



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Višnja P. Madić

**PROCENA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI
BILJNE MEŠAVINE KOJA SE PRIMENJUJE
U ETNOFARMAKOLOŠKOM TRETMANU
DIJABETESA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010, 93/2012,
89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и
сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2020.



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO - MATEMATIČKI FAKULTET



Višnja P. Madić

**PROCENA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI
BILJNE MEŠAVINE KOJA SE PRIMENJUJE
U ETNOFARMAKOLOŠKOM TRETMANU
DIJABETESA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Višnja P. Madić

**EVALUATION OF THE BIOLOGICAL
ACTIVITY OF A HERBAL MIXTURE USED
IN THE ETHNOPHARMACOLOGICAL
THERAPY OF DIABETES**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2020.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Перица Васиљевић
Редовни професор на Департману за биологију и екологију,
Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов: Процена биолошке активности биљне мешавине која се
примењује у етнофармаколошком третману дијабетеса

Резиме: Дијабетес је једна од најчешћих болести 21. века. Савремени лекови коришћени у фармакотерапији овог обољења успешно регулишу хипергликемију, али не спречавају прогресију пратећих секундарних компликација. Зато све већи број људи, поред већ прописане фармакотерапије, у терапију укључује и биљне супституенте из народне медицине. Циљеви ове студије били су утврђивање преваленце коришћења традиционалне медицине у Србији и испитивање биолошке активности биљне мешавине која се често примењује у етнофармаколошком третману дијабетеса. Преваленца употребе народне медицине процењена је интерскеторским истраживањем, док је биолошка активност „анти-дијабетичне“ биљне мешавине испитана кроз *in vitro* и *in vivo* приступ. Резултати испитивања су показали да се 67,7% испитаника из целе Србије ослања на етнофармакологију, као и да је употреба биљних мешавина и фармацеутских суплемената заснованих на традиционалним рецептурама чешћа од коришћења појединачног лековитог биља. Фитохемијска анализа биљне мешавине је указала на присуство високог садржаја фенола и флавоноида, а ХПЛЦ-УВ методом идентификовано је десет биоактивних супстанци у њој: хининска, гална и кафтаринска киселина, арбутин, рутин, трифолин, астрагалин, хиперозид, изокверцетин и кверцитрин. *In vitro* студија је показала изузетно високу антиоксидативну, антицитотоксичну и антигенотоксичну активност, као и изванредан ниво антимикробне активности ка широком спектру микроорганизама. Поред тога је њена цитотоксичност и генотоксичност била врло ниска. *In vivo* студија је показала да ова биљна мешавина поседује хипогликемијски, хиполипидемијски и хепатопротективни ефекат и код здравих и код дијабетичних животиња, док је код дијабетичних животиња показивала и нефропротективна дејства са већим хипогликемијским ефектом од инсулина и метформина у овом експерименталном моделу.

Научна област: Биолошке науке
Научна дисциплина: Биологија ћелије. Физиологија

Кључне речи:

Дијабетес, биљна мешавина, народна медицина,
цитотоксичност, генотоксичност, антиоксиданси,
хипогликемијски агенси, хепатопротективни ефекат,
нефропротективни ефекат, хиполипидемијско дејство

УДК:

573.6:615.322+615:616.379-008.64

CERIF
класификација:

B 200; B 210; B 220; B 480; B 740.

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD Perica Vasiljević Full professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Title:	Evaluation of the biological activity of a herbal mixture used in the ethnopharmacological therapy of diabetes
Abstract:	<p>Diabetes is one of the most prevalent diseases of the 21st century. Conventional pharmacotherapy of diabetes successfully regulates hyperglycemia, yet it cannot completely prevent the progress of secondary diabetic pathologies. Thus, many people combine pharmacotherapy with herbal remedies. This study aimed to evaluate the frequency of traditional medicine use in Serbia and to examine the biological activities of the “anti-diabetic” herbal mixture used in the ethnopharmacology. The prevalence of traditional medicine use was assessed by cross-sectional study, while the biological activities of the herbal mixture were examined through <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experiments. The results of the study showed that 67.7% of respondents from all over Serbia rely on ethnopharmacology. The consumption of polyherbal mixtures and pharmaceutical supplements based on traditional recipes was more frequent than individual medicinal herbs. Phytochemical analysis of tested herbal mixture indicated high content of phenols and flavonoids. The HPLC-UV analysis revealed the presence of ten bioactive compounds: quinic, gallic and caftaric acid, arbutin, rutin, trifolin, astragalin, hyperoside, isoquercetin and quercitrin. <i>In vitro</i> study indicated its high antioxidant, anticytotoxic and antigenotoxic activities as well as antimicrobial activity against a wide range of microorganisms. In addition, its cytotoxicity and genotoxicity were extremely low. <i>In vivo</i> study showed that this herbal mixture has hypoglycemic, hypolipidemic and hepatoprotective effects in both healthy and diabetic animals. Moreover, in diabetic animals, it showed nephroprotective activity, while its hypoglycemic effect was higher than the effect of insulin and metformin in this experimental model.</p>
Scientific Field:	Biological sciences
Scientific Discipline:	Cell biology. Physiology
Key Words:	Diabetes, herbal mixture, traditional medicine, cytotoxicity, genotoxicity, antioxidants, hypoglycemic agents, hepatoprotective effect, nephroprotective effect, hypolipidemic activity
UDC:	573.6:615.322+615:616.379-008.64
CERIF Classification:	B200; B210; B220; B480; B740.

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Вишња Модић
Ментор, МН:	Перица Васиљевић
Наслов рада, НР:	Процена биолошке активности биљне мешавине која се примењује у етнофармаколошком третману дијабетеса
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2020.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	8 поглавља, 129 страна, 281 цитат, 13 табела, 23 слике, 33 графика, 8 прилога
Научна област, НО:	Биолошке науке
Научна дисциплина, НД:	Биологија ћелије. Физиологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Дијабетес, биљна мешавина, народна медицина, цитотоксичност, генотоксичност, антиоксиданси, хипогликемијски агенси, хепатопротективни ефекат, нефропротективни ефекат, хиполипидемијско дејство
УДК	573.6:615.322+615:616.379-008.64
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, **ИЗ:**

Дијабетес је једна од најчешћих болести 21. века. Савремени лекови коришћени у фармакотерапији овог обољења успешно регулишу хипергликемију, али не спречавају прогресију пратећих секундарних компликација. Зато све већи број људи, поред већ прописане фармакотерапије, у терапију укључује и биљне супституенте из народне медицине. Циљеви ове студије били су утврђивање преваленце коришћења традиционалне медицине у Србији и испитивање биолошке активности биљне мешавине која се често примењује у ентофармаколошком третману дијабетеса. Преваленца употребе народне медицине процењена је интерскеторским истраживањем, док је биолошка активност „анти-дијабетичне“ биљне мешавине испитана кроз *in vitro* и *in vivo* приступ. Резултати испитивања су показали да се 67,7% испитаника из целе Србије ослања на етнофармакологију, као и да је употреба биљних мешавина и фармацеутских суплемената заснованих на традиционалним рецептурама чешћа од коришћења појединачног лековитог биља. Фитохемијска анализа биљне мешавине је указала на присуство високог садржаја фенола и флавоноида, а ХПЛЦ-УВ методом идентификовано је десет биоактивних супстанци у њој: хининска, гална и кафтаринска киселина, арбутин, рутин, трифолин, астрагалин, хиперозид, изокверцетин и кверцитрин. *In vitro* студија је показала изузетно високу антиоксидативну, антицитотоксичну и антигенотоксичну активност, као и изванредан ниво антимикробне активности ка широком спектру микроорганизама. Поред тога је њена цитотоксичност и генотоксичност била врло ниска. *In vivo* студија је показала да ова биљна мешавина поседује хипогликемијски, хиполипидемијски и хепатопротективни ефекат и код здравих и код дијабетичних животиња, док је код дијабетичних животиња показивала и нефропротективна дејства са већим хипогликемијским ефектом од инсулина и метформина у овом експерименталном моделу.

Датум прихватања теме, **ДП:**

17. 01. 2020.

Датум одбране, **ДО:**

Чланови комисије, **КО:** Председник:

Члан:

Члан, ментор:



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Višnja Madić
Mentor, MN :	Perica Vasiljević
Title, TI :	Evaluation of the biological activity of a herbal mixture used in the ethnopharmacological therapy of diabetes
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2020
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradaska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 129 , 281 references, 13 tables , 23 pictures 33 graphs, 8 appendixes
Scientific field, SF :	Biological sciences
Scientific discipline, SD :	Cell biology. Physiology
Subject/Key words, S/KW :	Diabetes, herbal mixture, traditional medicine, cytotoxicity, genotoxicity, antioxidants, hypoglycemic agents, hepatoprotective effect, nephroprotective effect, hypolipidemic activity
UC	573.6:615.322+615:616.379-008.64
Holding data, HD :	library
Note, N :	

Abstract, **AB**:

Diabetes is one of the most prevalent diseases of the 21st century. Conventional pharmacotherapy of diabetes successfully regulates hyperglycemia, yet it cannot completely prevent the progress of secondary diabetic pathologies. Thus, many people combine pharmacotherapy with herbal remedies. This study aimed to evaluate the frequency of traditional medicine use in Serbia and to examine the biological activities of the “anti-diabetic” herbal mixture used in the ethnopharmacology. The prevalence of traditional medicine use was assessed by cross-sectional study, while the biological activities of the herbal mixture were examined through *in vitro* and *in vivo* experiments. The results of the study showed that 67.7% of respondents from all over Serbia rely on ethnopharmacology. The consumption of polyherbal mixtures and pharmaceutical supplements based on traditional recipes was more frequent than individual medicinal herbs. Phytochemical analysis of tested herbal mixture indicated high content of phenols and flavonoids. The HPLC-UV analysis revealed the presence of ten bioactive compounds: quinic, gallic and caftaric acid, arbutin, rutin, trifolin, astragaln, hyperoside, isoquercetin and quercitrin. *In vitro* study indicated its high antioxidant, anticytotoxic and antigenotoxic activities as well as antimicrobial activity against a wide range of microorganisms. In addition, its cytotoxicity and genotoxicity were extremely low. *In vivo* study showed that this herbal mixture has hypoglycemic, hypolipidemic and hepatoprotective effects in both healthy and diabetic animals. Moreover, in diabetic animals, it showed nephroprotective activity, while its hypoglycemic effect was higher than the effect of insulin and metformin in this experimental model.

Accepted by the Scientific Board on, **ASB**:

Defended on, **DE**:

Defended Board, **DB**: President:

Member:

Member, Mentor:

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Perici Vasiljeviću na bezrezervnoj podršci pružanoj poslednjih dvadesetak godina, ukazanom poverenju i prilici da radim pod njegovim mentorstvom. Hvala na prenetom znanju, mnogobrojnim idejama i korisnim savetima koji su me usmerili na pravi put pri osmišljavanju i sprovođenju lutajućih misli u delo. I na kraju hvala na izvanrednoj strpljivosti, dobronamernosti i prijateljstvu.

Neizmerno sam zahvalna prof. dr Saši Živiću na tome što je poslednjih par decenija bio, ne samo moj lekar i profesor, već i iskren prijatelj pun razumevanja i podrške.

Veoma sam zahvalna i prof. dr Stevi Najmanu, na savetima i nesebičnoj stručnoj pomoći, ali pre svega na uvođenju u svet eksperimentalne biologije.

Hvala prof. dr Ljubiši Đorđeviću na brojnim savetima i velikom poverenju pruženom proteklih desetak godina. Hvala prof. dr Marini Jušković na velikoj pomoći i podršci.

Zahvaljujem prof. dr Gordani Stojanović na pomoći u HPLC analizi, prof. dr Zorici Stojanović-Radić na pomoći prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti i Andrei Žabar Popović na savetima u vezi fitohemijske analize.

Ogromnu zahvalnost dugujem Mariji Petković, kako na stručnoj pomoći, tako i na sveukupnoj podršci i nesuglasicama koje su uvek vodile jedino mom moralnom i profesionalnom napretku tokom proteklih dvadeset godina našeg prijateljstva.

Aleksandri Petrović sam neizmerno zahvalna na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu i sveukupnoj podršci, ali pre svega na pruženom novostečenom prijateljstvu i dokazu da će se, koliko god da je teško, uvek naći neko ko će te iznova motivisati.

Hvala Maji Stanojević na velikoj podršci, stručnim savetima i višegodišnjem prijateljstvu.

Hvala prof. dr Vladimiru Randeloviću na iscrpnim savetima datim prilikom publikacije mog prvog rada.

Hvala mojim kolegincama Mileni Aleksić i Jeleni Conić, kao i svojim divnim master studentima koji su laboratorijski rad učinili još zanimljivijim i nezaboravnim iskustvom.

Veliku zahvalnost dugujem Aleksandri Stanković, Nikoli Stankoviću i Nikoli Stojanoviću na brojnim savetima i ažurnosti da uvek pomognu u rešavanju bilo kog problema.

Neizmernu zahvalnost dugujem Vesni Krstić, Milanu Živanoviću, Zvonku Ristiću, Dragani Tričković i Suzani Jovanović na neizmernoj pomoći pruženoj u in vivo eksperimentima. Hvala Vesni na ogromnoj podršci i bezbrojnim savetima. Hvala Milanu i Zvonku na neverovatnoj strpljivosti. Hvala Milošu Markoviću na iscrpnim savetima tokom izvođenja in vivo dela eksperimenta.

Hvala Dragani Jugović, Desanki Radulović, Ljiljani Branković i Radovanu Milićeviću što su me naučili osnovama humane citogenetike i svojim savetima pomogli da je implementiram u eksperimentalne modele.

Hvala svim kolegama sa PMF-a na divnoj saradnji proteklih par godina.

Hvala mnogobrojnim ljudima koje sam srela baveći se naučno-istraživačkim radom, među kojima su i Milena Veselinović, Marija Vukelić-Nikolić, Tanja Prokić, Jackie Robb, Alec Redwod, Manfred Beilharz, Barry Marshall, Marina Silich-Carrara, koji su svojim savetima doprineli oblikovanju mog pristupa rešavanja naučnih problema.

Neizmerno hvala Nikoli, na dvadesetogodišnjoj podršci i strpljenju. Hvala Miroljubu i Svetlani na velikoj podršci.

Najveću zahvalnost dugujem roditeljima.

Hvala mom ocu Predragu, što mi je još u ranom detinjstvu probudio interesovanje ka prirodnim naukama, kosmologiji, medicini i biologiji, i što mi je preneo misao: "Lek za sve bolesti se nalazi u prirodi. Samo ga treba otkriti".

I naravno, najveću zahvalnost dugujem majci, Radmili, koja me je nagovorila da upišem doktorske studije, i pružila mi snagu i volju da istrajući u tom poduhvatu ostanem svoja. Hvala mama!

Višnja

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. DIJABETES MELITUS	1
1.1.1. Tipovi dijabetesa.....	1
1.1.2. Sekundarne komplikacije dijabetesa	2
1.1.3. Prevalenca dijabetesa	2
1.2. TERAPIJA DIJABETESA	3
1.3. PREVALENCIA KORIŠĆENJA ETNOFARMAKOLOŠKIH TERAPIJA	4
1.4. ETNOFARMAKOLOŠKI TRETMAN DIJABETESA	5
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	9
3. MATERIJAL I METODE	10
3.1. ISPITIVANJE PREVALENCE KORIŠĆENJA NARODNE MEDICINE U SRBIJI	10
3.2. EKSTRAKCIJA BILJNOG MATERIJALA	10
3.3. FITOHEMIJSKA ANALIZA	11
3.3.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola	11
3.3.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida	11
3.3.3. <i>HPLC</i> analiza	12
3.4. IN VITRO STUDIJA	13
3.4.1. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata DPPH testom	13
3.4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	13
3.4.2.1. Korišćeni mikroorganizmi	13
3.4.2.2. Mikrodiluciona metoda	14
3.4.3. Ispitivanje citotoksičnosti i anticitotoksičnosti testovima hemolize i antihemolize eritrocita	14
3.4.3.1. Priprema eritrocita za testove hemolize i antihemolize.....	15
3.4.3.2. Ispitivanje citotoksičnosti testom hemolize eritrocita	15
3.4.3.3. Ispitivanje anticitotoksičnosti testom antihemolize eritrocita	15
3.4.4. Ispitivanje genotoksičnosti i antigenotoksičnosti ekstrakata <i>Allium cepa</i> testom	16
3.4.4.1. Ispitivanje genotoksičnosti	16
3.4.4.2. Ispitivanje antigenotoksičnosti	16
3.4.4.3. Fiksacija tkiva	17

3.4.4.4. Priprema preparata za mikroskopsku analizu	17
3.4.4.5. Mikroskopska analiza.....	17
3.5. <i>IN VIVO</i> STUDIJA	18
3.5.1. Životinje.....	18
3.5.2. Ispitivanje akutne oralne toksičnosti	19
3.5.3. Ispitivanje sub-hronične oralne toksičnosti	19
3.5.4. Ispitivanje anti-dijabetičnog efekta	19
3.5.5. Uzorkovanje tkiva.....	20
3.5.6. Analiza lipidnog statusa	20
3.5.7. Priprema tkiva za histopatološku analizu	21
3.5.8. Bojenje tkiva	22
3.5.8.1. Bojenje hematoksilinom i eozinom (H&E)	22
3.5.8.2. Mason-trihromno bojenje (MT)	23
3.5.8.3. Bojenje perjodnom kiselinom i Šifovim reagensom (PAS)	24
3.5.9. Histopatološka analiza	24
3.6. STATISTIČKA ANALIZA.....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. PREVALENCA KORIŠĆENJA NARODNE MEDICINE U SRBIJI	26
4.2. FITOHEMIJSKA ANALIZA	27
4.2.1. Ukupan sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima	27
4.2.2. Hemijski sastav „anti-dijabetične“ biljne mešavine.....	28
4.3. <i>IN VITRO</i> STUDIJA	31
4.3.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata	31
4.3.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata.....	33
4.3.3. Citotoksičnost i anticitotoksičnost ekstrakata	34
4.3.3.1. Citotoksičnost ekstrakata	34
4.3.3.2. Anticitotoksičnost ekstrakata	36
4.3.4. Genotoksičnost i antigenotoksičnost ekstrakata	38
4.3.4.1. Genotoksičnost ekstrakata	40
4.3.4.2. Antigenotoksičnost ekstrakata.....	44
4.4. <i>IN VIVO</i> STUDIJA	49
4.4.1. Akutna oralna toksičnost biljne mešavine.....	49
4.4.2. Sub-hronična oralna toksičnost biljne mešavine	49

4.4.2.1. Uticaj biljne mešavine na telesnu masu i nivo šećera u krvi zdravih životinja.....	49
4.4.2.2. Uticaj biljne mešavine na lipidni status zdravih životinja	50
4.4.2.3. Uticaj biljne mešavine na tkivo pankreasa zdravih životinja.....	52
4.4.2.4. Uticaj biljne mešavine na tkivo bubrega zdravih životinja	54
4.4.2.5. Uticaj biljne mešavine na tkivo jetre zdravih životinja.....	57
4.4.3. Anti-dijabetični efekat biljne mešavine	61
4.4.3.1. Uticaj biljne mešavine na telesnu masu i nivo šećera u krvi dijabetičnih životinja.....	61
4.4.3.2. Uticaj biljne mešavine na lipidni status dijabetičnih životinja.....	63
4.4.3.3. Uticaj biljne mešavine na tkivo pankreasa dijabetičnih životinja.....	65
4.4.3.4. Uticaj biljne mešavine na tkivo bubrega dijabetičnih životinja	69
4.4.3.5. Uticaj biljne mešavine na tkivo jetre dijabetičnih životinja	72
5. DISKUSIJA	79
5.1. PREVALENCIA KORIŠĆENJA NARODNE MEDICINE U SRBIJI	79
5.2. FITOHEMIJSKA ANALIZA	80
5.3. <i>IN VITRO</i> STUDIJA	80
5.4. <i>IN VIVO</i> STUDIJA	86
6. ZAKLJUČCI.....	93
7. LITERATURA.....	94
8. PRILOZI.....	119
LISTA SKRAĆENICA	119
IZVOD.....	122
SUMMARY.....	123
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA AUTORA	124
BIOGRAFIJA	124
BIBLIOGRAFIJA	125
IZJAVE AUTORA	127

1. UVOD

1.1. Dijabetes melitus

Dijabetes melitus je hronični metabolički poremećaj u kome, usled nedostatka raspoloživog insulina, ili, pak, nemogućnosti efektivnog korišćenja insulina, dolazi do povećanja nivoa šećera u krvi, tj. hiperglikemije. Insulin je hormon koji proizvode β -ćelije pankreasa. Veživanjem insulina za insulinske receptore, glukoza ulazi u ćelije gde se potom konvertuje u raspoloživu energiju (IDF, 2019). Usled nedostatka insulina, ili nemogućnosti insulinskih receptora da vežu insulin, glukoza ostaje zarobljena u krvi i nedostupna ćelijama. To dovodi do poremećaja u funkcionisanju ćelija, prekomernoj proizvodnji reaktivnih vrsta kiseonika, povećanja nivoa oksidativnog stresa koji uništava preostale β -ćelije i ubrzava dalju progresiju dijabetesa (Wang i Wang, 2017).

1.1.1. Tipovi dijabetesa

Postoji više tipova dijabetesa a najčešći su tip 1, tip 2 i gestacioni dijabetes (IDF, 2019). Tip 1 dijabetes se dijagnostikuje u oko 5% identifikovanih slučajeva dijabetesa. Izazvan je autoimunom reakcijom pri kojoj imuni sistem domaćina napada sopstvene β -ćelije pankreasa, vremenom ih uništava, što dovodi do sniženja sinteze insulina, ili, pak, do totalnog prestanka sinteze insulina (IDF, 2019). Konkretni uzrok ovog autodestruktivnog procesa nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da je baziran na kombinaciji genetske predispozicije, virusnih infekcija i dijetarnim faktorima (Maahs i sar., 2010; Atkinson i sar. 2014). Dijabetes tip 1 se najčešće javlja kod dece i adolescenata (IDF, 2019).

Tip 2 dijabetes je najčešća forma dijabetesa i javlja se u 90% identifikovanih slučajeva. U tipu 2 dijabetesa hiperglikemija je, na početku, posledica insulinske rezistencije, odnosno smanjene sposobnosti insulinskih receptora da vežu insulin. Pošto su u ovom stadijumu bolesti β -ćelije i dalje funkcionalne, one pokušavaju da reše ovaj problem povećanjem proizvodnje insulina. Vremenom, to dovodi do njihove iscrpljenosti, gubitka funkcionalnosti, starenja i smrti. Iako se dijabetes tip 2 najčešće javlja u starijem životnom dobu, sve češće se dijagnostikuje kod dece i adolescenata kao posledica gojaznosti i nedostatka fizičke aktivnosti (King i sar., 1999). Pretpostavlja se da je dijabetes tip 2 multifaktorska bolest u kojoj glavnu ulogu imaju stres, manjak fizičke aktivnosti, gojaznost i genetske predispozicije (IDF., 2019; Lazarević i sar., 2008).

Gestacioni dijabetes se javlja u trudnoći i najčešće je prouzrokovan insulinskom rezistencijom nastalom usled hormonalnih promena (ADA, 2003). Predispozicije ka razvoju ovog tipa dijabetesa su starije životno doba, gojaznost, sindrom policističnih jajnika, itd. Iako gestacioni dijabetes sam po sebi ne predstavlja hroničnu bolest, visoka je incidenca razvoja dijabetesa tipa 2 tri do šest godina nakon njegove pojave (Song i sar., 2018).

1.1.2. Sekundarne komplikacije dijabetesa

Koliko god napora bilo uloženo u održavanje normalnih glikemijskih vrednosti, kod većine dijabetičara ipak dolazi do povremenih oscilacija šećera u krvi i, u najboljem slučaju, do blage, ali ipak konstantne hiperglikemije. Ovo konstantno hiperglikemično okruženje dovodi do prekomerne proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (Wang i Wang, 2017). Hiperglikemija i povećanje inflamacije vremenom mogu dovesti do razvoja sekundarnih komplikacija kao što je hiperlipidemija. Povećanje nivoa ROS-a uz hiperlipidemiju, usled oksidacije LDL frakcije holesterola, dovodi do disfunkcije endotela krvnih sudova, pojačane inflamacije tokom ateroskleroze i ozbiljnih makrovaskularnih i mikrovaskularnih oštećenja, koja vremenom vode ka razvoju brojnih sekundarnih komplikacija poput koronarne bolesti srca (Fontbonne i sar., 1989; Srikanth i Deedwania, 2011), ili, pak, nefropatije (O'Brien i sar., 1998; Gross i sar., 2005; Volpe i sar., 2018). Osim toga, hronična hiperglikemija dovodi do smanjenja broja T limfocita i neutrofila, posledičnog smanjenja funkcije imunskog sistema što vodi ka većoj predispoziciji ka virusnim, bakterijskim i gljivičnim infekcijama ljudi sa dijabetesom (Groza i sar., 2011). Pored svega toga, dijabetes je često praćen i nealkoholnom masnom jetrom (NAFLD) (Ikeda i sar., 1991; Friedman, 2000; Rockey, 2000; Evelson i sar., 2005; Ban i Twigg, 2008; Leite i sar., 2011; Bhatt i Smith, 2015; Xia i sar., 2019).

1.1.3. Prevalenca dijabetesa

Prema podacima Međunarodne federacije za dijabetes (eng. *International Diabetes Federation* - IDF) u 2019. bilo je 463 miliona dijabetičara, a predviđa se da će ovaj broj do 2045. godine porasti na 700 miliona (IDF, 2019). Uz to, 2012. godine je zabeleženo 2,2 miliona smrtnih slučajeva čiji je direktni uzrok bila hiperglikemija (IDF, 2015), dok je od bubrežnih oboljenja umrlo 1,2 miliona ljudi u 2015. godini (Luyckx i sar., 2018). Situacija u Srbiji, u kojoj više od 710 000 ljudi ima dijagnostikovan dijabetes i gde on predstavlja peti uzrok smrti, takođe je alarmantna. Interesantno, i u Srbiji se povećala incidenca javljanja tipa 2 dijabetesa kod dece i adolescenata (Institut za javno zdravlje "Dr. Milan Jovanović Batut", 2017).

1.2. Terapija dijabetesa

Terapija dijabetesa tip 1 bazirana je na svakodnevnom injektiranju kombinacija insulina, monitoringu šećera u krvi, balansiranoj dijeti i fizičkoj aktivnosti. Nažalost, u mnogim zemljama, usled lošeg socio-ekonomskog stanja i nedostatka edukacije, savršen terapijski odgovor nije moguć, što vodi ili ka konstantnoj hiperglikemiji i posledičnoj dijabetičnoj ketoacidozi ili do pojave životno ugrožavajućih hipoglikemičnih epizoda (Lansdown i sar., 2012). Svojevremeno je britanski dijabetolog Edvin Gejl izjavio: „Koji je najčešći uzrok smrti deteta sa dijabetesom? Odgovor, iz globalne perspektive, je nemogućnost pristupa insulinu“ (Gale i Wagner, 2006).

Inicijalna terapija u tretmanu dijabetesa tipa 2 je promena načina života, a ukoliko ovo ne dovede do rezultata, uključuje se oralna terapija metforminom. Ukoliko ova terapija nije dovoljna, ona se kombinuje sa drugim medikamentima poput sulfonilureaze, inhibitora dipeptidil-peptidaze 4 (DPP-4), glukagonu-sličnim peptidom 1 (GLP-1), itd. Da bi terapija ovim medikamentima uspešno regulisala glikemijske vrednosti neophodno je da bude praćena i uravnoteženom ishranom i fizičkom aktivnošću. Ukoliko to nije slučaj, vremenom se u terapiju mora uvesti i insulin (IDF, 2019).

Terapija gestacionog dijabetesa bazirana je na oralnim medikamentima i/ili insulinu i uravnoteženoj ishrani (IDF, 2019).

Iako je savremena farmakoterapija dijabetesa relativno uspešna u održavanju normoglikemijskih vrednosti, nju često prate neželjene reakcije poput gastrointestinalnih komplikacija izazvanih metforminom (Kirpichnikov i sar., 2002), ili pak povećanje telesne mase kao posledica uzimanja insulina (Russell-Jones i Khan, 2007). Takođe, ove farmakoterapije ne rešavaju u potpunosti problem povećanja nivoa ROS-a niti sprečavaju progresiju sekundarnih patologija dijabetesa. Osim toga, pristup savremenim metodama lečenja često je otežan usled visokih troškova zdravstvene nege, socio-ekonomskog statusa kao i teritorijalnom nedostupnošću. Zbog svega toga, nalaženje nove, jeftine i lako dostupne terapije koja bi bila sposobna da olakša ovaj sve veći teret zdravstvene nege od urgentnog je značaja. Rešenje ovog problema moglo bi biti uključivanje suplemenata biljnog porekla ili funkcionalne hrane u svakodnevnu ishranu.

Budući da su mikronutrijenti uključeni u brojne biohemijske procese, a da su lekovite biljke bogate brojnim biološki aktivnim supstancama koje mogu blokirati ili čak preokrenuti

oštećenja nastala dejstvom slobodnih radikala (Li i sar., 2015; Yu i sar., 2015), mnoge lekovite biljke se već vekovima koriste zbog svojih antioksidativnih, hipoglikemijskih, hipolipidemijskih, hepatoprotektivnih i nefroprotektivnih aktivnosti u terapiji dijabetesa i njegovih sekundarnih komplikacija (Li i sar., 2015; Radulović i sar., 2015; Sidorova i sar., 2017; Li i sar., 2018; Giles-Rivas i sar., 2020; Adams i Yakubu, 2020; Chinnappan i sar., 2019; Sajid i sar., 2020; Ansari i sar., 2020; Figueiredo de Santana Aquino i sar., 2020). Čak i u današnje vreme, uprkos velikom napretku farmakoterapije, korišćenje etnofarmakoloških terapija doživljava procvat (Farnsworth et al., 1985; Pieroni et al., 2011).

1.3. Prevalenca korišćenja etnofarmakoloških terapija

U poslednjih par decenija primećena je povećana učestalot upotrebe narodne medicine, kao i posledično uvećanje tržišne vrednosti komplementarne i alternativne medicine. Tako, stanovnici Sjedinjenih Američkih Država potroše 30,2 milijarde dolara godišnje na različita sredstva alternativne medicine, dok je globalno tržište tradicionalne kineske medicine vredno oko 48 milijardi američkih dolara na godišnjem nivou (WHO, 2012). Procenjeno je da će do 2025. godine tržišna vrednost tradicionalne medicine dostići 197 milijardi američkih dolara (Grand View Research, Inc, 2017).

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, 80% svetskog stanovništva oslanja se na narodnu medicinu (Farnsworth i sar, 1985). Takođe, i u Evropskim zemljama primećen je porast korišćenja etnofarmakoloških pristupa lečenju različitih bolesti, tako da se gotovo 98% stanovnika Evrope oslanja na metode alternativne medicine (Snyder i sar., 2009).

Iako su razlozi primećene učestalosti korišćenja tradicionalne medicine raznovrsni, oni se generalno mogu klasifikovati u tri široke kategorije, a to su nedostupost savremenoj zdravstvenoj zaštiti, strah od farmakoterapije i kulturološki razlozi. Savremena zdravstvena zaštita može biti nedostupna ljudima zbog brojnih razloga, kao što su teritorijalna nedostupnost, visoke cene zdravstvene zaštite ili loša organizacija zdravstvenog sistema. Strah od farmakoterapije može biti delimično opravdan potencijalnim nus-pojavama savremenih lekova ili u potpunosti neopravdan, odnosno uzrokovan ličnim ubeđenjima. Najveći uticaj na prevalencu korišćenja narodne medicine svakako ima kulturno nasleđe, što je najočiglednije u multikulturalnim zemljama poput Sjedinjenih Američkih Država (SAD) i Australije. U SAD, na primer, učestalost primene etnofarmakoloških terapija varira među etničkim grupama gde se 57% Amerikanaca vijetnamskog porekla i 53% stanovnika meksičkog porekla oslanja na narodnu medicinu, dok samo 29% belaca primenjuje ove pristupe lečenja (Ngu-yen i sar.,

2014). Situacija u Australiji je slična, pa tako, većina stanovništva koja se oslanja na metode alternativne medicine (63%) rođeni su van Australije, dok samo 38% rođenih Australijanaca primenjuje etnofarmakološke metode (Manya i sar., 2012).

Ove tri široke kategorije uzročnika trenda globalnog povećanja upotrebe tradicionalne medicine se preklapaju, a sam stepen preklapanja rezultira različitom prevalencom njene upotrebe u različitim zemljama, kako među ljudima sa dijabetesom, tako i u ne-dijabetičnoj populaciji. Sudeći po brojnim studijama, 14% Rusa regularno koristi lekovito bilje, 44% povremeno (Shikov i sar., 2014), dok se samo 20% Danaca oslanja na narodnu medicinu (Fisher, 1994). Nešto veća prevalenca korišćenja alternativne medicine je u Kini (40%) (Esmonde i sar, 2008), Australiji (46%) (Manyaet i sar., 2012), Velikoj Britaniji (46%) (AlQathama, 2016), Francuskoj (49%) (Fisher, 1994), Japanu (50 %) (Hori i sar., 2008), Kanadi (50%) (Bradshaw, 2016; Jatau i sar., 2016), Tajvanu (61%) (Chang i sar., 2011), Meksiku (62%) (Argaex-Lopez i sar., 2003), Nemačkoj (62%) (Hartel i Volger, 2004), Indiji (68%) (Kumar i sar., 2006) , SAD-u (73%) (Bell i sar., 2006), Africi (80%) (Esmonde i Long, 2008) i Iranu (88,4%) (Sheikhrabori i sar., 2017).

Broj ljudi koji se oslanjaju na narodnu medicinu umnogome zavisi i od uzorka populacije uključene u ispitivanje, pa tako, 100% stanovnika ruralnih krajeva Srbije se oslanja na tradicionalne pristupe prevencije i/ili lečenja (Pieroni i sar., 2011), dok je na teritoriji Niša ova prevalenca nešto niža, tako da 94,57% žena i 82,3% muškaraca uz standarne lekove za dijabetes tip 2 koristi i lekovito bilje (Damjanović i sar., 2015).

1.4. Etnofarmakološki tretman dijabetesa

Široko je zastupljeno mišljenje da je, pri terapiji složenih bolesti poput dijabetesa, korišćenje biljnih mešavina delotvornije od upotrebe pojedinačnog lekovitog bilja, pre svega zbog toga što sinergistički efekat lekovitog bilja upotrebljenog u vidu mešavina dovodi do boljeg terapeutskog ishoda kroz povećanje njihovih zaštitnih efekata i kroz smanjenje toksičnih dejstava (Umamaheswari i sar., 2009; Bera i sar., 2010; Parasuraman i sar., 2014; Mahajan i sar., 2018; Han i sar., 2019).

Veliki je broj različitih receptura biljnih mešavina koje se vekovima koriste u tradicionalnim medicinama širom sveta, a kroz razgovor sa brojnim travarima primećeno je jedna od često korišćenih „anti-dijabetičnih“ biljnih mešavina na ovom podneblju sastavljena od listova kupine (*Rubus fruticosus* L., Rosaceae), listova borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.,

Ericaceae), rizoma žute steže (*Potentilla erecta* (L.) Rauschel, Rosaceae), nadzemnog dela zečje stope (*Geum urbanum* L., Rosaceae), i suvih mahuna pasulja bez semena (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae), u odnosu 1:1:3:3:2, po receptu švajcarskog travara Oca Johana Kincla (Künzle, 1911).

Ovo lekovito bilje se već vekovima koristi u narodnoj medicini. Tako, kupina (*R. fruticosus*) (slika 1) ima veliki nutritivni i medicinski značaj (Mihok i sar., 2019). Bogata je antocijaninima, taninima, vitaminima i mineralima i odlikuju je antioksidantna, antimikrobna, protivupalna i antikancerska svojstva (Gudej i Tomczyk, 2004; Zia-Ul-Haq i sar., 2014; Machado i sar., 2015; Skrovankova i sar., 2015). Dekokt njenog lišća u se u narodnoj medicini koristi za lečenje upale desni, infekcija kože i gastrointestinalnog trakta, kao i u terapiji dijabetesa (Alonso i sar., 1980; Martini i sar., 2009; Verma i sar., 2014; Hamedi i sar., 2016).



Slika 1. *R. fruticosus* (Kops, 1877; preuzeto sa www.BioLib.de)

Borovnica (*V. myrtillus*) (slika 2) je zbog svoje široke upotrebe u fitomedicini, u mnogim evropskim zemljama, jedna od ekonomski najznačajnijih vrsta divljeg bobičastog voća.



Slika 2. *V. myrtillus* (Masclef, 1891.; preuzeto iz Atlas des plantes de France)

Njeni plodovi bogati su antocijaninima, a biljke sa visokim sadržajem antocijanina uglavnom pokazuju i značajnu antimikrobnu aktivnost (Cisowska i sar., 2011). Osim toga,

borovnica sadrži i brojne polifenole, poput kvercetina, što je čini dobrim izborom za obogaćivanje dijeta dijabetičara i srčanih bolesnika (Ghosh i Konishi, 2007; Mazza, 2007). Osim toga, ova biljka sadrži i tanine, flavonoide i malu količinu arbutina (Bohm i Koupai-Abyazani, 1994; Pavlović i sar., 2009).

U narodnoj medicini žuta steža (*P. erecta*) (slika 3) ima dugu primenu lečenja širokog spektra bolesti. Koristi se protivupalno i u tretiranju gastrointestinalnih problema (Subbotina i sar., 2003; Hoffmann i sar., 2016). Zbog svog antibakterijskog, antiviralnog i antifungalnog dejstva njome se ispiraju spoljašnje rane, a takođe se koristi i pri lečenju određenih kancera kao i dijabetesa (Grujić-Vasić i sar., 2006; Tomczyk i sar., 2010; Ökdem i sar., 2018).



Slika 3. *P. erecta* (Köhler, 1897.; preuzeto iz Köhler's Medizinal-Pflanzen)

Ova biljka je bogata taninima, triterpenoidima, organskim kiselinama, flavonoidima, kumarinom, polifenolima (Goncharov i sar., 1987; Goncharov i sar., 1989; Geiger i sar., 1994; Józwiak i sar., 2016; Drózdź i sar., 2019).

Najvažnije aktivne supstance zečje stope (*G. urbanum*) (slika 4) su galna kiselina, kofeinska kiselina, hlorogena kiselina, karotenoidi, flavonoidi, tanini, eterična ulja, seskviterpenski laktone (Psenák i sar., 1970).



Slika 4. *G. urbanum* (Sturm, 1796.; preuzeto sa <http://www.biolib.de>)

U narodnoj medicini ona se koristi zbog svojih sedativnih, hemostatskih, protivupalnih i anti-dijaretskih svojstava (Owczarek et al., 2013). Osim toga, u literaturi se pominju i njena antioksidativna, antimikrobna i neuroprotektivna dejstva, kao i upotreba u lečenju Parkinsonove bolesti i hipertenzije (Tunón i sar., 1995; Owczarek i sar., 2015; Javed i sar., 2018; Neshati i sar., 2018).

Zbog visokog sadržaja proteina pasulj (*P. vulgaris*) (slika 5) se upotrebljava u kulinarstvu širom sveta (Chávez-Mendoza i sar., 2019).



Slika 5. *P. vulgaris* (preuzeto sa <https://knowpulse.usask.ca/Phaseolus/vulgaris>)

Sadrži brojne bioaktivne supstance uključujući enzimske inhibitore, lektine, fitate, oligosaharide, fenolne komponente (Ekowati i sar., 2017; Hamed El i sar., 2017), masne kiseline, vitamine, flavonoide, antocijanine, proantocijanine i izoflavone. Odlikuju ga antioksidantne, antiinflamatorne i antikancerske aktivnosti (Madhujith i sar., 2004; Oomah i sar., 2010; Guajardo-Flores i sar., 2013). Koristi se i u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, gojaznosti i dijabetesa (Tsuda i sar., 1996; Ocho-Anin atchibri i sar., 2010).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uprkos značajnom napretku koji je savremena farmakoterapija kako dijabetesa, tako i drugih bolesti dostigla poslednjih decenija, veliki broj ljudi širom sveta se i dalje oslanja na upotrebu narodne medicine. Međutim, istraživanja o prevalenci korišćenja tradicionalne medicine u Srbiji su malobrojna. Jedna od najčešće korišćenih biljnih mešavina u etnofarmakolomakološkom tretmanu dijabetesa na Balkanu sastavljena je od listova borovnice i kupine, rizoma žute steže, nadzemnog dela zečje stope i mahuna pasulja. Iako se ova mešavina u narodnoj medicini koristi već vekovima, nema podataka o njenoj potencijalnoj toksičnosti kao ni studija koje bi verifikovale njen anti-dijabetični potencijal. Osim toga, malobrojni su i podaci o potencijalnoj toksičnosti samog lekovitog bilja koje ulazi u sastav ove „anti-dijabetične“ mešavine.

U vezi sa tim postavljeni su i ciljevi ovog istraživanja:

1. Utvrditi učestalost korišćenja narodne medicine u Srbiji u grupi ljudi sa dijagostikovanim dijabetesom, kao i među zdravim ljudima.
2. Ispitati fitohemijski sastav dekokta, metanolnih i etanolnih ekstrakata biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka. Identifikovati glavne hemijske konstituenate dekokta biljne mešavine.
3. Uporediti *in vitro* efekat biljne mešavine sa efektima njenih pojedinačnih sastojaka, kroz:
 - 3.1. ispitivanje antioksidativnog potencijala dekokta, metanolnih i etanolnih ekstrakata biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka;
 - 3.2. ispitivanje antimikrobne aktivnosti dekokta, metanolnih i etanolnih ekstrakata biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka;
 - 3.3. ispitivanje citotoksičnosti i anticitotoksičnosti dekokta, metanolnih i etanolnih ekstrakata biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka;
 - 3.4. ispitivanje genotoksičnosti i antigenotoksičnosti dekokta biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka.
4. Ispitati efekat dekokta biljne mešavine *in vivo*, kroz:
 - 4.1. procenu akutne oralne toksičnosti;
 - 4.2. procenu sub-hronične oralne toksičnosti;
 - 4.3. procenu anti-dijabetičnog efekta na primarne (hiperglikemija) i sekundarne (hiperlipidemija, patohistološke promene na pankreasu, bubrezima i jetri) komplikacije dijabetesa kroz poređenje sa efektima insulina i metformina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitivanje prevalence korišćenja narodne medicine u Srbiji

Ispitivanje učestalosti korišćenja narodne medicine na teritoriji celokupne Srbije sprovedeno je intersektorskim istraživanjem putem elektronskog anketiranja, uz pomoć Dijabetološkog saveza Srbije, Udruženja za borbu protiv dijabetesa grada Beograda i Ebers asocijacije za osobe sa dijabetesom u Nišu. Ispitano je 130 ljudi tokom februara 2018. godine.

Upitnik se sastojao od 11 pitanja u kombinaciji otvorenih i zatvorenih mogućnosti odgovora. Pitanja su bila svrstana u 4 kategorije: demografski podaci (pol i starost ispitanika), zdravstveno stanje (dijagnostikovan ili nedijagnostikovan dijabetes), upotreba tradicionalne medicine (vrsta fitoterapije i mesto kupovanja) i upotreba farmakoterapije.

3.2. Ekstrakcija biljnog materijala

Lekovito bilje ispitivano u ovoj studiji, tj. *V.myrtillus*, *P. erecta*, *R. fruticosus*, *G. urbanum* i *P. vulgaris* sakupljeni su u Srbiji tokom 2017. godine (Stara planina 43 21.943 N; 22 46.000 E, Vlasina 42 43.940 N; 22 19.533 E, Sićevačka klisura 43 19.308 N; 22 11.382 E, Gornja Koritnica 43 09.128 N; 22 20.200 E, Niška Banja 42 17.008 N; 22 01.727 E, redom). Nakon taksonomske identifikacije vaučeri su odloženi u herbarsku kolekciju Prirodno - matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, pod pristupnim brojevima HMN 13717–13721. Biljni materijal je 2-3 nedelje sušen na vazduhu, na promajnom mestu zaštićenom od svetlosti nakon čega je usitnjen do grubog praška (2-6 mm). „Anti-dijabetična“ biljna mešavina (ADM) je pripremljena na osnovu blago modifikovane tradicionalne recepture (Künzle, 1911) tako što je pomešano 10g listova kupine (RF), 10g listova borovnice (VM), 30g rizoma žute steže (PE), 30g nadzemnog dela zečje stope (GU) i 20g mahuna pasulja bez semena (pasuljevine) (PV).

Metanolni i etanolni ekstrakti dobijeni su tako što je 10g usitnjenog biljnog materijala potopljeno je u 100 mL 100% odgovarajućeg rastvarača. Tokom prvog i poslednjeg sata ekstrakcije korišćeno je ultrazvučno kupatilo. Nakon 24h u mraku, ekstrakti su filtrirani i rastvarači u potpunosti uklonjeni vakuum uparivačem (IKA RV10 Rotary Evaporator with HB10 Bath, Gaithersburg). Nakon toga, dobijeni ekstrakti čuvani su na suvom, hladnom mestu, zaštićenom od svetlosti sve do daljeg korišćenja u ispitivanjima fitohemijskog sastava, citotoksičnosti, anticitotoksičnosti i antimikrobne aktivnosti.

Dekokti su dobijeni tako što se 10g biljnog materijala ukuvavalo u 100 mL destilovane vode, sve dok 90 mL tečnosti nije isparilo. Nakon toga, dobijeni dekoka je filtriran i korišćen kao štok rastvor za eksperimente koji su rađeni istog dana (*HPLC* analiza i *in vivo* eksperimenti) ili je preostala tečnost u potpunosti uklonjena vakuum uparivačem a dobijeni ekstrakti čuvani na suvom, hladnom mestu, u mraku, do daljeg korišćenja u eksperimentima ispitivanja ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i *in vitro* studiji.

3.3. Fitohemijaska analiza

3.3.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola

Ukupan sadržaj fenola u dekoka, metanolnim i etanolnim ekstraktima „anti-dijabetične“ biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka određen je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem *Folin-Ciocalteu* reagensa (Singleton i sar., 1999). *Folin-Ciocalteu* reagens je oksidacino sredstvo koje se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Pri reakciji polifenola i *Folin-Ciocalteu* reagensa polifenolna jedinjenja se oksiduju do fenoksidnih anjona a sam reagens se redukuje do volfram-oksida i molibden-oksida koji je plave boje (Lamuela-Raventós, 2018). Intenzitet plave boje je direktno proporcionalan količini polifenola u uzorku, i određuje se spektrofotometrijski, merenjem absorbance na $\lambda=740$ nm (Singleton i sar., 1999).

Ispitivani ekstrakti rastvoreni su u metanolu (1 mg/mL). 0,3 mL rastvora svakog pojedinačnog ekstrakta pomešano je sa 1,5 mL *Folin-Ciocalteu*-ovog reagensa (razblaženog u metanolu, 1:10 (v/v)) i 1,2 mL Na_2CO_3 (7,5%, rastvorenim u destilovanoj vodi). Nakon 2 sata inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, merena je absorbanca u odnosu na slepu probu (metanol) na 740 nm (UV-1650PC, Shimadzu 1650, Europe). Koncentracija polifenola u ispitivanim uzorcima određena je sa kalibracione krive galne kiseline (100-1000 mg/L, razblaženja pravljena u metanolu). Dobijene vrednosti izražene su kao mg galne kiseline po g ekstrakta (mg GAE/g ekstrakta).

3.3.2. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida u dekoka, metanolnim i etanolnim ekstraktima „anti-dijabetične“ biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka određen je spektrofotometrijski upotrebom aluminijum-hlorida. Naime, flavonoidi sa metalima, kao što je aluminijum, obrazuju komplekse žute boje, u kojima je jačina boje direktno povezana sa koncentracijom

flavonoida u datom ekstraktu. Količina flavonoida u datom uzorku određuje se spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 510 nm (Woisky i Salatino, 1998).

Ispitivani ekstrakti rastvoreni su u metanolu (1 mg/mL). 1 mL rastvora svakog testiranog ekstrakta resuspendovano je u 6,4 mL destilovane vode, 0,3 mL NaNO₂ (5%, rastvorenog u destilovanoj vodi), 0,3 mL AlCl₃ (10% rastvorenog u destilovanoj vodi) i 2 mL NaOH (1M, rastvorenog u destilovanoj vodi). Napravljena smeša inkubirana je 30 minuta, u mraku, na sobnoj temperaturi. Nakon toga, merena je absorbanca u odnosu na slepu probu (destilovana voda) na 510 nm. Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima određen je sa kalibracione krive kvercetin hidrata (QuE) (100-1000 mg/L, razblaženja pravljena u metanolu) i izražen kao mg kvercetina po g ekstrakta (mg QuE/g ekstrakta).

