstrakciju fenola iz komine grožđa. U zavisnosti od osnovnog cilja procesa ekstrakcije ovi parametri se mogu lako modifikovati. Višestruke su mogućnosti za iskorišćenje komine grožđa, a jedan od njih bi mogla biti i da se koristi kao sirovina za izradu dijetetskih suplemenata.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata:</p> <p>DP</p>	<p>08.09.2016.</p>

Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: Prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu član: Prof. dr Aleksandar Rašković, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član: Doc. dr Milica Atanacković-Krstonošić, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član: Prof. dr Jelena Cvejić Hogervorst, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član: Prof. dr Ljilja Torović, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

University of Novi Sad

Faculty of Medicine

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Veljko Čučuz
Mentor: MN	Jelena Cvejić Hogervorst, full professor Ljilja Torović, associate professor
Title: TI	Analysis of grape pomace and dietary supplements based on grapes and <i>Polygonum cuspidatum</i> and examination of the effect of supplementation in experimental animals
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia

Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2019.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters 7 / pages 132 / pictures 8 / graphs 11 / tables 20 / schemes 3 / references 222 / appendix -
Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Instrumental pharmaceutical analysis; Pharmacology; Bromatology
Subject, Key words SKW	Phenols; Resveratrol; Dietary Supplements; Vitis; Plant Extracts; Chromatography, High Pressure Liquid; Diabetes Mellitus, Type 2; Hyperlipidemias; Rats; Animal Experimentation Non MeSH: Grape Pomace
UC	547.56:663.26]:543.544.5 615.322.07:612.085
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	The dissertation consists of three parts with a common element – testing phenols in terms of content and availability in grape and <i>Polygonum cuspidatum</i> -based dietary supplements, testing the supplement's impact on experimental animals and the possibility to extract phenolic compounds from grape pomace.

	<p>The primary objectives of the first part were testing safety and quality of fourteen grape and <i>Polygonum cuspidatum</i>-based supplements in terms of uniformity of mass, content and dissolution profile. In the second part, to test the therapeutic efficacy of a supplement containing pure resveratrol, its effect on the glycemia and lipid profile of experimental animals was examined. The third part covers the analysis of five different grape pomaces and the development of a phenol extraction method from the selected grape pomace to obtain extracts with the highest possible yield, using solvents that are safe for human health.</p> <p>The results showed that two out of fourteen supplements have not met the Pharmacopoeia requirements in terms of uniformity of mass and active substance content, while no supplement has met requirements in terms of dissolution test of the active substance, which raises the question of the effectiveness of the tested supplements. No pesticide or heavy metal residues were quantified in any of the supplements which confirms their safety. Pharmacodynamic testing on rats has shown antioxidant, antidiabetic and hypolipidemic properties of the resveratrol-based dietary supplement which confirms its efficacy. In order to confirm the supplement efficacy on people, it is necessary to conduct a well-designed clinical trial on a sufficient number of human participants. The analysis of five different grape pomaces revealed that this byproduct of vine production contains different phenols, and only catechin was present in significant amounts. The qualitative and quantitative composition of grape pomace varies significantly depending on grape variety and harvesting as well as on the technological process that was applied in vine production. Considering the comprehensive criteria in terms of extraction efficacy, it was concluded that optimal experimental conditions for the extraction of phenol from grape pomace include 55% ethanol, sample/solvent ratio 1:40, pH 4.5, T 55°C for 30 minutes. Depending on the primary objective in the extraction process, these parameters can be easily modified. There are multiple possibilities for utilizing grape pomace and one of them could be as raw material in production of dietary supplements.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>08.09.2016.</p>

<p>Defended:</p> <p>DE</p>	
<p>Thesis Defend Board:</p> <p>DB</p>	<p>president: Prof. dr Ljiljana Gojković-Bukarica, full professor, Faculty of Medicine, University of Belgrade</p> <p>member: Prof. dr Aleksandar Rašković, full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Prof. dr Milica Atanacković-Krstonošić, assistant professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Prof. dr Jelena Cvejić Hogervorst, full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Prof. dr Ljilja Torović, associate professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1. Fenoli grožđa	2
2.1.1. Neflavonoidna jedinjenja grožđa	3
2.1.2. Flavonoidna jedinjenja grožđa (C ₆ -C ₃ -C ₆)	6
2.1.3. Tanini	12
2.1.4. Biosinteza fenola grožđa	14
2.1.5. Bioraspoloživost fenola	15
2.2. Uticaj resveratrola na dijabetes	17
2.2.1. Resveratrol i dijabetes tip 1	17
2.2.2. Resveratrol i dijabetes tip 2	20
2.2.3. Klinička ispitivanja anti-dijabetske aktivnosti resveratrola	24
2.3. Uticaj resveratrola na lipidni status	26
2.3.1. Pretklinička ispitivanja	26
2.3.2. Klinička ispitivanja	27
2.4. Komina grožđa kao izvor fenola	29
2.4.1. Ekstrakcija fenola iz komine grožđa	30
3. CILJEVI I HIPOTEZE	34
4. MATERIJAL I METODE	35
4.1. Analiza dijetetskih suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota	38
4.1.1. Uzorci dijetetskih suplemenata	38
4.1.2. Određivanje ujednačenosti mase	39
4.1.3. Određivanje ujednačenosti sadržaja pojedinačnih fenola	39
4.1.4. Ispitivanje rastvorljivosti dijetetskih suplemenata	40
4.1.5. Određivanje antioksidantne aktivnosti	42
4.1.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC – <i>total phenolic content</i>)	42
4.1.7. Analitička metoda za analizu ostataka pesticida	43
4.1.8. Analitičke metode za određivanje toksičnih metala	45
4.2. Razvoj metode ekstrakcije fenola iz komine grožđa i analiza dobijenih ekstrakata	47
4.2.1. Uzorci komine grožđa	47
4.2.2. Priprema uzoraka komine grožđa	47

4.2.3. Razvoj metode ekstrakcije fenola iz komine grožđa.....	48
4.2.4. Određivanje pojedinačnih fenola	49
4.2.5. Određivanje antocijana	49
4.2.6. Određivanje antioksidantne aktivnosti.....	49
4.2.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	49
4.3. Optimizacija ekperimentalnih faktora ekstrakcije fenola iz komine grožđa	50
4.3.1. Priprema uzorka	50
4.3.2. Postupak ekstrakcije.....	50
4.3.3. Eksperimentalni dizajn.....	50
4.3.4. Određivanje pojedinačnih fenola	54
4.3.5. Određivanje antocijana	54
4.3.6. Određivanje antioksidantne aktivnosti.....	54
4.3.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	54
4.4. Ispitivanje uticaja suplementacije na glikemijski i lipidni status eksperimentalnih životinja (Farmakodinamska ispitivanja).....	55
4.4.1. Komercijani dijetetski suplement resveratrola (suplement 13).....	55
4.4.2. Postupci na životinjama	56
4.4.3. Analitičke metode	60
4.4.4. Statistička analiza.....	60
5. REZULTATI I DISKUSIJA	62
5.1. Analiza dijetetskih suplemenata.....	62
5.1.1. Ujednačenost mase doziranih jedinica	62
5.1.2. Ujednačenost sadržaja pojedinačnih fenola	67
5.1.3. Određivanje antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola (TPC).....	70
5.1.4. Ispitivanje testa rastvorljivosti	72
5.1.5. Analiza ostataka pesticida i toksičnih metala.....	74
5.1.6. Pregled rezultata.....	74
5.2. Analiza komina grožđa	76
5.2.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola.....	76
5.2.2. Ispitivanje sadržaja pojedinačnih fenola	78
5.3. Optimizacija ekperimentalnih faktora ekstrakcije fenola iz komine grožđa	82
5.3.1. Inicijalni skrining za kritične faktore ekstrakcije i njihov uticaj na definisane deskriptore efikasnosti ekstrakcije	82
5.3.2. Finalna optimizacija faktora ekstrakcije	88

5.3.3. Pregled rezultata.....	94
5.4. Uticaj resveratrola na glikemijski i lipidni status.....	95
5.4.1. Analiza dijetetskog suplementa na sadržaj resveratrola i antioksidantnu aktivnost	95
5.4.2. Uticaj dijetetskog suplementa na bazi resveratrola na glikemijski status	95
5.4.3. Uticaj dijetetskog suplementa na bazi resveratrola na lipidni status.....	98
5.4.4. Uticaj suplementa resveratrola na telesnu masu	100
5.4.5. Uticaj suplementa resveratrola na biohemijske parametre.....	101
6. ZAKLJUČAK	104
7. LITERATURA	106

LISTA SKRAĆENICA

AAS- atomska apsorpciona spektrofotometrija

ACN- acetonitril

ALP- alkalna fosfataza

ALT- alanin transaminaza

AMPK- 5' adenzin monofosfat-aktivirana protein kinaza

ANOVA- analiza varijanse

ASE- *Accelerated solvent extraction*- ubrzana ekstrakcija rastvaračem

AST- aspartat transaminaza

ATP- adenzin trifosfat

BGL- *Blood glucose levels*- nivo glukoze u krvi

CCF- *2³ full factorial Central Composite Face*

CHE-CHO-POD- holesterol / esteraza / oksidaza / peroksidaza

CHOD-POD- holesterol / oksidaza / peroksidaza

CoA- koenzim A

CV AAS- atomska apsorpciona spektrofotometrija sa generisanjem hladnih para

CYP7A1- citohrom P450 porodica 7 subporodica A član 1

DAD- *diode array* detektor

DDD- *Dichlorodiphenyldichloroethane*-dihlorodifenildihloroetan

DDE- *Dichlorodiphenyldichloroethylene*- dihlrodifenildihloroetilen

DDT- *Dichlorodiphenyltrichloroethane*-dihlorodifeniltrihloroetan

DJ- dozirana jedinica

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

DoE- *Design of Experiments*

DPPH- 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

d-SPE- disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi

EtOH- etanol

FDA- *Food and Drug Administration*

FIZ- fiziološki rastvor

GAE- *Gallic acid equivalent*- ekvivalent galne kiseline

GC-MS- gasna hromatografija sa masenim dektektorom

GF AAS- atomska apsorpciona spektrofotometrija sa grafitnom peći

gl- glukozid

GLUT4- transporter glukoze tip 4

GPO-POD- glicerol-3-fosfat / oksidaza / peroksidaza

HCH- heksahlorocikloheksan

HDL- *high-density lipoprotein*- lipoprotein velike gustine

HMG-CoA- 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A

HPLC- *High-Performance Liquid Chromatography*- visoko-efikasna tečna hromatografija

IC₅₀- 50%-tna inhibitorna koncentracija

IL- interleukin

IRS-1- *Insulin receptor substrate 1*

K- komina

Kaps.- kapsula

LDL- *low-density lipoprotein*- lipoprotein male gustine

M1 protokol- 80% metanol

M2 protokol- 80% metanol + limunska kiselina

n- broj

NAD⁺- nikotinamid adenin dinukleotid

NF-kappaB- nuklearni faktor kapa B

OGTT- *Oral Glucose Tolerance Test*- test oralnog opterećenja glukozom

p- nivo statističke značajnosti

p.o.- *per os*

PARP-1- poli[ADP-riboza] polimeraza

Ph. Eur.- *European Pharmacopoeia*- evropska farmakopeja

PSA- primarni sekundarni amin

QuEChERS- *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*

RES- suplement resveratrola

rpm- *Revolutions per minute*- obrtaja u minuti

RSC- *radical scavenging activity*- kapacitet hvatanja radikala

RSD- relativna standardna devijacija

RSM- *Response Surface Methodology*, metod odzivne površine

RTL- *Retention Time Locked* - zaključano retenciono vreme

SC-CO₂- superkritični ugljen-dioksid

SD- standardna devijacija

SFE- *supercritical fluid extraction*- ekstrakcija superkritičnim fluidom

SIM- *Selected Ion Monitoring*

SIRT1- sirtuin 1

SLE- *solid-liquid extraction*, čvrsto-tečna ekstrakcija

STZ- streptozotocin

Supl.- suplement

Tabl.- tablet

T.m.- telesna masa

TPC- *Total phenolic content*- sadržaj ukupnih fenola

UDP-glukuronoziltransferaza- uridin 5'-difosfo-glukuronoziltransferaza

UHPLC- *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*- ultra-visoko-efikasna tečna hromatografija

US- *ultrasound*- ultrazvuk

UV- *ultraviolet*

1. UVOD

Dijetetski suplementi se koriste širom sveta, pa tako i u Srbiji, a razlog tome je, svakako, i činjenica da se danas sve veći broj ljudi okreće prirodnom načinu lečenja bolesti. Međutim, suplementi prilikom registracije za stavljanje u promet ne podležu istim testovima kao i lekovi, te su stoga nedovoljno ispitani. Tu se pre svega misli na njihovu bezbednost i kvalitet. Pored toga, u zakonskoj regulativi nisu jasno definisani kriterijumi koje dijetetski suplementi treba da zadovolje u pogledu njihovog kvaliteta (1, 2). Kako se suplementi u prometu nalaze najčešće u obliku kapsula i tableta, poželjno je proveriti i sam kvalitet doziranih oblika u pogledu ujednačenosti mase, sadržaja i brzine rastvorljivosti. Ne sme se zanemariti ni činjenica da dijetetski suplementi mogu stupiti u interakciju sa određenim lekovima i dovesti do neželjenih ishoda, što može biti slučaj sa suplementima koji sadrže fenole za koje je potvrđeno da utiču na aktivnost i ekspresiju određenih enzima jetre koji učestvuju u metabolisanju lekova (3, 4). Ispitivanje bezbednosti i kvaliteta suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota može ukazati na nedostatke koji se mogu javiti i kod ostalih suplemenata koji se nalaze u slobodnom prometu u Republici Srbiji.

Radi provere terapijske delotvornosti, suplement koji sadrži čist resveratrol biće primenjen na eksperimentalnim životinjama i posmatraće se njegov uticaj na glikemiju i lipidni status eksperimentalnih životinja.

S obzirom na masovno uzgajanje grožđa vrste *Vitis vinifera* širom sveta, od čega se 80% koristi za proizvodnju vina, jasno je da nakon proizvodnje velika količina grožđa ostaje kao industrijski otpad u vidu komine grožđa koji može biti problem gledajući sa ekološkog i ekonomskog aspekta. Pošto značajna količina fenola ostaje u komini, postoje različite mogućnosti njene primene, naročito u industriji hrane gde se usled svog antimikrobnog dejstva komina može koristiti kao

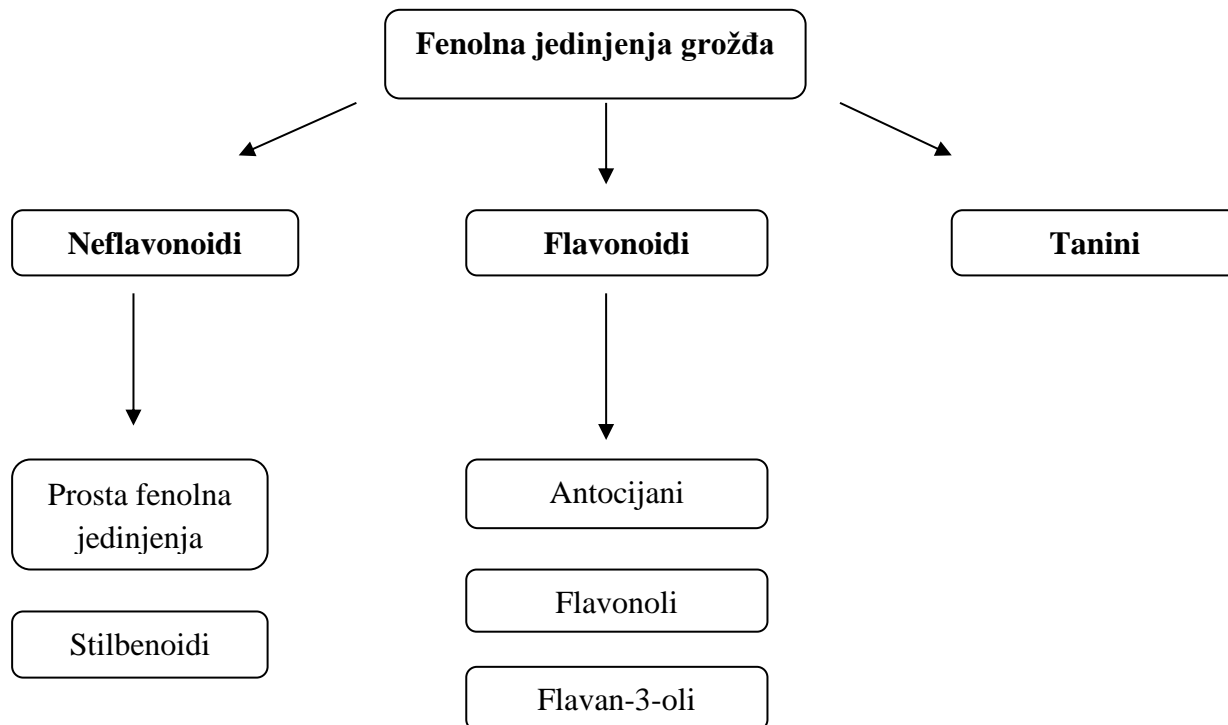
prirodan konzervans (5) ili, pak, kao sirovina za dobijanje dijetetskih suplemenata. Pre same primene komine grožđa, neophodno je razviti metodu ekstrakcije kako bi se dobili ekstrakti sa što je moguće većim prinosom fenola koristeći rastvarače koji su bezbedni po ljudsko zdravlje.

Doktorsku disertaciju čine tri celine. Prvi deo obuhvata kontrolu kvaliteta i bezbednosti dijetetskih suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota, u drugom delu je prikazana optimizacija ekstrakcije fenola iz komine grožđa, dok je u trećem delu ispitana delotvornost dijetetskog suplementa na bazi grožđa na laboratorijskim životinjama.

2. OPŠTI DEO

2.1. Fenoli grožđa

Grožđe (*Vitis* spp.) jedno je od ekonomski najisplativijih biljnih vrsta zahvaljujući svojoj ulozi u proizvodnji vina, sokova i drugih prehrambenih proizvoda. Kultiviše se na svim kontinentima u umerenim regionima gde ima dovoljno kiše, toplih i suvih leta, kao i relativno blagih zima. Kvalitet produkata grožđa zavisi od komponenti prisutnih u njemu gde se prvenstveno misli na fenole, sekundarne biljne metabolite koji se u širem smislu mogu podeliti na: flavonoide, neflavonoide i tanine (**Shema 1**) (6).



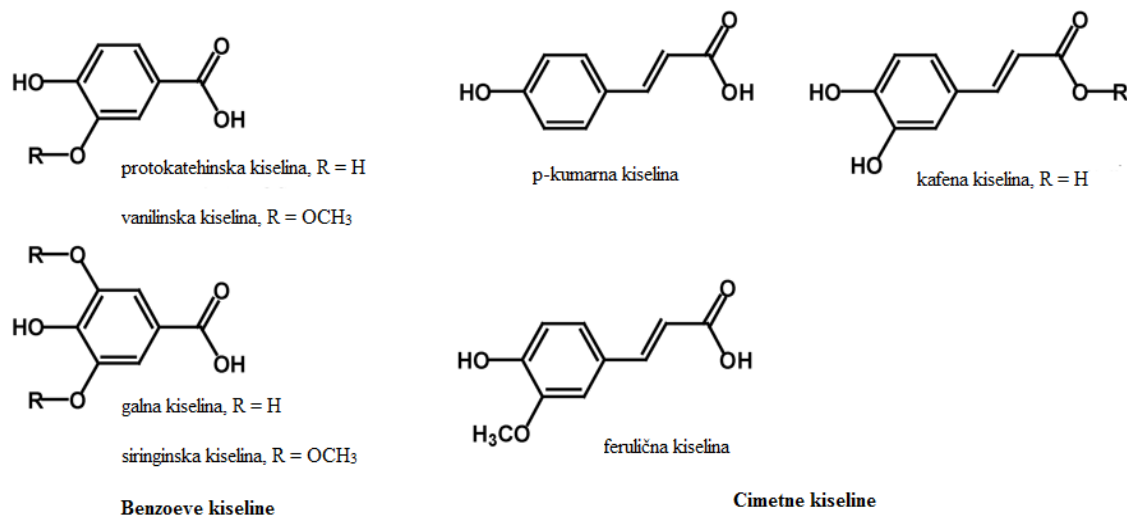
Shema 1. Podela fenolnih jedinjenja grožđa

2.1.1. Neflavonoidna jedinjenja grožđa

2.1.1.1. Prosta fenolna jedinjenja (C₆-C₁, C₆-C₃)

Ovo su najjednostavnija jedinjenja iz klase fenola. Sadrže jedan aromatičan prsten i čine ih mono-, di- i tri- fenoli, kao i fenolni aldehidi i kiseline. Nalaze se uglavnom u mesu bobice grožđa i grožđanom soku, a neke fenolne kiseline se mogu naći i u pokožici. Od fenola zastupljeni su mono-, di-, i tri- fenoli (fenol, pirokatehol, rezorcinol, floroglucinol), a od fenolnih aldehida vanilin, *p*-hidroksibenzaldehid, siringaldehid i koniferilaldehid (7). Među fenolnim kiselinama u grožđu i vinu utvrđeno je prisustvo sedam benzoevih (C₆-C₁) i tri cimetne kiseline (C₆-C₃). Od benzoevih kiselina prisutne su *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska, galna, siringinska, salicilna

i gentizinska kiselina. Od cimetnih kiselina zastupljene su *p*-kumarna, kafena, i ferulna kiselina (Slika 1). U vinu, derivati cimetne kiseline nalaze se kao estri vinske kiseline, dok su derivati benzoeve kiseline prisutni u slobodnom obliku (6).

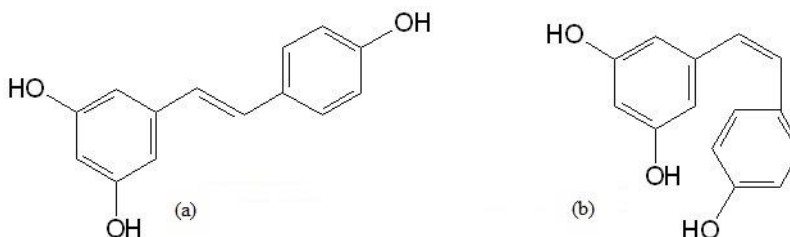


Slika 1. Prosta fenolna jedinjenja grožđa

Benzoeve kiseline mogu delovati inhibitorno na mnoge enzime usled prisustva fenolnih OH-grupa i time uticati na brzinu pojedinih biohemijskih reakcija. Jedno od njihovih najznačajnijih delovanja je na lipidnu peroksidaciju, zbog čega se mogu koristiti kao antioksidanti, konzervansi i anti-inflamatorni agensi. Antioksidantna aktivnost derivata benzoeve kiseline zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa na benzenovom jezgru (8, 9). Iz tih razloga je galna kiselina sa svoje tri hidroksilne grupe najsklonija oksidaciji, tj. najbolji je antioksidant. Delovanje salicilne kiseline kao antioksidanta je slabije u poređenju sa drugim višesupstituisanim derivatima benzoeve kiseline, ali ona zbog svoje strukture ima sposobnost kompleksiranja metalnih jona, što sprečava Fentonovu reakciju. Hidroksicinamati doprinose zaštiti dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) od vodonik peroksida poteklog od reaktivnih kiseoničnih metabolita (10).

2.1.1.2. Stilbenoidi ($C_6-C_2-C_6$)

Stilbenoidi su fenolna jedinjenja kod kojih je aromatični prsten premošten etanskim ili etenskim mostom. Kao predstavnik stilbena posebno interesovanje izaziva *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben). Resveratrol je fitoaleksin, biljni antibiotik, koji se stvara u tkivu lista vinove loze kao odgovor biljke na gljivičnu infekciju (*Botrytis cinerea*, *Plasmospora viticola*, itd.) i ostale stresne faktore, kao što su UV-radijacija, ozon, joni teških metala, mehanička povreda tkiva biljaka i mraz (11). Prvi put je detektovan 1940. godine iz korena belog kukureka (*Veratrum grandifolium*) i od tada pa sve do danas on i njegovi derivati (glikozidi i oligomeri) izolovani su i identifikovani u preko 70 biljnih vrsta (12). Najpoznatiji izvor ovog jedinjenja u ljudskoj ishrani, osim grožđa, gde ga najviše ima u pokožici, je svakako vino. Pošto se ekstrahuje iz pokožice grožđa, veća koncentracija mu je u crvenom vinu (13, 14). Iako su grožđe i vino njegov najpoznatiji izvor, najveća količina resveratrola nađena je u korenu japanskog troskota (*Polygonum cuspidatum*), te su brojni suplementi resveratrola na bazi ove biljke. Koren japanskog troskota se u poslednjih 100 godina koristi u tradicionalnoj azijskoj medicini za lečenje različitih inflamacija, dermatitisa, hiperlipidemija i ateroskleroze (15). Resveratrol se javlja kao *trans*- i *cis*- oblik (**Slika 2**), od kojih je samo *trans*- prirodni sastojak grožđa i ispoljava određena biološka dejstva, dok *cis*- nastaje izlaganjem *trans*- izomera UV-radijaciji (16).



Slika 2. Struktura *trans*- (a) i *cis*- (b) resveratrola

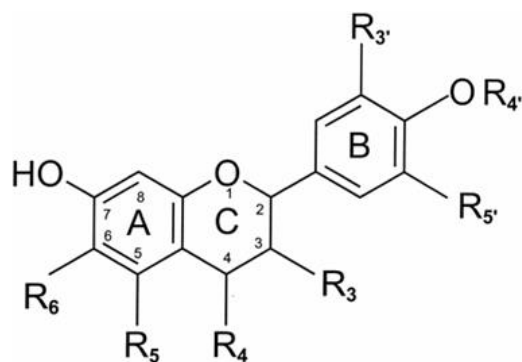
Osnovne biološke aktivnosti resveratrola su:

- inhibicija lipidne peroksidacije (LDL, membrana)
- chelacija bakarnih jona
- hvatanje slobodnih radikala
- promena u sintezi prostaglandina (eikosanoida)
- inhibicija agregacije trombocita
- anti-inflamatorna aktivnost
- vazorelaksaciona aktivnost
- modulacija metabolizma lipida
- antikancerogena aktivnost
- estrogenska aktivnost.

Stoga, mnogobrojna *in vitro* ispitivanja, kao i pretklinička ispitivanja na životinjama, ukazala su na sposobnost *trans*-resveratrola da ispolji širok spektar potencijalno korisnih delovanja po zdravlje ljudi, kao što su antioksidantno, anti-inflamatorno, kardioprotektivno, neuroprotektivno, anti-dijabetsko i antikancerogeno delovanje (17-22).

U grožđu i vinu su, pored resveratrola, zastupljeni i pterostilben (njegov metilovani derivat), piceid (resveratrol-3 β -D-glukopiranozid), astringinin, astringin i viniferini (njegovi oligomerni derivati) (23).

2.1.2. Flavonoidna jedinjenja grožđa (C₆-C₃-C₆)



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi (**Slika 3**) predstavljaju najveću grupu biljnih fenola, identifikovano je skoro 6000 ovih struktura (24). Raznolikost u njihovoj hemijskoj strukturi doprinosi širokom spektru njihovih fizioloških i bioloških aktivnosti. Oni su potentni antioksidanti, hvatači slobodnih radikala i helatori metalnih jona, pokazuju različite fiziološke aktivnosti uključujući anti-inflamatorni, antialergijski, antikancerogeni, antihipertenzivni i antimikrobni efekat (25). Najčešće prisutni flavonoidi u grožđu su antocijani (3-*O*-monoglukozi ili 3,5-*O*-diglukozi malvidina, cijanidina, peonidina, delfinidina, pelargonidina i petunidina, kao i njihovi acetil-, *p*-kumaroil- i kefeoil-estri), flavonoli ((+)-katehin, (-)-epikatehin, (-)-epikatehin-3-*O*-galat), dihidroflavonoli (astilbin i engeletin) i proantocijanidini (26-28).

Osnovna farmakološka aktivnost flavonoida je povezana sa njihovim delovanjem na zid perifernih krvnih sudova. Flavonoidi povećavaju elastičnost i osnovni tonus zida kapilara, a smanjuju permeabilnost i krtost. Delovanje flavonoida na kapilare može se tumačiti njihovom sposobnošću da, kao donori protona, sprečavaju redukciju dehidroaskorbinske kiseline. Drugo objašnjenje je da oni inhibiraju enzime (hijaluronidazu, elastazu i katehol-*O*-metiltransferazu) i usporavaju proces razlaganja elastina. Flavonoidi, takođe, inhibiraju enzim fosfodiesterazu i smanjuju agregaciju trombocita, pa se koriste u profilaksi i terapiji oboljenja povezanih sa pojavom tromboze. Zbog

svoga navedenog, flavonoidi se koriste u terapiji različitih oboljenja koja su uslovljena poremećajem i insuficijencijom krvnih i limfnih krvnih sudova periferne cirkulacije (10). Potvrđeno je da flavonoidi sprečavaju oksidaciju LDL, poseduju anti-inflamatorno, antitrombotičko delovanje, kao i antivirusne i antikarcinogene osobine (29). Antioksidantna aktivnost flavonoida zasniva se na zaustavljanju slobodnoradikalnih reakcija u kojima oni, predajući vodonikov atom lipid-peroksi radikalima, i sami prelaze u slobodne radikale. Ovako nastali slobodni radikali se stabilizuju i nemaju dovoljno energije da pokrenu lančanu reakciju sa supstratom. Flavonoidna jedinjenja povećavaju i aktivnost određenih antioksidantnih enzima i na taj način indirektno utiču na smanjenje koncentracije kiseoničnih radikala u živoj ćeliji. Flavonoidi koji imaju veći broj hidroksilnih grupa ili kod kojih se ove grupe nalaze u *orto*-položaju, predstavljaju efikasnije antioksidante. Flavonoidi koji u *orto*- položaju imaju hidroksilnu grupu u prstenu B i višestruke hidroksilacije u prstenu A, imaju posebnu antioksidantnu aktivnost. Glikozilacija OH-grupa flavonoida značajno smanjuje njihovu antioksidantnu aktivnost (8, 9).

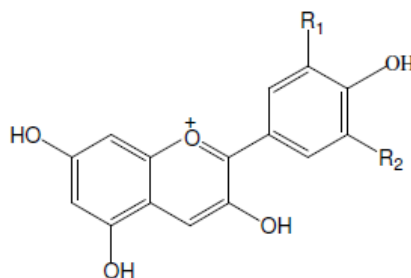
Biološke aktivnosti flavonoida striktno zavise od nekoliko faktora kao što su stepen glikozilacije, tip šećernog ostatka i prisustvo acil esterifikacije. Stoga je moguće izabrati različitu sortu grožđa sa jedinstvenim profilom flavonoida koja ima različita blagotvorna delovanja po zdravlje ljudi (30).

Na osnovu međusobne pozicije prstenova B i C, kao i oksidacionog stanja i funkcionalnih grupa prisutnih na prstenu C, flavonoidi se dele na 6 podklasa: antocijane, flavan-3-ole, flavonole, flavonone, flavone i izoflavone. U okviru svake podklase flavonoidi se razlikuju prema hidroksilaciji i konjugaciji prstena B, kao i konjugaciji hidroksilnih grupa na prstenovima A i C. U daljem tekstu opisane su podklase flavonoida karakteristične za grožđe i vino (31, 32).

2.1.2.1. Antocijani

Antocijani (**Slika 4**) su grupa u vodi rastvornih pigmenta odgovornih za crvene, plave, purpurne i ljubičaste boje cvetova i plodova. Pojam antocijani označava heterozide, dok su antocijanidini (ili antocijanini) aglikonske komponente. Antocijani su prisutni samo u crvenom grožđu i odgovorni su za njegovu boju. Nakupljaju se uglavnom u pokožici bobice, dok su kod nekih sorti grožđa prisutni i u mesu bobice (28, 33). Postoji uska korelacija između biosinteze antocijana i razvoja bobice, koja doseže maksimum pri punoj zrelosti bobice grozda (34). Svaka vrsta i sorta grožđa ima jedinstven set antocijana. Tako evropsko grožđe sadrži samo antocijanidin 3-*O*-monoglukozide, a muskatno samo antocijanidin 3,5-*O*-diglukozide (35). Hemijsku osnovu molekula antocijana čini benzopirilijum jon, a glikozidne jedinice mogu biti prisutne na pozicijama C₃ i/ili C₅ (7). U grožđu i crvenim vinima najprisutniji su 3-*O*-β-glukozidi cijanidina, peonidina, delfinidina, petunidina i malvidina (**Slika 4**) (36).

ANTOCIJANINI	R ₁	R ₂
PELARGONIDIN	H	H
CIJANIDIN	OH	H
PEONIDIN	OCH ₃	H
DELFINIDIN	OH	OH

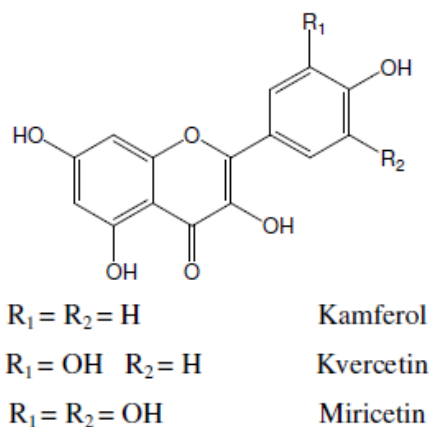


Slika 4. Struktura 2-fenilbenzopirilijum-oksonijum jona (Flavilijum katjona)

Antocijani smanjuju permeabilnost, a povećavaju elastičnost i osnovni tonus zida kapilara. Ovakva delovanja su uslovljena inhibicijom proteolitičkih enzima i povećanjem udela kolagena i elastina u zidu krvnih sudova (10). Povoljno deluju i na regeneraciju vidnog purpura, dok je za peonidin i malvidin dokazano antioksidantno delovanje.

