

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**



Nina Bukumirović

**HIPOGLIKEMIJSKO DELOVANJE PIKNOGENOLA
I EKSTRAKTA CRNOG BORA *PINUS NIGRA*
NA EKSPERIMENTALNOM MODELU DIJABETIČNIH PACOVA**

Doktorska disertacija

Mentori:

Prof. dr Aleksandar Rašković

Prof. dr Nataša Milić

Novi Sad, 2019.

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem:

- ❖ *svojim mentorima prof. dr Aleksandru Raškoviću i prof. dr Nataši Milić na ukazanom poverenju, značajnom trudu i podršci, na korisnim savetima, rečima podrške u teškim trenucima i svemu onome što su me naučili prilikom izrade i pisanja doktorskog disertacije;*
- ❖ *prof. dr Svetlani Goločorbin Kon i prof. dr Momiru Mikovu na svim lepim rečima i podršci, na stručnom vođenju istraživanja, na pronalaženju rešenja za svaki izazov koji se našao na putu, materijalnoj pomoći. Takođe, na nesebičnom prenošenju kako stručnog, tako i životnog znanja tokom svih godina saradnje;*
- ❖ *doc. dr Nebojši Stiliću na neizmernoj prijateljskoj pomoći i požrtvovanosti tokom izvođenja ogleda, pisanja naučnog rada i teze. Veliko hvala i na motivaciji i ohrabrenju da lakše dođem do cilja;*
- ❖ *doc. dr Zoranu Bukumiriću koji me je naučio kako da na najbolji mogući način statistički obradim rezultate i tako u velikoj meri doprineo značajnosti doktorata;*
- ❖ *assist. dr Milici Paut Kusturici na strpljenju i značajnoj pomoći pri pisanju naučnog rada koji nam je omogućio da rezultati ove teze budu prepoznati u široj naučnoj zajednici;*
- ❖ *doc. dr Ivanu Čapu, dr Dejanu Miljkoviću i dr Milanu Popoviću za pomoć oko histoloških analiza;*
- ❖ *doc. dr Tatjani Čebović na pomoći oko biohemijskih analiza;*
- ❖ *Radmili Matić na strpljenju i pomoći u citiranju i sređivanju literature;*
- ❖ *Slavenu Šuputu i Mari Katić na pomoći oko svih laboratorijskih procedura koje sam savladala tokom izvođenja eksperimenata;*
- ❖ *vereniku, roditeljima i sestri na nesebičnoj ljubavi i podršci kakvu samo porodica može pružiti, ogromnom razumevanju i veri u mene tokom ovog životnog puta kroz doktorske studije;*
- ❖ *kollegama, prijateljima i svima onima koji su na bilo koji način doprineli planiranju, realizaciji i kvalitetu ove doktorskog disertacije.*

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., master, dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nina Bukumirović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr.sc Aleksandar Rašković, redovni profesor Dr.sc Nataša Milić, redovni profesor
Naslov rada: NR	Hipoglikemijsko delovanje piknogenola i ekstrakta crnog bora <i>Pinus nigra</i> na eksperimentalnom modelu dijabetičnih pacova.
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 9/ stranica 146/ slika 9/ grafikona 18/ tabela 46/ referenci 147/ priloga 4)
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Farmakologija sa toksikologijom, farmaceutska Hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	pinus; kora biljaka; eksperimentalni dijabetes melitus; antioksidansi; oksidativni stres; hipoglikemijski agensi; fitoterapija
UDK	582.475:543.544.5 616.379-008.64:612.085
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Bor je bilo koji četinar roda <i>Pinus</i> koji pripada porodici <i>Pinaceae</i>. U Republici Srbiji nalaze se prirodne i veštačke šume crnog bora <i>Pinus nigra</i> Arnold. Kora bora se vekovima koristila u tradicionalnoj medicini, međutim tek u novije vreme su otkriveni i potvrđeni njeni pozitivni biološki efekti u medicini. Najpoznatiji komercijalni preparat kore bora je piknogenol, standardizovani ekstrakt kore francuskog primorskog bora <i>Pinus pinaster</i> Aiton, koji raste duž obale jugozapadne Francuske. Pozitivni efekti koje ispoljava piknogenol, kao što su antioksidativno, hipoglikemijsko, hipolipidemijsko delovanje, zasnovani su na njegovom visokom sadržaju fenolnih jedinjenja. Danas, i pored saznanja da je kora bora bogata sekundarnim metabolitima ona najčešće završava kao nusproizvod drvne industrije.</p> <p>Ciljevi ovog rada bili su ispitivanje kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika i biohemijskih aktivnosti ekstrakata kore crnog bora <i>Pinus nigra</i> sa Mokre gore i Tare, dobijenih različitim rastvaračima; upoređivanje glikemijskog i lipidnog delovanja ekstrakta kore bora <i>Pinus nigra</i> sa komercijalnim preparatom piknogenol; uticaj ekstrakta kore bora <i>Pinus nigra</i> i piknogenola na delovanje standardnih antidijabetika metformina i gliklazida; kao i uticaj na parametre oksidativnog stresa nakon izlaganja životinja toksičnoj dozi paracetamola.</p>

In vitro ispitivanja su uključivala analizu ekstrakata dobijenih različitim rastvaračima. Ukupni sadržaj fenola, tanina, flavonoida i proantocijanidna, kao i ispitivanje antioksidativne aktivnosti kroz pet različitih metoda, određivani su spektrofotometrijski. Vršena je analiza ekstrakata kore bora visokoefikasnom tečnom hromatografijom (HPLC). *In vivo* ispitivanje je rađeno na 156 albino laboratorijska pacova soja *Wistar*. Eksperimentalne životinje su tokom 7 dana *per os* primale ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore 100 mg/kg, koji je pokazao najbolju aktivnost, piknogenol 50 mg/kg, metformin 100 mg/kg, gliklazid 10 mg/kg, kao i njihove kombinacije. Za ispitivanje uticaja primenjenih supstanci na glikemiju životinja korišćeni su test oralnog podnošenja glukoze i indukcija trajne hiperglikemije aloksanom. Od biohemijskih parametara u serumu je određivana koncentracija lipida, kao i parametric pokazatelji funkcije bubrega i jetre. *Ex vivo* ispitivanja uključivala su određivanje intenzitet lipidne peroksidacije i anktivnosti enzima antioksidativne zaštite u homogenatu jetre ispitivanih životinja, nakon primene toksične doze paracetamola.

HPLC analizom ekstrakata kore crnog bora utvrđeno je da ekstrakti poreklom sa Mokre gore i Tare u najvećoj meri sadrže taksifolin, a zatim katehin, njegove derivate, kafenu kiselinu i epikatehin. Potvrđen je visok antioksidativni kapacitet piknogenola, ali takođe i značajan antioksidativni kapacitet ekstrakata kore crnog bora, sa najboljim rezultatima kod ekstrakta poreklom sa Mokre gore. Sedmodnevni tretman ekstraktom kore bora 100 mg/kg, metforminom 100 mg/kg, gliklazidom 10 mg/kg i piknogenolom 50 mg/kg, kod životinja sa aloksanski izazvanim dijabetesom, doveo je do sniženja glikemije u krvi. Uočeno je povećanje koncentracije HDL holesterola i značajno sniženje serumskih triglicerida kod dijabetičnih i normoglikemičnih životinja koje su primale piknogenol, ekstrakta kore bora, gliklazid i metformin u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Zajednička primena ekstrakta kore bora i standardnih antidijabetika značajno je snizila vrednosti AST, ALP i direktni bilirubin u grupi dijabetičnih i normoglikemičnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu, čime se ukazuje na potencijalno hepatoprotektivno delovanje ekstrakta kore crnog bora.

	<p>Oštećenje jetre izazvano toksičnom dozom paracetamola je potvrđeno ispitivanim parametrima, uključujući oksidativni status u homogenatu jetre i histološka ispitivanja. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da piknogenol 50 mg/kg, kao i ekstrakt kore crnog bora 100 mg/kg značajno smanjuju nivo MDA u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom koja je primala paracetamol.</p> <p>Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da primena piknogenola i ekstrakta kore crnog bora: ublažava poremećaj homeostaze glukoze, utiče povoljno na lipidni status, značajno potencira antihiperглиkemijsko delovanje metformina i hipoglikemijski efekat gliklazida, sprečava poremećaj biohemijskih parametara pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu ispitivanih životinja i ispoljava značajno <i>in vitro</i> antioksidativno delovanje i sprečava oštećenje jetre laboratorijskih životinja izazvano toksičnom dozom paracetamola.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	13.04.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr.sc Svetlana Goločorbin-Kon, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr.sc Momir Mikov, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr.sc Silva Dobrić, redovni profesor, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet Odbrane u Beogradu</p> <p>član: dr.sc Aleksandar Rašković, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr.sc Nataša Milić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Nina Bukumirović
Mentor: MN	PhD Aleksandar Rašković, full professor PhD Nataša Milić, full professor
Title: TI	Hypoglycemic potential of <i>Pycnogenol</i> and extract of black pine <i>Pinus nigra</i> on the experimental model of diabetic rats.
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters 9/ pages 146/ pictures 9/ graphicons 18/ tables 46/ references 147/ attachments 4
Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Pharmacology with toxicology, pharmaceutical Chemistry
Subject, Key words SKW	Pinus; Plant Bark; Diabetes Mellitus, Experimental; Antioxidants; Oxidative Stress; Hypoglycemic Agents; Phytotherapy
UC	582.475:543.544.5 616.379-008.64:612.085
Holding data: HD	Library of Medical faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>A pine is any conifer in the genus <i>Pinus</i> of the family <i>Pinaceae</i>. In the Republic of Serbia there are natural and artificial forests of black pine <i>Pinus nigra</i> Arnold. Pine bark has been used for centuries in traditional medicine, but only recently its positive biological effects has been revealed and confirmed in medicine. The most famous commercial pine bark product is <i>Pycnogenol</i>, a standardized extract of the French maritime pine bark (<i>Pinus pinaster</i> Aiton), which grows along the coast of southwestern France. The positive effects of <i>Pycnogenol</i>, such as antioxidant, hypoglycemic, hypolipidemic, are based on its high content of phenolic compounds. Nowadays, despite the knowledge that the pine bark is rich in secondary metabolites, it usually ends up as a by-product of the wood industry.</p> <p>The objectives of this dissertation were to investigate the qualitative and quantitative characteristics and biochemical activities of the black pine (<i>Pinus nigra</i>) extracts from Mokra gora and Tara, obtained by different solvents; comparison of glycemic and lipid action of <i>Pinus nigra</i> bark extract with commercial product <i>Pycnogenol</i>; the influence of black pine bark extract and <i>Pycnogenol</i> on the action of standard antidiabetics metformin and gliclazide; as well as the influence on the parameters of</p>

oxidative stress in animals exposed to the toxic dose of paracetamol.

In vitro analyses included the analysis of extracts obtained with different solvents. The total phenolic, tannin, flavonoid and proanthocyanidin content, as well as the antioxidant activity tests, were determined spectrophotometrically. High-efficiency liquid chromatography (HPLC) was performed in order to determine black pine bark extract content. *In vivo* analyses was performed on 156 albino Wistar laboratory rats. Experimental animals received for 7 days *per os*: black pine bark extract obtained from Mokra gora 100 mg/kg, which showed the best activity; *Pycnogenol* 50 mg/kg; metformin 100 mg/kg; gliclazide 10 mg/kg; and their combinations. An oral glucose tolerance test and the aloxan-induced hyperglycaemia were used to examine the effects of the substances on experimental animals. Biochemical parameters, the lipids concentration and parameters of the kidney and liver function, were determined in animal serum. *Ex vivo* analyses included determination of lipid peroxidation activity and the activity of antioxidant protection enzymes in liver homogenates of the test animals, after administration of a toxic dose of paracetamol.

HPLC analysis of black pine bark extracts obtained from Mokra gora and Tara showed the greatest content of taxifolin, then catechin, and its derivatives, caffeic acid and epicatechin. A high antioxidative capacity of *Pycnogenol* was confirmed, but also a significant antioxidant capacity of black pine bark extract, with the best results in the extract obtained from Mokra gora. Seven-day treatment in aloxan-induced diabetes animals with 100 mg/kg black pine bark extract, metformin 100 mg/kg, gliclazide 10 mg/kg and *Pycnogenol* 50 mg/kg led to a decrease of serum glycemic index. There was an increase in the HDL cholesterol concentration and a significant reduction in serum triglycerides in diabetic and normoglycemic animals which received *Pycnogenol*, black pine bark extract, gliclazide and metformin compared to the control group.

	<p>Concomitant usage of the black pine bark extract and standard antidiabetics significantly reduced the levels of AST, ALP and direct bilirubin in the group of diabetic and normoglycemic animals compared to the control group, indicating the potential hepatoprotective action of the black pine bark extract. Damage to the liver caused by the toxic dose of paracetamol was confirmed by the liver homogenate oxidative status and histological examination. The results of our study have shown that <i>Pycnogenol</i> 50 mg/kg, as well as 100 mg/kg black pine bark extract significantly reduce the level of MDA in comparison with the control and the paracetamol treated group.</p> <p>Based on the results of the dissertation, it can be concluded that the use of <i>Pycnogenol</i> and black pine bark extract alleviate glucose homeostasis disorder; positively affects the lipid status; significantly increases the antihyperglycemic effect of metformin and the hypoglycemic effect of gliclazide; prevents impairment biochemical parameters of the liver and kidney function in the serum of the experimental animals; significantly exhibits <i>in vitro</i> antioxidant activity and prevents liver damage caused by toxic dose of paracetamol in experimental animals.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	13.04.2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Svetlana Goločorbin-Kon, PhD associate professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Momir Mikov, PhD full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Silva Dobrić PhD full professor, Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade</p> <p>member: Aleksandar Rašković, PhD full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Nataša Milić, PhD full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. Dijabetes melitus	4
2.2. Oksidativni stres	6
2.3. Upotreba lekovitog bilja	8
2.4. Familija <i>Pinaceae</i>	10
2.5. Rod <i>Pinus</i>	11
2.5.1. Podrod <i>Pinus</i>	11
2.5.2. <i>Pinus pinaster</i> i komercijalni proizvod piknogenol	12
2.5.3. Hemijski sastav piknogenola.....	14
2.5.4. Upotreba piknogenola	16
2.5.5. <i>Pinus nigra</i>	18
2.5.6. Upotreba <i>Pinus nigra</i>	20
3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE	22
3.1. Ciljevi istraživanja.....	22
3.2. Radne hipoteze istraživanja	22
4. MATERIJAL I METODE.....	24
4.1. Biljni materijal i ekstrakcija	24
4.2. Komercijalni proizvod piknogenol.....	25
4.3. Supstance korišćene u radu.....	25
4.4. <i>In vitro</i> ispitivanja.....	26
4.4.1. Određivanje sadržaja fenola	27
4.4.2. Određivanje sadržaja tanina	28
4.4.3. Određivanje sadržaja proantocijanidina	29
4.4.4. Određivanje sadržaja flavonoida.....	29

4.4.5.	Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom.....	30
4.4.6.	Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom.....	30
4.4.7.	Određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS metodom.....	31
4.4.8.	Određivanje SOD aktivnosti NBT metodom	31
4.4.9.	Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	32
4.4.10.	HPLC analiza ekstrakata kore crnog bora.....	32
4.5.	<i>In vivo</i> ispitivanja.....	34
4.5.1.	Eksperimentalne životinje.....	34
4.5.2.	Tretman i podela eksperimentalnih grupa.....	34
4.5.3.	Farmakodinamska ispitivanja	39
4.5.4.	Biohemijska i toksikološka ispitivanja	40
4.6.	<i>Ex vivo</i> ispitivanja.....	41
4.6.1.	Određivanje koncentracije ukupnih proteina	43
4.6.2.	Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (LPx)	43
4.6.3.	Određivanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD)	43
4.6.4.	Određivanje koncentracije redukovanog glutationa (GSH).....	44
4.6.5.	Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSHPx)	44
4.6.6.	Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)	45
4.6.7.	Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	45
4.6.8.	Određivanje nivoa enzima jetre.....	46
4.7.	Statistička obrada rezultata.....	46
5.	REZULTATI.....	47
5.1.	<i>In vitro</i> ispitivanja antioksidativne aktivnosti	47
5.1.1.	Sadržaj fenola	47
5.1.2.	Sadržaj tanina	49
5.1.3.	Sadržaj proantocijanidina	51
5.1.4.	Sadržaj flavonoida.....	53
5.1.5.	Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom.....	55
5.1.6.	Antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom	56
5.1.7.	Antioksidativna aktivnost određena ABTS metodom.....	58

5.1.8.	SOD aktivnosti određena NBT metodom	60
5.1.9.	Ukupna antioksidativna aktivnost - molibdenska metoda.....	62
5.1.10.	Korelacijska analiza	64
5.1.11.	HPLC analiza ekstrakata kore crnog bora.....	66
5.2.	<i>In vivo</i> ispitivanja dijabetičnih i normoglikemičnih životinja	69
5.2.1.	Vrednost telesne mase	69
5.2.2.	Vrednost glukoze u krvi	72
5.2.3.	Lipidni status	76
5.2.4.	Parametri funkcije jetre	83
5.2.5.	Parametri bubrežne funkcije.....	92
5.3.	<i>Ex vivo</i> ispitivanja antioksidativne aktivnosti	95
5.3.1.	Uticaj na oksidativno oštećenje lipida.....	95
5.3.2.	Aktivnost enzima antioksidativne zaštite	96
5.3.3.	Uticaj na nivo enzima jetre.....	102
6.	DISKUSIJA.....	104
6.1.	Hemijski sastav piknogenola i ekstrakata kore crnog bora	104
6.2.	Sadržaj fenolnih jedinjenja u piknogenolu i ekstraktima kore crnog bora	106
6.3.	Antioksidativni potencijal piknogenola i ekstrakata kore crnog bora <i>in vitro</i>	110
6.4.	Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na telesnu masu pacova.....	112
6.5.	Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na vrednost glukoze u krvi	115
6.6.	Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na lipidni status	118
6.7.	Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na parametre jetre	120
6.8.	Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na bubrežne parametre	122
6.9.	Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na parametre oksidativnog stresa indukovane paracetamolom i hepatoprotektivno delovanje	124
7.	ZAKLJUČCI	130
8.	LITERATURA	131
9.	PRILOG	143

1. UVOD

Upotreba biljaka u lečenju datira iz daleke prošlosti. Veština lečenja biljem razvijala se kod svih naroda i često se održala u vidu tradicionalne ili narodne medicine. Mnoge biljke koje su se vekovima upotrebljavale u tradicionalnoj medicini kasnije su naučno izučavane i prihvaćene kao lekovite sirovine u savremenoj medicini. Danas postoji veliko interesovanje naučne javnosti za fitohemikalije i antioksidante iz raznih biljnih vrsta zbog njihove uloge u održavanju zdravlja ljudi. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji 80% svetske populacije koristi preparate lekovitih biljaka u lečenju i/ili sprečavanju bolesti, u obliku dijetetskih suplemenata i/ili biljnih lekova. Proteklih decenija, porastom istraživanja svojstava lekovitih biljaka, postavljeni su standardi efikasnosti i bezbednosti njihove primene kod životinja i ljudi [1, 2].