3.3.3. HPLC analiza

Identifikacija pojedinačnih sastojaka dekokta „anti-dijabetične“ biljne mešavine urađena je primenom tačne hromatografije visokih performansi (eng. *high-performance liquid chromatography* – HPLC). Analize su vršene na aparatu Agilent 1200 Series korišćenjem C-18 kolone (Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4.6×150 mm). Detekcija razdvojenih pikova izvršena je primenom detektora sa serijom dioda (eng. *Diode Array Detector, DAD*) na 254 i 350 nm, a absorpcioni spektri komponenata snimljeni su u opsegu od 190 do 400 nm, uz pomoć *AgilentChemStation* softvera (Agilent Technologies, US). Dekokt je profiltriran kroz filter sa porama veličine 0,45 µm. Hromatografsko razdvajanje je izvršeno gradijentnim eluiranjem kroz dve mobilne faze (v/v) eluenta A (0,27 M mravlja kiselina) i eluenta B (metanol): inicijalno 70% A (0-5 minuta), 70-30% A (5-20 minuta), 30-10% A (20-25 minuta). U kolonu je automatski injektovano 5 µL uzorka. Kolona je termostatirana na temperaturi od 25 °C. Identifikacija komponenti izvršena je komparacijom retencionih vremena i UV spektara konstituenata sa komercijalno dostupnim standardima, tj. sa miricetinom, kempferolom, acacetinom, hrizinom, izorhamnetinom, kvercetinom, rutinom, hesperidinom, apigeninom, naringinom, hiperozidom i kempferol-3-glukozidom, kao i sa galnom, kofeinskom, elaginskom, trans-ferulinskom, siringinskom, rozmarinskom i taninskom kiselinom.

3.4. In vitro studija

3.4.1. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata DPPH testom

Antioksidativna aktivnost dekokta, metanolnih i etanolnih ekstrakata „anti-dijabetične“ biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka ispitana je spektrofotometrijski, upotrebom 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) testa. DPPH je sintetski, stabilan slobodni radikal često korišćen u ispitivanju sposobnosti ekstrakata lekovitog bilja da „hvataju“ slobodne radikale (eng. *DPPH scavenging activity*). Ovo „hvatanje“, tj. neutralizacija slobodnih radikala je bazirana na sposobnosti antioksidativnih agenasa, kao što je lekovito bilje, da deluju kao donori protona i elektrona (Blois, 1958). Naime, bioaktivne supstance lekovitog bilja imaju sposobnost da stabilizuju ljubičasti DPPH• radikal i prevedu ga u redukovani, neutralni, žuto obojeni oblik DPPH-H (Blois, 1958).

Razblaženja testiranih ekstrakata su pravljena u apsolutnom metanolu. 0,3 mL svakog testiranog ekstrakta pomešano je sa 2,7 mL DPPH metanolnog rastvora (0,04 mg/mL, rastvorenog u apsolutnom metanolu) i lagano promešano. Inkubacija je trajala 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacionog perioda, očitana je absorbanca u odnosu na slepu probu (300 µL i 2,7 mL metanolnog rastvora) na 517 nm. Pozitivna kontrola bila je 0,3 mL apsolutnog metanola pomešanog sa 2,7 mL DPPH rastvora. Antioksidativna aktivnost (DPPHa) izračunata je kao:

$$DPPHa (\%) = ((A_p - A_x) \div A_p) \times 100,$$

gde je A_p absorbanca pozitivne kontrole a A_x absorbanca testiranog ekstrakta. Kao referentni standardi korišćeni su askorbinska kiselina (vit C) i butil hidroksianizol (BHA).

3.4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

3.4.2.1. Korišćeni mikroorganizmi

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti dekokta, metanolnih i etanolnih ekstrakata „anti-dijabetične“ biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka korišćeni su sojevi iz ATCC kolekcije (eng. *American Type Culture Collection*), Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), Gram negativne bakterije: *Salmonella enterica* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) i diploidna gljiva *Candida*

albicans (ATCC 24433). Bakterijske kulture čuvane su na on *Mueller Hinton* agaru na 37 °C, dok je kultura gljiva održavana na *Sabouraud* dekstroznom agaru na 30 °C.

3.4.2.2. Mikrodiluciona metoda

Antimikrobna aktivnost testiranih ekstrakata procenjena je mikrodilucionom metodom u mikrotirarskim pločama sa 96 bunarčića (Radulović i sar., 2011). Od prekonocnih kultura testiranih sojeva mikroorganizama napravljene su suspenzije mikroorganizama u sterilnom fiziološkom rastvoru i podešene na turbiditet od 0,5 *Mc Farland*-a. Finalna gustina bakterijskog inokuluma bila je 5×10^6 a gljivičnog 5×10^5 CFU/mL. Ekstrakti su rastvoreni u 100% DMSO, ubačeni u bunarčiće i napravljena je serija razblaženja, nakon čega je u bunarčiće ubačena suspenzija odgovarajućih mikroorganizama. Na ovaj način pripremljene mikrotitar ploče sa bakterijama inkubirane su 24 sata na 37°C a ploče sa gljivama 48h na 30 °C. Kao pozitivne kontrole korišćeni su hloramfenikol (Ch) i nistatin (Ns). Jedan neinokulisani bunarčić služio je kao negativna kontrola, odnosno kontrola sterilnosti medijuma. Na kraju, u svaki bunarčić je dodato 20 µL 0,5% (w/w) vodenog rastvora trifenil-tetrazolijum hlorida (TTC) i inkubirano 1h na 37 °C i 30 °C. MIK je definisan kao najniža koncentracija testiranog ekstrakta koji je inhibirao vidljivi rast mikroorganizma, tj. najniža koncentracija pri kojoj nije bilo crvenog peleta na dnu bunarčića sat vremena nakon dodavanja TTC-a.

3.4.3. Ispitivanje citotoksičnosti i anticitotoksičnosti testovima hemolize i antihemolize eritrocita

Testovi hemolize i antihemolize su često korišćeni testovi pri proceni potencijalne citotoksične i anticitotoksične aktivnosti ekstrakata lekovitog bilja (Khalili i sar., 2014). Ukupna koncentracija hemoglobina oslobođenog iz eritrocita kao posledica hemolize određena je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Drabkinovog reagensa. Drabkinov reagens je smeša kalijum cijanida i kalijum feracijanida koji sa hemoglobinom grade stabilan kompleks cijanmethemoglobin (HbCN) crvene boje (Rusov, 1984). Intenzitet crvene boje je direktno proporcionalan količini cijanmethemoglobina u uzorku, i određuje se spektrofotometrijski, merenjem absorbance na $\lambda=540$ nm.

Priprema Drabkinovog reagensa: 1000 mg natrijum bikarbonata, 50 mg kalijum cijanida, 200 mg kalijum feracijanida rastvoreno je u 1 L destilovane vode (Rusov, 1984).

3.4.3.1. Priprema eritrocita za testove hemolize i antihemolize

Izolacija i priprema eritrocita rađena je po metodi Kalili i saradnika (2014). Ukratko, Wistar pacov je anestetiziran 10% Ketamidom i kardiopunkturom je krv skupljena u heparinizovan špric. Puna krv je centrifugirana 10 minuta, 2000 rpm na 4 °C. Supernatant, koji sadrži plazmu, leukocite i trombocite, je odbačen i dodata je jednaka količina PBS-a (0,9%, pH 7,4). Ovaj proces je ponovljen tri puta i na kraju su dobijeni čisti eritrociti. Čisti eritrociti su razblaženi PBS-om i dobijena je 4% suspenzija koja se odmah koristila.

3.4.3.2. Ispitivanje citotoksičnosti testom hemolize eritrocita

Test hemolize obavljen je po protokolu koji su predložili Zang i saradnici (2005). Razblaženja testiranih ekstrakata su pravljena u PBS-u (0,9%, pH 7,4). 0,5 mL suspenzije eritrocita nežno je resuspendovano u 0,5 mL testiranog ekstrakta i inkubirano 2h na 37 °C. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 5 minuta, 2000 rpm na 4 °C. Nakon centrifugiranja, 0,2 mL dobijenog supernatanta pomešano je sa 3 mL Drabkinovog reagensa, inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi, i, na kraju, absorbanca je izmerena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm. Negativna kontrola bili su eritrociti inkubirani samo u PBS-u, a pozitivna kontrola eritrociti inkubirani sa destilovanom vodom. Hemolitička aktivnost ispitivanih ekstrakata izračunata je po formuli:

$$HA (\%) = ((Ax - An) \div (Ap - An)) \times 100,$$

gde je Ax - absorbanca testiranog ekstrakta, Ap – absorbanca pozitivne kontrole a An – absorbanca negativne kontrole.

3.4.3.3. Ispitivanje anticitotoksičnosti testom antihemolize eritrocita

Antihemolitička sposobnost ispitivanih ekstrakata određena je modifikovanom metodom Kalilija i saradnika (2014). Ukratko, razblaženja testiranih ekstrakata pravljena su u PBS-u (0,9%, pH 7,4). 1000 µL suspenzije eritrocita nežno je pomešano sa 500 µL testiranog ekstrakta i 1000 µL PBS-a. Nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, dodato je 250 µL 0,3% H₂O₂ i inkubirano 4h na 37 °C. Nakon perioda inkubacije, uzorci su centrifugirani 5 minuta, 2000 rpm na 4 °C. 200 µL pomešano je sa 3000 µL Drabkinovog reagensa, inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga absorbanca je izmerena u odnosu na slepu probu (Drabkinov reagens) na 540 nm. Negativna kontrola bili su eritrociti u inkubirani PBS-u, a pozitivna kontrola eritrociti inkubirani u vodonik-peroksidu.

Inhibicija hemolize, odnosno antihemolitička aktivnost (AA) izračunati su pomoću formule:

$$AA (\%) = ((A_p - A_x) \div (A_p - A_n)) \times 100,$$

gde je A_p absorbanca pozitivne kontrole, A_x absorbanca testiranog ekstrakta a A_n absorbanca negativne kontrole.

3.4.4. Ispitivanje genotoksičnosti i antigenotoksičnosti ekstrakata *Allium cepa* testom

Genotoksičnost i antigenotoksičnost dekokata „anti-dijabetične“ biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka ispitana je *Allium cepa* testom. *A. cepa* esej je metod koji je zbog svoje senzitivnosti, pouzdanosti, brzine i pristupačne cene našao široku primenu kako u ekotoksikologiji tako i u ispitivanju potencijalne toksičnosti i antitoksičnosti lekovitog bilja. (Fiskesjo, 1985; Camparoto i sar., 2002; Teixeira i sar., 2003; Rank i Nielsen, 1994; Prajitha i Thoppil, 2016). U ovoj studiji su za *A. cepa* test korišćene male lukovice, dijametra 1-2 cm, običnog crnog luka ($2n = 16$) kupljene u poljoprivrednoj apoteci u Nišu.

3.4.4.1. Ispitivanje genotoksičnosti

Potencijalna genotoksičnost ispitivanih ekstrakata ispitana je metodom koju je predložio Fiskesjo (1985). Testirane su tri koncentracije ispitivanih biljnih dekokata, tj. 400, 800 i 1200 $\mu\text{g/mL}$. Testirane koncentracije su dobijene razblaživanjem štok rastvora destilovanom vodom. Tokom prvih 24h dno lukovica bilo je potopljeno u destilovanu vodu. Nakon 24h, lukovice sa zadovoljavajućim rastom korena (1 - 2 cm) izložene su testiranim ekstraktima tokom narednih 48h. Negativna kontrola bile su lukovice gajene u destilovanoj vodi, a pozitivna kontrola lukovice gajene 24h u destilovanoj vodi, a nakon toga, 48h u 500 $\mu\text{g/mL}$ toluena. Testirani uzorci su menjani u isto vreme svakog dana. Eksperiment je rađen na 23 ± 1 °C u mraku.

3.4.4.2. Ispitivanje antigenotoksičnosti

Antigenotoksična aktivnost ispitivanog lekovitog bilja procenjena je *A. cepa* testom po metodi koji su predložili Prajitha i Topil (2016). Ukratko, lukovice su najpre 24h gajene u destilovanoj vodi. Nakon 24h, one kod kojih je primećen zadovoljavajući rast korena tretirane su sat vremena 3% vodonik-peroksidom (H_2O_2), temeljno isprane destilovanom vodom i tokom narednih 48h izložene modulatornom tretmanu niskim koncentracijama ispitivanih biljnih ekstrakata, tj. 20, 45 i 70 $\mu\text{g/ml}$. Negativna kontrola bile su lukovice uzgajane u destilovanoj

vodi, a pozitivna kontrola lukovice uzgajane 24h u destilovanoj vodi i 48h u 3% H₂O₂. Testirani uzorci su menjani u isto vreme svakog dana. Eksperiment je rađen na 23 ± 1 °C u mraku.

3.4.4.3. Fiksacija tkiva

Na kraju inkubacionog perioda u ispitivanim ekstraktima vrhovi korenčića isečeni su skalpelom, fiksirani u hladnom rastvoru metanola i glacijalne kiseline (3:1 (v/v)), 24h na 4 °C. Nakon toga prebačeni su u 70% etanol i čuvani na 4 °C do daljeg korišćenja.

3.4.4.4. Priprema preparata za mikroskopsku analizu

Mikroskopski preparati pravljani su po blago modifikovanom protokolu Bosio i Laughinghouse-a (2012). Vrhovi korenčića hidrolizovani su 13 minuta na 60 °C u 1N HCl, obojeni 1% acetokarminom, pritisnuti pokrovnim staklom i fiksirani na plameniku. Na ovaj način dobijeni su nativni mikroskopski preparati čija je analiza vršena istog dana.

3.4.4.5. Mikroskopska analiza

Uticaj testiranih ekstrakata ispitan je tako što je analizirano 2500 ćelija po svakoj testiranoj koncentraciji, odnosno 500 ćelija po organizmu, pod uvećanjem 400x i 1000x na Leica svetlosnom mikroskopu (Leica DM2500, Germany).

Pri određivanju genotoksičnosti i antigenotoksičnosti korišćeni su sledeći parametri: mitotski indeks (MI), fazni indeks (FI), procenat hromozomskih aberacija (HrAb) i procenat ćelija sa hromozomskim aberacijama u pojedinačnim fazama mitotskog ciklusa (AFI). Mitotski indeks izračunat je kao procentualni odnos broja ćelija u deobi i ukupnog broja prebrojanih ćelija, tj.

$$MI = \frac{P+M+A+T}{500} \times 100,$$

gde je P – broj ćelija u profazi, M – broj ćelija u metafazi, A – broj ćelija u anafazi a T – broj ćelija u telofazi mitotskog ciklusa. (Fiskesjo, 1985; Bosio i Laughinghouse IV, 2012).

Procenat ćelija sa hromozomskim aberacijama izračunat je kao procentualni odnos ćelija u deobi kod kojih su uočene aberacije hromozoma i ukupnog broja posmatranih ćelija (Bosio i Laughinghouse IV, 2012).

Fazni indeks izračunat je kao procentualni odnos između ćelija u pojedinačnim fazama mitoze i ukupnog broja ćelija u deobi (Fiskesjo, 1985), a AFI kao procenat ćelija u mitozu sa aberantnim hromozomima u odnosu na ukupan broj ćelija koje su ušle u mitozu.

Inhibitorna aktivnost (IA) biljnih ekstrakata prema hromozomskim aberacijama indukovanim vodonik peroksidom potvrđena je određivanjem procenta inhibicije, odnosno antigenotoksičnog potencijala. Tako je antigenotoksični potencijal dekokata testiranog lekovitog bilja izračunat korišćenjem formule:

$$IA(\%) = ((A1 - Ax) \div (A1 - A0)) \times 100,$$

gde A1 predstavlja broj ćelija sa hromozomskim aberacijama nastalih uticajem vodonik peroksida, Ax broj ćelija sa hromozomskim aberacijama nakon modulatornog tretmanom dekoktima lekovitog bilja a A0 broj aberantnih ćelija u negativnoj kontroli (Prajitha i Thoppil, 2016).

3.5. In vivo studija

Finalni korak svake studije čiji je cilj verifikacija tradicionalne upotrebe lekovitog bilja i polih herbalnih preparata svakako je ispitivanje njihovog dejstva na animalnom modelu. Shodno tome, potencijalna toksičnost dekokta biljne mešavine ispitana je akutnom (OECD, 2002) i sub-hroničnom metodom (OECD, 2018), dok je njen efekat primene u etnofarmakološkom tretmanu dijabetesa evaluiran na modelu pacova kod kojih je dijabetes indukovao hemijskim putem.

3.5.1. Životinje

U ovom istraživanju je korišćeno osamdeset pet ženki pacova soja Wistar, težine 200-250g. Studija je rađena na Institutu za biomedicinska ispitivanja, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Životinje su čuvane u standardnim uslovima, gde je temperatura vazduha bila 23 ± 2 °C, vlažnost vazduha $55 \pm 10\%$ a cirkadijalni ritam održavan smenom dana i noći na 12h. Pristup vodi i standardnoj hrani za laboratorijske pacove bio je *ad libitum*.

Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje oglada je odobrila Etička komisija Medicinskog fakulteta u Nišu i Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine – Uprava za veterinu, broj rešenja 323-07-01762/2019-05/5.

3.5.2. Ispitivanje akutne oralne toksičnosti

Studija akutne oralne toksičnosti obavljena je po blago modifikovanom protokolu Organizacije za ekonomsku kooperaciju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Co-operation and Development* -OECD) 420 (OECD, 2002). Ukratko, nakon 12 sati gladovanja, životinje su podeljene u četiri grupe od po pet životinja. Životinje su pomoću gastrične sonde tretirane *per os* dekoktom „anti-dijabetične“ biljne mešavine, tj. životinje u prvoj grupi primile su po 1 ml dekokta koncentracije 10 g suve biljne mase po kg životinje, u drugoj grupi po 1 ml dekokta koncentracije 20 g/kg, u trećoj grupi 40 g/kg, a u četvrtoj grupi 80 g/kg. Nakon toga, potencijalni fizički znakovi intoksikacije u smislu promene brzine disanja životinja, promena u navikama negovanja krzna, pojava dijareje i eventualna smrtnost posmatrani su tokom prvog sata, na svaki sat tokom narednih pet sati, i na svakih 24h tokom narednih 14 dana.

3.5.3. Ispitivanje sub-hronične oralne toksičnosti

Studija sub-hronične oralne toksičnosti obavljena je blago modifikovanom protokolu OECD 407. U studiji je korišćeno četiri grupe od po pet životinja: ZK, Z-10, Z-20 i Z-40 grupa. Svakog jutra tokom dvadeset osam dana eksperimenta, ZK (zdrava kontrola) tretirana je vodom, dok su životinje u grupama Z-10, Z-20 i Z-40 tretirane dekoktom „anti-dijabetične“ biljne mešavine (10, 20 i 40 g/kg, redom). Životinje su tretman primale *per os* pomoću gastrične tube. Ponašanje životinja praćeno je svakodnevno. Telesna masa životinja merena je na dnevnom nivou, a nivo šećera u krvi jednom nedeljno, iz kapi krvi uzete iz repne vene korišćenjem portabilnog glukometra (FreeStyle Precision Neo, Abbot, UK).

3.5.4. Ispitivanje anti-dijabetičnog efekta

Ispitivanje anti-dijabetičnog efekta trajalo je 28 dana, odnosno, 14 dana nakon injektiranja aloksan monohidrata se čekalo na razvoj stabilnog dijabetesa tip 1, dok je tretman biljnom mešavinom i kontrolnim supstancama, insulinom i metforminom trajao preostalih 14 dana eksperimenta. Nultog dana eksperimenta, životinje su nasumično podeljene u dve grupe: zdravu kontrolnu grupu (ZK) sa 5 životinja u njoj, i grupu u kojoj će se indukovati dijabetes (40 životinja). Nakon 12 sati prekononoćnog gladovanja, životinje u drugoj grupi su tretirane intraperitonealnim injektiranjem 0,5 mL aloksana rastvorenog u ledeno-hladnom fiziološkom rastvoru, 150 mg/kg, gde se vodilo računa o tome da vreme između rastvaranja aloksana i samog injektiranja bude kraće od 90 sekundi, a životinje u ZK grupi su injektirane samo

fiziološkim rastvorom. Da bi se sprečila hipoglikemija izazvana dejstvom aloksana, sat vremena nakon injektiranja aloksana, tokom narednih 48h, životinjama je pružen *ad libitum* pristup 5% rastvoru glukoze, dok su životinje u zdravoj kontroli pile samo vodu (Banda i sar., 2018).

Četrnaest dana nakon primene aloksana, uzorkovana je krv iz repne vene u cilju određivanja koncentracije glukoze u krvi. Za životinje kod kojih je šećer u krvi prilikom tog merenja bio viši od 20 mmol/L smatralo se da su razvile stabilan dijabetes tip 1. Dijabetične životinje (n=25) su nasumično podeljene u pet grupa od po pet životinja (I, M, D-10, D-20 i DK). Do kraja eksperimenta, odnosno u narednih 14 dana, D-10 i D-20 grupa su tretirane „anti-dijabetičnom“ mešavinom (koncentracije 10 i 20g suve biljne mase po kg životinje, respektivno), I grupa je primala insulin glargin (13 jedinica (IU) po kg), dok je M grupa tretirana metforminom (150 mg/kg). Zdrava (ZK) i dijabetična (DK) kontrolna grupa životinja tretirana je vodom. Voda, metformin i dekokt biljne mešavine administrirani su oralnom gavažom, pri čemu se vodilo računa da zapremina tečnosti koja se u životinje unese bude manja od 1 mL, dok je insulin apliciran intraperitonealnim injektiranjem. Tretman je obavljan svakog jutra u isto vreme tokom 14 uzastopnih dana. Ponašanje životinja i njihova telesna masa praćeni su svakodnevno. Nivo šećera u krvi meren je 14 dana nakon injektiranja aloksana, odnosno na nulti dan tretmana, i subsekventno na dan 7 i dan 14 tretmana, odnosno na dan 21 i 28 samog eksperimenta. Merenje glikemijske vrednosti obavljeno je iz kapi krvi uzete iz repne vene korišćenjem portabilnog glukometra (FreeStyle Precision Neo, Abbot, UK).

3.5.5. Uzorkovanje tkiva

Dvadeset četiri sata nakon poslednjeg tretmana, životinje iz studije sub-hronične akutne toksičnosti, kao životinje i iz studije ispitivanja anti-dijabetičnog dejstva biljne mešavine anestetizirane su intraperitonealnom injekcijom 10% ketamidora. Kardiopunkturom je izolovana krv koja je centrifugirana 10 minuta na 3500 rpm na sobnoj temperaturi. Dobijeni supernatant, tj. serum, izdvojen je, zamrznut i čuvan na -20 °C sve do analize lipidog statusa. Isečeni su uzorci pankreasa, bubrega i jetre, isprani ledenim fiziološkim rastvorom i stavljeni u puferovani 10% formalin.

3.5.6. Analiza lipidnog statusa

Hipolipidemijski efekat „anti-dijabetične“ biljne mešavine i njen potencijal u ublažavanju razvoja ateroskleroze ispitan je analizom sedam parametara, a to su nivoi ukupnog

holesterola, *HDL*-a (eng. *high-density lipoproteins*), *LDL*-a (eng. *low-density lipoproteins*), triglicerida, *VLDL*-a (eng. *very-low-density lipoprotein*), aterogenog indeksa i kardiovaskularnog indeksa.

Koncentracija ukupnog holesterola (TC), *HDL*-a i triglicerida (TG) u serumu eksperimentalnih životinja izmerena je upotrebom komercijalno dostupnih kitova *Cholesterol liquicolor*, *HDL Cholesterol liquicolor*, *Triglycerides liquicolor* (Human Biochemica und Diagnostica GmbH, Germany) po uputstvu proizvođača na automatizovanom hemijskom analizatoru (Chemray 420, Rayto) i izražena u mmol/L. Koncentracija *VLDL*-a izračunata je kao petina koncentracije triglicerida (TG/5). Koncentracija *LDL*-a izračunata je po formuli:

$$LDL (mmol/L) = TC - HDL - VLDL \text{ (Friedewald i sar., 1992).}$$

Aterogeni indeks (AI) izračunat je po formuli:

$$AI = (TC - HDL)/HDL \text{ (Harnafi i sar., 2008).}$$

Kardiovaskularni indeks (KRI) je izračunat metodom koji su predložili Azizian i saradnici (Azizian i sar., 2018):

$$KRI = TC/HDL.$$

3.5.7. Priprema tkiva za histopatološku analizu

Priprema tkiva za rutinsku histopatološku analizu se sastoji od pet koraka, a to su fiksacija, dehidracija, kalupljenje (najčešće paraplastom), sečenje i bojenje.

Fiksacija tkiva je proces stabilizacije proteinske osnove ćelija putem koje se prirodan oblik, tj. morfologija ćelija i tkiva može trajno očuvati (Suvarna i sar., 2012). U ovoj studiji, iseći pankreasa, bubrega u jetre (debljine 5 mm) fiksirani su u 10% puferovanom formalinu 72h, odakle su prebačeni u 70% etanol i čuvani na +4 °C do dalje obrade.

Sledeći korak u pripremi tkiva za histopatološku analizu bila je postepena dehidracija tkiva, primenom serije alkohola, i to: 70% etanol (1h), 80% etanol (2h, sa jednom zamenom nakon prvih sat vremena), 90% etanol (2h, sa jednom zamenom), 96% etanol (1h), 100% etanol (48h sa jednom zamenom nakon 24h), na sobnoj temperaturi. Pošto paraplast nije rastvorljiv ni u vodi ni u alkoholu, pre samog kalupljenja neophodno je odstraniti sav alkohol iz tkiva toluenom, tako da se tkivo, nakon dehidracije alkoholom, prebacuje u toluen u kome stoji 3h, na sobnoj temperaturi.

Proces kalupljenja započet je prebacivanjem dehidratiranog tkiva u smešu toluena i paraplasta (1:1 (v/v)) u kome je stajalo 2 sata, na 62-64 °C, zatim prebačeno u čist paraplast i ostavljeno na istoj temperaturi preko noći. Sutradan je izvršena još jedna promena paraplasta i inkubacija još 2h na 62-64 °C. Finalno, uzorci su kalupljeni (Leica EG1150, Germany). Za formiranje oblika parafinski kalupljenih tkiva korišćeni su kalupi sa metalnim delom i parafinskom mrežicom. Ukratko, tkivo je stavljeno u zagrejan metalni kalup, zaliveno toplim paraplastom (62-64 °C), prebačeno na ploču za hlađenje i brzo prekriveno zagrejanom plastičnom mrežicom. Nakon što je paraplast u potpunosti ohlađen, metalni deo kalupa je sklonjen i tako ukalupljena tkiva su stavljena na -20 °C preko noći.

Ohlađeni kalupi su na mikrotomu (Leica RM2125 RT, Germany) isečeni na preseke debljine 5 µm, ispravljeni u vodenom kupatilu na 50 °C i fiksirani na predmetna stakla.

Pre samog bojenja izvršena je deparafinizacija tkiva (sat vremena na 62-64 °C) i rehidratacija tkiva, odnosno: toluen (8 minuta), 100% etanol (3 minuta), 96% etanol (3 minuta) i destilovana voda (5 minuta).

U ovoj studiji tkivo pankreasa, bubrega i jetre bojeno je dvema metodama – hematoksilin & eozin metodom (H&E) i Mason-trihromnim (MT) bojenjem, a jetra je dodatno analizirana i na preparatima obojenim PAS metodom (eng. *periodic acid-Shiff reaction*).

3.5.8. Bojenje tkiva

3.5.8.1. Bojenje hematoksilinom i eozinom (H&E)

Bojenje tkiva hematoksilinom i eozinom je najčešće korišćeno bojenje u histologiji a bazirano je na primeni dve boje – hematoksilina, koji jedra ćelije boji u plavu do ljubičastu boju, i eozina, koji boji citoplazmu i ekstracelularni matriks u pet nijansi roze boje (Titford, 2005).

Pločice sa deparifinisanim i hidratisanim tkivima obojene su Harisovim hematoksilinom (10 minuta), ispirane destilovanom vodom (1 minut), tekućom vodom (5 minuta), destilovanom vodom (3 minuta), obojene eozinom (30 sekundi), ispirane destilovanom vodom (2 minuta), 96% etanolom (3 minuta), 100% etanolom (3 minuta) i osušene 5 minuta na 62-64 °C. Vruće pločice sa obojenim tkivima su stavljene u toluen u kome su stajale 8 minuta na sobnoj temperaturi, i finalno, preparati su zaštićeni pokrovnim staklima zalepljenim DPX-om.

Priprema Harisovog hematoksilina: 1g hematoksilina rastvoreno je u 10 mL 100% etanola, pomešano sa 20g kalijum alumina ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) prethodno rastvorenog u 190 mL vruće destilovane vode i zagrevano do ključanja. Ključalom rastvoru polako je dodato 0,5g živa(II) oksida (HgO) i smeša je kuvana 2-3 minuta. Rastvor je brzo ohlađen i dodato 20 mL glacijlne sirćetne kiseline.

Priprema eozina:

1. Štok: 2 g eozina rastvoreno je u 40 mL dH_2O i 160 mL 96% etanola.
2. Radni rastvor: 50 mL štoka resuspendovano je u 12 mL etanola, 30 mL dH_2O i 1 mL glacijalne sirćetne kiseline.

3.5.8.2. Mason-trihromno bojenje (MT)

Mason-trihromno bojenje je često primenjivana tehnika za razlikovanje ćelija od okolnog vezivnog tkiva. Ovim bojenjem se kolagen boji u plavo/zeleno, citoplazma u roze a jedra u tamno braon boju (Suvarna, 2012).

Pločice sa deparifinisanim i hidratiziranim tkivima tretirane su *Wiegerth*-ovim hematoksilinom (5 minuta) i prebačene u mešavinu dve boje - kiselog fuksina i *Ponceau* (1:2 (v/v)), napravljenu neposredno pre upotrebe, u kojoj su stajale 2 minuta. Nakon ispiranja destilovanom vodom, preparati su preliveni 1% fosfomolibdenskom kiselinom (2 puta po 1 minut). Na pločice je zatim, preko fosfomolibdenske kiseline dodat *anilin blue*, kako bi se obojio kolagen. Nakon 5 minuta preparati su isprani destilovanom vodom (3 minuta), 96% etanolom (3 minuta), 100% etanolom (3 minuta) i osušeni 5 minuta na 62-64 °C. Vruće pločice sa obojenim tkivima su stavljene u toluen u kome su stajale 8 minuta na sobnoj temperaturi, i na kraju, preparati su zaštićeni pokrovnim staklima zalepljenim DPX-om.

Priprema *Wiegerth*-ovog hematoksilina:

- Rastvor A: 2g hematoksilina rastvoreno je u 200 mL 96% etanola.
- Rastvor B: 8 mL 29% gvožđe (III) hlorida ($FeCl_3$) rastvoreno je u 2 mL koncentrovane HCl i 190 mL dH_2O .
- Rastvori A i B su pomešani, filtrirani i čuvani na 4 °C.

Priprema kiselog fuksina: 1g fuksina je rastvoreno u 100 mL vrele dH_2O , rastvor je ohlađen, dodato je 1 mL glacijalne sirćetne kiseline i filtrirano.

Priprema Ponceau: 1g Ponceau 2R rastvoren je u 100 mL vrele dH₂O, ohlađen, dodato je 1 mL glacialne sirćetne kiseline i filtrirano.

Priprema aniline blue: 2.5g *anilin blue* rastvoreno je u 100 mL vrele dH₂O, ohlađeno, dodato 2,5 mL glacialne sirćetne kiseline i filtrirano.

3.5.8.3. Bojenje perjodnom kiselinom i Šifovim reagensom (PAS)

Bojenje perjodnom kiselinom i Šifovim reagensom (PAS bojenje) se koristi za dokazivanje prisustva glikogena u tkivima. Kao rezultat se dobijaju purpurno obojene PAS pozitivne ćelije (Suvarna, 2012).

Pločice sa deparifinisanim i hidratiziranim tkivima tretirane su perjodnom kiselinom (30 minuta na 4 °C), isprane tekućom vodom (5 min), stavljene u Šifov reagens (30 minuta na 4 °C), ispirane tekućom vodom (10 minuta), obojene Harisovim hematoksilinom (10 minuta), ispirane tekućom vodom (5 minuta), destilovanom vodom (2 minuta), 96% etanolom (3 minuta), 100% etanolom i osušene na 62-64 °C. Vruće pločice sa obojenim tkivima su stavljene u toluen u kome su stajale 8 minuta na sobnoj temperaturi, i finalno, preparati su zaštićeni pokrovnim staklima zalepljenim DPX-om.

Priprema Šifovog reagensa:

- Rastvor A: 1 g pararozanilina rastvoren je u 30 mL 1N HCl;
- Rastvor B: 1 g natrijum-metabisulfita rastvoreno je u 170 mL dH₂O;
- Rastvori A i B su pomešani i ostavljeni da stoje 24h na sobnoj temperaturi u mraku;
- Rastvoru je dodato 3g aktivnog uglja, energično je promešan i filtriran;
- Kao finalni rastvor dobijena je bistra tečnost koja se čuvala na 4 °C.

Priprema perjodne kiseline: 0,5 g perjodne kiseline rastvoreno je u 100 mL dH₂O i čuvano na 4 °C (do mesec dana).

3.5.9. Histopatološka analiza

Obojeni preparati slikani su na optičkom mikroskopu (Leica DM2500, Germany). Nasumično je slikano pet vidnih polja po preparatu na uvećanju 200x, a deset vidnih polja na uvećanju 400x, i analizirano pomoću ImageJ softvera (NIH, USA).

Uticaoj tretmana biljnom mešavinom na tkivo pankreasa ispitan je morfometrijskom analizom dva parametra: broja ćelija po površini Langerhansovih ostrvaca pankreasa (LO), sa preparata obojenih H&E metodom, i nivoa depozicije kolagena u pankreasu, sa preparata obojenih MT metodom.

Efekat biljne mešavine na tkivo bubrega ispitan je analiziranjem tri parametra: površine glomerula i broja proksimalnih tubularnih ćelija sa preparata obojenih H&E i nivoa depozicije kolagena u bubregu sa preseka obojenih MT metodom.

Efekat tretmana na tkivo jetre ispitan je uporednom analizom sedam parametara, a to su: broj Kupferovih ćelija prisutnih u jetri, odnos nukleusa i citoplazme (N:C) mononukleusnih (MH) i binukleusnih (BH) hepatocita, broj hepatocita, broj binukleusnih hepatocita, depozicija kolagena u jetri i broj hepatocita sa glikogenom (PAS pozitivni hepatociti).

3.6. Statistička analiza

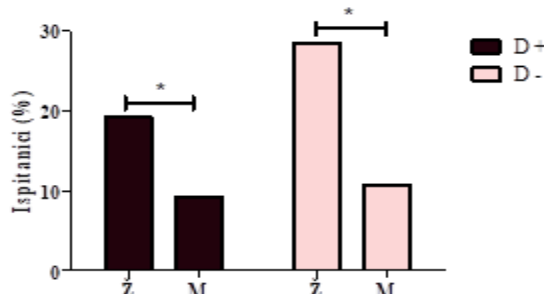
Fitohemijaska analiza rađena je u triplikatu. Osim *A. cepa* testa, svi *in vitro* eksperimenti su takođe rađeni u triplikatu. *A. cepa* test i *in vivo* studije rađene su u pentaplikatu. Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička analiza podataka odrađena je korišćenjem softvera *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, La Jolla California USA). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) je korišćena za utvrđivanje postojanja statističke značajnosti srednjih vrednosti merenja, a Tukijevim *post-hoc* testom ispitan je postojanje statistički značajnih razlika između tretiranih grupa ponaosob. Međusobna povezanost hemijskog sastava ispitivanog bilja sa njihovom biološkom aktivnošću upoređena je korišćenjem Pirsonovog koeficijenta korelacije. Statistička analiza podataka u studiji ispitivanja prevalence korišćenja narodne medicine urađena je pomoću χ^2 testa. Za statistički značajne smatrane su vrednosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Prevalenca korišćenja narodne medicine u Srbiji

U ovoj studiji je anketirano 130 ispitanika sa teritorije cele Srbije, od kojih je 55,38% bilo sa dijabetesom, a 44,62% bez ove bolesti. 77,69% ispitanika bilo je ženskog pola, a 22,31% muškog. Prosečna starost ispitanika bila je $34,83 \pm 12,76$ godina.

U celokupnom uzorku ispitanika, prevalenca korišćenja tradicionalne medicine iznosila je 67,7%. Primećena je značajna razlika u učestalosti upotrebe narodne medicine među polovima ($p < 0,05$). Tako, u uzorku od 99 anketiranih žena čak 47,69% njih je izjavilo da se oslanja na etnofarmakologiju, dok je se u uzorku od 31 anketiranog muškarca svega njih 19,99% izjasnilo da redovno upotrebljava lekovito bilje. Kao što se vidi na grafiku 1, ova razlika je bila izražena i u dijabetičnoj (D+) i u nedijabetičnoj (D-) grupi ispitanika. Naime, duplo veći broj žena nego muškaraca sa dijabetesom (19,23% žena i 9,23% muškaraca) se oslanja na tradicionalnu medicinu, dok je među zdravim ispitanicima ova razlika bila još izraženija, te se skoro tri puta više zdravih žena nego muškaraca izjasnilo kao redovni korisnici etnofarmakoloških pristupa (28,46% žena i 10,76% muškaraca) (grafik 1).



Grafik 1. Frekventnost korišćenja tradicionalne medicine u zavisnosti od pola u dijabetičnoj (D+) i nedijabetičnoj populaciji (D-). Ž: žene; M: muškarci. * $p < 0,05$

Zapaženo je da je upotreba lekovitog bilja i/ili supstituenata bila veća kod zdravih ispitanika (87,93%) u odnosu na ispitanike sa dijabetesom (51,34%). Svi dijabetični ispitanici su se striktno pridržavali saveta lekara i upotrebe farmakoterapije, dok se čak četvrtina zdravih ispitanika (26%) oslanjala isključivo na narodnu medicinu.

Najčešće je od lekovitog bilja i/ili farmaceutskih suplemenata upotrebljavana nana (21%), zatim biljne mešavine namenjene održavanju normalnih vrednosti glikemije i sprečavanju sekundarnih komplikacija dijabetesa (15%), kao i kamilica (13%) i farmaceutski suplementi zasnovani na tradicionalnim recepturama (10%). U nešto manjoj meri u upotrebi

su bili i đumbir, zova, brusnica, šipurak, eukaliptus, bosiljak, kopriva, majčina dušica, beli slez, virak, kantarion, neven, hibiskus, hajdučka trava, zeleni čaj, cimet, žalfija, peršun, kurkuma i origano.

Najveći broj ispitanika je lekovito bilje i suplemente kupovala u apotekama (58%) i od akreditovanih travara (30%), dok je samo 12% ispitanika kupovalo tretmane na pijaci.

4.2. Fitohemijaska analiza

4.2.1. Ukupan sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima

Ukupan sadržaj fenola i flavonoida, kao i sam prinos ekstrakcije, prikazani su u tabeli 1. U odnosu na sve testirane ekstrakte, najviši sadržaj fenola i flavonoida uočen je u metanolnom ekstraktu rizoma žute steže ($661,67 \pm 16,07$ mg GAE/g ekstrakta i $172,43 \pm 2,63$ mg QuE/g ekstrakta, respektivno), a najniži u etanolnom ekstraktu pasuljevine ($22 \pm 1,73$ mg GAE/g ekstrakta i $2,89 \pm 0,15$ mg QuE/g ekstrakta, redom). Poredeći uticaj rastvarača na dobijenu količinu ukupnih fenola u ekstraktima, može se primetiti da je ekstrakcija vodom uzrokovala najveću izolaciju ovih jedinjenja iz listova kupine i mahuna pasulja, etanolom iz „anti-dijabetične“ biljne mešavine i listova borovnice, a metanolom iz rizoma žute steže i nadzemnog dela zečje stope. Najveći nivo flavonoida ekstrakcijom vodom dobijen je iz kupine, borovnice, pasuljevine i zečje stope, etanolom iz biljne mešavine, a metanolom iz žute steže (tabela 1).

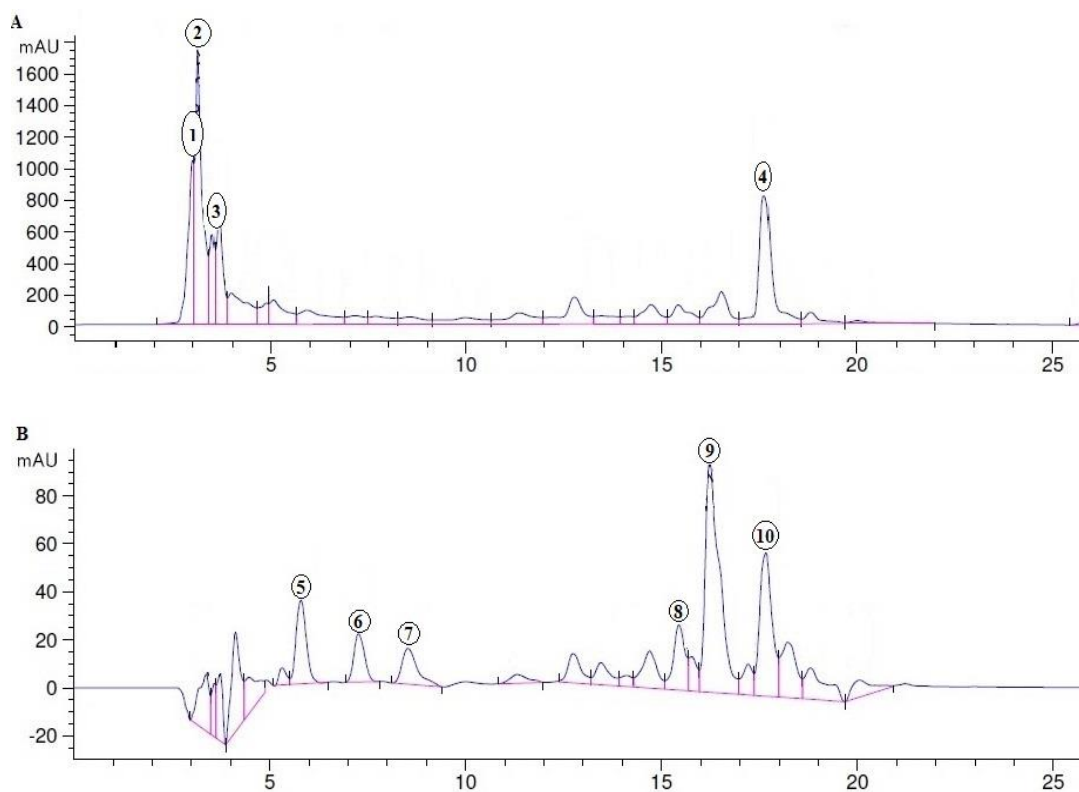
Poređenjem ekstrakata primećuje se pozitivna korelacija prinosa sa ukupnim sadržajem fenola ($r = 0,72$; $p < 0,001$) kao i sa ukupnim sadržajem flavonoida ($r = 0,52$; $p < 0,05$). Međutim, upoređivanjem pojedinačnih ekstrakcija, nije primećena uniformna povezanost. Prinos je statistički značajno pozitivno korelisan sa ukupnom količinom fenola kod metanolnih ($r = 0,79$; $p < 0,05$) i etanolnih ($r = 0,93$; $p < 0,01$) ekstrakata, dok je kod vodenih ekstrakata uočen trend negativne korelacije ($r = -0,31$; $p > 0,05$). Kod metanolnih ekstrakata, prinos ekstrakcije je bio statistički značajno povezan sa ukupnim sadržajem flavonoida ($r = 0,88$; $p < 0,05$), dok je kod etanolnih i vodenih ekstrakata bio primećen samo trend pozitivne ($r = 0,6$; $p > 0,05$), odnosno negativne ($r = -0,64$; $p > 0,05$) korelacije prinosa i ukupnog sadržaja flavonoida.

Tabela 1. Prinos, ukupan sadržaj fenola i flavonoida testiranih ekstrakata

Testirani ekstrakt		Prinos (%)	Ukupni fenoli (mg galne kiseline po g ekstrakta)	Ukupni flavonoidi (mg kvercetina po g ekstrakta)
ADM	Vodeni	14,97	129 ± 1	50,9 ± 0,46
	Etanolni	4,13	365 ± 24,25	118,57 ± 0,9
	Metanolni	10,73	267,33 ± 9,02	79,67 ± 0,21
RF	Vodeni	16,92	231,67 ± 6,81	57,97 ± 1,06
	Etanolni	6,03	92,67 ± 0,58	29,3 ± 1,31
	Metanolni	14,6	114 ± 2,08	31,48 ± 0,32
VM	Vodeni	12,07	191,33 ± 7,23	109,27 ± 11,06
	Etanolni	2,79	195 ± 4,58	92,6 ± 0,7
	Metanolni	6,71	160 ± 3,46	72,3 ± 0,17
PE	Vodeni	6,35	214 ± 9,54	140,13 ± 7,27
	Etanolni	39,97	510 ± 18,03	127,4 ± 0,85
	Metanolni	31,87	661,7 ± 16,07	172,43 ± 2,63
GU	Vodeni	18,2	87 ± 3,46	59,67 ± 2,33
	Etanolni	1,5	45 ± 0	22,47 ± 0,06
	Metanolni	5,72	101 ± 2,64	17,96 ± 0,61
PV	Vodeni	12,79	43,67 ± 2,31	8,3 ± 0,61
	Etanolni	0,36	22 ± 1,73	2,89 ± 0,15
	Metanolni	2,47	26,67 ± 0,58	6,13 ± 0,3

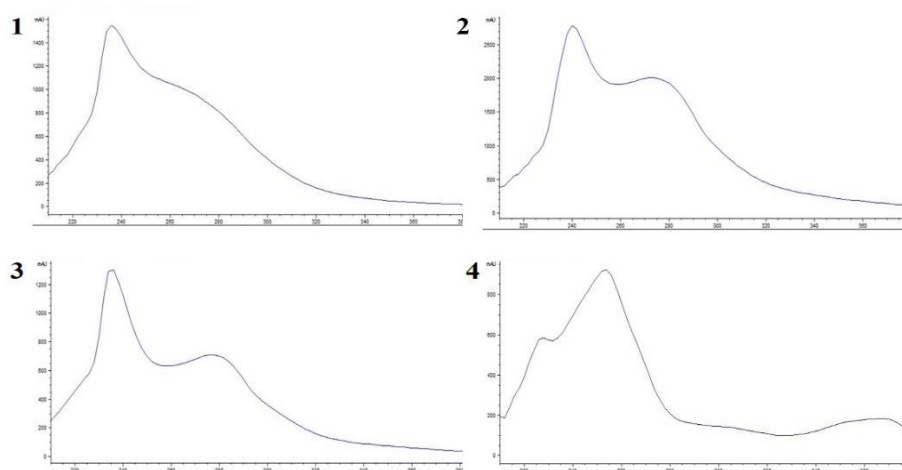
4.2.2. Hemijski sastav „anti-dijabetične“ biljne mešavine

HPLC-UV analizom identifikovano je 10 jedinjenja u dekoktu „anti-dijabetične“ biljne mešavine: hininska, galna i kaftarinska kiselina, arbutin (hidrohinon β -D-glukopiranozid), rutin (kvercetin-3-O-rutinozid), trifolin (kempferol-3-O-galaktozid), astragalin (kempferol-3-O-glukozid), hiperozid (kvercetin-3-O-galaktozid), izokvercetin (kvercetin-3-O-glukozid) i kvercitrin (kvercetin-3-O-ramnozid) (Slika 6).



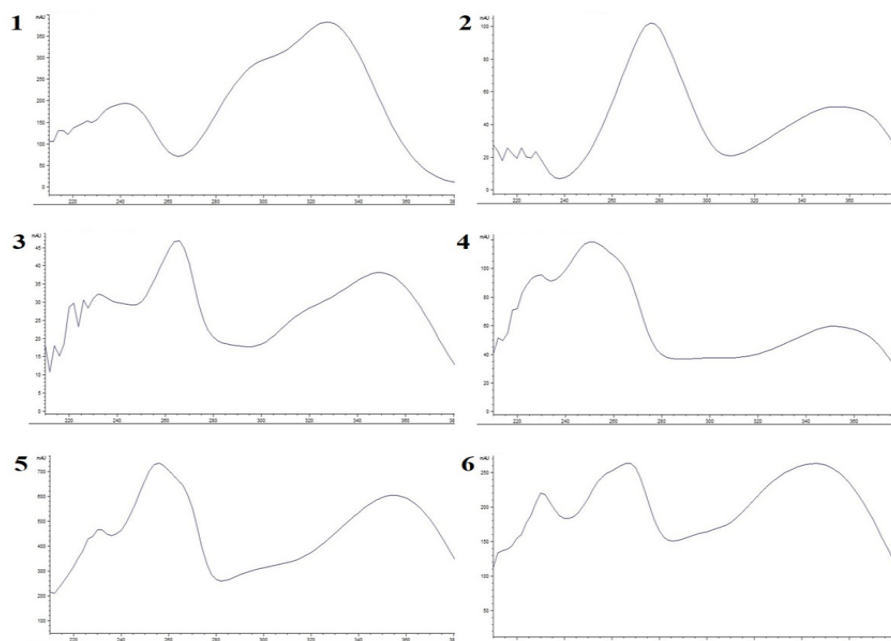
Slika 6. HPLC hromatogram dekokta „anti-dijabetične“ biljne mešavine snimljen na 254 (A) i 350 nm (B). 1: Hininska kiselina; 2: galna kiselina; 3: arbutin; 4: rutin; 5: kaftarinska kiselina; 6: trifolin; 7: astragalin; 8: hiperozid; 9: izokvercetin; 10: kvercitrin.