2.1.2.2. Flavonoli

Kao drugi najzastupljeniji flavonoidi u grožđu, flavonoli (**Slika 5**) su prisutni kao 3-*O*-glikozidi u pokožici grožđa, ali mogu biti prisutni i kao sami aglikoni (kvercetin, kempferol, miricetin, izoramnetin) u vinima i sokovima kao rezultat kisele hidrolize tokom procesa obrade i skladištenja. Derivati kvercetina, kempferola i izoramnetina nalaze se i u belom i u crvenom grožđu, dok se derivati miricetina prisutni samo u crvenom. Profil prisutnih flavonola usko je povezan sa sortom grožđa, ali generalno, kvercetin-3-*O*-glukozid i kvercetin-3-*O*-glukuronid su dominantne komponente prisutne kod većine grožđa. Kod muskatnog grožđa, kvercetin-3-*O*-ramnozid i aglikon kvercetina su identifikovani kao glavni flavonoli (35, 37).



Slika 5. Hemijska struktura flavonola grožđa

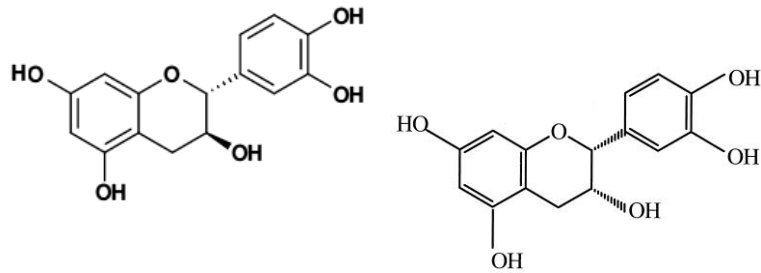
Flavonoli reaguju sa antocijanima dajući polifenolna jedinjenja poznata kao kopigmenti, zbog čega opadanje sadržaja flavonola, koje je obično primetno tokom starenja i skladištenja, može da se pripíše i fenomenu kopigmentacije. Istraživanja su pokazala da sadržaj flavonola zavisi od izloženosti sunčevoj svetlosti i da grozdovi koji su bili izloženi suncu sadrže deset puta više flavonola od uzoraka koji su bili u hladu (38).

Osnovna fiziološka uloga kvercetina je da blokira agregaciju trombocita, čime smanjuje rizik pojave ateroskleroze i pruža mogućnost inhibicije karcinogeneze. Tačan način inhibicije oksidacije nije jasan, ali flavonoli mogu delovati kao hvatači lipidnih alkoksi- ili peroksi- radikala, tako što prekidaju oksidativni lanac, helatizuju metalne jone ukoliko poseduju odgovarajuće strukturne osobine ili regenerišu α -tokoferol kroz redukciju α -tokoferol radikala. Efikasnost flavonola kao antioksidanata najviše zavisi od njihove hemijske strukture, od čega su najvažnije tri strukturne osobine:

1. *orto*-dihidroksi struktura (katehol) u B prstenu koji je meta radikala
2. dvostruka veza u položaju 2,3 u konjugaciji sa keto funkcijom u položaju 4, koja je odgovorna za elektronsku delokalizaciju u B prstenu
3. prisustvo obe hidrosilne grupe u položajima 3 i 5 za maksimalan potencijal hvatanja slobodnih radikala (38).

2.1.2.3. Flavan-3-oli

Među najpoznatijim jedinjenjima iz ove grupe (**Slika 6**) nalaze se: (+)-katehin, (+)-galokatehin, (-)-epikatehin i (-)-epigalokatehin. Nakupljaju se uglavnom u semenu grožđa, ali su prisutni i u pokožici bobice grožđa. Kod belih varijeteta flavanoli predstavljaju 46-56% ukupnih fenola, dok kod crvenog grožđa predstavljaju između 13-30% ukupnih fenola. Osim što su prisutni kao monomeri, sa flavan-diolima (leukoantocijani) grade složene polimere: tanine, procijanidine i proantocijanidine (39, 40).



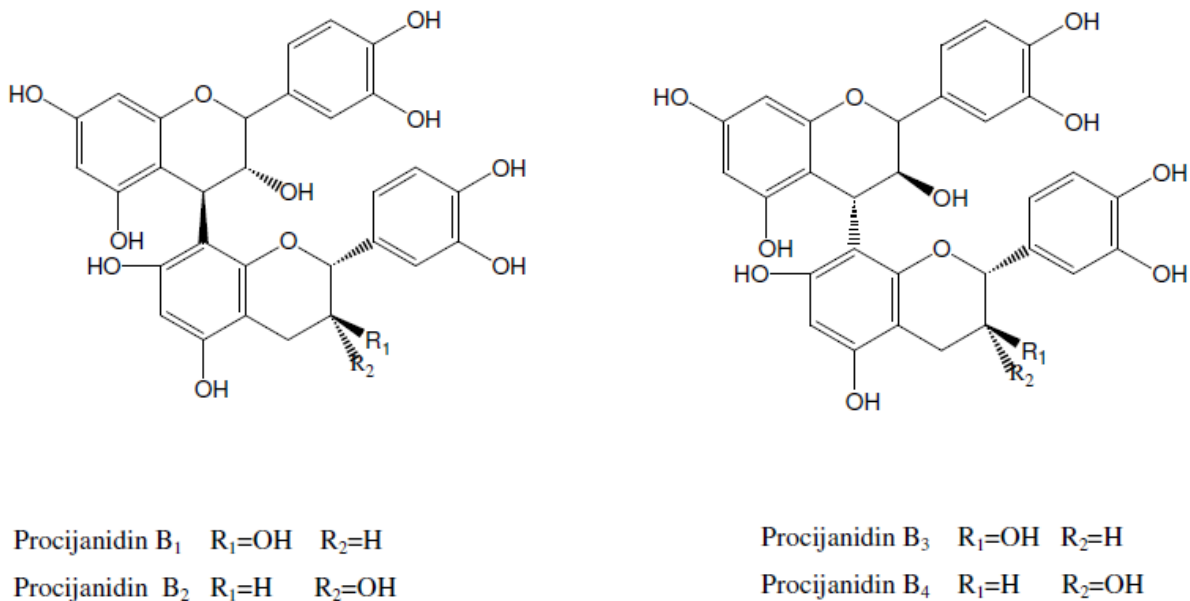
Slika 6. Hemijske strukture katehina (levo) i epikatehina (desno)

Flavan-3-oli ili flavanoli takođe pokazuju antioksidantne efekte, kao i mnoge druge korisne efekte po zdravlje, kao što su antitumorske, antimutagene i antipatogene osobine. Dokazano je da je antioksidantna i imunomodulatorska aktivnost vina u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom katehina i epikatehina (23, 41).

2.1.3. Tanini

Tanini su jedinjenja velike molekulske mase koja poseduju veliki broj fenolnih grupa. Dele se na dve osnovne grupe: kondenzovani (proantocijanidini) i hidrolizujući tanini. Proantocijanidini (**Slika 7**) nastaju kondenzacijom nekoliko (najčešće dva ili tri molekula) flavan-3-ola (katehina i epikatehina) ili ređe flavan-3,4-diola. Formiraju se C₄-C₈ ili C₄-C₆ kondenzacijom osnovnih jedinica (Proantocijanidini B). Nekada dolazi do dodatnog povezivanja unutar dimera C₄-C₈ i C₂-O-C₇ (Proantocijanidini A). Kondenzovani tanini imaju molekulske mase od 500-3000 što znači da se sastoje od 2-10 monomera. Procijanidin dimeri B₁-B₄ nastali vezivanjem dve jedinice katehina ili epikatehina C₄-C₈ vezom su najčešće prisutni u grožđu, a javljaju se i odgovarajući C₄-C₆ povezani izomeri B₅-B₈ (10, 36). Osnovni izvor ovih jedinjenja su semenke grožđa i pokožica, koje sadrže proantocijanidine u vakuolama ili ćelijskom zidu. Oni mogu reagovati sa antocijanima u vinu i formirati nove pigmente koji imaju različite boje i hemijske osobine od prirodnih

antocijana. Drugi izvor tanina u vinu je hrastovo drvo od koga se izrađuje burad za čuvanje vina. Ovi tanini su hidrolizujući tanini, derivati galoil jedinica esterifikovanih šećernim jezgrom (42).

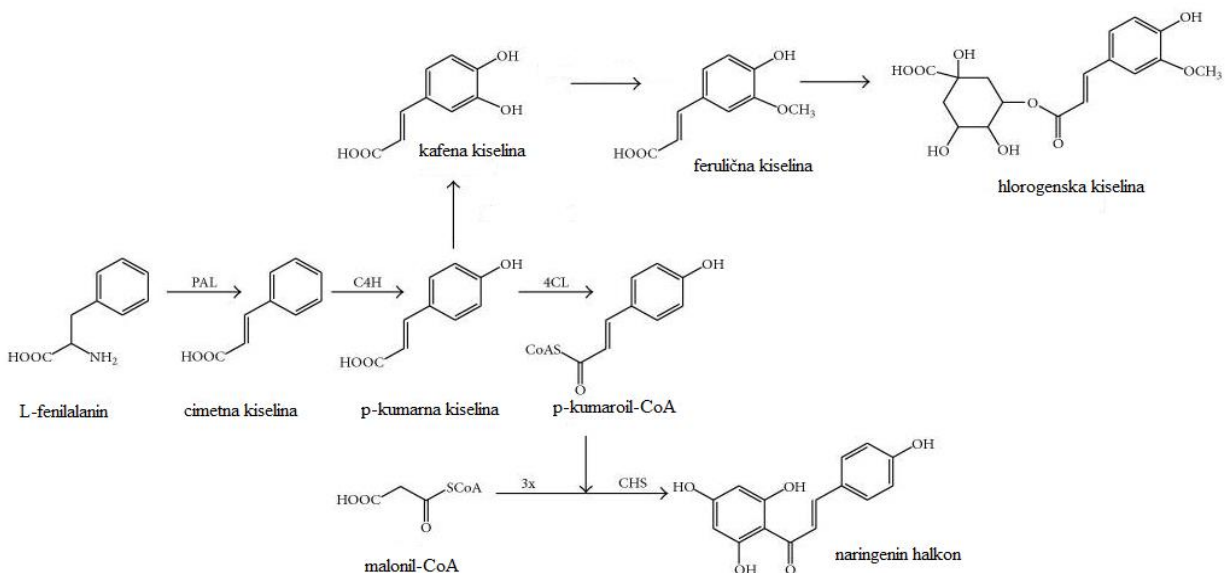


Slika 7. Hemijska struktura procijanidina B₁-B₄

Tanini u crvenom vinu određuju ukus i boju vina. Oni su odgovorni za gorčinu i oporost. Deluju adstrigentno zbog svoje osobine da reaguju sa proteinima i dovode do njihove precipitacije. Na ovaj način tanini reaguju sa proteinima površinskih slojeva sluznice i kože, ali i sa digestivnim i drugim enzimima, zatim sa proteinima bakterija, gljiva i virusa, zbog čega deluju antimikrobno. Smatra se da su tanini mnogo jači antioksidanti od jednostavnih monomernih fenola jer sadrže veći broj fenolnih hidroksilnih grupa. Usled velike molekulske mase formiraju snažne komplekse sa proteinima i otporni su na degradaciju, pa se smatra da ostaju u digestivnom traktu i da se ne apsorbuju (43, 44). Danas se ova jedinjenja (izolovana iz semenki vrste *Vitis Vinifera*) koriste kao aktivni sastojci u mnogim kardio- i hemo- preventivnim farmaceutskim proizvodima.

2.1.4. Biosinteza fenola grožđa

Svi flavonoidi potiču od L-fenilalanina, nakon različitih transformacija na fenilpropanoidnom metaboličkom putu. Uobičajeni inicijalni koraci su konverzija L-fenilalanina u cimetnu kiselinu (preko fenilalanin amonijak lijaze), zatim njena konverzija u *p*-kumarnu kiselinu (preko cinamat-4-hidroksilaze) nakon čega sledi transformacija u *p*-kumaroil-CoA (preko 4-kumaroil-CoA ligaze). *p*-Kumarna kiselina i *p*-kumaroil-CoA čine gradivne jedinice za hidroksicimetne kiseline, odnosno flavonoide (**Shema 2**). Kod sinteze flavonoida jedan molekul *p*-kumaroil-CoA i tri molekula malonil-CoA preko halkon sintetaze ulaze u sintezu bicikličnog naringenin halkona. Halkoni su supstrati za halkon izomerazu koja vrši zatvaranje B-prstena kod ovih komponenti pri čemu nastaju flavanoni (45).



Shema 2. Biosinteze hidroksicimetnih kiselina i flavonoida

Svi flavonoidi nastaju od ovih 15C flavanona delovanjem drugih fenilpropanoidnih enzima koji ih transformišu. Flavon sintaza stvara flavone, izoflavon sintaza izoflavone. Flavanon-3-hidroksilaza

stvara dihidroflavonole, a flavonol sintaza flavonole. Dihidroflavonol reduktaza i antocijanin sintaza stvaraju antocijanidine, dok antocijanidin reduktaza stvara flavan-3-ole (45, 46).

2.1.5. Bioraspoloživost fenola

Flavonoidi su obično u tkivu biljaka prisutni u formi različitih derivata, uglavnom glikozida gde se šećerna jedinica kod halkona vezuje za C₂ atom, kod flavonola, antocijanidina i flavan-3-ola za C₃ atom, a kod flavanona, flavona i izoflavona za C₇ atom. Od šećernih jedinica to su najčešće glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza, rutinoza, arabinopiranoza i arabinofuranoza (47). Ove i druge modifikacije (kao što je metilacija) doprinose strukturnoj stabilnosti flavonoida prilikom njihovog skladištenja u vakuolama ili hloroplastima, čime se održava njihova koncentracija u biljkama. Modifikacije u hemijskoj strukturi i vezivanje za šećerne jedinice značajno će uticati na njihovu apsorpciju i bioraspoloživost (4, 48).

2.1.5.1. Intestinalna apsorpcija

Ispitivanje metabolizma flavonoida u ljudskom telu je neophodno da bi se ustanovilo koji flavonoidi se bolje apsorbuju i koji vode do nastanka bioaktivnih metabolita. Nakon ingestije flavonoida, šećerne jedinice se u tankom crevu oslobađaju od aglikonskog dela i tu apsorbuju. Enzimi kao što su laktaza florizin hidrolaza (na membrani enterocita) i β-glukozidaza (citosolna, za polarne glikozide) hidrolizuju glikolizirane flavonoide, nakon čega aglikoni pasivnom difuzijom ulaze u epitelne ćelije (49-50). Flanonoidi vezani za ramnozu moraju dospeti do debelog creva gde ih hidrolizuje α-ramnozidaza koju sekretuje mikrobiotska flora debelog creva (kao što je *Bifidobacterium dentium*), nakon čega dolazi do apsorpcije (51). Flavan-3-oli, kao što je (-)-epikatehin, nisu nikad u glikoliziranoj formi, već su često acilovani sa galnom kiselinom. Zato se na nivou enterocita apsorbuju bez ikakve dekonjugacije ili hidrolize. Proantocijanidini su polimeri

velike molekulske mase, stoga se oligomeri koji se sastoje od više od tri jedinice vrlo teško apsorbuju u tankom crevu u svom prirodnom obliku (52). S druge strane, jednostavni fenoli, kao što su hidroksicimetne kiseline, najčešće su esterifikovane šećernim jedinicama, organskim kiselinama ili lipidima. Kako u ljudskom tkivu ne postoje esterase koje bi raskinule ove veze, to čini mikrobiotska flora debelog creva, pa je ono glavno mesto njihovog metabolizma i apsorpcije, iako se do jedne trećine mogu apsorbovati i u tankom crevu (53, 54). Neke hidroksicimetne kiseline, kao elagitanini, su polimeri te se ne mogu apsorbovati u tankom crevu, s obzirom da su rezistentni na laktaza florizin hidrolazu i β -glukozidazu. Njih u velikoj meri metaboliše mikroflora debelog creva, gde prilikom cepanja polimera nastaju različite hidroksifenilsirćetne kiseline (55, 56).

2.1.5.2. Metabolizam i eliminacija

Nakon apsorpcije finalnog derivata ili aglikona u tankom ili debelom crevu, već na nivou enterocita dolazi do odvijanja reakcija II faze metabolizma u određenom stepenu, kao što je metilacija (preko katehol-*O*-metiltransferaze), sulfatacija (preko sulfotransferaza) i glukuronidacija (preko UDP-glukuronoziltransferaze). Ovi produkti preko portnog krvotoka dospevaju do jetre, gde mogu dodatno biti podvrgnuti drugoj fazi metabolizma, odakle konjugovani ulaze ponovo u sistemska cirkulaciju i sekretuju se urinom (57, 58). Neki od konjugata iz jetre se ekskretuju preko žuči nazad u tanko crevo, nakon čega dekonjugovane komponente regenerišu enzimi crevne mikroflora pre njihove ponovne apsorpcije. Na ovaj način dolazi do enterohepatičke recirkulacije (efekta prvog prolaska kroz jetru). Neapsorbovani metaboliti eliminišu se putem fecesa. Svi ovi mehanizmi konjugacije su visoko efikasni tako da su slobodni aglikoni ili odsutni ili prisutni u veoma malim koncentracijama u plazmi nakon ingestije. Zbog toga je bioraspoloživost fenola veoma mala (59, 60).

2.2. Uticaj resveratrola na dijabetes

Dijabetes melitus je ozbiljna metabolička bolest od koje boluje 5% svetskog stanovništva. Broj obolelih 2017. iznosio je 425 miliona, dok se do 2045. godine očekuje njihov dramatičan porast na 629 miliona (61). U zavisnosti od etiologije bolesti, kliničkih simptoma i načina lečenja, dijabetes je podeljen na različite tipove, među kojima su tip 1 i tip 2 najučestaliji i obuhvataju više od 90% slučajeva. Dijabetes dovodi do nastanka ozbiljnih komplikacija. Dugoročne komplikacije uključuju, pored ostalih, angiopatije, kardiovaskularne poremećaje, otkazivanje bubrega, slepilo, neuropatije i povećan rizik od nastanka kancera. Da bi se sprečio nastanak navedenih komplikacija i poboljšao kvalitet života obolelih, kontrola dijabetesa mora biti delotvorna (62).

Dostupni lekovi za terapiju dijabetesa su efikasni, ali ih prate neželjena delovanja, kao što su hipoglikemija, gojaznost, gastrointestinalni problemi. Stoga se radi prevencije i lečenja dijabetesa kontinuirano ispituju novi lekovi i supstance prirodnog porekla (63). Među njima, velika pažnja posvećena je resveratrolu usled njegovih ranije nabrojanih različitih aktivnosti.

2.2.1. Resveratrol i dijabetes tip 1

Dijabetes tip 1 rezultat je autoimune destrukcije β -ćelija pankreasa i obuhvata 5-10% slučajeva dijabetesa. Oštećenje β -ćelija dovodi do toga da je sekrecija insulina nedovoljna da bi se sprečila hiperglikemija koja vremenom zajedno sa ostalim faktorima dovodi do nastanka različitih komplikacija. Stoga, glavni ciljevi lečenja dijabetesa tipa 1 su održavanje normoglikemije i zaštita β -ćelija pankreasa (62). Ispitivanja na životinjama pokazala su da resveratrol smanjuje nivo glukoze u krvi i štiti β -ćelije, odnosno, ostvaruje oba dejstva.

2.2.1.1. Uticaj resveratrola na nivo glukoze u krvi

Različita ispitivanja su pokazala da resveratrol ima sposobnost da smanji nivo glukoze u krvi kod pacova sa indukovanim dijabetesom pomoću streptozotocina (64-69) i streptozotocina sa nikotinamidom (70-73). Streptozotocin uništava β -ćelije pankreasa što dovodi do nedostatka insulina. U β -ćelijama životinja izloženih streptozotocinom dolazi do fragmentacije DNK molekula i aktivacije mehanizama reparacije gde ključnu ulogu u reparaciji DNK ima polimeraza PARP-1. Međutim, kod obimnog oštećenja molekula DNK, prevelika aktivnost enzima PARP-1 vodi do potrošnje intraćelijskog NAD^+ i ATP, što kao krajnju posledicu ima nekrozu β -ćelija. Zato su kod životinja sa streptozotocin- indukovanim dijabetesom nivoi glukoze u krvi bili značajno povećani, dok su kod životinja koje su pored streptozocina dobijale i nikotinamid, inhibitor PARP-1, nivoi glukoze u krvi bili umereno povećani (74, 75). Kod dijabetesa tipa 1, hiperglikemija je rezultat povećanog oslobađanja glukoze iz jetre, kao i smanjenog iskorišćavanja glukoze u perifernim tkivima, a oba ta procesa reguliše insulin. Antihiperglikemično delovanje resveratrola kod životinja sa dijabetesom tipa 1 zasniva se na povećanju insulina u krvi, supresiji oslobađanja glukoze iz jetre i povećanju iskorišćenja glukoze na periferiji.

2.2.1.2. Efekat resveratrola na nivo insulina u krvi i β -ćelije

Studije na dijabetičnim glodarima potvrdile su da resveratrol štiti β -ćelije pankreasa koje su jedini izvor stvaranja insulina. Smatra se da je ova protektivna uloga resveratrola delimično povezana sa njegovom antioksidantnom aktivnošću. Resveratrol u pankreasnom tkivu ispoljava antioksidantnu aktivnost tako što povećava aktivnost različitih antioksidantnih enzima (superoksid dismutaze, katalaze, glutacion peroksidaze i glutacion-S-transferaze) i štiti ćelije od oštećenja slobodnim radikalima (72). Ova antioksidantna aktivnost je značajna budući da β -ćelije pankreasa izložene

oksidativnom stresu imaju veoma smanjen mehanizam antioksidantne odbrane (76). Pored toga, resveratrol je sprečava apoptozu β -ćelija indukovanu streptozotocinom preko inhibicije cepanja PARP, što je efekat sličan nikotinamidu (68). Pored oštećenja β -ćelija streptozotocinom, resveratrol je ispoljio protektivnu ulogu i kod autoimunog oštećenja β -ćelija, tako što je smanjio broj patogenih limfocita u ostrvcima pankreasa u studiji rađenoj sa negojaznim miševima. Ovo ispitivanje je značajno, s obzirom da se smatra da dijabetes tip 1 kod ljudi ima autoimunu pozadinu (77).

2.2.1.3. Efekat resveratrola na iskorišćenje glukoze na periferiji i njeno oslobađanje iz jetre

Brojna ispitivanja su pokazala da je resveratrol ublažio disfunkciju skeletnih mišića kod dijabetesa tipa 1 kroz različite mehanizme delovanja (78, 79). Resveratrol je stimulisao sintezu mitohondrija i poboljšao metabolizam masnih kiselina u mišićima ispitivanih dijabetičnih životinja. Pored toga, doveo je do smanjenja ekspresije NF-kappaB i proinflamatornih citokina (IL-1 β i IL-6) u mišićnim ćelijama i tako ispoljio anti-inflamatorno delovanje (79). Resveratrol je smanjio i oksidativni stres u skeletnim mišićima životinja sa dijabetesom tipa 1, gde se zna da i inflamacija i oksidativni stres dovode do miopatije (78). Pored toga, resveratrol je u skeletnim mišićima dijabetičnih životinja povećao GLUT4 ekspresiju i time poboljšao transport glukoze u mišićne ćelije (80).

Pored skeletnih mišića, resveratrol je pokazao blagotvorna delovanja i na jetru dijabetičnih životinja koja ima regulatornu ulogu u održavanju normoglikemije. Kod dijabetesa ova regulatorna uloga jetre je poremećena, a resveratrol je pokazao da ima sposobnost da je povрати. Resveratrol na to utiče na više načina, a jedan od njih je menjanje aktivnosti enzima koji u jetri učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata. Resveratrol smanjuje aktivnost glavnih enzima glukoneogeneze, gde spada i fosfoenolpiruvat karboksikinaza, smanjuje aktivnost laktatne dehidrogenaze i glukoza-

6-fosfataze, a povećava aktivnost heksokinaze i piruvat kinaze. Pored toga, resveratrol povećava sintezu glikogena u jetri, a smanjuje njegovu fosforilaciju. Svi ovi mehanizmi delovanja resveratrola vode do smanjenja oslobađanja glukoze iz jetre i njih prate povećani nivoi insulina u krvi, što sugeriše da je i insulin, makar delom, odgovoran za navedena delovanja (71, 80). Pored metaboličkih promena u jetri, resveratrol može ispoljiti i hepatoprotektivno delovanje kod životinja sa dijabetesom tipa 1. Kao i kod skeletnih mišića, hepatoprotektivno delovanje je posledica antioksidantog i anti-inflamatornog delovanja resveratrola.

2.2.2. Resveratrol i dijabetes tip 2

Dijabetes tip 2 je metabolički poremećaj koji karakteriše pogoršanje u sekreciji i delovanju insulina. Hiperglikemija se razvija postepeno te bolest može ostati neprimećena godinama. Visoko-kalorična hrana i slaba fizička aktivnost povećavaju rizik za nastanak ove bolesti (81, 82). Učestalost dijabetesa tipa 2 veća je među gojaznim osobama u poređenju sa mršavim i kod starijih osoba. Značajan podatak je da se kontrolom ishrane i povećanjem fizičke aktivnosti može odložiti početak bolesti uprkos genetskoj predispoziciji (83, 84). Mnogi faktori dovode do pogoršanja delovanja insulina i progresivnog propadanja β -ćelija pankreasa kod dijabetesa tipa 2, a među njima su inflamacija i oksidativni stres (85). Resveratrol je pokazao blagotvorno delovanje na oba spomenuta faktora nastanka tip 2 dijabetesa.

2.2.2.1. Efekti resveratrola na insulinsku rezistenciju

Insulinska rezistencija predstavlja pogoršanje delovanja insulina na ciljna tkiva, što su skeletni mišići, jetra i adipozno tkivo, a to dovodi do poremećaja u homeostazi glukoze i sledstvenih komplikacija. Brojna ispitivanja na životinjama sa indukovanom insulinskom rezistencijom pokazala su da resveratrol poboljšava delovanje insulina. Ovo poboljšanje je pokazano na

pacovima na ishrani bogatoj holesterolom i fruktozom (86), na pacovima (87, 88), miševima na ishrani bogatoj lipidima (89-93), na pacovima na ishrani bogatoj lipidima koji su tretirani streptozotocinom (94), kao i na pacovima hranjenim fruktozom (95). Nedavno istraživanje pokazalo je da dugoročna primena resveratrola (80 mg/dan tokom prve i 480 mg/dan tokom druge godine) može poboljšati insulinsku osetljivost kod gojaznih rezus majmuna. Značajno poboljšanje insulinske osetljivosti primećeno je na visceralnom adipoznom tkivu (96). S druge strane, druga studija na rezus majmunima nije dala pozitivne rezultate (97).

2.2.2.2. Insulinska rezistencija u mišićima

Ispitivanja na insulin rezistentnim glodarima pokazala su da je resveratrol poboljšao intraćelijski transport glukoze. Ovo delovanje ostvario je na dva načina: poboljšanjem GLUT4 (transporter za glukozu) translokacije na membrani mišićnih ćelija i povećanjem GLUT4 ekspresije u skeletnim mišićima dijabetičnih životinja (88, 98). Pored poboljšanja transporta glukoze, resveratrol je povećao sintezu mitohondrija u mišićnim ćelijama i poboljšao β -oksidaciju u njima, što je dovelo do povećanja oksidacije masnih kiselina i smanjenja lipidnog sadržaja u mišićima ispitanih životinja. Ovo je značajno jer povećan lipidni sadržaj u mišićima doprinosi insulinskoj rezistenciji i nastanku dijabetesa tipa 2 (87, 99, 100). Blagotvorna delovanja resveratrola u mišićnom tkivu usko su povezana sa promenama u aktivnosti i/ili ekspresiji dva intraćelijska enzima, SIRT1 i AMPK. SIRT1 je NAD^+ -zavisna histon deacetilaza koja je uključena u mnoge procese, kao što su sinteza mitohondrija, inflamacija, otpornost na stres, intraćelijski metabolizam, apoptoza i homeostaza glukoze. Kod dijabetesa tipa 2 aktivnost/ekspresija SIRT1 je smanjena, pa je tako ovaj enzim meta brojnih anti-dijabetskih lekova (101, 102). Resveratrol je pokazao da može da aktivira SIRT1 u tkivima sisara (103) i u mišićnom tkivu miševa sa indukovanom insulinskom rezistencijom (104). AMPK je AMP-aktivirana protein kinaza koja reguliše mnoge fiziološke

processe, kao što su funkcija i stvaranje mitohondrija i lučenje insulina. I ovaj enzim je meta brojnih anti-dijabetskih lekova (metformin i tiazolidindioni). Kod dijabetičnih životinja aktivnost AMPK je smanjena, te resveratrol, kao i spomenuti lekovi, ponovno aktivira AMPK u različitim tkivima (105, 106). Resveratrol smanjuje i stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta u skeletnim mišićima insulin rezistentnih glodara, a smatra se da AMPK posreduje u ovom delovanju (99).

2.2.2.3. Insulinska rezistencija u jetri

Pored skeletnih mišića, resveratrol može ispoljiti blagotvorne efekte i na jetru insulin rezistentnih glodara. On smanjuje nakupljanje lipida u jetri i poboljšava steatozu jetre, što je povezano sa smanjenjem ekspresije sintaze masnih kiselina i acetil-CoA karboksilaze, a povećanjem ekspresije i aktivnosti karnitin palmitoil-transferaze 1. Kao i kod skeletnih mišića, delovanje resveratrola povezano je sa promenama u aktivnosti i/ili ekspresiji AMPK/SIRT1 enzima (107-110). Resveratrol povećanjem aktivnosti glutation peroksidaze smanjuje oksidativno oštećenje jetre i time ispoljava svoje antioksidantno delovanje, dok smanjenjem ekspresije proinflamatornih citokina i infiltracije makrofaga u tkivo jetre ispoljava svoje anti-inflamatorno delovanje kod dijabetičnih životinja (92, 108, 109).

2.2.2.4. Adipozna insulinska rezistencija

Adipozno tkivo ima svoju ulogu u nastanku insulinske rezistencije tako što povećano oslobađa slobodne masne kiseline i luči više adipokina. Poslednjih nekoliko godina ustanovljeno je da inflamacija masnog tkiva značajno utiče na razvoj dijabetesa tipa 2 kod ljudi (111, 112). Zbog toga je anti-inflamatorno delovanje resveratrola veoma bitno u prilog čega govore brojne studije na gojaznim pacovima (113), glodarima (92, 114) i primatima (96) sa indukovanim dijabetesom. Resveratrol i u masnom tkivu smanjuje infiltraciju makrofaga, indukuje sintezu mitohondrija i

poboljšava metabolizam kod insulin rezistentnih glodara (99, 115, 116). Do poboljšanja metabolizma dolazi smanjenjem aktivnosti lipogenih enzima (glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze, acetil-CoA karboksilaze i lipoprotein lipaze) (115). Anti-dijabetsko delovanje resveratrola može biti povezano i sa njegovim delovanjem protiv gojaznosti, jer ima sposobnost da smanji masu adipoznog tkiva kod dijabetičnih životinja (117, 118). Međutim, resveratrol može ispoljiti anti-dijabetsko delovanje i bez promena u telesnoj masi (92, 104), tako da njegovo delovanje protiv gojaznosti nije ključno za lečenje insulinske rezistencije. Kao i kod drugih tkiva, resveratrol ispoljava efekte preko promena u AMPK i SIRT1 enzimima.

2.2.2.5. Efekti resveratrola na nivoe insulina u krvi i β -ćelije

Pri fiziološkim uslovima lučenje insulina iz β -ćelija pankreasa regulisano je brojnim faktorima, kao što su nutrijenti, određeni hormoni i nervni sistem (119, 120). Kod dijabetesa tipa 2 insulinska rezistencija vodi do povećane potražnje za insulinom, te ga β -ćelije luče više, što u početku dovodi do povećanja nivoa insulina u krvi. Međutim, prolongirana preterana stimulacija ovih ćelija i preterano lučenje insulina zajedno sa ostalim štetnim faktorima dovode do progresivnog propadanja β -ćelija, pa tako vremenom snabdevanje insulinom postaje nedovoljno. Ovo propadanje β -ćelija uzrokuju glukotoksičnost, lipotoksičnost, inflamacija, oksidativni stres, formiranje amiloida, stres endoplazmatskog retikuluma i drugi faktori (85). Efekti resveratrola na dijabetes tipa 2 proučavani su na glodarima, gde su masa β -ćelija i nivoi insulina u krvi bili povišeni ili sniženi (što je najčešći slučaj). Dobijeni podaci su pokazali da je resveratrol bio efikasan u oba slučaja. Kod životinja sa insulinskom rezistencijom i hiperinsulinemijom resveratrol je smanjio koncentracije insulina u krvi kod glodara sa hiperinsulinemijom indukovanom ishranom i genetski gojaznih *Zucker* pacova (95, 114, 121). U drugom slučaju, kod glodara sa dijabetesom tipa 2 gde je prisutna smanjena masa β -ćelija i hipoinsulinemija, resveratrol

je povećao nivo insulina u krvi, što je pokazao model sa db/db miševima (98, 122). Kod rezus majmuna porast odnosa α - i β -ćelija u ostrvcima pankreasa indukovano ishranom značajno je poboljšano primenom resveratrola u trajanju od dve godine (97).