Bor je bilo koji četinar roda *Pinus* koji pripada porodici *Pinaceae*. Pretežno su zastupljeni u oblastima severne Zemljine hemisfere, a većina oblasti u kojima rastu domaćini su nekih autohtonih vrsta bora. U Republici Srbiji prirodne i veštačke šume crnog bora (*Pinus nigra* Arnold) zauzimaju površinu od 61.506 hektara ili 2,6% šuma i starosti su od 1-80 godina. Na osnovu prikupljenih podataka u Republici Srbiji ima najviše sastojina crnog bora i to 53% od svih četinarskih kultura zajedno [3, 4].

Zbog svoje trajnosti drvo crnog bora je posebno cenjeno u industriji nameštaja i građevinskoj industriji. Međutim, pri seči drveta u industrijske svrhe, kora drveta je jedan od najčešćih drvnih otpadaka, kako u Svetu, tako i u Republici Srbiji. Kora bora se vekovima koristila u tradicionalnoj medicini, međutim tek u novije vreme su otkriveni i potvrđeni njeni pozitivni biološki efekti u medicini. Danas, i pored saznanja da je kora bora bogata sekundarnim

metabolitima, naročito derivatima fenola i lignana, ona najčešće završava kao nusproizvod drvene industrije. U ekološkom smislu postavlja se pitanje kako iskoristiti koru crnog bora koja ostaje kao nusproizvod drvene industrije [5].

Najpoznatiji komercijalni preparat kore bora je piknogenol, standardizovani ekstrakt kore francuskog primorskog bora (*Pinus pinaster* Aiton) koji raste duž obale jugozapadne Francuske. Piknogenol je opisan u monografijama farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država i primenjuje su u terapiji degenerativnih poremećaja, prvenstveno zbog svojih antioksidativnih svojstava. Standardizovani ekstrakt se dobija tako što se sveža kora francuskog primorskog bora usitni do veličine praška i ekstrahuje etanolom i vodom, prečisti i izdvoji vodena faza koja se upari do finog braonkastog praha. Hemijski sastav piknogenola nije u potpunosti poznat, međutim smatra se da njegovi pozitivni efekti na zdravlje potiču od procijanidina, bioflavonoida i fenolnih kiselina, koji su detektovani u piknogenolu [6, 7, 8, 9, 10, 11].

Aktivne komponente iz piknogenola privukle su pažnju naučne zajednice najpre zbog antioksidativne i antimutagene aktivnosti koje ispoljavaju, a zatim i zbog pozitivnih efekata u kontroli glikemije kod životinja i ljudi sa tipom 1 i 2 dijabetesa. Piknogenol je u istraživanjima na životinjama i ljudima pokazao povećanje antioksidativnog kapaciteta, smanjenje nivoa glukoze i smanjenje nivoa holesterola u krvi [6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

Piknogenol je široko izučavan tokom prethodnih 40 godina u više od 160 kliničkih studija, dok, u nama dostupnoj literaturi, značajno manje podataka postoji o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu i farmakodinamskim svojstvima ekstrakata kore drugih vrsta bora. Francuski primorski bor morfološki je sličan drugim vrstama roda *Pinus*, a neka istraživanja pokazuju da i kora drugih vrsta bora, među kojima je i *Pinus nigra*, ispoljava značajnu biološku

aktivnost, što se objašnjava fenolnim jedinjenjima koja su identifikovana u drugim vrstama roda *Pinus*. Jedna od studija je pokazala da ekstrakti kore vrsta *Pinus nigra* i *Pinus sylvestris* imaju značajno veću aktivnost uklanjanja slobodnih radikala u odnosu na komercijalni preparat piknogenol [8, 19].

S obzirom da u literaturi ne postoji dovoljno podataka o kori crnog bora *Pinus nigra* Arnold sa teritorije Republike Srbije, ispitivanje ekstrakta kore crnog bora doprinosi naučnim saznanjima koja se odnose na potvrdu sastava i potencijalno korisna farmakodinamska svojstva, što može predstavljati osnovu za dalja preklinička i klinička ispitivanja ovog biljnog ekstrakta.

2. OPŠTI DEO

2.1. Dijabetes melitus

Dijabetes melitus je hronična nezarazna bolest koja se javlja kada pankreas ne proizvodi dovoljno insulina (tip 1) ili kada telo ne može efikasno da koristi insulin koji pankreas proizvodi (tip 2). Hiperglikemija u dijabetes melitusu je praćena poremećajima metabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina, a hronično stanje može dovesti do dugoročnih oštećenja, disfunkcija i propadanja različitih organa, posebno krvnih sudova, srca, bubrega, očiju i nerava [20, 21].

Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da danas preko 400 miliona ljudi globalno živi sa dijabetes melitusom, a da će se broj obolelih od dijabetes melitusa do 2040. godine povećati na 642 miliona. Globalna prevalencija dijabetes melitusa kod odraslih osoba starijih od 18 godina porasla je sa 4,7% u 1980. godini na 8,5% u 2014. godini (*tabela 1*). Tokom protekle decenije prevalencija dijabetes melitusa rasla je brže u zemljama sa niskim ili srednje niskim dohodkom u odnosu na zemlje sa visokim dohodkom. Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije, region istočnog Mediterana, kojem možemo reći pripada i deo Republike Srbije (severoistočni Mediteran), imao je najveći porast prevalencije dijabetes melitusa sa 5,9% u 1980. godini na 13,7% u 2014. godini i predstavlja regiju sa najvećom prevalencijom dijabetes melitusa (*tabela 1*). Region istočnog Mediterana pokazao je i najveću prevalenciju fizičke neaktivnosti kod odraslih osoba i adolescenata u poređenju sa ostalim regionima, a takođe se našao i u prva tri regiona po prevalenciji gojaznosti, što objašnjava i visoku prevalenciju dijabetes melitusa. Dijabetes melitus je bio uzrok 1,5 miliona smrtnih slučajeva u 2012. godini, dok je visok nivo

šećera u krvi uzrokovao dodatnih 2,2 miliona smrtnih slučajeva povećanjem rizika od kardiovaskularnih i drugih bolesti [20].

Prema proceni Instituta za javno zdravlje Srbije, u Republici Srbiji od dijabetes melitusa boluje približno 750.000 osoba ili 13,2% odraslog stanovništva, što odgovara komparativnoj prevalenciji od 10,3%. Broj osoba sa tipom 2 dijabetes melitusa je mnogostruko veći (95%) u odnosu na osobe sa tipom 1 dijabetes melitusa. U Srbiji, kao i u razvijenim zemljama sveta, dijabetes melitus je peti vodeći uzrok smrtnosti i peti uzrok opterećenja bolešću [22].

Tabela 1. Procena prevalencije i broj osoba sa dijabetes melitusom

(odrasli stariji od 18 godina)[20]

Regioni Svetske zdravstvene organizacije	Prevalenca (%)		Broj (milijon)	
	1980	2014	1980	2014
Afrički region	3,1%	7,1%	4	25
Američki region	5%	8,3%	18	62
Region istočnog Mediterana	5,9%	13,7%	6	43
Evropski region	5,3%	7,3%	33	64
Region jugoistočne Azije	4,1%	8,6%	17	96
Region zapadnog Pacifika	4,4%	8,4%	29	131
Ukupno	4,7%	8,5%	108	422

Dijabetes melitus tip 2, jedna od najbrže rastućih epidemija našeg vremena, je hronični metabolički poremećaj okarakterisan insulinskom rezistencijom u jetri, mišićima i masnom tkivu,

kao i progresivnim propadanjem β -ćelija pankreasa, koji vode u hiperglikemiju. Uzrokom nastanka dijabetes melitusa tip 2 smatra se kombinacija genetske predispozicije i faktora rizika sredine i/ili ponašanja pojedinca, kao što su gojaznost i fizička neaktivnost. Primarni cilj lečenja dijabetes melitusa tip 2 je odlaganje razvoja mikro- i makrovaskularnih komplikacija postizanjem dobre kontrole glikemije. Dijabetes melitus i njegove komplikacije dovode do značajnog ekonomskog opterećenja za osobe sa dijabetes melitusom, njihove porodice, kao i za zdravstvene sisteme kroz direktne troškove lečenja, gubitak posla i plate. Uzevši sve prethodno navedeno u obzir, prevencija dijabetes melitusa kroz zdravu ishranu, fizičko vežbanje, i kontrolu krvnog pritiska i nivoa lipida u krvi, ima ogroman značaj za čovečanstvo. Primenom biljnih preparata je pokazano da je moguće efikasno regulisati blaže poremećaje metabolizma, te se teži daljem ispitivanju istih kako bi se stekao uvid u njihov mehanizam delovanja [12, 13, 20, 21, 23].

2.2. Oksidativni stres

Živi organizmi su neprekidno izloženi visoko reaktivnim kiseoničnim vrstama koje se stvaraju prilikom normalnog metabolizma ćelija, uglavnom u respiratornom lancu mitohondrija. Oksido-redukcione reakcije predstavljaju osnovu brojnih biohemijskih dešavanja, biosintetskih i regulacionih mehanizama. Koncept oksidativnog stresa predstavljen je pre 30 godina, a danas se oksidativni stres definiše kao “neravnoteža između oksidanata i antioksidanata u korist oksidanata, što dovodi do poremećaja redoks signalizacije i kontrole i/ili molekularnih oštećenja”. Oksidanti se mogu klasifikovati u dve velike grupe: radikali (hidroksil radikal, superoksid anjon radikal, peroksi radikal, itd.) i neradikali (hipohlorna kiselina, ozon, aldehidi, itd.). Radikali mogu biti atomi, molekuli ili joni koji imaju najmanje jedan ili više nesparenih elektrona. Zbog tendencije da formiraju parove sa drugim elektronima smatraju se nestabilnim i

visoko reaktivnim, a kako bi se opet stabilizovali oni stupaju u reakcije sa drugim “stabilnim” molekulima ili atomima. Na taj način prethodno “stabilni” molekul postaje slobodni radikal, a reakcija postaje lančana, što rezultira stvaranjem sve većeg broja slobodnih radikala koji oštećuju ćelije organizma. Grupa neradikala sadrži mnogobrojna jedinjenja koja su veoma reaktivna, ali po definiciji ne pripadaju radikalima. Veoma često se radikali i neradikali zajedno nazivaju reaktivnim kiseoničnim vrstama (RKV). Međutim, postoje i jedinjenja koja sadrže azot i danas se zovu reaktivne azotne vrste (engl. *Reactive Nitric Species* - RNS), gde spada azotni oksid. Ove azotne vrste su slabo reaktivne, ali ipak sposobne da oštete mnoge biološke molekule [24, 25, 26, 27].

Promene oksidacionih karakteristika atmosfere naše planete dovode žive organizme do disbalansa oksido-redukcionih reakcija, ne samo zbog mnogobrojnih metaboličkih procesa, već i zbog spoljašnjih faktora kao što su mikrobne infekcije, ksenobiotici, toksini iz hrane, zračenje, zagađenje životne sredine, itd. Sve to zajedno može doprineti stvaranju ili pogoršanju mnogih bolesti, kao što su kancer, dijabetes melitus, Parkinsonova bolest, itd. Značajna meta napada RKV su lipidi, naročito polinezasićene masne kiseline u sastavu fosfolipida ćelijske membrane, zatim proteini, kao i nukleinske kiseline (DNK i RNK). Niske koncentracije RKV mogu biti neutralisane aktivnošću endogenih antioksidativnih agenasa, proteinske ili neproteinske strukture. Neki od njih su glutation, superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, itd. Endogeni mehanizmi odbrane mogu delovati sinergistički sa egzogenim antioksidantima unetim putem namirnica, kao što su tokoferol, askorbat, β -karoten, flavonoidi, i na taj način mogu biti neutralisane više koncentracije RKV u živim organizmima [28].

Oksidativni stres ima važnu ulogu u patofiziologiji dijabetes melitusa i njegovih mikro- i makrovaskularnih komplikacija. Autooksidacija glukoze posmatrana u dijabetes melitusu je najznačajniji faktor koji dovodi do produkcije slobodnih radikala. Visoki nivoi slobodnih radikala i istovremeni pad antioksidativnih odbrambenih mehanizama mogu dovesti do oštećenja ćelijskih organela, makromolekula i enzima, povećati lipidnu peroksidaciju i razvoj insulinske rezistencije. Istraživanja su dokazala da je stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima bio direktno proporcionalan koncentraciji glukoze *in vitro* i koncentraciji serumske glukoze kod pacijenata obolelih od dijabetes melitusa. Smatra se da metabolički poremećaji u dijabetes melitusu dovode do prekomerne produkcije RKV u endotelnim ćelijama velikih i malih krvnih sudova, što dalje dovodi do aktivacije proinflamatornih puteva i patološke proliferacije krvnih sudova. Novija istraživanja povezuju dijabetes melitus tip 2 sa povećanim oksidativnim oštećenjem DNK, povećanom osetljivošću na mutagene i smanjenom efikasnošću obnove DNK. Zbog svega prethodno navedenog, predložena strategija za tretman insulinske rezistencije u dijabetes melitusu, kao i kod njegovih komplikacija, je preveniranje i ublažavanje oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja [21, 29, 30].

2.3. Upotreba lekovitog bilja

Nutraceutici su svi oni sastojci prisutni u hrani ili neprehrambenim proizvodima za koje je utvrđeno da imaju uticaj na sprečavanje pojave pojedinih bolesti ili imaju terapijski efekat. U naučnim krugovima postoji sve veće interesovanje za sekundarne biomolekule (nutraceutike), posebno za fenolna jedinjenja iz dijetetske hrane, biljaka, začina i algi, zbog njihove sposobnosti da ublažavaju oksidativni stres, utiču na smanjenje rizika od bolesti i sprečavaju toksičnost lekova. Fenolna jedinjenja, uključujući flavonoide i neflavonoide, deluju sinergistički i imaju

dobro poznate preventivne efekte na bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom, kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne bolesti, dijabetes melitus i kancer. Prevencija i redukcija komplikacija dijabetes melitusa ima veliki značaj, te je osnovna preporuka sprovođenje zdravog stila života, uključujući pravilnu ishranu i sve češću upotrebu polifenolnih jedinjenja. Danas se u pretkliničkim studijama često koristi životinjski model pacova za ispitivanje hepatoprotektivnih efekata prirodnih proizvoda kroz njihovu antioksidativnu aktivnost. Ovaj efekat se ogleda u sposobnosti ispitivanog proizvoda da utiče na smanjenje nivoa markera peroksidacije – malondialdehida (MDA), povećanje sadržaja redukovanog glutationa (GSH) i aktivnosti glutation peroksidaze (GPx), superoksid dizmutaze (SOD) i katalaze (CAT). Iako su biljni preparati široko rasprostranjeni u prevenciji dijabetes melitusa, odlaganju njegovih komplikacija i u terapiji dislipidemija, postoji nedostatak konačnih informacija o njihovoj efikasnosti i mogućim neželjenim efektima biljnih suplemenata [15, 31, 32, 33, 34, 35, 36].

Poslednjih decenija, prilikom istraživanja hemijskog sastava kora različitih biljnih vrsta roda *Pinus*, iz kore su izolovani flavonoidi i fenolne komponente [37]. Upotreba kore bora pominje se u tradicionalnoj medicini, 2000 godina unazad, u pisanim dokumentima sa područja Evrope i Amerike. Terapeutsku upotrebu kore bora u lečenju inflamatornih bolesti je opisao Hipokrat u IV veku pre nove ere. Farmaceut H. Minner u *Thesaurus Medicaminum*-u 1497. godine beleži da kora bora može biti blagotvorna u lečenju rana. U Staroj Evropi, ekstrakt kore bora je korišćen za lečenje zapaljenja i za prevazilaženje simptoma skorbuta - što se može smatrati ranim predlogom za uzajamno dejstvo flavonoida i askorbinske kiseline. Američki domoroci su koru bora koristili kao hranu, piće i kao lek kod upaljenih rana i čireva, što se danas povezuje sa antioksidativnom aktivnošću kore bora. Značajno je naglasti da se i u davnim vremenima kora bora koristila kod stanja koja uključuju nedostatak vitamina C, kao što su

skorbut, oboljenja kože i zarastanje rana. To govori u prilog interakcije između vitamina C i flavonoida, što su takođe naveli Szent-Gyorgy i saradnici, koji su razumeli kompleksnu prirodu ove interakcije i značajnu ulogu polifenola u obnovi i međusobnom delovanju sa drugim antioksidantima, a na kraju ulogu i u zdravlju ljudi [11].