Na slici 7 prikazani su UV spektri identifikovanih metabolita dekokta „anti-dijabetične“ biljne mešavine snimljenih na 254 nm.



Slika 7. UV spektri hininske kiseline (1), galne kiseline (2), arbutina (3) i rutina (4).

Na slici 8 prikazani su UV spektri identifikovanih metabolita biljne mešavine snimljenih na 350 nm.



Slika 8. UV spektri kaftarinske kiseline (1), trifolina (2), astragalina (3), hiperozida (4), izokvercicina (5) i kvercitrina (6).

Najzastupljenija identifikovanja jedinjenja u dekoktu ispitivane biljne mešavine bila su: izokvercetin (22,8%), galna kiselina (18,23%), rutin (15,14%), kvercitrin (12,46%) i arbutin (10,85%). Relativna zastupljenost ostalih identifikovanih jedinjenja bila je: hininska kiselina (9,09%) > kaftarinska kiselina (5,85%) > hiperozid (5,21%) > astragalin (3,84%) > trifolin (3,54%) (Tabela 2).

Tabela 2. Retenciona vremena, maksimalne apsorbance i relativna zastupljenost identifikovanih metabolita dekokta „anti-dijabetične“ biljne mešavine.

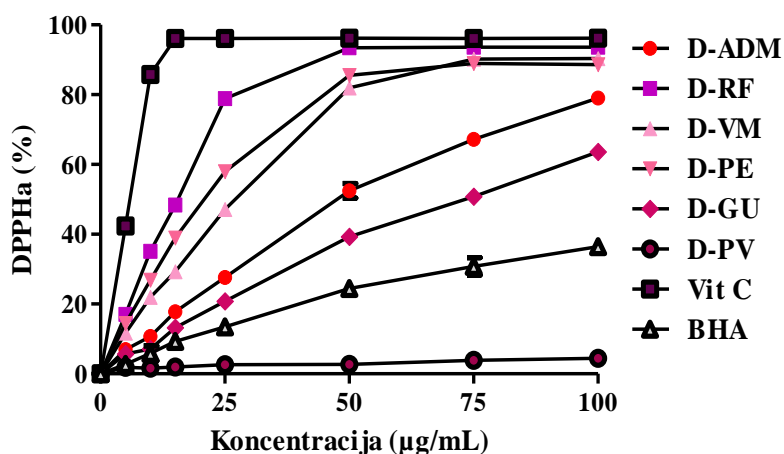
Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Maksimalna absorbanca (nm)	Relativna zastupljenost (%)
Hininska kiselina	2,99	220, 235	9,09
Galna kiselina	3,12	228, 270	18,23
Arbutin (Hidrohinon β -D-glukopiranozid)	3,57 \pm 0,11	220, 288	10,85
Rutin (Kvercetin-3-O-rutinozid)	17,61	230, 255, 360	15,14
Kaftarinska kiselina	5,8	220, 240, 300, 330	5,85
Trifolin (Kempferol-3-O-galaktozid)	7,26	266, 301, 346	3,54
Astragalin (Kempferol-3-O-glukozid)	8,53	266, 298, 346	3,84
Hiperozid (Kvercetin-3-O-galaktozid)	15,44	257, 265, 298, 355	5,21
Izokvercetin (Kvercetin-3-O-glukozid)	16,23	256, 266, 297, 355	22,8
Kvercitrin (Kvercetin-3-O-ramnozid)	17,66	256, 307, 351	12,46

4.3. In vitro studija

4.3.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata

DPPH testom je utvrđeno da svi analizirani ekstrakti poseduju određeni nivo antioksidativne aktivnosti (grafici 2, 3 i 4) koji je koncentracijski zavisian i pozitivno korelisan sa ukupnim sadržajem fenola ($r = 0,56$; $p < 0,01$) i flavonoida ($r = 0,64$; $p < 0,01$). Antioksidativna aktivnost testiranih ekstrakata je procenjena na osnovu poređenja maksimalnih kapaciteta neutralisanja DPPH radikala ekstrakata i antioksidanata koji su korišćeni kao standard. Kao standardi, korišćeni su vitamin C (vit C) i butil hidroksianizol (BHA). Najviši kapacitet neutralisanja DPPH radikala imao je vitamin C, a svi testirani ekstrakti lekovitog bilja, osim etanolnog ekstrakta *G. urbanum* i svih testiranih ekstrakata *P. vulgaris*, pokazali su značajno višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na BHA ($p < 0,001$).

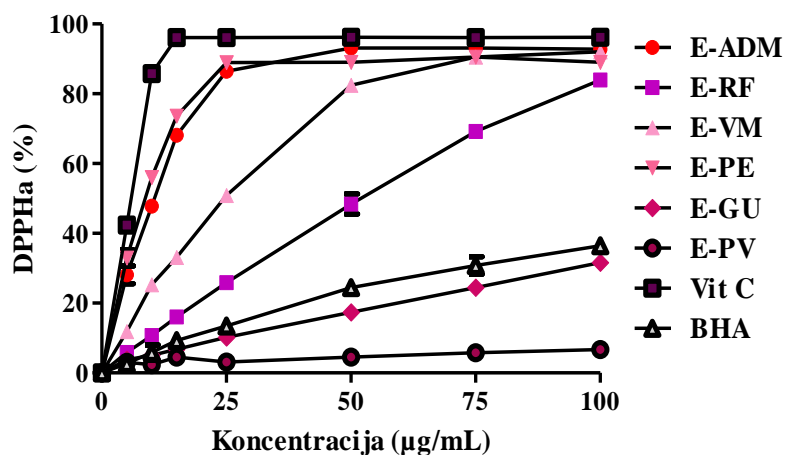
Na grafiku 2 je prikazana antioksidativna aktivnost dekokata lekovitog bilja. Pri korišćenju doze od 100 $\mu\text{g/mL}$, ispitivani dekokti su pokazali različit nivo antioksidativne aktivnosti i to: vitamin C > *R. fruticosus* > *V. myrtillus* > *P. erecta* > „anti-dijabetična“ biljna mešavina > *G. urbanum* > BHA > *P. vulgaris*, gde je neutralizacija DPPH slobodnih radikala iznosila $96,18 \pm 0\%$, $93,63 \pm 0,05\%$, $90,41 \pm 0,16\%$, $88,6 \pm 0,24\%$, $79,06 \pm 0,23\%$, $63,62 \pm 0,59\%$, $36,48 \pm 0,57\%$ i $4,46 \pm 0,18\%$, redom.



Grafik 2. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala dekokata.

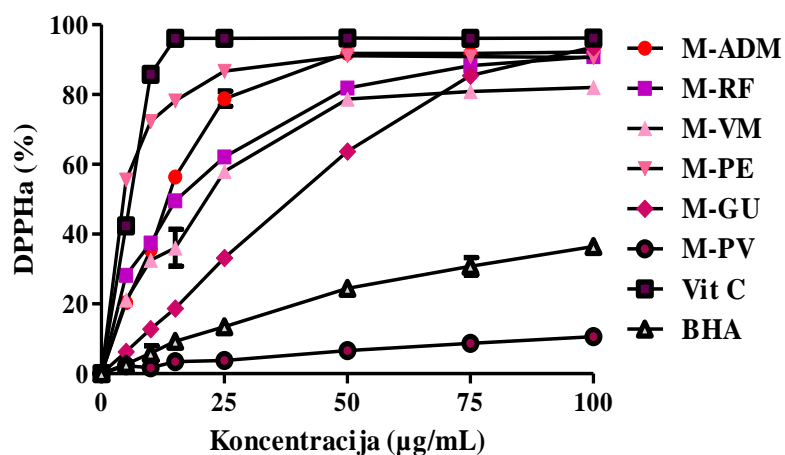
Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata ispitivanog lekovitog bilja prikazana je na grafiku 3. Može se primetiti da je kapacitet neutralisanja DPPH slobodnih radikala pri korišćenju maksimalne testirane doze etanolnih ekstrakata bio sledeći: vitamin C ($96,18 \pm 0\%$)

> „anti-dijabetična“ biljna mešavina ($92,82 \pm 0,09\%$) > *V. myrtillus* ($92,06 \pm 0,43\%$) > *P. erecta* ($89,04 \pm 0,37\%$) > *R. fruticosus* ($83,92 \pm 0,21\%$) > BHA ($36,48 \pm 0,57\%$) > *G. urbanum* ($31,62 \pm 1,27\%$) > *P. vulgaris* ($6,67 \pm 0,11\%$).



Grafik 3. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala etanolnih ekstrakata.

Kao što je prikazano na grafiku 4, svi metanolni ekstrakti testiranog lekovitog bilja, osim *P. vulgaris*, imali su visok stepen antioksidativne aktivnosti u DPPH testu. Kapacitet neutralisanja DPPH slobodnih radikala pri korišćenju maksimalne testirane doze metanolnih ekstrakata bio je sledeći: *G. urbanum* ($93,63 \pm 0,05\%$) > „anti-dijabetična“ biljna mešavina ($92,22 \pm 0,19\%$) > *R. fruticosus* ($90,85 \pm 0,15\%$) > *P. erecta* ($90,65 \pm 0,09\%$) > *V. myrtillus* ($82,06 \pm 0,61\%$) > *P. vulgaris* ($10,6 \pm 0,86\%$).



Grafik 4. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala metanolnih ekstrakata.

4.3.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti dekokata, metanolnih i etanolnih ekstrakata biljne i mešavine kao i njenih pojedinačnih sastojaka na odabrane sojeve mikroorganizama prikazani su u tabelama 3, 4 i 5. Antimikrobna aktivnost procenjena je mikrodilucionom metodom, odnosno određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija.

Kao što se vidi u tabeli 2, antimikrobna aktivnost testiranih dekokata bila je umerena do slaba i MIK je u većini ovih ekstrakata bio u rasponu od 625 do 5000 $\mu\text{g/mL}$. Jedini izuzetak bio je dekoka *P. erecta*, koji je u koncentraciji 150 $\mu\text{g/mL}$ uspeo da inhibira rast *B. cereus*.

Tabela 3. Antimikrobna aktivnost dekokata.

Mikroorganizam	ATCC broj	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						Kontrola	
		D-ADM	D-VM	D-RF	D-PE	D-GU	D-PV	Ch ($\mu\text{g/mL}$)	Ns ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	6538	2500	2500	2500	625	5000	/	6.25	/
<i>S. epidermidis</i>	12228	625	2500	2500	2500	/	/	1.56	/
<i>B. cereus</i>	11778	625	625	625	156	2500	/	3.12	/
<i>S. enterica</i>	13076	2500	2500	5000	2500	5000	/	12.5	/
<i>P. aeruginosa</i>	9027	1250	625	2500	1250	2500	/	12.5	/
<i>A. baumannii</i>	19606	5000	5000	5000	2500	/	/	25	/
<i>C. albicans</i>	24433	/	2500	5000	5000	/	5000	2.34	2.5

Antimikrobna aktivnost testiranih etanolnih ekstrakata bila je nešto veća od dekokata, ali i dalje umerena do slaba, gde je MIK kod većeg broja testiranih ekstrakata bio u opsegu od 310 do 5000 $\mu\text{g/mL}$. Najveću antimikrobnu aktivnost imao je ekstrakt „anti-dijabetične“ biljne mešavine koji je u koncentraciji 150 $\mu\text{g/mL}$ inhibirao rast *A. baumannii* i *C. albicans* i pasuljevine, koji se pokazao uspešnim u inhibiciji rasta gljive *C. albicans* (tabela 4).

Tabela 4. Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata.

Mikroorganizam	ATCC broj	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						Kontrola	
		E-ADM	E-VM	E-RF	E-PE	E-GU	E-PV	Ch ($\mu\text{g/mL}$)	Ns ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	6538	625	2500	1250	310	620	1250	6.25	/
<i>S. epidermidis</i>	12228	2500	5000	625	2500	5000	325	1.56	/
<i>B. cereus</i>	11778	310	310	625	625	310	1250	3.12	/
<i>S. enterica</i>	13076	2500	5000	625	5000	2500	625	12.5	/
<i>P. aeruginosa</i>	9027	2500	2500	1250	2500	2500	625	12.5	/
<i>A. baumannii</i>	19606	150	2500	/	310	1250	1250	25	/
<i>C. albicans</i>	24433	150	625	310	310	2500	150	2.34	2.5

U tabeli 5 prikazana je antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata. Većina testiranih ekstrakata imala je umerenu do slabu antimikrobnu aktivnost, kod kojih je MIK bio u opsegu od 325 do 5000 $\mu\text{g/mL}$. Visoka antimikrobna aktivnost uočena je kod metanolnog ekstrakta „anti-dijabetične“ biljne mešavine, koji je u koncentraciji od 150 $\mu\text{g/mL}$ inhibirao rast *A. baumannii* i *C. albicans*, kao i kod metanolnog ekstrakata *G. urbanum* i *P. vulgaris* koji su u istoj koncentraciji inhibirali *B. cereus* i *C. albicans*.

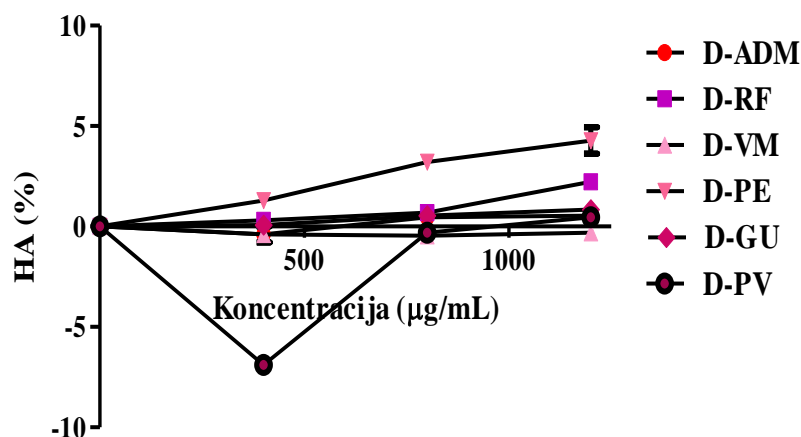
Tabela 5. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata.

Mikroorganizam	ATCC broj	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						Kontrola	
		M-ADM	M-VM	M-RF	M-PE	M-GU	M-PV	Ch ($\mu\text{g/mL}$)	Ns ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	6538	1250	5000	1250	310	625	5000	6.25	/
<i>S. epidermidis</i>	12228	5000	5000	625	1250	1250	2500	1.56	/
<i>B. cereus</i>	11778	1250	1250	310	310	150	5000	3.12	/
<i>S. enterica</i>	13076	5000	2500	1250	2500	310	5000	12.5	/
<i>P. aeruginosa</i>	9027	2500	2500	1250	2500	625	5000	12.5	/
<i>A. baumannii</i>	19606	150	1250	1250	310	2500	2500	25	/
<i>C. albicans</i>	24433	150	1250	5000	310	2500	150	2.34	2.5

4.3.3. Citotoksičnost i anticitotoksičnost ekstrakata

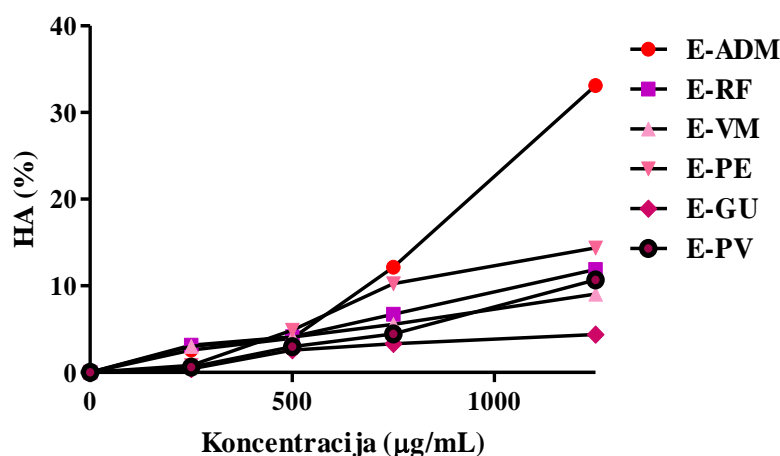
4.3.3.1. Citotoksičnost ekstrakata

Citotoksična, tj. hemolitička aktivnost dekokata, kao i etanolnih i metanolnih ekstrakata ispitivanog lekovitog bilja prikazana je na graficima 5, 6 i 7, gde je primećena koncentracijska zavisnost hemolitičke aktivnosti, dok povezanost između stepena hemolitičke aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola ($r = 0,39$; $p > 0,05$) i flavonoida ($r = 0,24$; $p > 0,25$) ispitivanih ekstrakata nije zapažena. Svi dekokti pokazali su izuzetno blagu citotoksičnost, tako da su čak i najviše ispitivane koncentracije (1250 $\mu\text{g/mL}$) izazvale manje od 5% hemolize crvenih krvnih zrnaca (grafik 5).



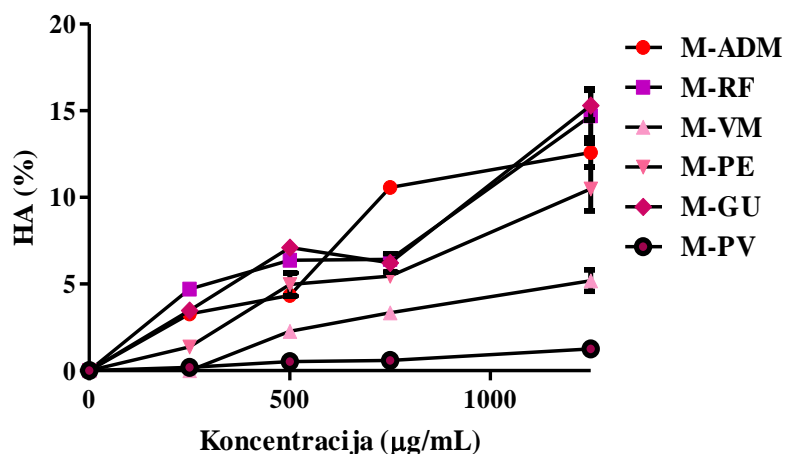
Grafik 5. Hemolitička aktivnost dekokata.

Nešto višu hemolitičku aktivnost od dekokata imali su etanolni ekstrakti ispitivanog bilja, koja je pri koncentraciji 1250 µg/mL iznosila: „anti-dijabetična“ biljna mešavina ($33,1 \pm 0,34\%$) > *P. erecta* ($14,39 \pm 0,67\%$) > *R. fruticosus* ($11,88 \pm 0,71\%$) > *P. vulgaris* ($10,68 \pm 0,34\%$) > *V. myrtillus* ($9,07 \pm 0,4\%$) > *G. urbanum* ($4,37 \pm 0,24\%$) (grafik 6).



Grafik 6. Hemolitička aktivnost etanolnih ekstrakata.

Na grafiku 7 prikazana je hemolitička aktivnost metanolnih ekstrakata testiranog lekovitog bilja. U odnosu na sve metanolne ekstrakte, najveću citotoksičnost imao je *G. urbanum*, a najmanju *P. vulgaris*, odnosno: *G. urbanum* ($15,31 \pm 0,87\%$) > *R. fruticosus* ($14,7 \pm 1,57\%$) > „anti-dijabetična“ biljna mešavina ($12,59 \pm 0,84\%$) > *P. erecta* ($10,49 \pm 1,27\%$) > *V. myrtillus* ($5,19 \pm 0,63\%$) > *P. vulgaris* ($1,26 \pm 0,09\%$).

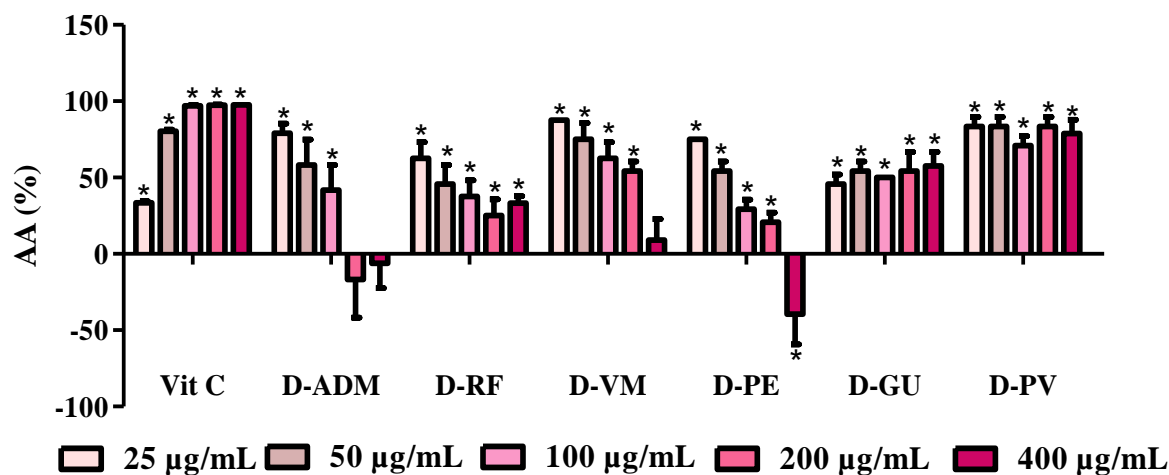


Grafik 7. Hemolitička aktivnost metanolnih ekstrakata.

4.3.3.2. Anticitotoksičnost ekstrakata

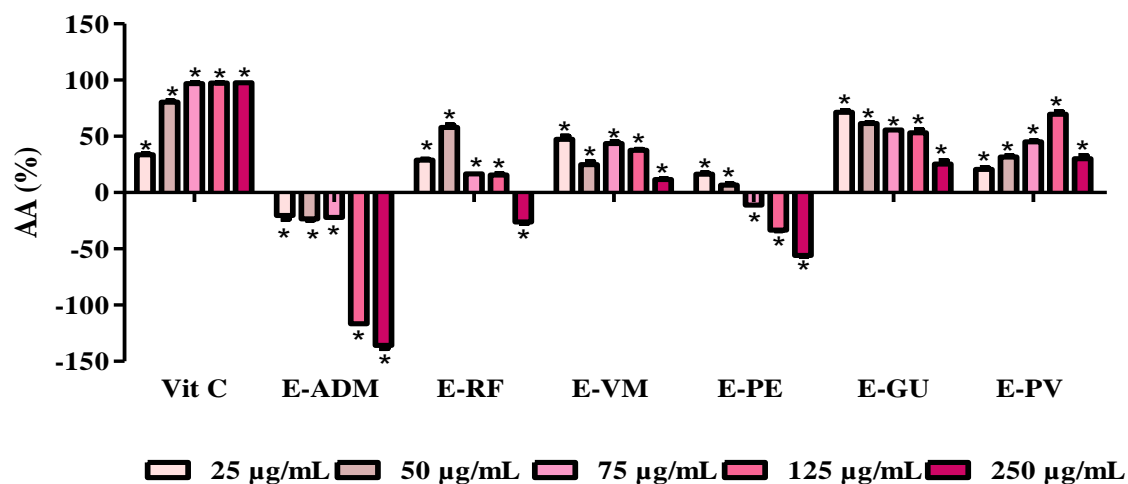
Na osnovu rezultata testa antihemolize, može se primetiti da je modulatoreni tretman niskim koncentracijama (25 i 50 µg/mL) svih testiranih ekstrakata štitio ćelije od citotoksičnog uticaja vodonik-peroksida (grafici 8, 9 i 10). Anticitotoksična, tj. antihemolitička aktivost nije bila koncentracijski zavisna, a pored toga bila je i negativno korelisana sa njihovim ukupnim sadržajem fenola ($r = -0,666$; $p < 0,01$) i flavonoida ($r = -0,7$; $p < 0,01$).

Antihemolitička aktivnost najniže testirane koncentracije svih dekokata (25 µg/mL) bila je značajno viša od citoprotektivne aktivnosti vitamina C, korišćenog kao standard ($p < 0,001$) (grafik 8). Kod testiranih ekstrakata, antihemolitička aktivnost (25 µg/mL) je bila sledeća: *V. myrtillus* ($87,5 \pm 0\%$) > *P. vulgaris* ($83,33 \pm 6,25\%$) > „anti-dijabetična“ biljna mešavina ($79,17 \pm 6,25\%$) > *P. erecta* ($75 \pm 5\%$) > *R. fruticosus* ($62,5 \pm 10,82\%$) > *G. urbanum* ($45,83 \pm 6,25\%$) > vitamin C ($33,52 \pm 0,94\%$).



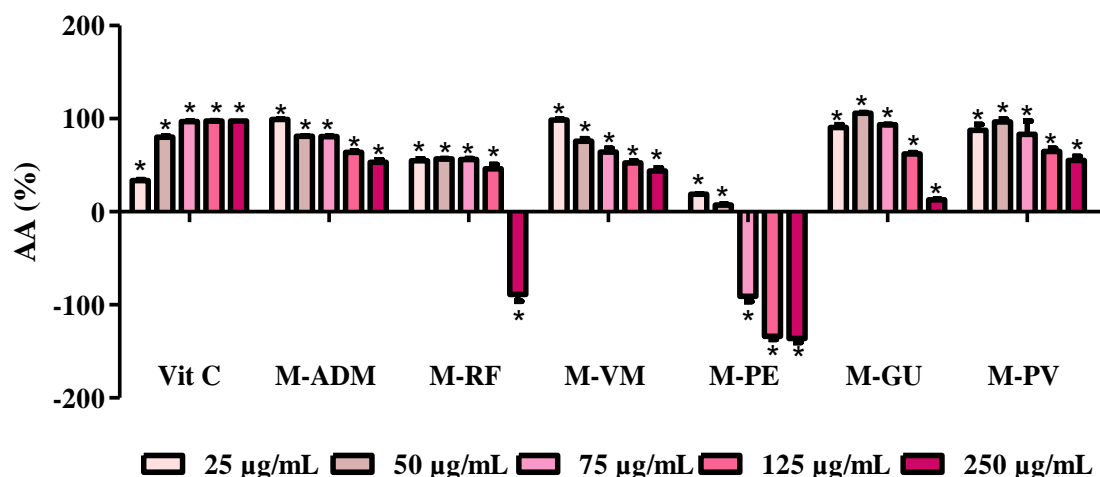
Grafik 8. Antihemolitička aktivnost dekokata. * $p < 0,05$ u odnosu na pozitivnu kontrolu.

Gotovo svi testirani etanolni ekstrakti su imali značajno nižu antihemolitičku aktivnost od vodenih ekstrakata (grafik 9). Jedini etanolni ekstrakt koji je pokazivao jaču citoprotektivnu aktivnost od vitamina C ($p < 0,001$), pri istim koncentracijama (25 µg/mL) bio je *G. urbanum* sa $71,37 \pm 1,47\%$ antihemolitičke aktivnosti.



Grafik 9. Antihemolitička aktivnost etanolnih ekstrakata. * $p < 0,05$ u odnosu na pozitivnu kontrolu.

Na grafiku 10 prikazana je antihemolitička aktivnost ispitivanih metanolnih ekstrakata. Može se primetiti da su svi testirani metanolni ekstrakti, osim *P. erecte*, u poređenju sa vitaminom C pokazali visoku citoprotektivnu aktivnost ($p < 0,001$). Najveću antihemolitičku aktivnost imali su ekstrakti „anti-dijabetične“ biljne mešavine ($99,08 \pm 0,29\%$) i lista kupine ($98,58 \pm 0,88\%$), u dozi od 25 µg/mL i 50 µg/mL ekstrakta nadzemnog dela zečje stope ($105,92 \pm 0,58\%$).

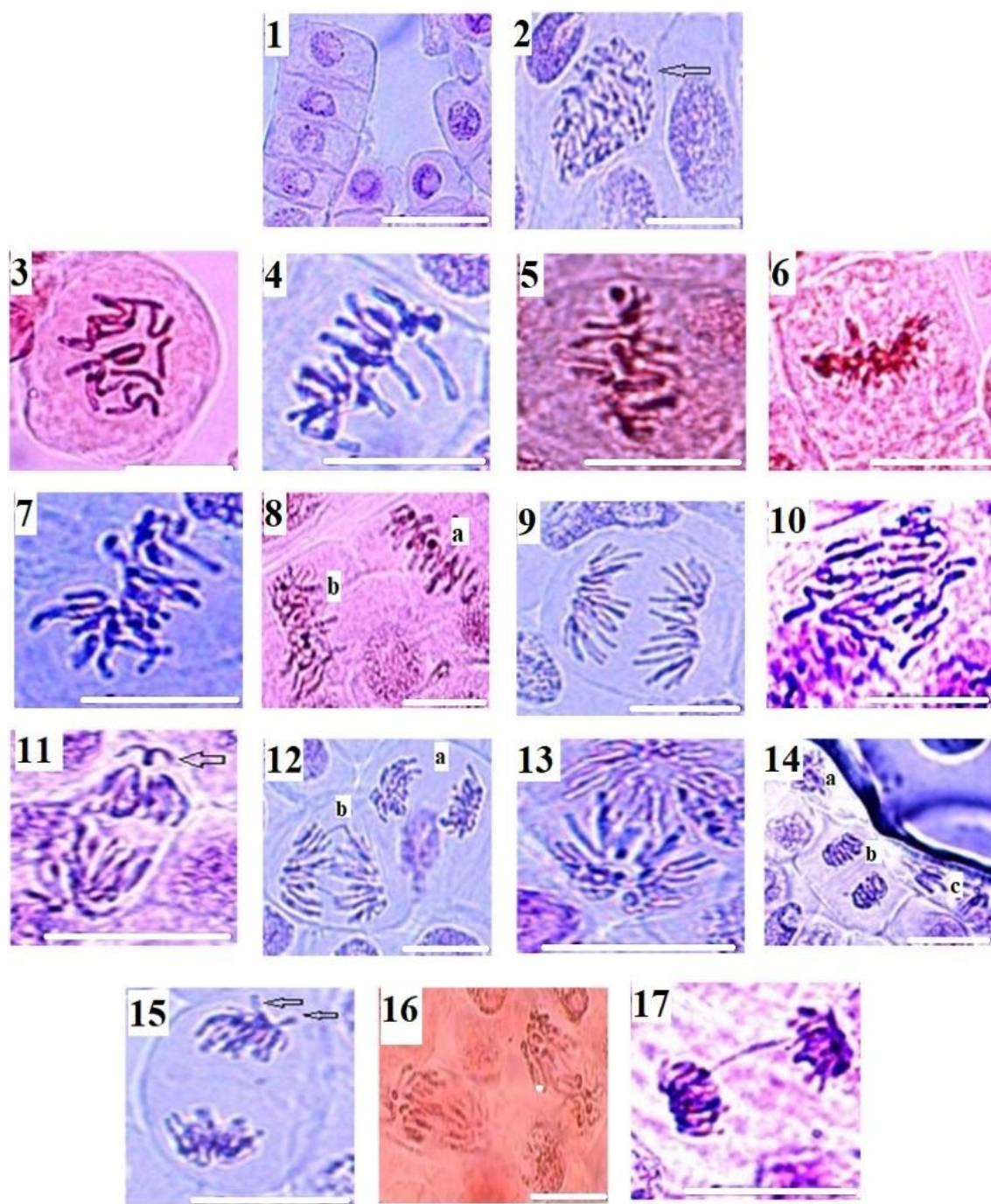


Grafik 10. Antihemolitička aktivnost metanolnih ekstrakata. * $p < 0,05$ u odnosu na pozitivnu kontrolu.

4.3.4. Genotoksičnost i antigenotoksičnost ekstrakata

Genotoksičnost i antigenotoksičnost dekokata „anti-dijabetične“ i njenih pojedinačnih sastojaka ispitana je *A. cepa* testom. Citogenetska analiza hromozoma meristemskih ćelija korenčića *A. cepa* tretiranih ispitivanim lekovitim biljem je ukazala na postojanje svih faza ćelijskog ciklusa, tj. uočene su ćelije sa normalnim kariotipom u interfazi (slika 9 (1)), profazi (slika 9 (2)), metafazi (slika 9 (4, 8a)), anafazi (slika 9 (9)) i telofazi (slika 9 (14b)).

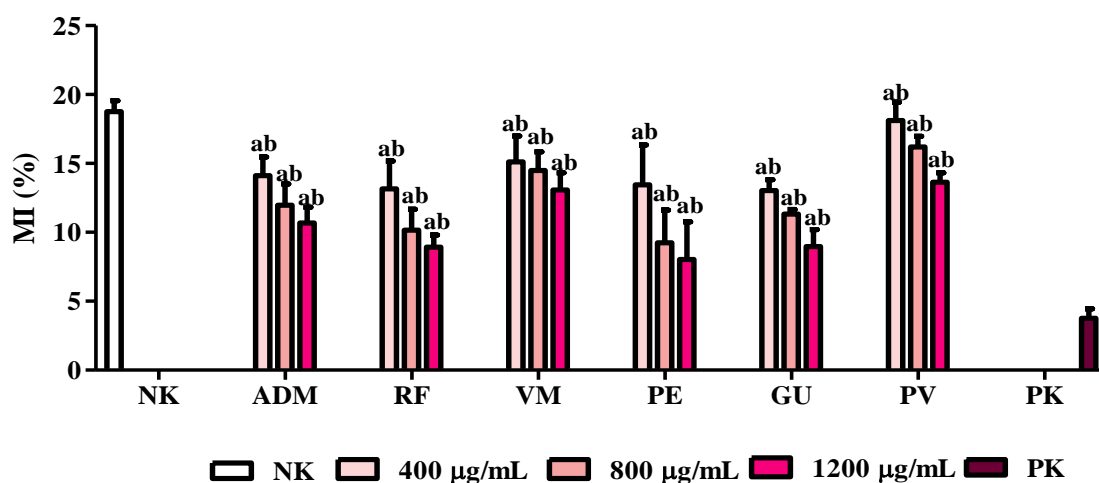
U zavisnosti tretmana, u meristemskih ćelijama je u svim fazama mitoze uočen i veći ili manji procenat ćelija sa aberantnim hromozomima. Najčešća hromozomska aberacija u profazi bila je c-mitoza (slika 9 (3)), dok je u drugim fazama uočen čitav spektar poremećaja naslednog materijala, poput: fragmentisanih hromozoma u metafazi (slika 9 (5)), lepljivih hromozoma u metafazi (slika 9 (6)), c-oblikovane metafaze (slika 9 (7)), vezane metafaze (slika 9 (14a)), rane anafaze (slika 9 (8b)), poremećaja deobnog vretena u anafazi (slika 9 (10)), lutajućeg hromozoma u anafazi (slika 9 (11)), fragmentisane telofaze (slika 9 (12a)), mosta u anafazi (slika 9 (12b)), zvezdaste anafaze (slika 9 (13)), poremećaja deobnog vretena u telofazi (slika 9 (14c)), fragmentisane telofaze sa zaostajućim hromozomom (slika 9 (15)), fragmentisane telofaze sa hromozomskim mostovima (slika 9 (16)), kao i hromozomskog mosta u telofazi (slika 9 (17)).



Slika 9. Analizirani citogenetski parametri u *A. cepa* testovima genotoksičnosti i antigenotoksičnosti. Skala 25 μm . Uvećanje 1000x.

4.3.4.1. Genotoksičnost ekstrakata

U studiji genotoksičnosti, najveći mitotski indeks uočen je u negativnoj kontroli ($18,76 \pm 0,79\%$), a najmanji u pozitivnoj kontroli ($3,76 \pm 0,68\%$), što je prikazano na grafiku 11. U poređenju sa negativnom kontrolom, svi testirani uzorci doveli su do koncentracijski zavisnog smanjenja mitotskog indeksa ($p < 0,05$). Tako, najveći pad mitotskog indeksa u meristemskim ćelijama uzrokovan je najvišim testiranim koncentracijama biljnih ekstrakata ($1200 \mu\text{g/mL}$), te je tako tretman ovom koncentracijom dekokta *P. vulgaris*, *V. myrtillus*, biljne mešavine, *R. fruticosus* i *P. erecta* smanjio mitotski indeks u odnosu na negativnu kontrolu u iznosu od 27,29%, 30,28%, 43,08%, 52,24%, 52,45% i 57,14%. Ipak, nijedan testirani ekstrakt nije doveo do smanjenja mitotskog indeksa uočenog u meristemskim ćelijama korenčića lukovica tretiranih toluenom ($p < 0,05$).



Grafik 11. MI nakon tretmana testiranim dekoktima u *A. cepa* testu genotoksičnosti. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

Kao što je prikazano u tabeli 6, u meristemskim ćelijama svih tretiranih lukovica uočeno je postojanje svih faza mitoze. Procenat ćelija u profazi bio je značajno povećan u pozitivnoj ($84,07 \pm 16,04\%$) u odnosu na negativnu kontrolu ($54,04 \pm 3,94\%$). Shodno tome, procenat ćelija u metafazi, anafazi i telofazi bio je značajno niži u pozitivnoj ($4,3 \pm 4,73\%$, $5,33 \pm 5,29\%$ i $6,3 \pm 11,23\%$) u odnosu na negativnu kontrolu ($22,17 \pm 3,39\%$, $13,59 \pm 2,58$ i $10,19 \pm 1,77\%$).

Nijedan testirani ekstrakt nije doveo do promene distribucije ovih faza u razmeri poput one uočenoj u pozitivnoj kontroli. Nasuprot tome, tretman svim testiranim ekstraktima smanjio je procenat ćelija u profazi a povećao procenat ćelija u ostalim fazama ćelijske deobe u odnosu na negativnu kontrolu (tabela 6).

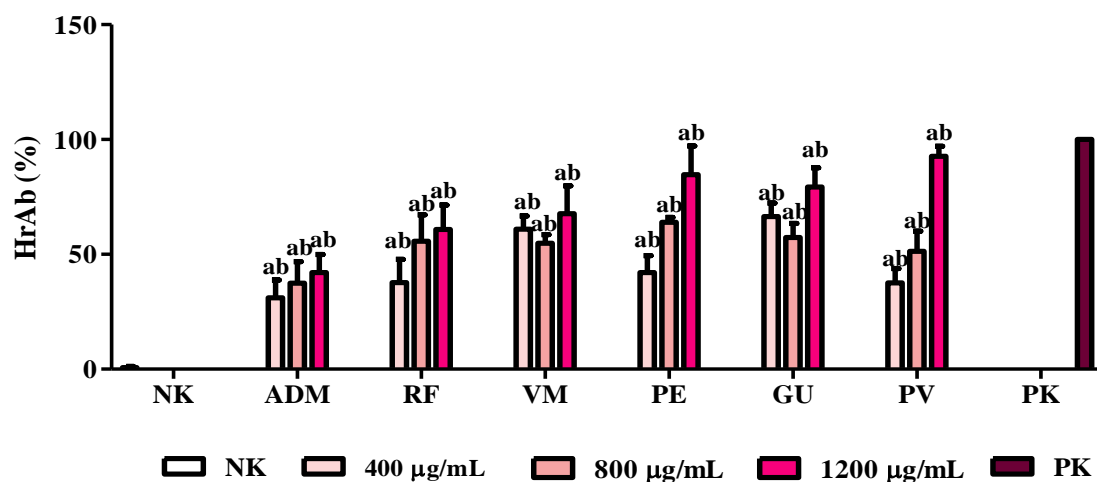
Tabela 6. FI nakon tretmana testiranim dekoktima u *A. cepa* testu genotoksičnosti

Tretman	FI (%)			
	P	M	A	T
NK	54,04 ± 3,94	22,17 ± 3,39	13,59 ± 2,58	10,19 ± 1,77
PK	84,07 ± 16,04	4,3 ± 4,73	5,33 ± 5,29	6,3 ± 11,23
ADM 400	42,75 ± 5,62 ^{ab}	25,99 ± 4,76 ^b	19,12 ± 3,65 ^{ab}	12,14 ± 1,29 ^a
ADM 800	42,23 ± 5,46 ^{ab}	24,18 ± 8,06 ^b	18,72 ± 6,59	14,86 ± 9,32
ADM 1200	45,7 ± 12,45 ^b	30,82 ± 9,91 ^{ab}	13,21 ± 4,31	10,72 ± 5,54
RF 400	53,74 ± 8,62 ^b	22,43 ± 6,37 ^b	15,25 ± 4,04 ^b	9,48 ± 5,83
RF 800	45,86 ± 5,58 ^b	30,89 ± 12,41 ^b	16,28 ± 2,39 ^b	11,93 ± 4,42
RF 1200	42,26 ± 7,11 ^{ab}	35,26 ± 2,8 ^{ab}	11,62 ± 1,08	10,86 ± 4,79
VM 400	58,57 ± 4,66 ^b	19,34 ± 3,17 ^b	12,88 ± 1,32 ^b	9,21 ± 3,66
VM 800	50,58 ± 4,16 ^b	21,27 ± 3,95 ^b	10,27 ± 3,62	17,87 ± 5,27
VM 1200	43,85 ± 11,13 ^b	25,53 ± 8,86 ^b	14,02 ± 1,82 ^b	16,6 ± 4,02
PE 400	47,99 ± 8,44 ^b	19,92 ± 9,76 ^b	18,1 ± 2,37 ^{ab}	11,53 ± 3,71
PE 800	43,48 ± 6,53 ^b	23,59 ± 4,57 ^b	17,05 ± 1,62 ^b	15,87 ± 5,06
PE 1200	41,01 ± 8,01 ^{ab}	26,28 ± 5,06 ^b	20,99 ± 6,43 ^{ab}	11,72 ± 8,68
GU 400	48,76 ± 2,85 ^b	25,44 ± 0,65 ^b	14,17 ± 2,68 ^b	11,63 ± 2,68
GU 800	46,76 ± 5,44 ^b	21,13 ± 2,98 ^b	10,91 ± 2,42 ^b	21,19 ± 2,28 ^a
GU 1200	35,01 ± 4,81 ^{ab}	26,95 ± 4,64 ^b	23,13 ± 8,37 ^{ab}	14,71 ± 2,82
PV 400	49,42 ± 10 ^b	20,33 ± 4,78 ^b	10,43 ± 3,26 ^b	12,68 ± 4,24
PV 800	50,49 ± 5,72 ^b	23,59 ± 5,16 ^b	12,39 ± 1,27 ^b	15,09 ± 4,99
PV 1200	48,21 ± 5,86 ^b	26,31 ± 2,78 ^b	13,45 ± 2,07 ^b	12,02 ± 3,21

^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

Istovremeno sa smanjenjem mitotskog indeksa, svi testirani ekstrakti izazvali su koncentracijski zavisno povećanje broja hromozomskih aberacija u odnosu na negativnu kontrolu (grafik 12). Kao što je i bilo očekivano, najniži procenat hromozomskih aberacija uočen je u negativnoj kontroli ($0,63 \pm 0,58\%$), dok su oštećenja genetskog materijala bila prisutna u svim meristemskim ćelijama pozitivne kontrole ($100 \pm 0\%$). Najviša testirana

koncentracija (1200 $\mu\text{g/mL}$) ekstrakta „anti-dijabetične“ biljne mešavine indukovala je aberacije u $42,01 \pm 7,98\%$, *R. fruticosus* u $60,81 \pm 10,58\%$, *V. myrtillus* u $67,67 \pm 12,15\%$, *G. urbanum* u $79,26 \pm 8,44\%$, *P. erecta* u $84,64 \pm 12,53\%$, a *P. vulgaris* u $92,67 \pm 4,37\%$ meristemskih ćelija (grafik 12). Najčešće hromozomske aberacije bile su c-mitoza (slika 9 (3)), fragmenisani hromozomi (slika 9 (5, 12a, 16)), lepljivi i vezani hromozomi (slika 9 (6)), zaostajući i lutajući hromozomi (slika 9 (11, 15)) i hromozomski mostovi (slika 9 (12b, 17)).



Grafik 12. HrAb nakon tretmana testiranim dekottima u *A. cepa* testu genotoksičnosti. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

Pojava aberantnih hromozoma uočena je u svim fazama ćelijske deobe, što se može videti iz tabele 7. Procenat ćelija sa hromozomskim aberacijama u profazi bio je najveći u pozitivnoj ($84,07 \pm 16,04\%$), a najmanji u negativnoj kontroli ($0,21 \pm 0,46\%$). Najbrojnije hromozomske aberacije u profazi pozitivne kontrole bile su fragmentisani hromozomi. Tretman biljnim ekstraktima nije indukovao fragmentisane hromozome u profazi, već samo c-mitose (slika 9 (3)). Svi testirani ekstrakti lekovitog bilja, osim ekstrakta lista borovnice, izazvali su koncentracijski-zavisnu akumulaciju aberacija u profazi, dok je dekott borovnice prouzrokovao znatno manji broj c-mitose, a znatno veći broj aberacija u metafazi, anafazi i telofazi (tabela 7).

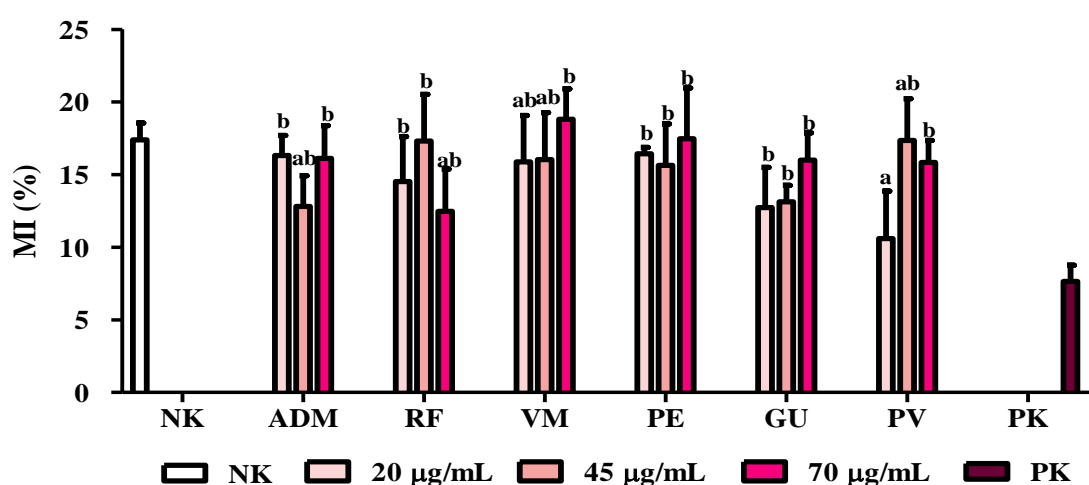
Tabela 7. AFI nakon tretmana testiranim dekoktima u *A. cepa* testu genotoksičnosti.

Tretman	AFI (%)			
	P	M	A	T
NK	0,21 ± 0,46	0 ± 0	0,43 ± 0,58	0 ± 0
PK	84,07 ± 16,04	4,3 ± 4,73	5,33 ± 5,29	3,32 ± 7,4
ADM 400	8,99 ± 2,05 ^{ab}	9,16 ± 3,11 ^a	8,51 ± 3,98 ^a	4,4 ± 3,53 ^a
ADM 800	11,2 ± 2,26 ^{ab}	9,86 ± 4,16 ^a	10,53 ± 2,37 ^a	5,86 ± 6,46
ADM 1200	15,14 ± 9,32 ^{ab}	13,79 ± 6,41 ^{ab}	8,65 ± 4,21 ^a	4,42 ± 3,58
RF 400	13,65 ± 7,13 ^{ab}	12,29 ± 2,27 ^a	7,61 ± 5,23 ^a	4,4 ± 2,49 ^a
RF 800	18,42 ± 7,91 ^{ab}	13,49 ± 5,39 ^{ab}	14,24 ± 2,29 ^{ab}	9,38 ± 3,92 ^a
RF 1200	21,18 ± 2,67 ^{ab}	21,02 ± 6,24 ^{ab}	10,79 ± 1,72 ^a	8,68 ± 4,17 ^a
VM 400	25,84 ± 6,17 ^{ab}	15,02 ± 1,68 ^{ab}	11,31 ± 1,56 ^{ab}	8,61 ± 3,32 ^a
VM 800	20,48 ± 1,49 ^{ab}	13,38 ± 2,37 ^{ab}	11,43 ± 2,76 ^a	10,81 ± 4,09 ^a
VM 1200	19,69 ± 3,6 ^{ab}	20,6 ± 9,09 ^{ab}	14,04 ± 4,28 ^a	15,12 ± 4,31 ^{ab}
PE 400	12,72 ± 6,76 ^{ab}	12,66 ± 6,61 ^{ab}	11,88 ± 2,1 ^a	5,01 ± 2,15 ^a
PE 800	20,33 ± 2,2 ^{ab}	17,48 ± 1,47 ^{ab}	15,19 ± 4,61 ^a	10,91 ± 2,62 ^a
PE 1200	34,02 ± 12,68 ^{ab}	21,68 ± 6,29 ^{ab}	19,46 ± 5,74 ^{ab}	9,47 ± 5,74 ^a
GU 400	24,52 ± 9,28 ^{ab}	19,04 ± 1,75 ^{ab}	15,52 ± 6,49 ^{ab}	7,09 ± 2,59 ^a
GU 800	17,12 ± 7,34 ^{ab}	14,46 ± 1,63 ^{ab}	9,87 ± 1,91 ^a	15,89 ± 2,32 ^{ab}
GU 1200	25,09 ± 4,24 ^{ab}	21,26 ± 3,76 ^{ab}	21,64 ± 8,63 ^{ab}	11,26 ± 4,03 ^a
PV 400	10,99 ± 2,3 ^{ab}	10,2 ± 3,02 ^a	8,09 ± 1,6 ^a	6,95 ± 3,38 ^a
PV 800	12,24 ± 4,62 ^{ab}	17,5 ± 2,79 ^{ab}	9,65 ± 2,78 ^a	11,92 ± 4,49 ^a
PV 1200	44,41 ± 6,97 ^{ab}	24,25 ± 3,41 ^{ab}	12,58 ± 2,23 ^a	11,14 ± 2,67 ^{ab}

^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

4.3.4.2. Antigenotoksičnost ekstrakata

Slično rezultatima dobijenim u testu genotoksičnosti, i u studiji potencijalne antigenotoksičnosti dekokata ispitivanog lekovitog bilja najviši mitotski indeks zabeležen je u meristemskim ćelijama negativne ($17,4 \pm 1,16\%$), a najniži u meristemskim ćelijama pozitivne kontrolne grupe organizama ($7,64 \pm 1,12\%$). Modulatorni tretmani svim testiranim ekstraktima, izuzev ekstrakta pasuljevine u koncentraciji od $20 \mu\text{g/mL}$, doveli su do značajnog povećanja ($p < 0,05$) mitotskog indeksa u odnosu na pozitivnu kontrolu (grafik 13).