Mehanizmi delovanja resveratrola su kompleksni i uključuju različite efekte. Jedan od najvažnijih je poboljšanje insulinske rezistencije kod dijabetičnih životinja, što dovodi do smanjenja nivoa glukoze u krvi i štetnih efekata hiperglikemije na β -ćelije pankreasa (glukotoksičnost). Smanjenjem lipida u krvi resveratrol sprečava nastanak druge pojave poznate kao lipotoksičnost. Smanjenjem glukotoksičnosti i lipotoksičnosti sprečava se propadanje β -ćelija kod dijabetesa (123, 124). Poboljšanjem insulinske rezistencije resveratrolom smanjuje se potražnja za insulinom, te kao rezultat toga β -ćelije ga manje luče, čime se smanjuje njihovo propadanje. Pored toga, resveratrol svojim antioksidantnim delovanjem smanjuje oksidativni stres u β -ćelijama pankreasa koji je kod dijabetesa povećan i doprinosi progresivnom propadanju β -ćelija (98, 122, 125). Takođe, resveratrol svojim anti-inflamatornim delovanjem smanjuje nivo inflamatornih markera u β -ćelijama i tako ih štiti. Iako se smatra da inflamatorni odgovor kod dijabetesa tipa 2 uzrokuje popravku i regeneraciju β -ćelija, hronična inflamacija vremenom dovodi do oštećenja ovih ćelija (72, 126). Resveratrol smanjuje i sadržaj triacilglicerola u pankreasu kod životinja na ishrani bogatoj lipidima (91).

2.2.3. Klinička ispitivanja anti-dijabetske aktivnosti resveratrola

Da bi se resveratrol koristio kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2, neophodno je sprovesti studije na ljudima kako bi se ispitala njegova delotvornost. Klinička ispitivanja vezana za anti-dijabetsko delovanje resveratrola su i dalje ograničena, ali ipak, dostupni podaci navode na to da ova supstanca može da smanji pojavu insulinske rezistencije. Brasnyo i saradnici pokazali su da je davanje

resveratrola u trajanju od 4 nedelje gojaznim pacijentima sa dijabetesom tipa 2 smanjilo insulinsku rezistenciju (127). I druge studije u trajanju od četiri nedelje, odnosno 45 dana, potvrdile su ovu efikasnost (128, 129). Takođe, davanje resveratrola pacijentima sa dijabetesom tipa 2 u trajanju od tri meseca malo je smanjilo natašte nivoe glukoze i hemoglobina A_{1c} u krvi i pokazalo dugoročno poboljšanje glikemije (130). Davanje resveratrola u trajanju od četiri nedelje pacijentima kod kojih je sa godinama došlo do pogoršanja u toleranciji glukoze dovelo je do smanjenja postprandijalnih nivoa glukoze i insulina u krvi i neznatnog poboljšanja insulinske osetljivosti (131). Zanimljivu studiju iz 2019. godine sproveli su Walker i saradnici na 28 gojaznih muškaraca sa metaboličkim sindromom. Ispitanici (11 pripadnika bele rase i 17 koji to nisu) su tokom 30 dana dobijali oralno 2 g resveratrola (kroz dve dnevne doze) ili placebo uz kontrolu telesne mase. Rezultati su pokazali da je suplementacija resveratrolom dovela do značajnog poboljšanja insulinske rezistencije i homeostaze glukoze, ali samo kod pripadnika bele rase. Smatra se da je do ovih razlika između pripadnika različitih rasa došlo usled razlika u njihovoj crevnoj mikroflori, gde je resveratrol kod pripadnika bele rase smanjio njenu raznolikost i povećao broj mikroba *Akkermansia muciniphila* za koje su ispitivanja na eksperimentalnim životinjama pokazala da imaju blagotvorno delovanje na gojaznost i dijabetes. Kako je u pitanju pilot kliničko ispitivanje, potrebno je sprovesti ispitivanja na većem broju ljudi pre donošenja konačnih zaključaka (132).

S druge strane, neke studije pokazale su izostanak anti-dijabetskog efekta resveratrola. Dve nedelje davanja resveratrola gojaznim ispitanicima nije značajno poboljšalo insulinsku rezistenciju (133). Resveratrol je davan i u periodu od četiri nedelje i nije uspeo da utiče na nivoe glukoze i insulina u krvi, kao ni na insulinsku rezistenciju. Slična ispitivanja u trajanju od 60 dana, odnosno osam nedelja, dala su negativne rezultate u pogledu insulinske rezistencije (107, 134, 135). Resveratrol

se pokazao kao neefikasan kod zdravih ispitanika i nije doveo do nikakvih značajnih promena u pogledu insulinske osetljivosti i inflamatornog statusa (136, 137).

Ove protivrečnosti među kliničkim ispitivanjima mogu se objasniti različitim eksperimentalnim uslovima, kao što su primenjena doza resveratrola i period administracije, godine i telesna masa pacijenata, trajanje i ozbiljnost dijabetesa, komplikacijama uzrokovanih dijabetesom i ishranom. Kako su se u ispitivanjima sa pozitivnim rezultatima koristile različite efektivne doze, moguće je da su različiti mehanizmi delovanja resveratrola dozno-zavisni. Tretman sa manjim dozama resveratrola može aktivirati SIRT1, dok se kod većih doza aktivira AMPK na SIRT1- zavisan način (128, 138).

2.3. Uticaj resveratrola na lipidni status

Pored anti-dijabetskog delovanja resveratrola, u ovom istraživanju od značaja je njegov uticaj na lipidni status. U daljem tekstu opisana su pretklinička i klinička ispitivanja vezana za ovo delovanje.

2.3.1. Pretklinička ispitivanja

Nekoliko studija na životinjama pokazalo je da resveratrol ima sposobnost da snizi nivoe ukupnog i LDL-holesterola u krvi, kao i nivoe triacilglicerola, a poveća nivoe HDL-holesterola (139-141). Kada je davan pacovima na ishrani bogatoj holesterolom zajedno sa pravastatinom, uobičajenim lekom za lečenje hiperholesterolemije, resveratrol je potencirao njegovo delovanje (142). Smatra se da je glavni mehanizam delovanja resveratrola na sniženje nivoa holesterola nishodna regulacija 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzima A (HMG-CoA), enzima jetre koji ima ključnu ulogu u biosintezi holesterola (139-141). Drugi predložen mehanizam delovanja na sniženje holesterola je povećana ekspresija enzima jetre holesterol 7 α -hidroksilaze (CYP7A1) koja vodi do povećane

sinteze i lučenja žučnih kiselina, što dovodi do smanjenja ukupnog i LDL-holesterola u plazmi (104). Pored toga, resveratrol je *in vitro* pokazao da može povećati ekspresiju LDL receptora na hepatocitima (143). Iako ove studije sugeriraju da resveratrol snižavanjem nivoa lipida u krvi može doprineti u prevenciji ateroskleroze, druge studije su pokazale anti-arterosklerotsko delovanje resveratrola bez snižavanja nivoa lipida u krvi (144-146). To sugeriraju da resveratrol može učestvovati i u drugim procesima patogeneze ateroskleroze, najviše zahvaljujući svom antioksidantnom (147, 148) i anti-inflamatornom delovanju (149-151).

2.3.2. Klinička ispitivanja

Nasuprot obećavajućim rezultatima prekliničkih ispitivanja na životinjama o uticaju resveratrola na lipide u krvi, rezultati kliničkih ispitivanja na ljudima nisu toliko jasni. Na primer, kod pacijenata sa dijabetesom tip 2 dnevna doza resveratrola od 250-1000 mg značajno je smanjila LDL-holesterol u dve različite studije (129, 130). Slično tome, dnevna doza resveratrola od 150, odnosno 500 mg značajno je smanjila nivoe triacilglicerola u krvi kod zdravih gojaznih muškaraca, odnosno zdravih odraslih pušača (128, 152). U drugom ispitivanju sa pacijentima sa visokim rizikom od kardiovaskularnih bolesti koji uzimaju statine, uzimanje 350 mg dnevno resveratrolom obogaćenog ekstrakta grožđa koji sadrži 8 mg resveratrola u periodu od 6 meseci dovelo je do smanjenja oksidovanog LDL-holesterola za 20%, dok je sam LDL-holesterol smanjen za samo 4,5%. Dobijeni rezultati sugeriraju da antioksidantno delovanje resveratrola može biti važnije od samog smanjenja LDL-holesterola u krvi (153). S obzirom da je u ovoj studiji korišćen ekstrakt grožđa, ovaj efekat je više posledica sinergističkog delovanja resveratrola sa drugim fenolima, nego samog resveratrola. U drugom kliničkom ispitivanju koje je uključilo pacijente sa stabilnom anginom pektoris, 20 mg resveratrola dnevno je davano u periodu od 60 dana, što je dovelo do sniženja ukupnog i LDL-holesterola, kao i triacilglicerola za 6,9%, 6,4% i 3,9% redom, dok je

HDL- holesterol povećan za 1,6% (154). Simental-Mendia i Guerrero-Romero su u ispitivanju iz 2019. godine ispitali uticaj resveratrola na lipidni status muškaraca i žena ($n=71$) sa dislipidemijom u dozi od 100 mg na dan tokom dva meseca. Rezultati su pokazali da je suplementacija resveratrolom statistički značajno smanjila nivo ukupnog holesterola (-8,7%) i triacilglicerola (-19,98%) u poređenju sa grupom koja je primala placebo, dok između navedenih grupa nije bilo statistički značajnih razlika za HDL- i LDL-holesterol (155).

Nasuprot studijama sa pozitivnim rezultatima, u nekoliko ispitivanja resveratrol nije pokazao uticaj na nivo lipida u krvi (107, 133, 137, 156, 157). U prilog tome govori meta-analiza sedam kliničkih ispitivanja koju je 2013. godine sproveo Sahebkar. Ova meta-analiza obuhvatila je 282 ispitanika (po 141 u svakoj grupi) i dala zaključak da resveratrol nema značajno delovanje na nivo lipida u krvi. Ipak, nekoliko ograničenja spomenuto je za ovu meta-analizu, kao što je mala veličina uzorka, različitost studijskih populacija, različitost dizajna studija, doze resveratrola i perioda suplementacije. U prilog tome, meta-analiza uključila je i dve studije gde je umesto čistog resveratrola korišćen resveratrolom obogaćeni ekstrakt (158). Novija meta-analiza iz 2018. godine koja je uključila dvadeset i jedno randomizovano kliničko ispitivanje dala je iste rezultate, s jedinom razlikom da se statistički značajna razlika javila za nivo triacilglicerola. Međutim, nakon eliminisanja samo jedne studije iz meta-analize, i ova značajnost se izgubila (159). Stoga, da bi se stvarno utvrdio efekat resveratrola na nivo lipida u krvi, neophodno je sprovesti veća, dugoročna i dobro dizajnirana klinička ispitivanja, a ono što zaista ohrabruje i podstiče buduća ispitivanja je saznanje da je primena resveratrola u dozi od 5 g/dan tokom jednog meseca bezbedna i dobro podnošljiva (158, 160).

2.4. Komina grožđa kao izvor fenola

Prilikom proizvodnje vina, nakon procesa fermentacije procenjeno je da oko 13% od ukupne mase grožđa završi kao sporedni produkt proizvodnje koji se tretira kao industrijski otpad, što može predstavljati problem gledano sa ekološkog i ekonomskog aspekta (161, 162). Ovaj sporedni produkt proizvodnje vina predstavlja komina grožđa (**Slika 8**), koju većinski čine semena, pokožice i stabljike grožđa (29). S obzirom na delimičnu ekstrakciju fenola grožđa tokom procesa vinifikacije, komina grožđa može predstavljati njihov značajan izvor. Najzastupljeniji fenoli komine su različiti glikozidi antocijana, hidroksibenzoeva i hidroksicimetna kiselina, flavan-3-oli, flavonoli, stilbeni, kao i monomerni i oligomerni proantocijanidini. Ipak, njihov kvalitativan i kvantitativan sastav u komini značajno varira u odnosu na sortu i berbu grožđa, kao i od primenjenog tehnološkog procesa proizvodnje vina (13, 14, 163).



Slika 8. Crvena (levo) i bela (desno) komina grožđa iz Barossa doline, južna Australija

Od značajnog interesa je činjenica da komina grožđa predstavlja jeftin izvor fenolnih komponenti za koje su brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja na miševima, pacovima i zečevima potvrdila da mogu

ispoljiti antioksidantno, anti-inflamatorno, kardioprotektivno, neuroprotektivno, antikancerogeno i anti-dijabetsko delovanje (17-22). Pored fenola, komina grožđa sadrži i značajne količine masti, proteina, dijetetskih vlakana i minerala. Semena grožđa sadrže 13-19% ulja bogatog esencijalnim masnim kiselinama, oko 11% proteina, čak 60-70% nesvarljivih dijetetskih vlakana, a prisutni su i fitosteroli i nefenolni antioksidanti, kao što su tokoferoli i β -karoten, koji se većinski nalaze u ulju semena grožđa (164). Zbog svega navedenog, komina grožđa može biti od velikog interesa kako za istraživače, tako i za farmaceutsku, kozmetičku i industriju hrane.

2.4.1. Ekstrakcija fenola iz komine grožđa

U cilju dobijanja ekstrakata komine grožđa sa što je moguće većim prinosom fenola neophodno je razviti metodu i postići optimalne uslove za njihovu ekstrakciju, s obzirom da standardna ekstrakciona metoda nije definisana. U daljem tekstu opisana je čvrsto-tečna ekstrakcija sa njenom modifikacijom, ultrazvučnom radijacijom, kao i novije metode ekstrakcije sa svojim prednostima i nedostacima.

2.4.1.1. Čvrsto-tečna ekstrakcija

Najčešće korišćena metoda za ekstrakciju fenola iz komine grožđa je čvrsto-tečna ekstrakcija, koja se može definisati kao fenomen transporta mase gde analit iz čvrstog matriksa migrira u tečnu fazu koja je u kontaktu sa matriksom.

Jedan od glavnih faktora koji utiče na efikasnost ekstrakcije je svakako tip rastvarača koji se koristi. Osim rastvarača, ekstrakcija ukupnih fenola iz komine grožđa zavisi i od sorte grožđa, vremena ekstrakcije, temperature, acidifikacije rastvarača, kao i od interakcija nabrojanih varijabli. Kako se većina fenola ekstrahuje nakon jednog ili dva ekstrakciona koraka, primena trećeg

ekstrakcionog koraka neznatno povećava njihov prinos (165). Zato se umesto dodatnog ekstrakcionog koraka prinos može povećati korišćenjem alternativnih vidova energije. Upotreba ultrazvučne radijacije (*Ultrasound radiation*, US) pogodna je alternativa konvencionalnoj čvrsto-tečnoj ekstrakciji pomoću mućkanja i mešanja, jer može znatno povećati efikasnost ekstrakcije primenom samo jednog ekstrakcionog koraka. Pri tome, ultrazvučna radijacija je jednostavna, jeftina i predstavlja malu modifikaciju konvencionalne čvrsto-tečne ekstrakcije. US ekstrakcija fenola zasniva se na kavitacionom fenomenu, a kao glavna prednost navodi se smanjenje vremena ekstrakcije i to bez potrebe za visokim temperaturama koje mogu uticati na stabilnost fenola (166).

2.4.1.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidom (Supercritical fluid extraction, SFE)

Za ekstrakciju fenola iz komine grožđa najčešće se kao superkritičan fluid koristi superkritični ugljen-dioksid (SC-CO₂). Dodatkom modifikatora superkritičnom fluidu (kao što je metanol) utiče se na njegovu polarnost i time na samu selektivnost ekstrakcije. Stoga je SC-CO₂ metoda pogodna alternativa za ekstrakciju prirodnih produkata iz različitih delova biljaka. Ona se uglavnom preporučuje za ekstrakciju termolabilnih supstanci za koje je neophodno održati niske temperature tokom ekstrakcije. U ovom slučaju temperatura ekstrakcije je 30°C, čime se sprečava degradacija osetljivih analita. Pored toga, ova metoda je prihvatljiva sa ekološkog aspekta, jer se dobijaju ekstrakti bez rezidualnih toksičnih rastvarača, te se mogu koristiti kao funkcionalna hrana (167, 168).

2.4.1.3. Ubrzana ekstrakcija rastvaračem (Accelerated solvent extraction, ASE)

ASE koristi konvencionalne rastvarače pri visokim temperaturama (100-180°C) i pritiscima (100-140 bara) da bi se poboljšala ekstrakcija organskih analita iz čvrstih uzoraka. Monrad i saradnici razvili su dve alternativne metode za ekstrakciju antocijana i proantocijanidina iz komine grožđa i

proučavali varijable koje utiču na ubrzanu ekstrakciju rastvaračem. Rezultati su pokazali da se za ekstrakciju procijanidina iz komine grožđa najbolje pokazala mešavina etanola i vode od 50:50 (v:v) u odnosu na druge zapreminske odnose etanola i vode i to pri optimalnoj temperaturi za ACE (80-140°C). Iako su etanol/voda mešavine bile manje efikasne za ekstrakciju polimera velike molekulske mase, pokazale su veliku efikasnost za ekstrakciju monomera, dimera, trimera, tetramera i pentamera. Slični uslovi dali su najbolje rezultate i za ekstrakciju antocijana. Stoga, istraživači su predložili ACE kao pogodnu metodu ekstrakcije bioaktivnih komponenti u industriji vina i sokova, jer čuva životnu sredinu i ne zahteva velika finansijska sredstva (169).

2.4.1.4. Ekstrakcija enzimskim oslobađanjem

Kammerer i saradnici optimizovali su enzimsku hidrolizu ekstrakata komine grožđa upotrebom kombinacije pektinolitičnih i celulolitičnih enzima tokom ekstrakcije pomoću vode da bi povećali prinos fenola. Autori su upotrebom navedene kombinacije enzima sproveli pre-ekstrakciju nakon čega je ostvaren prinos od 70,1% za fenolne kiseline, 75,2% za flavonoidne neantocijane i 1,7% za antocijane. Nakon digestije, prinos fenola kod ove ekstrakcije u dva koraka bio je 98,1% za fenolne kiseline, 96,8% za flavonoidne neantocijane i stilbene i 2,9% za antocijane. Uspeh ekstrakcije objašnjen je smanjenjem inhibitornog efekta na enzimsku digestiju, jer su se fenoli delom ekstrahovali tokom prvog koraka. Ipak, pre-ekstrakcija nije značajno poboljšala prinos antocijana. Ova predložena ekstrakcija iz dva koraka (pre-ekstrakcija i digestija) može biti dobra strategija za dobijanje visoko-koncentrovanih ekstrakata koji bi se koristili kao aditivi u hrani ili kao sastojak funkcionalne hrane (170).

2.4.1.5. Poređenje metoda ekstrakcije fenola iz komete grožđa

De Campos i saradnici ispitivali su uticaj više različitih metoda ekstrakcije na antioksidantni potencijal ekstrakata komete grožđa. Evaluirani su i ukupan sadržaj fenola i lipofilni sastav. Autori su poredili učinak konvencionalne čvrsto-tečne (SLE) i Soxhlet ekstrakcije, sa SFE sa CO₂ kao superkritičnim fluidom i SFE sa CO₂ uz upotrebu kosolventa. Rezultati su pokazali da je upotreba kosolventa (u ovom slučaju 15%-tnog etanola) povećala sadržaj ukupnih fenola i antioksidantnu aktivnost dobijenih ekstrakata. Ipak, antioksidantna aktivnost i sadržaj ukupnih fenola bili su značajno niži u poređenju sa konvencionalnim metodama. SFE je dala bolje rezultate u pogledu ekstrakcije nepolarnih supstanci, kao što su masne kiseline, i uspela da ekstrahuje neke bitne supstance koje nisu bile detektovane konvencionalnim metodama (171). Konvencionalne metode, kao što su čvrsto-tečna ekstrakcija (SLE) i njena modifikacija pomoću ultrazvučnog zračenja (US-SLE), imaju prednost jer su dostupne u većini laboratorija i daju zadovoljavajuće prinose ako se na pravi način optimizuju parametri ekstrakcije. S druge strane, konvencionalne metode često imaju nekoliko ograničenja, kao što je pregrevanje matriksa uzorka koje može dovesti do smanjenja aktivnosti i stabilnosti finalnog produkta, visoka potrošnja energije i cena, kao i upotreba organskih rastvarača koji mogu biti problem u pogledu bezbednosti primene dobijenih ekstrakata. Novije ekstrakcione metode, kao što su SFE i ACE, pokazale su se pogodnim za ekstrakciju bioaktivnih komponenti. One su primarno fokusirane na skraćivanje vremena ekstrakcije i smanjenje potrošnje organskih rastvarača, prilikom čega je prinos fenola bio približan ili veći u poređenju sa konvencionalnim metodama. Ipak, njihov glavni nedostatak je visoka cena i nedostupnost u većini standardno-opremljenih laboratorija. Iako je prinos fenola veoma bitan parametar, i drugi činioci, kao što su bezbednost finalnog proizvoda i cena procesa ekstrakcije, utiču na izbor ekstrakcione metode (164, 167).

3. CILJEVI I HIPOTEZE

Osnovni ciljevi doktorske disertacije:

1. Analiza dijetetskih suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota
 - 1.1. Analiza dijetetskih suplemenata na koncentraciju *trans*- resveratrola i drugih pojedinačnih fenola, ujednačenost njihove mase i sadržaja, kao i oslobađanje aktivnih komponenata iz čvrstih doziranih oblika
 - 1.2. Određivanje antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola
 - 1.3. Ispitivanje zdravstvene ispravnosti dijetetskih suplemenata u pogledu prisustva ostataka pesticida i toksičnih metala
2. Ispitivanje uticaja dijetetskog suplementa na glikemijski i lipidni status eksperimentalnih životinja
3. Razvoj metode ekstrakcije fenola iz praha komine grožđa, određivanje njihove koncentracije, antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola

Osnovni rezultati koji se očekuju (hipoteze):

- 1.1. Sadržaj resveratrola i drugih pojedinačnih fenola u dijetetskim suplementima nije u skladu sa deklariranim sadržajem, dok dozirane jedinice ne ispunjavaju zahteve farmakopeje u pogledu ujednačenosti mase i sadržaja, kao i brzine oslobađanja aktivnih komponenti
- 1.2. Dijetetski suplementi na bazi grožđa i japanskog troskota poseduju antioksidantni kapacitet
- 1.3. Dijetetski suplementi su zdravstveno ispravni u pogledu prisustva ostataka pesticida i toksičnih metala
2. Dijetetski suplement smanjuju nivo glukoze i lipida u krvi eksperimentalnih životinja
3. Komina grožđa sadrži znatnu količinu fenola grožđa i predstavlja njihov značajan izvor

4. MATERIJAL I METODE

Supstance i reagensi korišćeni u radu:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal - Sigma Aldrich (Nemačka)
- acetonitril UHPLC čistoće, min 99,9% - Panreac AppliChem (Nemačka)
- azotna kiselina (Trace Element Grade) (69%, Hiperpur) - Panreac AppliChem (Nemačka)
- destilovana voda, TKA water purification system tip 05.30C 7-DEN, Zavod za farmaciju, Novi Sad (Republika Srbija)
- etanol 96% - Zorka Pharm (Republika Srbija)
- *Folin Ciocalteu* fenolni reagens - Fluka Biochemika (Švajcarska)
- fruktoza 100% (Republika Srbija)
- galna kiselina, 99% - Alfa Aesar Lancaster Synthesis (SAD)
- glukoza 98% (Republika Srbija)
- heksan (Suprasolv) – Merck (Darmstadt, Nemačka)
- hidroksiaminhidrohlorid – Sigma-Aldrich (Nemačka)
- holesterol - Sigma Chemicals Co (SAD)
- holna kiselina - Sigma Chemicals Co (SAD)
- kalaj-hlorid - Sigma-Aldrich (Nemačka)
- kalijum permanganat – Sigma-Aldrich (Nemačka)
- limunska kiselina - Sigma Chemicals Co (SAD)
- maslinovo ulje Extra virgin Classico - Monini (Italija)
- metanol HPLC čistoće, min 99,8% - J.T. Baker (Holandija)
- metanol p.a. - Panreac AppliChem (Nemačka)
- mravlja kiselina, min 85% - Lach-Ner (Češka Republika)

- natrii chloridi infundibile, rastvor za infuziju, 0,9% - Hemofarm (Republika Srbija)
- natrijum karbonat anhidrovani, min 99,5% - Sinex laboratory (Republika Srbija)
- primarni sekundarni amin sorbent (PSA) – Supelco (Bellefonte, SAD)
- sirćetna kiselina p.a., min 99,5% - POCH (Poljska)
- streptozotocin - Sigma Chemicals Co (SAD)
- sumporna kiselina - Lach-Ner (Češka Republika) (Trace Element Grade)
- uretan - Sigma Chemicals Co (SAD)
- vodonik peroksid (Trace Element Grade)- AnalaR Normapur for traces analysis - VWR International

Za pripremu acetatnog pufera pH 4,5: koncentrovana sirćetna kiselina (99-100%) (J.T. Baker, Nemačka) i natrijum acetat (Lach-Ner, Češka)

Za pripremu smeše puferskih soli za ekstrakciju i razdvajanje kod QuEChERS metode: anhidrovani magnezijum sulfat (Merck, Darmstadt, Nemačka), natrijum hlorid (VWR Prolabo, Belgija), trinatrijum citrat dihidrat (Fisher Scientific, UK) i dinatrijum hidrogencitrat seskvihidrat (Merck, Darmstadt, Nemačka).

Standardne supstance: *trans*-resveratrol, galna kiselina, rutin hidrat, kafena kiselina, kvercetin dihidrat, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, benzoeva kiselina, hesperetin, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina, *trans*- cimetna kiselina, hlorogenska kiselina, naringenin, kempferol i (+)-katehin - Sigma Aldrich (Nemačka); malvidin-3-glukozid, cianin-3-glukozid hlorid i delfinidin-3- glukozid hlorid – AppliChem (Nemačka), petunidin-3- glukozid hlorid i peonidin 3- glukozid hlorid – Phytolab (Nemačka).

Instrumenti i aparatura korišćeni u radu:

- analitička vaga Radwag AS 60/C/2, 1mg-60g, 0,01mg (Poljska)

- atomski apsorpcioni spektrofotometar (AAS) - Pye Unicam SP9 (UK)
- atomski apsorpcioni spektrofotometar (AAS) - Thermo Scientific iCE 3000 Series sa grafitnom kivetom i autosemplerom GFS35 (SAD)
- centrifuga – Sigma 2-5 (Nemačka)
- gasni hromatograf (GC – Gass Chromatograph) - Agilent Technologies 6890N Series – model sa autosemplerom i masenim spektrometrom kao detektorom (MS)
- ultrazvučno kupatilo – Bandelin Sonorex (Nemačka)
- uređaj za ispitivanje rastvorljivosti: dissolution tester – Type DT 800, Erweka (Nemačka)
- UV/Vis spektrofotometar – Agilent 8453 (Nemačka)
- UV/Vis spektrofotometar – Olympus AU 400 (Nemačka)
- visoko efikasni tečni hromatograf (HPLC- High-Performance Liquid Chromatography) – Agilent 1100 Series – model sa binarnom pumpom, degaserom, autosemplerom i UV/Vis diode array detektorom (DAD)
- vorteks mikser – Vortex – genie 2, Scientific industries, INC. Bohemia, N.4. 11716, model: G-560 E (SAD)
- rotacioni vakuum uparivač - Laborota d4011 digital, Heidolph Instruments GmbH (Schwabach, Nemačka)
- mikrotalasna peć - Anton Paar Multiwave 3000 (SAD)
- vortex mikser – Vortex – genie 2, Scientific industries, INC. Bohemia, N.4. 11716, model: G-560 E (SAD)
- magnetna mešalica – Heidolph MR 3001 (Nemačka)
- blender – Bosch (Nemačka)
- membranski filteri 0,45 µm – Agilent Technologies (Delaware, Wilmington, SAD)

- aparat za merenje glikemije Accu-check Active – Roche (Švajcarska)

4.1. Analiza dijetetskih suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota

4.1.1. Uzorci dijetetskih suplemenata

Analizirano je ukupno 14 komercijalno dostupnih dijetetskih suplemenata koji se nalaze u slobodnom prometu na teritoriji Republike Srbije preko apoteka i interneta (**Tabela 1**).

Tabela 1. Pregled ispitanih dijetetskih suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota.

Supl.	Dozirani oblik	Sastav	Preporučena dnevna doza
1	tvrde kapsule	63 mg suvog ekstrakta semena grožđa (<i>Vitis vinifera</i>)	1-2 kapsule
2	tvrde kapsule	450 mg praha bobice crvenog grožđa (<i>Vitis Vinifera</i>) i 50 mg suvog ekstrakta crvenog vina (10:1), standardizovane na 47 mg ukupnih fenolnih jedinjenja	1 kapsula
3	tvrde kapsule	54,25 mg ekstrakta koštica grožđa (<i>Vitis Vinifera</i>) i 175 mg vitamina C	2 kapsule
4	tvrde kapsule	50 mg ekstrakta semena grožđa, standardizovanog na minimalno 95% proantocijanidina	1 kapsula
5	tvrde kapsule	162,5 mg grožđa u prahu i 87,5 mg ekstrakta komine grožđa	1 kapsula
6	tvrde kapsule	100 mg ekstrakta gljive <i>Ganoderma lucidum</i> , 30 mg ajkuline hrskavice u prahu, 130 mg matičnog mleča, 80 mg ekstrakta semenki grožđa (resveratrol), 80 mg ekstrakta zelenog čaja i 80 mg ekstrakta šipurka roze (vitamin C)	2 kapsule
7	tvrde kapsule	180 mg ekstrakta gljive <i>Ganoderma lucidum</i> , 25 mg ekstrakta mladica brokoliya (sulforafan), 160 mg matičnog mleča, 100 mg ekstrakta semenki grožđa (resveratrol), 35 mg ekstrakta paradajza (likopen)	2 kapsule
8	tvrde kapsule	20 mg biljke <i>Polygonum cuspidatum</i> (suvi ekstrakt standardizovan na najmanje 50% <i>trans</i> -resveratrola) i 40 mg lista <i>Ginkgo bilobae</i> (suvi ekstrakt (50:1) standardizovan na 24% flavonoida i 6% terpenskih laktona)	1-2 kapsule

Tabela 1. Nastavak

9	tvrde kapsule	20 mg biljke <i>Polygonum cuspidatum</i> (suvi ekstrakt standardizovan na najmanje 50% <i>trans</i> -resveratrola) i 30 mg koenzima Q10	1-2 kapsule
10	meke kapsule	20 mg resveratrola kroz ekstrakt biljke <i>Polygonum cuspidatum</i>	2-3 kapsule
11	tvrde kapsule	100 mg ekstrakta biljke <i>Polygonum cuspidatum</i> standardizovanog na 98% resveratrola i 100 mg vitamina C	1 kapsula
12	tvrde kapsule	100 mg ekstrakta resveratrola standardizovanog na 50% <i>trans</i> -resveratrola, 50 mg ekstrakta semena grožđa i 20 mg koenzima Q10	1 kapsula
13	kuglice	44,36 mg suvog ekstrakta korena biljke <i>Polygonum cuspidatum</i> standardizovanog na 98% resveratrola	4-6 kuglica
14	pastile	17 mg zaštićene mešavine resveratrola [<i>Polygonum cuspidatum</i> (standardizovan na 98% <i>trans</i> -resveratrola) i BioVin® ekstrakt crvenog vina (standardizovan na 5% <i>trans</i> -resveratrola)]	2 pastile

4.1.2. Određivanje ujednačenosti mase

Za svaki dijetetski suplement merena je masa 20 tableta/kapsula, pri čemu je masa kapsule predstavljala razliku mase cele kapsule i kapsule omotača. Izračunata je srednja vrednost mase tableta/kapsula, a zatim je odstupanje mase svake pojedinačne tablete/kapsule od srednje vrednosti mase izraženo u procentima (172).

4.1.3. Određivanje ujednačenosti sadržaja pojedinačnih fenola

Za svaki suplement vršeno je ispitivanje sadržaja pojedinačnih fenola za 10 tableta ili kapsula kako bi se mogla utvrditi ujednačenost njihovog sadržaja (172).

4.1.3.1. Priprema uzorka

Za 10 tableta/kapsula ekstrahovani su pojedinačni fenoli i određen je njihov sadržaj. Ekstrakcija je vršena sa 10 mL 80% metanola, 15 min na ultrazvučnom kupatilu. Nakon hlađenja rastvora,

isparena količina rastvarača nadoknađena je 80%-tnim metanolom do 10 mL i ekstrakti su razblaženi 10 puta sa 0,1%-tnim rastvorom sirćetne kiseline u vodi.

4.1.3.2. HPLC analiza

Dobijeni ekstrakti filtrirani su kroz membranske filtere (0,45 µm) u vijale i analizirani metodom visoko-efikasne tečne hromatografije, HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) (173). Kao kolona korišćena je reverzno-fazna Poroshell 120 EC-C18 kolona (4,6*100 mm, 2,7 µm; Agilent, SAD) sa gradijentnom elucijom (A- 0,1% CH₃COOH, B- 0,1% CH₃COOH u ACN). Kolona je termostatirana na 25°C, brzina protoka bila je 1,0 mL/min, a injekciona zapremina 5 µL. Za detekciju korišćen je *diode array* detektor (DAD) na 225, 280, 305, 330 i 360 nm. Pojedinačni fenoli su identifikovani na osnovu retencionog vremena i UV spektara odgovarajućih standardnih supstanci - *trans*-resveratrol, galna kiselina, rutin hidrat, kafena kiselina, kvercetin dihidrat, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, benzoeva kiselina, hesperetin, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina, *trans*-cimetna kiselina, hlorogenska kiselina, naringenin, kempferol i (+)-katehin. Za svaki standard konstruisane su kalibracione krive od pet tačaka sa koeficijentom korelacije $R^2 \geq 0,999$.

4.1.4. Ispitivanje rastvorljivosti dijetetskih suplemenata

Oslobađanje resveratrola iz šest tableta/kapsula određivano je testom rastvorljivosti (Aparatura 1 ili 2) (*British Pharmacopoeia 2012*) (**Tabela 2**) (172).