Iako se kora bora koristila još u davnim vremenima, tek u novije doba su dokazani njeni brojni pozitivni efekti u medicini. Ekstrakti nekih vrsta kore bora sadrže brojne fenolne sastojke kao što su katehin, epikatehin, taksifolin i fenolne kiseline. Ove aktivne materije privukle su pažnju naučne javnosti zbog svoje značajne antioksidativne, antimutagene i antikancerogene aktivnosti [19].

2.4. Familija *Pinaceae*

Familija *Pinaceae* obuhvata 10 rodova i oko 250 vrsta koje su rasprostranjene na severnoj Zemljinoj hemisferi, pretežno u šumama Evrope i Severne Amerike, ali i u području Mediterana. Ovoj familiji pripadaju komercijalno eksploatisani borovi i jele, značajni zbog drvene građe, celuloze, smole i terpentina [38, 39].

U flori Srbije samonikla je jedna vrsta jele (*Abies alba*), dve vrste smrče (*Picea omorika*, *Picea abies*) i pet vrsta bora (*Pinus*). Ovoj familiji pripadaju krupne, drvenaste, jednodome biljke, sa jednopolnim šiškama. Predstavnici ove familije imaju igličaste, zimzelene listove koji se nazivaju četine. Izuzetak su rodovi *Larix* i *Pseudolarix*, koji su listopadni. U šumama Srbije raste pet autohtonih vrsta bora: crni bor - *Pinus nigra*, beli bor (sin. srebrni bor) - *Pinus sylvestris*, bor krivolj (sin. planinski bor) - *Pinus mugo*, munika - *Pinus heldreichii* i molika - *Pinus peuce* [38, 40, 41].

2.5. Rod *Pinus*

Pinus, sa preko 100 identifikovanih i široko rasprostranjenih vrsta, je najširi rod konifera. Lokalizovan je uglavnom na severnoj Zemljinoj hemisferi, osim *Pinus merkusii*, čije je stanište južno od ekvatora na Sumatri. Vrste *P.caribaea*, *P.patula*, *P.pinaster* i *P. radiata* gaje se u celom svetu. Rod *Pinus* je značajan izvor drveta, papira, smola, uglja, hrane (semena) i ukrasa. Unutrašnji deo drveta je jestiv u nekim zemljama pa se u Finskoj pravi hleb od drveta bora (*pettuleipä*), dok se u Švedskoj konzumira čaj (*tallstrunt*) napravljen od zelenih borovih iglica. Takođe, većina *Pinus* vrsta smatra se značajnim izvorom strukturno različitih bioaktivnih jedinjenja koja se mogu naći u različitim farmaceutskim preparatima [42].

Rod *Pinus* se deli u dva podroda: *Pinus* (sin. *Diploxylon*, tvrdi borovi) i *Strobus* (sin. *Haploxylon*, meki borovi). Svaki od ovih podrodova ima nekoliko sekcija na osnovu sekvenciranja DNK hloroplasta [40, 43].

2.5.1. Podrod *Pinus*

Podrod *Pinus* obuhvata žute i tvrde borove koji većinom prirodno rastu u Evropi, Aziji i na Mediteranu. Borovi u ovom podrodu imaju jedan provodni snopić koji teče kroz četinu i 1-5 kratkih četina na kratkom izdanku. Ovaj podrod obuhvata dve sekcije, *Pinus* i *Trifoliae*. Sekcija *Pinus* se deli na subsekcije *Pinus* i *Pinaster*, čije vrste su ispitivane u ovom radu - *Pinus pinaster* i *Pinus nigra* [40, 44].

2.5.2. *Pinus pinaster* i komercijalni proizvod piknogenol

Francuski primorski bor (*Pinus pinaster* Aiton. subsp. *atlantica*, sin. *Pinus maritima* Mill.) (*slika 1*) je drvenasta zimzelena biljka, visine od 20-35 metara i prečnika stabla do 1,2 metra. Kora drveta (*slika 2*) je narandžasto-crvena, debela sa dubokim pukotinama. Ovu vrstu bora karakterišu najduže i najrobusnije iglice u odnosu na ostale evropske vrste borova. Igljice su u parovima i do 25 cm dugačke. Geografsko stanište francuskog primorskog bora je jugozapadna Francuska, Portugalija i severozapadna Španija [45, 46, 47].



Slika 1. Francuski primorski bor [48]



Slika 2. Kora francuskog primorskog bora [49]

Piknogenol je patentiran ekstrakt kore francuskog primorskog bora proizveden od strane *Horphag Research Ltd.*, Ženeva, Švajcarska. Drveće francuskog primorskog bora iz koga se dobija piknogenol je kultivisano isključivo kao monokultura u uskom području jugozapadne

Francuske. Šuma francuskog primorskog bora prostire se na 2,5 miliona hektara i jedna je od najvećih u Evropi. Višeslojna debela spoljna kora se sakuplja sa stabala starih 30 godina koja su uzgajana za potrebe drvne industrije. Naravno, drvna industrija stvara mnogo više nusproizvoda – kore, nego što je potrebno za ekstrakciju piknogenola [12].

Piknogenol je standardizovana praškasta smeša aktivnih i inertnih materija ekstrahovanih iz kore francuskog primorskog bora bež boje, oporog ukusa, dobre rastvorljivosti u vodi i etil-alkoholu, a nerastvorljivih u hloroformu, petrol-etu i etil-etu (*slika 3*). Njegove specifikacije su opisane u *USP 30 – Dietary supplements* (7). Piknogenol poseduje GRAS status (engl. *Generally Recognized As Safe*) u SAD. Standardizovan ekstrakt se dobija metodom koju je razvio Masquelier i Triaud, a koja je opisana u *US patent-u* (#4,698,360). Sveža kora francuskog primorskog bora se usitni do veličine praška i ekstrahuje vodom, a zatim ispira etil-acetatom kako bi se eliminisale supstance nerastvorljive u vodi. Izdvaja se vodena faza ekstrakta od koje se nakon otparavanja rastvarača dobija fini braonkasti prah, stabilan pri čuvanju na suvom i tamnom mestu. Sve se to odvija u patentiranoj aparaturi koja omogućava automatizovan i kontinuiran proces proizvodnje. Piknogenol je 2008. godine u SAD bio rangiran među 30 najprodavanijih dijetetskih suplemenata [10, 11, 12].



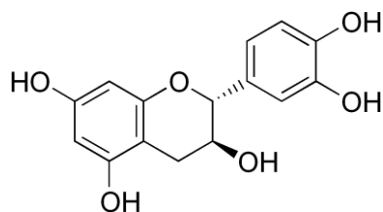
Slika 3. Piknogenol [50]

2.5.3. Hemijski sastav piknogenola

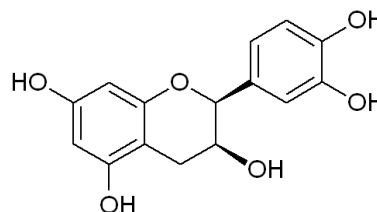
Iako hemijski sastav piknogenola nije u potpunosti razjašnjen, glavni sastojci ekstrakta kore bora su fenolna jedinjenja, podeljena na monomere (katehin, epikatehin i taksifolin) i kondenzovane flavonoide (klasifikovane kao procijanidini/proantocijanidini jer pri zagrevanju u kiseloj sredini oslobađaju antocijanidine). Proantocijanidini su porodica različitih kondenzovanih flavan-3-ola: procijanidina, prodelfinidina, propelargonidina i različitih drugih vrsta. Prisutni procijanidini u piknogenolu se mogu lako detektovati pomoću *Bates-Smith*-ove reakcije. Piknogenol u svom sastavu ima i fenolne kiseline (kafena, ferulna i p-hidroksibenzoeva kiselina) kao minorne sastojke i produkte glikolizacije [6, 11, 12].

Smatra se da su najznačajnije aktivne materije u piknogenolu kondenzovani proantocijanidini koji se pretežno sastoje od procijanidina i fenolnih kiselina. Standardizovani ekstrakt piknogenola sadrži 70 +/- 5% procijanidina, koje čine kondenzovani monomeri katehin (*slika 4*) i epikatehin (*slika 5*) i taksifolin (*slika 6*), dužine 2 do 12 monomera. Najčešći su dimeri

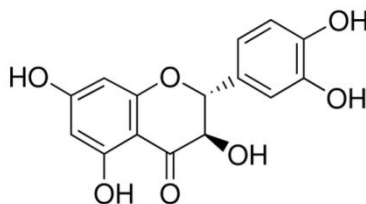
B1 i B3 koje čine epikatehin-katehin i katehin-katehin jedinice povezane C4-C8 vezama. Manje česti su dimeri B6 i B7 koje čine katehin-katehin i epikatehin-epikatehin, povezani C4-C6 vezama. Identifikovani su i trimeri C2 koje čine katehin-epikatehin-katehin. U piknogenolu je najzastupljeniji monomer katehin. Fenolne kiseline pronađene u piknogenolu su derivati benzoeve ili cimetine kiseline. Fenolne kiseline su prisutne u slobodnoj formi, kao glukozidi ili estri glukoze. Sve ovo prethodno navedeno je potvrdio Packer i sar. određivanjem hromatografskog profila piknogenola (*slika 7*) nakon separacije normalno-faznom visoko efikasnom tečnom hromatografijom (HPLC) na silikagel koloni [11, 12].



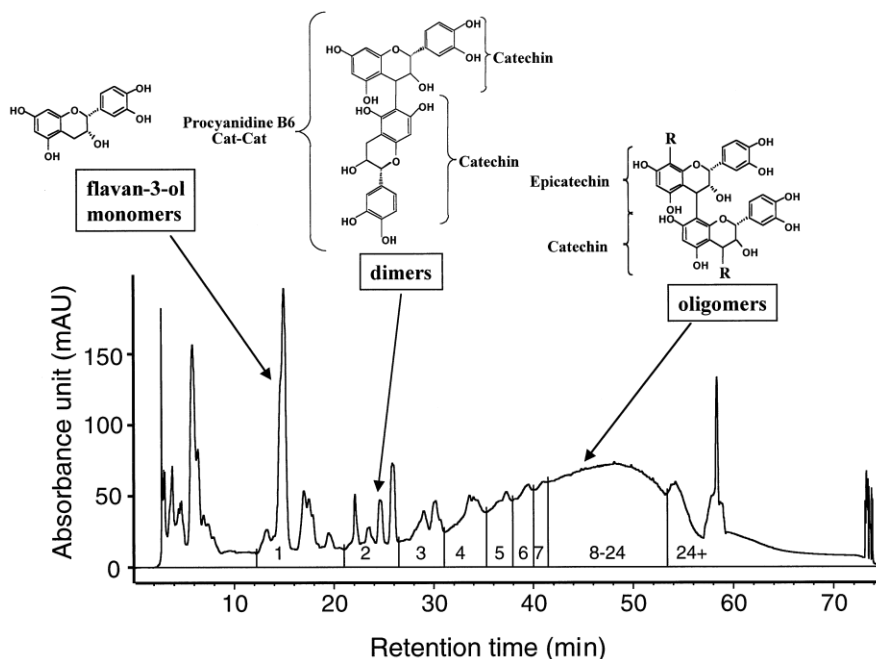
Slika 4. Hemijska struktura (+)-katehina (2R,3S)[51]



Slika 5. Hemijska struktura (-)-epikatehina (2R,3R)[52]



Slika 6. Hemijska struktura taksifolina [53]



Slika 7. Hromatografski profil piknogenola [54]

2.5.4. Upotreba piknogenola

Piknogenol ima jak antioksidativni i antiinflamatorni efekat što su pokazala brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja, a koja su dalje potvrđena i u kliničkim studijama [55]. Značajan antioksidativni potencijal piknogenola zasnovan je na njegovom visokom sadržaju proantocijanidina/procijanidina. Piknogenol se primarno koristi kod bolesti kardiovaskularnog sistema, uključujući hroničnu vensku insuficijenciju (HVI). Studije su dokazale da piknogenol ima pozitivan antihipertenzivni efekat; sposobnost poboljšanja mikrocirkulacije povećanjem kapilarne propustljivosti; snažnu sposobnost uklanjanja slobodnih radikala; potencijal da regeneriše askorbil radikal i zaštititi endogeni vitamin E i glutation od oksidativnog stresa; sposobnost ubrzavanja zarastanja rana [19, 56]. Osim toga, piknogenol pokazuje antiinflamatornu i vazodilatatornu aktivnost, antitrombotski efekat kao i svojstvo da stabilizuje kolagen, što ga čini

pogodnim u lečenju HVI i srodnih venskih poremećaja [57]. Kliničke studije su pokazale da može da smanji edem nogu u HVI, incidencu dubokih venskih tromboza tokom dugih letova i da ubrza zarastanje venskih ulkusa i hemoroidalnih epizoda primenjen lokalno i/ili oralno [58]. Rezultati istraživanja govore da piknogenol poboljšava kontrolu glikemije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i pomaže u lečenju dijabetičnog ulkusa [12]. Preliminarne studije pokazuju da piknogenol može biti od koristi kod dece sa hiperaktivnim poremećajem (engl. *attention deficit hyperactivity disorder*) i da može biti koristan kao dodatna terapija kod pacijenata sa astmom [12]. Piknogenol može pomoći u redukciji menstrualnog bola [12]. Nekoliko kliničkih studija pokazalo je da piknogenol može poboljšati subjektivne simptome osteoartritisa kolena [12]. Kroz svoju sposobnost da smanji proizvodnju inflamatornih citokina putem inhibicije aktivacije NF- κ B, piknogenol predstavlja potencijalno terapijsko sredstvo u lečenju pojedinih plućnih poremećaja [59].

U mnogim studijama na životinjama i ljudima dokazano je svojstvo piknogenola da uklanja reaktivne kiseonične i azotne vrste. Smatra se da piknogenol može biti efikasan u mnogim hroničnim bolestima, uključujući gojaznost, dislipidemije, dijabetes melitus, zapaljenske i imunološke poremećaje. Procijanidini pored antioksidativnog i antiinflamatornog efekta ispoljavaju aktivnost u kontroli glikemije kod osoba koji boluju od dijabetes melitusa tip 2. Piknogenol u dnevnoj dozi od 50 mg/kg telesne mase, primenjivan oralno tokom 8 nedelja, poboljšava srčanu disfunkciju izazvanu dijabetes melitusom, a pretpostavlja se da je za to zaslužna njegova metabolička i antiradikalska aktivnost. Primenom piknogenola intraperitonealno u dnevnoj dozi od 10 mg/kg telesne mase, tokom 4 nedelje, sprečava se hiperglikemijom indukovano oksidativno oštećenje jetre kod pacova sa dijabetes melitusom tip 2, verovatno potenciranjem antioksidativnog sistema odbrane. Takođe je pokazano da piknogenol

poboljšava izmenjene parametre metabolizma glukoze u 3T3-L1 adipocitima, kao i da može doprineti kontroli glukoze u krvi, stimulacijom preuzimanja glukoze preko PI3K zavisnih tirozin kinaza puteva, koji uključuju protein kinazu B. Nekoliko kliničkih ispitivanja je potvrdilo potencijalni pozitivan efekat piknogenola na lipidne parametre [21, 36].

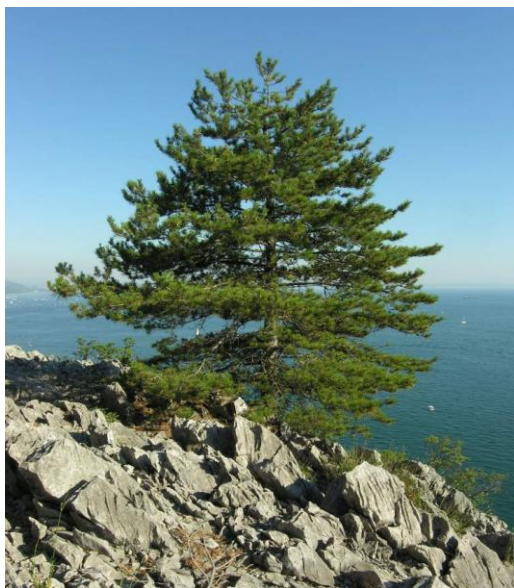
Prema Masquelier *US patentu* piknogenol može biti ordiniran oralno, intravenski ili kutano. Za oralnu administraciju, piknogenol se na tržištu nalazi u formulaciji tableta, šećerom obloženih pilula, kapsula, globula i ampula za oralnu upotrebu, u dozi od 20-100 mg. Piknogenol postoji i u obliku masti, a nalazi se i u brojnim kozmetičkim preparatima. Oralna doza piknogenola se kreće u opsegu od 1,5 do 3 mg/kg telesne mase, što predstavlja dnevnu dozu od 100-200 mg na dan za osobu prosečne telesne težine od 70 kg. Proizvođač navodi da preporučena doza piknogenola zavisi od prirode bolesti i željenog efekta na zdravlje. Preporučena doza za odrasle osobe obolele od dijabetes melitusa je 50-200 mg/dan. Kao antioksidant piknogenol može delovati u bilo kojoj dozi, ali da bismo imali merljive fiziološke efekte povezane sa prevencijom oksidativnog oštećenja tkiva, dnevna doza piknogenola treba da bude najmanje 20 mg. Prosečno vreme primene piknogenola u kliničkim ispitivanjima je bilo 2-3 meseca [10, 12, 60].