Grafik 13. MI nakon tretmana testiranim dekoktima u *A. cepa* testu antigenotoksičnosti. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

Nasuprot rezultata studije genotoksičnosti, gde je toluen, korišćen kao pozitivna kontrola doveo do nagomilavanja ćelija u profazi, u testu genotoksičnosti nisu primećene značajne promene u normalnoj distribuciji faznog indeksa, kako nakon tretmana vodonik-peroksidom, tako ni nakon modulatornog tretmana ekstraktima ispitivanog lekovitog bilja, što se može videti u tabeli 8.

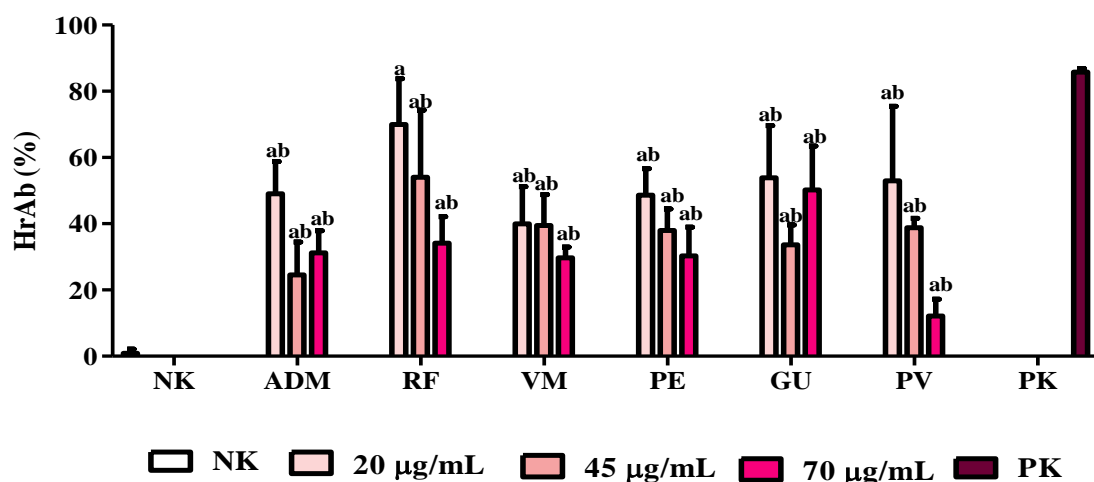
Tabela 8. FI nakon tretmana testiranim dekottima u *A. cepa* testu antigenotoksičnosti

Tretman	FI (%)			
	P	M	A	T
NK	46,05 ± 1,88	24,23 ± 2,96	13,27 ± 2,9	16,44 ± 4,17
PK	53,72 ± 20,14	15,52 ± 6,92	16,72 ± 10,56	14,02 ± 8,72
ADM 20	52,81 ± 3,21 ^a	20,56 ± 1,66	9,27 ± 2,07	16,53 ± 4,83
ADM 45	53,89 ± 4,91 ^a	19,85 ± 4,42 ^a	10,82 ± 5,18	15,44 ± 6,14
ADM 70	55,6 ± 7,25 ^a	21,25 ± 7,59	10,14 ± 6,83	13,01 ± 6,06
RF 20	44,34 ± 6,8	28,36 ± 4,95	14,26 ± 1,67	13,04 ± 2,2
RF 45	46,88 ± 5,25	22,52 ± 3,91	16,98 ± 4,11	13,62 ± 2,48
RF 70	60,25 ± 10,7 ^a	18,17 ± 1,5 ^a	10,55 ± 5,2	11,02 ± 6,38
VM 20	41,96 ± 4,01 ^a	24,16 ± 5,28	14,41 ± 7,45	15,19 ± 6,19
VM 45	47,96 ± 10,59	23,06 ± 9,4	14,64 ± 7,63	15,01 ± 6,06
VM 70	55,02 ± 5,09 ^a	18,32 ± 3,89	15,91 ± 3	10,74 ± 4,03
PE 20	58,07 ± 17,42	21,28 ± 8,19	7,54 ± 4,48 ^a	13,11 ± 6,76
PE 45	48,65 ± 10,72 ^a	20,77 ± 6,63	11,9 ± 4,7	18,68 ± 3,14
PE 70	55,97 ± 11,86	21,04 ± 5,48	10,13 ± 6,23	12,86 ± 6,38
GU 20	50,52 ± 9,21	31,66 ± 8,48 ^b	10,78 ± 5,89	7,04 ± 4,83 ^a
GU 45	52,42 ± 4,37	20,23 ± 5,4	15 ± 4,06	12,35 ± 6,1
GU 70	57,36 ± 13,98	25,84 ± 7,18	10,35 ± 6,88	13,2 ± 4,89
PV 20	51,12 ± 14,31	21,21 ± 8,08	13,42 ± 2,66	14,26 ± 4,7
PV 45	46,08 ± 5,54	24,88 ± 8,68	12,63 ± 2,2	16,41 ± 4,6
PV 70	49,33 ± 8,95	25,73 ± 5,03	10,13 ± 8,42	14,81 ± 5,5

^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

Za razliku od studije genotoksičnosti, gde je citotoksični i genotoksični potencijal ispitivanih ekstrakata bio direktno koncentracijski-zavisan, studija antigenotoksičnosti pokazala je da antigenotoksični potencijal ispitivanih ekstrakata ne pokazuje ovaj efekat. Tako, modulatorni tretman najnižim koncentracijama (20 µg/mL) niti jedne testirane lekovite biljke nije doveo do značajnog sniženja broja meristemskih ćelija sa hromozomskim aberacijama izazvanih vodonik-peroksidom. Više testirane doze sanirale su ove promene naslednog materijala, te su ekstrakti biljne mešavine i zečje stope svoj maksimalni potencijal imale pri primeni srednje testirane doze (45 µg/mL), dok su tretmani ekstraktima kupine, borovnice, žute stope i pasuljevine pokazali negativnu povezanost doze i efekta, odnosno, najviše testirane

doze (70 $\mu\text{g/mL}$) imale su najblagotvorniji efekat na sanaciju hromozomskih aberacija izazvanih ROS-om, što se može videti na grafiku 14.



Grafik 14. HrAb nakon tretmana testiranim dekoktima u *A. cepa* testu antigenotoksičnosti. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

Nasuprot rezultata dobijenih u studiji genotoksičnosti, u kome je toluen, korišćen kao pozitivna kontrola, indukcijom velikog broja fragmentisanih hromozoma u samoj profazi gotovo u potpunosti doveo do zaustavljanja ćelijske deobe (tabela 7), tretman vodonik-peroksidom je indukovao hromozomske aberacije u svim fazama ćelijskog ciklusa. Tako, u pozitivnoj kontroli je zabeleženo $45,59 \pm 10,93\%$ ćelija sa hromozomskim aberacijama u profazi, $14,97 \pm 4,29\%$ u metafazi, $15,24 \pm 9,73\%$ u anafazi i $9,83 \pm 6,31\%$ u telofazi, dok je u negativnoj kontroli zabeležen veoma mali broj ćelija sa aberantnim hromozomima (tabela 9).

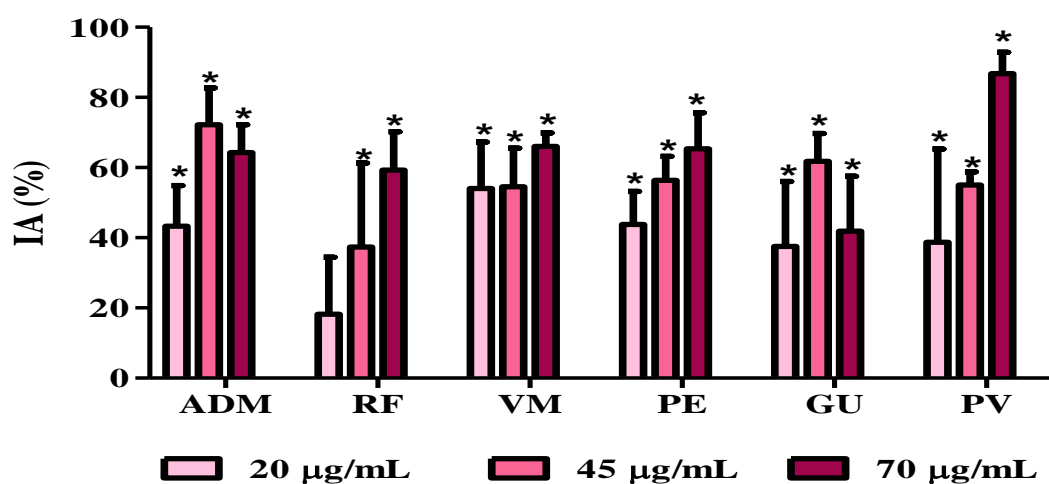
U odnosu na pozitivnu kontrolu, svi testirani ekstrakti, osim dekokta žute steže, primenjene u najnižoj testiranoj koncentraciji (20 $\mu\text{g/mL}$), značajno su smanjili su procenat ćelija sa hromozomskim aberacijama u profazi ćelijskog ciklusa, dok je modulatorni tretman dekoktima „anti-dijabetične“ biljne mešavine (45 i 70 $\mu\text{g/mL}$) i pasuljevine (70 $\mu\text{g/mL}$) izvršio uspešnu reverziju aberantnih hromozoma i u ostalim fazama mitotskog ciklusa, kao što je prikazano u tabeli 9.

Tabela 9. AFI nakon tretmana testiranim dekoktima u *A. cepa* testu antigenotoksičnosti.

Tretman	AFI (%)			
	P	M	A	T
NK	0,45 ± 0,61	0 ± 0	0,24 ± 0,54	0 ± 0
PK	45,59 ± 10,93	14,97 ± 4,29	15,24 ± 9,73	9,83 ± 6,31
ADM 20	15,21 ± 1,45 ^{ab}	15,21 ± 1,45 ^a	6,5 ± 3,59 ^a	9,04 ± 2,09 ^a
ADM 45	8,35 ± 4,89 ^{ab}	6,85 ± 3,58 ^{ab}	7,07 ± 1,55 ^a	2,24 ± 2,77
ADM 70	14,07 ± 2,84 ^{ab}	8,33 ± 5,2 ^a	4,99 ± 3,28 ^{ab}	2,68 ± 1,85 ^{ab}
RF 20	26,38 ± 9,58 ^{ab}	24,18 ± 5,06 ^a	17,5 ± 10,32 ^a	9,99 ± 2,68 ^a
RF 45	16,89 ± 11,56 ^{ab}	16,25 ± 7,14 ^a	12,05 ± 4,11 ^{ab}	12,05 ± 4,11 ^a
RF 70	19,34 ± 4,52 ^{ab}	7,27 ± 2,12 ^a	5,12 ± 3,28 ^a	3,61 ± 1,6 ^a
VM 20	10,15 ± 3,96 ^{ab}	11,94 ± 3,58 ^a	11,27 ± 6,41 ^a	11,27 ± 6,41
VM 45	14,27 ± 3,49 ^{ab}	9,87 ± 6,72 ^a	9,31 ± 6,52 ^a	9,31 ± 6,52 ^a
VM 70	14,29 ± 4,16 ^{ab}	6,71 ± 2,45 ^{ab}	5,45 ± 3,14 ^a	3,23 ± 2,7
PE 20	19,1 ± 19,4	14,98 ± 6,34 ^a	6,34 ± 4,28 ^a	7,91 ± 4 ^a
PE 45	8,91 ± 4,24 ^{ab}	12,84 ± 1,93 ^a	8,08 ± 3,12 ^a	8,92 ± 1,91 ^a
PE 70	14,17 ± 8,01 ^{ab}	8,81 ± 2,77 ^{ab}	4,23 ± 2,04 ^a	3,05 ± 1,29 ^a
GU 20	18,29 ± 11,96 ^{ab}	22,33 ± 8,04	8,91 ± 5,39 ^a	6,87 ± 3,7 ^a
GU 45	15,63 ± 4,66 ^{ab}	6,59 ± 3,3 ^{ab}	8,33 ± 1,12 ^a	3,09 ± 1,52 ^{ab}
GU 70	16,88 ± 7,59 ^{ab}	18,33 ± 9,4 ^a	8,47 ± 6,2 ^a	8,63 ± 5,42
PV 20	15,38 ± 7,04 ^{ab}	12,96 ± 6,52	10,98 ± 7,82 ^a	9,94 ± 5,42 ^a
PV 45	10,85 ± 4,51 ^{ab}	14,42 ± 5,32 ^a	7,19 ± 1,83 ^a	6,32 ± 2,36 ^a
PV 70	5,87 ± 5,89 ^b	3,84 ± 1,41 ^{ab}	4,63 ± 3,32 ^{ab}	0,28 ± 0,61 ^b

^a $p < 0,05$ u poređenju sa negativnom kontrolom. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa pozitivnom kontrolom.

Na grafiku 15 prikazan je antigenotoksični kapacitet ispitivanih ekstrakata, odnosno inhibitorna aktivnost prema nastanku hromozomskih aberacija indukovanih vodonik-peroksidom. Može se primetiti da su svi ekstrakti u svim testiranim koncentracijama, izuzev najniže testirane koncentracije dekokta lista kupine, imali visoku antimutagenu aktivnost. Najveću antimutagenu aktivnost, tj. najviši potencijal reverzije već postojećih hromozomskih aberacija, pokazali su modulatorni tretmani sledećim testiranim koncentracijama testiranih ekstrakata: 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pasuljevine ($86,81 \pm 6,05\%$), 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biljne mešavine ($72,18 \pm 10,52\%$), 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ borovnice ($66,08 \pm 3,83\%$), 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ žute steže ($65,39 \pm 10,23\%$), 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zečije stope ($61,81 \pm 7,86\%$) i 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kupine ($59,31 \pm 10,87\%$).



Grafik 15. IA testiranih dekokata.* $p < 0,05$ u odnosu na pozitivnu kontrolu.

4.4. In vivo studija

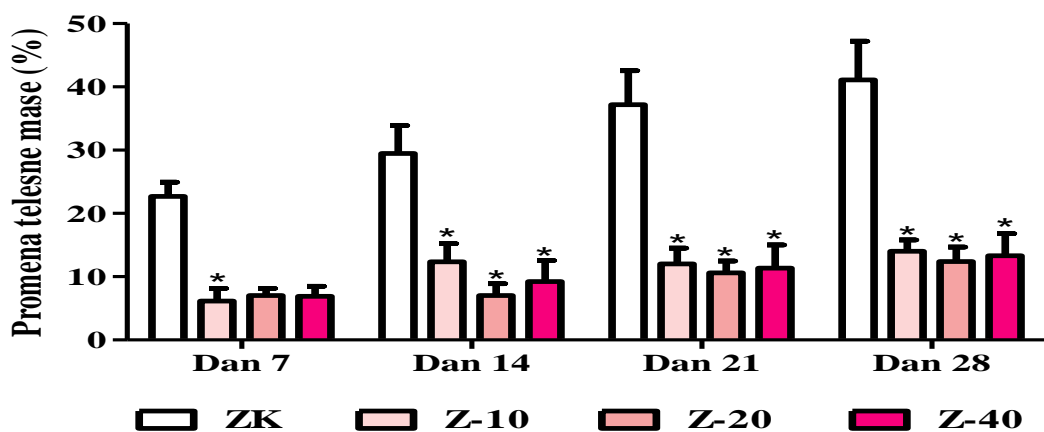
4.4.1. Akutna oralna toksičnost biljne mešavine

U studiji akutne oralne toksičnosti jedna od pet životinja tretiranih najvećom koncentracijom dekokta „anti-dijabetične“ biljne mešavine (80 g/kg) imala je blagu dijareju prvih 24 h nakon administracije ekstrakta. Osim ovog slučaja, nije primećen niti jedan simptom trovanja izazvan akutnim tretmanom biljne mešavine.

4.4.2. Sub-hronična oralna toksičnost biljne mešavine

4.4.2.1. Uticaj biljne mešavine na telesnu masu i nivo šećera u krvi zdravih životinja

Na grafiku 16 prikazan je procenat promene telesne mase eksperimentalnih grupa životinja 7, 14, 21 i 28 dana nakon početka tretmana u odnosu na nulti dan eksperimenta. Može se primetiti da su sve testirane koncentracije „anti-dijabetične“ biljne mešavine značajno umanjile procenat dobijanja telesne mase u odnosu na onu zabeleženu u netretiranoj grupi zdravih životinja. Tako je na kraju eksperimenta procenat dobijanja telesne mase u zdravoj kontrolnoj grupi bio $39,1 \pm 16,45\%$, u Z-10 grupi $14,03 \pm 3,99\%$, u Z-20 grupi $12,41 \pm 5,1\%$, a u Z-40 grupi $13,3 \pm 7,8\%$, u odnosu na nulti dan eksperimenta (grafik 16).



Grafik 16. Procenat promene telesne mase zdravih tretiranih životinja. * $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

Iako je uticao na težinu životinja, tretman biljnom mešavinom nije doveo do promena glikemijskih vrednosti tokom prve tri nedelje eksperimenta. Međutim, u četvrtoj nedelji, na dan 28 eksperimenta, došlo je do sniženja nivoa glukoze u krvi kod svih tretiranih životinja ($4,62 \pm 0,62$ mmol/L, $4,78 \pm 0,28$ mmol/L i $4,7 \pm 0,57$ mmol/L u Z-10, Z-20 i Z-40 eksperimentalnim grupama, redom) u odnosu na kontrolnu grupu zdravih životinja ($6,36 \pm 1,09$ mmol/L), kao što je prikazano u tabeli 10.

Tabela 10. Nivo šećera u krvi zdravih tretiranih životinja.

Eksperimentalne grupe	Nivo šećera u krvi (mmol/L)				
	Dan 0	Dan 7	Dan 14	Dan 21	Dan 28
ZK	5,88 ± 0,5	5,86 ± 0,59	5,78 ± 0,37	5,58 ± 0,55	6,36 ± 1,09
Z-10	5,26 ± 0,65	5,46 ± 0,94	5,16 ± 0,58	4,94 ± 0,43	4,62 ± 0,62 *
Z-20	5,6 ± 0,61	5,8 ± 0,66	5,4 ± 0,66	5,26 ± 0,76	4,78 ± 0,28 *
Z-40	5,24 ± 0,3	4,94 ± 0,52	5,04 ± 0,72	5,06 ± 0,58	4,7 ± 0,57 *

* $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

4.4.2.2. Uticaj biljne mešavine na lipidni status zdravih životinja

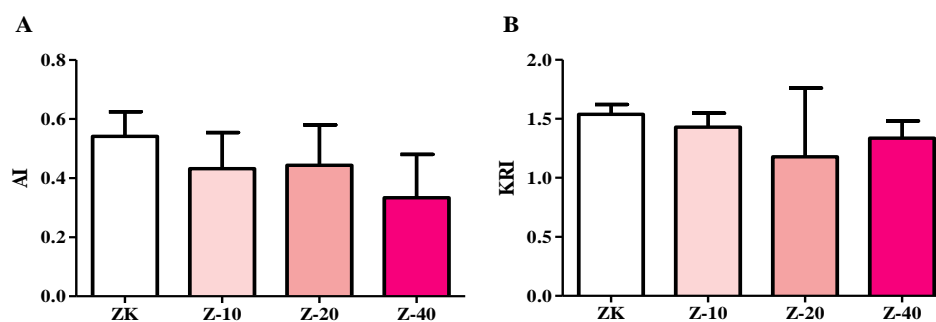
Kao što je prikazano u tabeli 11, analiza lipidnog statusa zdravih životinja tretiranih „anti-dijabetičnom“ biljnom mešavinom pokazala je da biljna mešavina poseduje koncentracijski-zavisian hipolipidemijski efekat, u smislu izvesnog smanjenja nivoa triglicerida i VLDL-a, kao i povećanja HDL-a uočenih kod tretiranih životinja u odnosu na netretirane zdrave životinje. Tako, tretman biljnom mešavinom je statistički značajno ($p < 0,05$) snizio nivo triglicerida ($1,35 \pm 0,12$ mmol/L, $1,15 \pm 0,08$ mmol/L, $0,86 \pm 0,12$ mmol/L i $0,62 \pm 0,1$ mmol/L u ZK, Z-10, Z-20 i Z-40 eksperimentalnim grupama, redom) i VLDL-a ($0,27 \pm 0,02$ mmol/L, $0,23 \pm 0,02$ mmol/L, $0,17 \pm 0,02$ mmol/L i $0,12 \pm 0,02$ mmol/L u ZK, Z-10, Z-20 i Z-40 eksperimentalnim grupama, redom). Takođe, primećen je trend povećanja nivoa HDL-a ($0,84 \pm 0,08$ mmol/L, $0,85 \pm 0,06$ mmol/L i $0,92 \pm 0,09$ mmol/L u Z-10, Z-20 i Z-40, redom), kao i nivoa ukupnog holesterola tretiranih životinja ($1,19 \pm 0,02$ mmol/L, $1,19 \pm 0,02$ mmol/L i $1,22 \pm 0,02$ mmol/L u Z-10, Z-20 i Z-40 eksperimentalnim grupama, respektivno) u odnosu na netretirane zdrave životinje ($0,75 \pm 0,03$ i $1,16 \pm 0,03$ mmol/L, redom). Tretman biljnom mešavinom nije imao uticaj na nivo LDL-a (tabela 11).

Tabela 11. Lipidni status zdravih tretiranih životinja.

Eksperimentalne grupe	Ukupni holesterol (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)	VLDL (mmol/L)
ZK	1,16 ± 0,03	0,75 ± 0,03	0,14 ± 0,04	1,35 ± 0,12	0,27 ± 0,02
Z-10	1,19 ± 0,02	0,84 ± 0,08	0,13 ± 0,07	1,15 ± 0,08 *	0,23 ± 0,02 *
Z-20	1,19 ± 0,02	0,85 ± 0,06	0,17 ± 0,09	0,86 ± 0,12 *	0,17 ± 0,02 *
Z-40	1,22 ± 0,02 *	0,92 ± 0,09 *	0,18 ± 0,11	0,62 ± 0,1 *	0,12 ± 0,02 *

* $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

Osim toga, terapija biljnom mešavinom dovela je i do blagog smanjivanja kako aterogenog ($0,54 \pm 0,08$ u ZK, $0,43 \pm 0,12$ u Z-10, $0,44 \pm 0,14$ u Z-20 i $0,33 \pm 0,14$ u Z-40) tako i kardiovaskularnog indeksa ($1,54 \pm 0,08$ u ZK, $1,43 \pm 0,12$ u Z-10, $1,18 \pm 0,58$ u Z-20 i $1,14 \pm 0,15$ u Z-40) tretiranih životinja, međutim, nije uočena statistička značajnost (grafik 17).

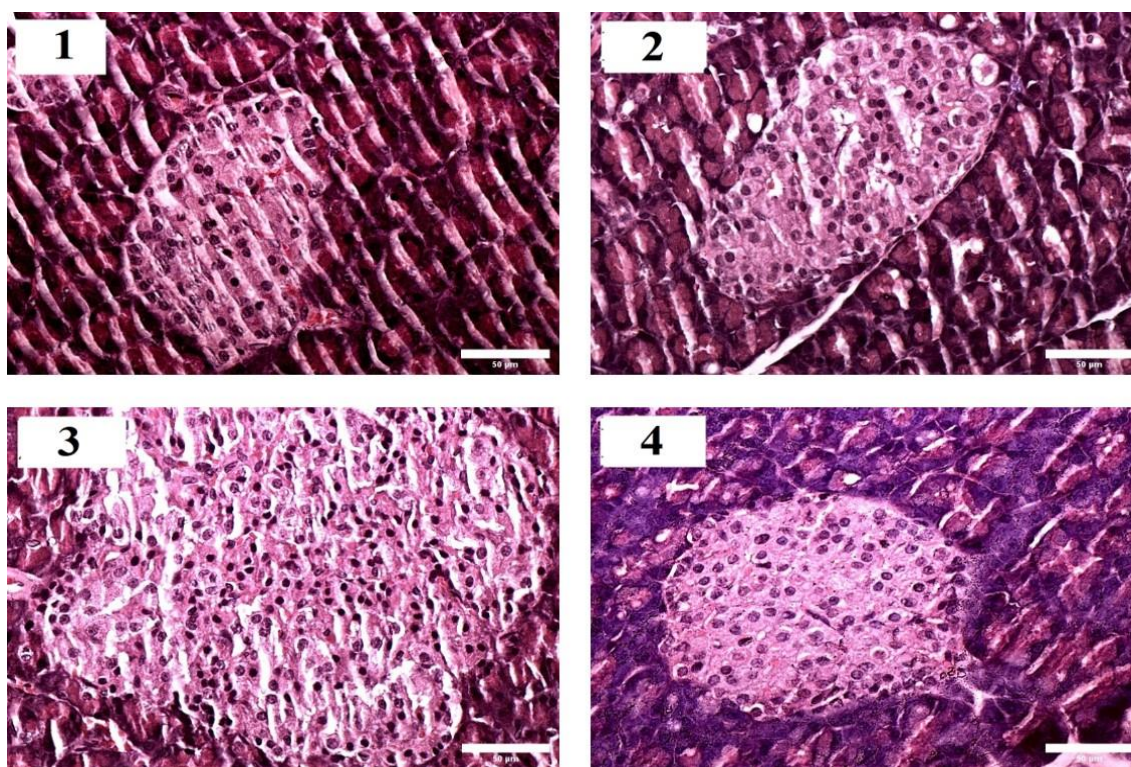


Grafik 17. AI (A) i KRI (B) indeks zdravih tretiranih životinja

4.4.2.3. Uticaj biljne mešavine na tkivo pankreasa zdravih životinja

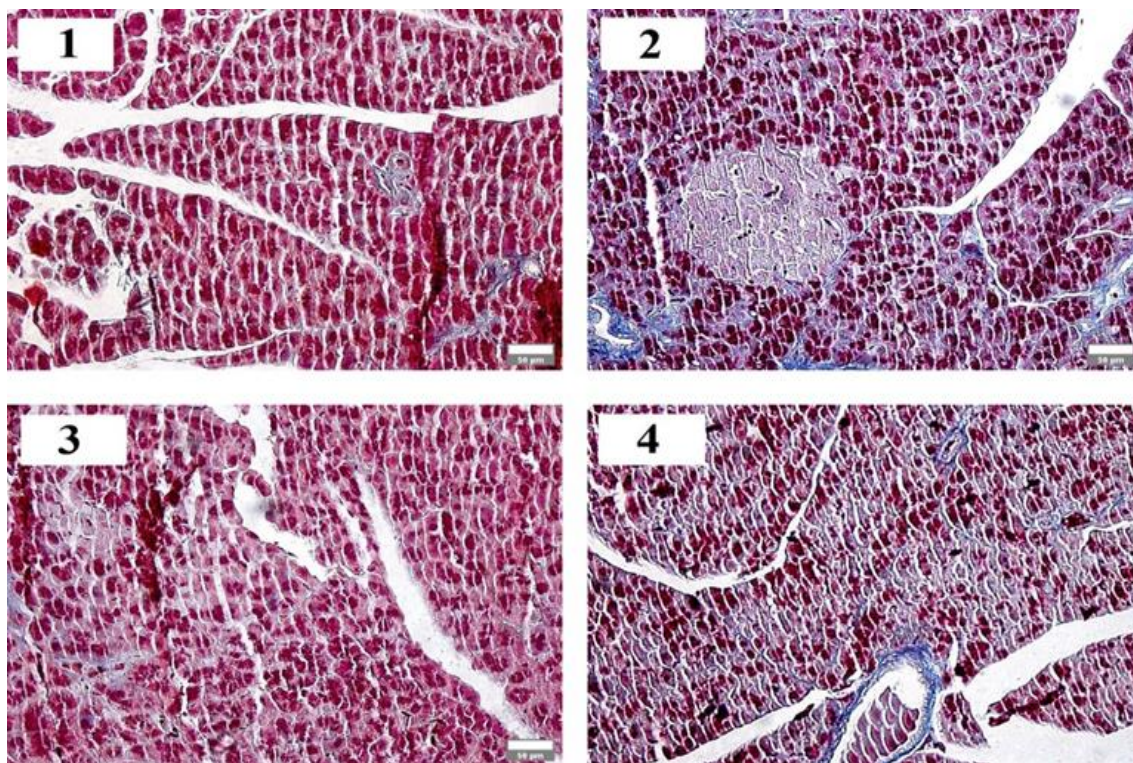
Dejstvo biljne mešavine na pankreas tretiranih životinja analiziran je na histološkim preparatima obojenim hematoksilinom i eozinom (slika 10) i Mason-trihromnom metodom (slika 11).

Na slici 10 (1) prikazana je normalna morfološka struktura pankreasa zdrave kontrolne grupe životinja. U centru preparata se može videti endokrini deo pankreasa, tj. Langerhansovo ostrvce, u kome je citoplazma ćelija ostrvca obojena svetlo roze a jedra tamno ljubičasto, dok se na periferiji preparata mogu uočiti tamno obojene acinusne ćelije egzokrinog dela pankreasa. Kao što se može videti na slici 10 (2, 3, i 4), tretman biljnom mešavinom ni u jednoj testiranoj koncentraciji nije doveo do narušavanja normalne morfološke strukture pankreasa (slika 10 (1)) u smislu velikih promena kako u obliku Langerhansovih ostrvaca tako ni u promeni broja ćelija ostrvca.



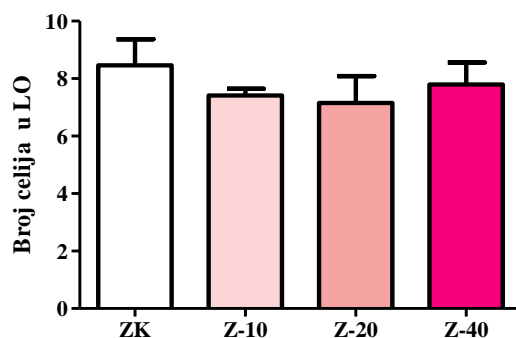
Slika 10. Tkivo pankreasa obojeno H&E metodom. 1: ZK; 2: Z-10; 3: Z-20; 4: Z-40. Uvećanje 400x. Skala 50 µm.

Normalna raspodela kolagena u pankreasu može se videti na slici 11 (1), gde su plavo obojena vlakna kolagena u pankreasu zdrave kontrolne grupe životinja tanka i rastresita. Nijedna testirana koncentracija biljne mešavine nije uzrokovala vidljive promena u gustini kolagena, te je prostor između ćelija kako endokrinog tako i egzokrinog dela pankreasa tretiranih životinja bio ispunjen usnopljenim vlaknima kolagena normalne gustine (slika 11 (2, 3 i 4)).



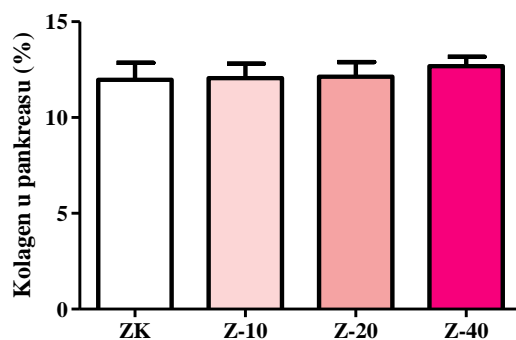
Slika 11. Tkivo pankreasa obojeno MT metodom. 1: ZK; 2: Z-10; 3: Z-20; 4: Z-40. Uvećanje 200x. Skala 50 μm .

Detaljnijom morfometrijskom analizom primećeno je da je tretman biljnom mešavinom blago smanjio broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima (LO) pankreasa zdravih tretiranih životinja ($8,49 \pm 0,88$ ćelija na $1000 \mu\text{m}^2$ LO u ZK, $7,41 \pm 0,24$ ćelija na $1000 \mu\text{m}^2$ LO u Z-10, $7,15 \pm 0,93$ ćelija na $1000 \mu\text{m}^2$ LO u Z-20 i $7,79 \pm 0,77$ ćelija na $1000 \mu\text{m}^2$ LO u Z-40), ali nije primećena statistička značajnost, što je prikazano na grafiku 18.



Grafik 18. Uticaj biljne mešavine na broj ćelija u LO zdravih životinja.

Uz to, kao što se može videti sa grafika 19, morfometrijska i statistička analiza je pokazala da je tretman biljnom mešavinom izuzetno blago povećao nivo kolagena u pankreasu zdravih životinja, te je depozicija kolagena iznosila $11,97 \pm 0,89$ % u ZK, $12,06 \pm 0,75$ % u Z-10, $12,13 \pm 0,76$ % u Z-20 i $12,67 \pm 0,49$ % u Z-40 grupi životinja.



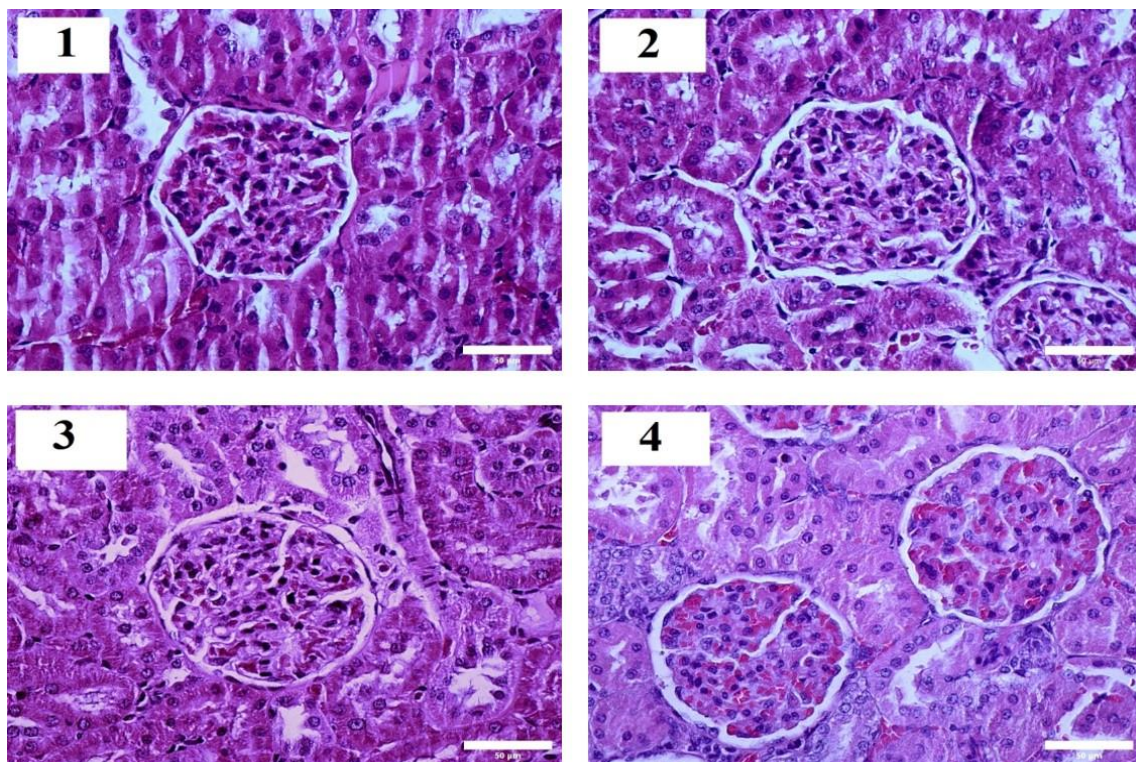
Grafik 19. Uticaj biljne mešavine na nivo kolagena u pankreasu zdravih životinja.

4.4.2.4. Uticaj biljne mešavine na tkivo bubrega zdravih životinja

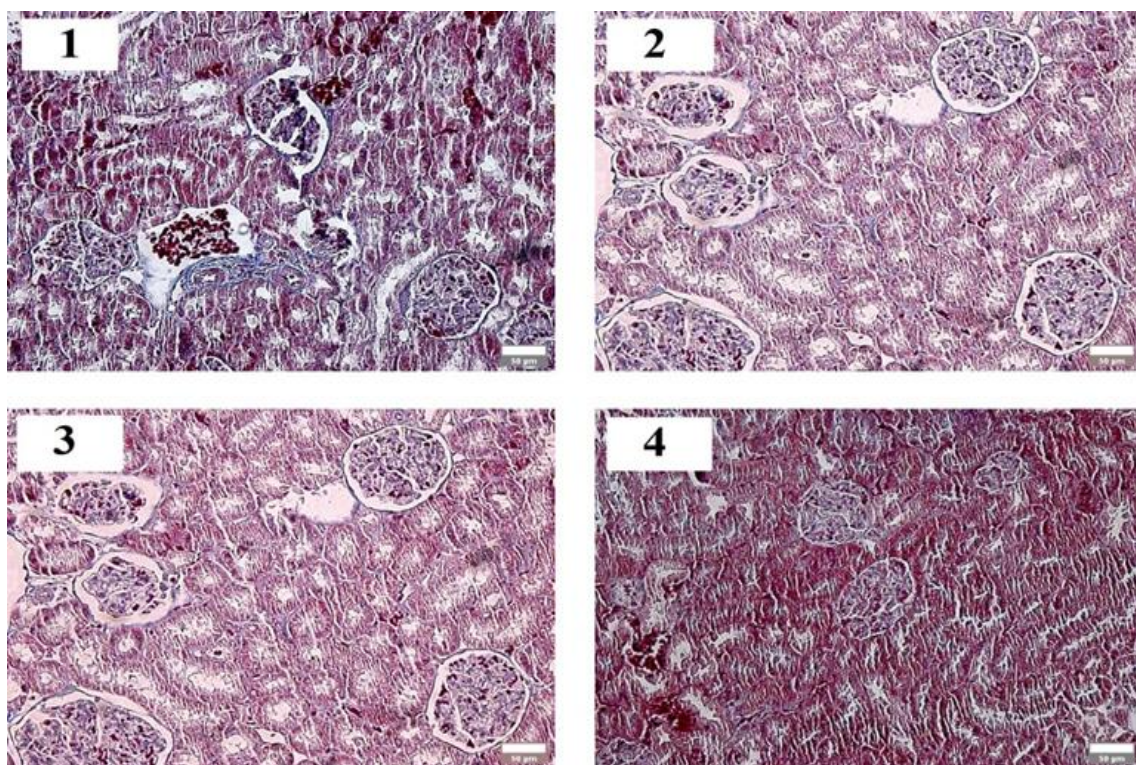
Potencijalna nefrotoksičnost biljne mešavine ispitana je uporednom analizom triju histoloških parametara, a to su površina glomerula, broj proksimalnih tubularnih ćelija i nivo kolagena u datom organu. Površina glomerula i broj proksimalnih tubularnih ćelija analizirana je na isečcima obojenim hematoksilinom i eozinom (slika 12), dok je ispitivanje količine kolagena u tkivu bubrega urađeno na isečcima obojenim Mason-trihromnom metodom (slika 13).

Na slikama 12 (1) i 13 (1) je prikazana normalna morfološka građa preseka bubrega životinja zdrave kontrolne grupe. Kao što se sa slika 12 (2, 3 i 4) i 13 (2, 3 i 4) može primetiti, tretman biljnom mešavinom nije doveo do velikih promena u odnosu na zdrave kontrole, te je kod svih tretiranih životinja uočen nepromenjen izgled glomerula sa očuvanom Boumanovom kapsulom, kao i gotovo neizmenjen izgled vlakana kolagena, sa izuzetkom tkiva bubrega

životinja iz Z-40 grupe, kod kojih se može primetiti blago povećanje u gustini kolagena (slika 13 (4)).

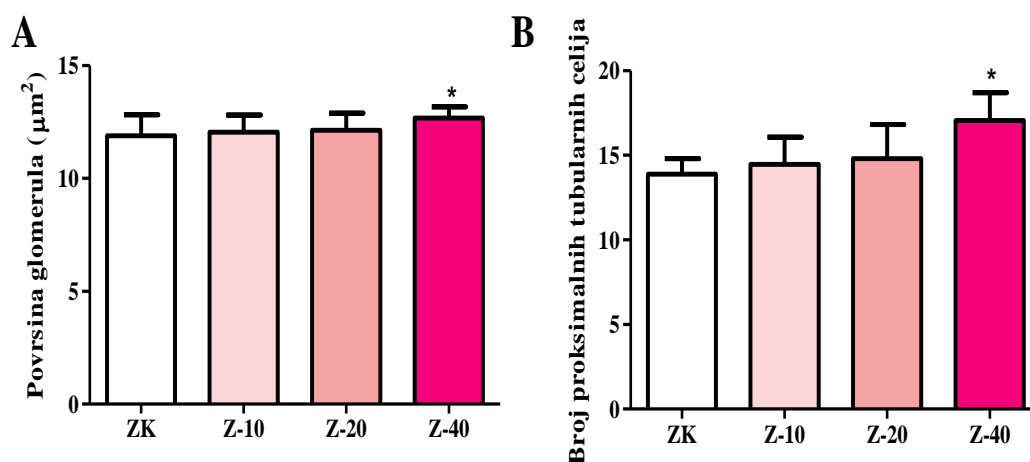


Slika 12. Tkivo bubrega obojeno H&E metodom. 1: ZK; 2: Z-10; 3: Z-20; 4: Z-40. Uvećanje 400x. Skala 50 μm .



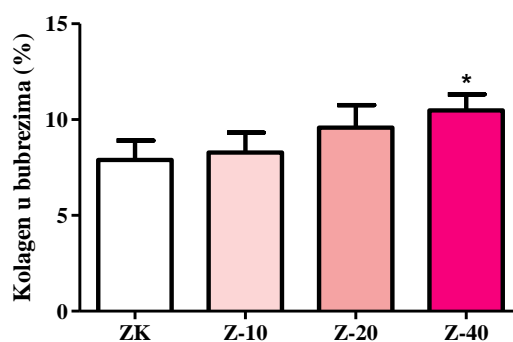
Slika 13. Tkivo bubrega obojeno MT metodom. 1: ZK; 2: Z-10; 3: Z-20; 4: Z-40. Uvećanje 200x. Skala 50 μm .

Ipak, detaljna morfometrijska i statistička analiza je pokazala da iako tretman niskom i srednjom koncentracijom ispitivane biljne mešavine (10 i 20 g/kg) nije izazvao promene u tkivu bubrega, 28 dana administracije najvećom testiranom koncentracijom (40 g/kg) je ipak doveo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja veličine glomerula i broja proksimalnih tubularnih ćelija ($12,68 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$ i $17,06 \pm 1,63$, respektivno) u odnosu na zdravu kontrolu ($11,19 \pm 0,92 \mu\text{m}^2$ i $13,89 \pm 0,92$, respektivno), što je prikazano na grafiku 20.



Grafik 20. Uticaj biljne mešavine na površinu glomerula (A) i broj proksimalnih tubularnih ćelija (B) zdravih životinja * $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

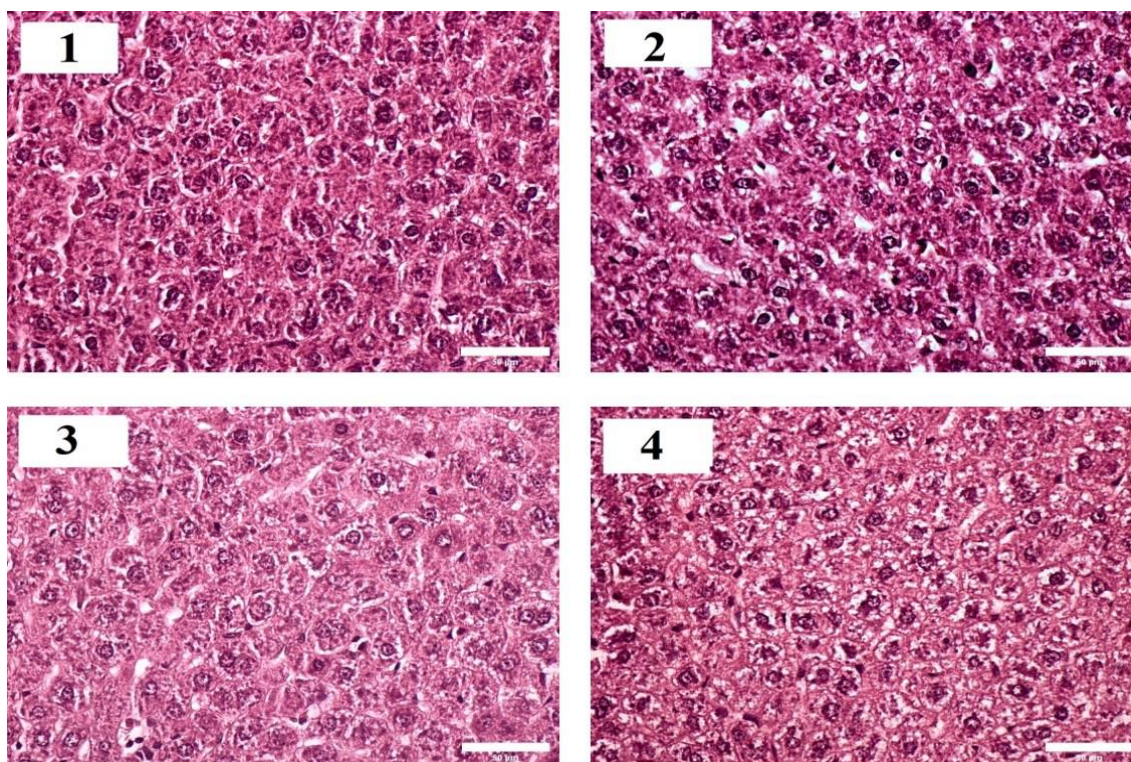
Osim toga, tretman biljnom mešavinom korišćen u niskoj i srednjoj testiranoj koncentraciji, doveo je do veoma blagog, ali ne statistički značajnog povećanja depozicije kolagena u tkivu bubrega eksperimentalnih životinja ($8,28 \pm 1,04$ i $9,58 \pm 1,17$ %, u Z-10 i Z-20 eksperimentalnim grupama), dok je administracija najviše testirane koncentracije (40 g/kg) izazvala statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje kolagena kod tretiranih životinja ($10,48 \pm 0,84$ %) u odnosu na grupu zdravih netretiranih životinja ($7,89 \pm 1,01$ %), što je prikazano na grafiku 21.