Tabela 2. Uslovi testa rastvorljivosti (*British Pharmacopoeia 2012*)

	metod	medijum	zapremina	broj obrtaja/min	uzorkovanje (min)
suplement 1-12	lopatice	acetatni pufer, pH 4,5	500 mL	100	45
suplement 13, 14	korpace	acetatni pufer, pH 4,5	500 mL	100	45

4.1.4.1. Ispitivanje rastvorljivosti kapsula

Ispitivano je po šest doznih jedinica svakog suplementa. Test disolucije vršen je na temperaturi od $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pri brzini mešanja od 100 rpm, metodom sa korpicama (Aparatura 1) u 500 mL pufera pH 4,5. Alikvoti rastvora su ručno uzorkovani nakon 45 minuta, potom su filtrirani kroz membranski filter u tamne vijale za HPLC analizu.

4.1.4.2. Ispitivanje rastvorljivosti tableta

Kod ispitivanja rastvorljivosti tableta korišćen je metod sa lopaticama (Aparatura 2), na temperaturi od $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pri brzini mešanja od 50 rpm u 500 mL pufera pH 4,5. Alikvoti rastvora su ručno uzorkovani nakon 45 minuta, nakon čega su filtrirani kroz membranski filter u tamne vijale za HPLC analizu.

4.1.4.3. HPLC analiza

HPLC analiza rađena je prema metodi opisanoj kod određivanja sadržaja pojedinačnih fenola suplemenata (173).

4.1.5. Određivanje antioksidantne aktivnosti

Antioksidantna aktivnost dijetetskih suplemenata određivana je spektrofotometrijski pomoću reakcije sa DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikalom (174). U niz epruveta dodavana je odgovarajuća rastuća količina uzorka (50-300 μL metanolnog ekstrakta suplementa), po 1000 μL etanolnog rastvora DPPH reagensa (90 μM), dok je etanol dodavan do 4000 μL . Epruvete su nakon stavljanja aluminijumske folije držane u mraku 1h, nakon čega je merena apsorbanca na 515 nm. Kapacitet hvatanja radikala (RSC) računat je za svaku koncentraciju, prema formuli $\text{RSC} = 100 - 100 \times [\text{A}_{\text{ekstrakt}}/\text{A}_{\text{slepa proba}}]$, gde je $\text{A}_{\text{ekstrakt}}$ predstavljao apsorbanču analiziranih uzoraka, a $\text{A}_{\text{slepa proba}}$ apsorbanču slepe probe. Blank rastvor bio je 95%-tni etanol, dok je slepu probu predstavljao 95%-tni etanol (3000 μL) i DPPH reagens (1000 μL). Kalibraciona kriva je konstruisana tako da RSC bude naspram koncentracije ekstrakata iz koje je računata 50%-tna inhibitorna koncentracija (IC_{50} , mg/mL) kao koncentracija ekstrakta neophodnog za dostizanje RSC vrednosti u iznosu od 50%.

4.1.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC – *total phenolic content*)

Sadržaj ukupnih fenola određivao se spektrofotometrijski *Folin-Ciocalteu* metodom korišćenjem galne kiseline kao standarda (175). Ista količina (100 μL) slepe probe (destilovana voda), standarda i ekstrakta uzorka dodana je u različite epruvete i tretirana na isti način. Nakon dodavanja 500 μL razblaženog *Folin-Ciocalteu* reagensa (odnos *Folin-Ciocalteu* reagens : voda = 1:10), epruvete su vorteksirane 6 s. Nakon 6 min dodato je 400 μL 7,5%-tnog rastvora Na_2CO_3 , epruvete su ponovo vorteksirane 6 sekundi, obložene aluminijumskom folijom i čuvane zaštićene od svetlosti 2 h. Apсорbanca je merena UV-spektrofotometrijom na 740 nm. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) po gramu proizvoda korišćenjem standardne krive galne kiseline.

4.1.7. Analitička metoda za analizu ostataka pesticida

Za određivanje ostataka pesticida primenjena je tehnika gasne hromatografije sa selektivnim detektorom masa (GC-MS), nakon pripreme uzoraka QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) metodom, prema standardu EN 15662 (176).

4.1.7.1. Priprema uzoraka- QuEChERS metoda (176)

Reagensi: Acetonitril i heksan, magnezijum sulfat anhidrovani, natrijum hlorid, dinatrijum hidrogencitrat seskvihidrat, trinatrijum citrat dihidrat, primarni sekundarni amin sorbent (PSA), mravlja kiselina.

Smeša puferskih soli za ekstrakciju i razdvajanje: $4 \pm 0,2$ g magnezijum sulfata anhidrovanog, $1 \pm 0,05$ g natrijum hlorida, $1 \pm 0,05$ g trinatrijum citrat dihidrata i $0,5 \pm 0,03$ g dinatrijum hidrogencitrata seskvihidrata (soli odmerene u plastičnu kivetu).

Aparati i pribor: Uobičajeni laboratorijski aparati, i posebno sledeće: oprema za usitnjavanje uzorka, vaga, polipropilenske kivete za centrifugu zapremina 15 i 50 mL, vorteks, automatske pipete pogodne za rad sa zapreminama od 10 μ L do 100 μ L i 200 μ L do 1000 μ L, graduisane staklene pipete od 1, 5 i 10 mL, centrifuga, rotacioni vakuum uparivač, viali od 2 mL za GC autosampler.

Postupak: Prvi ekstrakcioni korak: odmereno je $5 \pm 0,1$ g usitnjenog homogenog uzorka u kivetu za centrifugu od 50 mL. Dodano je 10 mL dejonizovane vode i 10 mL acetonitrila. Kiveta je zatvorena i snažno mućkana tokom 1 min. Uzorci su ohlađeni na temperaturu od $+4^{\circ}\text{C}$ pre dodatka smeše puferskih soli.

Drugi ekstrakcioni korak i razdvajanje: dodana je pripremljena smeša puferskih soli suspenziji dobijenoj u prvom ekstrakcionom koraku. Kiveta je zatvorena, odmah snažno mućkana tokom 1 min i centrifugirana tokom 5 min na 3500 g.

Prečišćavanje (disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi, d-SPE): alikvot 6 mL acetonitrilne faze dobijene u drugom ekstrakcionom koraku prenet je u kivetu za centrifugiranje u kojoj se nalazilo 150 mg PSA i 900 mg magnezijum sulfata. Kiveta je zatvorena, snažno mućkana tokom 30 sekundi i centrifugirana tokom 5 min na 3500 g. Alikvot 4 mL bistrog ekstrakta je odmah odvojen i zakišeljjen dodatkom 40 μ L 5%-tne mravlje kiseline u acetonitrilu, u balonu za uparavanje.

Koncentrovanje ekstrakta: ekstrakt je uparen skoro do suva i izmeren rastvarač sa heksanom, tako da konačna zapremina ekstrakta iznosi 1 mL. Ekstrakt je prenet u autosampler vial.

4.1.7.2. GC-MS metoda

Primenjena je TRI_PEST metoda (Agilent) sa zaključanim retencionim vremenom (*Retention Time Locked*, RTL) za hlorpirifos metil na 16,596 min, na gasnom hromatografu Agilent Technologies 6890N Series, sa autosemplerom Agilent Technologies 7686B Series injector i analitičkom kolonom HP-5MSi 5% Phenyl Methyl Siloxane Capillary 30,0m*250 μ m*0,25 μ m, pri sledećim uslovima rada hromatografa: inlet splitless; noseći gas helijum, 99,9999%; inlet pritisak 24,14 psi; inlet temperatura 250°C; injekciona zapremina 1 μ L, temperaturni program za kolonu: početna temperatura 70°C sa vremenom zadržavanja 2 min, zagrevanje sa 25°C/min do 150°C, zagrevanje sa 3°C/min do 200°C, zagrevanje sa 8°C/min do 280°C i vreme zadržavanja 10 min (vreme analize 41,9 min). Kao detektor korišćen je maseni spektrometar Agilent Technologies 5973 Series, pri sledećim uslovima rada: temperatura izvora 230°C; temperatura kvadropola 150°C. SIM (*Selected Ion Monitoring*) metoda uključila je po 1 kvantifikacioni i 2 identifikaciona

jona za svaki pesticid. Analiza prikupljenih podataka sprovedena je korišćenjem softvera MSD ChemStation D.02.00275.

Primenjena metoda obuhvatila je ostatke 57 odabranih pesticida iz grupa organohlornih, organofosfornih, azotnih pesticida i triazina (*organohlorni pesticidi*: α -HCH, β -HCH, lindan, δ -HCH, heptahlor, heptahlorepoxid, aldrin, dieldrin, endrin, *cis*-hlordan, *trans*-hlordan, nonahlor *trans*, endosulfan I, endosulfan II, endosulfansulfat, DDE, DDD, DDT, hlorobenzilat, metoksihlor, hlorotaldimetil, *cis*-permetrin, *trans*-permetrin; *organofosforni pesticidi*: mevinfos, etoprofos, hlorpirifos, tetrahlorvinfos. *azotni pesticidi*: difenamid, napropamid, pabulat, tebutiuron, molinat, cikloat, propahlor, hlorprofam, pronamid, terbacil, alahlor, metolahlor, triadimefon, butahlor, fenarimol, bromacil, trifluralin, norflurazon, fluridon; *triazini*: atraton, atrazin, prometon, propazin, prometrin, terbutrin, simetrin, ametrin, cianazin, heksazinon, simazin).

Metoda je okarakterisana sledećim karakteristikama izvođenja: limit kvantifikacije od 0,01 mg/kg, prinos i preciznost u skladu sa zahtevima definisanim za metode za određivanje ostataka pesticida u hrani, datim u vodiču SANTE/11945/2015 (177) (prinos 70-120%; preciznost kao RSD<20%), opseg linearnosti od 10-2000 ng/mL. Proširena merna nesigurnost određivanja procenjena je na 50%.

4.1.8. Analitičke metode za određivanje toksičnih metala

Analiza toksičnih metala obuhvatila je olovo (Pb), kadmijum (Cd) i živu (Hg), za koje je dozvoljeni sadržaj u dijetetskim suplementima regulisan zakonskim aktima (2).

Analiza je urađena tehnikom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), za olovo i kadmijum sa grafitnom peći (GF AAS) nakon mikrotalasne digestije, prema standardnoj metodi SRPS EN 14084:2008 (178), odnosno za živu sa generisanjem hladnih para (CV AAS).

4.1.8.1. Analiza olova i kadmijuma (178)

Za pripremu uzorka mikrotalasnom digestijom korišćena je mikrotalasna peć Anton Paar Multiwave 3000. Postupak pripreme: deo homogenizovanog uzorka mase 0,5 g prenet je u posudu za digestiju (teflonska kiveta) i zatim dodato 4 mL azotne kiseline, 1 mL hlorovodonične kiseline i 2 mL vodonik peroksida (reagensi kvaliteta Trace Element Grade). Posude za digestiju postavljene su u rotor i mikrotalasnu peć i pokrenut je odgovarajući program za digestiju (snaga 1200 W, p-rate: 0,5 bar/s IR: 210°C p: 40 bar). Nakon završene digestije posude za digestiju izvučene su iz mikrotalasne peći i ostavljene da se sasvim ohlade pre otvaranja. Nakon otvaranja poklopci i zidovi posude isprani su dejonizovanom vodom u plastični normalni sud od 25 mL i dopunjeni dejonizovanom vodom do crte.

Instrumentalna analiza urađena je na instrumentu AA spektrofotometar Thermo Scientific iCE 3000 Series sa grafitnom kivetom i autosemplerom GFS35. Parametri spektrometra: apsorbanacija na talasnoj dužini od 283,3 nm za olovo, odnosno 228,8 nm za kadmijum. Parametri grafitne peći: tip kivete ELC (Omega platform – L'vov). Za olovo: temperaturni program: 100°C 30 sec, rampa 10°C/sec, 450°C 20 sec, rampa 15°C /sec, 1900°C 3 sec, 2500°C 3 sec; zapremina uzorka 20,0 µL; matriks modifikator amonijum dihidrogen fosfat-magnezijum nitrat. Za kadmijum: temperaturni program: 100°C 30 sec, rampa 10°C/sec, 300°C 20 sec, rampa 150°C /sec, 1250°C 3 sec, 2500°C 3 sec; zapremina uzorka 20,0 µL; matriks modifikator: ne.

Metoda je okarakterisana sa limitom kvantifikacije od 0,01 mg/kg za Pb i 0,01 mg/kg za Cd, kao i opsegom linearnosti od 2-20 µg/L (u 0,1 M HNO₃) za olovo i 0,4-4 µg/L (u 0,1 M HNO₃) za kadmijum.

4.1.8.2. Analiza žive

Postupak pripreme uzoraka: odmereno je 1,0 g homogenizovanog uzorka u erlenmajer sa šlifom od 250 mL. Dodano je 5 mL cc H₂SO₄ (Trace Element Grade) i ostavljeno na 70°C 1 sat u dobro zatvorenom erlenmajeru. Nakon hlađenja do sobne temperature i uz stalno hlađenje dodano je 50 mL 6%-tnog KMnO₄ i ostavljeno na 70°C još 2 sata u dobro zatvorenom erlenmajeru. Neposredno pre određivanja dodano je 15 mL 20%-tnog hidroksiaminhidrohlorida i 5 mL dejonizovane vode.

Instrumentalna analiza urađena je na atomskom apsorpcionom spektrofotometru Pye Unicam SP9, na talasnoj dužini 253,8 nm. Postupak određivanja: u erlenmajer sa šlifom za generisanje hladnih para kvantitativno je prenet pripremljen uzorak za određivanje, dodano 2 mL 10%-tnog SnCl₂ u HCl i odmah uronjen barboter (vazduh). Nakon 1 minuta očitana je vrednost apsorbance.

Metoda je okarakterisana sa limitom kvantifikacije od 0,01 mg/kg, kao i opsegom linearnosti od 0,3-2 µg/L.

4.2. Razvoj metode ekstrakcije fenola iz komine grožđa i analiza dobijenih ekstrakata

4.2.1. Uzorci komine grožđa

Razvoj metode ekstrakcije fenola iz komine grožđa i analiza dobijenih ekstrakata uključio je pet različitih komina grožđa dobijenih nakon proizvodnje vina od *Merlot* i *Cabernet* sorti crvenog grožđa sa teritorije Republike Srbije.

4.2.2. Priprema uzoraka komine grožđa

Nakon sušenja uzoraka komine grožđa na sobnoj temperaturi (25°C) u periodu od tri dana, sledilo je sitnjenje u blenderu do postizanja praškaste konzistencije. Sa dobijenim prahovima komine grožđa rađen je razvoj metode ekstrakcije.

4.2.3. Razvoj metode ekstrakcije fenola iz komine grožđa

Kao ekstrakciona metoda odabrana je čvrsto- tečna ekstrakcija uz pomoć ultrazvučnog zračenja. Ekstrakcija je sprovedena u četiri ekstrakciona protokola, gde je maseni odnos između rastvarača i uzorka bio podešen na 50:1, temperatura vode u ultrazvučnom kupatilu 56°C, a vreme ekstrakcije 30 min.

Protokoli su se razlikovali prema ekstrakcionim medijumima:

Ekstrakcioni protokol 1- 3 g/L limunske kiseline u vodi

Ekstrakcioni protokol 2- 3 g/L limunske kiseline u 53%-tnom etanolu

Ekstrakcioni protokol 3- 53%-tni etanol

Ekstrakcioni protokol 4- 3 g/L limunske kiseline u 80%-tnom etanolu.

Kao poredbeni rastvarač za jednu vrstu komine koristio se metanol sa i bez dodatka limunske kiseline pri istim uslovima ekstrakcije. Nakon pripreme uzoraka komine za svaki ekstrakcioni medijum odmerena je na analitičkoj vagi odgovarajuća masa komine (0,2 g) kako bi odnos rastvarača i komine bio 50:1, a koncentracija uzorka komine 0,02 g/mL. Odmerene mase komine su potom kvantitativno prenete u normalne sudove od 10 mL koji su punjeni do crte ekstrakcionim medijumom i komine su rastvarane u odgovarajućem rastvaraču na magnetnoj mešalici u trajanju od 5 min. Nakon toga, normalni sudovi su postavljeni u ultrazvučno kupatilo i držani 30 min na

56°C. Nakon perioda hlađenja, nadoknađena je količina rastvarača koja je isparila, ekstrakti su filtrirani kroz membranske filtere (0,45 µm) i analizirani predviđenim testovima.

4.2.4. Određivanje pojedinačnih fenola

Pojedinačni fenoli u uzorcima komina grožđa određivani su HPLC metodom po istom postupku za određivanje pojedinačnih fenola opisanom kod ispitivanja dijetetskih suplemenata (173).

4.2.5. Određivanje antocijana

Za određivanje antocijana korišćena je HPLC metoda (173). Od antocijana određivani su delfinidin-3-glc, cijanidin-3-glc, petunidin-3-glc, peonidin-3-glc i malvidin-3-glc. Za gradijentnu eluciju na reverzno-faznoj Poroshell 120 EC-C18 koloni (4,6*100 mm, 2,7µm; Agilent, SAD) mobilnu fazu činile su mešavine destilovane vode, mravlje kiseline i acetonitrila u različitim odnosima (A- 87:10:3; B- 40:10:50) pri protoku od 0,8 mL/min, vremenu analize od 35 min i injekcionom zapreminom od 100 µL. Za detekciju antocijana na 518 nm korišćen je *diode array* detektor (DAD).

4.2.6. Određivanje antioksidantne aktivnosti

Antioksidantna aktivnost uzoraka komina grožđa određivana je spektrofotometrijski po istom postupku opisanom kod ispitivanja dijetetskih suplemenata (174).

4.2.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) određivan je spektrofotometrijski po istom postupku opisanom kod ispitivanja dijetetskih suplemenata (175).

4.3. Optimizacija ekperimentalnih faktora ekstrakcije fenola iz komine grožđa

Komina grožđa koja je pokazala najveću antioksidantnu aktivnost i najviši sadržaj ukupnih fenola (TPC) odabrana je za optimizaciju ekperimentalnih faktora ultrazvučne ekstrakcije.

4.3.1. Priprema uzorka

Nakon sušenja komine grožđa na sobnoj temperaturi (25°C) tokom tri dana, sledeći korak bio je mlevenje komine u blenderu do praškaste konzistencije.

4.3.2. Postupak ekstrakcije

Nakon pripreme uzorka, odgovarajuća masa komine odmerena je na analitičkoj vagi i kvantitativno prenetu u volumetrijske tikvice od 10 mL, koje su zatim punjene odgovarajućim ekstrakcionim medijumom. Nakon toga, volumetrijske tikvice su stavljane u ultrazvučno kupatilo i držane propisano vreme na odgovarajućoj temperaturi (**Tabeli 3 i Tabela 4**). Nakon hlađenja, ekstrakti su filtrirani kroz membranski filter (0,45 μ m) i analizirani.

4.3.3. Eksperimentalni dizajn

MODDE 10.0 softver (Umetrics, Umea, Švedska) korišćen je za optimizaciju ekperimentalnih faktora. Kroz set 11 planiranih eksperimenata (*Placket Burman* dizajn) dva prvobitno ispitivana ekperimentalna faktora bila su: koncentracija rastvarača (x_1) u rasponu od 0% (tj. 100% vode) do 80% etanola u vodi i maseni odnos uzorka i rastvarača (x_2) u rasponu od 1:10 (tj. 1 g uzorka na 10 mL rastvarača) do 1:60 (tj. 1 g uzorka na 60 mL rastvarača), koristeći konstantne druge faktore ekstrakcije iz literature: 55°C, 30 min (**Tabela 3**). Raspon je definisan na osnovu naučne pozadine, praktičnih i finansijskih razloga u vezi samog procesa ekstrakcije. Prethodni radovi su pokazali da

je maksimalna koncentracija etanola u vodi koja se koristi za ekstrakciju fenola iz grožđa komine bila 80%, a odnos uzorka i rastvarača 1:60 (164).

Za konačnu optimizaciju metode primenjen je set od 17 planiranih eksperimenata u okviru CCF (2^3 full factorial Central Composite Face) dizajna (**Tabela 4**). Tri optimizovana eksperimentalna faktora bila su: pH vrednost (x1) od 3 do 6, temperatura ekstrakcije (x2) od 30 do 60°C i vreme ekstrakcije (x3) od 10 do 60 min korišćenjem koncentracije rastvarača i masenog odnosa uzorka i rastvarača koji su dali najbolje rezultate u inicijalnoj optimizaciji. Podaci iz literature pokazali su da je fenolni ekstrakt dobijen na pH 4,5 imao veći prinos ukupnih i pojedinačnih fenola i bolji antioksidantni kapacitet u odnosu na ekstrakt dobijen na nižoj pH vrednosti (179). Napred navedeni pH (4,5) postavljen je kao srednja vrednost odabranog opsega u okviru ovog rada. Kako je limunska kiselina slaba organska kiselina i može efikasno da održava pH vrednost od 3 do 6,2, zadano je da opseg ispitivanja bude od pH 3-6 (180). Više temperature oštećuju fenolna jedinjenja i uzrokuju gubitak u prinosu (181, 182), pa je maksimalna temperatura postavljena na 60°C kako bi se sprečila denaturacija fenola. Vreme ekstrakcije bilo je ograničeno na 60 min zbog praktičnih razloga i ukupnih troškova procesa ekstrakcije zavisnih od vremena.

Tabela 3. Procena antioksidantne aktivnosti (y_1) i sadržaja ukupnih fenola (y_2) tokom inicijalnog ispitivanja faktora ekstrakcije korišćenjem *Placket Burman* dizajna eksperimenata; jedan uzorak za različite eksperimentalne faktore: koncentracija etanola (x_1) i odnos uzorak / rastvarač (x_2)

Eks. no.	Experimentalni faktori		Deskriptori efikasnosti ekstrakcije*	
	x_1 (c(etanola), %)	x_2 (uzorak/rastvarač odnos, w/V)	y_1 Antioksidantna aktivnost (IC ₅₀ , µL/mL)	y_2 Sadržaj ukupnih fenola (Total phenolic content -TPC, mg GAE/L)
no.1	80	10	0,55 ± 0,04	2280 ± 36
no.2	80	60	0,51 ± 0,05	2542 ± 19
no.3	80	60	0,41 ± 0,04	2661 ± 23
no.4	0	60	1,80 ± 0,14	910 ± 11
no.5	80	10	0,59 ± 0,12	2302 ± 16
no.6	0	60	1,76 ± 0,22	908 ± 28
no.7	0	10	3,16 ± 0,28	809 ± 12
no.8	0	10	3,35 ± 0,30	806 ± 17
no.9	40	35	0,44 ± 0,07	2686 ± 37
no.10	40	35	0,43 ± 0,07	2702 ± 42
no.11	40	35	0,42 ± 0,05	2799 ± 56

*rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD ($n=3$)

Tabela 4. Procena antioksidantne aktivnosti (y_1) i sadržaja ukupnih fenola (y_2) tokom optimizacije faktora ekstrakcije korišćenjem CCF (2^3 full factorial Central Composite Face) dizajna za različite eksperimentalne faktore: pH vrednost (x_1), temperatura ekstrakcije (x_2) i vreme ekstrakcije (x_3)

Eks.no.	Experimentalni faktori			Deskriptori efikasnosti ekstrakcije*	
	x_1 pH vrednost	x_2 Temperatura (°C)	x_3 Vreme (min)	y_1 Antioksidantna aktivnost (IC ₅₀ , µL/mL)	y_2 Sadržaj ukupnih fenola (Total phenolic content-TPC, mg GAE/L)
no.1	3	30	10	0,91 ± 0,01	1841 ± 35
no.2	6	30	10	0,64 ± 0,05	2253 ± 41
no.3	3	60	10	0,48 ± 0,06	3077 ± 32
no.4	6	60	10	0,35 ± 0,03	2177 ± 16
no.5	3	30	60	0,76 ± 0,05	2842 ± 17
no.6	6	30	60	0,62 ± 0,07	2512 ± 24
no.7	3	60	60	0,52 ± 0,58	3236 ± 52
no.8	6	60	60	0,31 ± 0,04	2300 ± 14
no.9	3	45	35	0,45 ± 0,06	3006 ± 18
no.10	6	45	35	0,32 ± 0,05	2400 ± 11
no.11	4,5	30	35	0,50 ± 0,09	2518 ± 27
no.12	4,5	60	35	0,36 ± 0,03	3148 ± 33
no.13	4,5	45	10	0,39 ± 0,06	3412 ± 31
no.14	4,5	45	60	0,37 ± 0,05	3706 ± 48
no.15	4,5	45	35	0,36 ± 0,03	3736 ± 26
no.16	4,5	45	35	0,35 ± 0,02	3677 ± 29
no.17	4,5	45	35	0,34 ± 0,03	3677 ± 61

*rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD ($n=3$)

Značajnost faktora procenjena je računanjem faktorskih koeficijenata (b) odgovarajućeg polinoma datog u jednačinama (1) za *Placket Burman* dizajn i (2) za CCF dizajn DoE (*Design of Experiments*):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_Nx_N \quad (1)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_Nx_N + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + \dots + b_{(N-1)N}x_{N-1}x_N + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + \dots + b_{NN}x_n^2 \quad (2)$$

gde je x eksperimentalni faktor, i predstavlja procenjeni odgovor, b_0 je prosečni eksperimentalni odgovor, koeficijenti b_N su procenjeni efekti faktora, koeficijenti $b_{(N-1)N}$ su termini interakcije, a b_{NN} su termini drugog reda.

4.3.4. Određivanje pojedinačnih fenola

Pojedinačni fenoli u uzorcima komina grožđa određivani su HPLC metodom po istom postupku za određivanje pojedinačnih fenola opisanog kod ispitivanja dijetetskih suplemenata (173).

4.3.5. Određivanje antocijana

Antocijani su određivani na način prethodno opisan kod razvoja metode ekstrakcije fenola iz komine grožđa (173).

4.3.6. Određivanje antioksidantne aktivnosti

Antioksidantna aktivnost uzoraka komina grožđa određivana je spektrofotometrijski po istom postupku opisanom kod ispitivanja dijetetskih suplemenata (174).

4.3.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) određivan je spektrofotometrijski po istom postupku opisanom kod ispitivanja dijetetskih suplemenata (175).

4.4. Ispitivanje uticaja suplementacije na glikemijski i lipidni status eksperimentalnih životinja (Farmakodinamska ispitivanja)

4.4.1. Komercijalni dijetetski suplement resveratrola (suplement 13)

Tokom ogleda korišćen je komercijalni dijetetski suplement na bazi resveratrola za ljudsku upotrebu koji se nalazi u slobodnoj prodaji na teritoriji Republike Srbije. Predhodno je utvrđeno da je suplement zadovoljio zahtev Britanske farmakopeje za ujednačenost sadržaja *trans*-resveratrola. Preparat je imao 150 doznih jedinica, a svaka jedinica sadržala je 44,36 mg suvog ekstrakta korena japanskog troskota (*Polygonum cuspidatum*) standardizovanog na min 98% (m/m) *trans*-resveratrola. Preporučena dnevna doza je 4-6 jedinica za osobe koje pate od gojaznosti, dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, karcinoma i osteoporoze. Doza suplementa korišćena za pacove dobijena je na osnovu preporučene dnevne doze FDA za muškarce sa standardnom telesnom masom od 70 kg (183). Suplement je suspendovan u fiziološkom rastvoru i davan *per os* eksperimentalnim životinjama u dnevnoj dozi od 20 mg/kg telesne mase tokom 7 ili 30 dana u zavisnosti od tipa eksperimenta.

4.4.1.1. Priprema uzoraka

Standardni rastvori *trans*-resveratrola pripremljeni su u čistom metanolu, u rasponu koncentracija od 2,5 do 40 mg/L ($R^2=0,999$). Nakon sitnjenja do praha (pulverizacije) jedne dozne jedinice suplementa, primenjena je ultrazvučna ekstrakcija sa 80% metanolom (10 mL). Nakon 15 minuta ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani kroz membranski filter (0,45 μ m) i analizirani na sadržaj *trans*-resveratrola i antioksidantnu aktivnost. Sve analize su rađene u triplikatu.

4.4.1.2. HPLC metoda za određivanje sadržaja trans-resveratrola

Za kvantifikaciju *trans*-resveratrola primenjena je metoda visoko-efikasne tečne hromatografije, opisana kod analize pojedinačnih fenola u dijetetskim suplementima (173).

4.4.1.3. Određivanje antioksidantne aktivnosti

Antioksidantna aktivnost analiziranog dijetetskog suplementa određivana je prethodno kod ispitivanja dijetetskih suplemenata (174).

4.4.2. Postupci na životinjama

Trideset šest muških belih pacova soja *Wistar*, težine 250-300 g, starih 10 nedelja, nabavljeno je za potrebe ispitivanja od Vojno-tehničkog instituta u Beogradu. Životinje su boravile u UNI Protect (Ehret, Emmendingen, Nemačka) ormanima na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. U ormanima je temperatura vazduha održavana između 20 i 25°C, uz kontrolu vlažnosti vazduha i održavanje cirkadijalnog ritma (smena dana i noći u trajanju od 12 h). Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure sprovedene su u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje oglada odobrila je Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost sa planom ovog ispitivanja (broj odobrenja 323-07-10109/2015-05).

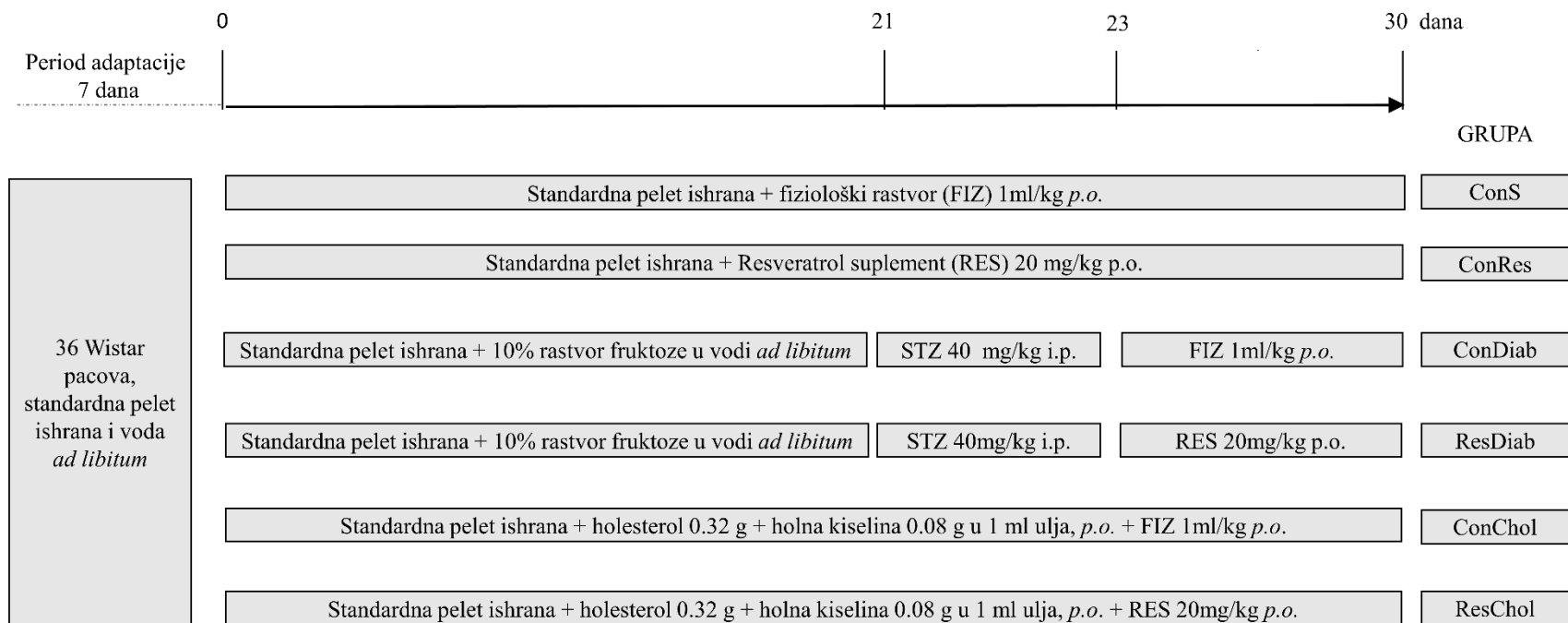
4.4.2.1. Eksperimentalni protokol

Tokom nedelju dana prilagođavanja koje je prethodilo eksperimentima, životinje su imale neograničen pristup vodi i peletiranoj hrani. Nakon toga, životinje su nasumično izabrane u šest grupa od šest životinja ($n=6$). Dve grupe činile su zdrave jedinke, dve su činile dijabetični pacovi,

dok su u preostale dve grupe bili pacovi sa indukovanom hiperlipoproteinemijom što je prikazano u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Podela eksperimentalnih životinja unutar grupa

	Grupa	Broj životinja
1.	Kontrolni pacovi tretirani fiziološkim rastvorom (1 mL/kg) <i>per os</i> tokom 30 dana (ConS), hranjeni standardnom ishranom na pelet	6
2.	Kontrolni pacovi tretirani vodenim rastvorom resveratrola (20 mg/kg) tokom 30 dana (ConRes), hranjeni standardnom ishranom na pelet	6
3.	Dijabetični pacovi (ConDiab). Standardna ishrana na pelet, 10%-tni rastvor fruktoze u vodi za piće i 40 mg/kg t.m. streptozotocina	6
4.	Dijabetični pacovi (standardna ishrana na pelet, 10%-tni rastvor fruktoze u vodi za piće i 40 mg/kg t.m. streptozotocina) tretirani dijetetskim suplementom na bazi resveratrola (20 mg/kg) u vodenom rastvoru <i>per os</i> tokom 7 dana (ResDiab).	6
5.	Hiperholesterolemični pacovi (ConChol). Standardna ishrana na pelet uz dodatak holesterola, tretirani fiziološkim rastvorom (1 mL/kg) <i>per os</i> tokom 30 dana.	6
6.	Hiperholesterolemični pacovi, hranjeni standardnom ishranom na pelet uz dodatak holesterola tretirani dijetetskim suplementom na bazi resveratrola (20 mg/kg) u vodenom rastvoru <i>per os</i> tokom 30 dana (ResChol).	6
		Ukupno 36



Shema 3. Pregled eksperimentalnog protokola

4.4.2.2. Indukcija dijabetes melitusa

Dijabetes melitus tip 2 izazvan je kombinacijom ishrane bogate fruktozom i streptozotocina. Nakon perioda adaptacije, životinje su tokom tri nedelje hranjene standardnom pelet ishranom i vodom koja je sadržavala 10% fruktoze *ad libitum* (184). Nakon toga, streptozotocin rastvoren neposredno pre primene u citratnom puferu, dat je u jednoj dozi od 40 mg/kg. Nakon 48 sati, krv iz repne vene uzeta je za merenje nivoa glukoze i potvrdu dijabetesa. Životinje sa glikemijom većom od 15 mmol/L uključene su u dodatno ispitivanje. Krv iz repne vene uzeta je na početku i na kraju eksperimenata (185).