2.5.5. *Pinus nigra*

Crni bor (*Pinus nigra* Arn., sin. Austrijski bor) (*slika 8*) se ubraja u grupu mediteranskih borova i jedan je od najrasprostranjenijih konifera u Evropi. Prostire se širom južnog Mediterana u Evropi, od Španije na zapadu do Male Azije na istoku, a može se naći i na Korzici, Kipru, Krimu, kao i na visokim planinama Magreba u Severnoj Africi. U Republici Srbiji se raspoznaju dve podvrste crnog bora, *ssp. nigra* i *ssp. pallasiana*, a među njima više varijeteta, uključujući *var. nigra*, *var. zlatiborica*, *var. gocensis*, *var. banatica*. Najčešće raste na nadmorskoj visini od

400 do 1300 metara, ali se na Kopaoniku mogu naći pojedini primerci i na 1650 metara nadmorske visine [61, 62].

Crni bor je drvenasta zimzelena biljka visoka 30 do 40 m sa široko kupastom do amrelastom krošnjom. Na odraslom stablu kora je tamnosiva, skoro crna, duboko izbrazdana i debela do 10 cm (*slika 9*). Pupoljci su jajasti i smolasti. Sa kratkog izdanka polaze po dve četine koje su tamnozeleno boje, dugačke 8 do 18 cm. Muške šišarke su žuto-zelene boje i resolike, a ženske su jajaste, sedeće ili sa kratkom drškom. Šišarke su dugačke oko 10 cm, široke 4 cm i smeđe boje. Drvo je bogato smolom. Raste na toplim i suvim mestima, često i na plitkom zemljištu i krševima [38].



Slika 8. Crni bor [63]



Slika 9. Kora crnog bora [64]

2.5.6. Upotreba *Pinus nigra*

Crni bor je drvo koje se često koristi prilikom pošumljavanja, a kako može da raste i na gotovo potpuno vertikalnim liticama često se koristi za pošumljavanje terena pod nagibom. Ova vrsta je otporna na različite i ekstremne uslove sredine, biljne zajednice gradi sa mnogim listopadnim i četinarskim vrstama drveća, a može doživeti čak 500 godina. Drvo crnog bora stvara veliku količinu smole, što takođe doprinosi trajnosti i otpornosti drveta, a još veću otpornost ima drvo koje je neko vreme bilo pod vodom. Crni bor je najotpornija vrsta bora na gradske uslove sredine i zagađenja te je idealan za sadnju po gradovima, u vetrozaštitnim pojasevima, duž autoputeva ili kao zaštitni pojas oko fabrika [65].

Drvena industrija je važan sektor privrede koji se zasniva na obnovljivim prirodnim resursima. Drvo crnog bora može da se koristi za izradu furnira kao i rezane građe, a kada se pažljivo obradi može da se koristi u proizvodnji nameštaja. Zbog svojih karakteristika, drvo crnog bora se koristi za izradu prozora, vrata, podova, krovnih konstrukcija i drugih proizvoda izloženih promenljivim atmosferskim uticajima. Kao rezultat rada ove industrije, značajne količine produkata nakon prerade drveta bivaju odbačeni kao sporedni produkti proizvodnje, uključujući koru, piljevinu i druge delove drveta. Kora šumskih vrsta drveća predstavlja dominantnu biorezervu koja je u današnje vreme potcenjen resurs. Uprkos malom interesovanju drvne industrije za koru bora, ona može poslužiti kao materijal za hemijsku industriju (npr. proizvodnja adheziva), farmaceutsku industriju ili kao gorivo [39, 65, 66, 67, 68].

Veliki broj *in vitro* i *in vivo* studija je sproveden u cilju dobijanja i hemijske karakterizacije biljnih ekstrakata bogatih polifenolima, kako bi se ispitala njihova potencijalna primena za ljudsku upotrebu u dijetetskim suplementima. Kora bora sadrži visok nivo prirodnih

polifenola raznih bioloških aktivnosti koji mogu biti upotrebljeni kao bioaktivne i farmakološke komponente. Između ostalog, interes za ispitivanje prirodnih antioksidanata postoji i zbog rastuće zabrinutosti zbog mogućih kancerogenih efekata hemijskih aditiva koji se trenutno koriste kao antioksidanti, uključujući butilhidroksianizol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT). Ovi aditivi se mogu pronaći u folijama za pakovanje proizvoda, žitaricama, kobasicama i drugim proizvodima od mesa, žvakaćim gumama, čipsu, pivu, maslacu, biljnim uljima, kozmetici i hrani za životinje. Sumnja se da su BHA i BHT zaslužni za oštećenje jetre i karcinogenezu na laboratorijskim životinjama. Podaci istraživanja pokazuju da ekstrakti kore *Pinus sylvestris* imaju isto pa čak i bolje delovanje od BHA i BHT u jednakim uslovima [39, 66, 69].

Kora crnog bora je prema našim dosadašnjim saznanjima veoma malo ispitivana, međutim većina do sada ispitivanih vrsta bora je pokazala da poseduje značajan antioksidativni kapacitet. Kroz prizmu svega prethodno navedenog - kora crnog bora je potencijalno atraktivan izvor materijala koji se može koristiti u oblasti nutricije, medicine, farmacije i kozmetologije [39, 70].

3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja

1. Uporediti hemijski sastav i antioksidativni status ekstrakata kore crnog bora i komercijalnog preparata piknogenola *in vitro*;
2. Utvrditi uticaj ekstrakta kore crnog bora i komercijalnog preparata piknogenola na glikemiju, lipidni status i biohemijske parametre pokazatelje funkcije jetre i bubrega u serumu zdravih i dijabetičnih pacova;
3. Utvrditi uticaj ekstrakta kore crnog bora i komercijalnog preparata piknogenola na farmakološka svojstva antidijabetika, metformina i gliklazida kod dijabetičnih pacova;
4. Utvrditi antioksidativni potencijal ekstrakta kore crnog bora i komercijalnog preparata piknogenola kod pacova izloženih oksidativnom stresu izazvanim toksičnom dozom paracetamola.

3.2. Radne hipoteze istraživanja

1. Razlike hemijskog sastava kore crnog bora i komercijalnog preparata piknogenola ne izazivaju statistički značajnu razliku njihovog antioksidativnog potencijala;
2. Primena ekstrakta kore crnog bora ili komercijalnog preparata piknogenola statistički značajno smanjuje poremećaj homeostaze glukoze i lipida, kao i poremećaj biohemijskih parametara pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu životinja sa hemijski izazvanim dijabetes melitusom;

3. Primena komercijalnog preparata piknogenola ili ekstrakta kore crnog bora statistički značajno potencira antihiperglikemijsko delovanje metformina i hipoglikemijski efekat gliklazida kod životinja sa hemijski izazvanim dijabetes melitusom;
4. Primena komercijalnog preparata piknogenola ili ekstrakta kore crnog bora kod eksperimentalnih životinja sprečava oštećenje jetre oksidativnim stresom izazvanim primenom toksične doze paracetamola.

4. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni rad je izveden u laboratorijama Katedre za farmaciju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i Katedre za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju, Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

4.1. Biljni materijal i ekstrakcija

Kao droga je korišćena kora crnog bora *Pinus nigra* Arnold sakupljena sa dva lokaliteta - Mokra gora i Tara, a dobijena od Šumarskog fakulteta u Beogradu i determinisana do vrste (serijski broj za Mokru goru: 251/15; serijski broj za Taru: 258/15). Biljni materijal je osušen i propisano usitnjen uz pomoć laboratorijskog mlina čekićar tip 11, ABC Inženjering (Pančevo, Srbija). Karakteristike mlina čekićara: kapacitet 200 kg materijala po času, snaga motora 2,2 kW, broj obrtaja motora 2880 o/min, prečnik sita 31 cm, broj redova čekića 4, ukupan broj čekića 16. Određivan je stepen vlage u oba uzorka u vidu tri merenja na IR vlagomeru (Kern, Nemačka) i utvrđeno je da stepen vlage u uzorku kore bora poreklom sa Mokre gore 10,54%, dok je u uzorku kore bora poreklom sa Tare stepen vlage 16,8%. Tako usitnjen biljni materijal je prosejan kroz sito prečnika 0,35 mm (*Retsch GmbH*, Nemačka) i čuvan na suvom, hladnom i tamnom mestu, u papinim vrećama, do početka ispitivanja. Ekstrakcija biljnog materijala je vršena po ugledu na ekstrakciju pknogenola metodom razvijenom od strane Masquelier-a [10].

Postupak ekstrakcije: usitnjena droga (200 g) je prelivena sa po 500 mL ključale destilovane vode i ekstrahovana tokom 3 h. Zatim su uzorci dopunjeni sa još 1500 mL destilovane vode, kako bi se postigao odnos droge i destilovane vode 1:10. Dobijeni ekstrakti su zagrevani u staklenoj čaši, uz mešanje, do temperature od 90 °C, a zatim ostavljeni da ključaju

tokom 30 min. Nakon kuvanja uzorci su profiltrirani kroz gazu, a zaostali biljni materijal na gazi je ispran sa 50 mL destilovane vode i dobro isceden. Filtratima uzoraka je dodat NaCl do zasićenja i zatim su refiltrirani kroz filter papir. Dobijeni filtrat je ekstrahovan tri puta sa etil-acetatom u odnosu 1:10. Zatim je uzorcima dodavan natrijum-sulfat do stvaranja taloga, upareni su do suva i stavljeni u eksikator tokom 24 h. Dobijeni ekstrakti u obliku braonkasto-crvenog praha, aromatičnog mirisa, su čuvani na suvom i tamnom mestu do početka analize.

4.2. Komercijalni proizvod piknogenol

U eksperimentima je korišćen komercijalni proizvod piknogenol (*Pycnogenol*®, *Biolandes Aromes, Le Sen*, Francuska) pribavljen ljubaznošću prof. dr Rohdewald Peter-a i MSc Burki Carolin-e (*Horphag Research*, Ženeva, Švajcarska). Preparat predstavlja 100% ekstrakt kore francuskog primorskog bora (*Pinus pinaster*) u obliku fino usitnjenog braonkasto-crvenog praška, rastvorljiv u vodi (CAS # 90082-75-0). Pknogenol je čuvan na suvom, hladnom i tamnom mestu do početka analize. Pknogenol je za ispitivanje parametara oksidativnog stresa, kod životinja izloženih toksičnoj dozi paracetamola, primenjivan u dve doze - 20 mg/kg i 50 mg/kg. Doza je određena na osnovu prethodne studije Jankyova i sar. [18]. Pknogenol je kod ispitivanja hipoglikemijskog i hipolipodemijskog potencijala, kod dijabetičnih i normoglikemičnih životinja, primenjen u dozi od 50 mg/kg, koja je u prethodnoj studiji pokazala bolje rezultate nego doza od 20 mg/kg [71].

4.3. Supstance korišćene u radu

Metanol, etanol, aceton, mravlja kiselina, aluminijum-hlorid, *Folin-Ciocalteu* reagens, 2,2-difenil-1-pikrazil, polivinilpolipirolidon (PVPP), vanilin, 2,4,6-tripiridil-S-tiazin, anhidrovani

natrijum-karbonat, sirćetna kiselina i natrijum-fosfat su pribavljeni od *J.T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, SAD)*. Kalijum-fericijanid, trihlorsirćetna kiselina, gvožđe(III)-hlorid, natrijum-hlorid, etil-acetat, natrijum-sulfat, acetatni pufer, amonijum-molibdat, sumporna kiselina, 2,2-azinobis-(3-etilbenzilazolin)-6-sulfonska kiselina, superoksid dismutaza, fosfatni pufer, metionin, nitrotetrazolijum-plavo i EDTA su pribavljeni od *Merck KGaA (Darmstadt, Nemačka)*. Standardne supstance - galna kiselina, protokatehinska kiselina, kafena kiselina, vanilinska kiselina, hlorogenska kiselina, askorbinska kiselina, siringična kiselina, ferulna kiselina, rutin, miricetin, katehin, epikatehin, rozmarinska kiselina, transcinamična kiselina, naringenin, luteolin, kempferol, kverectin, apigenin, riboflavin, Trolox i aloe-emodin su pribavljeni od *Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka)*. Voda koja se koristila u HPLC analizi se prečišćava upotrebom *Millipore, Eli UV and Simplicity Water Purification System (Milford, MA, SAD)*. Metformin i gliklazid su pribavljeni od Hemofarm-a (Vršac, Srbija). Alkosan, glukoza, uretan, paracetamol su pribavljeni od *Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, SAD)*.

4.4. In vitro ispitivanja

U cilju određivanja sadržaja ukupnih fenola, tanina, proantocijanidina, flavonoida i antioksidativnog potencijala kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare i piknogenola, uzorci su ekstrahovani pomoću tri rastvarača: aceton, metanol i etanol. Sve analize ispitivanih ekstrakata su urađene u tri ponavljanja.

Postupak ekstrakcije: droga (2,5 g) je prelivena sa 125 mL rastvarača (aceton, metanol ili etanol), a zatim ekstrahovana u ultrazvučnom kupatilu *Labsonic Falc (Treviglio, Italija)* tokom 20 minuta. Dobijeni ekstrakt je ostavljen na suvom i tamnom mestu tokom 24 h, a zatim ponovo ekstrahovan u ultrazvučnom kupatilu tokom 20 minuta. Nakon toga, ekstrakt je profiltriran,

uparen do suva i stavljen u eksikator tokom 24 h. Dobijeni ekstrakt je čuvan na suvom i tamnom mestu do početka analize.

Podela ekstrakata prema grupama:

- Acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore (**CBMG + Ac**)
- Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore (**CBMG + Met**)
- Etanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre Gore (**CBMG + Et**)
- Acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare (**CBT + Ac**)
- Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare (**CBT + Met**)
- Etanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare (**CBT + Et**)
- Acetonski ekstrakt piknogenola (**PYC + Ac**)
- Metanolni ekstrakt piknogenola (**PYC + Met**)
- Etanolni ekstrakt piknogenola (**PYC + Et**)

Za određivanje apsorbance svih dobijenih rastvora korišćen je UV/Vis spektrofotometar – *Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System* (Nemačka).

4.4.1. Određivanje sadržaja fenola

Sadržaj ukupnih fenola (TPC – *Total phenolic content*) određen je spektrofotometrijski pomoću *Folin-Ciocalteu* reagensa, uz upotrebu galne kiseline kao referentnog standarda. Metoda se zasniva na svojstvu *Folin-Ciocalteu* reagensa da stupa u reakciju sa fenolnim jedinjenjima i nefenolnim redukujućim supstancama, pri čemu nastaju hromogeni koji se mogu detektovati spektrofotometrijski [72].

Postupak: u epruvete u kojima se nalazilo 3 mL *Folin-Ciocalteu* reagensa dodato je 35 μ L ispitivanog uzorka i promešano na vorteksu. Nakon 5 minuta, dodato je 333 μ L koncentrovanog (20%) rastvora natrijum-karbonata i ponovo promešano. Posle 60 minuta stajanja na tamnom mestu očitavana je apsorbancija na 720 nm. Za dalja računanja je uzimana srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbancija. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suve materije (mg GAE/g SM), korišćenjem prethodno konstruisane kalibracione krive standarda galne kiseline.

4.4.2. Određivanje sadržaja tanina

Sadržaja ukupnih tanina (TTC – *Total tannin content*) je određen upotrebom polivinilpolipirrolidona (PVPP) koji vezuje tanine, pri čemu netaninski fenoli ostaju u supernatantu nakon centrifugiranja [73]. Sadržaj netaninskih fenola u supernatantu je određen metodom po *Folin-Ciocalteu*. Razlika sadržaja ukupnih fenola (određenih po postupku opisanom u 4.4.1.) i sadržaja netaninskih fenola predstavlja sadržaj tanina u uzorku.

Postupak: odmereno je 100 mg PVPP u epruvete i dodato je 1 mL destilovane vode i 1 mL ispitivanog uzorka. Nakon snažnog mućkanja uzorci su stavljeni u frižider tokom 15 minuta, a zatim je izvršeno centrifugiranje tokom 10 minuta (3000 obrtaja/min). Uzeto je 70 μ L dobijenog supernatanta i određen sadržaj fenola po prethodno opisanom postupku. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbancija. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suve materije (mg GAE/g SM), korišćenjem prethodno konstruisane kalibracione krive standarda galne kiseline.

4.4.3. Određivanje sadržaja proantocijanidina

Sadržaj ukupnih proantocijanidina (PAC – *Proanthocyanidin content*) određen je vanilinskom metodom. Metoda se zasniva na kondenzaciji vanilina sa proantocijanidinima u kiselom rastvoru. Protonovani vanilin kao elektrofilni radikal reaguje sa flavonoidnim prstenom, a intermedijerni produkt reakcije odmah dehidriše i daje svetloružičasto do tamnocrveno obojeni produkt čija je apsorbanca izmerena na 500 nm [74].

Postupak: u epruvete je odmereno po 2 mL smeše 9M metanol-HCl i 1% vanilina. U radne probe je dodato po 0,8 mL odgovarajućeg ispitivanog uzorka, a u slepu probu 0,8 mL destilovane vode umesto ekstrakata. Nakon 20 minuta očitane su apsorbanca na 500 nm. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanca. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata katehina po gramu suve materije (mg CE/g SM), korišćenjem prethodno konstruisane kalibracione krive standarda katehina.