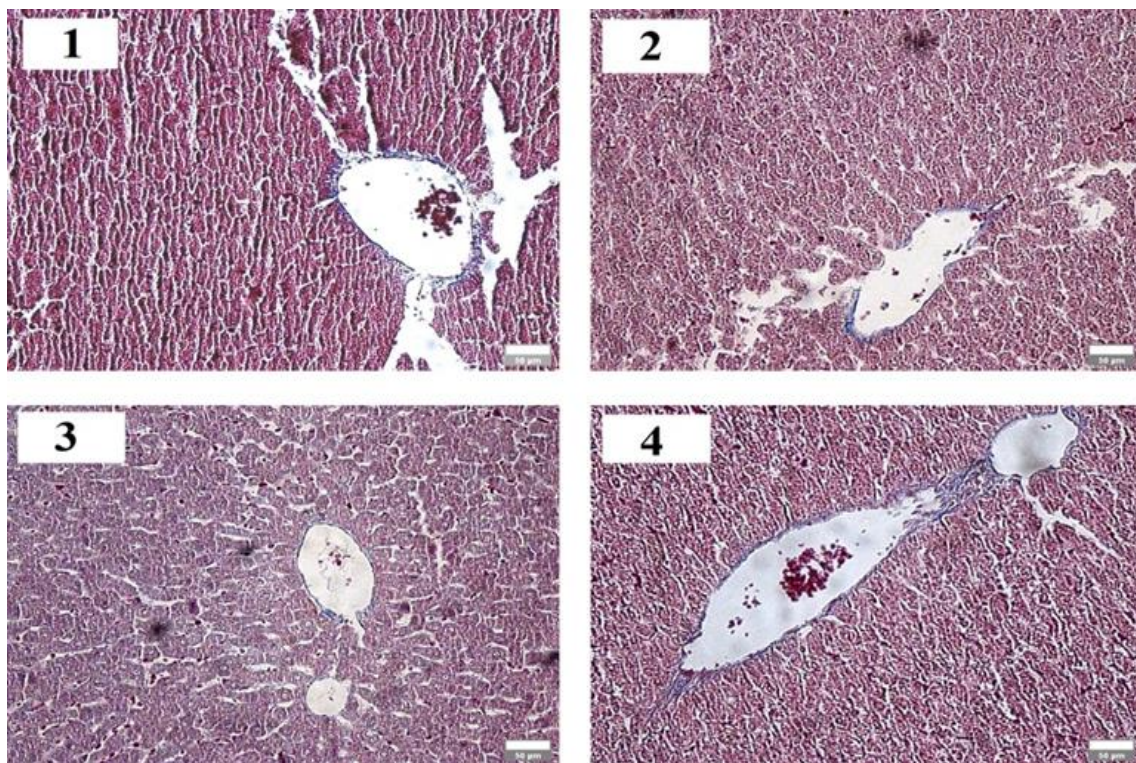
Grafik 21. Uticaj biljne mešavine na nivo kolagena u bubrežima zdravih životinja. * $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

4.4.2.5. Uticaj biljne mešavine na tkivo jetre zdravih životinja

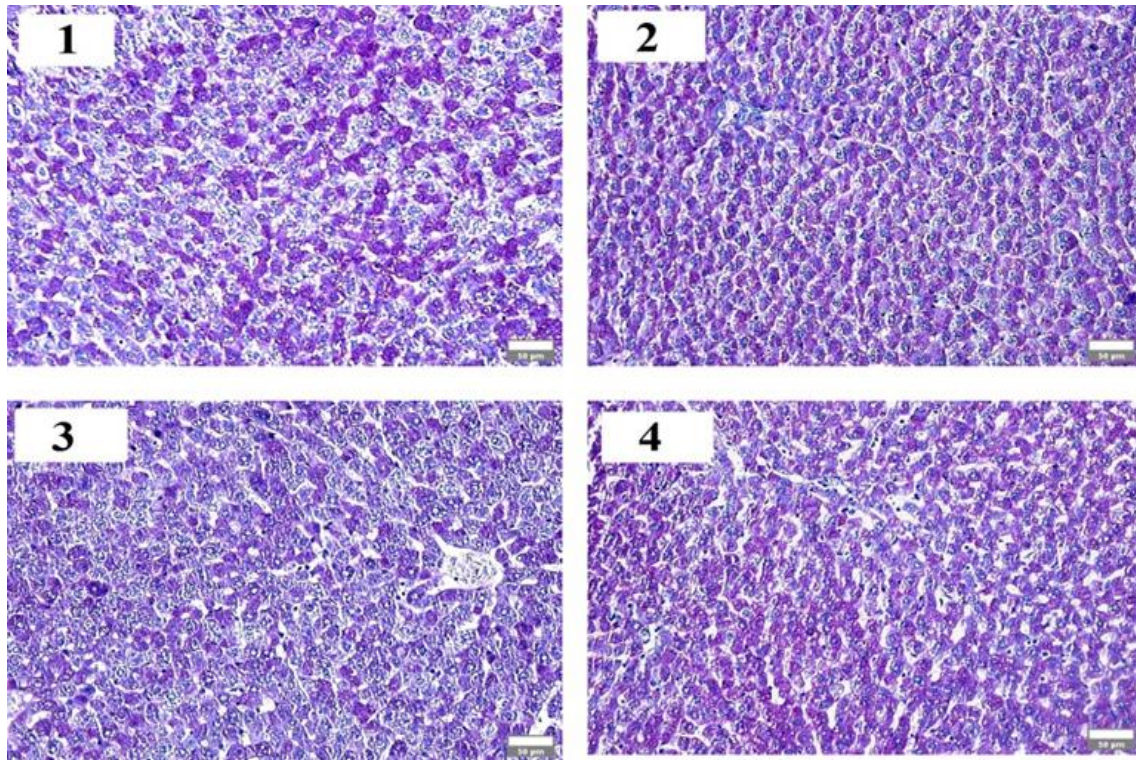
Potencijalna hepatotoksičnost biljne mešavine ispitana je histološkom analizom preseka jetre eksperimentalnih životinja obojenih H&E (slika 14), MT (slika 15) i PAS metodom (slika 16). Na slikama 14(1), 15 (1) i 16 (1) prikazane su mikrofotografije jetre zdrave kontrolne grupe životinja. Raspored i oblik hepatocita je pravilan, citoplazma roze eozinofilna, nukleusi mononukleusnih i binukleusnih hepatocita ljubičasto obojeni hematoksilinom, dok su Kupferove ćelije obojene tamno ljubičasto (slika 14 (1)). Anilin plavo obojena kolagena vlakna su tanka i rastresita (slika 15 (1)), a uočeno je i prisustvo ljubičasto obojenih granula glikogena u hepatocitima (slika 16 (1)). Tretman biljnom mešavinom ni u jednoj testiranoj koncentraciji nije izazvao grube morfološke promene u jetri eksperimentalnih životinja, što se može uočiti na slikama 14 (2, 3 i 4), 15 (2, 3 i 4) i 16 (2, 3 i 4) .



Slika 14. Tkivo jetre obojeno H&E metodom. 1: ZK; 2: Z-10; 3: Z-20; 4: Z-40. Uvećanje 400x. Skala 50 µm.



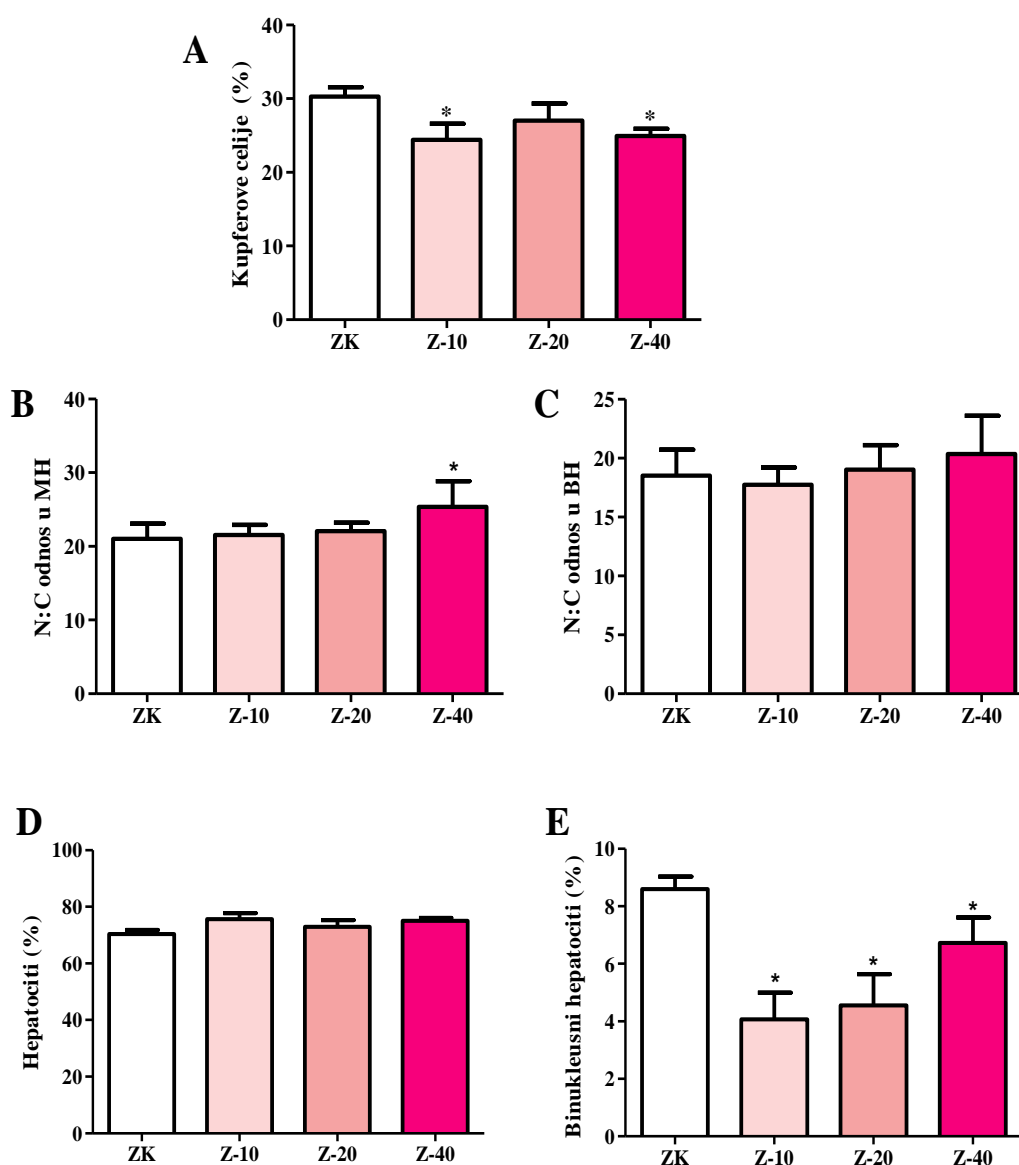
Slika 15. Tkivo jetre obojeno MT metodom. 1: ZK; 2: Z-10; 3: Z-20; 4: Z-40. Uvećanje 200x. Skala 50 µm.



Slika 16. Tkivo jetre obojeno PAS metodom. 1: ZK; 2: Z-10; 3: Z-20; 4: Z-40. Uvećanje 200x. Skala 50 µm.
Uvećanje 200x. Skala 50 µm.

Detaljna morfometrijska analiza uključila je sedam parametara, a to su: broj Kupferovih ćelija prisutnih u jetri, odnos nukleusa i citoplazme (N:C), broj mononukleusnih (MH) i binukleusnih (BH) hepatocita, ukupan broj hepatocita, depozicija kolagena u jetri i procenat hepatocita sa glikogenom.

Statistička analiza je pokazala da je „anti-dijabetična“ biljna mešavina prouzrokovala blago sniženje broja Kupferovih ćelija u jetri zdravih tretiranih životinja ($24,41 \pm 2,25\%$, $27,03 \pm 2,33\%$ i $24,95 \pm 0,96\%$ u Z-10, Z-20 i Z-40 eksperimentalnim grupama, respektivno) u odnosu na netretiranu zdravu kontrolnu grupu ($30,27 \pm 1,27\%$), što je prikazano na grafiku 22 (A).



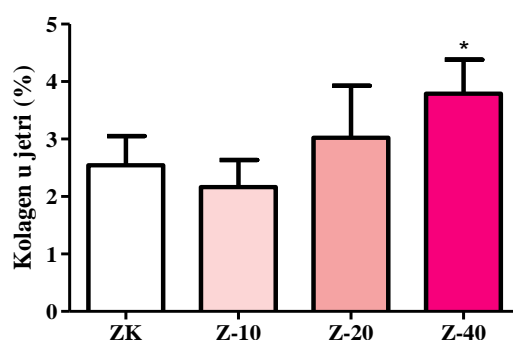
Grafik 22. Uticaj biljne mešavine na broj Kupferovih ćelija (A), N:C odnos u MH (B), N:C odnos u BH (C), ukupan broj hepatocita (D) i broj BH (E) u jetri zdravih životinja. * $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

Osim toga, kao što se vidi sa grafika 22 (C), tretman biljnom mešavinom nije doveo do statistički značajnih promena u odnosu nukleusa i citoplazme (N:C) binukleusih hepatocita (BH) zdravih tretiranih životinja ($17,75 \pm 1,46$ u Z-10, $19,03 \pm 1,86$ u Z-20 i $20,36 \pm 2,9$ u Z-40 eksperimentalnim grupama) u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu ($18,52 \pm 2,2$).

U odnosu na netretiranu zdravu kontrolu, ukupan broj hepatocita bio je blago povišen kod svih životinja tretiranih polih herbalnom mešavinom ($70,37 \pm 1,42$ % u ZK, $75,59 \pm 2,22$ % u Z-10, $72,97 \pm 2,33$ % u Z-20 i $75,05 \pm 0,96$ % u Z-40 eksperimentalnim grupama), ali nije uočena statistička značajnost (grafik 22 (D)).

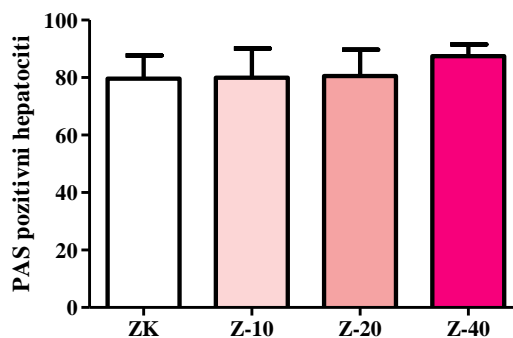
Ipak, sve testirane koncentracije biljne mešavine dovele su do smanjenja broja binukleusnih hepatocita, tako da je njihova zastupljenost iznosila $8,59 \pm 0,44$ % u ZK, $4,07 \pm 0,92$ % u Z-10, $4,55 \pm 1,09$ % u Z-20 i $6,73 \pm 0,89$ % u Z-40 grupi (grafik 22 (E)). Uz to, najviša testirana koncentracija biljne mešavine (40 g/kg) povećala je i odnos nukleusa i citoplazme u mononukleusnim hepatocitima (MH) kod tretiranih zdravih životinja ($25,33 \pm 3,51$) u odnosu na zdravu kontrolu ($21,02 \pm 2,06$), što je prikazano na grafiku 22 (B).

Tretman niskom testiranom koncentracijom (10 g/kg) biljne mešavine blago je snizio ($2,16 \pm 0,47$ %), dok je tretman srednjom ispitivanom koncentracijom (20 g/kg) blago povišio depoziciju kolagena u jetri tretiranih životinja ($3,02 \pm 0,9$ %), u odnosu na netretiranu grupu zdravih životinja ($2,54 \pm 0,51$ %), ali, statistički značajna razlika nije uočena. Nasuprot tome, administracija najviše ispitivane koncentracije (40 g/kg) biljne mešavine dovela do statistički značajnog povećanja nivoa kolagena u jetri tretiranih životinja ($3,79 \pm 0,59$ %) u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom ($p < 0,05$), što je prikazano na grafiku 23.



Grafik 23. Uticaj biljne mešavine na nivo kolagena u jetri zdravih životinja. * $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

Administracija nižih doza biljne mešavine nije imala efekat na povećanje nivoa glikogena u hepatocitima tretiranih zdravih životinja, dok je najviša testirana koncentracija dovela do izuzetno blagog povećanja ovog parametra, pa je tako broj PAS pozitivnih hepatocita bio $79,6 \pm 7,22$ u ZK, $79,98 \pm 9,08$ u Z-10, $80,52 \pm 8,2$ u Z-20 i $87,46 \pm 3,63$ u Z-40 grupi životinja (grafik 24).

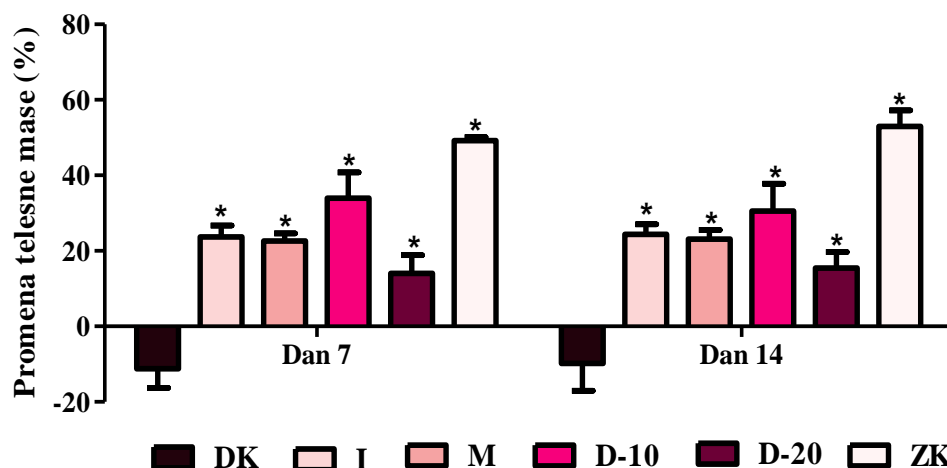


Grafik 24. Uticaj biljne mešavine na broj PAS pozitivnih hepatocita zdravih životinja. * $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

4.4.3. Anti-dijabetični efekat biljne mešavine

4.4.3.1. Uticaj biljne mešavine na telesnu masu i nivo šećera u krvi dijabetičnih životinja

Na grafiku 25 prikazan je procenat promene telesne mase eksperimentalnih grupa životinja na 7. i 14. dan tretmana biljnom mešavinom, tj. na 21. i 28. dan samog eksperimenta, u odnosu na nulti dan eksperimenta. Najveće povećanje telesne mase zabeleženo je u zdravoj kontrolnoj grupi životinja (ZK), tj. gradacijski $49,18 \pm 0,96$ i $52,98 \pm 4,21\%$ na dan 7 i 14. Značajan gubitak telesne mase tokom toka eksperimenta uočen je kod netretiranih dijabetičnih životinja (DK) ($-11,25 \pm 5,05$ i $-9,76 \pm 7,28\%$ na dan 7 i 14 u odnosu na nulti dan). Iako su svi primenjivani tretmani (insulinom, metforminom i biljnom mešavinom) umanjili nekontrolisan gubitak telesne mase izazvan dijabetesom ($p < 0,001$ u odnosu na DK), te su na dan 7 i 14 procenti dobijanja telesne mase iznosili $23,68 \pm 3,04$ i $24,37 \pm 2,64\%$ u I grupi, $22,65 \pm 2$ i $23,16 \pm 2,37\%$ u M grupi a $14,06 \pm 4,85$ i $15,45 \pm 4,25\%$ u D-20 grupi, najpovoljniji efekat imala je najniža koncentracija biljne mešavine (10 g/kg), gde je zabeleženi procenat dobijanja telesne mase bio $33,92 \pm 6,9$ i $30,58 \pm 7,18\%$ na dane 7 i 14, redom.



Grafik 25. Procenat promene telesne mase dijabetičnih tretiranih životinja. * $p < 0,05$ u poređenju sa DK.

Kao što se vidi u tabeli 12, dve nedelje nakon injektiranja aloksana, tj. na nulti dan tretmana, nivo šećera u krvi bio je ekstremno povišen kod svih dijabetičnih životinja u odnosu na zdrave životinje ($p < 0,001$). Do kraja eksperimenta, tretman obema koncentracijama biljne mešavine doveo je do potpune normalizacije nivoa šećera u krvi ($8,64 \pm 4,09$, $5,26 \pm 1,3$ i $6,76 \pm 1,54$ mmol/L u D-10, D-20 i ZK eksperimentalnim grupama), dok je viša testirana koncentracija biljne mešavine (20 g/kg) uspešno je regulisala šećer u krvi dijabetičnih životinja nakon samo sedam dana administracije ekstrakta ($3,28 \pm 0,91$ mmol/L). Nasuprot tome, tretman insulinom samo je malo umanjio nivo šećera u krvi, dok metformin nije pokazao nikakav uticaj na glikemijske vrednosti tretiranih životinja u poređenju sa netretiranom dijabetičnom kontrolom ($22,86 \pm 2,58$, $28,5 \pm 0,42$ i $27,82 \pm 0,9$ mmol/L u I, M i DK grupi).

Tabela 12. Nivo šećera u krvi dijabetičnih tretiranih životinja.

Eksperimentalna grupa	Nivo šećera u krvi (mmol/L)		
	Dan 0	Dan 7	Dan 14
DK	$28,02 \pm 0,59^b$	$27,24 \pm 1,41^b$	$27,82 \pm 0,9^b$
I	$28,16 \pm 1,46^b$	$24,94 \pm 3,17^b$	$22,86 \pm 2,58^{ab}$
M	$27,78 \pm 1,37^b$	$28,32 \pm 0,59^b$	$28,5 \pm 0,42^b$
D-10	$28,08 \pm 1,42^b$	$24,78 \pm 3,37^b$	$8,64 \pm 4,09^{acd}$
D-20	$28,12 \pm 0,54^b$	$3,28 \pm 0,91^{acd}$	$5,26 \pm 1,3^{acd}$
ZK	$5,64 \pm 0,63^a$	$5,48 \pm 0,33^a$	$6,76 \pm 1,54^a$

^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK. ^c $p < 0,05$ u poređenju sa I grupom. ^d $p < 0,05$ u poređenju sa M grupom.

4.4.3.2. Uticaj biljne mešavine na lipidni status dijabetičnih životinja

Kao što je prikazano u tabeli 13, do kraja eksperimenta, nivo ukupnog holesterola, *LDL*-a, triglicerida i *VLDL*-a bio je značajno povišen ($p < 0,001$) u netretiranoj dijabetičnoj grupi ($1,49 \pm 0,12$ mmol/L, $0,48 \pm 0,08$ mmol/L, $2,46 \pm 0,27$ mmol/L i $0,49 \pm 0,05$ mmol/L, redom) u odnosu na zdravu kontrolnu grupu ($1,15 \pm 0,02$ mmol/L, $0,14 \pm 0,05$ mmol/L, $1,39 \pm 0,09$ mmol/L i $0,28 \pm 0,02$ mmol/L).

Tretman obema koncentracijama biljne mešavine značajno je snizio ($p < 0,001$) ovaj povećan nivo ukupnog holesterola ($0,98 \pm 0,05$ i $0,87 \pm 0,14$ mmol/L u D-10 i D-20 grupama, redom), triglicerida ($0,33 \pm 0,03$ i $0,37 \pm 0,08$ mmol/L u D-10 i D-20 grupama, respektivno) i *VLDL*-a ($0,07 \pm 0,01$ mmol/L u obema grupama tretiranim dekoktom), dok je viša testirana koncentracija biljne mešavine (20 g/kg) bila uspešna i pri snižavanju nivoa *LDL*-a ($p < 0,001$), sa $0,48 \pm 0,08$ mmol/L u DK na $0,27 \pm 0,06$ mmol/L u D-20 (tabela 13).

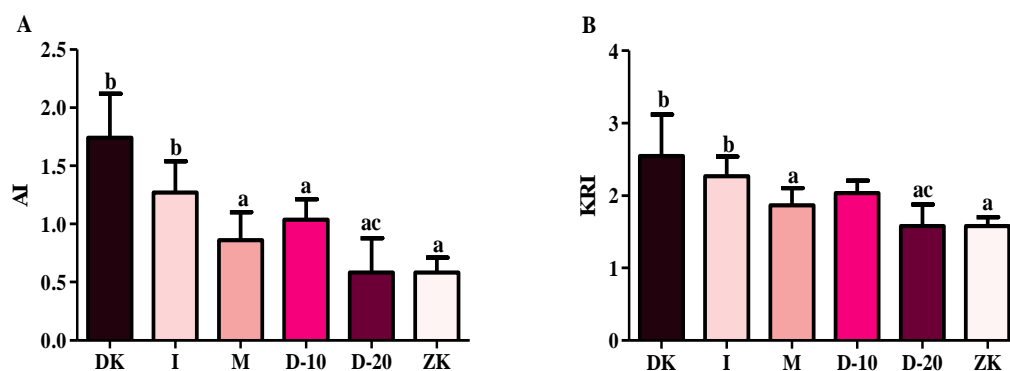
Tabela 13. Lipidni status dijabetičnih tretiranih životinja

Eksperimentalna grupa	Ukupni holesterol (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)	VLDL (mmol/L)
DK	$1,49 \pm 0,12^b$	$0,61 \pm 0,12$	$0,48 \pm 0,08^a$	$2,46 \pm 0,27^b$	$0,49 \pm 0,05^b$
I	$1,44 \pm 0,14^b$	$0,65 \pm 0,11$	$0,7 \pm 0,07^{ab}$	$0,48 \pm 0,06^{ab}$	$0,1 \pm 0,01^{ab}$
M	$1,56 \pm 0,17^b$	$0,85 \pm 0,15^a$	$0,58 \pm 0,12^b$	$0,64 \pm 0,04^{ab}$	$0,13 \pm 0,01^{ab}$
D-10	$0,98 \pm 0,05^{acd}$	$0,47 \pm 0,05^{bd}$	$0,42 \pm 0,06^{bc}$	$0,33 \pm 0,03^{abd}$	$0,07 \pm 0,01^{abd}$
D-20	$0,87 \pm 0,14^{abcd}$	$0,57 \pm 0,13^d$	$0,27 \pm 0,06^{acd}$	$0,37 \pm 0,08^{abd}$	$0,07 \pm 0,01^{abd}$
ZK	$1,15 \pm 0,02^a$	$0,73 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,05^b$	$1,39 \pm 0,09^a$	$0,28 \pm 0,02^a$

^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK. ^c $p < 0,05$ u poređenju sa I grupom. ^d $p < 0,05$ u poređenju sa M grupom.

Na grafiku 26 (A) se može videti da je nivo aterogenog indeksa bio značajno povećan ($p < 0,001$) u dijabetičnoj kontrolnoj grupi ($1,74 \pm 0,38$) u odnosu na zdravu kontrolnu grupu ($0,58 \pm 0,13$). Iako su svi tretmani doveli do izvesnog smanjenja aterogenog indeksa u odnosu na netretiranu dijabetičnu kontrolu ($1,27 \pm 0,27$ u I grupi, $0,86 \pm 0,24$ u M grupi i $1,04 \pm 0,17$ u D-10 grupi), jedino je tretman „anti-dijabetičnom“ biljnom mešavinom u dozi 20 g/kg uspeo da u potpunosti normalizuje ovaj parametar ($0,58 \pm 0,29$).

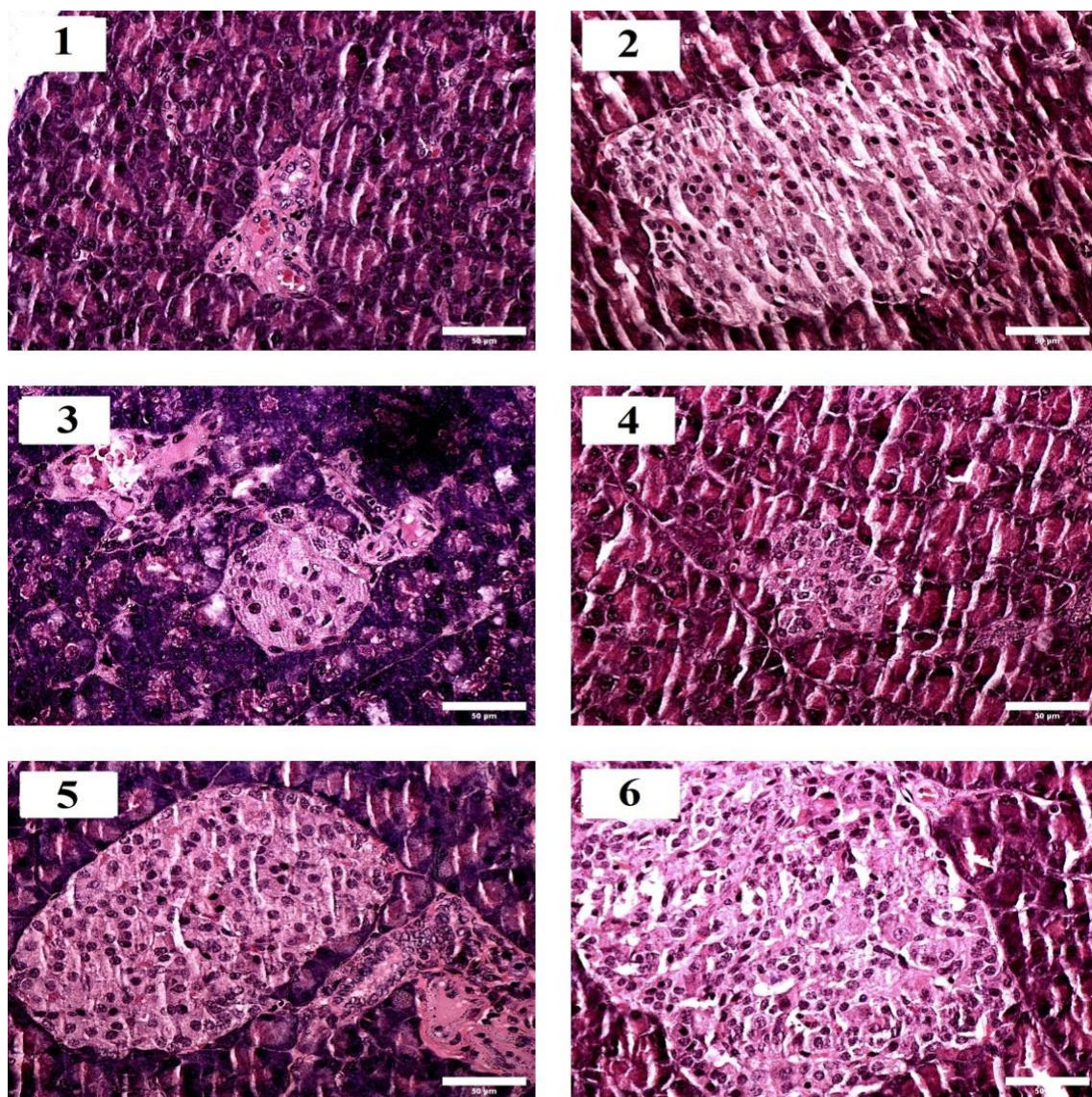
Slično situaciji uočenoj pri analizi aterogenog indeksa, aloksanom-indukovan dijabetes izazvao je i značajno povećanje ($p < 0,001$) kardiovaskularnog indeksa ($2,54 \pm 0,58$ u DK) u odnosu na zdrave životinje ($1,58 \pm 0,12$). Svi primenjeni tretmani doveli su blagog snižavanja kardiovaskularnog indeksa ($2,26 \pm 0,27$ u I grupi, $1,86 \pm 0,24$ u M grupi i $2,04 \pm 0,17$ u D-10 grupi) u odnosu na dijabetičnu kontrolnu grupu, dok je viša testirana koncentracija polih herbalne mešavine (20 g/kg) snizila njegovu vrednost ($1,58 \pm 0,29$) i dovela ga do nivoa uočenog kod zdravih životinja, što je prikazano na grafiku 26 (B).



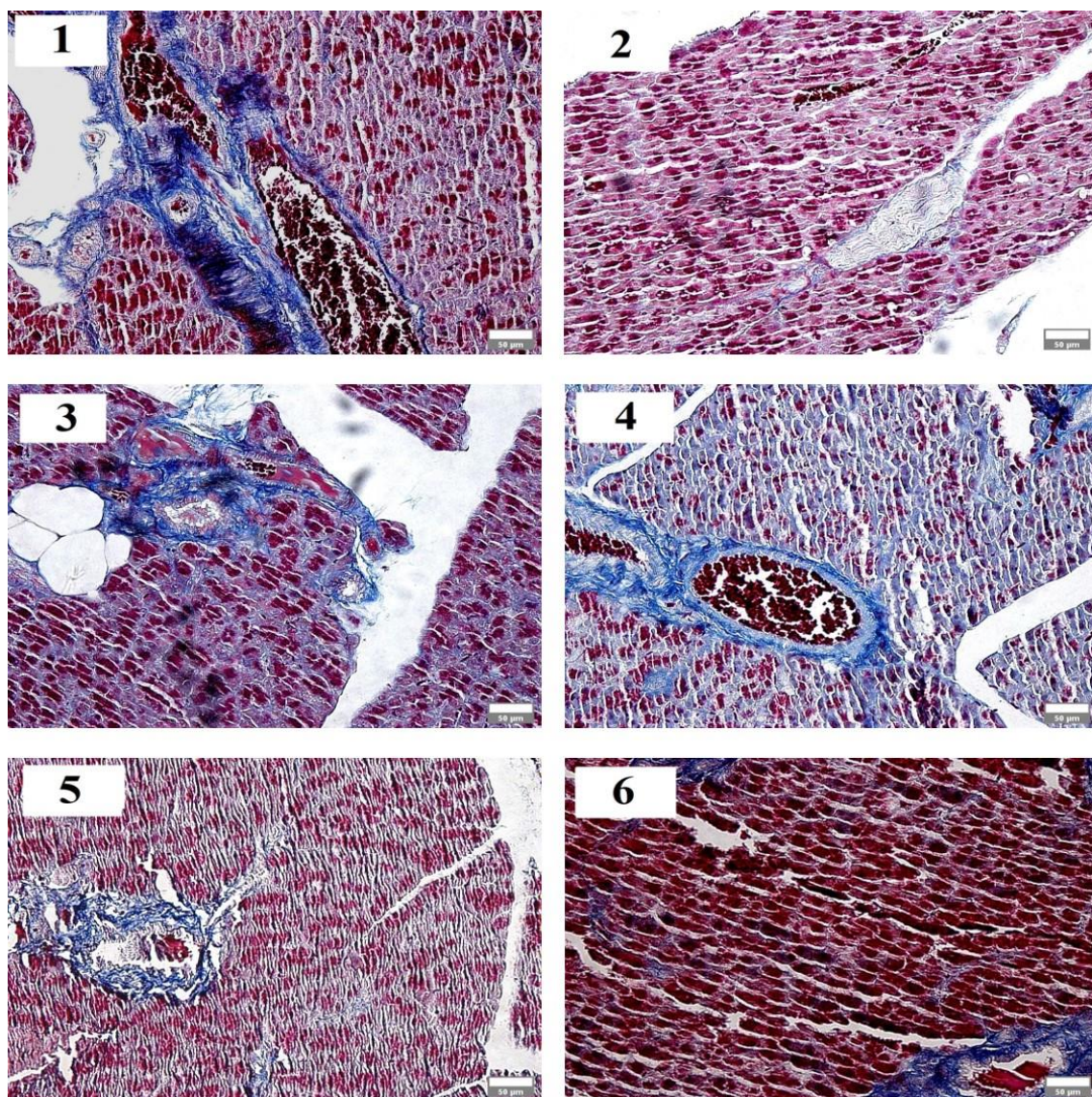
Grafik 26. Uticaj biljne mešavine na AI (A) i KRI (B) indeks dijabetičnih životinja. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK. ^c $p < 0,05$ u poređenju sa I grupom. ^d $p < 0,05$ u poređenju sa M grupom.

4.4.3.3. Uticaj biljne mešavine na tkivo pankreasa dijabetičnih životinja

Mikrofotografije tkiva pankreasa eksperimentalnih životinja iz studije ispitivanja anti-dijabetičnog efekta biljne mešavine, obojena H&E i MT metodom prikazane su na slikama 17 i 18. Može se primetiti da je u odnosu na zdravu kontrolnu grupu (slike 17 (2) i 18 (2)) aloksanom-indukovan dijabetes doveo do velikog smanjenja veličine Langerhansovog ostrvca, gotovo u potpunosti uništio sve ćelije endokrinog dela pankreasa (slika 17 (1)) i, uz to, doveo do velikog zadebljanja vlakana kolagena prisutnog u ovom organu (slika 18 (1)). Terapija insulinom i metforminom blago je sanirala ove morfološke poremećaje, te je broj endokrinih ćelija pankreasa u ovim eksperimentalnim grupama bio malo veći (slika 17 (3, 4)), a zadebljanje kolagena malo manje (slika 18 (3, 4)) u odnosu na dijabetičnu kontrolnu grupu životinja (slike 17 (1) i 18 (1)). Kao što se sa slike 17 (5, 6) može videti, broj ćelija u Langerhansovom ostrvcu pankreasa dijabetičnih životinja tretiranih obema koncentracijama biljne mešavine bio je približno jednak onom uočenim u Langerhansovom ostrvcu zdravih životinja (slika 17 (2)). Osim toga, vlakna kolagena bila su znatno tanja i rastresitija u pankreasu dijabetičnih životinja tretiranih biljnom mešavinom (slika 18 (5, 6)) nego u pankreasu netretirane dijabetične kontrole (slika 18 (2)).



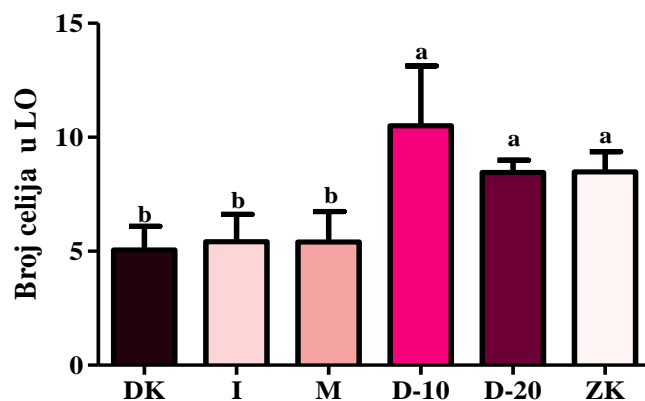
Slika 17. Tkivo pankreasa obojeno H&E metodom. 1: DK; 2: ZK; 3: I; 4: M; 5: D-10; 6: D-20. Uvećanje 400x.
Skala 50 μ m.



Slika 18. Tkivo pankreasa obojeno MT metodom. 1: DK; 2: ZK; 3: I; 4: M; 5: D-10; 6: D-20. Uvećanje 200x. Skala 50 µm.

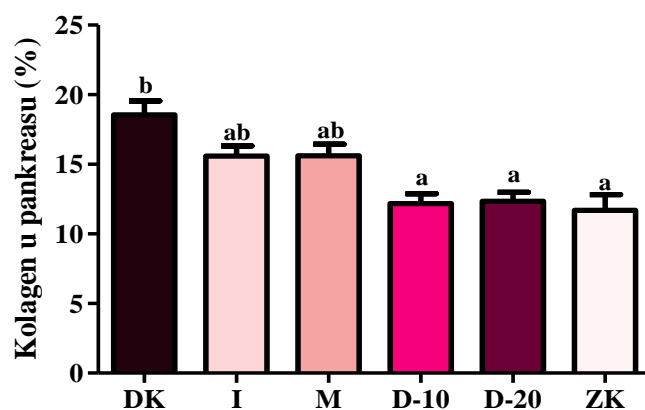
Detaljna morfometrijska i statistička analiza dokazala je da je broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima (LO) bio je značajno niži ($p < 0,001$) u netretiranim dijabetičnim kontrolama, kao i u grupama životinja tretiranim insulinom i metforminom ($5,06 \pm 1,04$, $5,41 \pm 1,2$ i $5,41 \pm 1,33$ ćelija na $1000 \mu\text{m}^2$ Langerhanovog ostrvca), u poređenju sa zdravom kontrolom ($8,49 \pm 0,88$ na $1000 \mu\text{m}^2$ Langerhanovog ostrvca). Tretman biljnom mešavinom

značajno je povećao broj ovih ćelija i doveo ga do nivoa zdravih jedinki ($10,51 \pm 2,62$ i $8,46 \pm 0,53$ ćelija na $1000 \mu\text{m}^2$ Langerhansovog ostrvca u D-10 i D-20 eksperimentalnih grupa), kao što je i prikazano na grafiku 27.



Grafik 27. Uticaj biljne mešavine na broj ćelija u LO dijabetičnih životinja. ^a $p < 0.05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0.05$ u poređenju sa ZK.

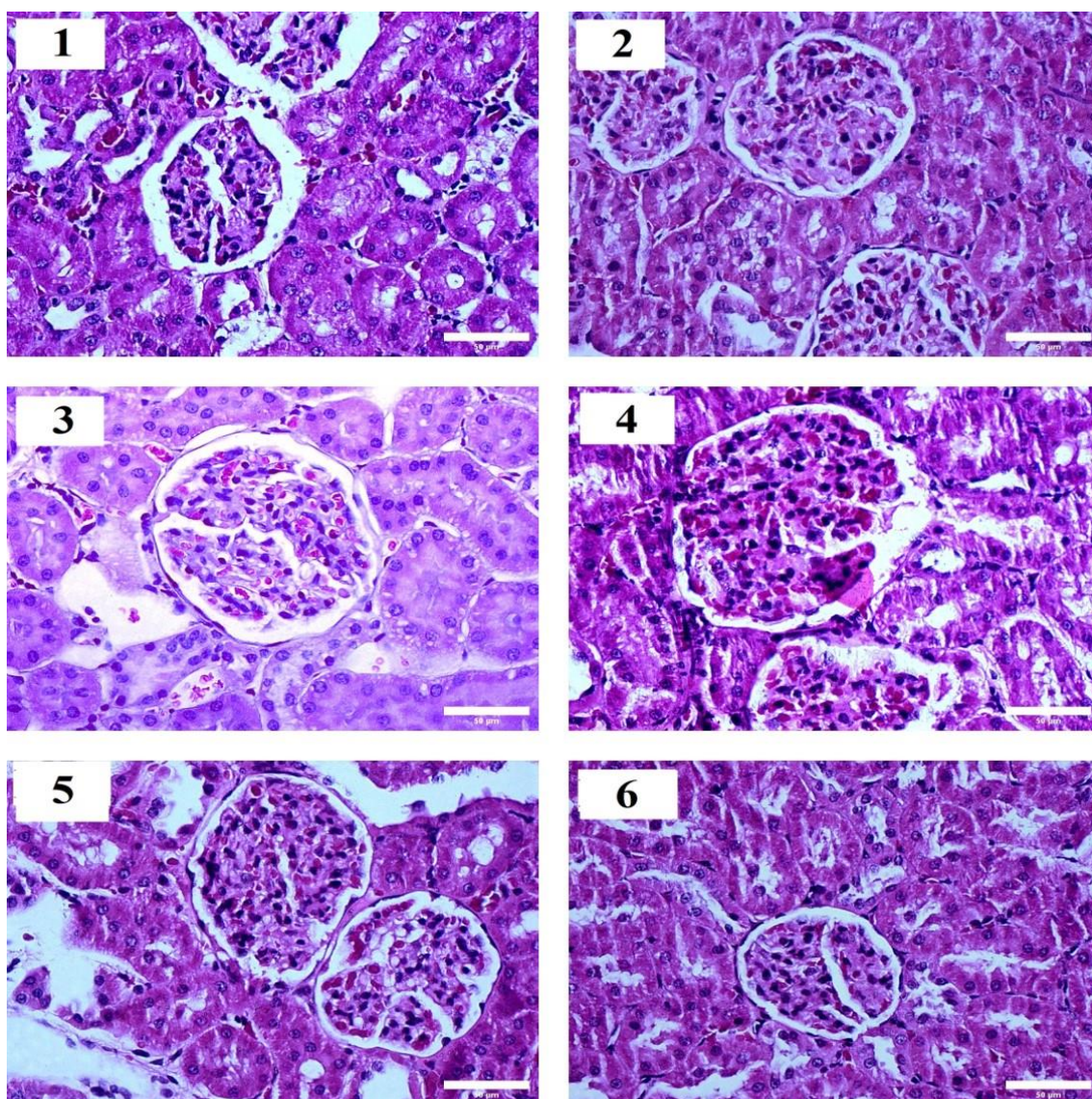
Osim toga, aloksanom-indukovan dijabetes je doveo i do značajnog povećanja ($p < 0,001$) depozicije kolagena u pankreasu dijabetičnih životinja ($18,55 \pm 1\%$) u odnosu na zdravu grupu životinja ($11,69 \pm 1,13\%$) (grafik 28). Tretman dijabetičnih životinja insulinom i metforminom blago je snizio distribuciju kolagena u pankreasu ($15,59 \pm 0,73$ i $15,61 \pm 0,84\%$, respektivno), dok je tretman obema koncentracijama biljne mešavine u potpunosti normalizovao nivo kolagena u ovom organu ($12,17 \pm 0,72$ i $12,33 \pm 0,65\%$ u D-10 i D-20 eksperimentalnim grupama), što se vidi na grafiku 28.



Grafik 28. Uticaj biljne mešavine na nivo kolagena u pankreasu dijabetičnih životinja. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

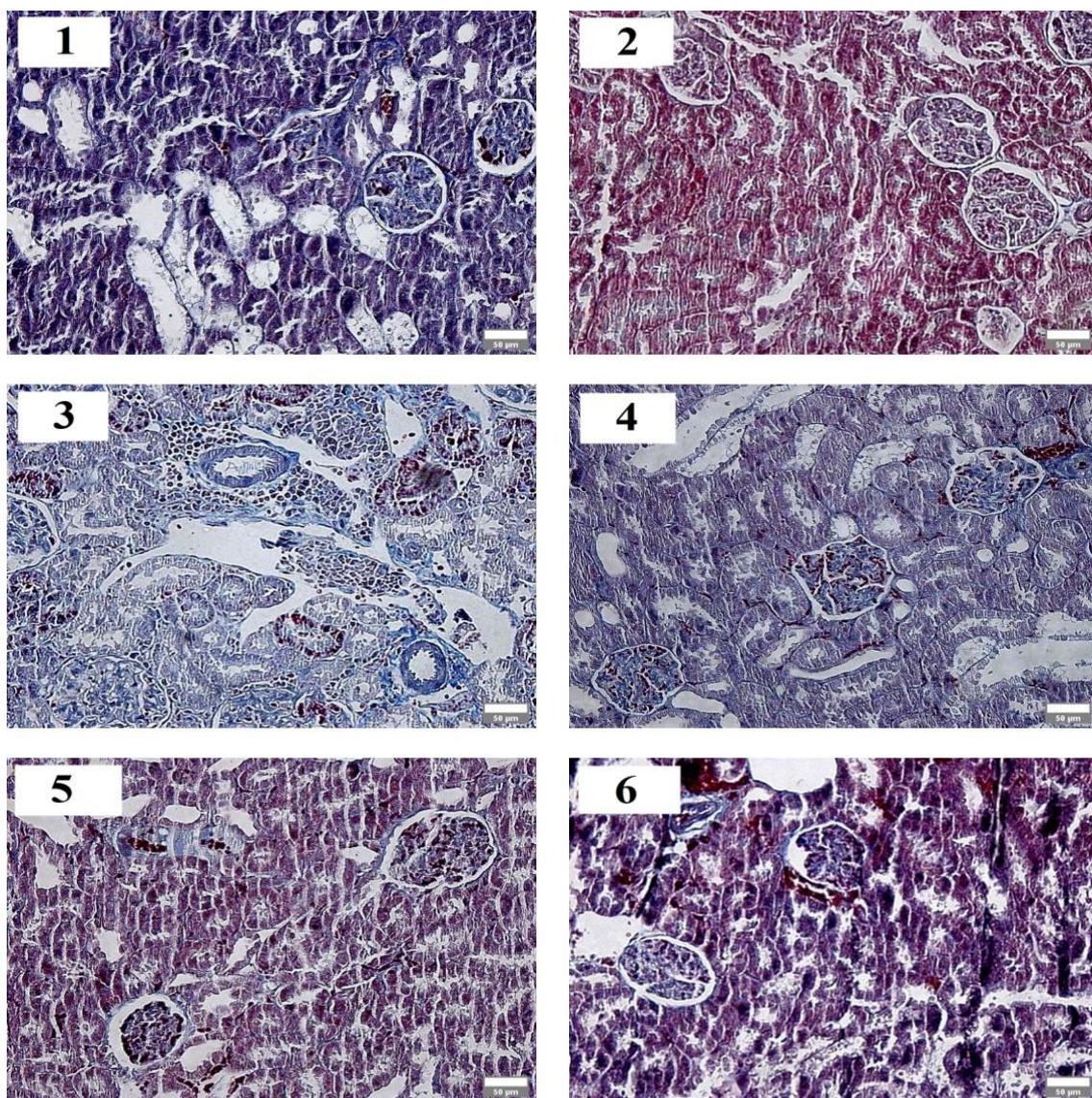
4.4.3.4. Uticaj biljne mešavine na tkivo bubrega dijabetičnih životinja

Mikrofotografije preseka bubrega eksperimentalnih životinja obojena H&E i MT metodom prikazane su na slikama 19 i 20. Aloksanom-indukovan dijabetes izazvao je niz morfoloških promena u ovom organu, poput promene oblika glomerula i smanjenje njegove veličine (slika 19 (1)) u odnosu na zdravu kontrolnu grupu (slika 19 (2)). Sve primenjene terapije su se rezultirale normalizacijom oblika glomerula, te se on nije razlikovao od onog uočenog u zdravoj kontrolnoj grupi životinja (slika 19 (3, 4, 5, 6)).