4.4.2.3. Indukcija hiperlipidemije

Hiperlipidemija je indukovana hranjenjem životinja standardnom pelet ishranom uz dodatak holesterola tokom 30 dana. Životinje koje su imale neograničen pristup hrani i vodi dobijale su oralno holesterol i holnu kiselinu, kao pojačivač apsorpcije, rastvorene u maslinovom ulju. Svaka životinja dobila je oko 1 mL ulja koji sadrži 0,32 g holesterola i 0,08 g holne kiseline, a tačna zapremina ulja je prilagođavana nedeljnim merenjima mase životinja (186).

4.4.2.4. Test opterećenja glukozom (OGTT)

Poslednjeg dana eksperimenta, test opterećenja glukozom (OGTT) izveden je na pacovima koji su gladovali preko noći. Glukoza (2 g/kg) davana je 30 min nakon tretmana fiziološkom rastvorom ($n=6$) ili dijetetskim suplementom ($n=6$). Nivo glukoze u krvi je meren 0, 30, 60 i 120 min nakon testa opterećenja glukozom. Koncentracija glukoze određivana je iz repne vene korišćenjem glukoza oksidaza-peroksidaza reaktivnih traka i glukometra (Accu-Chek, Roche Diagnostics, SAD). Nakon završetka OGTT eksperimenta, sve životinje su anestezirane 25%-tnim vodenim rastvorom uretana (0,75 g/kg) intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su

žrtvovane kardiopunkcijom i uzeti su uzorci krvi za dalje testove (187). Uzorci krvi su centrifugirani 10 minuta pri 6000 obrtaja u minuti, nakon čega je supernatant pipetiran i prebačen u nove, pravilno obeležene, mikroeprovete. Do analitičke obrade, uzorci su držani u zamrzivaču na temperaturi od -20°C (188).

4.4.3. Analitičke metode

Koncentracija glukoze određena je pomoću komercijalnih kitova na uređaju Accu-check Active (Roche, Basel, Švajcarska). Glukoza u krvi je merena je 6 sati nakon posta. Serumi su korišćeni za biohemijske analize ukupnog holesterola, triacilglicerola, LDL-holesterola i HDL-holesterola. Ukupni holesterol je određen metodom CHOD-POD (holesterol / oksidaza / peroksidaza), a triacilgliceroli GPO-POD (glicerol-3-fosfat / oksidaza / peroksidaza) metodom. HDL-holesterol je određen metodom CHE-CHO-POD (holesterol / esteraza / oksidaza / peroksidaza), a LDL-holesterol metodom od Friedewald-a (189). Da bi se pratila funkcija bubrega, u serumu su mereni urea, kreatinin i mokraćna kiselina, dok su aktivnosti aspartat transaminaze (AST), alanin transaminaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP) u serumu merene kao markeri funkcije jetre. Analize su rađene na spektrofotometru Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka) standardnim IFCC metodama (Međunarodna federacija kliničke hemije). Sve životinje bile su podvrgnute merenju telesne mase neposredno pre i nakon završetka eksperimenta.

4.4.4. Statistička analiza

Statistička analiza rađena je korišćenjem statističkog softvera IBM SPSS, verzija 19.0 (IBM SPSS, Čikago, IL, SAD). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (SD). Za poređenje telesne mase korišćen je Studentov t-test parova. Za poređenje eksperimentalnih grupa korišćena je jednostrana analiza varijanse (ANOVA) ili Kruskal-Wallis-ov test. Post-hoc

ispitivanje za ANOVU rađeno je pomoću Tukey-ovog testa. Mann-Whitney U test korišćen je za post-hoc testiranje u Kruskal-Wallis-ovoj analizi. Sve razlike smatrane su statistički značajnim za p vrednost manju od 0,05 ($p < 0,05$).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Analiza dijetetskih suplemenata

5.1.1. Ujednačenost mase doziranih jedinica

Rezultati ispitivanja ujednačenosti mase doziranih jedinica dijetetskih suplemenata prikazani su u **Tabeli 6** i **Tabeli 7**.

Uniformnost mase određivana je prema *British Pharmacopoeia 2012, Volume V, Appendix XII C. Consistency of Formulated Preparations (Ph. Eur. method 2.9.5)* (172). Kako ne više od dve individualne mase smeju da odstupaju od zahteva naznačenog u **Tabeli 7**, a ni jedna ne sme da odstupa duplo od naznačenog zahteva, od 14 ispitanih suplemenata samo suplementi **5** i **9** nisu odgovarali farmakopejskom kriterijumu za ispitivanje ujednačenosti mase doziranih jedinica.

Tabela 6. Mase kapsula/tableta (mg) dijetetskih suplemenata

kapsula/tableta	supl. 1	supl. 2	supl. 3	supl. 4	supl. 5	supl. 6	supl. 7
	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)
1	504,6	520,0	357,2	199,4	274,5	505,1	532,9
2	491,9	509,6	361,3	195,3	199,9	514,8	507,5
3	512,7	513,8	347,7	194,7	223,1	527,1	533,4
4	468,7	520,0	362,8	194,8	235,5	512,3	529,9
5	501,6	510,6	347,8	196,6	223,4	518,2	523,0
6	518,2	502,5	358,0	199,3	232,7	526,0	474,8
7	501,1	523,8	367,1	190,7	238,9	522,4	507,2
8	527,5	511,2	347,9	200,3	235,1	518,4	507,8
9	490,0	525,6	371,6	200,0	267,7	522,2	493,6
10	508,0	531,3	357,2	197,8	255,4	514,5	526,7
11	505,2	524,6	359,4	198,3	244,5	516,5	523,1
12	499,9	456,5	355,6	194,3	237,3	521,6	488,3
13	495,4	475,1	347,0	195,0	245,2	513,1	476,4
14	521,2	534,0	350,3	195,3	249,8	519,7	516,3
15	483,5	525,4	349,7	196,5	206,2	509,0	525,6
16	482,8	526,9	353,0	190,5	219,0	516,7	521,6
17	505,4	501,7	359,7	191,3	224,0	514,4	536,4
18	508,3	483,4	356,0	203,7	241,7	516,6	482,3
19	509,7	470,0	358,7	197,0	235,9	528,7	527,7
20	496,4	483,2	352,9	195,1	277,3	508,1	518,1
Xsr	501,6	507,5	356,0	196,3	238,3	517,3	512,6
SD	±14,0	±22,4	±6,7	±3,3	±20,3	±6,3	±19,6

Tabela 6. Nastavak

kapsula/tableta	supl. 8	supl. 9	supl. 10	supl. 11	supl. 12	supl. 13	supl. 14
	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m kaps. (mg)	m tabl. (mg)	m tabl. (mg)
1	366,8	330,3	501,2	347,3	528,8	145,9	152,8
2	325,8	374,3	495,0	325,2	538,6	150,5	158,6
3	352,5	339,4	501,1	346,7	549,3	169,2	161,4
4	341,8	343,4	512,1	330,5	545,1	154,0	158,0
5	346,1	345,3	505,9	336,3	553,9	150,5	158,8
6	374,5	319,3	490,1	339,3	524,4	180,9	148,7
7	362,0	376,2	505,3	340,0	525,3	158,0	164,8
8	333,0	331,1	488,6	345,0	542,3	161,6	160,9
9	311,5	312,2	499,3	325,9	542,2	168,5	151,0
10	348,9	366,3	525,8	338,5	554,4	167,7	160,4
11	365,6	344,4	507,5	321,5	516,0	158,1	159,5
12	337,7	323,7	511,6	353,4	543,0	170,5	150,3
13	342,1	338,8	499,6	316,8	520,6	162,9	156,0
14	351,4	318,7	503,1	346,1	553,8	153,4	158,2
15	343,3	334,4	504,5	338,0	534,8	152,9	160,7
16	333,9	368,3	516,0	337,8	534,7	163,4	158,0
17	354,1	370,1	510,9	331,4	518,8	165,3	153,3
18	323,7	362,2	508,0	334,8	545,6	169,2	159,1
19	345,9	349,0	521,8	344,6	544,0	160,8	156,1
20	323,0	358,6	499,7	324,4	511,6	160,3	157,0
Xsr	344,2	345,3	505,3	336,2	536,4	161,2	157,2
SD	±16,2	±19,8	±9,4	±9,8	±13,3	±8,5	±4,1

Tabela 7. Mase kapsula/tableta procentualno izražene u odnosu na srednju vrednost mase (100%) odgovarajućeg suplementa

kapsula/tableta	supl. 1	supl. 2	supl. 3	supl. 4	supl. 5	supl. 6	supl. 7
	%	%	%	%	%	%	%
1	100,6	102,5	100,3	101,6	115,2	97,7	104,0
2	98,1	100,4	101,5	99,5	83,9	95,5	99,0
3	102,2	101,2	97,7	99,2	93,6	101,9	104,1
4	93,4	102,5	101,9	99,2	98,8	99,0	103,4
5	100,0	100,6	97,7	100,2	93,7	100,2	102,0
6	103,3	99,0	100,5	101,5	97,6	101,7	92,6
7	99,9	103,2	103,1	97,2	100,2	101,0	98,9
8	105,2	100,7	96,0	102,0	98,6	100,2	99,1
9	97,7	103,6	104,4	101,9	112,3	100,9	96,3
10	101,3	104,7	100,3	100,8	107,1	99,5	102,7
11	100,7	103,4	100,9	101,0	102,6	99,9	102,0
12	99,7	90,0	99,9	99,0	95,6	100,8	95,3
13	98,8	93,6	97,5	99,3	102,9	99,2	92,9
14	103,9	105,2	98,4	99,5	104,8	100,5	100,7
15	96,4	103,5	98,2	100,1	86,5	98,4	102,5
16	96,3	103,8	99,2	97,0	91,9	99,9	101,7
17	100,7	98,9	101,0	97,5	94,0	99,5	104,6
18	101,3	95,3	100,0	103,8	101,4	99,9	94,1
19	101,6	92,6	100,7	100,3	99,0	102,2	103,0
20	99,0	95,2	99,1	99,4	116,3	98,2	101,1
opseg	93,4-105,2	90-105,2	96-104,4	97-103,8	83,9-116,3	95,5-102,2	92,6-104,6
zahtev	±7.5%	±7.5%	±7.5%	±10%	±10%	±7.5%	±7.5%

Tabela 7. Nastavak

kapsula/tableta	supl. 8	supl. 9	supl. 10	supl. 11	supl. 12	supl. 13	supl. 14
	%	%	%	%	%	%	%
1	106,6	95,6	99,2	103,3	98,6	90,3	97,3
2	94,7	108,4	98,0	96,7	100,4	93,1	101,0
3	102,4	98,3	99,2	103,1	102,4	104,6	102,8
4	99,3	99,5	101,3	98,3	101,6	95,3	100,6
5	100,6	100,0	100,1	100,0	103,3	93,1	101,1
6	108,8	92,5	97,0	100,9	97,8	111,9	94,7
7	105,2	108,9	100,0	101,1	97,9	97,7	104,9
8	96,8	95,9	96,7	102,6	101,1	100,0	102,5
9	90,5	90,4	98,8	96,9	101,1	104,3	96,2
10	101,4	106,1	104,0	100,7	103,4	103,8	102,1
11	106,2	99,8	100,4	95,7	96,2	97,8	101,6
12	98,1	93,7	101,2	105,1	101,2	105,5	95,7
13	99,4	98,1	98,8	94,3	97,1	100,8	99,4
14	102,1	92,3	99,6	102,9	103,2	94,9	100,8
15	99,8	96,9	99,8	100,5	99,7	94,6	102,3
16	97,0	106,7	102,1	100,5	99,7	101,1	100,6
17	102,9	107,2	101,1	98,6	96,7	102,3	97,6
18	94,0	104,9	100,5	99,6	101,7	104,6	101,3
19	100,5	101,1	103,2	102,5	101,4	99,5	99,4
20	93,8	103,8	98,9	96,5	95,4	99,2	98,1
opseg	90,5-108,8	90,4-108,9	96,7-104,0	94,3-105,1	95,4-103,4	90,3-111,9	94,7-104,9
zahtev	±7.5%	±7.5%	±7.5%	±7.5%	±7.5%	±7.5%	±7.5%

5.1.2. Ujednačenost sadržaja pojedinačnih fenola

Od 14 ispitanih dijetetskih suplemenata na sadržaj pojedinačnih fenola, suplementi **8, 9, 10, 11, 13** i **14** pokazali su prisustvo samo *trans*-resveratrola, suplementi **3** i **12** su pored *trans*-resveratrola pokazali prisustvo i drugih fenola, dok kod suplemenata **1, 2, 4, 5, 6** i **7** nije kvantifikovan *trans*-resveratrol, ali jesu drugi pojedinačni fenoli. Najzastupljeniji fenol kod suplemenata **1, 2, 4, 5, 6, 7** bio je katehin, od kojih je suplement **7** pokazao značajno više vrednosti (207,54 mg po doznoj jedinici). Kod ostalih suplemenata najzastupljeniji fenol bio je *trans*-resveratrol.

Uniformnost sadržaja određivana je prema *British pharmacopoeia 2012, Volume V, Appendix XII C. Consistency of Formulated Preparations (Ph. Eur. method 2.9. 6)* (172). Test je ispunjen ukoliko je ne više od jednog pojedinačnog sadržaja izvan 85-115% od prosečnog sadržaja, a ni jedan izvan 75-125% od prosečnog sadržaja. Ujednačenost sadržaja doziranih jedinica ispitana je u odnosu na dominantan fenol prisutan u suplementu, *trans*-resveratrol (**Tabela 8**) ili katehin (**Tabela 9**).

Tabela 8. Ujednačenost sadržaja *trans*-resveratrola u odnosu na prosečni sadržaj

kaps. /tabl.	supl. 3 (%)	supl. 8 (%)	supl. 9 (%)	supl. 10 (%)	supl. 11 (%)	supl. 12 (%)	supl. 13 (%)	supl. 14 (%)
1	94,14	94,64	91,95	95,35	89,91	83,99	94,16	94,43
2	101,17	110,34	101,51	102,15	84,62	95,03	98,01	99,15
3	97,15	104,28	100,14	100,01	128,13	101,88	107,32	98,98
4	99,50	93,19	103,84	99,82	103,03	103,90	96,83	100,51
5	100,50	102,75	101,19	102,41	108,90	109,78	91,90	97,39
6	102,18	100,70	99,42	107,73	98,42	98,61	111,59	106,25
7	100,17	102,15	100,30	103,45	97,30	105,19	95,47	98,81
8	105,53	100,87	99,18	98,26	96,40	99,16	101,89	99,15
9	99,50	101,30	101,99	96,90	97,98	99,74	104,23	106,36
10	100,17	89,78	100,47	93,92	94,60	102,70	98,47	98,98
opseg	94,14-105,53	89,78-110,34	91,95-103,84	93,92-107,73	84,62-128,13	83,99-109,78	91,90-111,59	94,43-106,36

Tabela 9. Ujednačenost sadržaja katehina u odnosu na prosečni sadržaj

kaps./ tabl.	supl. 1 (%)	supl. 2 (%)	supl. 4 (%)	supl. 5 (%)	supl.6 (%)	supl. 7 (%)
1	69,42	98,89	93,86	111,97	95,92	109,31
2	105,63	94,96	98,92	82,92	99,46	102,82
3	86,52	97,33	93,20	90,63	103,44	109,33
4	114,18	100,72	109,58	99,83	91,06	96,27
5	98,59	100,72	102,38	93,22	97,30	104,49
6	98,59	98,35	97,49	99,23	110,34	91,53
7	100,60	103,44	99,47	102,95	105,37	98,52
8	134,30	102,08	100,13	100,32	105,59	102,02
9	99,60	101,81	107,60	110,19	100,62	101,87
10	98,55	101,06	97,39	108,72	90,89	99,12
opseg	69,42- 134,30	94,96- 103,44	93,20- 109,58	82,92- 111,97	90,89- 110,34	91,53- 109,33

Od ispitanih suplemenata gde je dominantni fenol bio *trans*-resveratrol, jedino suplement **11** nije zadovoljio zahteve farmakopeje u pogledu ujednačenosti sadržaja.

Od ispitanih suplemenata gde je dominantni fenol bio katehin, jedino suplement **1** nije zadovoljio zahteve farmakopeje u pogledu ujednačenosti sadržaja.

Kod suplemenata **6** i **7**, iako je deklarirana vrednost resveratrola bila 80, odnosno 100 mg po doziranoj jedinici, resveratrol nije nađen, odnosno bio je prisutan u tragovima kod suplementa **7**.

Dosadašnja istraživanja sadržaja *trans/cis*- resveratrola i drugih fenola grožđa prisutnih u komercijalnim dijetetskim suplementima dala su rezultate koji se razlikuju od vrednosti sadržaja naznačenih na pakovanju. Omar i saradnici ispitali su sadržaj *trans/cis*- resveratrola u 28 dijetetskih suplemenata i došli do rezultata da je šest suplemenata imalo za 11–76% manji sadržaj resveratrola od naznačenog, dok su tri suplementa imala viši sadržaj za 18–162% (190). Rossi i saradnici ispitali su 14 dijetetskih suplemenata na bazi resveratrola gde su, pored sadržaja *trans*-resveratrola, odredili i sadržaj flavonoida, procijanidina, kao i ukupnih fenola. Samo pet od 14

suplemenata je imalo sadržaj koji je odgovarao sadržaju naznačenom na pakovanju i bilo u skladu sa Dobrom Proizvođačkom Praksom (95-105%), četiri suplementa su bila blago izvan dozvoljenog opsega (83-111%), tri suplementa imala su sadržaj u opsegu od 8-64%, dok je sadržaj u dva suplementa bio ispod limita detekcije (191).

Ispitivani pojedinačni fenoli, osim *trans*-resveratrola i katehina, bili su prisutni u veoma malim količinama u analiziranim suplementima (**Tabela 10**) kroz ekstrakt nekog dela grožđa. Dodatna stavka koja otežava tumačenje rezultata je činjenica da postoje mnogi suplementi na bazi ekstrakta nekog dela grožđa koji nisu standardizovani ni na jednu fenolnu komponentu, čime je onemogućeno poređenje deklarisanog i stvarnog sadržaja.

Tabela 10. Sadržaj pojedinačnih fenola u suplementima po doziranoj jedinici (DJ)

mg/DJ	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S12
katehin	0,02	0,59	0,36	0,28	1,59	18,10	207,54	/
vanilinska kiselina	/	0,06	0,03	/	0,41	2,21	3,60	/
siringinska kiselina	/	0,02	0,01	0,06	0,16	1,05	8,49	/
benzoeva kiselina	0,01	/	0,06	0,21	/	1,07	28,55	/
galna kiselina	/	0,05	/	/	0,09	4,84	7,46	0,37
<i>p</i> -OH-benzoeva kiselina	/	0,02	/	0,04	0,2	/	/	/
<i>trans</i> -cimetna kiselina	/	/	/	/	0,01	0,28	/	0,26
<i>p</i> -kumarinska kiselina	/	/	/	/	0,02	/	0,72	/
kafena kiselina	/	/	/	/	0,05	/	8,80	/
<i>trans</i> -resveratrol	/	/	0,60	/	0,03	/	0,71	11,36
rutin	/	/	/	/	0,04	/	0,39	/
kvercetin	/	0,02	0,01	0,02	0,11	1,93	1,29	/
kempferol	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	/	0,68	/

-rezultati su izraženi u mg po prosečnoj masi dozirane jedinice (DJ)

5.1.3. Određivanje antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola (TPC)

Rezultati određivanja antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola (TPC) prikazani su u

Tabeli 11.

Tabela 11. Antioksidantna aktivnost i sadržaj ukupnih fenola ispitanih dijetetskih suplemenata

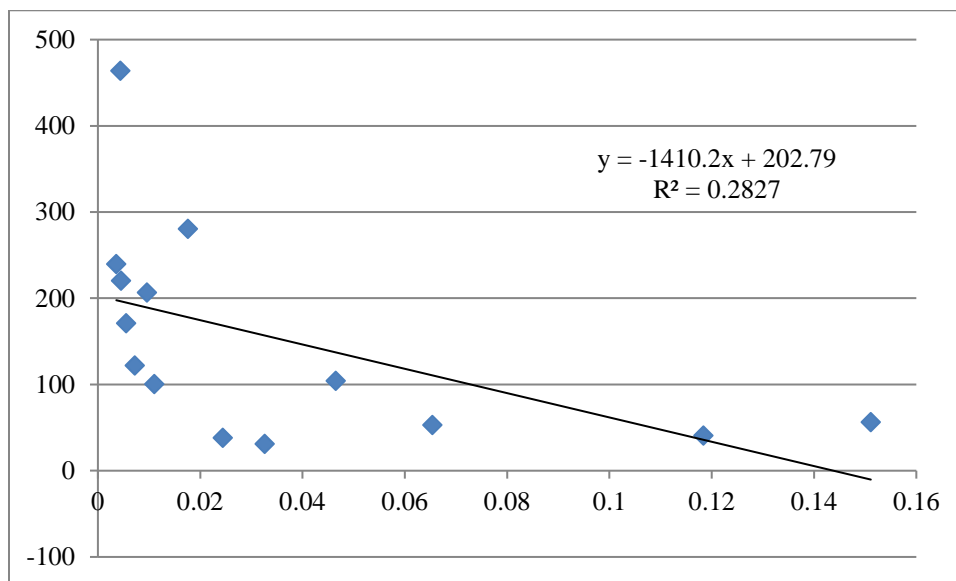
Uzorak	IC₅₀ (mg/mL)	TPC (mg GAE/g)
Suplement 1	0,0326	31,20
Suplement 2	0,0244	38,34
Suplement 3	0,0110	100,55
Suplement 4	0,0055	171,36
Suplement 5	0,0045	220,69
Suplement 6	0,0036	239,97
Suplement 7	0,0072	122,29
Suplement 8	0,0654	53,33
Suplement 9	0,1184	41,07
Suplement 10	0,1511	56,49
Suplement 11	0,0044	464,09
Suplement 12	0,0096	207,04
Suplement 13	0,0176	280,57
Suplement 14	0,0465	104,51

-rezultati su izraženi po prosečnom punjenju dozirane jedinice.

Najvišu antioksidantnu aktivnost (najniži IC₅₀) pokazao je suplement **6**. Pored suplementa **6**, izraženu antioksidantnu aktivnost pokazali su i suplementi **5** i **11**. Rezultati su očekivani s obzirom da suplement **6** pored resveratrola sadrži i ostale antioksidanse koji doprinose ukupnom antioksidantnom kapacitetu. Oni su bili prisutni u suplementu kroz ekstrakt gljive *Ganoderma lucidum*, matični mleč, ekstrakt zelenog čaja i ekstrakt šipurka (vitamin C). Poređenja radi, IC₅₀ poznatog antioksidansa α -tokoferola iznosi 0,00253 mg/mL, što je približna vrednost IC₅₀ suplementa **6** (0,0036 mg/mL) čime je ovaj suplement potvrdio svoj visok antioksidantni kapacitet.

Rossi i saradnici odredili su, takođe DPPH metodom, antioksidantnu aktivnost 14 dijetetskih suplemenata na bazi resveratrola i dobili znatno nižu antioksidantnu aktivnost za ispitane suplemente. Najniža dobijena IC_{50} je bila 13,15 mg/mL, a najviša čak 38,65 mg/mL (191). Znatno viša antioksidantna aktivnost suplemenata na bazi grožđa i japanskog troskota može se pripisati drugim antioksidantima prisutnim u preparatima.

Najviši sadržaj ukupnih fenola pokazao je suplement **11** (464,09 mg GAE/g), a najniži suplement **1** (31,20 mg GAE/g). U poređenju sa četiri dijetetska suplementa na bazi ekstrakta soje (najviši dobijen TPC=45,24 mg GAE/g) i dva suplementa na bazi crvene deteline (najviši dobijen TPC=71,49 mg GAE/g) (192), vrednosti sadržaja ukupnih fenola za suplemente na bazi grožđa i japanskog troskota kretale su se od približno istih pa do višestruko viših.



Grafik 1. Prava linearna korelacije antioksidantne aktivnosti (IC_{50} - x osa) i sadržaja ukupnih fenola (TPC- y osa)

Slaba korelacija ($R^2=0,2827$) između vrednosti TPC i IC_{50} ispitanih dijetetskih suplemenata (**Grafik 1**) objašnjava se time što druge supstance sem fenolnih koje su prisutne u suplementima

značajno doprinose ukupnoj antioksidantnoj aktivnosti doziranih jedinica. Spomenute supstance bile su prisutne u analiziranim suplementima u ekstraktu gljive *Ganoderma-e lucidum*, matičnom mleču, ekstraktu zelenog čaja, ekstraktu šipurka (vitamin C), ekstraktu mladica brokolija (sulforafan), ekstraktu paradajza (likopen) i ekstraktu lista ginkga.

5.1.4. Ispitivanje testa rastvorljivosti

Prema *British Pharmacopoeia 2012* za dozirane oblike sa uobičajenim oslobađanjem navedeno je da, ukoliko nije drugačije propisano, treba da se oslobodi minimum 80% od deklarisanog sadržaja za 45 minuta (172).

Nakon testiranja rastvorljivosti vizuelnom procenom je konstatovano da kod doznih jedinica suplemenata **3, 5, 8, 9, 11, 12, 13** nije bilo čvrstih ostataka u kadicama aparata. Delimično su se rastvorili suplementi **2, 4, 6, 7 i 10**, dok su suplementi **1 i 14** ostali skoro nerastvoreni (uočene su gotovo cele dozne jedinice u kadicama za rastvaranje).

Resveratrol je kvantifikovan kod suplemenata **8, 9, 11, 12, 13 (Tabela 12)**, dok ostali suplementi nisu oslobodili detektabilnu količinu resveratrola.

Tabela 12. Količina resveratrola (mg) oslobođena iz doznih jedinica suplementa

Dozna jedinica Oznaka suplementa	1	2	3	4	5	6
Suplement 8	2,28	3,29	2,73	2,98	3,05	2,75
Suplement 9	2,39	2,31	2,11	8,11	7,85	1,93
Suplement 11	19,62	19,13	20,04	20,04	19,32	17,26
Suplement 12	1,42	1,66	2,04	0,76	1,02	1,51
Suplement 13	0,10	0,13	0,07	0,03	0,06	/

Radi jasnog tumačenja rezultata, dobijene količine su izražene kao procentualni udeo u odnosu na deklarirani sadržaj na pakovanju (**Tabela 13**).

Tabela 13. Procenat oslobođenog resveratrola iz doznih jedinica u odnosu na deklarirani sadržaj

Dozna jedinica Oznaka suplementa	Sadržaj resveratrola (%)					
	1	2	3	4	5	6
Suplement 8	22,80	32,90	27,30	29,80	30,50	27,50
Suplement 9	23,90	23,10	21,10	81,10	78,50	19,30
Suplement 11	20,02	19,52	20,45	20,45	19,71	17,61
Suplement 12	2,84	3,32	4,08	1,52	2,04	3,02
Suplement 13	0,24	0,32	0,16	0,07	0,14	/

Nijedan od analiziranih suplemenata nije bio zadovoljavajućeg kvaliteta. Samo je kapsula 4 suplementa **9** oslobodila dovoljnu količinu resveratrola (81,1%), kapsula 5 istog suplementa je bila blizu zahteva farmakopeje (78,5%), dok su ostale kapsule oslobodile značajno manju količinu. Veoma lošu rastvorljivost imali su i suplementi **12** i **13**, imajući u vidu da se nije oslobodilo više od 5% ni iz jedne ispitane dozne jedinice.

U sličnom ispitivanju rastvorljivosti dijetetskih suplemenata na bazi soje i crvene deteline, samo su dva suplementa od ispitanih šest oslobodila dovoljnu količinu izoflavona i time zadovoljila zahteve farmakopeje (192).

U farmaceutskoj industriji testovi brzine rastvorljivosti/oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskog oblika (*eng. dissolution tests*) su značajni parametri u kontroli kvaliteta lekova, zbog toga što ukazuju i na biološku raspoloživost. Apsorpcija resveratrola kod ljudi nakon oralne primene je velika, ali mu je bioraspoloživost manja od 1%, zbog izraženog efekta prvog prolaska kroz jetru (193). Zato poboljšanje rastvorljivosti resveratrola može osigurati bržu i potpuniju

apsorpciju, što bi dovelo do povećanja maksimalne koncentracije i poboljšanja njegove efikasnosti (194). Za dijetetske suplemente nema zakonski usvojenih kriterijuma koji bi se odnosili na rastvorljivost, ali uzimajući u obzir važnost ovog parametra kod procene biološke raspoloživosti kod lekovitih oblika, primenjeni su farmakopejski propisi za lekove na dijetetskim suplementima, kako bi se utvrdio njihov kvalitet.

5.1.5. Analiza ostataka pesticida i toksičnih metala

Rezultati su pokazali da ni u jednom ispitivanom suplementu nisu kvantifikovani ostaci pesticida i toksični metali, čime su suplementi potvrdili svoju zdravstvenu ispravnost. Rezultati su očekivani s obzirom da se suplementi pre stavljanja u promet kontolišu u pogledu zdravstvene ispravnosti, za razliku od kontrole njihovog kvaliteta.

5.1.6. Pregled rezultata

Pregledom rezultata analize dijetetskih suplemenata (**Tabela 14**) može se zaključiti da ni jedan ispitivani suplement ne ispunjava sve zahteve za sprovedene testove farmakopeje za čvrste dozirane oblike.

Tabela 14. Pregled rezultata kontrole kvaliteta suplemenata (+ ako suplement zadovoljava test, - ako ne zadovoljava)

Test	Ujednačenost mase	Ujednačenost sadržaja	Rastvorljivost
Suplement 1	+	-	-
Suplement 2	+	+	-
Suplement 3	+	+	-
Suplement 4	+	+	-
Suplement 5	-	+	-
Suplement 6	+	+	-
Suplement 7	+	+	-
Suplement 8	+	+	-
Suplement 9	-	+	-
Suplement 10	+	+	-
Suplement 11	+	-	-
Suplement 12	+	+	-
Suplement 13	+	+	-
Suplement 14	+	+	-

Svi dijetetski suplementi ispunili su zahteve farmakopeje za ujednačenost mase osim suplemenata **5 i 9**.

Svi dijetetski suplementi ispunili su zahteve farmakopeje za ujednačenost sadržaja osim suplemenata **1 i 11**.

Ni jedan dijetetski suplement nije ispunio zahteve farmakopeje za rastvorljivost doziranih oblika sa uobičajenim oslobađanjem. Veoma loši rezultati ispitivanja brzine oslobađanja fenola iz suplemenata otvaraju pitanje njihove delotvornosti kod ljudi. Kako fenoli kod ljudi usled efekta prvog prolaska kroz jetru i ubrzanog metabolizma imaju veoma nisku bioraspoloživost (manju od

1%), loši rezultati brzine oslobađanja mogu pogoršati i tako veoma nisku bioraspoloživost i dovesti do izostanka blagotvornog efekta.

Ni kod jednog suplementa nisu kvantifikovani ostaci pesticida niti toksični metali čime je potvrđena njihova zdravstvena ispravnost.

5.2. Analiza komina grožđa

5.2.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola

Tabela 15. Rezultati određivanja antioksidantne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola

Uzorak		IC ₅₀ (μL/mL)	TPC (mg GAE/L)
K1	Eksperimentalni protokol: 1	7,70	307,47
	2	2,59	817,78
	3	1,73	698,46
	4	3,54	624,12
K2	Eksperimentalni protokol: 1	6,26	363,46
	2	1,60	947,19
	3	1,03	964,63
	4	2,36	810,43
K3	Eksperimentalni protokol: 1	9,15	218,44
	2	2,76	804,93
	3	2,15	593,83
	4	3,62	498,38
K4	Eksperimentalni protokol: 1	6,95	320,32
	2	3,04	656,24
	3	1,74	708,56
	4	3,76	553,44
K5	Eksperimentalni protokol: 1	10,77	144,10
	2	3,38	580,06
	3	2,53	583,73
	4	4,30	523,16
	80% metanol* (M1)	3,74	502,60
	80% metanol + 3g/L limunske kiseline* (M2)	3,51	540,85

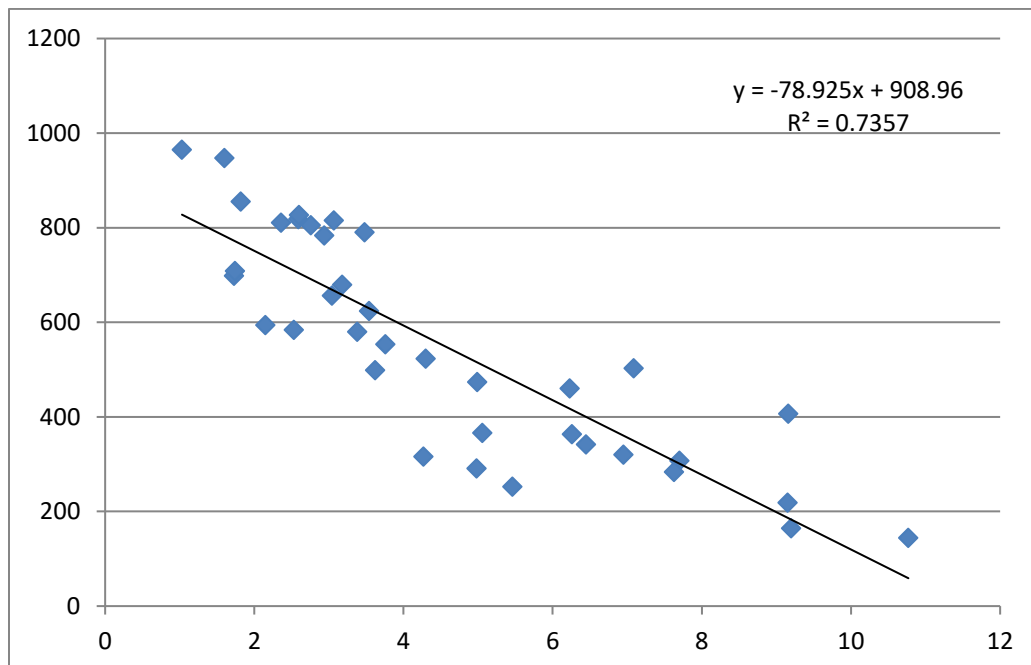
* metanol se koristio kao poredbeni rastvarač samo za K5 uzorak komine

Eksperimentalni protokol 1- rastvarač je destilovana voda + 3 g/L limunske kiseline

Eksperimentalni protokol 2- rastvarač je 53%-tni etanol + 3 g/L limunske kiseline

Eksperimentalni protokol 3 - rastvarač je 53%-tni etanol

Eksperimentalni protokol 4 - rastvarač je 80%-tni etanol + 3 g/L limunske kiseline



Grafik 2. Prava linearna korelacije antioksidantne aktivnosti (IC₅₀- x osa) i sadržaja ukupnih fenola (TPC- y osa)

Pirsonov koeficijent korelacije iznosi -0,86. Koncentracija rastvora komina grožđa sa kojom su rađeni testovi je 0,02 g/mL.