4.4.4. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (TFC – *Total flavonoid content*) određen je metodom koja se zasniva na svojstvima flavonoida i flavon-glikozida da sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse. Naročito je značajan kompleks sa aluminijumom, jer se aluminijum vezuje za sve vrste flavonoida, tako da se apsorpcioni maksimum ukupnih flavonoida lako određuje spektrofotometrijski na 430 nm [75].

Postupak: radni rastvor se dobija mešanjem aluminijum-hlorida, anhidrovane sirćetne kiseline i destilovane vode. U svaku epruvetu se sipa 20 mL radnog rastvora i 200 µL ispitivanog uzorka. Nakon mešanja na vorteksu očitava se apsorbanca dobijenog metalo-kompleksa na 430

nm. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanci. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata kvercetina po gramu suve materije (mg (QE)/g SM), korišćenjem prethodno konstruisane kalibracione krive standarda kvercetina.

4.4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Metoda je zasnovana na sposobnosti uzoraka da uklone stabilne 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikale, pri čemu dolazi do promene boje reakcione smeše. Procena antioksidantnog potencijala vrši se kolorimetrijski, na osnovu promene u optičkoj gustini DPPH-radikala. Razlika u aktivnosti uklanjanja DPPH-radikala između slepe probe i radne probe očitava se spektrofotometrijski na 517 nm [69, 76].

Postupak: u epruvete je odmereno 0,25 mL DPPH-EtOH rastvora, 1,25 mL acetatnog pufera i 25 μ L ispitivanog uzorka. Zatim je promešano na vorteksu i ostavljeno tokom 30 minuta na tamnom mestu, a nakon toga je očitavana apsorbancia reakcione smeše na 517 nm. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanci. Rezultati su izraženi u miligramima Trolox ekvivalenta po gramu suve materije (mg TE/g SM).

4.4.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

FRAP test (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) se zasniva na redukciji kompleksa gvožđe(III)-tripiridil-S-tiazin do gvožđe(II)-tripiridil-S-tiazina, u kiseloj sredini u prisustvu antioksidanata, pri čemu nastaje kompleks plave boje čija se apsorbancia očitava na 593 nm [77].

Postupak: kao radni rastvor je upotrebljena smeša acetatnog pufera (300 mmol/dm³, pH=3,6), 10 mM 2,4,6-tripiridil-S-tiazina u 40 mmol/dm³ HCl i 20 mM rastvora gvožđe(III)-

hlorida u odnosu 10:1:1. U epruvete je dodato 2,9 mL radnog rastvora i 20 μ L ispitivanog uzorka. Sledilo je vorteksovanje, a nakon 30 minuta je očitana apsorbancia na 593 nm. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanci. Rezultati su izraženi u mikromolima ekvivalenta askorbinske kiseline (ASK) po gramu suve materije (μ mol ASK/g SM).

4.4.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti ABTS metodom

Metoda je zasnovana na pretvaranju 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS) u svoju radikalsku formu dodatkom natrijum-persulfata. Radikalska frakcija je plave boje i apsorbuje svetlost na 734 nm. Pod dejstvom antioksidanata, plava boja se gubi [78].

Postupak: u epruvete je dodato po 3 mL ABTS rastvora i po 25 μ L odgovarajućeg uzorka. Epruvete su ostavljene na tamnom mestu tokom 2 h. Zatim je očitana apsorbancia na 734 nm. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanci. Kalibraciona kriva je podrazumevala seriju rastvora Troloxa (0,4; 0,3; 0,25; 0,2; 0,15; 0,125; 0,1; 0,075; 0,05; 0,038; 0,025; 0,0125 mg/mL), a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta Troloxa po gramu suve materije (mg TE/g SM).

4.4.8. Određivanje SOD aktivnosti NBT metodom

Metoda se zasniva na sposobnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) da inhibira reakciju redukcije nitrotetrazolijum-plavo (NBT) sa superoksid radikalom pri čemu nastaje plavi proizvod. Superoksid radikal se generiše pomoću riboflavina u prisustvu svetlosti. Superoksid-dismutaza vrši dismutaciju superoksid radikala i na taj način smanjuje apsorpciju redukovanog NBT, koja je očitana na 560 nm [37].

Postupak: slepa proba je sadržala 600 mL fosfatnog pufera (pH=7,8), 200 µL rastvora metionina, 600 µL rastvora NBT, 200 µL rastvora EDTA i 150 µL rastvora riboflavina. Radne probe su, pored pomenutih rastvora, sadržale i po 150 µL odgovarajućeg uzorka. Apsorbanca je očitana na 560 nm. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanci. Rezultati su izraženi kao % inhibicije, u odnosu na slepu probu.

4.4.9. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata određena je metodom pomoću fosfomolibdena. Ova metoda se zasniva na redukciji Mo(VI) pomoću antioksidanata, pri čemu nastaje Mo(V)-fosfat kompleks u kiseloj sredini [79].

Postupak: rastvor reagensa je predstavljala smeša 0.6 M sumporne kiseline, 28 mM natrijum-fosfata i 4 mM amonijum-molibdata. U epruvete je sipano po 3 mL rastvora reagensa i po 0,3 mL odgovarajućeg ekstrakta. Epruvete su zatim grejane na vodenom kupatilu u trajanju od 90 minuta na 95 °C. Nakon toga epruvete su ohlađene, a apsorbanca je očitana na 695 nm u odnosu na slepu probu. Za dalja računanja je uzeta srednja vrednost tri uzastopna merenja apsorbanci. Rezultati su izraženi kao miligrami askorbinske kiseline po gramu suve materije (mg ASK/g SM).

4.4.10. HPLC analiza ekstrakata kore crnog bora

HPLC analiza je izvedena korišćenjem hromatografa (*Agilent 1200 series*), koji je opremljen DAD detektorom, *Chemstation Software* (*Agilent Technologies*), binarnom pumpom, mrežnim vakuum degazerom, autosemplerom i delom za kolonu sa termostatom.

Vršeno je poređenje metanolnog i etanolnog ekstrakta kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare, dok acetnoski ekstrakt nije bio upoređivan jer je u prethodnim ispitivanjima pokazao najslabiji antioksidativni potencijal. Dobijeni ekstrakti su pripremljeni za HPLC analizu rastvaranjem metanolnog i etanolnog suvog ekstrakta kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare u smeši metanola i 1% mravlje kiseline (1:1, v/v) u ultračistoj vodi. Pre injektovanja rastvoreni ekstrakti su profiltrirani kroz 0,20 µm membranski PTFE filter (*Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Nemačka*).

Uslovi HPLC analize:

- Kolona: Zorbax , Eclipse XDB- C18 (4.6 mm 50 mm, m i.d. 1.8 µm veličina čestica)
- Mobilna faza: A- metanol; B - 1% mravlja kiselina u vodi
- Gradijentna elucija: početna 10% A; 0-10 min 10 -25% A; 10-20 min 25 - 60% A; 20-30 min, 60-70% A.
- Injektovanje: 5 µL
- Protok: 1 mL/min
- Temperatura: 30 °C
- Detekcija: 280 nm, 330 nm, 350 nm, referentna talasna dužina 550/100 nm. Spektri su snimani u opsegu od 190-450 nm.
- Ukupno vreme trajanja analize: 30 min

Ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Moke gore je pokazao bolje rezultate u *in vitro* ispitivanjima, te je taj ekstrakt korišćen u daljim *in vivo* i *ex vivo* ispitivanjima.

4.5. In vivo ispitivanja

4.5.1. Eksperimentalne životinje

U našem istraživanju su korišćeni zdravi, beli laboratorijski pacovi, oba pola, soja *Wistar*, telesne mase 150-300 g, odabrani metodom slučajnog izbora iz okota sa Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Laboratorijske životinje su boravile u *Uni-Protect (Ehret, Emendingen, Nemačka)* ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja, sa filterskim sistemom za protok vazduha, na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. U ormanima je temperatura vazduha održavana između 20 i 25 °C, uz kontrolu vlažnosti vazduha i održavanje cirkadijalnog ritma (smena dana i noći u trajanju od 12 h). Životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje (Veterinarski institut Zemun, Srbija). Pristup hrani je bio onemogućen 6 h pre merenja glikemije.

Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje oglada je odobrila Etička komisija ZZDOŽ Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost sa planom ovog ispitivanja, broj odobrenja III-2014-02 kao i Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine – Uprava za veterinu, broj rešenja: 323-07-00550/2015-05.

4.5.2. Tretman i podela eksperimentalnih grupa

U okviru ispitivanja praćenja efekata komercijalnog proizvoda piknogenola i ekstrakta kore bora poreklom sa Mokre gore, kao i njihovih interakcija sa standardnim antidijabeticima metforminom i gliklazidom kod dijabetičnih i normoglikemičnih životinja, ispitivane životinje su bile nasumično podeljene u eksperimentalne i kontrolne grupe. U svakoj grupi je bilo po šest

životinja, a svaka životinja je korišćena u eksperimentu samo jedanput. Sve životinje su bile podvrgnute merenju telesne mase i glikemije neposredno pre početka oglada i nakon završetka oglada. Prilikom formiranja grupa, životinje su obeležene rastvorom pikrinske kiseline koja ostavlja vidljiv trag na belom krznu tokom 7 dana oglada. Doze standardnih antidijabetika metformina i gliklazida, upotrebljene u ovom ogledu, izračunate su prema *Clarc*-ovoj formuli uzimajući u obzir terapijske doze za čoveka. Kako bi injicirani volumen kod svih eksperimentalnih životinja bio isti, sve doze ispitivanih supstanci su rastvorene odnosno suspendovane u volumenu od 1 mL fiziološkog rastvora. Tretiranje eksperimentalnih životinja je vršeno *per os* pomoću gastrične sonde tokom 7 dana, svakoga dana u isto vreme. Poslednjeg dana oglada, 2 h nakon poslednje administracije prethodno opisanih supstanci, odnosno izvođenja predviđenih farmakodinamskih testova, životinje su anestetizirane 25% rastvorom uretana u dozi od 5 mL/kg intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane kardiopunkcijom u cilju uzimanja uzoraka krvi za dalja ispitivanja.

Eksperimentalne životinje kod ispitivanja hipoglikemijskog i hipolipidemijskog potencijala pknogenola i ekstrakta kore crnog bora poreklom sa Mokre gore su podeljene u grupe u odnosu na nivo glukoze u krvi, na dijabetične i normoglikemične životinje, kao i prema aplikovanim supstancama:

Normoglikemične životinje:

- Prvoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovao fiziološki rastvor u dozi od 1 mL/kg (**FIZ**);
- Drugoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta pknogenola (**PYC**);

- Trećoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog ekstrakta kore bora (**KB**);
- Četvrtoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora metformina (**MET**);
- Petoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 10 mg/kg vodenog rastvora gliklazida (**GLIK**);
- Šestoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola i 100 mg/kg vodenog rastvora metformina (**PYC + MET**);
- Sedmoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola i 10 mg/kg vodenog rastvora gliklazida (**PYC + GLIK**);
- Osmoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta kore bora i 100 mg/kg vodenog rastvora metformina (**KB + MET**);
- Devetoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta kore bora i 10 mg/kg vodenog rastvora gliklazida (**KB + GLIK**).

Dijabetične životinje:

Životinjama je na početku oglada indukovana hiperglikemija rastvorom aloksana u dozi od 130 mg/kg.

- Prvoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovao fiziološki rastvor u dozi od 1 mL/kg (**FIZ**);
- Drugoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola (**PYC**);

- Trećoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog ekstrakta kore bora (**KB**);
- Četvrtoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora metformina (**MET**);
- Petoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 10 mg/kg vodenog rastvora gliklazida (**GLIK**);
- Šestoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola i 100 mg/kg vodenog rastvora metformina (**PYC + MET**);
- Sedmoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola i 10 mg/kg vodenog rastvora gliklazida (**PYC + GLIK**);
- Osmoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta kore bora i 100 mg/kg vodenog rastvora metformina (**KB + MET**);
- Devetoj grupi dijabetičnih životinja se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta kore bora i 10 mg/kg vodenog rastvora gliklazida (**KB + GLIK**).

U okviru ispitivanja efekata komercijalnog proizvoda piknogenola i ekstrakta kore bora poreklom sa Mokre gore na zaštitu jetre nakon primene toksične doze paracetamola, ispitivane životinje su bile nasumično podeljene u eksperimentalne i kontrolne grupe. Tretiranje eksperimentalnih životinja je vršeno *per os* pomoću gastrične sonde tokom 7 dana, svakoga dana

u isto vreme. Poslednjeg dana ogleđa, 2 h nakon poslednje administracije prethodno opisanih supstanci, odnosno izvođenja predviđenih farmakodinamskih testova, životinje su anestetizirane 25% rastvorom uretana u dozi od 5 mL/kg intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane kardiopunkcijom u cilju uzimanja uzoraka krvi i tkiva jetre za dalja ispitivanja.

Eksperimentalne životinje su kod ispitivanja parametara oksidativnog stresa podeljene u grupe u odnosu na aplikovane supstance:

- Prvoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovao fiziološki rastvor u dozi od 1 mL/kg (**FIZ**);
- Drugoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 20 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola (**PYC 20**);
- Trećoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola (**PYC 50**);
- Četvrtoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovao fiziološki rastvor u dozi od 1 mL/kg, a poslednjeg dana tretmana je indukovan oksidativni stres rastvorom paracetamola u dozi od 600 mg/kg (**FIZ + PCT**);
- Petoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 20 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola, a poslednjeg dana tretmana je indukovan oksidativni stres rastvorom paracetamola u dozi od 600 mg/kg (**PYC 20 + PCT**);
- Šestoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 50 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta piknogenola, a poslednjeg dana tretmana je indukovan oksidativni stres rastvorom paracetamola u dozi od 600 mg/kg (**PYC 50 + PCT**);

- Sedmoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta kore bora (**KB**);
- Osmoj grupi zdravih životinja se se peroralno tokom 7 dana aplikovalo 100 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta kore bora, a poslednjeg dana tretmana je indukovan oksidativni stres rastvorom paracetamola u dozi od 600 mg/kg (**KB+ PCT**).

4.5.3. Farmakodinamska ispitivanja

Za ispitivanje uticaja piknogenola i ekstrakta kore crnog bora poreklom sa Mokre gore na glikemiju normoglikemičnih i dijabetičnih životinja korišćena su dva farmakodinamska testa: indukcija trajne hiperglikemije aloksanom i test oralnog podnošenja glukoze.

Za indukciju trajne hiperglikemije kod laboratorijskih životinja korišćen je aloksan. Aloksan je supstanca strukturno slična glukozi koja se vezuje za GLUT2 glukozne transportere na površini β -ćelija pankreasa, ulazi u ćelije i stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta dovodi do oštećenja ćelija. Na taj način izaziva aloksansni dijabetes melitus koji je nastao po tipu nekroze kao i dijabetes melitus tip 2 [80, 81, 82].

Aloksan je rastvaran u fiziološkom rastvoru neposredno pre aplikacije i primenjen je u dozi od 130 mg/kg intraperitonealno (i.p.) jednokratno. Posle 48 h od primene aloksana, uzorkovana je krv iz repne vene u cilju određivanja koncentracije glukoze u krvi. Životinje koje su prilikom tog merenja imale glikemiju višu od 15 mmol/L bile su uključene u dalji tok ispitivanja.

Koncentracija glukoze u kapilarnoj krvi, uzete iz repne vene, određivana je komercijalnim kitovima na aparatu *FreeStyle Optium Neo* (Abbott Laboratories Limited, Berkshire, Engleska).

Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih normoglikemičnih životinja je merena neposredno pre početka tretmana i nakon sedmodnevnog tretmana piknogenolom i ekstraktom kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih dijabetičnih životinja merena je neposredno pre davanja alkosana, 48 h nakon davanja aloksana, 24 h nakon ponovnog davanja aloksana životinjama kod kojih prethodno nije indukovano dijabetes melitus i nakon sedmodnevnog tretmana piknogenolom i ekstraktom kore crnog bora sa Mokre gore.

U cilju izvođenja testa oralne tolerancije glukoze životinje su po završetku tretmana primile vodeni rastvor glukoze u dozi od 3 g/kg *per os*. Pre primene vodenog rastvora glukoze određena je startna glikemija. Nakon 30 minuta od aplikovanja glukoze izmerena je vrednost glikemije uzorkovanjem krvi iz repne vene.

4.5.4. Biohemijska i toksikološka ispitivanja

Uzorci krvi ispitivanih životinja su centrifugirani tokom 10 min na 6000 obrtaja u minuti. Nakon centrifugiranja pipetiran je supernatant koji je prenet u nove, pravilno obeležene, mikroeprovete. Do momenta analitičke obrade, uzorci seruma su odloženi u obeleženim mikroeprovetama u zamrzivaču i čuvani na temperaturi od -80 °C.

U serumu ispitivanih životinja određeni su biohemijski parametri:

- koncentracija ukupnog holesterola;
- koncentracija triglicerida;
- koncentracija HDL holesterola;

putem standardnih enzimskih metoda, uz upotrebu komercijalno dostupnog kompleta (*Bio Merieux, Francuska i Randox, Velika Britanija*) za HDL holesterol i automatskog uređaja za

hemijsku analizu (*TECHNICON RA-XT*, *Randox*, Velika Britanija). Koncentracija LDL holesterola je određena izračunavanjem prema *Friedwald*-ovoj formuli [83].