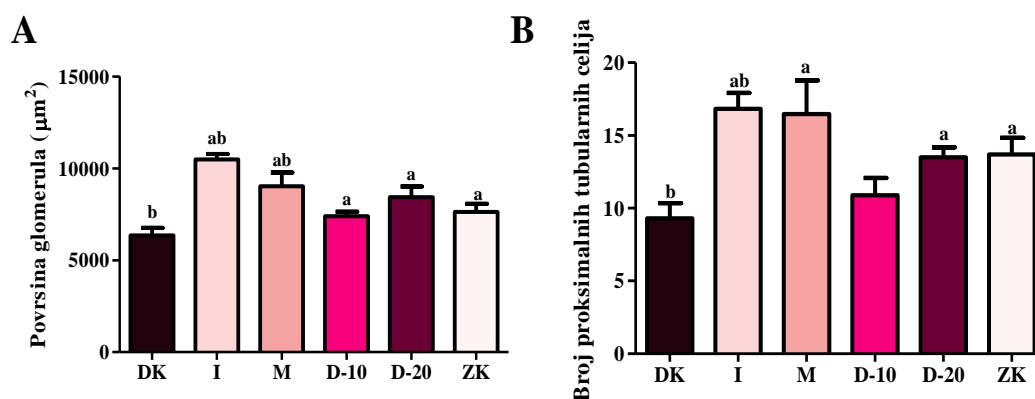
Slika 19. Tkivo bubrega obojeno H&E metodom. 1: DK; 2: ZK; 3: I; 4: M; 5: D-10; 6: D-20. Uvećanje 400x.
Skala 50 μ m.

Uz to, na slici 20 (1, 3, 4) se može primetiti da plavo obojena zgusnuta vlakna kolagena u potpunosti prožimaju bubrege životinja u dijabetičnoj kontroli (slika 20 (1)), kao i u grupama tretiranim insulinom (slika 20 (3)) i metforminom (slika 20 (4)). Kao što se vidi sa slike 20 (5 i 6), vlakna kolagena bila su znatno tanja i rastresitija u bubrezima dijabetičnih životinja tretiranih biljnom mešavinom, i u potpunosti podsećala na morfologiju uočenu u zdravoj kontrolnoj grupi (slika 20 (2)).



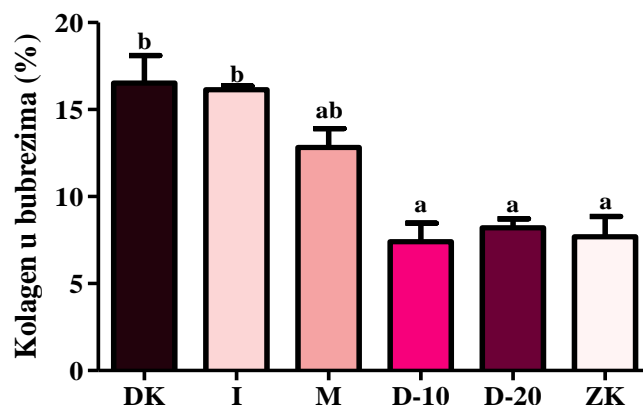
Slika 20. Tkivo bubrega obojeno MT metodom. 1: DK; 2: ZK; 3: I; 4: M; 5: D-10; 6: D-20. Uvećanje 200x.
Skala 50 µm.

Rezultati morfolometrijske analize praćeni statistiãkom obradom su pokazali da je površina glomerula (grafik 29 (A)), kao i broj proksimalnih tubularnih ćelija (grafik 28 (B)) znatno niži ($p < 0.001$) u dijabetiãnoj kontrolnoj grupi ($6338,92 \pm 418,09 \mu\text{m}^2$ i $9,32 \pm 1,04$) u odnosu na zdravu kontrolnu grupu ($7635,69 \pm 433,09 \mu\text{m}^2$ i $13,69 \pm 1,15$). Tretman insulinom i metforminom doveo je do povećanja površine glomerula ($10481,6 \pm 302,02 \mu\text{m}^2$ u I grupi i $9020,8 \pm 743,8 \mu\text{m}^2$ u M grupi) i broja proksimalnih tubularnih ćelija ($16,83 \pm 1,09$ u I grupi i $16,47 \pm 2,31$ u M grupi) u odnosu i na dijabetiãnu i na kontrolnu grupu. Tretman nižom koncentracijom biljne mešavine u potpunosti je normalizovao površinu glomerula ($7391,74 \pm 255,01 \mu\text{m}^2$), ali nije uspeo da u potpunosti vrati broj proksimalnih tubularnih ćelija ($10,9 \pm 1,18$) na nivo uoćen kod zdravih životinja, dok je viša doza mešavine (20 g/kg) vratila oba parametra na normalan nivo ($8428,18 \pm 573,65 \mu\text{m}^2$ i $13,52 \pm 0,67$) srazmeran onom uoćenim u ZK.



Grafik 29. Uticaj biljne mešavine na površinu glomerula (A) i broj proksimalnih tubularnih ćelija (B) dijabetiãnih životinja. ^a $p < 0.05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0.05$ u poređenju sa ZK.

Kao što je prikazano na grafiku 30, dijabetes indukovao aloksanom doveo je do velike akumulacije kolagena u tkivu netretiranih dijabetiãnih životinja u odnosu na zdravu kontrolnu grupu ($16,52 \pm 1,58$ i $7,69 \pm 1,16\%$, respektivno). Terapija insulinom nije imala uticaj na smanjenje kolagena, te je u ovoj eksperimentalnoj grupi distribucija kolagena u bubrezima iznosila $16,13 \pm 0,22\%$, dok je terapija metforminom blago smanjila depoziciju kolagena u ovom organu ($12,82 \pm 1,08\%$) u odnosu na dijabetiãne kontrole, ali nije ih normalizovala. Tretman biljnom mešavinom u potpunosti je normalizovao nivo kolagena u tkivu bubrega dijabetiãnih životinja ($7,42 \pm 1,05$ i $8,22 \pm 0,51\%$ u D-10 i D-20 eksperimentalnim grupama).

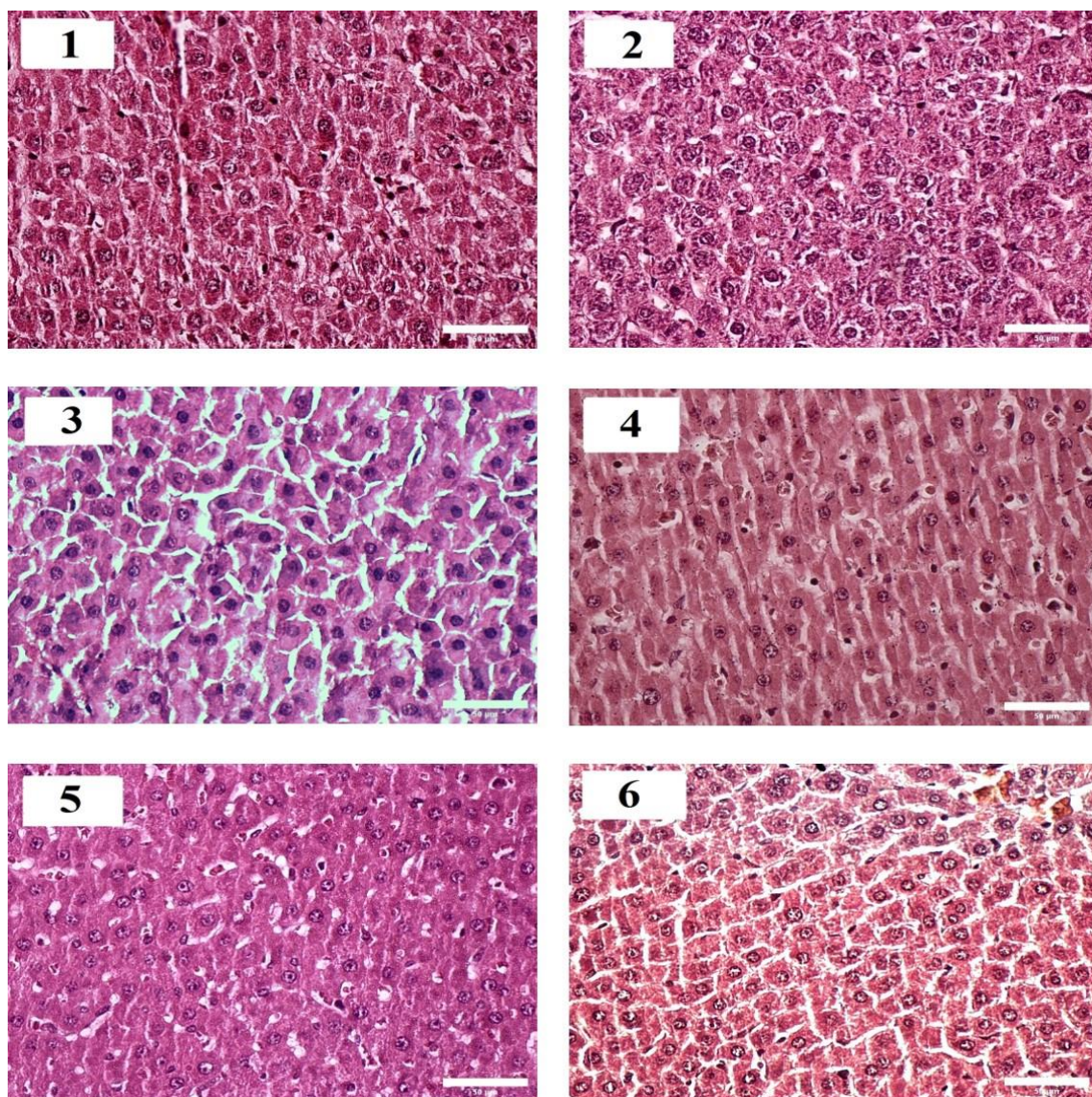


Grafik 30. Uticaj biljne mešavine na nivo kolagena u bubrezima dijabetičnih životinja. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

4.4.3.5. Uticaj biljne mešavine na tkivo jetre dijabetičnih životinja

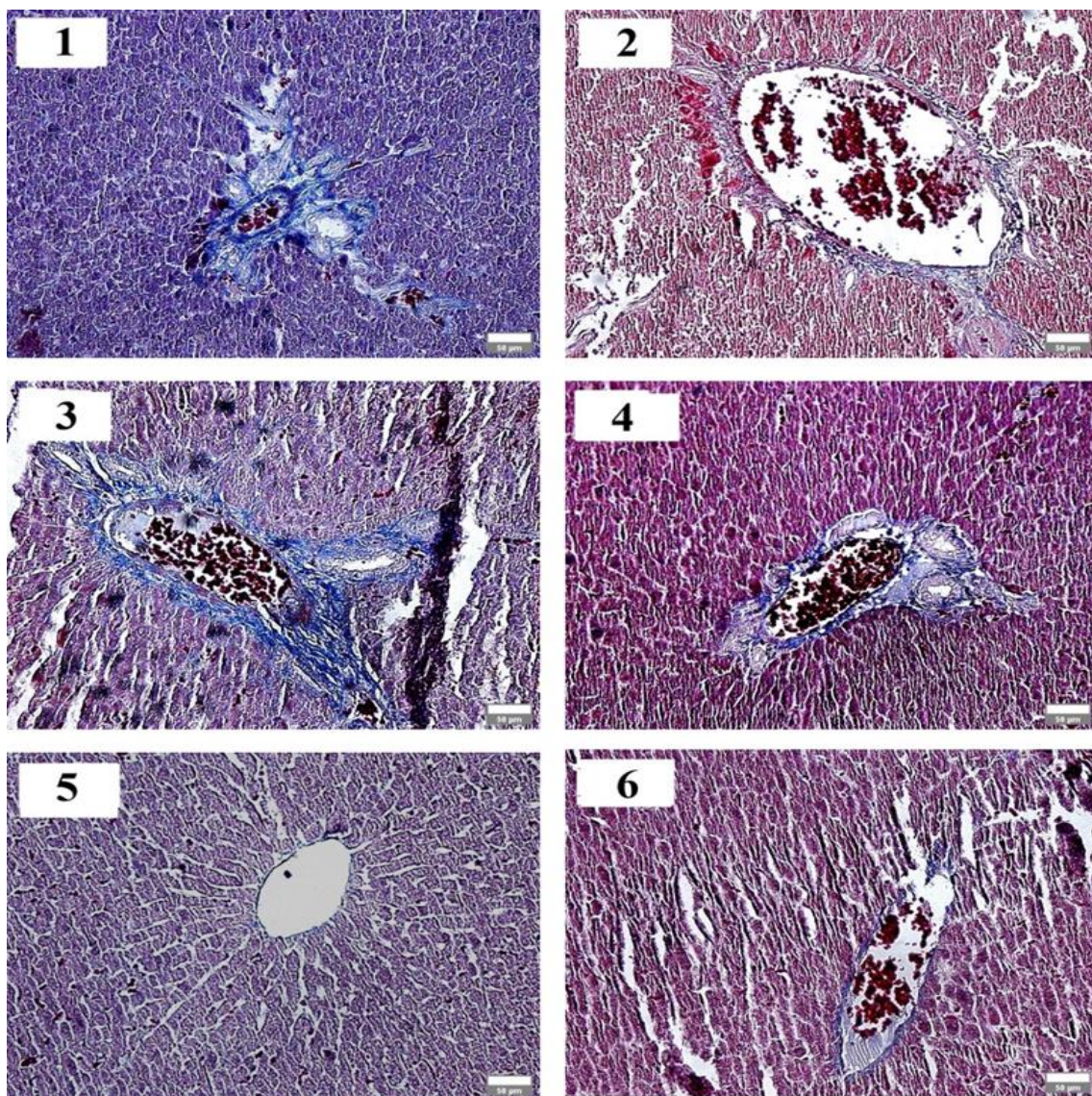
Potencijalna hepatoprotektivna aktivnost „anti-dijabetične“ biljne mešavine ispitana je histološkom analizom jetre eksperimentalnih životinja, pri čemu su, kao i u studiji ispitivanja sub-hronične oralne toksičnosti korišćena tri bojenja – H&E (slika 21), MT (slika 22) i PAS (slika 23).

Aloksanom-indukovan dijabetes doveo je do višestrukih poremećaja normalne morfološke strukture jetre. Tako, može se primetiti da su jedra i mononukleusnih i binukleusnih ćelija bila znatno sitnija i nepravilnog oblika u dijabetičnoj kontroli (slika 21 (1)), kao i u jetri dijabetičnih životinja tretiranih insulinom (slika 21 (2)) i metforminom (slika 21 (3)), u odnosu na zdravu kontrolnu grupu životinja (slika 21 (1)). Osim toga, jasno se vidi smanjenje broja hepatocita kao i povećanje broja Kupferovih ćelija u jetri netretiranih dijabetičnih životinja (slika 21 (1)) u odnosu na zdrave životinje ((slika 21 (2)). Nasuprot uticaju tretmana insulinom i metforminom, administracija obe doze biljne mešavine dovela je do normalizacije svih ovih parametara, te je u jetri životinja ovih eksperimentalnih grupa uočen normalan oblik i veličina jedra, normalan oblik i broj hepatocita i kao i normalna infiltracija Kupferovih ćelija (slika 21 (5, 6)).



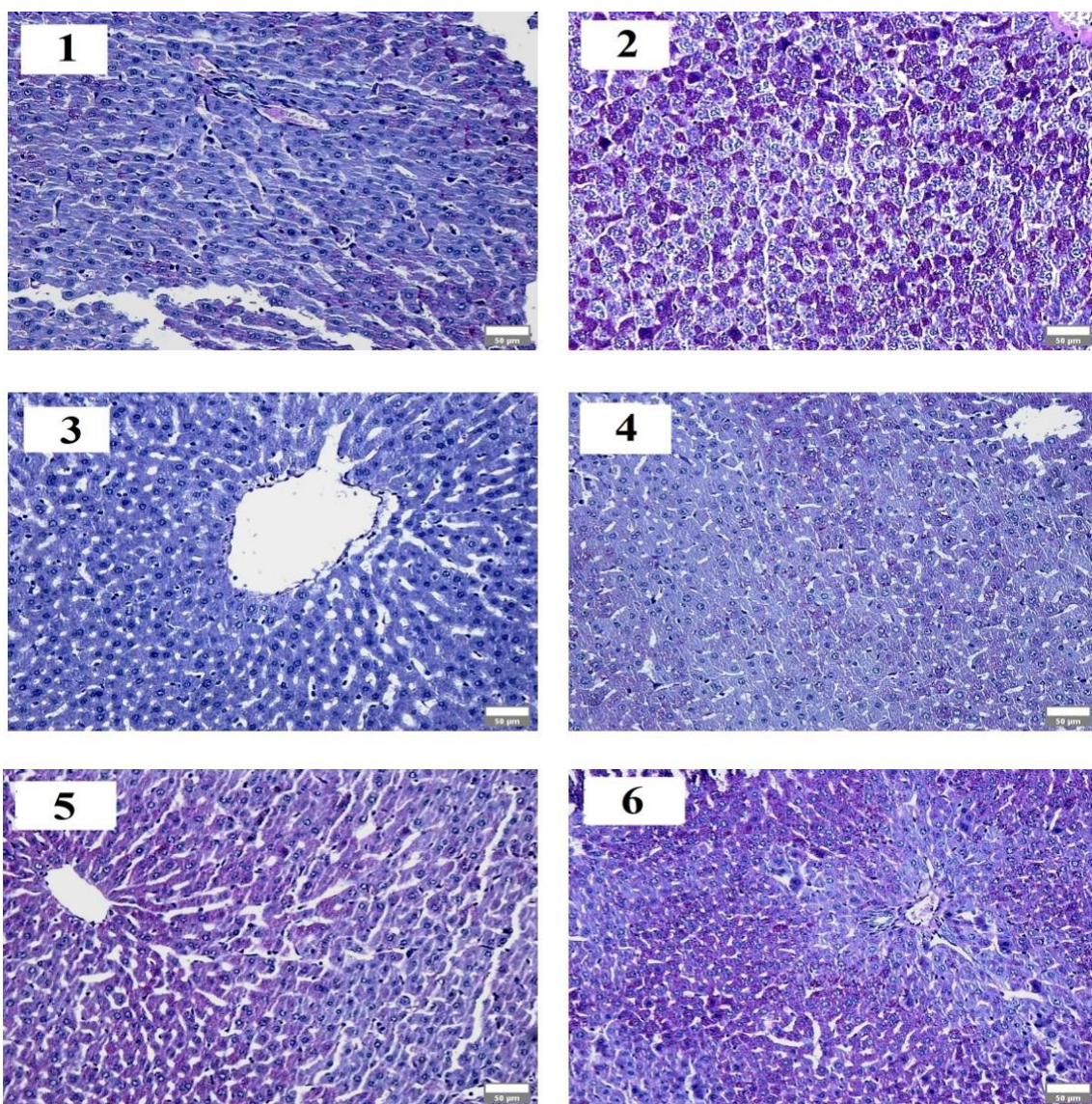
Slika 21. Tkivo jetre obojeno H&E metodom. 1: DK; 2: ZK; 3: I; 4: M; 5: D-10; 6: D-20. Uvećanje 400x. Skala 50 µm.

Osim toga, anilin plavo obojena vlakna hepatičnog kolagena bila su višestruko zadebljana u dijabetičnoj kontroli (slika 22 (1)), kao i u životinjama tretiranim insulinom (slika 22 (3)) i metforminom (slika 22 (4)) u odnosu na tanka rastresita vlakna kolagena uočenih kako u jetri zdravih životinja (slika 22 (2)) tako i u jetri dijabetičnih životinja tretiranim biljnom mešavinom (slika 22 (5,6)).



Slika 22. Tkivo jetre obojeno MT metodom. 1: DK; 2: ZK; 3: I; 4: M; 5: D-10; 6: D-20. Uvećanje 200x. Skala 50 µm.

Na histološkim preparatima jetre obojenim PAS metodom se može primetiti gotovo potpuno odsustvo hepatičnog glikogena kako u jetri netretiranih dijabetičnih životinja (slika 23 (2)), tako i u jetri dijabetičnih životinja tretiranih insulinom (slika 23 (3)) i metforminom (slika 23 (4)), dok je prisustvo ljubičasto obojenih granula glikogena jasno uočljivo u hepatocitima zdravih životinja (slika 23 (1)), kao i u hepatocitima dijabetičnih životinja tretiranih obema dozama „anti-dijabetične“ biljne mešavine (slika 23 (5, 6)).



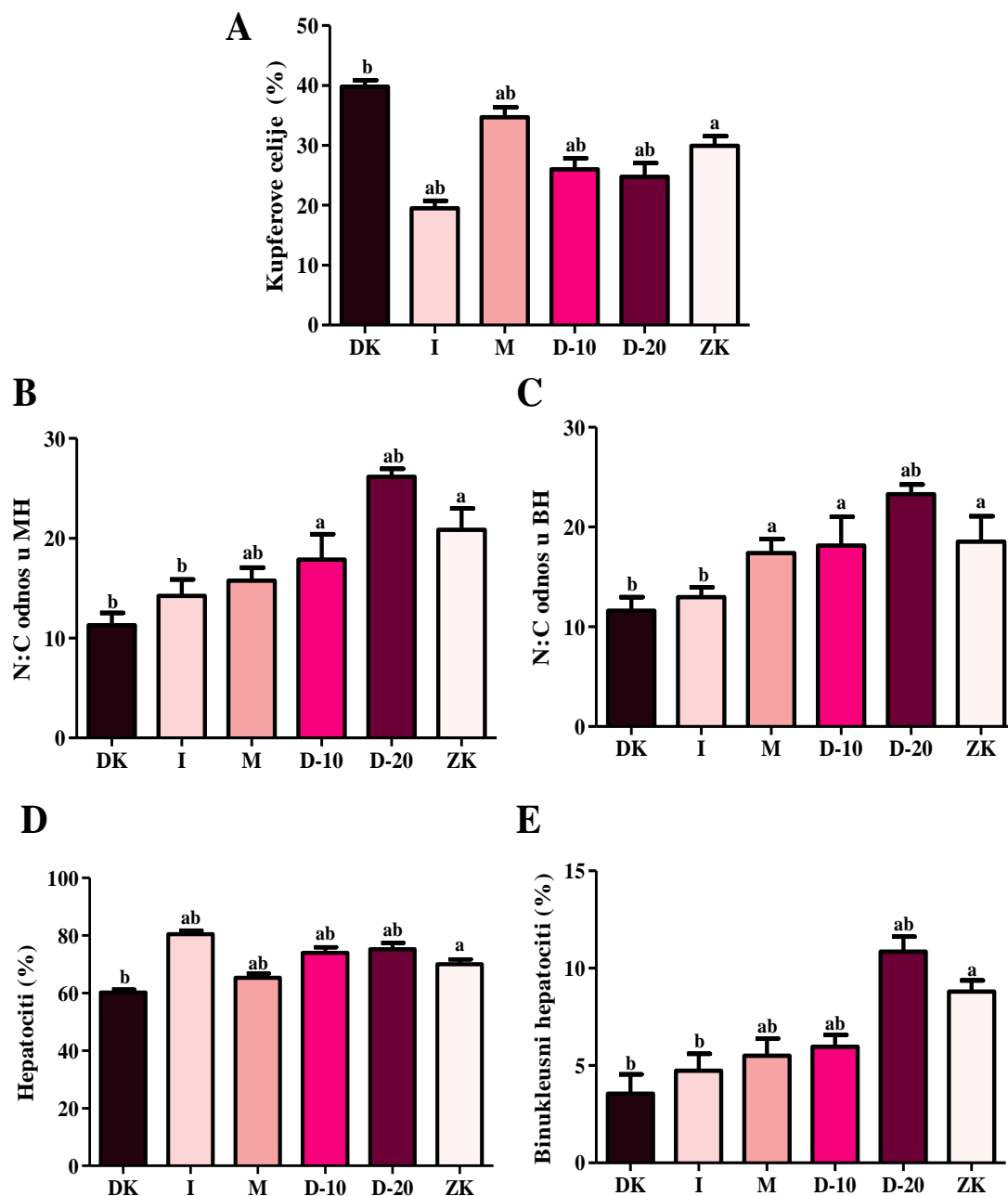
Slika 23. Tkivo jetre obojeno PAS metodom. 1: DK; 2: ZK; 3: I; 4: M; 5: D-10; 6: D-20. Uvećanje 200x. Skala 50 µm.

Kao i u eksperimentu ispitivanja sub-hronične toksičnosti, morfometrijska analiza je uključila sedam parametara, odnosno: broj Kupferovih ćelija prisutnih u jetri, odnos nukleusa i citoplazme (N:C) mononukleusnih (MH) i binukleusnih (BH) hepatocita, broj hepatocita, broj binukleusnih hepatocita, depozicija kolagena u jetri i broj hepatocita sa glikogenom (PAS pozitivni hepatociti).

Statistička analiza je pokazala da je broj Kupferovih ćelija u jetri bio značajno uvećan ($p < 0,001$) u dijabetičnoj ($39,83 \pm 1,06\%$) u odnosu na zdravu kontrolnu grupu ($29,93 \pm 1,62\%$). Tretman insulinom značajno je umanjio broj Kupferovih ćelija ($19,53 \pm 1,25\%$) u odnosu i na DK i na ZK, dok je tretman metforminom samo blago smanjio njihov broj ($34,74 \pm 1,59\%$) u odnosu na DK. Tretman biljnom mešavinom u potpunosti je normalizovao broj Kupferovih ćelija u jetri ($26,02 \pm 1,89$ i $24,79 \pm 2,27\%$ u D-10 i D-20 eksperimentalnim grupama), što je prikazano na grafiku 31 (A).

Osim toga, tretman aloksanom je takođe izazvao i značajno smanjenje odnosa nukleusa i citoplazme i u mononukleusnim ($11,29 \pm 1,24$) i u binukleusnim hepatocitima ($11,61 \pm 1,38$) netretiranih dijabetičnih životinja u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom ($20,86 \pm 2,14$ i $18,55 \pm 2,54$, respektivno). U odnosu na dijabetičnu kontrolu, terapija insulinom i metforminom blago je povećala N:C odnos i u mononukleusnim ($14,23 \pm 1,66$ u I grupi i $15,75 \pm 1,31$ u M grupi) i u binukleusnim hepatocitima (u $12,98 \pm 0,98$ I grupi i $17,4 \pm 1,41$ u M grupi). Tretman biljnom mešavinom doveo je do značajnog povećanja N:C odnosa u hepatocitima dijabetičnih životinja ($26,16 \pm 0,79$ i $23,29 \pm 0,98$ u mononukleusnim i binukleusnim hepatocitima, respektivno), kao što se vidi sa grafika 31 (B, C).

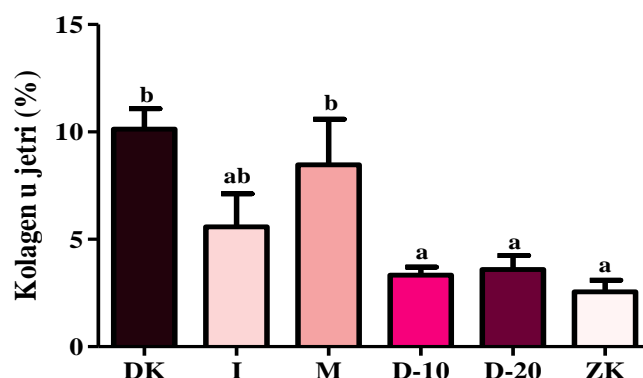
Pored toga, primećeno je značajno sniženje broja hepatocita, pogotovo binukleusnih, u dijabetičnoj kontroli ($60,17 \pm 1,07$ i $3,54 \pm 0,99\%$) u odnosu na zdravu kontrolu ($70,07 \pm 1,62$ i $8,79 \pm 0,57\%$). Administracija insulina i metformina, kao i niže doze biljne mešavine dovela je do povećanja oba parametra u odnosu na dijabetičnu kontrolu, te je ukupan procenat hepatocita u jetri u I grupi bio $80,47 \pm 1,25\%$, u M grupi $65,26 \pm 1,59\%$ a u D-10 grupi $73,95 \pm 1,89\%$, dok je procenat mononukleusnih hepatocita u I grupi iznosio $4,73 \pm 0,88\%$, u M grupi $5,51 \pm 0,88\%$, a u D-10 grupi $5,95 \pm 0,62\%$. Terapija biljnom mešavinom u višoj testiranoj koncentraciji (20 g/kg) pokazala se kao najefikasnija u normalizaciji ova oba parametra ($75,21 \pm 2,27$ i $10,85 \pm 0,76\%$) (grafik 31 (D, E)).



Grafik 31. Uticaj biljne mešavine na broj Kupferovih ćelija (A), N:C odnos u MH (B), N:C odnos u BH (C), ukupan broj hepatocita (D) i broj BH (E) u jetri dijabetičnih životinja. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

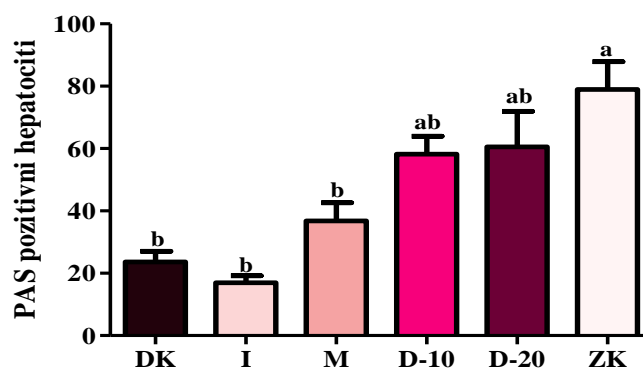
Kao i u slučaju uočenom u analizi tkiva pankreasa i bubrega, tretman aloksanom izazvao je značajno povećanje ($p < 0,001$) depozicije kolagena u jetri dijabetičnih životinja ($10,13 \pm 0,94\%$) u odnosu na zdravu kontrolu ($2,56 \pm 0,53\%$). Do kraja eksperimenta, tretman insulinom i metforminom snizio je povećani nivo kolagena u jetri ($5,59 \pm 1,53\%$ u I grupi i $8,47 \pm 2,11$ u M grupi) u odnosu na DK, dok je terapija obema koncentracijama biljne mešavine u potpunosti

normalizovala depozit hepatičnog kolagena ($3,33 \pm 0,37$ i $3,59 \pm 0,65\%$ u D-10 i D-20 eksperimentalnim grupama), što je prikazano na grafiku 32.



Grafik 32. Uticaj biljne mešavine na nivo kolagena u jetri dijabetičnih životinja ^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

Takođe, analizom isečaka obojenim PAS metodom primećeno je da je procenat hepatocita sa glikogenom značajno niži u netretiranoj grupi dijabetičnih životinja ($23,65 \pm 3,37\%$), kao i u grupama dijabetičnih životinja tretiranim insulinom ($16,96 \pm 2,27\%$) i metforminom ($36,8 \pm 5,81\%$), nego u zdravoj kontrolnoj grupi ($78,99 \pm 8,89\%$), dok je tretman biljnom mešavinom normalizovao je broj ovih ćelija ($58,23 \pm 5,75$ i $60,53 \pm 11,44\%$ u D-10 i D-20 grupama) (grafik 33).



Grafik 33. Uticaj biljne mešavine na broj PAS pozitivnih hepatocita dijabetičnih životinja. ^a $p < 0,05$ u poređenju sa DK. ^b $p < 0,05$ u poređenju sa ZK.

5. DISKUSIJA

Rezultati ove disertacije su od posebnog značaja jer predstavljaju prvo ispitivanje prevalencije korišćenja narodne medicine na teritorije cele Srbije (Madić i sar., 2018). Pored toga predstavljaju i prvo ispitivanje citotoksičnosti i anticitotoksičnosti listova kupine i borovnice, rizoma žute steže, nadzemnog dela zečije stope i mahuna pasulja, kao i prvo ispitivanje genotoksičnosti i antigenotoksičnosti pomenutog bilja (Madić i sar., 2019), i, što je najvažnije, prvo sveobuhvatno *in vitro* i *in vivo* ispitivanje „anti-dijabetične“ biljne mešavine tradicionalno korišćene u tretmanu dijabetesa (Madić i sar., 2019; Madić i sar., 2020).

5.1. Prevalenca korišćenja narodne medicine u Srbiji

U ispitivanju upotrebe narodne medicine kao terapije učestvovala su osobe sa dijagnostikovanim dijabetesom, i one bez dijabetesa. Od celokupnog broja svih ispitanika, 67,7 % se izjasnilo da redovno koristi lekovito bilje i/ili farmaceutske suplemente bazirane na njemu. Uočena niža upotreba narodne medicine na teritoriji cele Srbije u odnosu na upotrebu u pojedinim regionima (Pieroni i sar., 2011; Damjanović i sar., 2015) može se objasniti činjenicom da teritorijalnu dostupnost zdravstvenih ustanova, kao i povećanje stepena obrazovanja i ekonomskog statusa, prati smanjenje učestalosti korišćenja etnofarmakoloških pristupa. Imajući na umu da se svi ispitanici sa dijabetesom pridržavaju moderne farmakoterapije, dok se čak četvrtina ispitanika bez dijabetesa oslanja isključivo na narodnu medicinu, može se doći do zaključka da je savremena zdravstvena zaštita lako dostupna u slučaju ozbiljnih hroničnih bolesti kao što je dijabetes, ali ne tako pristupačna zdravim ljudima.

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da su žene sklonije tradicionalnim metodama lečenja (grafik 1), što se poklapa sa dosadašnjim istraživanjima ovog tipa (Shih i sar., 2012; Kristoffersen i sar., 2014). Najveći broj ispitanika kupuje lekovito bilje i /ili suplemente u apotekama (58%) i kod akreditovanih travara (30%) što govori da je kvalitet i laka dostupnost terapija od presudnog značaja ispitanicima (Madić i sar., 2018).

Interesantan je podatak da se i na našem podneblju znatno više upotrebljavaju biljne mešavine i farmaceutske suplementi zasnovani na tradicionalnim recepturama nego pojedinačno lekovito bilje. Upravo je iz tog razloga najveći deo ovog istraživanja posvećen ispitivanju bioloških aktivnosti jedne od najčešće korišćenih biljnih mešavina u ovim krajevima (Madić i sar., 2019), sastavljene od listova kupine i borovnice, rizoma žute steže, nadzemnog dela zečije stope i mahuna pasulja (Künzle, 1911).

5.2. Fitohemijaska analiza

Drugi deo ove studije sastojao se od preliminarne fitohemijske analize, odnosno određivanja ukupnog sadržaja fenola i flavonoida dekokta, metanolnih i etanolnih ekstrakata, kako ispitivane „anti-dijabetične“ biljne mešavine, tako i njenih pojedinačnih sastojaka. Osim toga, urađena je identifikacija glavnih bioaktivnih konstituenata dekokta same biljne mešavine.

Fitohemijaska analiza je ukazala na visok sadržaj fenola i flavonoida u svim ispitivanim ekstraktima, osim ekstrakata pasuljevine (tabela 1). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su potvrdila da su glavna bioaktivna jedinjenja listova borovnice i kupine kao i rizoma žute steže i nadzemnog dela zečije stope upravo polifenoli (Vogl i sar., 2013; Oszmiański i sar., 2015; Tomczyk i Latté, 2009; Ferlemi i Lamari, 2016; Abu-Shandi i sar., 2015; Dimitrova i sar., 2017a). Detaljnija analiza hemijskog sastava dekokta biljne mešavine *HPLC-UV* metodom utvrdila je prisustvo 10 biološki aktivnih jedinjenja u dekoktu biljne mešavine, a to su: izokvercetin (22,8%), galna kiselina (18,23%), rutin (15,14%), kvercitrin (12,46%), arbutin (10,85%), hininska kiselina (9,09%), kaftarinska kiselina (5,85%), hiperozid (5,21%), astragalin (3,84%), trifolin (3,54%) (slike 6, 7 i 8, tabela 9).

5.3. *In vitro* studija

Antioksidativna aktivnost bila je visoka kod gotovo svih ispitivanih ekstrakata (grafici 2, 3 i 4). Izuzev svih ekstrakata pasuljevine i etanolnog ekstrakta zečje stope, svi ostali testirani ekstrakti pokazali su jaču antioksidativnu aktivnost ($p < 0,001$) od komercijalno dostupnog BHA korišćenog kao standard, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjem, koje je pokazalo da polifenoli prirodnog porekla uglavnom imaju isti ili veći antioksidativni kapacitet od sintetičkih antioksidanata poput BHA (Kim i Li, 2004).

S obzirom na to da hronična hiperglikemija često dovodi do slabljenja imunskog sistema (Groza i sar., 2011; Yu i sar., 2015; Volpe i sar., 2018) i pojačanoj osetljivosti prema bakterijskim infekcijama (Forland i sar., 1977; Chavance i sar., 1989) u ovom radu ispitana je i antimikrobna aktivnost dekokata, etanolnih i metanolnih ekstrakata, kako „anti-dijabetične“ biljne mešavine, tako i njenih sastojaka. Većina testiranih ekstrakata pokazala je umerenu do slabu antimikrobnu aktivnost, dok je visoka aktivnost uočena jedino kod vodenog ekstrakta žute steže, metanolnog ekstrakta zečje stope, kao i metanolnih i etanolnih ekstrakata „anti-dijabetične“ biljne mešavine i pasuljevine (tabele 3, 4 i 5). Primećena je povezanost uočene antimikrobne aktivnosti ekstrakata ispitivanih u ovoj studiji i sadržaja fenola i flavonoida prisutnih u njima (tabela 1), što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima u kojima je

primećeno da su za antimikrobnu aktivnost listova kupine većim delom zaslužni flavonoidi i tanini (Gudej i Tomczyk, 2004), listova borovnice polifenoli (Kokoska i sar., 2002), a žute steže polifenoli, tanini i katehini (Synowiec i sar., 2014; Dróždž i sar., 2019, Grujić-Vasić i sar., 2006).

„Anti-dijabetična“ biljna mešavina je, u odnosu na njene pojedinačne sastojke, pokazala antimikrobnu aktivnost prema znatno širem spektru mikroorganizama, pre svega u borbi protiv stafilokoka. Uočena antimikrobna aktivnost je veoma značajna budući da infekcija stafilokokama može dovesti do brojnih komplikacija, poput endokarditisa, sepse (Leung i sar., 1993; Lesens i sar., 2004; Adem i sar., 2005; Tong i sar., 2015; Vogel i sar., 2016), osteomijelitisa i ulcera koji, pak, kod dijabetičara mogu dovesti do znatno većih komplikacija nego kod zdravih ljudi (Elasri i sar., 2002; Mathias i sar., 2012; Petković i sar., 2020). Pored toga, biljna mešavina je imala blagu inhibitornu aktivnost i prema rastu patogenog soja *S. enterica*, koja nekad, kod imunološki oslabljenog organizma, poput ljudi sa neregulisanim dijabetesom, može dovesti do razvoja *emphysematous cholecystitis*-a (Moanna i sar., 2006). Vodeni i etanolni ekstrakti „anti-dijabetične“ biljne mešavine uspešno su sprečili rast *B. cereus*, patogena poznatog po kolonizaciji gastrointestinalnog trakta, često povezanim sa trovanjem hranom (Stenfors Arnesen i sar., 2008; Ehling-Schulz i sar., 2015), koji kod dijabetičara može izazvati i druge probleme, poput nekroze kože (Michelotti i Bodansky, 2015). Osim navedenog, vodeni ekstrakt „anti-dijabetične“ biljne mešavine je slabije sprečavao i rast *P. aeruginosa*, uzročnika respiratornih infekcija (Ryan i Ray, 2004) kojima su dijabetičari, usled oslabljenog imuniteta, podložniji od zdravih osoba. Osim toga, etanolni i metanolni ekstrakti biljne mešavine pokazali su i veliku sposobnost u sprečavanju rasta *C. albicans*, uzročnika sistemskih gljivičnih oboljenja gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta (Hospital, 1982; Hostetter, 1990; Monea i sar., 2017) koja se kod dijabetičara teže iskorenjuje, što u najtežim slučajevima može dovesti čak i do nekroze tkiva bubrega i cistitisa urinarnog trakta (Tomashefski i Abramowsky, 1981; Singh i Lytle, 1983).

Citotoksičnost biljnih ekstrakata može se, na osnovu upoređivanja hemolitičke aktivnosti ekstrakta i negativne kontrole, klasifikovati u 4 kategorije: (1) neutralna, kada je hemolitička aktivnost testiranog ekstrakta slična onoj uočenoj u negativnoj kontroli, (2) slaba, kada je hemoliza manja od 20%, (3) jaka, kada je hemoliza između 20 i 50% i (4) visoka, kada je hemolitička aktivnost viša od 50% u odnosu na negativnu kontrolu (Khalili i sar., 2014; Antosiewicz, 1990). Uzevši u obzir ovaj podatak, može se primetiti da je citotoksična aktivnost najvećih testiranih koncentracija (1250 µg/mL) svih dekokata (grafik 5), etanolnog ekstrakta zečje stope (grafik 6) i metanolnog ekstrakta pasuljevine, bila neutralna (grafik 7), slaba kod

etanolnih ekstrakata borovnice, pasuljevine, kupine, žute steže (grafik 6) kao i kod metanolnih ekstrakata borovnice, žute steže, „anti-dijabetične“ biljne mešavine, kupine i zečje stope (grafik 7), dok je jaka citotoksičnost zabeležena jedino kod etanolnog ekstrakta „anti-dijabetične“ biljne mešavine (grafik 6), u ovom eksperimentalnom modelu.

Rezultati ispitivanja antihemolize pokazali da modulatorni tretmani niskim koncentracijama (25 i 50 $\mu\text{g/mL}$) svih ispitivanih ekstrakata, osim etanolnog ekstrakta biljne mešavine, sprečavaju oštećenja ćelijske membrane eritrocita izazvana vodonik-peroksidom (grafici 8, 9 i 10). Na osnovu činjenice da se supstanca koja inhibira toksičnost više od 40% smatra jakim antitoksičnim agensom (Antosiewicz, 1990), može se primetiti da su svi ispitivani ekstrakti korišćeni u niskim koncentracijama, sa izuzetkom etanolnih ekstrakata biljne mešavine i žute steže (grafik 9) i metanolnog ekstrakta žute steže (grafik 10), pokazali izuzetno jaku sposobnost zaštite od citotoksičnog dejstva prevelike količine reaktivnih vrsta kiseonika. Najbitniji rezultat ovog ispitivanja svakako je to što su svi testirani dekokti, kao i etanolni ekstrakt zečje stope i metanolni ekstrakti svih testiranih biljaka osim žute steže, u najnižim testiranim koncentracijama imali veću citoprotektivnu moć od one zabeležene pri korišćenju jednake koncentracije komercijalno dostupnog standarda, vitamina C ($p < 0,001$).

Poređenjem rezultata ispitivanja antioksidativne aktivnosti lekovitog bilja ispitivanog DPPH testom i antihemolitičkim testom, mogu se primetiti izvesne razlike. Naime, žuta steža je u DPPH testu imala znatno veću antioksidativnu aktivnost nego u testu antihemolize eritrocita, dok je situacija sa pasuljevinom bila suprotna, tj, iako je DPPH test pokazao izuzetno slab antioksidativni kapacitet svih ekstrakata ove biljke, rezultati antihemolitičkog eksperimenta pokazali su da je antioksidativna aktivnost njenih vodenih i metanolnih ekstrakata jača od antioksidativne aktivnosti askorbinske kiseline ($p < 0,001$). Takođe je DPPH testom utvrđena pozitivna, a u testu antihemolize negativna korelacija antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja polifenola i flavonoida ispitivanih ekstrakata. Prethodno opisane razlike su najverovatnije posledica razlike u samim mehanizmima ovih testova. Naime, u hemijskim *in vitro* testovima, kao što je DPPH test, antioksidativna aktivnost je direktno povezana sa koncentracijom aktivnih antioksidansnih molekula (Blois, 1958). Sa druge strane, biološki *in vitro* testovi, poput testova hemolize i antihemolize eritrocita, znatno su osetljiviji na bioaktivne sastojke lekovitog bilja kao što su polifenoli, saponini i tanini, koji u višim koncentracijama mogu imati citotoksično dejstvo (Gudej i Tomczyk, 2004; Tomczyk i Latté, 2009; Spiridonov i sar., 2005). Na osnovu ove opservacije, može se uvideti izuzetan značaj uporednog korišćenja hemijskih i bioloških metoda u ispitivanjima ovog tipa.

Zanimljivo je da etanolni ekstrakt „anti-dijabetične“ biljne mešavine, za razliku od dekokta i metanolnog ekstrakata, nije pokazao nikakvu citoprotektivnu aktivnost, već nasuprot, pokazao je jaku citotoksičnost i u testu hemolize i u testu antihemolize. S obzirom da je u fitohemijskoj analizi biljne mešavine uočena značajna razlika u proporciji prinosa ekstrakcije i ukupnog sadržaja fenola i flavonoida kod dekokata i metanolnih ekstrakata u odnosu na njene etanolne ekstrakte (tabela 1), pomenuta citotoksična aktivnost etanolnog ekstrakta mogla bi se objasniti eventualnim obrazovanjem kompleksnih jedinjenja rastvorljivih u vodi i metanolu, ali ne i etanolu, ili, verovatnije, većom rastvorljivošću drugih bioaktivnih jedinjenja, poput proteina i ugljenih hidrata, u vodi i metanolu (Zieliński i Kozłowska, 2000).

Sirovi ekstrakti lekovitog bilja su kompleksne mešavine bioaktivnih supstanci, koje mogu delovati sinergistički, aditivno ili antagonistički (Prajitha i Thoppil, 2016), što naročito dolazi do izražaja u polih herbalnim preparatima. Primećena citotoksičnost etanolnog ekstrakta „anti-dijabetične“ biljne mešavine upućuje da odabir adekvatnog rastvarača ne utiče samo na bolji prinos i viši antioksidativni kapacitet (Do i sar., 2014), nego deluje i na nivo citotoksičnosti i/ili anticitotoksičnosti samog ekstrakta.

Poredeći antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost sa citotoksičnom aktivnošću dekokta, etanolnih i metanolnih ekstrakata „anti-dijabetične“ biljne mešavine primećeno je da dekokte karakteriše i izuzetno mala citotoksična aktivnost pored već postojeće izuzetne antioksidativne aktivnosti, i u DPPH testu i u testu antihemolize eritrocita, kao i solidnog antimikrobnog potencijala. S obzirom na to, odlučeno je da se u nastavku istraživanja dodatno ispita i potencijalna genotoksičnost i antigenotoksičnost samo dekokata biljne mešavine i njenih pojedinačnih sastojaka.

Svi testirani dekokti u testiranju genotoksičnosti imali su koncentracijski zavisani mitodepresivni efekat, što se podudara sa prethodnim istraživanjima, koja su pokazala da ekstrakti lekovitog bilja, sa porastom testirane koncentracije, uglavnom snižavaju normalan rast ćelijske deobe u meristemskim ćelijama *A. cepa* (Frescura i sar., 2013; Prajitha i Thoppil, 2016; Aşkin Celik i Aslantürk, 2010). S obzirom na to da je efekat koji neka supstanca ima na promenu mitotskog indeksa merilo citotoksičnosti u svim živim organizmima (Smaka-Kincl i sar., 1996) i da 22-50% njegovog smanjenja u odnosu na negativnu kontrolu uglavnom upućuje na subletalni efekat ispitivane supstance (Antosiewicz i sar., 1990), na osnovu rezultata ove studije se može zaključiti da je citotoksični efekat testiranog lekovitog bilja bio: *P. vulgaris* < *V. myrtillus* < „anti-dijabetična“ biljna mešavina < *G. urbanum* < *R. fruticosus* < *P. erecta*, kao i da su svi testirani ekstrakti, izuzev dekokta *P. erecta*, pokazali srednji nivo citotoksične aktivnosti u ovom eksperimentalnom modelu (grafik 11). Zasnovano na procentu

hromozomskih aberacija izazvanih najvišim testiranim koncentracijama ispitivanih dekokata (grafik 12), može se primetiti da je genotoksični efekat testiranih ekstrakata bio: „anti-dijabetična“ biljna mešavina < *R. fruticosus* < *V. myrtillus* < *G. urbanum* < *P. erecta* < *P. vulgaris*.

U literaturi je već opisan kako mehanizam nastanka, tako i posledice nastanka uočenih hromozomskih aberacija. C-mitoza nastaje kao posledica inaktivacije deobnog vretena (slika 9 (3)) (Levan, 1938) i indikator je blage toksičnosti testirane supstance (Fiskesjo, 1985). Slepljeni hromozomi (slika 9 (6)) su posledica nepravilnog savijanja hromatina u procesu obrazovanja pojedinačnih hromatida i hromozoma (Kláštorská i sar., 2009; McGill i sar., 1974). Fragmentisani hromozomi (slika 9 (5, 12a, 16)) nastaju usled nedovršene reparacije i/ili greške u reparaciji DNK (Stevens i sar., 2011). Lutajući i zaostajući hromozomi (slika 9 (11, 15)) nastaju usled oštećenja deobnog vretena (Rank i Nielsen, 1994; Redli i sar., 2016) dok su hromozomski mostovi (slika 9 (12b, 17)) posledica fuzije i nemogućnosti razdvajanja telomera sestrinskih hromatida (Chan i Hickson, 2011). Uočeni fragmentisani, lepljivi, vezani, lutajući i zaostajući hromozomi, kao i hromatinski mostovi u meristemskim ćelijama *A. cepa* su većinom ireverzibilne prirode i indikatori su visoke toksičnosti testiranog ekstrakta (Fiskesjo, 1985).