Najviši antioksidantni kapaciteti ekstrakata komina grožđa (**Tabela 15**) dobijeni su upotrebom 53%-tnog etanola kao ekstrakcionog medijuma za svih pet ispitanih uzoraka komine grožđa. Sadržaj ukupnih fenola (TPC) za uzorke komine grožđa K1 i K3 bio je viši kod ekstrakata gde je etanolu dodata limunska kiselina. Za uzorke K2 i K5 dobijene su slične vredosti TPC kada je kao

ekstakcioni medijum korišćen 53%-tni etanol ili etanol uz dodatak limunske kiseline. Za uzorak komine K4 dobijena je nešto viša vrednost TPC upotrebom 53%-tnog etanola bez dodatka limunske kiseline. Kao bolji ekstrakcioni medijum se pokazao 53%-tni etanol u odnosu na 80%-tni etanol i 80%-tni metanol, dok se destilovana voda pokazala kao najslabiji medijum.

U poređenju sa drugim dostupnim rezultatima, vrednosti sadržaja ukupnih fenola komine dobijene u ovom radu bile su slične, ali i dva do tri puta niže u zavisnosti od toga koji ekstrakcioni medijum su koristili drugi istraživači (164, 195).

Najviši antioksidantni kapacitet i sadržaj ukupnih fenola pokazala je K2 komina grožđa, te je ona uključena u drugi deo ispitivanja - optimizaciju eksperimentalnih faktora ekstrakcije fenola iz komine grožđa.

5.2.2. Ispitivanje sadržaja pojedinačnih fenola

Od ispitanih 17 pojedinačnih fenola, u pet različitih komina grožđa kvantifikovano je njih 10 (**Tabela 16**). Resveratrol je bio prisutan u maloj količini samo kod komine K3 za eksperimentalne protokole 2, 3 i 4. Najzastupljeniji fenol svih komina grožđa bio je katehin, a kao najbolji medijum za njegovu ekstrakciju pokazao se 53%-tni etanol uz dodatak limunske kiseline (protokol 2), osim za K2 vrstu komine gde je to bio 53%-tni etanol. Metanol (M1) i metanol uz dodatak limunske kiseline (M2) su se pokazali kao nešto slabiji medijum za ekstrakciju katehina u poređenju sa etanolom iste koncentracije (protokol 4). Najslabiji medijum za ekstrakciju katehina bila je destilovana voda uz dodatak limunske kiseline (protokol 1).

Brazinha i saradnici optimizovali su ekstrakciju fenola iz komine grožđa *Tempranillo* sorte i dobili značajno više vrednosti sadržaja određenih pojedinačnih fenola i sadržaja ukupnih fenola. Najviši sadržaj katehina (145 mg/L), galne kiseline (69 mg/L) i sadržaj ukupnih fenola (TPC=3962 mg

GAE/L) dobili su korišćenjem 60% etanola i 3 g/L limunske kiseline (196). Dobijene vrednosti sadržaja pojedinačnih i ukupnih fenola različitih komina grožđa nije lako porediti, jer one pored faktora ekstrakcije zavise uveliko i od berbe i sorte grožđa od koje je dobijena komina, kao i od primenjenog tehnološkog procesa proizvodnje vina.

Tabela 16. Sadržaj pojedinačnih fenola u komini grožđa

	protokol	katehin	vanilin- ska kiselina	siringin- ska kiselina	benzoeva kiselina	galna kiselina	rutin	kvercetin	kempferol	kafena kiselina	resveratrol
		mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
K1	1	2,31	0,22	0,60	/	2,47	/	0,70	0,59	/	/
	2	5,32	0,24	0,58	0,88	2,77	0,38	1,32	0,59	/	/
	3	4,13	0,31	0,71	0,61	2,25	0,24	1,22	0,50	/	/
	4	3,18	0,25	0,46	0,67	2,09	0,26	1,17	0,53	/	/
K2	1	4,14	0,14	0,40	/	1,72	/	/	/	0,36	/
	2	7,73	0,27	0,68	1,56	2,11	1,02	2,62	0,69	0,31	/
	3	8,46	0,21	0,55	1,84	2,15	1,08	2,70	0,72	0,32	/
	4	7,84	0,24	0,46	1,41	1,73	0,76	2,77	0,71	0,30	/
K3	1	1,86	/	0,63	/	1,23	/	/	/	0,26	/
	2	3,77	/	0,51	0,63	0,91	0,52	0,63	0,35	/	0,39
	3	2,98	/	0,66	0,34	0,78	0,59	0,65	0,41	/	0,28
	4	2,82	/	0,45	/	0,91	0,55	0,66	0,41	/	0,37
K4	1	2,24	0,14	0,22	/	2,88	/	0,60	0,59	/	/
	2	4,88	0,26	0,23	/	3,28	/	1,13	0,60	/	/
	3	4,29	0,25	0,38	/	3,20	/	1,03	0,43	/	/
	4	3,72	/	0,16	/	2,70	/	1,13	0,41	/	/
K5	1	1,72	0,16	0,44	/	0,82	/	0,53	/	/	/
	2	3,46	0,24	0,53	/	1,26	/	0,75	0,41	/	/
	3	2,93	0,22	0,57	/	1,13	/	0,71	0,42	/	/
	4	2,71	0,21	0,31	/	0,74	/	0,72	0,37	/	/
	M1	2,53	0,19	0,33	/	0,71	/	0,64	/	/	/
	M2	2,68	0,20	0,29	/	0,79	/	0,69	0,38	/	/

5.2.3. Ispitivanje sadržaja antocijana

Tabela 17. Rezultati određivanja sadržaja antocijana

	Protokol	Delfinidin-3-gl*	Cijanidin-3-gl*	Petunidin-3-gl*	Peonidin-3-gl*	Malvidin-3-gl*
		mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
K1	1	0,20	0,19	0,30	0,68	1,85
	2	0,05	0,13	0,13	0,50	1,12
	3	0,05	0,12	0,12	0,51	1,06
	4	0,02	0,11	0,09	0,37	0,72
K2	1	1,51	0,99	1,62	3,55	11,17
	2	0,12	0,21	0,25	1,02	2,33
	3	0,12	0,19	0,24	1,00	2,25
	4	0,08	0,16	0,17	0,69	1,56
K3	1	2,79	0,66	1,72	2,21	10,03
	2	0,33	0,15	0,30	0,67	2,04
	3	0,34	0,15	0,32	0,73	2,17
	4	0,23	0,13	0,22	0,48	1,41
K4	1	0,15	0,25	0,22	0,79	1,20
	2	0,04	0,13	0,07	0,45	0,46
	3	0,04	0,14	0,07	0,47	0,51
	4	0,03	0,12	0,05	0,33	0,30
K5	1	0,18	0,15	0,21	0,28	1,45
	2	0,04	0,11	0,07	0,25	0,74
	3	0,04	0,10	0,07	0,23	0,67
	4	0,03	0,10	0,05	0,16	0,42
	M1	0,25	0,14	0,24	0,28	1,89
	M2	0,23	0,13	0,24	0,28	1,88

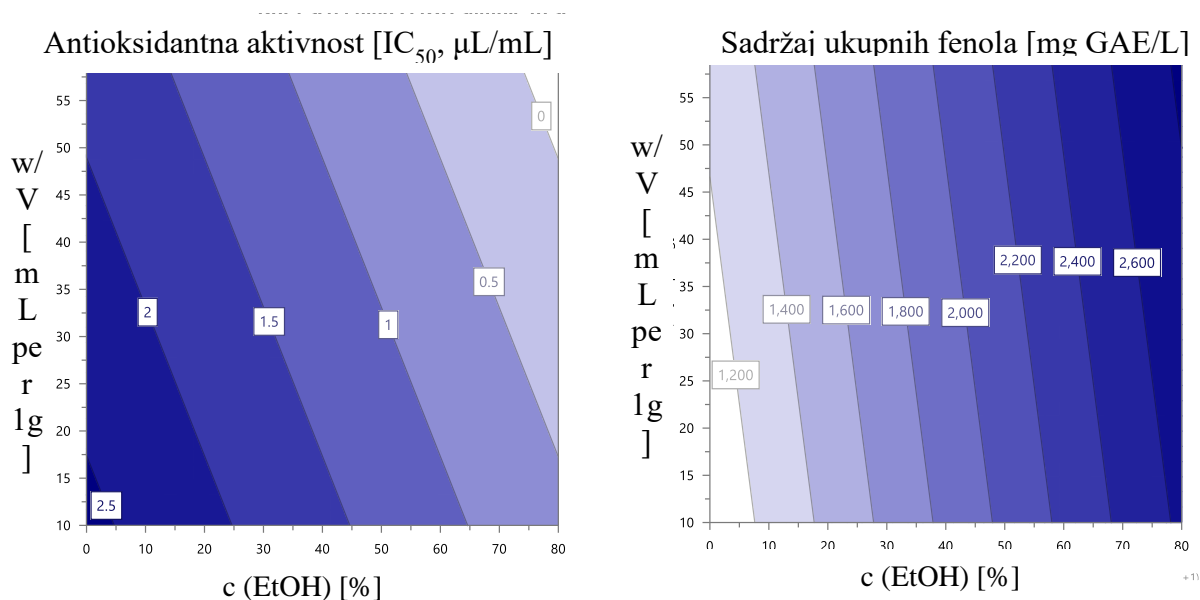
*gl- glukozid

Kao najbolji medijum za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa pokazala se destilovana voda uz dodatak limunske kiseline, dok se kod uzorka K5 80%-tni metanol pokazao kao još bolji rastvarač u odnosu na destilovanu vodu, što se objašnjava polarnijom prirodom antocijana (koji su u komini prisutni u formi glikozida) u odnosu na prethodno nabrojane pojedinačne fenole. Najzastupljeniji antocijan svih komina grožđa bio je malvidin-3-glukozid, a njegov najviši sadržaj (11,17 mg/L) je dobijen za uzorak K2 upotrebom destilovane vode uz dodatak limunske kiseline (protokol 1).

5.3. Optimizacija ekperimentalnih faktora ekstrakcije fenola iz komine grožđa

5.3.1. Inicijalni skrining za kritične faktore ekstrakcije i njihov uticaj na definisane deskriptore efikasnosti ekstrakcije

Rezultati dobijeni tokom inicijalnog skrininga za otkrivanje najznačajnijih faktora ekstrakcije prikazani su kroz **Grafik 3**. Rezultati su pokazali da oba faktora (koncentracija rastvarača i odnos uzorak/rastvarač) utiču na efikasnost ekstrakcije, a uticaj oba faktora zavisi od definisanih odgovora ekstrakcije.



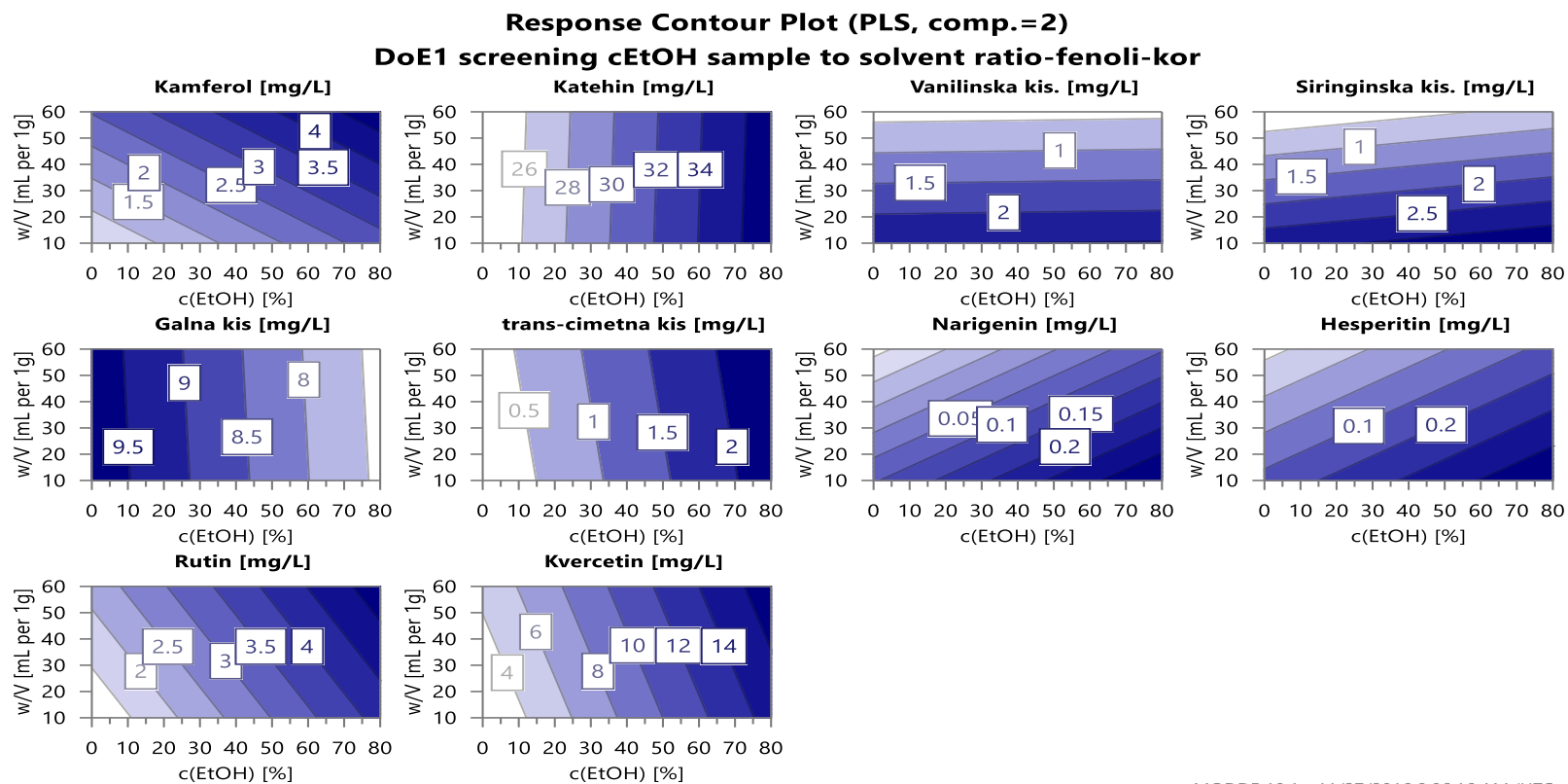
Grafik 3. Konturni dijagrami uticaja promene koncentracije rastvarača (x1) u rasponu od 0% (tj. 100% vode) do 80% etanola u vodi i masenog odnosa uzorka i rastvarača (x2) u rasponu od 1:10 do 1:60 (korišćenjem fiksnih faktora ekstrakcije: 55°C, 30 min) na antioksidantnu aktivnost (y1) i sadržaj ukupnih fenola (y2) tokom inicijalnog ispitivanja faktora ekstrakcije pomoću *Placket Burman* dizajna eksperimenata.

Prema dijagramima deskriptora efikasnosti ekstrakcije za definisani raspon eksperimentalnih faktora, viša antioksidantna aktivnost i sadržaj ukupnih fenola ekstrakata (niže IC_{50} i više vrednosti TPC) postignuti su pri višim koncentracijama etanola u vodi. Uticaj odnosa uzorak/rastvarač nije bio presudan za ova dva odgovora.

Većina razvijenih metoda ekstrakcije ima za cilj da dobije ekstrakte sa visokim sadržajem fenola, umesto frakcioniranja i ekstrakcije jedne ili više srodnih supstanci. Fenoli se lako rastvaraju u polarnim medijumima poput vodenoalkoholnih smeša, dok se odgovarajuće frakcije fenola mogu dobiti na osnovu njihove polarnosti promenom koncentracije alkohola (197, 198). Tako je nekoliko istraživača koristilo sistem organski rastvarač/alkohol/voda za ekstrakciju fenola iz komine grožđa, gde je prisustvo vode povećalo prinos i antocijana i fenola mehanizmom difuzije, što je dovelo do većeg prinosa supstanci rastvorljivih u vodi (165, 199). Što se tiče ekstrakcije ukupnih fenola, smeše etanol/voda dale su bolje rezultate u poređenju sa sistemom rastvarača aceton ili metanol/voda (164). Razlika u prinosu ekstrakcije korišćenjem metanola i etanola može se pripisati nepolarnom delu i alifatskom fragmentu alkohola fenola. Metanol sadrži manji i fleksibilniji alifatični fragment u poređenju sa etanolom i na taj način lakše okružuje fenole sa supstitucijom na trećem ili četvrtom ugljeniku unutar njihovog aromatičnog prstena (npr. vanilinska i siringinska kiselina). S druge strane, veći molekuli, fenoli sa dva dijametralno-suprotno supstituisana ugljenika ili sa dužim alifatičnim fragmentima više preferiraju etanol kao ekstrakcioni medijum (198). Pored toga, etanol je jeftiniji i bezbedniji rastvarač koji se može koristiti u prehrambenoj industriji (164).

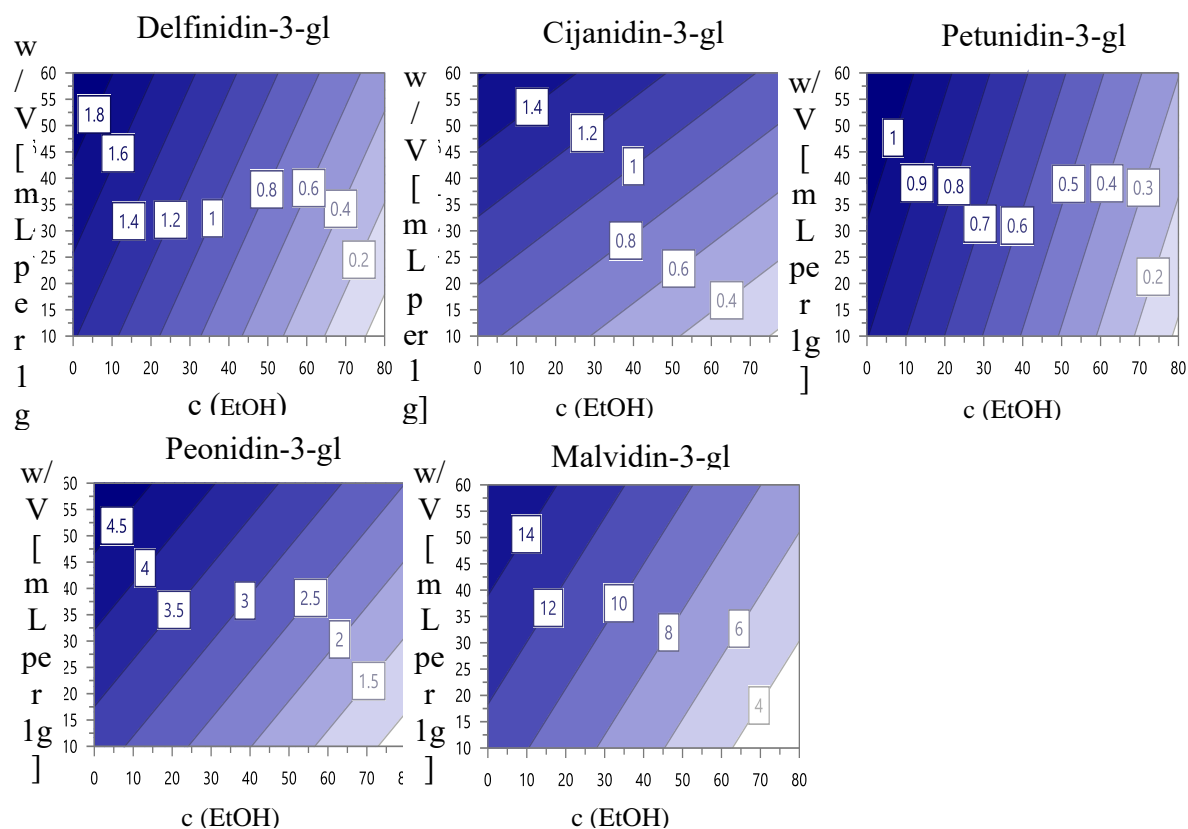
Koristeći iste eksperimentalne uslove opisane u *Placket Burman* dizajnu eksperimenata (**Tabela 3**), određen je sadržaj pojedinačnih fenola i antocijana. Uticaj deskriptora efikasnosti ekstrakcije: sadržaj pojedinačnih fenola (kempferol, katehin, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, galna

kiselina, *trans*-cimetna kiselina, naringenin, hesperetin, rutin i kvercetin) i antocijana (delfinidin-3-gl, cijanidin-3-gl, petunidin-3-gl, peonidin-3-gl, malvidin-3-gl) za definisani opseg eksperimentalnih faktora koncentracije rastvarača (x1) u rasponu od 0% (tj. 100% vode) do 80% etanola u vodi i masenog odnosa uzorka i rastvarača (x2) u rasponu od 1:10 do 1:60 (korišćenjem fiksnih faktora ekstrakcije: 55°C, 30 min), procenjen je korišćenjem metode odzivne površine (*Response Surface Methodology*, RSM) (**Grafik 4** i **Grafik 5**).



MODDE 10.1 - 11/27/2016 9:06:16 AM (UTC+1)

Grafik 4. Konturni dijagrami uticaja promene koncentracije rastvarača (x1) u rasponu od 0% (tj. 100% vode) do 80% etanola u vodi i masenog odnosa uzorka i rastvarača (x2) u rasponu od 1:10 do 1:60 (korišćenjem fiksnih faktora ekstrakcije: 55°C, 30 min) na pojedinačni sadržaj (mg/mL): kempferola (y1), katehina (y2), vanilinske kiseline (y3), siringinske kiseline (y4), galne kiseline (y5), *trans*-cimetne kiseline (y6), naringenina (y7), hesperetina (y8), rutina (y9), kvercetina (y10), tokom inicijalnog ispitivanja faktora ekstrakcije pomoću *Placket Burman* dizajna eksperimenata.



Grafik 5. Konturni dijagrami uticaja promene koncentracije rastvarača (x_1) u rasponu od 0% (tj. 100% vode) do 80% etanola u vodi i masenog odnosa uzorka i rastvarača (x_2) u rasponu od 1:10 do 1:60 (korišćenjem fiksnih faktora ekstrakcije: 55°C, 30 min) na pojedinačni sadržaj (mg/mL): delfinidin-3-gl (y_1), cijanidin-3-gl (y_2), petunidin-3-gl (y_3), peonidin-3-gl (y_4), malvidin-3-gl (y_5), tokom inicijalnog ispitivanja faktora ekstrakcije pomoću *Plackett Burman* dizajna eksperimenata.

Definisani eksperimentalni faktori imali su različit uticaj na ekstrakciju pojedinačnih fenola. Izuzev galne kiseline, bolja ekstrakcija fenolnih jedinjenja postignuta je pri višim koncentracijama etanola u vodi. Galna kiselina (gde je aromatični prsten okružen sa tri hidroksilne grupe i jednom

karboksilnom grupom) lakše se rastvara u polarnijim vodenim rastvaračima (198). Na ekstrakciju dva fenola (vanilinska kiselina, siringinska kiselina) koncentracija etanola nije imala značajnog efekta. Ovde su bolji prinosi postignuti korišćenjem manjeg odnosa uzorak/rastvarač (1 g uzorka : 10 mL rastvarača). Slično je bilo i za naringenin i hesperetin, dok se za ostale fenole (kempferol, rutin, kvercetin) bolji prinos dobio kada je odnos uzorak / rastvarač bio veći (1 g uzorka : 60 mL rastvarača). Na neke fenole (katehin, galna kiselina, *trans*-cimetna kiselina) odnos uzorak/rastvarača nije imao uticaja. Prema tome, upotreba DoE-a za optimizaciju faktora ekstrakcije pokazala je da je odnos uzorak/rastvarač veoma kritičan faktor i da se njegov uticaj na efikasnost ekstrakcije lako može predvideti ako se optimizacija radi na tradicionalan način.

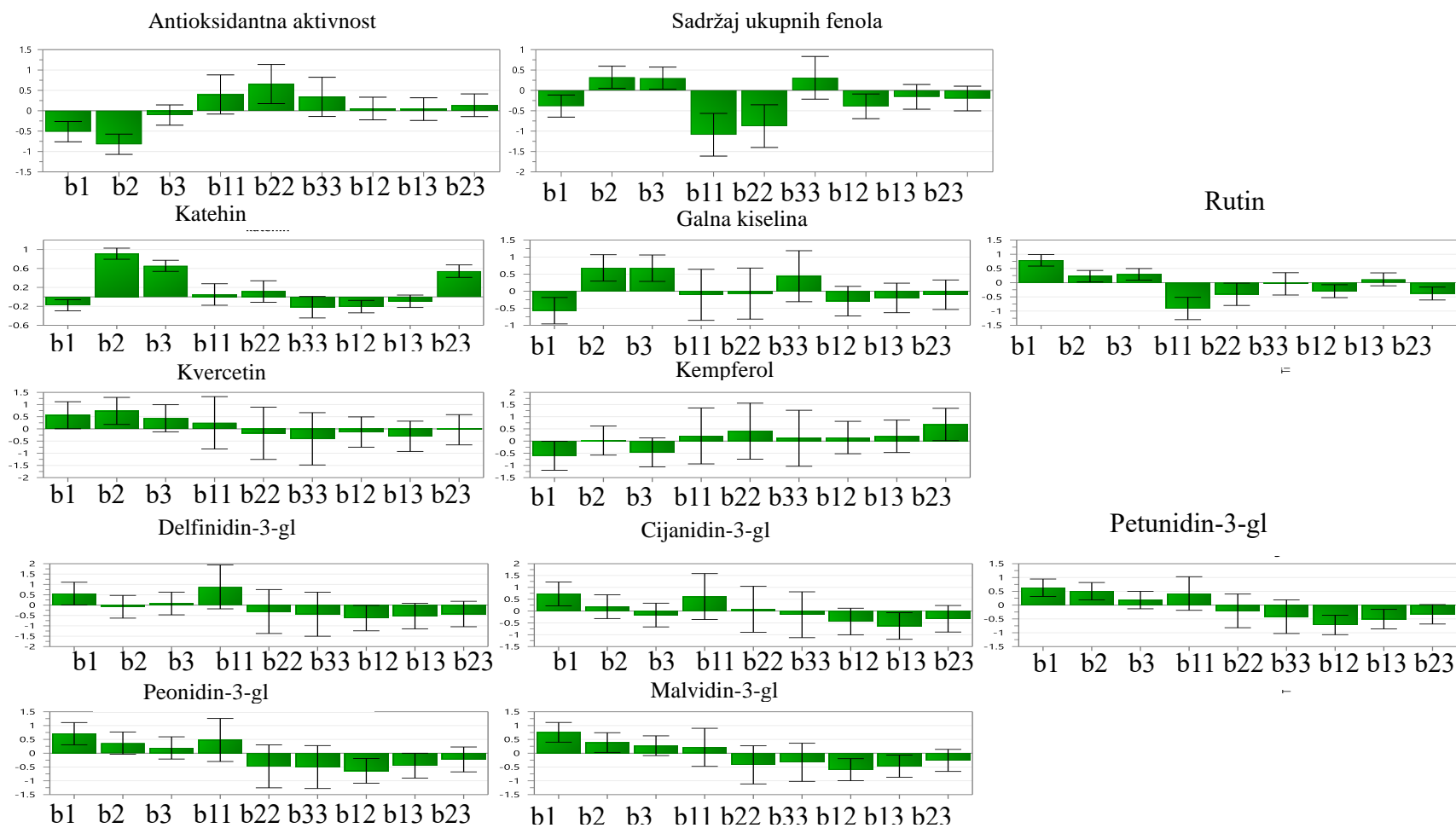
Uticaj koncentracije etanola na prinos ekstrakcije antocijana bio je suprotan rezultatima dobijenih za antioksidantnu aktivnost i većinu pojedinačnih fenola (**Grafik 4**), odnosno bolji prinos antocijana postignut je korišćenjem što nižih koncentracija etanola u vodi. To dovodi do zaključka da je čista voda najbolji rastvarač za ekstrakciju svih antocijana.

Tražeci metodu pogodnu za ekstrakciju antocijana istovremeno sa pojedinačnim fenolnim jedinjenjima, koncentracija etanola je postavljena na 55%, jer je ovo područje gde je svaki dijagram pokazao zadovoljavajući prinos i antocijana i pojedinačnih fenola. Pored toga, u literaturi se spominju slične koncentracije etanola u vodi (50%, 53% i 60%), tako da su dobijeni rezultati istraživanja uporedivi sa drugim rezultatima (195, 200, 201). Bolja ekstrakcija antocijana postignuta je kada je odnos uzorak/rastvarač bio veći (1 g uzorka : 60 mL rastvarača). Imajući u vidu promenljiv uticaj odnosa uzorak/rastvarač na ekstrakciju pojedinačnih fenola i oprečne rezultate dobijene za ekstrakciju većine pojedinačnih fenola i antocijana, kao i uticaj na antioksidantnu aktivnost i sadržaja ukupnih fenola, za ovaj eksperimentalni faktor je predloženo da se autori odluče za optimalnu vrednost na osnovu rezultata dobijenih RSM (*Response Surface*

Methodology) (200). Predloženo je da optimalni odnos uzorak / rastvarač za svrhu ovog istraživanja bude centralna vrednost eksperimentalnog raspona (1:40, 1 g uzorka: 40 mL rastvarača), jer ova vrednost pokriva zadovoljavajuće rezultate za sve odgovore pri koncentraciji etanola od 55%.

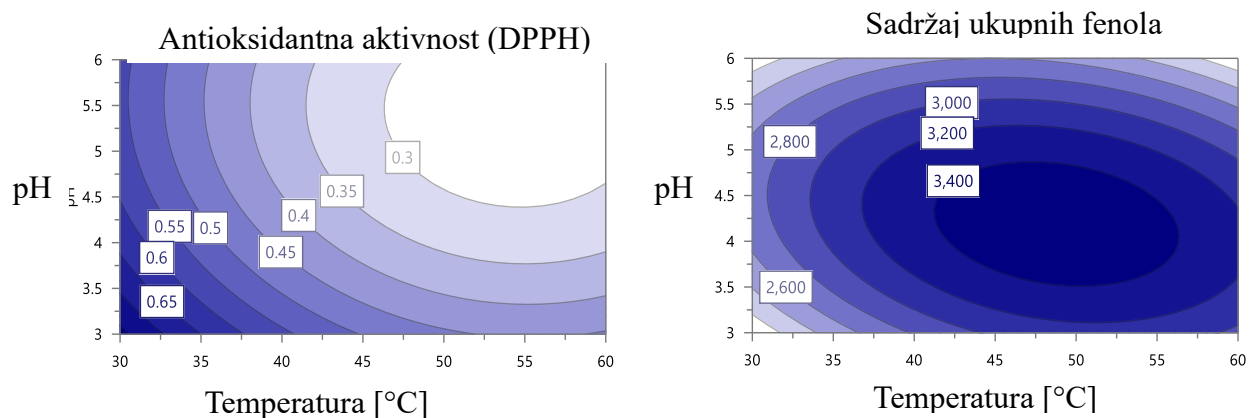
5.3.2. Finalna optimizacija faktora ekstrakcije

Ovaj deo istraživanja bio je usmeren na dalju optimizaciju antioksidantne aktivnosti, ekstrakciju antocijana (delfinidin-3-gl, cijanidin-3-gl, petunidin-3-gl, peonidin-3-gl i malvidin-3-gl) i fenola (kempferol, katehin, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, galna kiselina, *trans*-cimetna kiselina, naringenin, hesperetin, rutin i kvercetin). Set od 17 planiranih eksperimenata u okviru CCF (*2³ full factorial Central Composite Face*) dizajna primenjenih tokom finalne optimizacije metode obuhvatio je ispitivanje tri eksperimentalna faktora: pH vrednost (x1) od 3 do 6, temperaturu ekstrakcije (x2) od 30 do 60°C i vreme ekstrakcije (x3) od 10 do 60 min (**Tabela 4**). Uticaji različitih eksperimentalnih faktora na definisane deskriptore prinosa ekstrakcije (antioksidantna aktivnost, ekstrakcija fenola i ekstrakcija antocijana) prikazani su kroz normalizovane koeficijente DoE (**Grafik 6**).