U cilju praćenja jetrene i bubrežne funkcije u serumu ispitivanih životinja određivana je:

- enzimska aktivnost aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT);
- direktni bilirubin;
- koncentracija mokraćne kiseline;
- koncentracija kreatinina;
- koncentracija uree.

Gore navedene analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama pomoću imunoturbidimetrijskog kompleta (*Human*, Nemačka), na automatskom sistemu za hemijske analize *Olimpus AU 400* (*Hamburg*, Nemačka).

4.6. *Ex vivo* ispitivanja

U okviru *ex vivo* ispitivanja efekata komercijalnog proizvoda piknogenola i ekstrakta kore crnog bora poreklom sa Mokre gore na zaštitu jetre životinja, nakon primene toksične doze paracetamola, u homogenatu jetre ispitivanih životinja određivan je intenzitet lipidne peroksidacije i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, dok smo u serumu ispitivanih životinja određivali aktivnost enzima jetre.

Homogenat jetre pripremljen je tako što se 1 g tkiva jetre homogenizovao sa TRIS-HCl puferom (pH=7,4), u odnosu 1:3, na temperaturi od 4 °C. Za homogenizaciju je korišćen homogenizator tipa *B. Braun, Potter S* (*Melsungen*, Nemačka). Tokom homogenizacije, posuda

homogenizatora je bila sve vreme uronjena u lomljeni led, kako bi se zaustavila aktivnost enzima i kako usled povećane temperature usled trenja pri homogenizaciji ne bi došlo do denaturacije proteina. Za spektrofotometrijsko određivanje parametara oksidativnog stresa u pripremljenom homogenatu tkiva jetre korišćen je spektrofotometar *Agilent 8453 (Santa Clara, SAD)*.

Aktivnost enzima jetre i direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je vršena prema standardnim spektrofotometrijskim metodama pomoću imunoturbidimetrijskog kompleta (*Human, Nemačka*), na automatskom sistemu za hemijske analize *Olimpus AU 400 (Hamburg, Nemačka)*.

Određivani su sledeći parametri:

- intenzitet lipidne peroksidacije (LPx), izmeren je na osnovu koncentracije sekundarnog produkta lipidne peroksidacije malondialdehida (MDA) [84];
- aktivnost enzima ksantin oksidaze (XOD) [85];
- koncentracija redukovanog glutationa (GSH) [86];
- aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSHPx) [87];
- aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) [88];
- aktivnost enzima katalaze (CAT) [89];
- aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) [90, 91] i alkalne fosfataze (ALP) [92]
- direktni bilirubin [93].

4.6.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Ukupni proteini su određeni biuretskom metodom.

Postupak: na uzorak homogenata jetre 20-50 μL , dodato je 3 mL rastvora biuretskog reagensa ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,15% K,Na-tartarat – 0,6%, rastvor KI – 0,1% u 0,85 mol/L NaOH i deoksiholat – 1,5%), i nakon 30 minuta merena je apsorbanca nastalog jedinjenja na 540 nm. Sadržaj proteina određen je na osnovu kalibracione krive dobijene merenjem različite koncentracije albumina goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*) (5-50 mg/L).

4.6.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (LPx)

Intenzitet LPx određen je primenom TBA-testa (engl. *Thiobarbituric acid test*). Merena je oksidacija lipida ćelijskih membrana preko reakcije lipid-peroksidnih produkata nastalih u reakcionom sistemu (malonildialdehida) sa tiobarbiturnom kiselinom.

Postupak: uzorak homogenata jetre 20-50 μL , je zagrevan tokom 15 minuta na ključalom vodenom kupatilu sa 3 mL rastvora Činidle (tiobarbiturna kiselina 0,375% u 15% TCA (3,75 g TBA + 15 g CCl_3COOH + 20,72 mL 37% HCl + 1-2 kapi α -tokoferola na 1 L rastvora)). Rastvor je zatim centrifugiran tokom 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti, a zatim je merena apsorbanca nastalog proizvoda reakcije na 535 nm. Rezultati su izraženi kao nanomoli malonildialdehida po miligramu proteina (nmol MDA/mg proteina).

4.6.3. Određivanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD)

Aktivnost ksantin oksidaze je određena spektrofotometrijski na osnovu promene apsorbance na 293 nm, pri prelazu ksantina u mokraćnu kiselinu.

Postupak: na uzorak homogenata jetre 20-50 μL , dodato je 3 mL fosfatnog pufera, $\text{pH}=7,5$ (optimalna pH za XOD), u kome se nalazio rastvor EDTA i ksantina u koncentraciji od 1 mol/L. Rastvor je centrifugiran na 3000 obrtaja u minuti u toku 10 minuta. Merena je apsorbancija reakcionog produkta na 293 nm, a rezultati su izraženi u nanomolima po miligramu proteina (nmol/mg proteina/min).

4.6.4. Određivanje koncentracije redukovano glutationa (GSH)

Koncentracija redukovano glutationa određena je na osnovu količine ne-protein sulfhidrilnih ostataka pomoću *Ellman*-ovog reagensa (smeša 0,2 mmol/dm³ rastvora DTNB i 0,1 mmol/dm³ fosfatnog pufera, $\text{pH}=8$).

Postupak: uzorak homogenata jetre, zapremine 1 mL centrifugiran je sa 2 mL rastvora 4%-ne sulfosalicilne kiseline, 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti. Određena zapremina supernatanta je pomešana sa rastvorom *Ellman*-ovog reagensa u odnosu 1:40. Merena je apsorbancija na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta, a prepačunat na miligrame proteina preko ukupnih proteina (nmol/mg proteina).

4.6.5. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSHPx)

Aktivnost glutation peroksidaze je određena pomoću kumol hidroperoksida (α -dimetilbenzilhidroperoksid) kao supstrata.

Postupak: uzorak homogenata jetre 20-50 μL , pomešan je sa 0,75 mL TRIS/HCl pufera ($\text{pH}=7,6$), $C=5 \cdot 10^{-2}$ mol/L (pufer I) i termostatiran 10 minuta na 37 °C. U reakcionu smešu je zatim dodat 0,1 mL rastvora GSH, $C=2,1 \cdot 10^{-3}$ mol/L i 0,1 mL rastvora kumolhidroperoksida u metanolu (1:200) i ponovo termostatirano 5 minuta na 37 °C. Potom je dodato 1 mL 20%-nog

rastvora trihlorsirćetne kiseline (engl. *Trichloroacetic acid*), da bi se reakcija stopirala. Reakciona smeša je centrifugirana na 3000 obrtaja u minuti u toku 10 minuta. Zatim je u 2 mL TRIS/HCl pufera, pH=8,9 (pufer II), C=0,4 mol/L, dodat 1 mL supernatanta i 0,1 mL rastvora DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (0,02 g u 5 mL pufera). Merena je apsorbanca na 412 nm. Rezultati su izraženi kao nanomoli po miligramu proteina (nmol/mg proteina/min).

4.6.6. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Aktivnost glutation reduktaze određena je praćenjem enzimske reakcije redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u prisustvu NADPH.

Postupak: na uzorak homogenata jetre 20-50 μL , dodato je 0,2 mL 2%-nog rastvora GSSG, 0,3 mL rastvora NADPH, $C=1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, a optimalna pH vrednost je podešena dodavanjem 2 mL fosfatnog pufera, pH=7,6. Nakon određenog vremena, reakcija je stopirana, a reakciona smeša centrifugirana na 3000 obrtaja u minuti u toku 10 minuta. Zatim je merena apsorbanca nastalog produkta na 340 nm. Rezultati su izraženi u nanomolima po miligramu proteina (nmol/mg proteina/min).

4.6.7. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze je određena primenom vodonik peroksida (H_2O_2) kao supstrata.

Postupak: uzorak homogenata jetre 20-50 μL , dodato je u 3 mL rastvora fosfatnog pufera, pH=7, C=0,05 mol/L (u koji je dodato 0,075 mL 30%-nog rastvora H_2O_2 na 50 mL fosfatnog pufera). Rastvor je centrifugiran na 3000 obrtaja u minuti u toku 10 minuta. Merena je apsorbanca na 240 nm, a rezultati su izraženi u nanomolima po miligramu proteina (nmol/mg proteina/min).

4.6.8. Određivanje nivoa enzima jetre

Vrednost enzima jetre AST i ALT, kao i direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je određen kao što je prethodno navedeno u poglavlju 4.5.4.

4.7. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja je rađena statističkim programom *IBM SPSS Statistics*, verzija 21. Kao mera centralne tendencije neke grupe korišćena je aritmetička sredina (\bar{x}), a mera varijacije među podacima izražena je standardnom devijacijom (δ). Statistička značajnost razlika određenih grupa je ispitivana Student t-testom za zavisne uzorke, odnosno analizom varijanse sa jednim promenljivim faktorom (jednosmerna ANOVA za istovremeno poređenje više uzoraka). *Post hoc* testiranje nakon jednosmerne ANOVA je rađeno *Tukey*-evim metodom. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05. Stepen zavisnosti pojava među uzorcima određivan je koeficijentom linearne korelacije (r), ili regresionom analizom. Rezultati korelacione analize su opisivani samo u slučaju da postoji statistička značajnost pojave. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

5. REZULTATI

5.1. *In vitro* ispitivanja antioksidativne aktivnosti

5.1.1. Sadržaj fenola

U *tabeli 2* su prikazani rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suve materije (mg GAE/g SM).

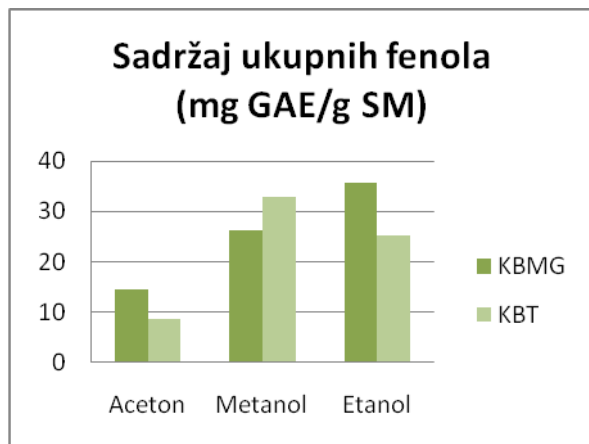
Tabela 2. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola ((mg GAE/ g SM), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

Grupe	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/ g SM)
CBMG + Ac	14,62±1,74
CBMG + Met	26,30±0,29
CBMG + Et	35,68±1,73
CBT + Ac	8,60±0,84
CBT + Met	32,76±2,21
CBT + Et	25,35±1,74
PYC + Ac	851,00±96,42 ^a
PYC + Met	772,67±48,88 ^a
PYC + Et	825,33±64,83 ^a

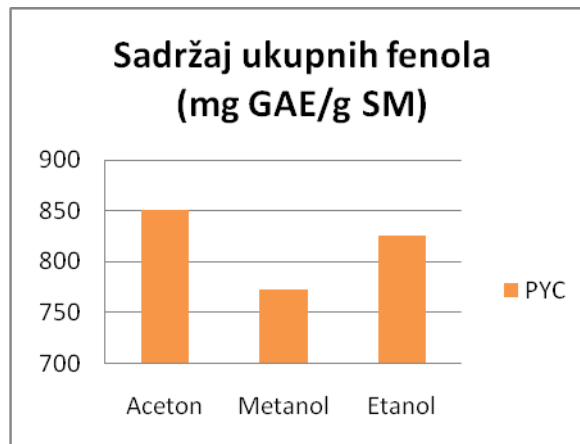
^ap<0.05 u odnosu na sve ostale ekstrakte kore crnog bora

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima se kretao u opsegu 8,6 - 851 mg GAE/ g SM. Najmanja vrednost sadržaja ukupnih fenola dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u acetonskom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske

ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola između ispitivanih grupa ekstrakata ($F=267,329$; $p<0,001$). Sadržaj ukupnih fenola je statistički značajno veći u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na sve ekstrakte kore crnog bora (*tabela 2*).



Grafikon 1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 2. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima piknogenola

Rezultati na *grafikonu 1* pokazuju sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veći sadržaj fenola u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veći sadržaj fenola u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na *grafikonu 2* pokazuju sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su sadržaj ukupnih fenola prema sledećem redosledu: PYC aceton > PYC etanol > PYC metanol.

5.1.2. Sadržaj tanina

U *tabeli 3* su prikazani rezultati određivanja sadržaja ukupnih tanina u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suve materije (mg GAE/g SM).

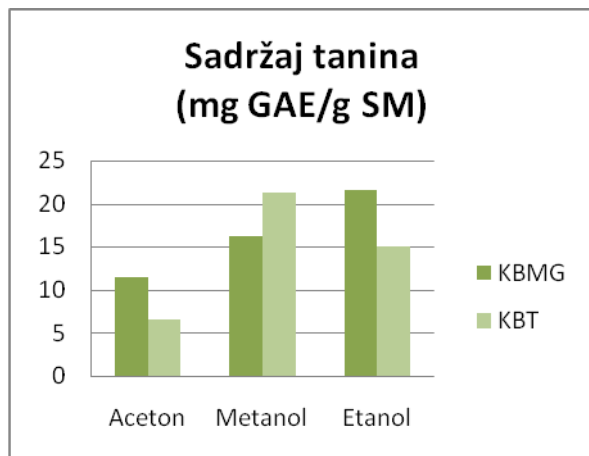
Tabela 3. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih tanina ((mg GAE/ g SM), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

Grupe	Sadržaj ukupnih tanina (mg GAE/ g SM)
CBMG + Ac	11,45±0,18
CBMG + Met	16,19±0,70
CBMG + Et	21,64±0,30
CBT + Ac	6,62±0,02
CBT + Met	21,31±0,45
CBT + Et	14,99±0,70
PYC + Ac	724,78±33,10 ^a
PYC + Met	673,37±7,86 ^a
PYC + Et	473,08±15,00 ^a

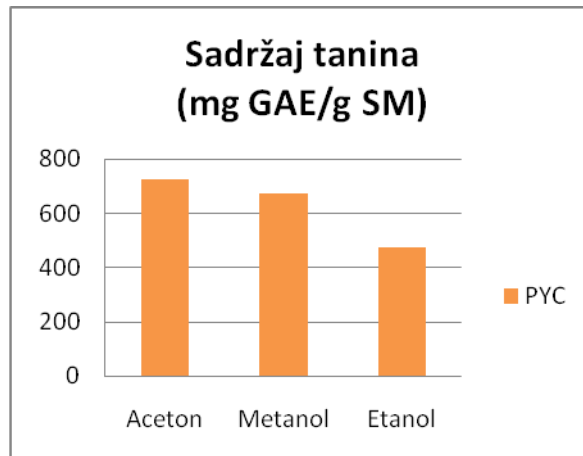
^ap<0.05 u odnosu na sve ostale ekstrakte

Sadržaj ukupnih tanina u ispitivanim ekstraktima se kretao u opsegu 6,62 – 724,78 mg GAE/ g SM. Najmanja vrednost sadržaja ukupnih fenola dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u acetonskom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih tanina između ispitivanih grupa ekstrakata (F=1893,28; p<0,001). Sadržaj ukupnih tanina je

statistički značajno veći u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na sve ostale ekstrakte (*tabela 3*).



Grafikon 3. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 4. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima piknogenola

Rezultati na *grafikonu 3* pokazuju sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veći sadržaj tanina u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakti kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veći sadržaj tanina u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na *grafikonu 4* pokazuju sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su sadržaj ukupnih tanina prema sledećem redosledu: PYC aceton > PYC metanol > PYC etanol.

5.1.3. Sadržaj proantocijanidina

U *tabeli 4* su prikazani rezultati određivanja sadržaja ukupnih proantocijanidina u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao miligrami ekvivalenta katehina po gramu suve materije (mg CE/g SM).

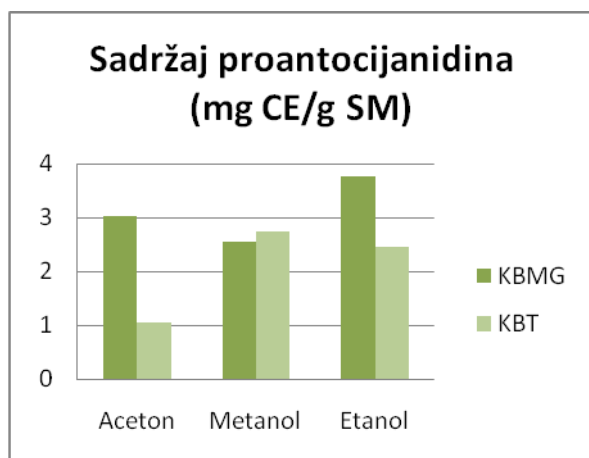
Tabela 4. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih proantocijanidina ((mg CE/g SM), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

Grupe	Sadržaj ukupnih proantocijanidina (mg CE/g SM)
CBMG + Ac	3,02±0,17
CBMG + Met	2,55±0,11
CBMG + Et	3,76±0,04
CBT + Ac	1,05±0,03
CBT + Met	2,74±0,06
CBT + Et	2,46±0,01
PYC + Ac	420,60±9,05 ^a
PYC + Met	501,07±40,90 ^a
PYC + Et	633,43±13,64 ^a

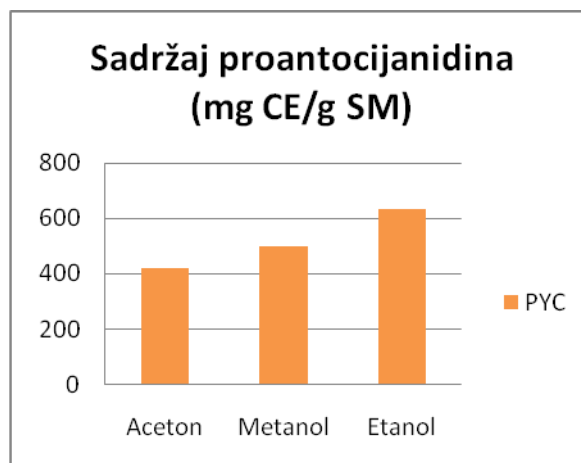
^ap<0.05 u odnosu na sve ostale ekstrakte

Sadržaj ukupnih proantocijanidina u ispitivanim ekstraktima se kretao u opsegu 1,05 – 633,43 mg CE/ g SM. Najmanja vrednost sadržaja ukupnih proantocijanidina dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u etanolnom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih proantocijanidina između ispitivanih grupa ekstrakata (F=965,18;

$p < 0,001$). Sadržaj ukupnih proantocijanidina je statistički značajno veći u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na sve ostale ekstrakte (*tabela 4*).