Na osnovu poređenja mitotskog indeksa (grafik 11) i procenta ćelija sa hromozomskim aberacijama (grafik 12), može se primetiti da većina testiranih ekstrakata pokazuje blag citotoksičan efekat, ali i da neki od njih deluju kao jaki genotoksični agenti. Citotoksična aktivnost *P. vulgaris* bila je veoma slaba, za razliku od njene izuzetno velike genotoksičnosti, dok je dekokt *P. erecte* imao visok i citotoksični i genotoksični efekat. Za razliku od svog testiranog lekovitog bilja u ispitivanju genotoksičnosti, koje je indukovalo uniformnu i dozno-zavisnu akumulaciju hromozomskih aberacija u svim fazama ćelijskog ciklusa, dekokt *V. myrtillus* nije izazvao takav vid akumulacije aberacija u profazi. Naime, najviše testirane koncentracije ovog ekstrakta indukovale su najmanji procenat c-mitoza (tabela 7), pa se može zaključiti da je od svih testiranih ekstrakata, tretman *V. myrtillus* izazvao najveću akumulaciju ireverzibilnih oštećenja genetskog materijala u datom modelu, što ovaj dekokt, zajedno sa dekoktom pasuljevine, svrstava u lekovito bilje sa visokim stepenom potencijalne genotoksičnosti. *G. urbanum* imao je umeren citotoksični i genotoksični potencijal, dok je *R. fruticosus* pokazala umeren citotoksični i veoma nizak genotoksični kapacitet. Najmanji genotoksični efekat imala je „anti-dijabetična“ biljna mešavina, što upućuje na zaključak da je najbezbednija upotreba ispitivanog lekovitog bilja upravo u formi biljne mešavine napravljene po precizno definisanoj recepturi.

Uočeno smanjenje mitotskog indeksa i porast nivoa hromozomskih aberacija može biti objašnjeno dejstvom testiranih ekstrakta na samu sintezu neukleoproteina, kao i smanjenjem dostupnog ATP-a potrebnog za obrazovanje deobnog vremena i pokretanje mikrotubula i hromozoma (Majewska i sar., 2003). U svakom slučaju, nijedan testirani ekstrakt nije izazvao akumulaciju broja ćelija u profazi praćenu fragmentacijom hromozoma poput one uočenoj u pozitivnoj kontroli, što ukazuje na to da nije došlo do blokade mitotskog ciklusa u CHFR tački koja sprečava tranziciju iz profaze u metafazu (Scolnick i Halazonetis, 2000).

Svi testirani uzorci u *A. cepa* testu antigenotoksičnosti pokazali su preventivnu aktivnost u smislu, kako redukovanja, tako i reverzije citoloških aberacija indukovanih dejstvom vodonik-peroksida (grafik 15). Naime, pri izlaganju ovom jedinjenju, ćelije prolaze kroz izuzetno povišen nivo oksidativnog stresa, što uzrokuje pojavu hromozomskih aberacija (Prajitha i Thoppil, 2016) vidljivih u svim fazama mitotskog ciklusa (tabela 9).

Pri proceni antigenotoksičnog potencijala ekstrakata lekovitog bilja smatra se da ekstrakt poseduje snažan antimutageni efekat ukoliko je procenat inhibiranja dejstva mutagena veći od 40%, (Prajitha i Thoppil, 2016). Shodno tome, rezultati ovog istraživanja pokazali su da svi testirani dekolti u određenim koncentracijama poseduju visok antogenotoksičan efekat (grafik 15). Dekolti kupine, borovnice, žute steže i pasuljevine imali su maksimalan antigenotoksični efekat u koncentraciji 70 µg/mL, dok su dekolti zečje stope i „anti-dijabetične“ biljne mešavine maksimalan antimutageni potencijal pokazali pri korišćenju u duplo nižoj dozi (45 µg/mL).

Skoro svi testirani dekolti, izuzev najniže testirane koncentracije žute steže (20 µg/mL), su u svim testiranim koncentracijama uspeli da smanje procenat hromozomskih aberacija u profazi, dok su dekolti biljne mešavine i pasuljevine snizili procenat ćelija sa aberantnim hromozomima u svim fazama ćelijskog ciklusa (tabela 9). Imajući na umu da je najčešća aberacija u testiranju antigenotoksičnosti uočena u profazi bila c-mitoza, kao i da je c-mitoza lako reverzibilna aberacija, dok su lepljivi hromozomi, mostovi u anafazi i telofazi, fragmentisani i lutajući hromozomi znatno ireverzibilnije prirode (Fiskesjo, 1985), može se zaključiti da su, od svih testiranih ekstrakata, jedino ekstrakti biljne mešavine (45 i 70 µg/mL) i pasuljevine (70 µg/mL) uspeli da saniraju čak i gotovo ireverzibilne poremećaje genetskog materijala izazvane ROS-om u ovom modelu.

Uzevši u obzir rezultate ispitivanja genotoksičnosti i antigenotoksičnosti, može se istaći da se sve testirane lekovite biljke kao i sama biljna mešavina mogu kategorisati kao „Janus kancerogena i mutagena“ (Zeiger, 2003). U niskim dozama one imaju blagotvoran efekat na neutralisanje viška slobodnih radikala, dok u visokim dozama one pojačavaju njihovo štetno dejstvo. Uočena genotoksičnost i antigenotoksičnost posledica je bioaktivnih jedinjenja

prisutnog u dekoktu ovog lekovitog bilja (tabela 1). Naime, studije su pokazale da upotreba polifenola i tanina u visokim koncentracijama može uzrokovati brojne toksične reakcije, pa i indukciju hromozomskih aberacija (Pérez-Carreón i sar., 2002; Paolini i sar., 2003a, 2003b).

Rezultati ipitivanja citotoksičnosti *A. cepa* testom (grafici 11 i 13) podudarali su se sa rezultatima dobijenim testom hemolize/antihemolize eritrocita (grafici 5 i 8). Naime su svi testirani ekstrakti pri nižim koncentracijama (25, 50 i 100 µg/mL) pokazali visoku antihemolitičku aktivnost, odnosno sprečavanje citotoksičnog uticaja povišenog nivoa reaktivnih vrsta kiseonika, ali je zanimljivo i to da nijedna testirana doza pasuljevine nije prouzrokovala hemolitičku reakciju, što potvrđuje rezultate *A. cepa* testa, kojim je pokazano da dekokt mahuna pasulja nema citotoksični efekat delovanja na ćelijsku membranu. Visoke doze drugih ekstrakata prouzrokovale su hemolizu eritrocita, potvrđujući svoju „Janus“ prirodu potencijalne citotoksičnosti. Najveću hemolitičku aktivnost uzrokovali su dekokti lista kupine i rizoma žute steže, što je najverovatnije posledica njihovog visokog sadržaja tanina i triterpenoidnih saponina (Gudej i Tomczyk, 2004; Tomczyk i Latté, 2009; Spiridonov i sar., 2005).

Pošto je svim prethodnim rezultatima ispitivanja *in vitro* ukazano na višestruku prednost korišćenja ovog lekovitog bilja u formi mešavine u odnosu na korišćenje pojedinačnog bilja, odlučeno je da se u finalnom delu ovog rada dodatno proveriti potencijalna toksičnost same „anti-dijabetične“ biljne mešavine i na animalnom modelu i dokaže efikasnost njene primene u etnofarmakološkom tretmanu lečenja dijabetesa, na modelu pacova sa dijabetesom tip 1.

5.4. *In vivo* studija

Na osnovu rezultata akutnog ispitivanja oralne toksičnosti, gde biljna mešavina, primenjena u koncentraciji do 40 g (suve biljne mase)/kg nije pokazala nijedan toksični efekat, za dalju analizu, odnosno za sub-hronično ispitivanje oralne toksičnosti odabrane su tri koncentracije: 10, 20 i 40 g/kg. U ovom eksperimentu, zdrave životinje su mesec dana tretirane već pomenutim trima koncentracijama dekokta biljne mešavine, pri čemu je njen efekat proučavan u nekoliko nivoa, i to uticaj na procenat promene telesne mase životinja, nivo šećera u krvi, lipidni status i histološke promene tkiva pankreasa, bubrega i jetre.

Rezultati sub-hroničnog ispitivanja oralne toksičnosti pokazali su da sve testirane koncentracije biljne mešavine snižavaju povećanje telesne mase eksperimentalnih životinja (grafik 16). S obzirom da su izokvercetin i galna kiselina najzastupljenija bioaktivna jedinjenja u dekoktu ove mešavine (tabela 2), rezultati se poklapaju sa rezultatima prethodnih studija.

Naime, izokvercetin se može metabolisati u kvercetin (Yin i sar., 2019), a suplementacija kvercetinom inhibira adipogenezu i lipogenezu (Zhao i sar., 2017), dok galna kiselina ima sposobnost da reguliše prekomerno dobijanje telesne mase kroz aktivaciju adenozin monofosfatom aktivirane proteinske kinaze (engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase* – AMPK) (Doan i sar., 2015).

Dvadeset osam dana tretmana zdravih životinja svim testiranim koncentracijama biljne mešavine dovelo je do blagog pada šećera u krvi svih tretiranih životinja u odnosu na netretiranu zdravu kontrolu (tabela 10). S obzirom da je tretman doveo do blagog sniženja broja ćelija Lanerhansovih ostrvaca (grafik 18), može se zaključiti da je uočeno sniženje šećera u krvi najverovatnije posledica povećanja sinteze insulina, smanjene apsorpcije ugljenih hidrata i pojačane osetljivosti insulinskih receptora. Naime, rutin, osim što umanjuje apsorpciju ugljenih hidrata u samom digestivnom traktu, on, takođe inhibira glukoneogenezu i olakšava unos glukoze u ćelije (Naik i sar., 1991; Mezei i sar., 2003; Sarkhail i sar., 2007; Ghorbani, 2017). Osim toga, galna kiselina povećava sintezu insulina u već postojećim β -ćelijama (Punithavathi i sar., 2011) i, uz to, olakšava insulin-zavisani transport glukoze kroz translokaciju i aktivaciju GLUT4 insulinskih receptora u PI3k/p-Akt signalnom putu (Gandhi i sar., 2014). Takođe, studije su pokazale da izokvercetin inhibira α -glukozidazu kod pacova (Shibano i sar., 2008), humanu α -amilazu (Li i sar., 2009) i transport šećera posredovan glukoznim transporterom GLUT2 (Kwon i sar., 2007), dok kvercitrin i hiperozid takođe inhibiraju aktivaciju α -glukozidaze (Hanamura i sar., 2005; Islam i sar., 2013).

Tretman biljnom mešavinom u svim testiranim koncentracijama snizio je nivo triglicerida i VLDL-a u krvi zdravih životinja (tabela 11). Ova hipolipidemijska aktivnost je najverovatnije posledica gubitka težine (grafik 16) izazvana visokom zastupljenošću kvercitrina i galne kiseline u dekoktu ispitivane biljne mešavine.

Histopatološka analiza tkiva bubrega i jetre u subhroničnom ispitivanju oralne toksičnosti pokazala je da biljna mešavina u apliciranim dozama od 10 i 20 g/kg nema nikakav toksičan efekat. Nasuprot tome, mesec dana tretmana biljnom mešavinom u koncentraciji od 40 g/kg uzrokovao je akumulaciju kolagena u ovim organima (grafici 21 i 23), što može predstavljati znak potencijalne hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti izazvane svakodnevnim upotrebom ove biljne mešavine u previsokim dozama.

Nasuprot podacima o potencijalnoj hepatotoksičnosti biljne mešavine pri korišćenju u visokoj dozi, detaljna histopatološka analiza tkiva jetre pokazala je da tretman nižim koncentracijama dekokta biljne mešavine sproveden nad zdravim životinjama snižava broj Kupferovih ćelija u jetri (grafik 22 (A)), kao i procenat binukleusnih hepatocita (grafik 22 (E)),

i pri tome ne uzrokuje niti jednu drugu histološku promenu ovog tkiva (grafik 22 (B, C, D), grafik 23 i grafik 24), tako da se može zaključiti da ispitivan ekstrakt poseduje protivupalnu i hepatoprotektivnu aktivnost (Wang i sar., 2017).

Uzevši u obzir sve rezultate studije sub-hronične oralne toksičnosti, može se primetiti da dekokt biljne mešavine, korišćen u nižim koncentracijama (10 i 20 g/kg) nema toksične efekte. Nasuprot, on sprečava pojavu gojaznosti, potencijalni razvoj hiperglikemije i hiperlipidemije i, pored toga, regeneriše jetru. Ipak, kao i većina lekovitog bilja, ona pokazuje „Janus efekat“ (Zeiger, 2003), odnosno, primena u previsokim koncentracijama (u ovom slučaju 40 g/kg) pokazuje izvesna toksična dejstva. Upravo zbog toga, za finalni deo ove studije, odnosno za ispitivanje anti-dijabetičnog efekta odabrane su dve koncentracije dekokta biljne mešavine, i to 10 i 20 g/kg.

Anti-dijabetičan efekat ove tradicionalno korišćenje biljne mešavine procenjen je na modelu pacova kojima je aloksanom indukovana *dijabetes melitus* tip 1. Ovaj model je veoma pogodan za istraživanja ovog tipa, zato što intoksikacija aloksanom deluje na više nivoa. Naime, injektiranje aloksana u visokoj dozi uništava β -ćelije pankreasa i, samim tim, indukuje hiperglikemiju (Szkudelski, 2001). Pored toga, aloksan izaziva i histopatološke promene bubrega i jetre koje se podudaraju sa kliničkom slikom ljudske dijabetičke nefropatije i NAFLD (Pourghasem i sar., 2014; Lucchesi i sar., 2015).

Pri razvoju eksperimentalnog dijabetičnog modela hemijskim putem, uzelo se u obzir da aloksan može biti nepouzdan (Misra i Aiman, 2012; Jain i Arya, 2011). Zbog toga, da bi se isključila ikakva mogućnost lažno pozitivnih rezultata, u ispitivanje su uključene samo životinje kod kojih je ostvaren model stabilnog dijabetesa tip 1, odnosno one kod kojih je nivo šećera u krvi bio veći od 20 mmol/L tokom 14 uzastopnih dana nakon injektiranja aloksana.

Do kraja eksperimenta, u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom, telesna masa životinja u dijabetičnoj kontroli bila je značajno niža ($p < 0,001$), dok je nivo šećera bio značajno viši ($p < 0,001$), što je smatrano kao dokaz uspešnosti eksperimentalnog modela.

U poređenju sa dijabetičnom kontrolom, porast telesne mase primećen je kod svih tretiranih dijabetičnih životinja. Ipak, najveća normalizacija telesne mase primećena je u grupi dijabetičnih životinja tretiranih nižom koncentracijom (10 g/kg) biljne mešavine (grafik 25). Ipak, iako je tretman biljnom mešavinom povećao stepen dobijanja telesne mase dijabetičnih životinja, ona je i dalje bila značajno niža od rasta telesne mase zdravih životinja, što se podudara sa slučajem primećenim u sub-hroničnom ispitivanju oralne toksičnosti (grafik 16), gde se testirani ekstrakt ponašao kao sredstvo kontrole prekomernog dobijanja telesne mase.

Najvažniji rezultat ove studije svakako je podatak da je tretman biljnom mešavinom bio višestruko uspješniji u snižavanju šećera u krvi od standardno korišćenih lekova, tj. od metformina i insulina (tabela 12). Iako se u većini istraživanja smatra da lekovita biljka poseduje izvanrednu hipoglikemijsku aktivnost ukoliko je ona slična dejstvu insulina, mali broj istraživanja je došao do rezultata u kojima biljni ekstrakt snažnije reguliše hiperglikemiju od standardnog leka. U jednoj od takvih studija primećeno je da tretman galnom kiselinom, izolovanom iz lekovite biljke, uspješnije reguliše glikemijske vrednosti dijabetičnih pacova od tretmana insulinom (Latha i Daisy, 2011). Podatak da metformin nije pokazao nikakav efekat na regulaciju glikemije u ovom eksperimentu nije iznenađujuć. S obzirom na to da se metformin primenjuje u lečenju dijabetesa tip 2, a ne tipa 1 (Kirpichnikov i sar., 2002), pomenuti rezultat je samo dodatni dokaz uspešnosti izazivanja dijabetesa tip 1 u eksperimentalnim životinjama.

Iako su obe testirane koncentracije biljne mešavine pokazale izvanrednu hipoglikemijsku aktivnost, viša koncentracija (20 g/kg) bila je za nijansu uspješnija u ovome, u smislu da je u potpunosti normalizovala glikemiju dijabetičnih životinja nakon samo nekoliko apliciranih doza (tabela 12).

Poređenjem rezultata dobijenih u praćenju promene telesne mase (grafik 25), nivoa šećera u krvi (tabela 12) i broja ćelija u Langerhansovim ostrvcima (grafik 27), može se uočiti da je princip po kome dekokt tradicionalno korišćene „anti-dijabetske“ biljne mešavine reguliše nivo šećera u krvi dijabetičnih životinja najverovatnije zasnovan na regeneraciji β -ćelija pankreasa. Ovoj opservaciji u prilog ide i podatak da je nivo kolagena u pankreasu, što je i inače prihvaćen parametar u proceni dijabetičnog životinjskog modela (Abunasef i sar., 2014), bio veoma povišen ($p < 0,001$) u DK grupi u odnosu na ZK grupu životinja, dok je tretman obema koncentracijama biljne mešavine u potpunosti normalizovao ovaj parametar (grafik 27).

Uzevši u obzir detaljnu fitohemijsku analizu rađenu *HPLC-UV* metodom (tabela 2), predloženi mehanizam hipoglikemijske aktivnosti ove tradicionalno korišćene „anti-dijabetske“ biljne mešavine u skladu je sa dosadašnjim studijama. Naime, suplementacija kvercitrinom štiti β -ćelije pankreasa od daljeg propadanja u dijabetesu (Coskun i sar., 2005), dok kombinovan tretman kvercitrinom i hinikom kiselinom smanjuje nivo proapoptopskog Bax proteina i umanjuje apoptozu β -ćelija (Gurzov i Eizirik, 2011; Arya i sar., 2014). Istovremeno, administracija galne kiseline potpomaže regeneraciju β -ćelija (Latha i Daisy, 2011).

Tretman biljnom mešavinom smanjio je nivo ukupnog holesterola, triglicerida, VLDL-a i LDL-a dijabetičnih životinja u poređenju sa dijabetičnom kontrolom (tabela 13). S obzirom

na identifikovana bioaktivna jedinjenja dekokta ove biljne mešavine (tabela 12), uočena hipolipidemijska aktivnost u saglasnosti je sa dosadašnjim studijama. Naime, suplementacija hininskom kiselinom uzrokuje porast nivoa nikotinamida (Pero i sar., 2009) koji može imati hipolipidemijsku aktivnost (Zak i sar., 2006), dok je studija Oliveire i saradnika pokazala da tretman galnom kiselinom može sniziti nivo ukupnog holesterola, triglicerida i LDL-a (de Oliveira i sar., 2016). Osim toga, poznato je da mnogi polifenoli i flavonoidi snižavaju nivo holesterola u krvi kroz inhibiciju NPC1-sličnom intracelularnog transportera holesterola (engl. *NPC1 Like Intracellular Cholesterol Transporter 1 - NPC1L1*) (Kobayashi, 2019), kao i putem smanjivanja sinteze holesterola u jetri kroz inhibiciju 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A- HMG-CoA*) reduktaze (Islam et al., 2015). Uz to, uočena visoka antioksidativna aktivnost testiranog dekokta (grafik 2) i njegov efekat na smanjenje aterogenog i kardiovaskularnog indeksa i zdravih i dijabetičnih životinja (grafici 17 i 26), u skladu su sa dosadašnjim studijama koje su pokazale da suplementacija antioksidantima prirodnog porekla može doprineti smanjenju aterogenog indeksa (Salvamani i sar., 2014; Zeka i sar., 2017).

Uočene promene na tkivu bubrega, tj. smanjen broj ćelija proksimalnih tubula (grafik 29 (B) i povećan nivo kolagena (grafik 30) uočen pri poređenju dijabetične i zdrave kontrolne grupe životinja ($p < 0,001$) su priznati parametri nefropatije (Terayama i sar., 2017; Gewin, 2018; Qi i Yang, 2018). Naime, hronična hiperglikemija, povećan nivo ROS-a i delovanje toksičnih agenata kao što je aloksan, dovode do poremećaja ćelijskog ciklusa u ćelijama proksimalnih tubula i zadržavaju ih u G0, G1 ili G2 fazi mitoze. Iako je ovo usporavanje mitoze adaptivan proces koji pruža ćelijama dodatno vreme za popravak potencijalnih oštećenja DNK (Gewin, 2018), predugo zadržavanje u ovim fazama može dovesti do pojačanog stvaranja profibrotičnih citokina - transformišućeg faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta - TGF-β*) i faktora rasta koji uslovljava razvoj vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor - CTGF*) u c-Jun N kinazno zavisnom signalnom putu (engl. *c-Jun N-terminal kinases - dependent pathway - JNK*) (Yang i sar., 2010; Lovisa i sar., 2015).

Slično tome, na samom početku obnavljanja povređenog tkiva, lokalni fibrotski proces, pružanjem strukturne potpore, olakšava preživljavanje nefrona (Kaissling i sar., 2013). Međutim, produženo prekomerno stvaranje ekstracelularnog matriksa (ECM) može dostići „tačku bez povratka“ što vremenom gotovo neizbežno dovodi do dijabetesne nefropatije (Gewin, 2018).

Mehanizam primećene nefroprotektivne aktivnosti ove biljne mešavine u vidu normalizacije veličine glomerula (grafik 29 (A)), broja ćelija proksimalnih tubula (grafik 29

(B)) i nivoa renalnog kolagena (grafik 30) je najverovatnije baziran na njenoj visokoj antioksidativnoj aktivnosti (grafik 2). Naime, visoka antioksidativna aktivnost biljne mešavine odgovorna je za njen antigenotoksični efekat (grafik 15), tj. za ubrzanje reparacije oštećenja hromozoma izazvanih ROS-om koja dovode do normalizacije tempa mitotskog ciklusa u ćelijama proksimalnih tubula. Ovaj zaključak je u skladu sa prethodnim ispitivanjima gde je pokazano da kaftarinska i hininska kiselina deluju antimutageno (Zhang i sar., 2011) i ubrzavaju reparaciju oštećene DNK (Pero i sar., 2009) kroz inhibiciju proinflatornog NF- κ B (Åkesson i sar., 2005, 2003), dok galna kiselina sprečava progresiju dijabetske nefropatije kroz inhibiciju p38 MAPK signalnog puta (Ahad i sar., 2015). Uz to, rutin snižava ekspresiju TGF β -1 i fibronektina i na taj način sprečava razvoj renalne fibroze (Ganesan i sar., 2020).

Histopatološka analiza tkiva jetre ukazala je na veliki broj morfometrijskih promena u dijabetičnoj kontrolnoj grupi u odnosu na zdravu kontrolnu grupu životinja (grafici 31, 32 i 33). Mehanizam ovih promena već je opisan u literaturi. Smanjen odnos nukleusa i citoplazme uočen i u mononukleusnim i u binukleusnim netretirane dijabetične grupe (grafik 31 (B, C)) je pokazatelj nedostatka reparacije oštećene DNK koja vodi nekrozi ovih ćelija (Gujral, 2001; Gujral i sar., 2002), a koja se standardnom morfometrijskom analizom lako uočava kroz opadanje broja ovih ćelija (grafik 31 (D, E)). Osim toga, procenat binukleusnih hepatocita, glavnog pokazatelja obnavljanja jetre nakon velikog pretrpljenog oštećenja (Miyaoaka i Miyajima, 2013), bio je značajno smanjen u DK u odnosu na ZK (grafik 31 (E)). U isto vreme, broj Kupferovih ćelija, važnog posrednika u razvoju NAFLD-e (Odegaard et al., 2007; Huang et al., 2010; Dixon et al., 2013) bio je značajno povišen kod netretiranih dijabetičnih životinja (grafik 30 (A)). Iako je blago povećanje broja Kupferovih ćelija, odnosno, povišena inflamacija, prvi korak u procesu obnavljanja povređenog hepatičnog tkiva, neregulisana i prolongirana inflamacija dovodi do smanjene proizvodnje insulina i/ili insulinske rezistencije (Kimura i sar., 2016; Feng i sar., 2018), što ubrzava razvoj fibroze ovog organa (grafik 32) i progresiju NAFLD (Martinez-Hernandez i Amenta, 1993; Gressner i Bachem, 1995; Michelotti i sar., 2013; Tacke, 2017).

Osim toga je smanjenje glikogena u jetri u dijabetičnoj kontroli u odnosu na zdravu kontrolu (grafik 33) jedna od glavnih karakteristika i depankreatizovanog i životinjskog dijabetičnog modela indukovanog aloksanom (Vallance Owen, 1952; Ferrannini i sar., 1990).

Tretman biljnom mešavinom normalizovao je sve ove parametre i doveo ih do nivoa zdrave kontrolne grupe životinja (grafici 31, 32 i 33), što je najverovatnije posledica visoke koncentracije fenola i flavonoida prisutne u njoj (tabela 1). Poznato je da suplementacija polifenolima ima veliki efekat na regulaciju oksidativnog stresa koji se ostvaruje različitim

mehanizmima: ubrzavanjem oporavka oštećenja na DNK izazvanih oksidativnim stresom kroz NRF2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) signalni put; smanjivanjem zapaljenskog procesa preko inhibicije NF- κ B; kroz povećanje oksidacije β -masnih kiselina putem povećanja ekspresije alfa receptora aktiviranim peroksizomnim proliferatorom (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* – PPAR α), inhibiranjem lipogeneze kroz aktivaciju AMPK kinaze, kao i smanjivanjem aktivnosti SREBP-1c (engl. *sterol regulatory element-binding proteins*) (Prajitha i Thoppil, 2016; Li i sar., 2014; Li i sar., 2018; Domitrović i Potočnjak, 2016; Kim i sar., 2016; Das i sar., 2012). Osim toga, polifenoli sprečavaju razvoj hepatične fibroze i kroz smanjivanje aktivacije stelatnih ćelija koje su odgovorne za stvaranje ekstracelularnog matriksa (Hicks i sar., 2017; Arffa i sar., 2016; Hernández-Ortega i sar., 2012; Li i sar., 2011; Qiu i sar., 2014; Lin i Chen, 2011). Povrh svega ovoga, studije su pokazale da flavonoidi, poput kvercitrina i rutina, poseduju hepatoprotektivnu aktivnost (Domitrović i sar., 2012). Ta hepatoprotektivna aktivnost se najverovatnije ostvaruje kroz pojačavanje antioksidativne aktivnosti samog organizma kroz ekspresiju Nrf2/citohroma P450 2E1 (CYP2E1), kroz smanjivanje inflamacije kroz inaktivaciju MAPK/ NF- κ B signalnih puteva i kroz smanjenje apoptoze putem regulacije Bcl-2/AKT ekspresije (Li i sar., 2018).

Kao što je već pomenuto, ovo je prvo ispitivanje prevalencije korišćenja narodne medicine na teritorije cele Srbije (Madić i sar., 2018), prvo ispitivanje citotoksičnosti i anticitotoksičnosti listova kupine i borovnice, rizoma žute steže, nadzemnog dela zečije stope i mahuna pasulja, prvo ispitivanje genotoksičnosti i antigenotoksičnosti pomenutih ekstrakata (Madić i sar., 2019), i, najbitnije, prvo sveobuhvatno *in vitro* i *in vivo* ispitivanje „anti-dijabetične“ biljne mešavine tradicionalno korišćene u tretmanu dijabetesa (Madić i sar., 2019; Madić i sar., 2020).

6. ZAKLJUČCI

1. Prevalenca korišćenja narodne medicine značajno je niža na teritoriji cele Srbije u odnosu prevalencu korišćenja u pojedinačnim regionima. Žene su naklonjenije tradicionalnim metodama lečenja.
2. Češća je upotreba biljnih mešavina i farmaceutskih suplemenata zasnovanih na tradicionalnim recepturama nego pojedinačnog lekovitog bilja.
3. U svim ispitivanim ekstraktima, sa izuzetkom ekstrakata *P. vulgaris*, uočen je visok sadržaj fenola i flavonoida.
4. Antioksidativna aktivnost bila je izuzetno visoka kod gotovo svih ispitivanih ekstrakata.
5. Većina testiranih ekstrakata imala je umerenu do slabu antimikrobnu aktivnost. Biljna mešavina je, u odnosu na njene pojedinačne sastojke, pokazala antimikrobnu aktivnosti prema znatno širem spektru mikroorganizama.
6. U odnosu na sve testirane ekstrakte najvišu anticitotoksičnost i najnižu citotoksičnost imali su dekokti.
7. Od svih ispitivanih dekokata, najvišu antigenotoksičnost i najmanju genotoksičnost imala je biljna mešavina.
8. Dekokt biljne mešavine imao je hipoglikemijski, hipolipidemijski i hepatoprotektivni efekat nad zdravim životinjama.
9. Dekokt biljne mešavine imao je hipoglikemijski, hipolipidemijski, hepatoprotektivni i nefroprotektivni efekat nad dijabetičnim životinjama.
10. Hipoglikemijski efekat biljne mešavine bio je veći od efekta insulina i metformina u ovom eksperimentalnom modelu.

7. LITERATURA

- Abunasef, S.K., Amin, H.A., Abdel-Hamid, G.A., 2014. A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochem. Cytobiol.* 52, 42–50. <https://doi.org/10.5603/FHC.2014.0005>
- Abu-Shandi, K., Al-Rawashdeh, A., Al-Mazaideh, G., Abu-Nameh, E., Al-Amro, A., Al-Soufi, H., Al-Ma'abreh, A.; Al-Dawdeyah, A., 2015. A novel strategy for the identification of the medicinal natural products in *Rubus fruticosus* plant by using GC/MS technique: A study on leaves, stems and roots of the plant. *Adv. Anal. Chem.* 5, 31–41.
- Adams, D.M., Yakubu, M.T., 2020. Aqueous extract of *Digitaria exilis* grains ameliorate diabetes in streptozotocin-induced diabetic male Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* 249, 112383. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112383>
- Adem, P. V., Montgomery, P. V., Husain, C. P., Koogler, A. N., Arangelovich, T K., Humilier V., Boyle-Vavra, M., Daum, R. S., 2005. *Staphylococcus aureus* Sepsis and the Waterhouse–Friderichsen Syndrome in Children. *New England Journal of Medicine.* Massachusetts Medical Society. 353(12): 1245–1251.
- Ahad, A., Ahsan, H., Mujeeb, M., Siddiqui, W.A., 2015. Gallic acid ameliorates renal functions by inhibiting the activation of p38 MAPK in experimentally induced type 2 diabetic rats and cultured rat proximal tubular epithelial cells. *Chem. Biol. Interact.* 240, 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.026>
- Åkesson, C., Lindgren, H., Pero, R.W., Leanderson, T., Ivars, F., 2005. Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100®. *Int. Immunopharmacol.* 5, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.09.028>
- Åkesson, C., Lindgren, H., Pero, R.W., Leanderson, T., Ivars, F., 2003. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF-κB activity without inducing cell death. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1889–1900. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2003.07.001>
- Almuaigel, M.F., Seif, M.A., Albuali, H.W., Alharbi, O., Alhawash, A., 2017. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* pods in streptozotocin-diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* 94, 742–746. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.135>
- Alonso, R., Cadavid, I. and Calleja, J., 1980 A Preliminary Study of Hypoglycemic Activity of *Rubus fruticosus*. *Planta Medica.* 40(1): 102–106.

- AlQathama, A., 2016. Natural Products & Complementary Medicines: where are we up to? *British Journal of Pharmacy*. 1 (1).
- Alves, C., Casqueiro, J., Casqueiro, J., 2012. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16, 27.
<https://doi.org/10.4103/2230-8210.94253>
- American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Jan 1;26(Supplement 1):S103– 5; DOI:10.2337/diacare.26.2007.s103.
- Ansari, P., Azam, S., Hannan, J.M.A., Flatt, P.R., Abdel Wahab, Y.H.A., 2020. Anti-hyperglycaemic activity of *H. rosa-sinensis* leaves is partly mediated by inhibition of carbohydrate digestion and absorption, and enhancement of insulin secretion. *J. Ethnopharmacol.* 253, 112647. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112647>
- Antosiewicz, D., 1990. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of ledakrin. *Folia Histochem. Cytobiol.* 28, 79–95.
- Arffa, M.L., Zapf, M.A., Kothari, A.N., Chang, V., Gupta, G.N., Ding, X., Al-Gayyar, M.M., Syn, W., Elsherbiny, N.M., Kuo, P.C., Mi, Z., 2016. Epigallocatechin-3-gallate upregulates miR-221 to inhibit osteopontin-dependent hepatic fibrosis. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167435>
- Argaex-Lopez, N.W.N.H., Kumate-Rodriguez, J., Cruz, M., Talavera, J., Rivera-Arce, E., 2003. The Use of Complementary and Alternative Medicine Therapies in Type 2 Diabetic Patients in Mexico. *Diabetes Care*. 26(8), 2470.
- Arya, A., Jamil Al-Obaidi, M.M., Shahid, N., Bin Noordin, M.I., Looi, C.Y., Wong, W.F., Khaing, S.L., Mustafa, M.R., 2014. Synergistic effect of quercetin and quinic acid by alleviating structural degeneration in the liver, kidney and pancreas tissues of STZ-induced diabetic rats: A mechanistic study. *Food Chem. Toxicol.* 71, 183–196.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.010>
- Aşkin Celik, T., Aslantürk, O.S., 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* test. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 189252.
<https://doi.org/10.1155/2010/189252>
- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014 Jan 4;383(9911):69–82; DOI:10.1016/S0140-6736(13)60591-7.
- Azizian, H., Khaksari, M., Asadi karam, G., Esmailidehaj, M., Farhadi, Z., 2018. Cardioprotective and anti-inflammatory effects of G-protein coupled receptor 30 (GPR30) on postmenopausal type 2 diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* 108, 153–164.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.028>

- Ban, C.R., Twigg, S.M., 2008. Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc. Health Risk Manag.*
<https://doi.org/10.2147/vhrm.s1991>
- Banda, M., Nyirenda, J., Muzandu, K., Sijumbila, G., Mudenda, S., 2018. Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Effects of Aqueous Extracts of *Lannea edulis* in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Front. Pharmacol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01099>
- Bell, R.A., Suerken, C.K., Grzywacz, J.G., Quandt, S.A., Arcury, T.A., 2006. Complementary and alternative medicine use among adults with diabetes in the United States. *Alternative Therapies in Health and Medicine.* 12(5), 16-22.
- Bera, T. K., De, D., Chatterjee, K., Ali, K. M., & Ghosh, D., 2010. Effect of Diashis, a polyherbal formulation, in streptozotocin-induced diabetic male albino rats. *International Journal of Ayurveda Research*, 1(1), 18.
- Bhatt, H.B., Smith, R.J., 2015. Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 4, 101–108. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.03>
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature.*
<https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bohm, B.A., Koupai-Abyazani, M.R., 1994. Flavonoids and condensed tannins from leaves of Hawaiian *Vaccinium reticulatum* and *V. calycinum* (Ericaceae). *Pac.Sc.* 48(4): 458–463.
- Bosio, S., Laughinghouse IV, H.D., 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test, in: *Environmental Contamination. InTech.* <https://doi.org/10.5772/31371>
- Bradshaw, ML., 2016. Knowledge, Attitudes, and Personal Use of Complementary and Alternative Medicine among Occupational Therapy Educators in the United States. *Occupational Therapy In Health Care* 30(1), 80-94.
- Briand, C.H., Kapoor, B.M., 1989. The cytogenetic effects of sodium salicylate on the root meristem cells of *Allium sativum* L. *Cytologia (Tokyo).* 54, 203–209.
<https://doi.org/10.1508/cytologia.54.203>
- Camparoto, M.L., Teixeira, R.O., Mantovani, M.S., Vicentini, V.E.P. 2002 Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 85-89.
- Chan, K.L., Hickson, I.D., 2011. New insights into the formation and resolution of ultra-fine anaphase bridges. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 906–912.
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2011.07.001>
- Chang, H.A., Wallis, M., Tiralongo, E., 2011. Use of Complementary and Alternative

- Medicine among People with Type 2 Diabetes in Taiwan: A Cross-Sectional Survey. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 983792, 8 pages
- Chavance, M., Herbeth B, Fournier C, Janot C, Vernhes G. 1989. Vitamin status, immunity and infections in an elderly population. *European journal of clinical nutrition*. 43(12): 827–35.
- Chávez-Mendoza, C., Hernández-Figueroa, K. I., Sánchez, E., 2019. Antioxidant capacity and phytonutrient content in the seed coat and cotyledon of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from various regions in Mexico. *Antioxidants*. 8(1): E5.
- Chinnappan, S.M., George, A., Thaggikuppe, P., Choudhary, Y., Choudhary, V.K., Ramani, Y., Dewangan, R., Malaysia Berhad, B., Alam, S., 2019. Nephroprotective Effect of Herbal Extract *Eurycoma longifolia* on Paracetamol-Induced Nephrotoxicity in Rats. <https://doi.org/10.1155/2019/4916519>
- Chu, W., Cheung, S.C.M., Lau, R.A.W., Benzie, I.F.F., 2011. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.), Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects.
- Cisowska, A., Wojnicz, D. and Hendrich, A.B., 2011. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural Product Communications*. 6(1): 149–156.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S., 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol. Res.* 51, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.06.002>
- Damnjanović, I., Kitić, D., Stefanović, N., Zlatković–Guberinić, S., Catić–Đordjevic, A., Veličković–Radovanović, R., 2015. Herbal self-medication use in patients with diabetes mellitus type 2. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 45(4), 964-971.
- Das, J., Roy, A., Sil, P.C., 2012. Mechanism of the protective action of taurine in toxin and drug induced organ pathophysiology and diabetic complications: A review. *Food Funct.* <https://doi.org/10.1039/c2fo30117b>
- de Oliveira, L.S., Thomé, G.R., Lopes, T.F., Reichert, K.P., de Oliveira, J.S., da Silva Pereira, A., Baldissareli, J., da Costa Krewer, C., Morsch, V.M., Chitolina Schetinger, M.R., Spanevello, R.M., 2016. Effects of gallic acid on delta – aminolevulinic dehydratase activity and in the biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* 84, 1291–1299. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.021>
- Dimitrova, L., Zaharieva, M.M., Popova, M., Kostadinova, N., Tsvetkova, I., Bankova, V., Najdenski, H., 2017a. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. *Chem. Cent. J.* 11, 113.

- <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0343-8>
- Dimitrova, L., Zaharieva, M.M., Popova, M., Kostadinova, N., Tsvetkova, I., Bankova, V., Najdenski, H., 2017b. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. Chem. Cent. J. 11, 113.
<https://doi.org/10.1186/s13065-017-0343-8>
- Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., Nagy, L.E., 2013. Kupffer cells in the liver. Compr. Physiol. 3, 785–797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. J Food Drug Anal. 22(3):296-302. doi: 10.1016/j.jfda.2013.11.001
- Doan, K. V., Ko, C.M., Kinyua, A.W., Yang, D.J., Choi, Y.H., Oh, I.Y., Nguyen, N.M., Ko, A., Choi, J.W., Jeong, Y., Jung, M.H., Cho, W.G., Xu, S., Park, K.S., Park, W.J., Choi, S.Y., Kim, H.S., Moh, S.H., Kim, K.W., 2015. Gallic acid regulates body weight and glucose homeostasis through AMPK activation. Endocrinology 156, 157–168.
<https://doi.org/10.1210/en.2014-1354>
- Domitrović, R., Jakovac, H., Vasiljev Marchesi, V., Vladimir-Knežević, S., Cvijanović, O., Tadić, Ž., Romić, Ž., Rahelić, D., 2012. Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. Acta Pharmacol. Sin. 33, 1260–1270. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.62>
- Domitrović, R., Potočnjak, I., 2016. A comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives. Arch. Toxicol. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1580-z>
- Drózdź, P., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K. 2019: *Potentilla erecta* (L.) rhizomes as a source of phenolic acids. Natural Product Research, 33(14): 2128–2131.
- Drózdź, P., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K., 2019. *Potentilla erecta* (L.) rhizomes as a source of phenolic acids. Natural Product Research. 33(14): 2128–2131.
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E., Gohar, M. 2015. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. Frontiers in microbiology. 6: 704.
- Ekowati, H., Arai, J., Damana P.A.S., Nainu, F., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y., 2017. Protective effects of *Phaseolus vulgaris* lectin against viral infection in *Drosophila*. Drug Discoveries & Therapeutics. 11(6): 329–335.
- Elasri, M. O., Thomas, J.R., Skinner, R.A., Blevins, J.S., Beenken, K.E., Nelson, C.L., Smelter, M.S. 2002. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the

- pathogenesis of osteomyelitis. *BONE*, 30(1): 275–280.
- Esmonde, L., Long, A.F., 2008. Complementary therapy use by persons with multiple sclerosis: benefits and research priorities. *Complement Ther Clin Pract.* 14, 176-184.
- EUR-Lex - 32010L0063 - EN - EUR-Lex [WWW Document], n.d. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063> (accessed 10.23.18).
- Evelson, P., Susemihl, C., Villarreal, I., Llesuy, S., Rodríguez, R., Peredo, H., Lemberg, A., Perazzo, J., Filinger, E., 2005. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats. *Ann. Hepatol. Off. J. Mex. Assoc. Hepatol.* 4, 115–120. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)32074-5](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)32074-5)
- Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.* 63, 965–981. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90016-x](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90016-x)
- Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.* 63, 965–81.
- Feng, B., Zhang, N., Duan, K., Shi, B., 2018. Hypothalamic POMC expression is required for peripheral insulin action on hepatic gluconeogenesis through regulating STAT3 in sepsis rats. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 1696–1707. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13449>
- Ferlemi, A.-V., Lamari, F., 2016. Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value. *Antioxidants* 5, 17. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>
- Ferlemi, A.V., Lamari, F.N., 2016. Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>
- Ferrannini, E., Lanfranchi, A., Rohner-Jeanrenaud, F., Manfredini, G., Van de Werve, G., 1990. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. *Metabolism* 39, 1082–1088. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(90\)90170-H](https://doi.org/10.1016/0026-0495(90)90170-H)
- Figueiredo de Santana Aquino, D., Monteiro, T.A., Lima Cardoso, C.A., Heredia Vieira, S.C., Vieira, M. do C., de Picoli Souza, K., Amaya-Farfan, J., Borges Castro Carvalho, G.C., Moura, C.S., Morato, P.N., 2020. Investigation of the antioxidant and hypoglycemic properties of *Alibertia edulis* (L.C. Rich.) A.C. Rich. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 253, 112648. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112648>
- Fisher, P. & Ward, A., 1994. Complementary medicine in Europe. *BMJ.* 309, 107–111.
- Fiskesjo, G., 1985. The *Allium test* as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99–100.