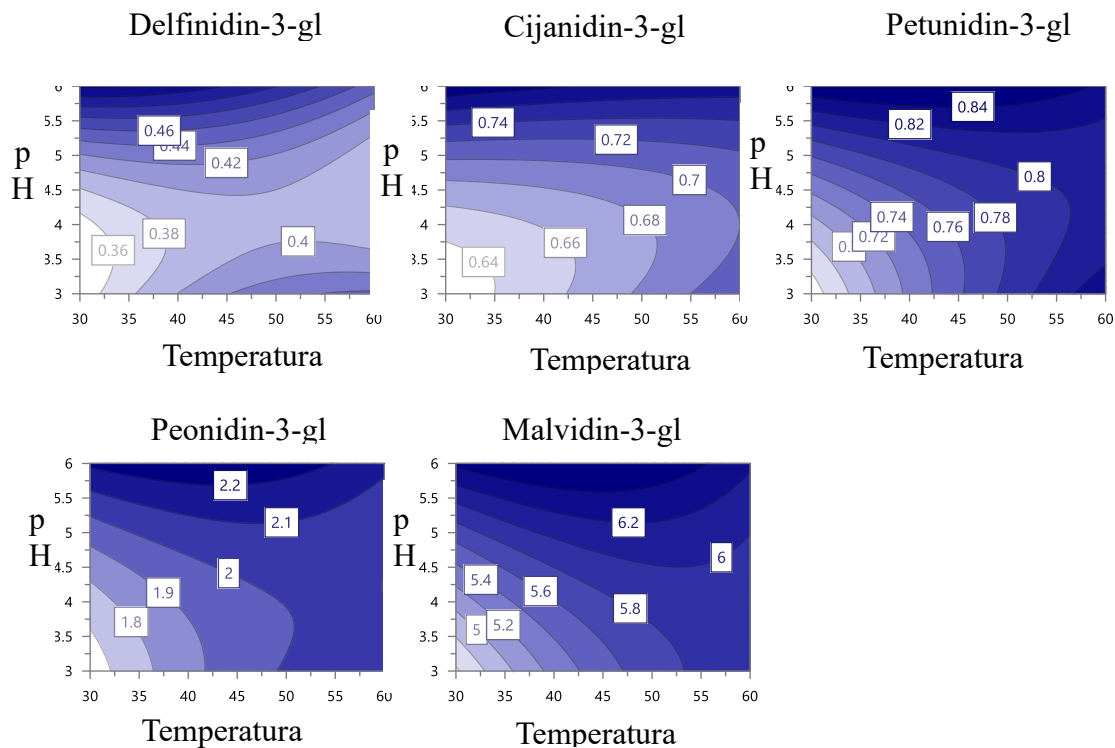
Grafik 6. Normalizovani koeficijenti 2^3 CCF dizajna koji pokazuju uticaj tri različita faktora ekstrakcije: b1 - pH vrednost, b2 - temperaturu ekstrakcije, b3 - vreme ekstrakcije, kao i na njihove interakcije (b11, b22, b33, b12, b13, b23) na deskriptore prinosa ekstrakcije: antioksidantna aktivnost, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj fenola (katehin, galna kiselina, rutin, kvercetin i kempferol) i sadržaj antocijana (delfinidin-3-gl, cijanidin-3-gl, petunidin-3-gl, peonidin-3-gl i malvidin-3-gl).

Normalizovani koeficijenti 2^3 CCF dizajna pokazali su da vreme ekstrakcije (faktor x3) ima najmanji uticaj na efikasnost ekstrakcije, odnosno ovaj faktor je uticao samo na ekstrakciju katehina, galne kiseline i kempferola (pozitivno za prva dva, a negativno za kempferol). Iz tog razloga, da bi se procenio uticaj ostala dva ispitivana faktora (pH vrednosti i temperature ekstrakcije) na antioksidantnu aktivnost, sadržaj ukupnih fenola (**Grafik 7**), sadržaj antocijana (**Grafik 8**) i sadržaj pojedinačnih fenola (**Grafik 9**), vreme ekstrakcije je postavljeno na srednju vrednost ispitivanog opsega (30 min).



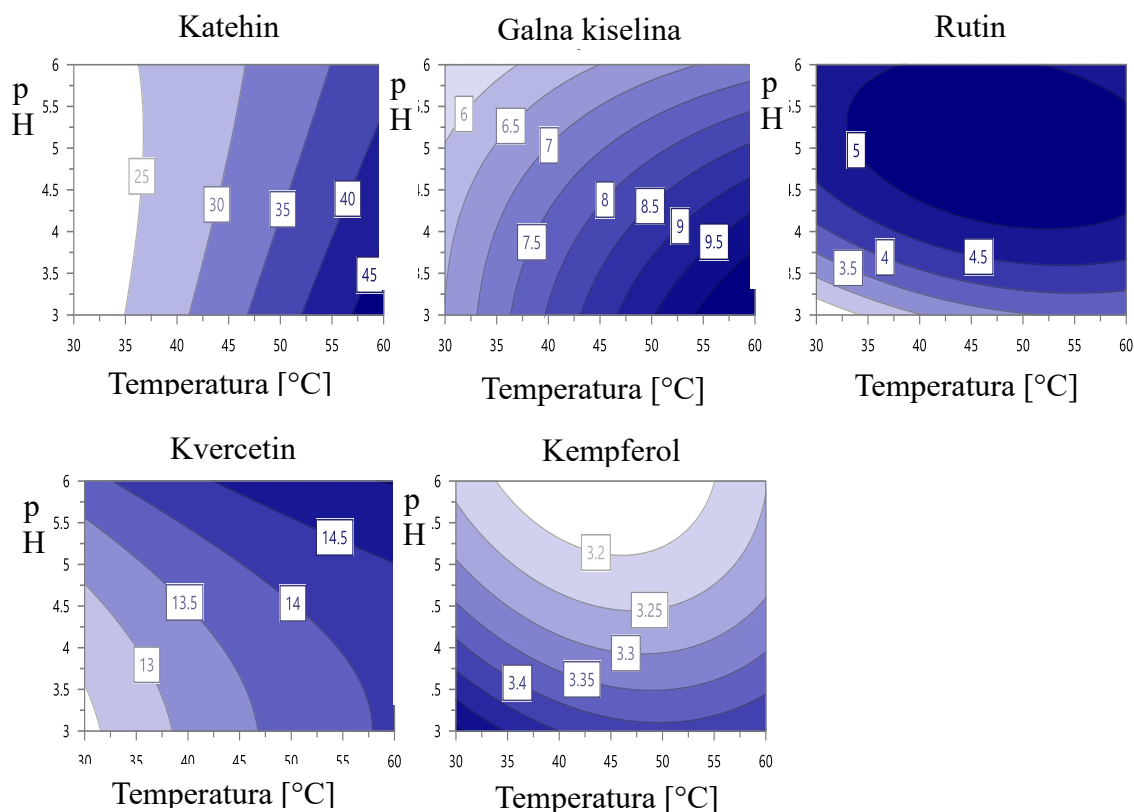
-za vreme ekstrakcije podešeno na 30 min

Grafik 7. Konturni dijagrami uticaja promene pH vrednosti (x1) u rasponu od 3 do 6, temperature ekstrakcije (x2) u rasponu od 30 do 60°C za vreme ekstrakcije od 30 min na antioksidantnu aktivnost (y1) i sadržaj ukupnih fenola (y2) tokom finalne optimizacije faktora ekstrakcije korišćenjem 2^3 CCF dizajna DoE.



-pri vremenu ekstrakcije od 30 min

Grafik 8. Konturni dijagrami uticaja promene pH vrednosti (x_1) u rasponu od 3 do 6, temperature ekstrakcije (x_2) u rasponu od 30 do 60°C za vreme ekstrakcije od 30 min na pojedinačni sadržaj (mg/mL): delfinidin-3-gl (y_1), cijanidin-3-gl (y_2), petunidin-3-gl (y_3), peonidin-3-gl (y_4), malvidin-3-gl (y_5), tokom finalne optimizacije faktora ekstrakcije korišćenjem 2^3 CCF dizajna DoE.



-pri vremenu ekstrakcije od 30 min

Grafik 9. Konturni dijagrami uticaja promene pH vrednosti (x1) u rasponu od 3 do 6, temperature ekstrakcije (x2) u rasponu od 30 do 60°C za vreme ekstrakcije od 30 min na pojedinačni sadržaj (mg/mL): katehina (y1), galne kiseline (y2), rutina (y3), kvercetina (y4) i kempferola (y5) tokom finalne optimizacije faktora ekstrakcije korišćenjem 2^3 CCF dizajna DoE.

Prema dijagramima deskriptora efikasnosti ekstrakcije za definisan opseg eksperimentalnih faktora, optimalna antioksidantna aktivnost i sadržaj ukupnih fenola ekstrakata postignuti su pri višim temperaturama i pH vrednostima između 4 i 5. Temperatura povećava efikasnost ekstrakcije poboljšanjem rastvorljivosti rastvoraka i koeficijenta difuzuje. Međutim, na temperaturi višoj od

50°C stabilnost fenola je smanjena i može rezultirati njihovom denaturacijom, jer su fenoli kao reaktivne hemijske vrste, podložni oksidaciji, konjugaciji, hidrolizi, polimerizaciji i građenju kompleksa. Pored toga, slični rezultati potvrđeni su i kroz druga istraživanja (181) koja su navela da zagrevanje na 50 ili 60°C uzrokuje značajno smanjenje koncentracije fenola i antioksidantnog kapaciteta ekstrakata dobijenih iz otpadnih voda mlina maslina. Ovo smanjenje može biti povezano sa termičkom aktivacijom endogene fenol-oksidadze. Termička aktivacija fenol-oksidadze iz drugih izvora, poput jabuke, događa se između 45 i 65°C (202). Zbog toga je maksimalna temperatura za ekstrakciju fenola iz komine grožđa čvrsto-tečnom ekstrakcijom postavljena na 60°C (162, 182).

Što se tiče sadržaja antocijana, najbolji rezultati su dobijeni pri višim temperaturama ekstrakcije (temperatura iznad 50°C dala je dobar prinos svih antocijana) i pH vrednosti iznad 5 (ali takođe i pH vrednosti između 4 i 5).

Bolja ekstrakcija fenola postignuta je pri višim temperaturama, dok uticaj pH vrednosti na ekstrakciju pojedinačnih fenola nije bio tako očigledan. Za neke fenole (rutin i kvercetin) bolji rezultati postignuti su pri višim pH vrednostima, za druge (galna kiselina i kempferol) pri nižim pH vrednostima, dok pH vrednost nije uticala na ekstrakciju katehina. Međutim, pri pH 5 (koji se pokazao optimalnim za gore navedene deskriptore: antioksidantna aktivnost, sadržaj ukupnih fenola i antocijana), sadržaj ekstrahovanih fenola bio je zadovoljavajući pri višim temperaturama. Dodavanje kiselina rastvaračima može povećati efikasnost ekstrakcije. Brazinha i njegove kolege su u svom radu dodali 3 g/L limunske kiseline u 60%-tni etanol, što je dovelo do povećanja prinosa galne kiseline, katehina, epikatehina i sadržaja ukupnih fenola (196). Upotrebom citratno-fosfatnog pufera (pH 3, 5 i 7) za ekstrakciju fenola iz grozdova vinove loze bolja antioksidantna aktivnost dobijenih ekstrakata postignuta je pri pH vrednostima 5 i nižim (201). Takođe, pokazano

je da dodavanje hlorovodonične kiseline rastvaraču dovodi do većeg prinosa ukupnih fenola i antocijana u ispitivanim ekstraktima (195). Hosseini i njegove kolege su u svom radu istražili uticaj dodavanja tri različite organske kiseline u sistem rastvarača voda / etanol / organska kiselina (50:48:2) na ekstrakciju fenola i antocijana iz kore crvenog kupusa, turske loze i patlidžana. Pošto pH vrednost zakišelnog rastvarača utiče na konačni sadržaj fenola i antocijana, ekstrakcija je rađena pri konstantnom početnom pH (pH=3,49). U poređenju sa sirćetnom i hlorovodoničnom kiselinom, dodavanje limunske kiseline u sistem rastvarača dovelo je do najvišeg sadržaja ukupnih fenola, antocijana i antioksidantne aktivnosti ekstrakata za sva tri različita izvora. To može značiti da je uloga limunske kiseline u procesu ekstrakcije dvostruka. Osim što snižava pH rastvarača, limunska kiselina može delovati i kao ekstraktant (203).

5.3.3. Pregled rezultata

Imajući u vidu sveobuhvatne kriterijume za efikasnost ekstrakcije, zaključeno je da su 55%-tni etanol, odnos uzorak / rastvarač 1:40, pH 4,5, T 55°C i vreme od 30 min optimalni eksperimentalni faktori za ekstrakciju fenola iz komine grožđa. U zavisnosti od osnovnog cilja procesa ekstrakcije (antioksidantna aktivnost, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj pojedinačnih fenola ili sadržaj antocijana) ovi parametri se mogu lako modifikovati kako bi se ostvario željeni cilj. Dobijeni rezultati bili su u dobroj korelaciji sa rezultatima dostupnim u literaturi, dodatno pokrivajući optimizaciju faktora koji se u publikacijama retko spominju (odnos uzorak / rastvarač i pH vrednost ekstrakcionog medijuma).

5.4. Uticaj resveratrola na glikemijski i lipidni status

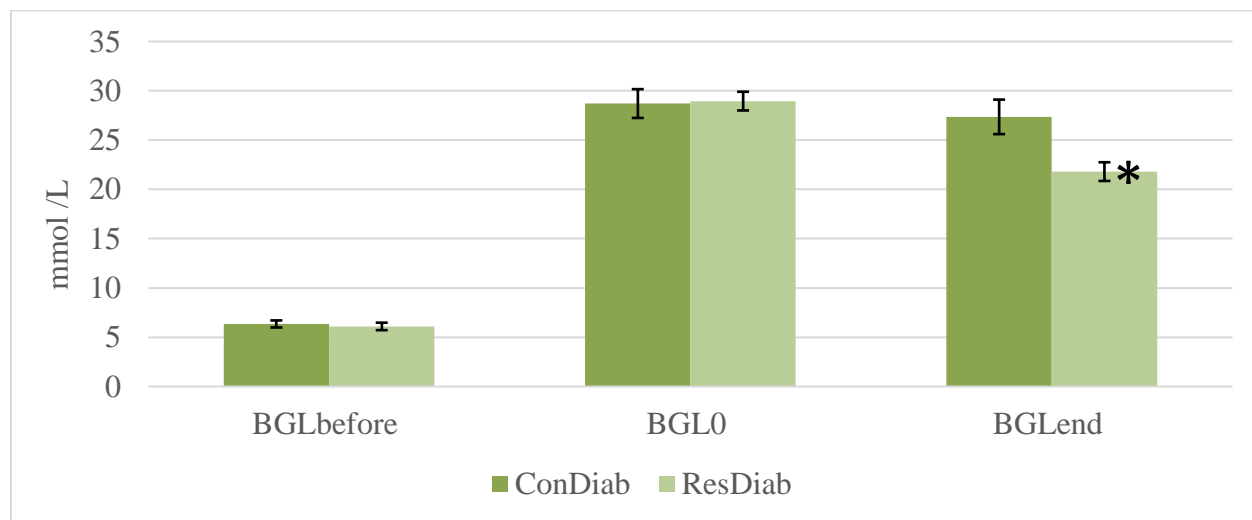
5.4.1. Analiza dijetetskog suplementa na sadržaj resveratrola i antioksidantnu aktivnost

Sadržaj *trans*-resveratrola u dijetetskom suplementu iznosio je $44,005 \pm 0,27$ mg po doziranoj jedinici (99,2% suvog ekstrakta korena). Sadržaj resveratrola u ispitanom suplementu (99,2%) bio je u skladu sa deklaracijom proizvoda od $\approx 98\%$ *trans*-resveratrola.

In vitro DPPH određivanje antioksidantne aktivnosti suplementa na bazi resveratrola potvrdilo je antioksidantno dejstvo izabranog suplementa (suplement na bazi resveratrola, $IC_{50}=0,0176 \pm 0,001$ mg/mL; α -tokoferol, $IC_{50}=0,00253$ mg/mL). Nađeno je da je kapacitet hvatanja slobodnih radikala 1 mg α -tokoferola, dobro poznatog antioksidanta, ekvivalentan sa 6,9 mg ispitanog suplementa resveratrola.

5.4.2. Uticaj dijetetskog suplementa na bazi resveratrola na glikemijski status

Uticaj suplementacije resveratrolom na glikemiju dijabetičnih pacova prikazan je na **Grafiku 10**.



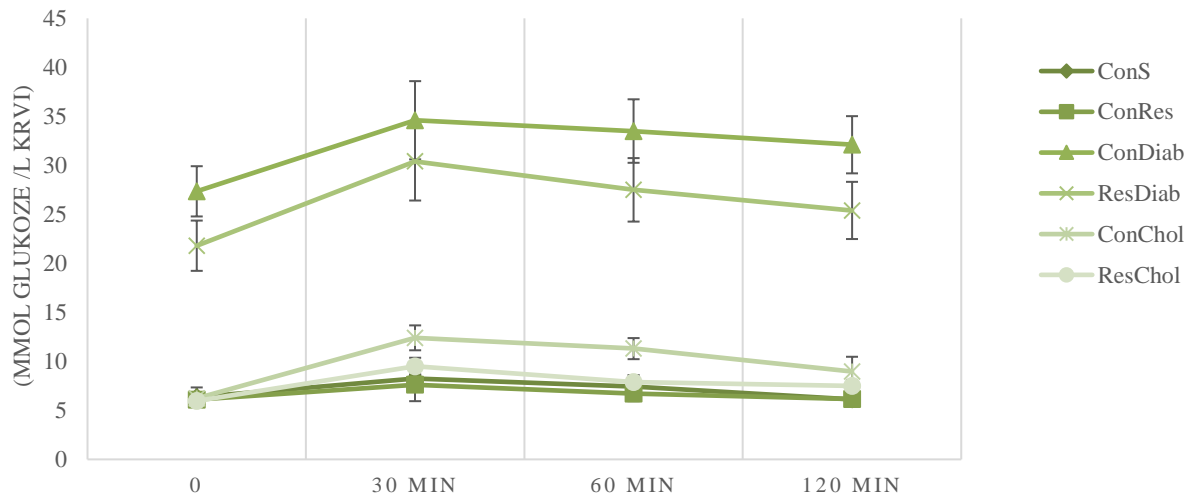
Grafik 10. BGL (*Blood glucose levels*) - nivo glukoze u krvi dijabetičnih pacova kojima je davan fiziološki rastvor (ConDiab) ili dijetetski suplement resveratrola 20 mg/kg (ResDiab). BGLbefore

- pre administracije streptozotocina, BGL0 - 48 sati nakon administracije streptozotocina i BGLend – na poslednji dan eksperimenta. *statistički značajno u poređenju sa ConDiab ($p < 0,001$)

Kombinacija 10%-tne fruktoze u vodi i streptozotocina uspešno je indukovala perzistentnu hiperglikemiju kod eksperimentalnih životinja. Ovaj model služi kao alternativni, negenetski model pacova za indukovanje dijabetesa tipa 2 (184). Poboljšana tolerancija na glukozu primećena u ovom ispitivanju je u skladu sa drugim istraživanjima koja su takođe pokazala da resveratrol poboljšava delovanje insulina kod glodara sa indukovanom rezistencijom na insulin (86, 95). Resveratrol može pospešiti delovanje insulina kroz smanjenje adipoznosti, inhibiciju ekspresije inflamatornih gena i aktivaciju SIRT1 i 5'-AMP- aktiviranih enzima protein kinaza (204). Anti-dijabetički efekti resveratrola se takođe mogu objasniti njegovim visokim antioksidantnim kapacitetom, koji može dovesti do zaštite β -ćelija pankreasa (205). Nije bilo statistički značajne razlike između dve grupe kojima je meren nivo šećera u krvi pre primene streptozotocina (BGLbefore; $p=0,136$), kao ni između dve grupe kojima je nivo šećera u krvi meren 48 sati nakon primene streptozotocina (BGL0; $p=0,366$). Nakon sedam dana suplementacije resveratrolom, statistički značajna razlika dobila se između grupe životinja koja je dobijala resveratrol (ResDiab) i dijabetične kontrolne grupe životinja (ConDiab) ($p < 0,001$). Dijabetični pacovi tretirani resveratrolom imali su za 25,46% niži nivo šećera u krvi nego odgovarajuća kontrola.

Kriva glukoze u krvi OGTT (*Oral Glucose Tolerance Test*) pokazala je da su nivoi glukoze u krvi kod dijabetičnih i hiperlipidemičnih pacova bili viši od nivoa u kontrolnoj grupi izmerenih 0–120 min nakon oralnog unosa glukoze (**Grafik 11**).

OGTT



Grafik 11. OGTT (*Oral Glucose Tolerance Test*) dijabetičnih i hiperlipidemičnih pacova. ConS- kontrolna grupa, ConRes- pacovi tretirani resveratrol suplementom (20 mg/kg), ConDiab- dijabetični pacovi, ResDiab- dijabetični pacovi tretirani resveratrol suplementom 20 mg/kg), ConChol- hiperlipidemični pacovi, ResChol- hiperlipidemični pacovi tretirani resveratrol suplementom 20 mg/kg.

Tretman resveratrolom značajno je poboljšao toleranciju na glukozu dijabetičnih pacova ($p < 0,05$). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Iang-a i Kanga koji su utvrdili da resveratrol ima sposobnost da poboljša toleranciju na glukozu kod dijabetičnih pacova (121). Kod pacova hranjenih fruktozom, primena resveratrola smanjila je povišen nivo glukoze u krvi nakon intraperitonealnog testa opterećenja glukozom (95). Pored toga, OGTT je pokazao da je tolerancija na glukozu pogoršana i kod pacova sa indukovanom hiperlipidemijom, dok je ovo oštećenje poboljšano suplementacijom hiperlipidemičnih pacova resveratrolom. Smanjena tolerancija na opterećenje glukozom kod hiperlipidemičnih pacova je posledica insulinske rezistencije. Poznato je da ishrana sa visokim udelom masti izaziva insulinsku rezistenciju i upalu u visceralnom belom

masnom tkivu. Mehanizam koji delimično može objasniti uticaj resveratrola na osetljivost insulina je prevencija upale poboljšanjem ćelijskog stresa i inhibicijom ekspresije inflamatornih gena (206-208). Resveratrol povećava ekspresiju pAkt, GLUT4 i IRS-1 u masnom tkivu i smanjuje nivo proinflamatornih citokina u serumu (209).

5.4.3. Uticaj dijetetskog suplementa na bazi resveratrola na lipidni status

Indukcija hiperlipidemije kod životinja bila je uspešna davanjem standardne ishrane uz dodatak holesterola i holne kiseline kao pospešivača njegove apsorpcije. Statistički značajno povećanje ukupnog holesterola, LDL-holesterola i triacilglicerola (**Tabela 18**) primećeno je nakon 30 dana. Suplementacija resveratrolom značajno je uticala na metabolizam lipida kod zdravih, dijabetičnih i pacova sa indukovanom hiperlipidemijom. Statistički značajna razlika nije primećena u nivou ukupnog holesterola između grupa životinja podvrgnutih 30-dnevnoj ishrani uz dodatak holesterola koja je primala fiziološki rastvor (ConChol) i suplement resveratrola (ResChol), niža vrednost je dobijena u grupi koja je bila pod suplementacijom. Između istih grupa primećeno je statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnih triacilglicerola (za 40,54%, $p < 0,01$) i LDL-holesterola (za 21,02%, $p = 0,043$), dok je primećen značajan porast HDL-holesterola (za 13,23%, $p = 0,022$). Ovo povećanje HDL frakcije je razlog za slične nivoe ukupnog holesterola kod grupe hiperlipidemičnih pacova tretiranih resveratrolom i odgovarajuće kontrolne grupe. Kod pacova sa dijabetesom došlo je do značajnog povećanja ukupnih nivoa triacilglicerola (**Tabela 18**). Ovo potvrđuje da korišćen streptozotocin/fruktoza model pacova za indukovanje dijabetesa ne samo da indukuje perzistentnu hiperglikemiju, već i dovodi do promena u lipidnom sastavu karakterističnih za dijabetes tipa 2 (210). Suplementacija resveratrolom snizila je ukupne triacilglicerole kod dijabetičnih pacova, ali bez statističke značajnosti. Dijabetički pacovi su tretirani 7 dana

resveratrolom, što može biti razlog zašto promene u lipidnom profilu nisu tako izražene kao kod hiperlipidemičnih pacova tretiranih 30 dana.

Tabela 18. Lipidni profil- koncentracije u plazmi ukupnog holesterola, triacilglicerola, LDL-holesterola i HDL-holesterola ($X \pm SD$)

Grupa	ConS	ConRes	ConDiab	ResDiab	ConChol	ResChol
Ukupni holesterol (mmol/L)	1,93±0,22	1,79±0,16	1,96,±0,15	1,74±0,06	2,68±0,16#	2,56±0,19
Triacilgliceroli (mmol/L)	0,19±0,04	0,20±0,22	1,31±0,08	1,20±0,17	0,52±0,10#	0,37±0,07*
HDL-holesterol (mmol/L)	0,66±0,10	0,62±0,04	0,60±0,07	0,73±0,05	0,68±0,03	0,77±0,09*
LDL-holesterol (mmol/L)	1,18±0,30	1,00±0,15	1,10±0,12	0,46±0,10	1,90±0,40#	1,57±0,12*

ConS- fiziološki rastvor 1 mL/kg *p.o.*; ConRes- resveratrol suplement 20 mg/kg *p.o.*; ConDiab- 10%-tna fruktoza u vodi i streptozotocin 40 mg/kg *i.p.*; ResDiab- streptozotocin 40 mg/kg *i.p.* i resveratrol suplement 20 mg/kg *p.o.* tokom 7 dana; ConChol- hiperlipidemična kontrola; ResChol- hiperlipidemični pacovi i resveratrol suplement 20 mg/kg, *p.o.* tokom 30 dana; #statistički značajna razlika u poređenju sa ConS ($p < 0,05$, $n=6$); *statistički značajna razlika u poređenju sa ConChol ($p < 0,05$, $n=6$).

Mnoge studije su potvrdile da duže davanje resveratrola ima sposobnost snižavanja nivoa lipida u krvi: kod pacova hranjenih holesterolom i tretiranih 4 nedelje (211), hiperlipidemičnih miševa tretiranih šest nedelja (139) i gojaznih pacova tretiranih osam nedelja (114). Međutim, ima i ispitivanja sa oprečnim rezultatima, pa tako sedmodnevna primena resveratrola (50 mg/kg) nije

uspela da smanji koncentraciju holesterola i triacilglicerola u serumu (212). To se može objasniti predloženim mehanizmom delovanja resveratrola, koji uključuje promene u aktivnosti i ekspresiji enzima koji su uključeni u metabolizam holesterola, što zahteva određeno vreme pre nego što se postigne puni efekat.

5.4.4. Uticaj suplementa resveratrola na telesnu masu

U ovom ispitivanju statistički značajno povećanje telesne mase zabeleženo je u svim eksperimentalnim grupama tokom 7 i 30 dana (**Tabela 19**).

Tabela 19. Početna i krajnja telesna masa (g, $X \pm SD$)

Grupa	ConS	ConRes	ConDiab	ResDiab	ConChol	ResChol
Početna telesna masa	279,83 ±12,53	294,00 ±8,74	246,75 ±18,07	220,80 ±7,63	199,17 ±17,44	201,00 ±9,44
Krajnja telesna masa	330,17 ±13,29	342,50 ±15,42	292,50 ±23,66	258,00 ±9,80	272,00 ±12,25	260,40 ±14,92
Δ	50,33± 9,99	48,50± 14,15	45,75 ±0,74	37,20 ±7,41	72,83 ±20,07	59,40 ±18,96

ConS- fiziološki rastvor 1 mL/kg *p.o.*; ConRes- resveratrol suplement 20 mg/kg *p.o.*; ConDiab- 10%-tna fruktoza u vodi i streptozotocin 40 mg/kg *i.p.*; ResDiab- streptozotocin 40 mg/kg *i.p.* i resveratrol suplement 20 mg/kg *p.o.* tokom 7 dana; ConChol- hiperlipidemična kontrola; ResChol- hiperlipidemični pacovi i resveratrol suplement 20 mg/kg, *p.o.* tokom 30 dana

Pacovi sa indukovanom dijabetesom dobijali su manje na masi od ostalih životinja. Suplementacija resveratrolom nije značajno smanjila telesnu masu, mada su sve tri grupe životinja koje su dobijale suplementaciju imale manju masu u poređenju sa njihovim kontrolnim grupama koje su primale

fiziološki rastvor. Kod pacova sa fruktoza/streptozotocin indukovanim dijabetesom manje povećanje telesne mase bilo je u grupi koja je dobijala resveratrol suplement u poređenju sa kontrolnom grupom, za razliku od dijabetes tipa 1 modela, gde usled smanjene endogene proizvodnje insulina dolazi do hiperglikemije i porasta telesne mase (213). Preventivno delovanje resveratrola na povećanje telesne mase pacova hranjenih visoko-kaloričnom ishranom je upitno. Dok su neki autori dobili statistički značajno smanjenje telesne mase kod glodara hranjenih ishranom sa visokim udelom masti (214-218), određeni autori dobili su blago smanjenje telesne mase (106) ili izostanak smanjenja (219). Nedavni pregled zaključio je da se efekti resveratrola na telesne masti kod glodara razlikuju u zavisnosti od uslova hranjenja i da nema dovoljno dokaza na osnovu kojih bi se resveratrol predložio za korišćenje u tretmanu gojaznosti (220).

5.4.5. Uticaj suplementa resveratrola na biohemijske parametre

Upoređivanjem rezultata nakon određivanja serumskih koncentracija aminotransferaze u kontrolnim i eksperimentalnim grupama zdravih životinja (**Tabela 20**), niže vrednosti za AST (za 12,76%) i ALT (za 23,79%) dobijene su u grupi koja je bila pod suplementacijom resveratrola od 30 dana, međutim, bez statističke značajnosti. Za dve grupe životinja sa indukovanim dijabetesom, primećeni su niži nivoi ALT, AST i ALP kod životinja koje su bile podvrgnute suplementaciji u periodu od 7 dana u poređenju sa kontrolnom grupom koja je primala fiziološki rastvor, ali takođe bez statističke značajnosti. Za dve grupe životinja sa indukovanom hiperlipidemijom, niže vrednosti ALT, AST i ALP primećene su za životinje koje su bile podvrgnute suplementaciji tokom 30 dana, ali, takođe, bez statističke značajnosti. Statistički značajno niži nivoi ALP dobijeni su kod zdravih životinja ($p=0,024$). Upoređivanjem rezultata nakon određivanja serumskih koncentracija uree, kreatinina i mokraćne kiseline između kontrolnih i eksperimentalnih grupa životinja sa indukovanim dijabetesom (**Tabela 20**), značajno niži nivoi kreatinina (za 22,85%,

$p=0,024$) i mokraćne kiseline (za 25,55%, $p=0,017$) dobijeni su za grupu koja je bila pod suplementacijom u periodu od 7 dana. Niža vrednost je primećena i za ureu (za 26,41%), blizu statističke značajnosti ($p=0,057$).

Ovi rezultati potvrđuju prethodna ispitivanja da resveratrol može poboljšati nekoliko vrsta oštećenja bubrega, uključujući dijabetiku nefropatiju, kao i oštećenja izazvana lekovima, sepsom i ishemija-reperfuzijom (69, 221, 222). Između dve grupe životinja sa indukovanom hiperlipidemijom nije bilo statistički značajnog smanjenja sva tri parametra bubrežne funkcije.

Tabela 20. Parametri jetrene (AST, ALT i ALP, U/L, $X \pm SD$) i bubrežne (urea, mmol/L, $X \pm SD$; kreatinin i mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$, $X \pm SD$) funkcije

Grupa	ConS	ConRes	ConDiab	ResDiab	ConChol	ResChol
AST	117,83 $\pm 11,31$	104,50 $\pm 7,12$	135,25 $\pm 6,06$	122,00 $\pm 12,85$	140,17 $\pm 35,56$	120,40 $\pm 4,22$
ALT	29,50 $\pm 3,43$	23,83 $\pm 2,05$	38,00 $\pm 4,87$	37,60 $\pm 26,60$	30,00 $\pm 18,60$	17,40 $\pm 1,74$
ALP	225,00 $\pm 22,86$	163,00 $\pm 12,57^*$	1019,25 $\pm 80,43$	1005,80 $\pm 54,11$	461,67 $\pm 42,07$	445,21 $\pm 38,27$
Urea	6,40 $\pm 0,86$	5,55 $\pm 0,52$	13,45 $\pm 3,17$	10,64 $\pm 2,39$	7,45 $\pm 0,72$	7,14 $\pm 0,52$
Kreatinin	60,17 $\pm 5,02$	57,17 $\pm 5,12$	71,50 $\pm 6,12$	58,20 $\pm 5,98^*$	55,50 $\pm 6,44$	51,80 $\pm 1,94$
Mokraćna kiselina	88,53 $\pm 9,70$	84,26 $\pm 11,40$	114,25 $\pm 8,48$	91,00 $\pm 10,62^*$	114,17 $\pm 43,75$	112,00 $\pm 15,50$

ConS- fiziološki rastvor 1 mL/kg *p.o.*; ConRes- resveratrol suplement 20 mg/kg *p.o.*; ConDiab- 10%-tna fruktoza u vodi i streptozotocin 40 mg/kg *i.p.*; ResDiab- streptozotocin 40 mg/kg *i.p.* i resveratrol suplement 20 mg/kg *p.o.* tokom 7 dana; ConChol- hiperlipidemična kontrola; ResChol-

hiperlipidemični pacovi i resveratrol suplement 20 mg/kg, *p.o.* tokom 30 dana; *statistički značajna razlika u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom ($p < 0,05$, $n=6$).