Grafikon 5. Sadržaj ukupnih proantocijanidina u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 6. Sadržaj ukupnih proantocijanidina u ekstraktima piknogenola

Rezultati na *grafikonu 5* pokazuju sadržaj ukupnih proantocijanidina u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veći sadržaj proantocijanidina u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakti kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veći sadržaj proantocijanidina u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na *grafikonu 6* pokazuju sadržaj ukupnih proantocijanidina u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su sadržaj ukupnih proantocijanidina prema sledećem redosledu: PYC etanol > PYC metanol > PYC acetone.

5.1.4. Sadržaj flavonoida

U *tabeli 5* su prikazani rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suve materije (mg QE/g SM).

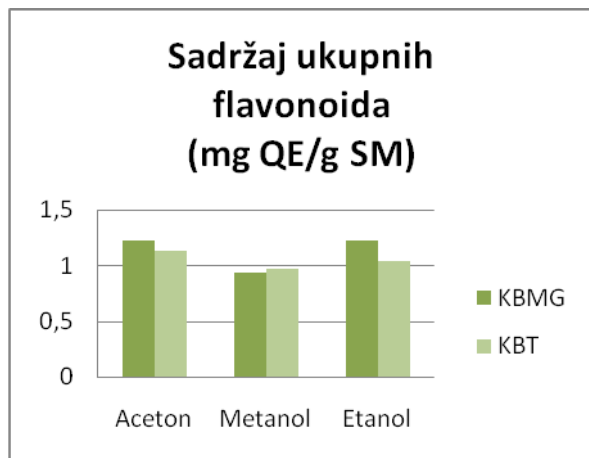
Tabela 5. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoida ((mg QE/g SM), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

Grupe	Sadržaj ukupnih flavonoida (mg QE/ g SM)
CBMG + Ac	1,222±0,044
CBMG + Met	0,935±0,018
CBMG + Et	1,221±0,127
CBT + Ac	1,131±0,031
CBT + Met	0,965±0,029
CBT + Et	1,039±0,062
PYC + Ac	12,69±0,12 ^a
PYC + Met	14,56±0,47 ^a
PYC + Et	15,62±0,87 ^a

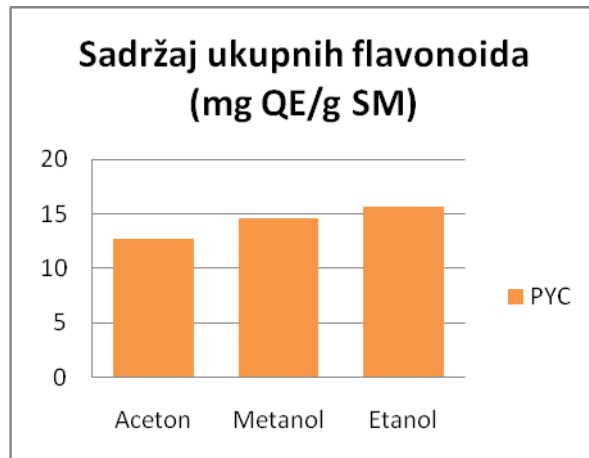
^ap<0.05 u odnosu nasve ostale ekstrakte

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima se kretao u opsegu 0,935 – 15,62 mg QE /g SM. Najmanja vrednost sadržaja ukupnih flavonoida dobijena je u metanolnom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Mokre gore, a najveća u etanolnom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih flavonoida između ispitivanih grupa ekstrakata (F=158,456; p<0,001). Sadržaj ukupnih

flavonoida je statistički značajno veći u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na sve ostale ekstrakte (*tabela 5*).



Grafikon 7. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 8. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima pikonegnola

Rezultati na *grafikonu 7* pokazuju sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veći sadržaj flavonoida u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veći sadržaj flavonoida u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na *grafikonu 8* pokazuju sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su sadržaj ukupnih flavonoida prema sledećem redosledu: PYC etanol > PYC metanol > PYC aceton.

5.1.5. Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom

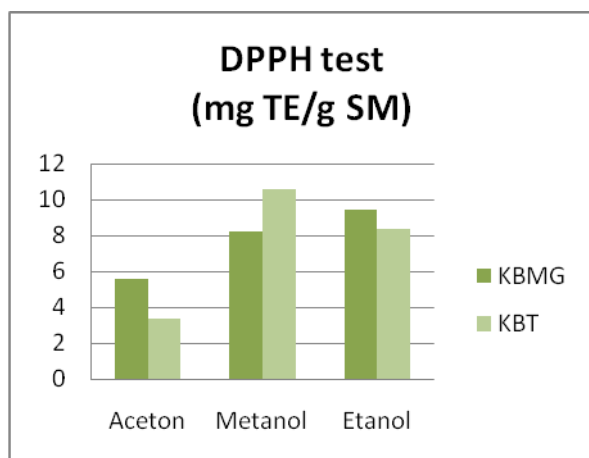
U **tabeli 6** su prikazani rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao miligrami Trolox ekvivalenta po gramu suve materije (mg TE/g SM).

Tabela 6. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom ((mg TE/g SM), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

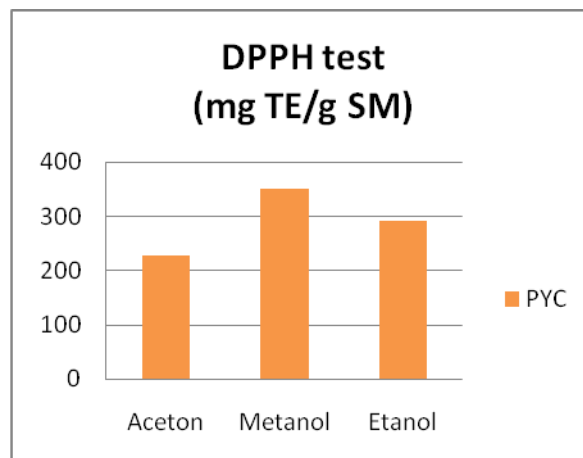
Grupe	DPPH (mg TE/g SM)
CBMG + Ac	5,55±0,78
CBMG + Met	8,19±1,02
CBMG + Et	9,45±0,82
CBT + Ac	3,35±0,58
CBT + Met	10,60±0,53
CBT + Et	8,35±0,68
PYC + Ac	228,33±23,46 ^a
PYC + Met	349,67±28,99 ^a
PYC + Et	292,00±7,00 ^a

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale ekstrakte

Vrednosti DPPH testa u ispitivanim ekstraktima su se kretale u opsegu 3,35 – 349,67 mg TE/g SM. Najmanja vrednost DPPH testa dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u metanolnom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima DPPH testa između ispitivanih grupa ekstrakata (F=390,396; p<0,001). Vrednost DPPH testa je statistički značajno veća u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na sve ostale ekstrakte (**tabela 6**).



Grafikon 8. Vrednost DPPH testa u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 9. Vrednost DPPH testa u ekstraktima piknogenola

Rezultati na **grafikonu 8** pokazuju vrednost DPPH testa u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veću vrednost DPPH u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veću vrednost DPPH u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na **grafikonu 9** pokazuju vrednost DPPH testa u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su DPPH vrednost prema sledećem redosledu: PYC metanol > PYC etanol > PYC aceton.

5.1.6. Antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom

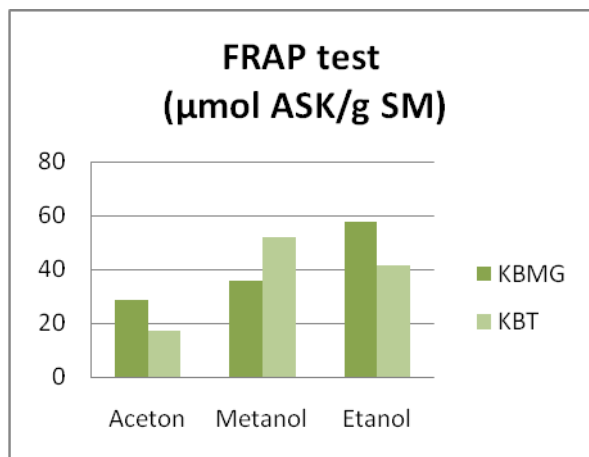
U **tabeli 7** su prikazani rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao mikromoli ekvivalenta askorbinske kiseline (ASK) po gramu suve materije ($\mu\text{mol ASK/g SM}$).

Tabela 7. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom ($\mu\text{mol ASK/g SM}$), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

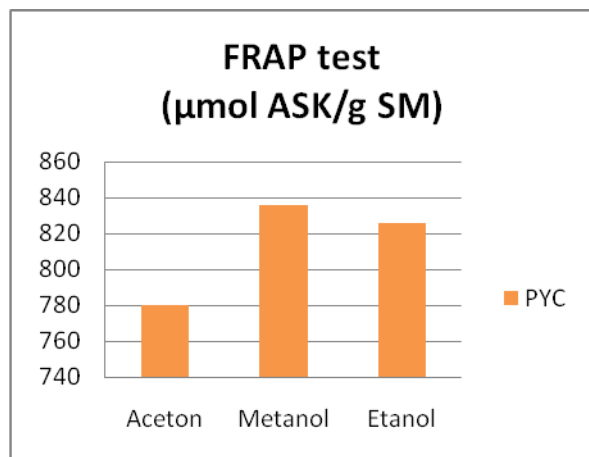
Grupe	FRAP ($\mu\text{mol ASK/g SM}$)
CBMG + Ac	28,4 \pm 0,77
CBMG + Met	35,71 \pm 3,70
CBMG + Et	57,44 \pm 1,41
CBT + Ac	17,08 \pm 0,8
CBT + Met	52,11 \pm 3,17
CBT + Et	41,61 \pm 1,56
PYC + Ac	780,00 \pm 16,64 ^a
PYC + Met	836,00 \pm 42,23 ^a
PYC + Et	825,67 \pm 7,10 ^a

^ap<0.05 u odnosu na sve ekstrakte kore crnog bora

Vrednosti FRAP testa u ispitivanim ekstraktima su se kretale u opsegu 17,08 – 836,00 $\mu\text{mol ASK/g SM}$. Najmanja vrednost FRAP testa dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u metanolnom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima FRAP testa između ispitivanih grupa ekstrakata ($F=1900,123$; $p<0,001$). Vrednost FRAP testa je statistički značajno veća u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na ekstrakte kore crnog bora (*tabela 7*).



Grafikon 10. Vrednost FRAP testa u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 11. Vrednost FRAP testa u ekstraktima piknogenola

Rezultati na **grafikonu 10** pokazuju vrednost FRAP testa u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veću vrednost FRAP u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veću vrednost FRAP u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na **grafikonu 11** pokazuju vrednost FRAP testa u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su FRAP vrednost prema sledećem redosledu: PYC metanol > PYC etanol > PYC aceton.

5.1.7. Antioksidativna aktivnost određena ABTS metodom

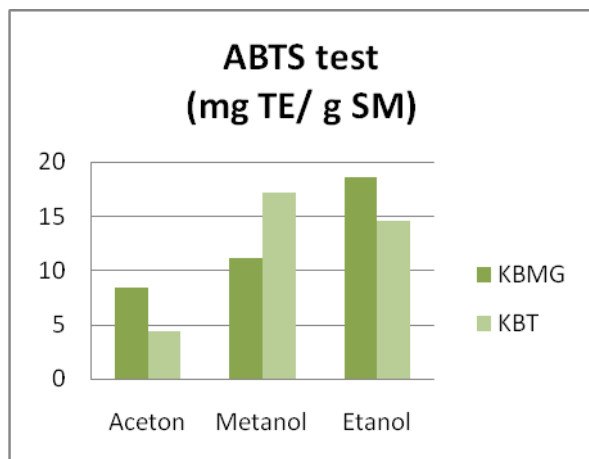
U **tabeli 8** su prikazani rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti ABTS metodom u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao miligrami ekvivalenata Troloxa po gramu suve materije (mg TE/g SM).

Tabela 8. Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti ABTS metodom ((mg TE/g SM), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

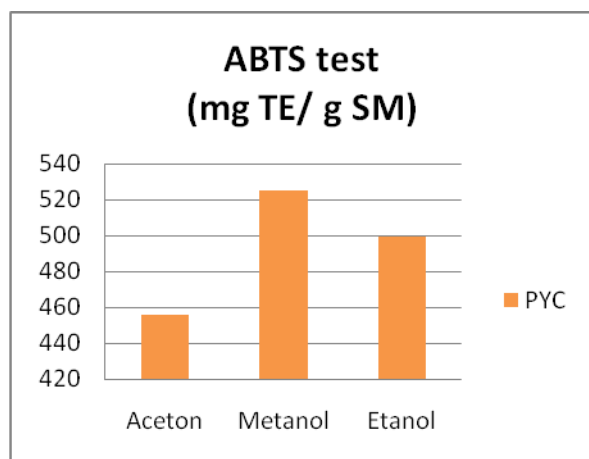
Grupe	ABTS (mg TE/g SM)
CBMG + Ac	8,35±0,39
CBMG + Met	11,08±1,34
CBMG + Et	18,54±0,93
CBT + Ac	4,32±0,84
CBT + Met	17,16±1,20
CBT + Et	14,58±0,65
PYC + Ac	455,67±15,50 ^a
PYC + Met	524,67±12,10 ^a
PYC + Et	499,00±10,82 ^a

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale ekstrakte

Vrednosti ABTS testa u ispitivanim ekstraktima su se kretale u opsegu 4,32 – 524,67 mg TE/ g SM. Najmanja vrednost ABTS testa dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u metanolnom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima ABTS testa između ispitivanih grupa ekstrakata (F=3082,046; p<0,001). Vrednost ABTS testa je statistički značajno veća u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na sve ostale ekstrakte (*tabela 8*).



Grafikon 12. Vrednost ABTS testa u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 13. Vrednost ABTS testa u ekstraktima piknogenola

Rezultati na **grafikonu 12** pokazuju vrednost ABTS testa u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veću vrednost ABTS u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veću vrednost ABTS u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na **grafikonu 13** pokazuju vrednost ABTS testa u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su ABTS vrednost prema sledećem redosledu: PYC metanol > PYC etanol > PYC aceton.

5.1.8. SOD aktivnosti određena NBT metodom

U **tabeli 9** su prikazani rezultati određivanja SOD aktivnosti NBT metodom u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao % inhibicije, u odnosu na slepu probu.

Tabela 9. Rezultati određivanja SOD aktivnosti NBT metodom ((% inhibicije), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

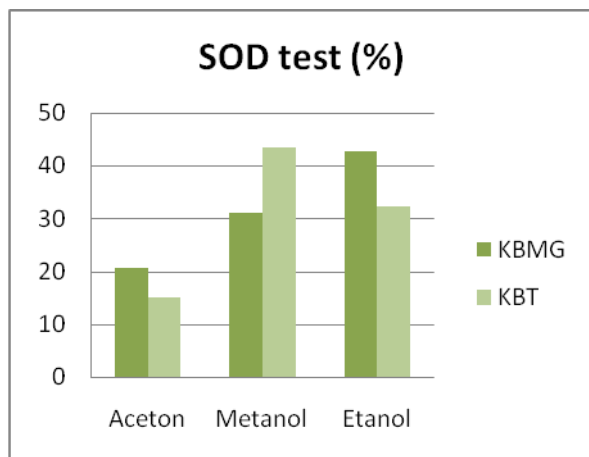
Grupe	SOD aktivnost (% inhibicije)
CBMG + Ac	20,74±2,87
CBMG + Met	31,12±4,20
CBMG + Et	42,70±7,00 ^a
CBT + Ac	15,00±4,61 ^b
CBT + Met	43,40±5,87 ^{a,c}
CBT + Et	32,23±9,94
PYC + Ac	26,79±4,12
PYC + Met	43,56±0,97 ^{a,c}
PYC + Et	28,16±2,76

^ap<0.05 u odnosu na CBMG+Ac, PYC+Ac

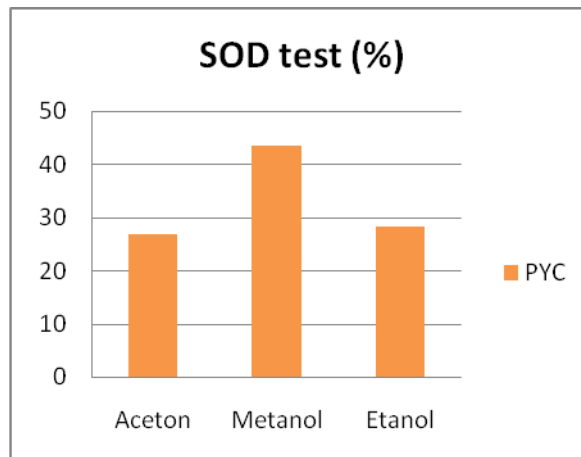
^bp<0.05 u odnosu na CBMG+Met, CBMG+Et, CBT+Met, CBT+Et, PYC+Met

^cp<0.05 u odnosu na PYC+Et

Vrednosti SOD aktivnosti u ispitivanim ekstraktima su se kretale u opsegu 15,00 – 43,56 % inhibicije. Najmanja vrednost SOD aktivnosti dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u metanolnom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima SOD aktivnosti između ispitivanih grupa ekstrakata ($F=11,043$; $p<0,001$). Vrednost SOD aktivnosti je statistički značajno veća u ekstraktima kore crnog bora CBMG + Et, CBT + Met i ekstraktu piknogenola PYC + Met u odnosu na ekstrakte CBMG + Ac, PYC + Ac. Vrednost SOD aktivnosti je statistički značajno veća u ekstraktu kore crnog bora CBT + Met i ekstraktu piknogenola PYC + Met u odnosu na ekstrakt piknogenola PYC + Et. Vrednost SOD aktivnosti je statistički značajno niža u ekstraktu kore crnog bora CBT + Ac u odnosu na ekstrakte CBMG + Met, CBMG + Et, CBT + Met, CBT + Et, PYC + Met (*tabela 9*).