- Fontbonne, A., Eschwege, E., Cambien, F., Richard, J.L., Ducimetiere, P., Thibault, N., Warnet, J.M., Claude, J.R.; Rosselin, G.E., 1989. Hypertriglyceridaemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the paris prospective study. *Diabetologia*, 32, 300–304.
- Forland, M., Thomas, V., Shelokov, A. 1977. Urinary Tract Infections in Patients With Diabetes Mellitus. *JAMA*, 238(18): 1924.
- Frescura, V.D.-S., Kuhn, A.W., Laughinghouse IV, H.D., Nicoloso, F.T., Lopes, S.J., Tedesco, S.B., 2013. Evaluation of the allelopathic, genotoxic, and antiproliferative effect of the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* (*Rubiaceae*) on the germination and cell division of *Eruca sativa* (*Brassicaceae*). *Caryologia* 66, 138–144. <https://doi.org/10.1080/00087114.2013.821832>
- Fridewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. “Determination of Ldl cholesterol,” in *Text Book of Clinical Biochemistry*, ed. A. Gaw (London: Churchill Livingstone).
- Friedman, S.L., 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2247>
- Gale, E.A.M., Wagner, T.H., 2006. Dying of Diabetes. *BMJ Publishing Group Limited and RPS Publishing, Lancet, London*. 368 (9548): 1626-1628.
- Gandhi, G.R., Jothi, G., Antony, P.J., Balakrishna, K., Paulraj, M.G., Ignacimuthu, S., Stalin, A., Al-Dhabi, N.A., 2014. Gallic acid attenuates high-fat diet fed-streptozotocin-induced insulin resistance via partial agonism of PPAR γ in experimental type 2 diabetic rats and enhances glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 745, 201–216. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.044>
- Ganesan, D., Albert, A., Paul, E., Ananthapadmanabhan, K., Andiappan, R., Sadasivam, S.G., 2020. Rutin ameliorates metabolic acidosis and fibrosis in alloxan induced diabetic nephropathy and cardiomyopathy in experimental rats. *Mol. Cell. Biochem.* 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03758-y>
- Geiger, C., Scholz, E., Rimpler, H., 1994. Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. *Planta Medica*. 60(4): 384–385.
- Gewin, L.S., 2018. Renal fibrosis: Primacy of the proximal tubule. *Matrix Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.006>
- Ghorbani, A., 2017. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomed. Pharmacother.* <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>

- Ghosh, D., Konishi, T., 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts. *Asia Pac J Clin Nutr.* 16(2): 200–208.
- Giles-Rivas, D., Estrada-Soto, S., Aguilar-Guadarrama, A.B., Almanza-Pérez, J., García-Jiménez, S., Colín-Lozano, B., Navarrete-Vázquez, G., Villalobos-Molina, R., 2020. Antidiabetic effect of *Cordia morelosana*, chemical and pharmacological studies. *J. Ethnopharmacol.* 251, 112543. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112543>
- Goncharov, N. F., Stupakova, P., Komissarenko, N. F., Gella, V., 1987. Coumarins of the epigeal part of *Potentilla erecta*. *Chemistry of Natural Compounds.* 23(2): 253–253.
- Goncharov, N. F., Stupakova, P. and Komissarenko, N.F., 1989. Polyphenol composition of the epigeal part of *Potentilla erecta*. *Chemistry of Natural Compounds.* 25(3): 375–376.
- Grand View Research, Inc., 2017. Alternative & Complementary Medicine Market Worth \$196.87 Billion By 2025. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-alternative-complementary-medicine-therapies-market>.
- Gressner, A.M., Bachem, M.G., 1995. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis - A homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion.* <https://doi.org/10.1159/000201257>
- Gross, J.L., De Azevedo, M.J., Silveiro, S.P., Luís, L., Canani, H., Caramori, M.L., Zelmanovitz, T., 2005. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment.
- Groza, M., Jitaru, D., Bădescu, L., Ciocoiu, M., Bădescu, M. 2011: Evaluation of the immune defense in diabetes mellitus using an experimental model. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1): 5971–5979.
- Grujić-Vasić, J., Pilipović, S., Bosnić, T., Redžić, S. 2006: Antimicrobial Activity of Different Extracts from Rhizome and Root of *Potentilla erecta* L. Raeuschel and *Potentilla alba* L. Rosaceae. *Acta Medica Academica*, 35(1): 19–22.
- Guajardo-Flores, D., Serna-Saldívar, S.O., Gutiérrez-Urbe, J.A., 2013. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry.* 141(2): 1497–1503.
- Gudej, J., Tomczyk, M., 2004. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1114–9.
- Gujral, J., 2001. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: Apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33, 397–405. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22002>
- Gujral, J.S., Knight, T.R., Farhood, A., Bajt, M.L., Jaeschke, H., 2002. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: Apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol. Sci.* 67,

- 322–328. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.2.322>
- Gurzov, E.N., Eizirik, D.L., 2011. Bcl-2 proteins in diabetes: Mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.001>
- Hamed El S, E., Ibrahim El A, M. M, Mounir S, M., 2017. Antimicrobial Activities of Lectins Extracted from Some Cultivars of *Phaseolus vulgaris* Seeds. *Journal of Microbial & Biochemical Technology.* 09(03): 109–116.
- Hamedi, S, Sadeghpour, O., Shamsardekani, M. R., Amin, G., Hajjghasemali, D., Feyzabadi, Z., 2016. The most common herbs to cure the most common oral disease: Stomatitis recurrent aphthous ulcer (RAU). *Iranian Red Crescent Medical Journal.* 18(2): e21694.
- Han, X., Yang, Y., Metwaly, A.M., Xue, Y., Shi, Y., Dou, D., 2019. The Chinese herbal formulae (Yitangkang) exerts an antidiabetic effect through the regulation of substance metabolism and energy metabolism in type 2 diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 239, 111942. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111942>
- Hanamura, T., Hagiwara, T., Kawagishi, H., 2005. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry,* 69(2), 280-286.
- Harnafi, H., Serghini Caid, H., el Houda Bouanani, N., Aziz, M., Amrani, S., 2008. Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chem.* 108, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.062>
- Hartel, U., Volger, E., 2004. Use and acceptance of classical natural and alternative medicine in Germany – findings of a representative population-based survey. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 11, 327–334.
- Hernández-Ortega, L.D., Alcántar-Díaz, B.E., Ruiz-Corro, L.A., Sandoval-Rodriguez, A., Bueno-Topete, M., Armendariz-Borunda, J., Salazar-Montes, A.M., 2012. Quercetin improves hepatic fibrosis reducing hepatic stellate cells and regulating pro-fibrogenic/anti-fibrogenic molecules balance. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27, 1865–1872. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07262.x>
- Hicks, D.F., Goossens, N., Blas-García, A., Tsuchida, T., Wooden, B., Wallace, M.C., Nieto, N., Lade, A., Redhead, B., Cederbaum, A.I., Dudley, J.T., Fuchs, B.C., Lee, Y.A., Hoshida, Y., Friedman, S.L., 2017. Transcriptome-based repurposing of apigenin as a potential anti-fibrotic agent targeting hepatic stellate cells. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep42563>
- Hoffmann, J. , Casetti, F., Bullerkotte, U., Haarhaus, B., Vagedes, J., Schempp, C., Wölfle,

- U., 2016, Anti-Inflammatory Effects of Agrimoniin-Enriched Fractions of *Potentilla erecta*. *Molecules*. 21(6): 792
- Hori, S., Mihaylov, I., Vasconcelos, J. & McCoubrie, M., 2008. Patterns of complementary and alternative medicine use amongst outpatients in Tokyo, Japan. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 8 (14).
- Hospital, C. 1982. Gastro-oesophageal candidiasis. *British Medical Journal*. 23(2): 137–139.
- Hostetter, M. K., 1990. Handicaps to Host Defense: Effects of Hyperglycemia on C3 and *Candida albicans*. *Diabetes*. 39(3): 271–275.
- Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J.J., Scott, D.K., O'Doherty, R.M., 2010. Depletion of liver kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59, 347–357.
<https://doi.org/10.2337/db09-0016>
- IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.
- IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019 [WWW Document], n.d. URL
<https://www.diabetesatlas.org/en/> (accessed 4.30.20).
- Ikedo, S., Makino, H., Haramoto, T., Shikata, K., Kumagai, I., Ota, Z., 1991. Changes in glomerular extracellular matrices components in diabetic nephropathy. *J. Diabet. Complications* 5, 186–188. [https://doi.org/10.1016/0891-6632\(91\)90068-Z](https://doi.org/10.1016/0891-6632(91)90068-Z)
- Institut za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović Batut”. 2017. Svetski dan dijabetesa.
<http://www.batut.org.rs/download/aktuelno/Saopstenje%20za%20javnost%20povodom%20Svetskog%20dana%20dijabetesa.pdf>.
- Islam, B., Sharma, C., Adem, A., Aburawi, E., Ojha, S., 2015. Insight into the mechanism of polyphenols on the activity of HMGR by molecular docking. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 4943–4951. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86705>
- Islam, M.M., Jung, H.A., Sohn, H.S., Kim, H.M., Choi, J.S., 2013. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Arch Pharm Res.* 36: 542-552.
- Jain, D.K., Arya, R.K., 2011. Anomalies in alloxan-induced diabetic model: It is better to standardize it first. *Indian J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.4103/0253-7613.75684>
- Jatau, A.I., Aung, M.M.T., Kamauzaman, T.H.T., Chedi, B.A.Z., Sha'aban, A., Rahman, A.F.A., 2016. Use and toxicity of complementary and alternative medicines among patients visiting emergency department: Systematic review. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 5(2), 191-197.
- Javed, H., Nagoor M., M. F., Azimullah, S., Adem, A., Sadek, B., Ojha, S. K., 2018. Plant

- Extracts and Phytochemicals Targeting α -Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease Models. *Frontiers in pharmacology*. 9: 1555.
- Józwiak, G. W., Majer-dziedzic, B., Jesionek, W., Zieliński, W., Waksmundzka-hajnos, M., Józwiak, G. M., Jesionek W., 2016. Thin-layer chromatography : Direct bioautography as a method of examination of antimicrobial activity of selected *Potentilla species*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 0(0): 281–285.
- Kaissling, B., LeHir, M., Kriz, W., 2013. Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.010>
- Khalili, M., Ebrahimzadeh, M.A., Safdari, Y., 2014. Antihemolytic activity of thirty herbal extracts in mouse red blood cells. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 65, 399–406. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2513>
- Kim, C.S., Choi, H.S., Joe, Y., Chung, H.T., Yu, R., 2016. Induction of heme oxygenase-1 with dietary quercetin reduces obesity-induced hepatic inflammation through macrophage phenotype switching. *Nutr. Res. Pract.* 10, 623–628. <https://doi.org/10.4162/nrp.2016.10.6.623>
- Kim, D.O., Lee, C.Y., 2004. Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44(4):253-73. doi:10.1080/10408690490464960
- Kimura, K., Tanida, M., Nagata, N., Inaba, Y., Watanabe, H., Nagashimada, M., Ota, T., Asahara, S.I., Kido, Y., Matsumoto, M., Toshinai, K., Nakazato, M., Shibamoto, T., Kaneko, S., Kasuga, M., Inoue, H., 2016. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Rep.* 14, 2362–2374. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.032>
- King, P., Peacock, I., Donnelly, R., 1999. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.* 48(5):643– 8; DOI:10.1046/j.1365-2125.1999.00092.x.
- Kirpichnikov, D., Samy, ; Mcfarlane, I., Sowers, J.R., 2002. Metformin: An Update.
- Klásterská, I., Natarajan, A.T., Ramel, C., 2009. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. *Hereditas* 83, 153–162. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1976.tb01581.x>
- Kobayashi, S., 2019. The effect of polyphenols on hypercholesterolemia through inhibiting the transport and expression of niemann–pick C1-like 1. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20194939>

- Köhler, F. E., 1897. Köhler's Medizinal-Pflanzen.
- Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., Vanek, T., 2002. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 82, 51–53.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00143-5)
- Kops, J., 1877. Flora Batava of Afbeelding en Beschrijving van Nederlandsche Gewassen, XV. Deel. Preuzeto sa www.BioLib.de
- Kristoffersen, A. E., Stub, T., Salamonsen, A., Musial, F., Hamberg, K., 2014. Gender differences in prevalence and associations for use of CAM in a large population study. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 463.
- Kumar, D., Bajaj, S., Mehrotra, R., 2006. Knowledge, Attitude and Practice of Complementary and Alternative Medicines for Diabetes. *Public Health*.120(8), 705-711.
- Künzle J. 1911. Herbs and weeds: A practical booklet on medicinal herbs Switzerland.
- Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C.P., Lee, J.H., Kruhlak, M., Levine, M., 2007. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 21, 366–377.
- Kyznetsova, M.Y., Makieieva, O.M., Lavrovskaya, D.O., Tymoshenko, M.O., Pavlivna Sheverova, D., Halenova, T.I., Savchuk, O.M., Ostapchenko, L.I., 2015. Effect of Aqueous Extract from *Phaseolus vulgaris* Pods on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity in the Liver and Kidney of Diabetic Rats ARTICLE INFO ABSTRACT. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5, 1-006. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50501>
- Kyznietsova, M.Y., Halenova, T.I., Savchuk, O.M., Vereschaka, V.V., Ostapchenko, L.I., 2015. Carbohydrate metabolism in type 1 diabetic rats under the conditions of the kidney bean pods aqueous extract application. *Fiziol. Zh.* 61, 96–103.
<https://doi.org/10.15407/fz61.06.096>
- Lamuela-Raventós, R. M., 2018. Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity. Recent Trends and Applications*, 107-117.
- Lansdown, A.J., Barton, J., Warner, J., Williams, D., Gregory, J.W, Harvey, JN, et al. Prevalence of ketoacidosis at diagnosis of childhood onset Type 1 diabetes in Wales from 1991 to 2009 and effect of a publicity campaign. *Diabet Med.* 2012 Dec;29(12):1506–9; DOI:10.1111/j.1464-5491.2012.03638.x.
- Latha, R.C.R., Daisy, P., 2011. Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 189, 112–118.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.11.005>

Lazarević, G., Milojković, M., Tasić, I., Najman, S., Antić, S., Stefanović, V., PC-1 (ENPP1) K121Q polymorphism in overweight and obese type 2 diabetic coronary heart disease patients. *Acta Cardiol* 2008; 63(3):323-330

Leite, N.C., Villela-Nogueira, C.A., Pannain, V.L.N., Bottino, A.C., Rezende, G.F.M., Cardoso, C.R.L., Salles, G.F., 2011. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. *Liver Int.* 31, 700–706.
<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02482.x>

Lesens, O. Hansmann, Y., Brannigan, E., Remy, V., Hopkins, S., Martinot, M., Meyer, P., Connel, B.O., Monteil, H., Christmann, D., Bergin, C. 2004. Positive surveillance blood culture is a predictive factor for secondary metastatic infection in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Infection.* 48(3): 245–252.

Leung, D. Y., Kotzin, B.L., Meissner, H.C., Fulton, R.D., Murray, D.L., Schlievert, P. M. 1993. Toxic shock syndrome toxin-secreting *Staphylococcus aureus* in Kawasaki syndrome. *The Lancet.* 342(8884): 1385–1388.

Levan, A., 2010 (First published 1938). The effect of colchinie on root mitoses in *allium*. *Hereditas* 24, 471–486. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>

Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., Li, H. Bin, 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients.*
<https://doi.org/10.3390/nu6126020>

Li, J., Liu, P., Zhang, R., Cao, L., Qian, H., Liao, J., Xu, W., Wu, M., Yin, Z., 2011. Icaritin induces cell death in activated hepatic stellate cells through mitochondrial activated apoptosis and ameliorates the development of liver fibrosis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 137, 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.030>

Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Cheung, F., Hong, M., Feng, Y., 2018. The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8394818>

Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., Feng, Y., 2015. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26087–26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>

Li, Y., Gao, F., Gao, F., Shan, F., Bian, J., Zhao, C., 2009. Study on the interaction between 3 flavonoid compounds and α -amylase by fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics. *J. Food Sci.* 74. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01080.x>

Lin, J., Chen, A., 2011. Curcumin diminishes the impacts of hyperglycemia on the activation

- of hepatic stellate cells by suppressing membrane translocation and gene expression of glucose transporter-2. *Mol. Cell. Endocrinol.* 333, 160–171.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.12.028>
- Lippman, S.M., Benner, S.E., Hong, W.K., 1994. Cancer chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* 12, 851–73. <https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.4.851>
- Lovisa, S., LeBleu, V.S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vадnagara, K., Carstens, J.L., Wu, C.C., Hagos, Y., Burckhardt, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Nischal, H., Allison, J.P., Zeisberg, M., Kalluri, R., 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat. Med.* 21, 998–1009.
<https://doi.org/10.1038/nm.3902>
- Lucchesi, A.N., Cassettari, L.L., Spadella, C.T., 2015. Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver that Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. <https://doi.org/10.1155/2015/494578>
- Luyckx, V.A., Tonelli, M., Stanifer, J.W., 2018. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bull. World Health Organ.* 96, 414–422C.
<https://doi.org/10.2471/BLT.17.206441>
- Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M., Mayer-Davis, E.J., 2010. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 39(3):481–97;
DOI:10.1016/j.ecl.2010.05.011.
- Machado, A.P.D.F., Pasquel-Reátegui, J.L., Barbero, G.F., Martínez, J., 2015. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International.* 77(3): 675–683.
- Madhujith, T., Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Antioxidant activity of common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Food Lipids.* 11(3): 220–233.
- Madić, V., Petrović, A., Jušković, M., Jugović, D., Djordjević, Lj., Stojanović, G., Vasiljević, P., 2020. Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113210.
- Madić, V., Popović, Ž.A., Vukelić-Nikolić, M., Đorđević, Lj., Vasiljević, P., 2018. ETHNOPHARMACOLOGICAL THERAPIES IN THE TREATMENT OF DIABETES IN SERBIA. *Glas. Antropološkog društva Srb. / J. Anthropol. Soc. Serbia Niš* 53.
<https://doi.org/10.5937/gads53-18083>
- Madić, V., Stojanović-Radić, Z., Jušković, M., Jugović, D., Žabar Popović, A., Vasiljević, P.,

2019. Genotoxic and antigenotoxic potential of herbal mixture and five medicinal plants used in ethnopharmacology. *South African J. Bot.* 125, 290–297.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.043>
- Mahajan, N. M., Lokhande, B. B., Thenge, R. R., Gangane, P. S., & Dumore, N. G., 2018. Polyherbal formulation containing antioxidants may serve as a prophylactic measure to diabetic cataract: Preclinical investigations in rat model. *Pharmacognosy Magazine*, 14(58), 572.
- Majewska, A., Wolska, E., Śliwińska, E., Furmanowa, M., Urbańska, N., Pietrosiuk, A., Zobel, A., Kuraś, M., 2003. Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots. *Caryologia* 56, 337–351.
<https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589343>
- Manya, K., Champion, B. & Dunning, T., 2012. The use of complementary and alternative medicine among people living with diabetes in Sydney. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12 (2).
- Martinez-Hernandez, A., Amenta, P.S., 1993. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 423, 77–84. <https://doi.org/10.1007/bf01606580>
- Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., Rossi, C., 2009. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34(1): 50–59.
- Masclef, A. 1891. Atlas des plantes de France. Paris : Librairie des sciences naturelles, Paul Klincksieck, éditeur. 52, rue des.
- Mathias, M. T., Mathias, M. T., Horsley, M. B., Mawn, L. A., Laquis, S. J., Cahill, K. V., Foster, J., Amato, M. M., Durairaj, V. D. 2012. Atypical Presentations of Orbital Cellulitis Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Ophthalmology*, 119(6): 1238–1243.
- Mazza, G., 2007. Anthocyanins and heart health. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43(4): 369–374.
- McGill, M., Pathak, S., Hsu, T.C., 1974. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness. *Chromosoma* 47, 157–66.
- Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N., 2003. Soy isoflavones

- exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *Biochem Mol Act Nutr.* 58:1238–43.
- Michelotti, F., Bodansky, H. J., 2015. *Bacillus cereus* causing widespread necrotising skin infection in a diabetic person. *Practical Diabetes.* 32(5): 169-170a.
- Michelotti, G.A., Machado, M. V., Diehl, A.M., 2013. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.183>
- Mihok, E., György, É., Máthé, E., 2019. The Carpathian lingonberry, raspberry and blackberry fruit extracts feature variable antimicrobial efficiency. *Acta Agraria Debreceniensis.* (1): 27–32.
- Misra, M., Aiman, U., 2012. Alloxan: An unpredictable drug for diabetes induction. *Indian J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.4103/0253-7613.99348>
- Miyaoka, Y., Miyajima, A., 2013. To divide or not to divide: Revisiting liver regeneration. *Cell Div.* <https://doi.org/10.1186/1747-1028-8-8>
- Moanna, A., Bajaj, R., del Rio, C., 2006. Emphysematous cholecystitis due to *Salmonella* derby. *The Lancet Infectious Diseases,* 6(2): 118–120.
- Monea, A., Santacroce, L., Marrelli, M., Man, A., 2017. Oral candidiasis and inflammatory response: A potential synergic contribution to the onset of type-2 diabetes mellitus. *Australasian Medical Journal.* 10(6): 550–556.
- Naik, S.R., Filho, J.M.B., Dhuley, J.N., Deshmukh, V., 1991. Probable mechanism of hypoglycemic activity of bassic acid, a natural product isolated from *Bumelia sartorum*. *J. Ethnopharmacol.* 33, 37–44. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90158-A](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90158-A)
- Neshati, V., Mollazadeh, S., Fazly Bazzaz, B.S., Iranshahi, M., Mojarrad, M., Naderi-Meshkin, H., Kerachian, M.A., 2018. Cardiogenic effects of characterized *Geum urbanum* extracts on adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Biochemistry and Cell Biology.* 96(5): 610–618.
- Newton, S.M., Lau, C., Gurcha, S.S., Besra, G.S., Wright, C.W., 2002. The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharmacol.* 79, 57–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00350-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00350-6)
- Nguyen, H., Sorkin, DH., Billimek, J., Kaplan, SH., Greenfield, S. & Ngo-Metzger, Q., 2014. Complementary and Alternative Medicine (CAM) Use among Non-Hispanic White, Mexican American, and Vietnamese American Patients with Type 2 Diabetes, *Health Care Poor Underserved.* 25(4), 1941–19.
- Noumedem, J.A.K., Mihasan, M., Lacmata, S.T., Stefan, M., Kuate, J.R., Kuete, V., 2013.

- Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 26. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-26>
- O'Brien, T., Nguyen, T.T., Zimmerman, B.R., 1998. Hyperlipidemia and diabetes mellitus. *Mayo Clin. Proc.* 73, 969–976. <https://doi.org/10.4065/73.10.969>
- Ocho-Anin atchibri, A.L., Ocho-Anin atchibri, A.L., Brou, K.D., Kouakou, T H., Kouadio, Y.J., Gnakri, D., 2010. Screening for antidiabetic activity and phytochemical constituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17): 1757–1761.
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Eagle, A.R., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., Chawla, A., 2007. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120. <https://doi.org/10.1038/nature05894>
- OECD, 2002. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>.
- OECD, 2018. "Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (OECD TG 407)", in Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-22-en>.
- Ökdem, B., Karatoprak, G. Ş. and Koşar, M., 2018. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of a traditional medicinal plant from Turkey: *Potentilla recta*, L. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 17(4): 691–698.
- Oomah, B. D., Corbé, A., Balasubramanian, P., 2010. Antioxidant and anti-Inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) Hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(14): 8225–8230.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Nowicka, P., Teleszko, M., Cebulak, T., Wolanin, M., 2015. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. species. *Molecules* 20, 4951–4966. <https://doi.org/10.3390/molecules20034951>
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Nowicka, P., Teleszko, M., Cebulak, T., Wolanin, M., 2015. Determination of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Leaves from Wild *Rubus* L. Species. *Molecules* 20, 4951–4966. <https://doi.org/10.3390/molecules20034951>

- Owczarek, A., Gudej, J., Olszewska, M.A., 2015. Antioxidant activity of *Geum Rivale*, L. and *Geum Urbanum*, L. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. 72(6): 1239–1244.
- Owczarek, A., Olszewska, M. A., Gudej, J., 2014. Quantitative determination of ellagic acid and gallic acid in *Geum rivale*, L. And *Geum urbanum*, L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 56(2): 74–78.
- Paolini, M., Abdel-Rahman, S.Z., Sapone, A., Pedulli, G.F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., Legator, M.S., 2003a. β -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? Mutat. Res. Mutat. Res. 543, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00002-4)
- Paolini, M., Abdel-Rahman, S.Z., Sapone, A., Pedulli, G.F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., Legator, M.S., 2003b. Beta-carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? Mutat. Res. 543, 195–200.
- Parasuraman, S., Thing, G.S., Dhanaraj, S.A., 2014. Polyherbal formulation: Concept of ayurveda. Pharmacogn. Rev. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.134229>
- Pavlović, R. D., Lakušić, B., Došlov-Kokoruš, Z., Kovačević, N., 2009. Arbutin content and antioxidant activity of some *Ericaceae* species. Di Pharmazie – An International Journal of Pharmaceutical Sciences. 64(10): 656–659.
- Pérez-Carreón, J., Cruz-Jiménez, G., Licea-Vega, J., Arce Popoca, E., Fattel Fazenda, S., Villa-Treviño, S., 2002. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. Toxicol. Vitro. 16, 253–258. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(02\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(02)00005-X)
- Pero, R.W., Lund, H., Leanderson, T., 2009. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. Phyther. Res. 23, 335–346. <https://doi.org/10.1002/ptr.2628>
- Petkovic, M., Sørensen, A.E., Leal, E.C., Carvalho, E., Dalgaard, L.T., 2020. Mechanistic Actions of microRNAs in Diabetic Wound Healing. Cells 9, 2228.
- Pieroni, A., Giusti, M.E., Quave, C.L., 2011. Cross-Cultural Ethnobiology in the Western Balkans: Medical Ethnobotany and Ethnozoology Among Albanians and Serbs in the Pešter Plateau, Sandžak, South-Western Serbia. Hum. Ecol. 39, 333–349. <https://doi.org/10.1007/s10745-011-9401-3>
- Pourghasem, M., Nasiri, E., Shafi, H., 2014. Early renal histological changes in alloxan-induced diabetic rats. Int. J. Mol. Cell. Med. 3, 11–5.
- Prajitha, V., Thoppil, J.E., 2016. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. South African J. Bot.

- 102, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.06.018>
- Prajitha, V., Thoppil, J.E., 2016. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. South African J. Bot. 102, 18–25. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2015.06.018>
- Psenák, M., Jindra, A., Kovács, P., Dulovcová, H., 1970. Biochemical study on *Geum urbanum*. Planta medica. 19(2): 154–9.
- Punithavathi, V.R., Prince, P.S.M., Kumar, R., Selvakumari, J., 2011. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. Eur. J. Pharmacol. 650, 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.059>
- Qi, R., Yang, C., 2018. Renal tubular epithelial cells: the neglected mediator of tubulointerstitial fibrosis after injury. Cell Death Dis. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1157-x>
- Qiu, J., Zhou, Q., Zhai, X., Jia, X., Zhou, Y., 2014. Curcumin regulates delta-like homolog 1 expression in activated hepatic stellate cell. Eur. J. Pharmacol. 728, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.074>
- Radulović, N.S., Randjelović, P.J., Stojanović, N.M., Ilić, I.R., Miltojević, A.B., Stojković, M.B., Ilić, M., 2015. Effect of two esters of N-methylantranilic acid from Rutaceae species on impaired kidney morphology and function in rats caused by CCl₄. Life Sci. 135, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.05.022>
- Rank, J., Nielsen, M.H. 1994: Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. Mutation Research, 312, 17- 24.
- Redli, P.M., Gasic, I., Meraldi, P., Nigg, E.A., Santamaria, A., 2016. The Ska complex promotes Aurora B activity to ensure chromosome biorientation. J. Cell Biol. 215, 77. <https://doi.org/10.1083/JCB.201603019>
- Riaz, M., Ahmad, M., Rahman, N., 2011. Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. J. Med. Plants Res. 5, 5920–5924.
- Rockey, D.C., 2000. The cell and molecular biology of hepatic fibrogenesis: Clinical and therapeutic implications. Clin. Liver Dis. 4, 319–355. [https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(05\)70113-6](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(05)70113-6)
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., Alonso-Moraga, Á., 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 585, 147–155. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2005.05.004>

- Rusov, Č., 1984. Osnovi hematologije životinja. Beograd: Naučna knjiga.
- Russell-Jones, D., Khan, R., 2007. Insulin-associated weight gain in diabetes – causes, effects and coping strategies. *Diabetes, Obes. Metab.* 9, 799–812.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00686.x>
- Ryan, K.J., Ray, C.G., eds. 2004. *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 978-0-8385-8529-0.
- Sajid, M., Khan, M.R., Ismail, H., Latif, S., Rahim, A.A., Mehboob, R., Shah, S.A., 2020. Antidiabetic and antioxidant potential of *Alnus nitida* leaves in alloxan induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 251, 112544. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112544>
- Salvamani, S., Gunasekaran, B., Azmi Shaharuddin, N., Aqlima Ahmad, S., Yunus Shukor, M., 2014. Antiatherosclerotic Effects of Plant Flavonoids.
<https://doi.org/10.1155/2014/480258>
- Sanderson, L.A., Caron, .T., Tan, R., Shen, Y., Liu, R., Bett, K.E., 2019. KnowPulse: A Web-Resource Focused on Diversity Data for Pulse Crop Improvement. *Front. Plant Sci.* 10:965. doi: 10.3389/fpls.2019.00965
- Sarkhail, P., Rahmanipour, S., Fadyevatan, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Amin, G., Shafiee, A., Abdollahi, M., 2007. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacol. Res.* 56, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.07.003>
- Scolnick, D.M., Halazonetis, T.D., 2000. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 406, 430–435. <https://doi.org/10.1038/35019108>
- Sheikhrabari, A, Mahlagha Dehghan, M., Ghaedi, F., Khademi, G.R., 2017. Complementary and Alternative Medicine Usage and Its Determinant Factors Among Diabetic Patients: An Iranian Case, *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine.* 22(3), 449-454.
- Shibano, M., Kakutani, K., Taniguchi, M., Yasuda, M., Baba, K., 2008. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their α -glucosidase-inhibitory activity. *J. Nat. Med.* 62, 349–353. <https://doi.org/10.1007/s11418-008-0244-1>
- Shih, C. C., Liao, C. C., Su, Y. C., Tsai, C. C., & Lin, J. G., 2012. Gender differences in traditional Chinese medicine use among adults in Taiwan. *PLoS One*, 7(4), e32540.
- Shikov, A., Pozharitskaya, O., Makarov, V., Wagner, H., Verpoorte, R. & Heinrich, M., 2014. Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology.* 154, 481–536.

- Shushunov, S., Balashov, L., Kravtsova, A., Krasnogorsky, I., Latté, K.P., Vasiliev, A., 2009. Determination of Acute Toxicity of the Aqueous Extract of *Potentilla erecta* (Tormentil) Rhizomes in Rats and Mice. *J. Med. Food* 12, 1173–1176.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0281>
- Sidorova, Y., Shipelin, V., Mazo, V., Zorin, S., Petrov, N., Kochetkova, A., 2017. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Vaccinium myrtillus* L. leaf and *Phaseolus vulgaris* L. seed coat extracts in diabetic rats. *Nutrition* 41, 107–112.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.04.010>
- Sidorova, Y., Shipelin, V., Mazo, V., Zorin, S., Petrov, N., Kochetkova, A., 2017. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Vaccinium myrtillus* L. leaf and *Phaseolus vulgaris* L. seed coat extracts in diabetic rats. *Nutrition* 41, 107–112.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.04.010>
- Singh, C. R., Lytle, W. F. , 1983. Cystitis emphysematosa caused by *Candida albicans*. *Journal of Urology*, 130(6): 1171–1173.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J., 2015. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences.* 16(10): 24673–24706.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., Toman, M.J., 1996. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutat. Res. Toxicol.* 368, 171–179. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90059-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90059-2)
- Snyder, M. & Lindquist, R., 2009. *Complementary and Alternative Therapies in Nursing.* 6th ed. Berlin, Germany: Springer.
- Song, C., Lyu, Y., Li, C., Liu, P., Li, J., Ma, R.C., et al. Long-term risk of diabetes in women at varying durations after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis with more than 2 million women. *Obes Rev.* 2018;19(3):421–9.
- Spiridonov, N.A., Konovalov, D.A., Arkhipov, V. V., 2005. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phyther. Res.* 19, 428–432.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1616>
- Srikanth, S., Deedwania, P., 2011. Primary and secondary prevention strategy for cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Cardiol. Clin.* 29, 47–70.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. and Granum, P. E., 2008. From soil to gut: *Bacillus*

- cereus and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(4). 579–606.
- Stevens, J.B., Abdallah, B.Y., Liu, G., Ye, C.J., Horne, S.D., Wang, G., Savasan, S., Shekhar, M., Krawetz, S.A., Hüttemann, M., Tainsky, M.A., Wu, G.S., Xie, Y., Zhang, K., Heng, H.H.Q., 2011. Diverse system stresses: common mechanisms of chromosome fragmentation. *Cell Death Dis.* 2, e178–e178. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.60>
- Sturm, J. G., 1796. Deutschlands Flora in Abbildungen. Preuzeto sa <http://www.biolib.de>
- Subbotina, M. D., Timchenko, V., Vorobyov, M., Konunova, Y., Aleksandrovih, Y., Shushunov, S., 2003. Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla tormentilla*) on rotavirus diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled trial', *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 22(8): 706–711.
- Sushmita, N., Ranjana, N., 1997. Anti-oxidant flavonoids in common Indian foods. *South Asian J Prevent Cardiol* 1, 33–35
- Suvarna, Kim S, Mbbs Bsc, Frcp Frcpath, Christopher Layton, and John D Bancroft. 2012. "Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques 7th Edition Pdf."
- Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J., Flat, P.R., 1990. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice, *Diabetologia*.
- Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J., Flatt, P.R., 1990. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* 33, 462–4.
- Synowiec, A., Gniewosz, M., Bączek, K., Przybył J. L. 2014: Antimicrobial effect of an aqueous extract of *Potentilla erecta* rhizome. *Herba Polonica*, 60(2): 18–28.
- Szkudelski, T., 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas, *Physiological Research*.
- Tacke, F., 2017. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J. Hepatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.02.026>
- Teixeira, R.O., Camparoto, M.L., Mantovani, M.S., Vicentini, V.E.P. 2003. Assesment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 551-555.
- Terayama, Y., Kodama, Y., Matsuura, T., Ozaki, K., 2017. Acute alloxan renal toxicity in the rat initially causes degeneration of thick ascending limbs of henle. *J. Toxicol. Pathol.* 30, 7–13. <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0035>
- Tomashefski, J. F., Abramowsky, C. R. ,1981. Candida-associated Renal Papillary Necrosis. *American Journal of Clinical Pathology*. 75(2): 190–194.
- Tomczyk, M., Latté, K.P., 2009. *Potentilla*—A review of its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* 122, 184–204.

- <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.022>
- Tomczyk, M., Leszczyńska, K., Jakoniuk, P., 2008. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia* 79, 592–594. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2008.06.006>
- Tomczyk, M., Pleszczyńska, M., Wiater, A., 2010. Variation in total polyphenolics contents of aerial parts of *Potentilla* species and their anticariogenic activity. *Molecules*. 15(7): 4639–4651
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3): 603–661.
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., Osawa, T., 1996. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris*, L. *Biochemical Pharmacology*, 52(7): 1033–1039.
- Tunón, H., Olavsdotter, C., Bohlin, L., 1995. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *Journal of Ethnopharmacology*. 48(2): 61–76.
- Umamaheswari, S., Prathiba, D., Srikanth, J., & Reddy, U., 2009. Antioxidant potential of a polyherbal formulation (Diabet) on alloxan induced oxidative stress in rats. *Drug Invention Today*, 1(1).
- Vallance Owen, J., 1952. Liver glycogen in diabetes mellitus. *J. Clin. Pathol.* 5, 42–53. <https://doi.org/10.1136/jcp.5.1.42>
- Verma, R., Gangrade, T., Punasiya, R., Ghulaxe, C., 2014. *Rubus fruticosus* (blackberry) use as an herbal medicine', *Pharmacognosy Reviews*. 8 (16) 101–104.
- Vogel, M., Schmitz, R.P., Hagel, S., Pletz, M.W., Gagelmann, N., Scherag ,A., Schlattmann, P., Brunkhorst, F.M. 2016: Infectious disease consultation for *Staphylococcus aureus* bacteremia - A systematic review and meta-analysis', *Journal of Infection*, 72(1): 19–28.
- Vogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V.M., Saukel, J., Kopp, B., 2013. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine - An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J. Ethnopharmacol.* 149, 750–771. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.007>
- Volpe, C.M.O., Villar-Delfino, P.H., Dos Anjos, P.M.F., Nogueira-Machado, J.A., 2018. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications review- Article. *Cell Death Dis.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
- Volpe, C.M.O., Villar-Delfino, P.H., Dos Anjos, P.M.F., Nogueira-Machado, J.A., 2018.

- Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis.* 9, 119. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
- Wang, J., Wang, H., 2017. Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cell Regeneration. <https://doi.org/10.1155/2017/1930261>
- Wang, J., Wang, H., 2017. Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cell Regeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 1930261. <https://doi.org/10.1155/2017/1930261>
- Wang, M.J., Chen, F., Lau, J.T.Y., Hu, Y.P., 2017. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell Death Dis.* <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.167>
- Wang, S.Y., Lin, H.S., 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48, 140–146. <https://doi.org/10.1021/jf9908345>
- Wang, S.Y., Lin, H.S., 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48, 140–6.
- Waris, G., Ahsan, H., 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* 5, 14. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>
- WHO., 2012. The Regional Strategy for Traditional Medicine in the Western Pacific (2011-2020). World Health Organization, Western Pacific Region.
- Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37, 99–105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>
- Xia, M.F., Bian, H., Gao, X., 2019. NAFLD and Diabetes: Two Sides of the Same Coin? Rationale for Gene-Based Personalized NAFLD Treatment. *Front. Pharmacol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00877>
- Yang, L., Besschetnova, T.Y., Brooks, C.R., Shah, J. V., Bonventre, J. V., 2010. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat. Med.* 16, 535–543. <https://doi.org/10.1038/nm.2144>
- Yin, H., Ma, J., Han, J., Li, M., Shang, J., 2019. Pharmacokinetic comparison of quercetin, isoquercitrin, and quercetin-3-O- β -Dglucuronide in rats by HPLC-MS. *PeerJ* 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.6665>
- Yu, A., Snowwhite, I., Vendrame F., Rosenzweig, M., Klatzmann, D., Pugliese, A., Malek, T. R. 2015: Selective IL-2 responsiveness of regulatory t cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *American*

- Diabetes Association, 64(6): 2172–2183.
- Zak, A., Zeman, M., Vecka, M., Tvrzicka, E., 2006. Nicotinic acid: an unjustly neglected remedy. *Cas Lek Cesk* 145: 825–831.
- Zeiger, E., 2003. Illusions of safety: Antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00111-4)
- Zeiger, E., 2003. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 543, 191–194. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00111-4).
- Zeka, K., Ruparelia, K., Arroo, R., Budriesi, R., Micucci, M., 2017. Flavonoids and Their Metabolites: Prevention in Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Diseases* 5, 19. <https://doi.org/10.3390/diseases5030019>
- Zhang, X., Ishida, R., Yuhara, Y., Kamiya, T., Hatano, T., Okamoto, G., Arimoto-Kobayashi, S., 2011. Anti-genotoxic activity of *Vitis coignetiae* Pulliat towards heterocyclic amines and isolation and identification of caftaric acid as an antimutagenic component from the juice. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 723, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.001>
- Zhao, Y., Chen, B., Shen, J., Wan, L., Zhu, Y., Yi, T., & Xiao, Z., 2017. The beneficial effects of quercetin, curcumin, and resveratrol in obesity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., de Feo, V., Jaafar, H., Moga, M., 2014. *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. *Molecules* 19, 10998–11029.
- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., De Feo, V., Jaafar, H.Z.E., Moga, M., 2014. *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules190810998>
- Zieliński, H., Kozłowska, H., 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48:2008e16.

8. PRILOZI

LISTA SKRAĆENICA

A – broj ćelija u anafazi mitotskog ciklusa

AA – antihemolitička aktivnost

ADA (eng. *American Diabetes Association*) – Američko udruženje za dijabetes

ADM – „anti-dijabetična“ biljna mešavina

AFI – procenat ćelija sa hromozomskim aberacijama u pojedinačnim fazama mitotskog ciklusa

AI (eng. *atherogenic index*) – aterogeni indeks

AMPK (engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) – adenozin monofosfatom aktivirana proteinska kinaza

ANOVA (eng. *analysis of variance*) – analiza varijanse

ATP (eng. *adenosine triphosphate*) – adenozin trifosfat

ATTC (eng. *American Type Culture Collection*) – Američka banka ćelija

BH – binukleusni hepatociti

BHA – butil hidroksianizol

Ch – hloramfenikol

CTGF (engl. *connective tissue growth factor*) – faktor rasta koji uslovljava razvoj vezivnog tkiva

D – ispitanici bez dijagnostikovanog dijabetesa

D+ – ispitanici sa dijagnostikovanim dijabetesom

D-10 – grupa dijabetičnih životinja tretirana biljnom mešavinom koncentracije 10 g/kg

D-20 – grupa dijabetičnih životinja tretirana biljnom mešavinom koncentracije 20 g/kg

DAD (eng. *Diode Array Detector*) – detektor sa serijom dioda

DK – kontrolna grupa dijabetičnih životinja tretiranih vodom

DPP-4 (eng. *dipeptidyl-peptidase 4*) – dipeptidil-peptidaza 4

DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

- DPPHa** – antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata izračunata DPPH testom
- ECM** (eng. *extracellular matrix*) – ekstracelularni matriks
- FI** – fazni indeks
- GAE** (eng. *gallic acid*) – galna kiselina
- GLP-1** (eng. *glucagon-like peptide 1*) – glukagonu-sličan peptid 1
- GU** (lat. *Geum urbanum*) – zečja stopa
- H&E** (eng. *hematoxylin and eosin*) – hematoksilin i eozin bojenje
- HA** – hemolitička aktivnost
- HDL** (eng. *high-density lipoproteins*) – lipoproteini visoke gustine
- HMG-CoA** (engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A*) – 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
- HPLC** (eng. *high-performance liquid chromatography*) – tečna hromatografija visokih performansi
- HrAb** – procenat meristemskih ćelija *A. cepa* sa hromozomskim aberacijama
- I** – kontrolna grupa dijabetičnih životinja tretirana insulinom glarginom (13 IU/kg)
- IA** – inhibitorna aktivnost
- IDF** (eng. *International Diabetes Federation*) – Međunarodna federacija za dijabetes
- JNK** (engl. *c-Jun N-terminal kinases - dependent pathway*) – signalni put zavisan od c-Jun N kinaze
- KRI** (eng. *cardiovascular risk index*) – kardiovaskularni indeks
- LDL** (eng. *low-density lipoproteins*) – lipoproteini niske gustine
- LO** – Langerhansova ostrvca pankreasa
- M** – broj ćelija u metafazi mitotskog ciklusa
- M** – kontrolna grupa dijabetičnih životinja tretirana metforminom (150 mg/kg)
- MH** – mononukleusni hepatociti
- MI** – mitotski indeks
- MIK** (eng. *minimum inhibitory concentration*) – minimalna inhibitorna koncentracija
- MT** (eng. *Masson's trichrome*) – Mason trihromno bojenje

N:C – odnos nukleusa i citoplazme

NAFLD (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*) – nealkoholna masna jetra

NPC1L1 (engl. *NPC1 Like Intracellular Cholesterol Transporter 1*) – NPC1-sličnom intracelularni transporter holesterola

Ns – nistatin

OECD (eng. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) – Organizacija za ekonomsku kooperaciju i razvoj

P – broj ćelija u profazi mitotskog ciklusa

PAS (eng. *periodic acid-Schiff*) – bojenje perjodnom kiselinom i Šifovim reagensom

PBS (eng. *phosphate-buffered saline*) – fosfatni pufer

PE (lat. *Potentilla erecta*) – žuta steža

PV (lat. *Phaseolus vulgaris*) – pasulj

QuE (eng. *quercetin*) – kvercetin

RF (lat. *Rubus fruticosus*) – kupina

ROS (eng. *reactive oxygen species*) – reaktivne vrste kiseonika

T – broj ćelija u telofazi mitotskog ciklusa

TC (eng. *total cholesterol*) – ukupni holesterol

TG (eng. *triglycerides*) – trigliceridi

TGF- β (engl. *transforming growth factor beta*) – transformišući faktor rasta beta

TTC – trifetil-tetrazolijum hlorid

Vit C – askorbinska kiselina

VLDL (eng. *very-low-density lipoprotein*) – lipoproteini veoma niske gustine

VM (lat. *Vaccinium myrtillus*) – borovnica

WHO (eng. *World Health Organization*) – Svetska zdravstvena organizacija

Z-10 – grupa zdravih životinja tretirana biljnom mešavinom koncentracije 10 g/kg

Z-20 – grupa zdravih životinja tretirana biljnom mešavinom koncentracije 20 g/kg

Z-40 – grupa zdravih životinja tretirana biljnom mešavinom koncentracije 40 g/kg

ZK – kontrolna grupa zdravih životinja tretiranih vodo

IZVOD

Dijabetes je jedna od najčešćih bolesti 21. veka. Savremeni lekovi korišćeni u farmakoterapiji ovog oboljenja uspešno regulišu hiperglikemiju, ali ne sprečavaju progresiju pratećih sekundarnih komplikacija. Zato sve veći broj ljudi, pored već propisane farmakoterapije, u terapiju uključuje i biljne supstituente iz narodne medicine.

Ciljevi ove studije bili su utvrđivanje prevalencije korišćenja tradicionalne medicine u Srbiji i ispitivanje biološke aktivnosti biljne mešavine koja se često primenjuje u etnofarmakološkom tretmanu dijabetesa.

Prevalenca upotrebe narodne medicine procenjena je intersektorskim istraživanjem, dok je biološka aktivnost „anti-dijabetične“ biljne mešavine ispitana kroz *in vitro* i *in vivo* pristup.

Rezultati ispitivanja su pokazali da se 67,7% ispitanika iz cele Srbije oslanja na etnofarmakologiju, kao i da je upotreba biljnih mešavina i farmaceutskih suplemenata zasnovanih na tradicionalnim recepturama češća od korišćenja pojedinačnog lekovitog bilja.

Fitohemijaska analiza biljne mešavine je ukazala na prisustvo visokog sadržaja fenola i flavonoida, a *HPLC-UV* metodom identifikovano je deset bioaktivnih supstanci u njoj: hininska, galna i kaftarinska kiselina, arbutin, rutin, trifolin, astragalin, hiperozid, izokvercitrin i kvercitrin.

In vitro studija je pokazala izuzetno visoku antioksidativnu, anticitotoksičnu i antigenotoksičnu aktivnost, kao i izvestan nivo antimikrobne aktivnosti ka širokom spektru mikroorganizama. Pored toga je njena citotoksičnost i genotoksičnost bila vrlo niska.

In vivo studija je pokazala da ova biljna mešavina poseduje hipoglikemijski, hipolipidemijski i hepatoprotektivni efekat i kod zdravih i kod dijabetičnih životinja, dok je kod dijabetičnih životinja pokazivala i nefroprotektivna dejstva sa većim hipoglikemijskim efektom od insulina i metformina u ovom eksperimentalnom modelu.

SUMMARY

Diabetes is one of the most prevalent diseases of the 21st century. Conventional pharmacotherapy of diabetes successfully regulates hyperglycemia, yet it cannot completely prevent the progress of secondary diabetic pathologies. Thus, many people combine pharmacotherapy with herbal remedies.

This study aimed to evaluate the frequency of traditional medicine use in Serbia and to examine the biological activities of the “anti-diabetic” herbal mixture used in the ethnopharmacology.

The prevalence of traditional medicine use was assessed by cross-sectional study, while the biological activities of the herbal mixture were examined through *in vitro* and *in vivo* experiments.

The results of the study showed that 67.7% of respondents from all over Serbia rely on ethnopharmacology. The consumption of polyherbal mixtures and pharmaceutical supplements based on traditional recipes was more frequent than individual medicinal herbs.

Phytochemical analysis of tested herbal mixture indicated high content of phenols and flavonoids. The HPLC-UV analysis revealed the presence of ten bioactive compounds: quinic, gallic and caftaric acid, arbutin, rutin, trifolin, astragaloside, hyperoside, isoquercetin and quercitrin.

In vitro study indicated its high antioxidant, anticytotoxic and antigenotoxic activities as well as antimicrobial activity against a wide range of microorganisms. In addition, its cytotoxicity and genotoxicity were extremely low.

In vivo study showed that this herbal mixture has hypoglycemic, hypolipidemic and hepatoprotective effects in both healthy and diabetic animals. Moreover, in diabetic animals, it showed nephroprotective activity, while its hypoglycemic effect was higher than the effect of insulin and metformin in this experimental model.

BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA AUTORA

BIOGRAFIJA

Višnja Madić je rođena 1984. godine u Nišu. Osnovnu školu „Vožd Karađorđe“ završila je 1999. u Nišu, a gimnaziju „Bora Stanković“ 2003. godine, takođe u Nišu. Od 2008. do 2009. godine volontirala je na Institutu za biologiju sa humanom genetikom, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu, gde je radila i svoj diplomski rad „*In vitro* ispitivanje biokompatibilnosti ekstrakata biomaterijala“. 2009. godine je diplomirala na odseku za Biologiju sa ekologijom, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Od 2011. do 2012. godine radila je na Odseku za Mikrobiologiju i imunologiju, Fakulteta Patologije i laboratorijske medicine Univerziteta Zapadne Australije na potprojektima „Ispitivanje mehanizma kompeticije ko-infektivnih sojeva mišjeg citomegalovirusa posredovane NK ćelijama“ i „Funkcionalno objašnjenje varijabilnog dela mišjeg citomegalovirusa“, a takođe i kao demonstrator na vežbama Mikrobiologije.

Od 2014. do 2015. godine obavljala je pripravnički staž u Kliničkom centru u Nišu, u Laboratoriji za citogenetiku i imunologiju, a 2015. godine položila je i državni ispit za medicinske saradnike.

2015. godine upisala je doktorske studije u Laboratoriji za ćelijsku i tkivnu biologiju, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. 2016. godine izabrana je u zvanje istraživač pripravnik a 2019. u zvanje istraživač saradnik. U školskoj 2017/18. godini bila je angažovana za izvođenje vežbi na predmetu Biohemija. Od 2016. godine radi sa master studentima i pomaže im u osmišljavanju teze, eksperimentalnom radu i analizi dobijenih rezultata.

Tečno govori srpski i engleski jezik. Član je EASD. Recenzent je u međunarodnim časopisima iz oblasti eksperimentalne biologije i biomedicine.

BIBLIOGRAFIJA**A: Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)**

Madić V, Petrović A, Jušković M, Jugović D, Djordjević Lj, Stojanović G, Vasiljević P. Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113210.

B: Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

Madić V, Stojanović-Radić Z, Jušković M, Jugović D, Žabar Popović A, Vasiljević P. Genotoxic and antigenotoxic potential of herbal mixture and five medicinal plants used in ethnopharmacology. *South African Journal of Botany*. 2019. 125 (C): 290-297

C: Radovi u međunarodnim časopisima (M23)

Jugović D, Miljković P, Jevtović-Stoimenov T, Despotović T, **Madić V**, Milićević A, Vukelić-Nikolić M, Vasiljević P. Association of TGF- β 1 and TNF- α genes polymorphisms with the kidney scars forming risk in children with vesicoureteral reflux. *Genetika*. 2019. 51 (2): 701-715

Milićević R, Branković Lj, Radulović D, Jugović D, Stamenković H, Stanković T, Milićević A, **Madić V**, Ristić M. Fetal chromosomal anomalies in Southeast Serbia- single center cohort retrospective study. *Genetika*. 2019. 51 (1) 157-166

D: Radovi u časopisima od istaknutog nacionalnog značaja (M52)

Madić V, Žabar Popović A, Vukelić-Nikolić M, Đorđević Lj, Vasiljević P. Ethnopharmacological therapies in the treatment of diabetes in Serbia. *Glasnik Antropološkog Društva Srbije*. 2018. 53, 99-105

E: Radovi u časopisima od nacionalnog značaja (M53)

Madić V, Jovanović J, Stojilković A, Jušković M, Vasiljević P. Evaluation of cytotoxicity of 'anti-diabetic' herbal preparation and five medicinal plants: an *Allium cepa* assay. *Biologica Nyssana – Journal of Biological Sciences*. 2017. 8 (2): 151-158

F: Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

Madić V, Žabar Popović A, Vukelić-Nikolić M, Đorđević Lj, Vasiljević P. Etnofarmakološke

terapije u lečenju dijabetesa u Srbiji. 55. Kongres antropološkog društva Srbije, Zlatibor. 2018. 27

Žabar Popović A, Veljković N, **Madić V**, Aleksić M, Conić J, Popović P, Vasiljević P. Populaciono genetička analiza prisustva 20 homozigotih recesivnih osobina kod ljudi sa melanomom. 55. Kongres antropološkog društva Srbije, Zlatibor. 2018. 112

Madić V, Petrović A, Jušković M, Žabar Popović A, Aleksić M, Vasiljević P. Hypoglycemic effect of traditionally used herbal mixture in normal and diabetic rats. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., 2019. 172

Žabar Popović A, Aleksić M, Aleksić A, **Madić V**, Stojanović J, Stojanović-Radić Z, Vasiljević P. Antioxidant and antimicrobial potential of *Gleditsia triacanthos* L. pods. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., 2019. 184

Aleksić M, Žabar Popović A, Stojanović J, **Madić V**, Vasiljević P. Antiradical properties of homemade wines: white vs. red wine. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., 2019. 185

F: Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

Madić V, Jugović D, Žabar Popović A, Vasiljević P. Ispitivanje potencijalne antigenotoksičnosti pet lekovitih biljaka korišćenih u etnofarmakološkom tretmanu dijabetesa – *in vivo* studija. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo. 2018. 142

Žabar Popović A, Conić J, Aleksić M, **Madić V**, Jušković M, Vasiljević P. Biološka aktivnost različitih ekstrakata mahune vrste *Gleditsia triacanthos* L. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo. 2018. 132

IZJAVE AUTORA**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ПРОЦЕНА БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ БИЉНЕ МЕШАВИНЕ КОЈА СЕ ПРИМЕЊУЈЕ У ЕТНОФАРМАКОЛОШКОМ ТРЕТМАНУ ДИЈАБЕТЕСА

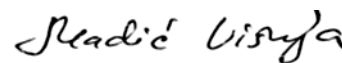
која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 16. 10. 2020.

Потпис аутора дисертације:



Вишња Модић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

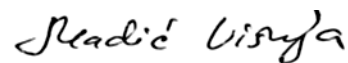
Наслов дисертације:

**ПРОЦЕНА БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ БИЉНЕ МЕШАВИНЕ КОЈА СЕ
ПРИМЕЊУЈЕ У ЕТНОФАРМАКОЛОШКОМ ТРЕТМАНУ ДИЈАБЕТЕСА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 16. 10. 2020.

Потпис аутора дисертације:



Вишња Модић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ПРОЦЕНА БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ БИЉНЕ МЕШАВИНЕ КОЈА СЕ ПРИМЕЊУЈЕ У ЕТНОФАРМАКОЛОШКОМ ТРЕТМАНУ ДИЈАБЕТЕСА

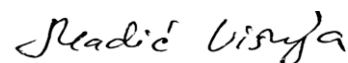
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 16. 10. 2020.

Потпис аутора дисертације:



Вишња Мадих