6. ZAKLJUČAK

Ispitivanje kvaliteta i bezbednosti 14 dijetetskih suplemenata na bazi grožđa ili japanskog troskota u okviru prvog dela disertacije donelo je zaključke koji su delimično ili u potpunosti potvrdili elemente hipoteze 1. Kod ispitivanja kvaliteta suplemenata samo dva od 14 nisu zadovoljila farmakopejske zahteve za lekove u pogledu ujednačenosti mase i ujednačenosti sadržaja. Međutim, ispitivanje brzine rastvorljivosti dalo je veoma loše rezultate, gde ni jedan suplement nije oslobodio ni blizu dovoljnu količinu *trans*-resveratrola, čime se postavlja pitanje njihove efikasnosti kod ljudi. S obzirom da *trans*-resveratrol ima veoma malu rastvorljivost u vodi (oko 30 mg/L) i veoma nisku bioraspoloživost (manju od 1% usled efekta prvog prolaska kroz jetru i ubrzane eliminacije), razvijanje novih formulacija za primenu suplemenata može nadomestiti navedene nedostatke. Jedno od rešenja je inkorporiranje *trans*-resveratrola u liposome ili upotreba micelarnih sistema, čime bi se značajno povećala njegova rastvorljivost u vodi, a time i bioraspoloživost. Dobijeni rezultati kontrole kvaliteta suplemenata ukazuju na probleme koji se mogu javiti i kod drugih suplemenata dostupnih na tržištu, a posebno kod onih čije aktivne komponente imaju malu rastvorljivost u vodi. U našem ispitivanju hipoteza 1.1. je delimično potvrđena jer je većina suplemenata ispunila zahteve farmakopeje u pogledu ujednačenosti mase i sadržaja doznih jedinica. Dijetetski suplementi na bazi grožđa i japanskog troskota posedovali su antioksidantni kapacitet čime je potvrđena hipoteza 1.2. Suplementi su bili zdravstveno ispravni u pogledu prisustva ostataka pesticida i toksičnih metala, čime je potvrđena bezbednost njihove upotrebe i hipoteza 1.3.

Farmakodinamska ispitivanja na pacovima pokazala su antioksidantna, anti-dijabetska i hipolipidemijska svojstva dijetetskog suplementa na bazi resveratrola. Suplement resveratrola značajno je poboljšao lipidni profil u plazmi i toleranciju na glukozu kod pacova sa indukovanim

dijabetesom tipa 2 i hiperlipidemijom, čime je potvrdio svoju delotvornost i hipotezu 2. Međutim, kako ispitani suplement resveratrola nije prošao testove farmakopeje za brzinu oslobađanja aktivne komponente, postavlja se pitanje njegove delotvornosti kod ljudi. U prilog tome je i činjenica da je bioraspoloživost resveratrola kod pacova značajno viša nego kod ljudi (manje od 1%). Stoga, jedini način da se delotvornost suplementa resveratrola potvrdi kod ljudi je dobro dizajnirano kliničko ispitivanje na dovoljnom broju ispitanika.

Analiza pet različitih komina grožđa u okviru prvog dela ispitivanja pokazala je da ovaj nusprodukt proizvodnje vina sadrži različite fenole od kojih je samo katehin bio prisutan u značajnoj količini. Time je delimično potvrđena hipoteza 3 da komina grožđa sadrži znatnu količinu fenola i predstavlja njihov značajan izvor. Ipak, kvalitativan i kvantitativan sastav fenola u komini značajno varira u odnosu na sortu i berbu grožđa, kao i od primenjenog tehnološkog procesa proizvodnje vina. U drugom delu ispitivanja optimizovani su faktori ekstrakcije fenola na jednoj vrsti komine. Imajući u vidu sveobuhvatne kriterijume u pogledu efikasnosti ekstrakcije, zaključeno je da su 55%-tni etanol, odnos uzorak / rastvarač 1:40, pH 4,5, T 55°C i vreme od 30 min optimalni eksperimentalni uslovi za ekstrakciju fenola iz komine grožđa. U zavisnosti od osnovnog cilja procesa ekstrakcije (antioksidantna aktivnost, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj pojedinačnih fenola ili sadržaj antocijana) ovi parametri se mogu lako modifikovati kako bi se ostvario željeni cilj.

7. LITERATURA

1. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. 2002.
2. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda, Službeni glasnik RS br. 45/10. 2010.
3. Asher GN, Corbett AH, Hawke RL. Common Herbal Dietary Supplement-Drug Interactions. *Am Fam Physician* 2017;96:101-107.
4. Lewandowska U, Szewczyk K, Hrabec E, Janecka A, Gorlach S. Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols. *J Agric Food Chem* 2013;61:12183-99.
5. Kunová S, Felsöciová S, Tvrďá E, Ivanišová E, Kántor A, Žiarovská J, et al. Antimicrobial activity of resveratrol and grape pomace extract. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* 2019;13:363-368.
6. Ali K, Maltese F, Choi Y, Verpoorte R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem Rev* 2010;9:357–378.
7. Flamini R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. *Wiley Periodicals* 2003;22:218-250.
8. Mimica-Dukić N, Budimčević MM, Mihajlović AB, Gašić SO. Antioxidant activity of plant phenolics. Flavonoids and phenolic acids. *J Serb Chem Soc* 1994;59:823-828.
9. Mimica-Dukić N. *In vivo* i *in vitro* ispitivanja antioksidantnih svojstava biljnih ekstrakata. *Arh Farm* 1997.
10. Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Građevinska knjiga, 2004.

11. Sun AY, Ribes AM, Leandro MC, Belchior AP, Spranger MI. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal Chim Acta* 2006;563:382-90.
12. Pussa T, Florem J, Kuldkepp P, Raal, A. Survey of Grapewine *Vitis Vinifera* Stem Polyphenols by Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem* 2006;54:7488-7494.
13. Cvejić J, Puškaš V, Miljić U, Torović Lj, Rakić D. Probus, Rumenika and Frankovka red wines from Fruška gora (Serbia): Varietal differentiation and changes of phenolic compounds during maceration. *J Food Sci Technol* 2016;242:1319-1329.
14. Atanacković M, Petrović A, Jović S, Gojković-Bukarica Lj, Bursać M, Cvejić J. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chem* 2012;131:513-518.
15. Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho CT, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem* 2000;48:253-6.
16. Kolouchova-Hanzlikova I, Melzoch K, Fili V, Smidrkal J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem* 2004;87:151-58.
17. Abolaji AO, Adedera AO, Adie MA, Vicente-Crespo M, Farombi EO. Resveratrol prolongs lifespan and improves 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced oxidative damage and behavioural deficits in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;503:1042-1048.

18. Hsu HT, Tseng YT, Wong WJ, Liu CM, Lo YC. Resveratrol prevents nanoparticles-induced inflammation and oxidative stress via down regulation of PKC- α and NADPH oxidase in lung epithelial A549 cells. *BMC Complement Altern Med* 2018;18:211.
19. Qin N, Tan X, Jiao Y, Liu L, Zhao W, Yang S, et al. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Sci Rep* 2014;4:5467.
20. Xu K, Liu XF, Ke ZQ, Yao Q, Guo S, Liu C. Resveratrol Modulates Apoptosis and Autophagy Induced by High Glucose and Palmitate in Cardiac Cells *Cell Physiol Biochem* 2018;46:2031-2040.
21. Novelle MG, Wahl D, Dieguez C, Bernier M, de Cabo R. Resveratrol supplementation, where are we now and where should we go? *Ageing Res Rev* 2015;21:1-15.
22. Cai H, Scott E, Kholghi A, Andreadi C, Rufini A, Karmokar A, et al. Cancer chemoprevention: Evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. *Sci Transl Med* 2015;7:298ra117.
23. Gurbuz O, Gocmen D, Dagdelen F, Gursoy M, Aydin S, Sahin I, et al. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chem* 2007;100:518-25.
24. Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot* 2011;62:2465–2483.
25. Rodriguez Vaquero MJ, Alberto MR, Manca de Nadra MC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 2005;18:93-101.

26. Ananga A, Georgiev V, Tsoлова V. Manipulation and engineering of metabolic and biosynthetic pathway of plant polyphenols. *Curr Pharm Des* 2013;19:6186–6206.
27. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* 2010;11:622–646.
28. He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, et al. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 2010;15:9057–9091.
29. Georgiev V, Ananga A, Tsoлова V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients* 2014;6:391-415.
30. Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Clark JR. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 2004;84:1771–1782.
31. Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules* 2017;22:292.
32. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003;133:3248S-3254S.
33. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res* 2017;61:1361779.
34. Zhang ZZ, Che XN, Pan QH, Li XX, Duan CQ. Transcriptional activation of flavan-3-ols biosynthesis in grape berries by UV irradiation depending on developmental stage. *Plant Sci* 2013;208:64–74.

35. Zhu L, Zhang Y, Lu, J. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *Int J Mol Sci* 2012;13:3492–3510.
36. Dell' Agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res* 2004;63:593-602.
37. Castillo-Muñoz N, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Hermosín-Gutiérrez I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J Agric Food Chem* 2007;55:992–1002.
38. Makris DP, Kallithraka S, Kefalas P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J Food Compos Anal* 2006;19:396-404.
39. Trad M, Le Bourvellec C, Hamda HB, Renard CMGC, Harbi M. Flavan-3-ols and procyanidins in grape seeds: biodiversity and relationships among wild and cultivated vines. *Euphytica* 2017;213:242.
40. Cantos E, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC–DAD–MS–MS. *J Agric Food Chem* 2002;50:5691–5696.
41. Zhu F, Du B, Li J. Recent advance on the antitumor and antioxidant activity of grape seed extracts. *Int J Wine Res* 2015;7:63-67.
42. Saucier C, Jourdes M, Glories Y, Quidean S. Extraction, Detection and Quantification Flavano-Ellagitannins and Ethylvescalagin in Bordeaux Red Wine Aged in Oak Barrels. *J Agric Food Chem* 2006;54:7349-7354.

43. Olejar KJ, Ricci A, Swift S, Zujovic Z, Gordon KC, Fedrizzi B, et al. Characterization of an Antioxidant and Antimicrobial Extract from Cool Climate, White Grape Marc. *Antioxidants* (Basel) 2019;8:232.
44. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, et al. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J Agric Food Chem* 1998;46:1887-1892.
45. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 2010;3:2–20.
46. Gottlieb OR. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. *Phytochemistry* 1989;28:2545–2558.
47. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009;26:1001–1043.
48. Pourcel L, Irani NG, Lu Y, Riedl K, Schwartz S, Grotewold E. The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Mol Plant* 2010;3:78–90.
49. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 2000;468:166–170.
50. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb, GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 2000;130:2765–2771.
51. Bang SH, Hyun YJ, Shim J, Hong SW, Kim DH. Metabolism of rutin and poncirin by human intestinal microbiota and cloning of their metabolizing α -L-rhamnosidase from *Bifidobacterium dentium*. *J Microbiol Biotechn* 2014;24:3.

52. Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antiox Redox Sign* 2001;3:957–967.
53. Borges G, Lean MEJ, Roberts SA, Crozier A. Bioavailability of dietary (poly)phenols: a study with ileostomists to discriminate between absorption in small and large intestine. *Food Funct* 2013;4:754–762.
54. Erk T, Hauser J, Williamson G, Renouf M, Steiling H, Dionisi F, et al. Structure- and dose absorption relationships of coffee polyphenols. *BioFactors* 2014;40:103–112.
55. Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int* 2011;44:1150–1160.
56. Jaganath IB, Mullen W, Edwards CA, Crozier A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Res* 2006;40:1035–1046.
57. Stalmach A, Steiling H, Williamson G, Crozier A. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Arch Biochem Biophys* 2010;501:98–105.
58. Ouzzine M, Barre L, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S. The human UDP-glucuronosyltransferases: structural aspects and drug glucuronidation. *Drug Metab Rev* 2003;35:287–303.
59. Aura AM. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev* 2008;7:407–429.

60. Cardona F, Andres-Lacueva S, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal Nutr Biochem* 2013;24:1415–1422.
61. International Diabetes Federation IDF Diabetes Atlas (8th edn), International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2017.
62. American Diabetes Association Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 29 (2006), pp. S43-S48.
63. Cheng AY, Fantus, IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ* 2005;175:213-226.
64. Chi TC, Chen WP, Chi TL, Kuo TF, Lee SS, Cheng JT, Su MJ. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2007;80:1713-1720.
65. Silan C. The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 2008;31:897-902.
66. Shahi MM, Haidari F, Shiri MR. Comparison of effect of resveratrol and vanadium on diabetes related dyslipidemia and hyperglycemia in streptozotocin induced diabetic rats. *Adv Pharm Bull* 2011;1:81-86.
67. Chang CC, Chang CY, Huang JP, Hung LM. Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Chin J Physiol* 2012;55:192-201.

68. Ku CR, Lee HJ, Kim SK, Lee EY, Lee MK, Lee EJ. Resveratrol prevents streptozotocin-induced diabetes by inhibiting the apoptosis of pancreatic β -cell and the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *Endocr J* 2012;59:103-109.
69. Jiang B, Guo L, Li BY, Zhen JH, Song J, Peng T, Yang XD, Hu Z, Gao HQ. Resveratrol attenuates early diabetic nephropathy by down-regulating glutathione s-transferases Mu in diabetic rats. *J Med Food* 2013;16:481-486.
70. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2008;62:598-605.
71. Palsamy P, Subramanian S. Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2009;179:356-362.
72. Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cel. Physiol* 2010;224:423-432.
73. Soufi FG, Vardyani M, Sheervalilou R, Mohammadi M, Somi MH. Long-term treatment with resveratrol attenuates oxidative stress pro-inflammatory mediators and apoptosis in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Gen Physio Biophys* 2012;31:431-438.
74. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-546.
75. Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012;237:481-490.

76. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 2008;36:343-347.
77. Lee SM, Yang H, Tartar DM, Gao B, Luo X, Ye SQ, Zaghouani H, Fang D. Prevention and treatment of diabetes with resveratrol in a non-obese mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011;54:1136-1146.
78. Chang CC, Yang MH, Tung HC, Chang CY, Tsai YL, Huang JP, Yen TH, Hung LM. Resveratrol exhibits differential protective effects on fast- and slow-twitch muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes* 2014;6:60-67.
79. Chen KH, Cheng ML, Jing YH, Chiu DT, Shiao MS, Chen JK. Resveratrol ameliorates metabolic disorders and muscle wasting in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:853-863.
80. Chi TC, Chen WP, Chi TL, Kuo TF, Lee SS, Cheng JT, Su MJ. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2007;80:1713-1720.
81. Sattar N, Gill JM. Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Med* 2014;26:10.1186/s12916-014-0123-4.
82. Palermo A, Maggi D, Maurizi AR, Pozzilli P, Buzzetti R. Prevention of type 2 diabetes mellitus: is it feasible? *Diabetes Metab Res Rev* 2014;30:4-12.
83. Pedersen SD. Metabolic complications of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27:179-193.
84. Han TS, Wu FC, Lean ME. Obesity and weight management in the elderly: a focus on men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27:509-525.

85. Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann NY Acad Sci* 2013;1281:92-105.
86. Deng JY, Hsieh PS, Huang JP, Lu LS, Hung LM. Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways. *Diabetes* 2008;57:1814-1823.
87. Chen LL, Zhang HH, Zheng J, Hu X, Kong W, Hu D, et al. Resveratrol attenuates high-fat diet-induced insulin resistance by influencing skeletal muscle lipid transport and subsarcolemmal mitochondrial β -oxidation. *Metab Clin Exp* 2011;60:1598-1609.
88. Tan Z, Zhou LJ, Mu PW, Liu SP, Chen SJ, Fu XD, Wang TH. Caveolin-3 is involved in the protection of resveratrol against high-fat-diet-induced insulin resistance by promoting GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle of ovariectomized rats. *J Nutr Biochem* 2012;23:1716-1724.
89. Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol* 2011;81:1343-1351.
90. Kang W, Hong HJ, Guan J, Kim DG, Yang EJ, Koh G, et al. Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. *Metab Clin Exp* 2012;61:424-433.
91. Zhang J, Chen L, Zheng J, Zeng T, Li H, Xiao H, Deng X, Hu X. The protective effect of resveratrol on islet insulin secretion and morphology in mice on a high-fat diet. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;97:474-482.

92. Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2012;61:1444-1454.
93. Yang SJ, Lim Y. Resveratrol ameliorates hepatic metaflammation and inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Metab Clin Exp* 2014;63:693-701.
94. Zheng X, Zhu S, Chang S, Cao Y, Dong J, Li J, et al. Protective effects of chronic resveratrol treatment on vascular inflammatory injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: Role of NF-kappa B signaling. *Eur J Pharmacol* 2013;720:147-157.
95. Bagul PK, Middela H, Matapally S, Padiya R, Bastia T, Madhusudana K, et al. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacol Res* 2012;66:260-268.
96. Jimenez-Gomez Y, Mattison JA, Pearson KJ, Martin-Montalvo A, Palacios HH, Sossong AM, et al. Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell Metab* 2013;18:533-545.
97. Fiori JL, Shin YK, Kim W, Krzysik-Walker SM, González-Mariscal I, Carlson OD, et al. Resveratrol prevents β -cell dedifferentiation in nonhuman primates given a high-fat/high-sugar diet. *Diabetes* 2013;62:3500-3513.
98. Do GM, Jung UJ, Park HJ, Kwon EY, Jeon SM, McGregor RA, et al. Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:1282-1291.

99. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 2010;59:554-563.
100. Coen PM, Goodpaster BH. Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:391-398.
101. Kitada M, Koya D. SIRT1 in type 2 diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Diabetes Metab J* 2013;37:315-325.
102. Kitada M, Kume S, Kanasaki K, Takeda-Watanabe A, Koya D. Sirtuins as possible drug targets in type 2 diabetes. *Curr Drug Targets* 2013;14:622-636.
103. Baur JA. Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:1626-1634.
104. Chen S, Li J, Zhang Z, Li W, Sun Y, Zhang Q, et al. Effects of resveratrol on the amelioration of insulin resistance in KKAY mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90:237-242.
105. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2013;123:2764-2772.
106. Shang J, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29:698-706.
107. Poulsen MM, Vestergaard PF, Clasen BF, Radko Y, Christensen LP, Stødkilde-Jørgensen H, et al. High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes* 2013;62:1186-1195.

108. Andrade JM, Paraíso AF, de Oliveira MV, Martins AM, Neto JF, A.L. Guimarães, et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition* 2014;30:915-919.
109. Zhu W, Chen S, Li Z, Zhao X, Li W, Sun Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol on the amelioration of oxidative stress and hepatic steatosis in KKAY mice. *Nutr Metab (Lond.)* 2014;12:10.1186/1743-7075-11-35.
110. Alberdi G, Rodríguez VM, Macarulla MT, Miranda J, Churruca I, Portillo MP. Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition* 2013;29:562-567.
111. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2014;15:6184-6223.
112. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol* 2014;222:113-127.
113. Rachek LI. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014;121:267-292.
114. Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1053-1063.
115. Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Lasa A, Hijona E, Bujanda L, Portillo MP. Effects of resveratrol on obesity-related inflammation markers in adipose tissue of genetically obese rats. *Nutrition* 2013;29:1374-1380.

116. Smith BK, Perry CG, Herbst EA, Ritchie IR, Beaudoin MS, Smith JC, Neuffer PD, Wright DC, Holloway GP. Submaximal ADP-stimulated respiration is impaired in ZDF rats and recovered by resveratrol. *J Physiol* 2013;591:6089-6101.
117. Szkudelska K, Szkudelski T. Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol* 2010;635:1-8.
118. De Ligt M, Timmers S, Schrauwen P. Resveratrol and obesity: can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1137-1144.
119. Hinke SA, Hellemans K, Schuit FC. Plasticity of the beta cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic beta cell for the next meal. *J Physiol* 2004;558:369-380.
120. Henquin JC. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;93:27-31.
121. Yang DK, Kang HS. Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomol Ther* 2018;26:130.
122. Lee YE, Kim JW, Lee EM, Ahn YB, Song KH, Yoon KH, et al. Chronic resveratrol treatment protects pancreatic islets against oxidative stress in db/db mice. *PLoS ONE* 2012;7:e50412.
123. Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cel. Endocrinol* 2012;364:1-27.
124. Marchetti P, Bugliani M, Boggi U, Masini M, Marselli L. The pancreatic beta cells in human type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2012;771:288-309.
125. Kong W, Chen LL, Zheng J, Zhang HH, Hu X, Zeng TS, et al. Resveratrol supplementation restores high-fat diet-induced insulin secretion dysfunction by increasing mitochondrial function in islet. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015;240:220-9.

126. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep* 2013;13:435-444.
127. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr* 2011;106:383-938.
128. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 2011;14:612-622.
129. Movahed A, Nabipour I, Lieben Louis X, Thandapilly SJ, Yu L, Kalantarhormozi M, et al. Antihyperglycemic effects of short term resveratrol supplementation in type 2 diabetic patients. *Evid Based Complement Alternat. Med* 2013;2013:851267.
130. Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res* 2012;32:537-541.
131. Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, et al. Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012;67:1307-1312.
132. Walker JM, Eckardt P, Aleman JO, da Rosa JC, Liang Y, Iizumi T, 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. *J Clin Transl Res* 2018;4(2):122-135.

133. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Szeto L, Lewis GF. High-dose resveratrol treatment for 2 weeks inhibits intestinal and hepatic lipoprotein production in overweight/obese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2895-2901.
134. Bashmakov YK, Assaad-Khalil SH, Abou Seif M, Udumyan R, Megallaa M, Rohoma KH, et al. Resveratrol promotes foot ulcer size reduction in type 2 diabetes patients. *ISRN Endocrinol* 2014;20:816307.
135. Chachay VS, Macdonald GA, Martin JH, Whitehead JP, O'Moore-Sullivan TM, P. Lee, et al. Resveratrol does not benefit patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;25:10.1016/j.cgh.2014.02.024.
136. Olesen J, Gliemann L, Biensø R, Schmidt J, Hellsten Y, Pilegaard H. Exercise training, but not resveratrol, improves metabolic and inflammatory status in skeletal muscle of aged men. *J Physiol* 2014;592:1873-1886.
137. Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai S, Schechtman KB, et al. Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab* 2012;16:658-664.
138. Goh KP, Lee HY, Lau DP, Supaat W, Chan YH, Koh AFY. Effects of resveratrol in patients with type 2 diabetes mellitus on skeletal muscle SIRT1 expression and energy expenditure. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2014;24:2-13.
139. Xie HC, Han HP, Chen Z, He JP. A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014;11:209-12.
140. Cho SJ, Jung UJ, Choi MS. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 2012;108:2166–2175.

141. Do GM, Kwon EY, Kim HJ, Jeon SM, Ha TY, Park T, Choi MS. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:55-59.
142. Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Pant R, et al. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:508-516.
143. Yashiro T, Nanmoku M, Shimizu M, Inoue J, Sato R. Resveratrol increases the expression and activity of the low density lipoprotein receptor in hepatocytes by the proteolytic activation of the sterol regulatory element-binding proteins. *Atherosclerosis* 2012;220:369-374.
144. Matos RS, Baroncini LA, Precoma LB, Winter G, Lambach PH, Caron EY, et al. Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol* 2012;98:136-142.
145. Wang Z, Zou J, Cao K, Hsieh TC, Huang Y, Wu JM. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med* 2005;16:533-540.
146. Rocha KK, Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Cataneo AC, Novelli EL. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1362-1367.
147. Xia N, Daiber A, Förstermann U, Li H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2017;174:1633-46.

148. Berrougui H, Grenier G, Loued S, Drouin G, Khalil A. A new insight into resveratrol as an atheroprotective compound: inhibition of lipid peroxidation and enhancement of cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 2009;207:420-427.
149. Song R, Li WQ, Dou JL, Li L, Hu YJ, Guo JZ, et al. Resveratrol reduces inflammatory cytokines via inhibiting nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signal pathway in a rabbit atherosclerosis model. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2013;41:866-869.
150. Ramprasath VR, Jones PJ. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:660-668.
151. Wakabayashi I, Takeda Y. Inhibitory effects of resveratrol on MCP-1, IL-6, and IL-8 production in human coronary artery smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013;386:835-839.
152. Bo S, Ciccone G, Castiglione A, Gambino R, De Michieli F, Villos P, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind placebo-controlled, cross-over trial. *Curr Med Chem* 2013;20:323-31.
153. Tome-Carneiro J, Gonzalvez M, Larrosa M, Garcia-Almagro FJ, Aviles-Plaza F, Parra S. Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:810-21.
154. Militaru C, Donoiu I, Craciun A, Scorei ID, Bulearca AM, Scorei RI. Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life. *Nutrition* 2013;29:178-183.

155. Simental-Mendia LE, Guerrero-Romero F. Effect of resveratrol supplementation on lipid profile in subjects with dyslipidemia: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* 2019;58:7-10.
156. Fujitaka K, Otani H, Jo F, Jo H, Nomura E, Iwasaki M, et al. Modified resveratrol Longevinex improves endothelial function in adults with metabolic syndrome receiving standard treatment. *Nutr Res* 2011;31:842-847.
157. Wong RH, Berry NM, Coates AM, Buckley JD, Bryan J, Kunz I, et al. Chronic resveratrol consumption improves brachial flow-mediated dilatation in healthy obese adults. *J Hypertens* 2013;31:1819-1827.
158. Sahebkar A. Effects of resveratrol supplementation on plasma lipids: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Rev* 2013;71:822-35.
159. Haghghatdoost F, Hariri M. Effect of resveratrol on lipid profile: An updated systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials. *Pharmacol Res* 2018;129:141-150.
160. Patel KP, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Ann NY Acad Sci* 2011;1215:161-9.
161. Christ KL, Burritt RL. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *J Clean Prod* 2013;53:232-242.
162. Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Nuñez MJ. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agric Food Chem* 2005;53:2111– 2117.

163. Ruberto G, Renda A, Daquino C, Amico V, Spatafora C, Tringali C, et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem* 2007;100:203-210.
164. Fontana AR, Antonioli A, Bottini R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem* 2013;61:8987-9003.
165. Cheng VJ, Bekhit AEDA, McConnell M, Mros S, Zhao J. Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chem* 2012;134:474-482.
166. Luque de Castro MD, Priego-Capote F. *Analytical Applications of Ultrasound, Ultrasound Assistance to Analytical Heterogeneous Liquid-Liquid Systems*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; Vol. 26, pp 1-398.
167. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 2011;126:1821-1835.
168. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants *Trends Food Sci. Technol* 2006;17:300-312.
169. Monrad JK, Srinivas K, Howard LR, King JW. Design and optimization of a semicontinuous hot-cold extraction of polyphenols from grape pomace. *J Agric Food Chem* 2012;60:5571-5582.
170. Kammerer D, Claus A, Schieber A, Carle R. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *J Food Sci* 2005;70:C157-C163.

171. De Campos LMAS, Leimann FV, Pedrosa RC, Ferreira SRS. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresour Technol* 2008;99:8413–8420.
172. The British Pharmacopoeia (BP) 2012, published on 19 August 2011 – Electronic version.
173. Miljić U, Puškaš V, Cvejić J, Torović Lj. Phenolic compounds, chromatic characteristics and antiradical activity of plum wines. *Int J Food Prop* 2017;20:2022-2033.
174. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 1995;28:25-30.
175. Hagerman A, Harvey-Mueller I, Makkar HPS. Quantification of tannins in tree foliage – a laboratory manual. FAO/IAEA, Vienna; 2000.
176. European Committee for Standardization. EN 15662: Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE – QuEChERS-method. 2008.
177. SANTE. Document No. SANCO/11945/2015. Analytical quality control and method validation for pesticide residues analysis in food and feed. 2015.
178. SRPS EN 14084. Prehrambeni proizvodi – Određivanje elemenata u tragovima – Određivanje olova, kadmijuma, cinka, bakra i gvožđa atomskom apsorpcionom spektrometrijom (AAS) posle mikrotalasnog razaranja. 2008.
179. Rubio-Senent F, Fernandez-Bolanos J, Garcia-Borrego A, Lama-Munoz A, Rodriguez-Gutierrez G. Influence of pH on the antioxidant phenols solubilised from hydrothermally treated olive oil by-product (alperujo). *Food Chem* 2017;219:339-345.

180. Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H., & Jones, K.M. *Data for Biochemical Research*. 3rd ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1986.
181. Galanakis CM, Tornberg E, Gekas V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *J Chem Technol Biot* 2010;85:1148-1155.
182. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng* 2007;81:200-208.
183. Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Rockville MD: FDA, 2005.
184. Wilson RD, Islam MS. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep* 2012;64:129-39.
185. Radenkovic M, Stojanovic M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2016;78:13-31.
186. Thiruchenduran M, Vijayan NA, Sawaminathan JK, Devaraj SN. Protective effect of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Cardiovasc Pathol* 2011;20:361-368.
187. Rašković A, Gigov S, Čapo I, Paut Kusturica M, Milijašević B, Kojić-Damjanov S, et al. Antioxidative and protective actions of apigenin in a paracetamol-induced hepatotoxicity rat model. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2017;42:849-856.
188. Holen T, Norheim F, Gundersen TE, Mitry P, Linseisen J, Iversen PO, et al. Biomarkers for nutrient intake with focus on alternative sampling techniques. *Genes Nutr* 2016;11:12.

189. Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Kalimanovska-Spasojević V. Beograd: Medicinska biohemija, 2003.
190. Omar JM, Yang H, Li S, Marquardt RR, Jones PJH. Development of an Improved Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analyses of *trans*-/*cis*-Resveratrol, Quercetin and Emodin in Commercial Resveratrol Supplements. *J Agric Food Chem* 2009;62:5812–17.
191. Rossi D, Guerrini A, Bruni R, Brognara E, Borgati M, Gambari R, et al. *Trans*-Resveratrol in Nutraceuticals: Issues in Retail Quality and Effectiveness. *Molecules* 2012;17:12393-405.
192. Bursać M. Fitoestrogeni- analiza u prirodnim izvorima i dijetetskim suplementima [dissertation]. Faculty of Medicine, University of Novi Sad; 2013.
193. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis Jr JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1377-1382.
194. Pujara N, Jambhrunkar S, Wong KY, McGuckin M, Popat A. Enhanced colloidal stability, solubility and rapid dissolution of resveratrol by nanocomplexation with soy protein isolate. *J Colloid Interface Sci* 2017;488:303-308.
195. Vatai T, Skerget M, Knez Z. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *J Food Eng* 2009;90:246–254.
196. Brazinha C, Cadima M, Crespo JG. Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from Different Types of Grape Pomace Produced at Wineries and Distilleries. *J Food Sci* 2014;79:1142-1149.

197. Tsakona S, Galanakis CM, Gekas V. Hydro-ethanolic mixtures for the recovery of phenols from Mediterranean plant materials. *Food Bioprocess Tech* 2012;5:1384-1393.
198. Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas VA knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int J Food Prop* 2013;16:382-396.
199. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem* 2001;73:285-290.
200. Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, Jo IH. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J Agric Food Chem* 2009;57:4988-4994.
201. Amendola D, De Faveri DM, Spigno G. Grape marc phenolics: extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J Food Eng* 2010;97:384–392.
202. Soysal C. Kinetics and thermal activation/inactivation of starring apple polyphenol oxidase. *J Food Process Pres* 2008;32:1034-1036.
203. Hosseini S, Gharachorloo M, Ghiassi-Tarzi B, Ghavami M. Evaluation of the Organic Acids Ability for Extraction of Anthocyanins and Phenolic Compounds from Different Sources and Their Degradation Kinetics During Cold Storage. *Pol J Food Nutr Sci* 2016;66:261-269.
204. Szkudelski T, Szkudelska K. Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann NY Acad Sci* 2011;1215:34-39.
205. Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes—A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact* 2016;244:49-63.

206. Zhu X, Wu C, Qiu S, Yuan X, Li L. Effects of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab* 2017;14:60.
207. Chen L, Wang T, Chen G, Wang N, Gui L, Dai F, et al. Influence of resveratrol on endoplasmic reticulum stress and expression of adipokines in adipose tissues/adipocytes induced by high-calorie diet or palmitic acid. *Endocrine* 2017;55:773-85.
208. Soufi GF, Arbabi-Aval E, Kanavi RM, Ahmadi H. Anti-inflammatory properties of resveratrol in the retinas of type 2 diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015;42:63-8.
209. Ding S, Jiang J, Wang Z, Zhang G, Yin J, Wang X, et al. Resveratrol reduces the inflammatory response in adipose tissue and improves adipose insulin signaling in high-fat diet-fed mice. *PeerJ* 2018;6:e5173.
210. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2009;5:150-159.
211. Zhu L, Luo X, Jin Z. Effect of Resveratrol on Serum and Liver Lipid Profile and Antioxidant Activity in Hyperlipidemia Rats. *Asian-Australas J Anim Sci* 2008;21(6):890-895.
212. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1982;30:1766-1770.
213. Islam MS, Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study. *Pharmacology* 2007;79:243-249.

214. Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol* 2011;81:1343-1351.
215. Cho SJ, Jung UJ, Choi MS. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 2012;108:2166–2175.
216. Qiao Y, Sun J, Xia S, Tang X, Shi Y, Le G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food Funct* 2014;5:1241–1249.
217. Montero M, de la Fuente S, Fonteriz RI, Moreno, A, Alvarez J. Effects of long-term feeding of the polyphenols resveratrol and kaempferol in obese mice. *PLoS One* 2014;9:e112825.
218. Jeon SM, Lee SA, Choi MS. Antiobesity and vasoprotective effects of resveratrol in apoE-deficient mice. *J Med Food* 2014;17:310–316.
219. Kang W, Hong HJ, Guan J, Kim DG, Yang EJ, Koh G, et al. Effects of resveratrol on the insulin signaling pathway of obese mice. *J Vet Sci* 2014;15:179-185.
220. Milton-Laskibar I, Gomez-Zorita S, Aguirre L, Fernandez-Quintela A., Gonzalez M, Portillo M. Resveratrol-induced effects on body fat differ depending on feeding conditions. *Molecules* 2017;22:2091.
221. Szkudelski T, Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *BBA-Mol Basis Dis* 2015;1852:1145-1154.
222. Kitada M, Koya D. Renal protective effects of resveratrol. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:568093.