Grafikon 14. Vrednost SOD testa u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 15. Vrednost SOD testa u ekstraktima piknogenola

Rezultati na **grafikonu 14** pokazuju vrednost SOD testa u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veću vrednost SOD u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veću vrednost SOD u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na **grafikonu 15** pokazuju vrednost SOD testa u ekstraktima piknogenola. Ekstrakti piknogenola pokazali su SOD vrednost prema sledećem redosledu: PYC metanol > PYC etanol > PYC aceton.

5.1.9. Ukupna antioksidativna aktivnost - molibdenska metoda

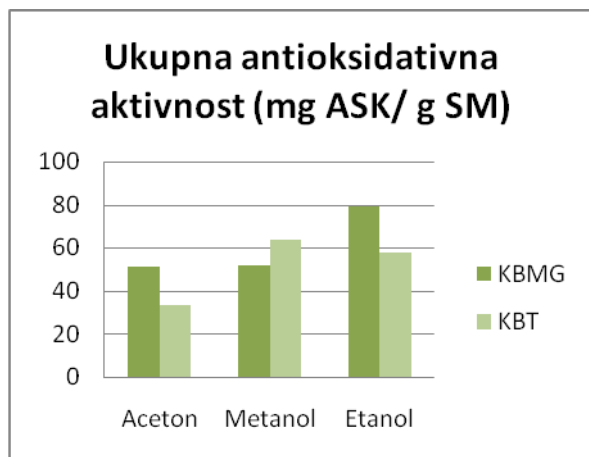
U **tabeli 10** su prikazani rezultati određivanja ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola, izraženi kao miligrami askorbinske kiseline po gramu suve materije (mg ASK/g SM).

Tabela 10. Rezultati određivanja ukupne antioksidativne aktivnosti ((mg ASK/g SM), $\bar{x} \pm SD$) u ekstraktima kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara) i piknogenola.

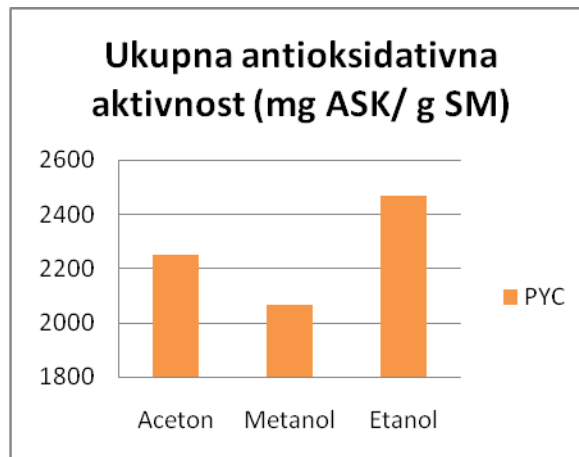
Grupe	Ukupna antioksidativna aktivnost (mg ASK/g SM)
CBMG + Ac	51,43±1,20
CBMG + Met	51,69±2,06
CBMG + Et	79,19±2,38
CBT + Ac	33,05±1,52
CBT + Met	63,58±0,84
CBT + Et	57,47±1,14
PYC + Ac	2250,33±56,66 ^a
PYC + Met	2065,33±38,42 ^a
PYC + Et	2468,33±25,72 ^a

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale ekstrakte

Vrednosti ukupne antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima su se kretale u opsegu 33,05 – 2468,33 mg ekvivalenata ASK/g SM. Najmanja vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti dobijena je u acetonskom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare, a najveća u etanolnom ekstraktu piknogenola. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednostima ukupne antioksidativne aktivnosti između ispitivanih grupa ekstrakata (F=6172,092; p<0,001). Vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti je statistički značajno veća u ekstraktima piknogenola PYC + Ac, PYC + Met, PYC + Et u odnosu na sve ostale ekstrakte (*tabela 10*).



Grafikon 16. Vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktima kore crnog bora



Grafikon 17. Vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktima pknogenola

Rezultati na **grafikonu 16** pokazuju vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktima kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao je veću vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazali su veću vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti u odnosu na etanolni i acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

Rezultati na **grafikonu 17** pokazuju vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktima pknogenola. Ekstrakti pknogenola pokazali su vrednost ukupne antioksidativne aktivnosti prema sledećem redosledu: PYC etanol > PYC aceton > PYC metanol.

5.1.10. Korelacijska analiza

U **tabeli 11** su prikazani rezultati koeficijenta korelacije (R) između prethodno dobijenih ekstrakata kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara).

Tabela 11. Koeficijent korelacije (R) između prethodno dobijenih rezultata ekstrakata kore crnog bora.

Koeficijent korelacije (R)					
	DPPH	ABTS	FRAP	NBT	TAA
TPC	0.934 ^a	0.942 ^a	0.948 ^a	0.882 ^a	0.902 ^a
TFC	- 0.399	- 0.161	- 0.091	- 0.316	0.099
TTC	0.940 ^a	0.946 ^a	0.965 ^a	0.883 ^a	0.914 ^a
PAC	0.669 ^c	0.742 ^a	0.776 ^a	0.633 ^c	0.902 ^a

^ap<0.001

^bp<0.01

^cp<0.05

TPC – sadržaj ukupnih fenola

TFC – sadržaj ukupnih flavonoida

TTC – sadržaj ukupnih tanina

PAC – sadržaj ukupnih proantocijanidina

TAA – ukupna antioksidativna aktivnost

Iz *tabele 11* se uočava da postoji statistički značajna jaka pozitivna povezanost vrednosti fenola i DPPH ($r=0,934$; $p<0,001$), fenola i ABTS ($r=0,942$; $p<0,001$), fenola i FRAP ($r=0,948$; $p<0,001$), fenola i NBT-SOD ($r=0,882$; $p<0,001$), fenola i TAA ($r=0,902$; $p<0,001$).

Postoji statistički značajna jaka pozitivna povezanost vrednosti tanina i DPPH ($r=0,94$; $p<0,001$), tanina i ABTS ($r=0,946$; $p<0,001$), tanina i FRAP ($r=0,965$; $p<0,001$), tanina i NBT-SOD ($r=0,883$; $p<0,001$), tanina i TAA ($r=0,914$; $p<0,001$).

Postoji statistički značajna pozitivna povezanost vrednosti proantocijanidina i DPPH ($r=0,669$; $p<0,05$), proantocijanidina i ABTS ($r=0,742$; $p<0,001$), proantocijanidina i FRAP ($r=0,776$; $p<0,001$), proantocijanidina i NBT-SOD ($r=0,633$; $p<0,05$), proantocijanidina i TAA ($r=0,902$; $p<0,001$).

5.1.11. HPLC analiza ekstrakata kore crnog bora

U *tabeli 12* su prikazani rezultati HPLC analize metanolnog i etanolnog ekstrakta kore crnog bora sa dva staništa (Mokra gora i Tara), izraženi kao miligrami po gramu suve materije (mg/g SM).

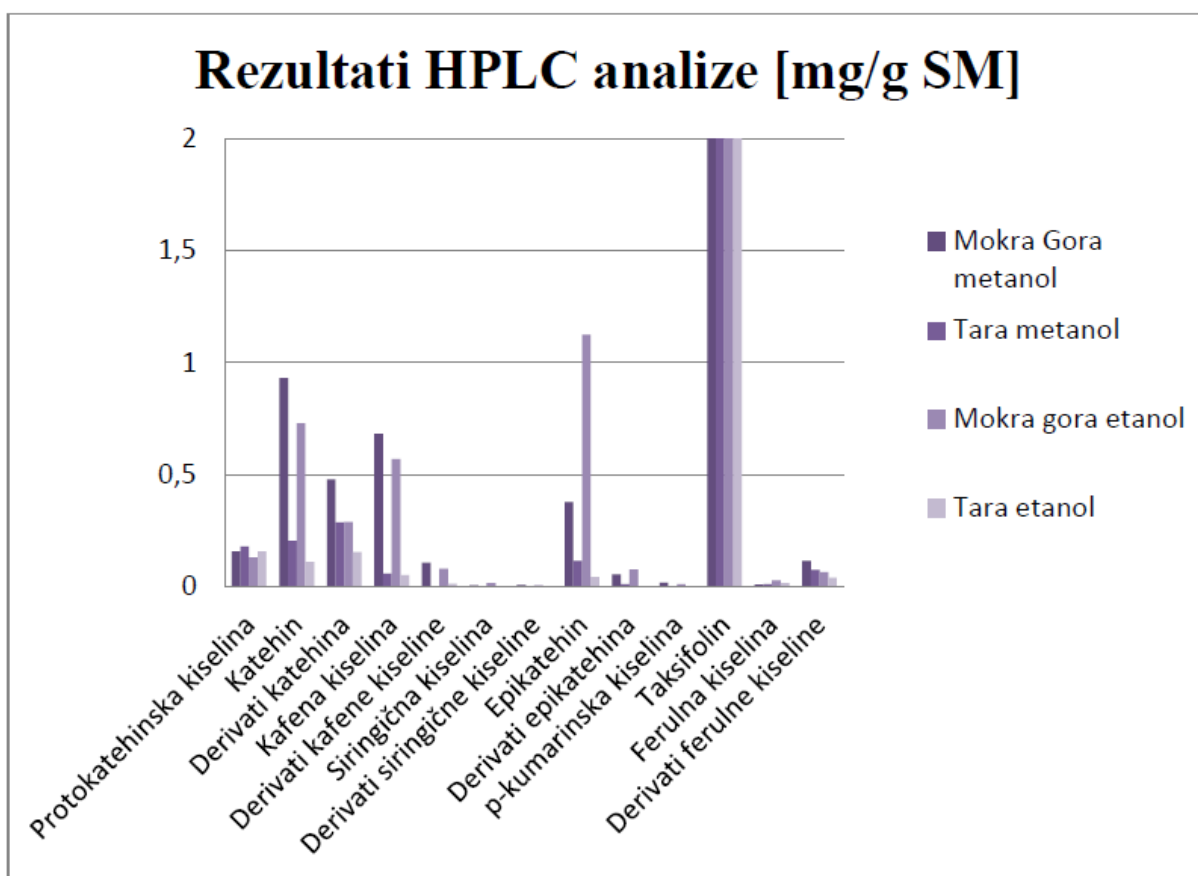
Tabela 12. Rezultati HPLC analize metanolnog i etanolnog ekstrakta kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare (mg/g SM).

		λ (nm)	Retenciono vreme (min)	Mokra Gora		Tara	
				metanol	etanol	metanol	etanol
Protokatehinska kiselina	1	280	2,216	0,1568	0,1291	0,1772	0,1566
Katehin	2	280	4,327	0,9306	0,7293	0,2036	0,1091
Derivati katehina	2a	280	4,65	0,4769	0,2884	0,2867	0,1532
			4,97				
Kafena kiselina	3	350	5,854	0,6818	0,5689	0,0579	0,0515
Derivati kafene kiseline	3a	350	5,42	0,1051	0,0794	n.d.	0,0119
Siringična kiselina	4	350	6,409	0,0051	0,0147	0,0011	0,0021
Derivati siringične kiseline	4a	350	6,5	0,0072	0,0047	0,0020	0,0019
			6,8				
Epikatehin	5	280	8,0	0,3773	1,1237	0,1136	0,0416
Derivati epikatehina	5a	280	7,7	0,0538	0,0762	0,0093	n.d.
p-kumarinska kiselina	6	280	10,102	0,0168	0,0105	0,0017	n.d.
Taksifolin	7	280	10,6	52,9744	38,9235	17,8263	11,9265
Ferulna kiselina	8	280	11,8	0,0080	0,0258	0,0097	0,0144
Derivati ferulne kiseline	8a	280	13,3	0,1135	0,0635	0,0740	0,0380
	8b		14,02				
	8c		21,24				

n.d - nije detektovan

U **Prilogu** su prikazani spektri hromatograma svakog ekstrakta pojedinačno (*prilog 1, prilog 2, prilog 3, prilog 4*).

Poređenjem retencionih vremena i spektara dobijenih pikova sa retencionim vremenima i spektrima standarada, u kori *Pinus nigra* Arnold identifikovane i kvantifikovane su: protokatehinska kiselina, katehin, kafena kiselina, siringična kiselina, epikatehin, p-kumarinska kiselina, taksifolin, ferulna kiselina i kempferol (*tabela 12*).



Grafikon 18. Rezultati HPLC analize ekstrakata kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare

Rezultati na **grafikonu 18** prikazuju da je sadržaj katehina i njegovih derivata, kafene kiseline i njenih derivata, siringične kiseline i njenih derivata, epikatehina i njegovih derivata, p-kumarinske kiseline, taksifolina, ferulne kiseline i njenih derivata veći u metanolnom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Mokre gore u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare, dok je sadržaj protokatehinske kiseline veći u metanolnom ekstraktu kore crnog bora poreklom sa Tare u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore.

Sadržaj protokatehinske kiseline, katehina, derivata katehina, kafene kiseline, derivata kafene kiseline, derivata siringične kiseline, p-kumarinske kiseline, taksifolina, ferulne kiseline i derivata ferulne kiseline je veći u metanolnom ekstraktu u odnosu na etanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore, dok je sadržaj siringične kiseline, epikatehina i derivata epikatehina veći u etanolnom u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Sadržaj protokatehinske kiseline, katehina, derivata katehina, kafene kiseline, derivata siringične kiseline, p-kumarinske kiseline i derivata ferulne kiseline je veći u metanolnom ekstraktu u odnosu na etanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare, dok je sadržaj derivata kafene kiseline, siringične kiseline i ferulne kiseline veći u etanolnom u odnosu na metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare.

5.2. In vivo ispitivanja dijabetičnih i normoglikemičnih životinja

5.2.1. Vrednost telesne mase

U *tabeli 13* su prikazani rezultati telesne mase na početku, nakon završetka sedmodnevnog tretmana, promena telesne mase u posmatranom periodu i masa jetre nakon sedmodnevnog tretmana kod normoglikemičnih životinja, izraženi u gramima (g).

Tabela 13. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start (g), $\bar{x} \pm SD$), nakon završetka sedmodnevnog tretmana (TM Kraj (g), $\bar{x} \pm SD$), promena telesne mase u posmatranom periodu (TM Δ (g), $\bar{x} \pm SD$) i masa jetre nakon sedmodnevnog tretmana (M jetre (g), $\bar{x} \pm SD$) kod normoglikemičnih životinja.

Grupa	TM start (g)	TM kraj (g)	Δ TM (g)	M jetre (g)
FIZ	276,8 \pm 16,5	316,8 \pm 17,4 ^a	40,0 \pm 7,9	12,8 \pm 0,8 ^d
PYC	275,5 \pm 11,5	314,3 \pm 14,1 ^a	38,8 \pm 9,5	10,5 \pm 0,7
KB	215,7 \pm 16,1	251,5 \pm 18,7 ^a	35,8 \pm 5,1	11,1 \pm 0,7
MET	280,5 \pm 11,0	299,7 \pm 16,6 ^a	19,2 \pm 7,6 ^c	9,3 \pm 1,2
GLIK	250,0 \pm 12,1	273,2 \pm 22,1 ^a	23,2 \pm 10,2	11,0 \pm 1,4
PYC + MET	250,5 \pm 15,5	265,5 \pm 18,8 ^a	15,0 \pm 5,8 ^b	10,0 \pm 0,7
PYC + GLIK	249,5 \pm 8,7	273,8 \pm 15,8 ^a	24,3 \pm 10,3	10,3 \pm 0,8
KB + MET	218,5 \pm 14,4	256,7 \pm 17,5 ^a	38,2 \pm 5,2	10,9 \pm 0,5
KB + GLIK	213,7 \pm 9,6	256,3 \pm 12,3 ^a	42,7 \pm 15,8	11,3 \pm 1,6

^ap<0.05 u odnosu na TM start

^bp<0.05 u odnosu na PYC, FIZ, KB+MET, KB+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na KB+GLIK

^dp<0.05 u odnosu na MET, PYC+MET, PYC+GLIK

Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da postoji statistički značajno povećanje telesne mase na kraju, u odnosu na telesnu masu na početku sedmodnevnog tretmana u svim grupama normoglikemičnih životinja: FIZ (t=-12,443; p<0,0001), PYC (t=-

9,973; $p < 0,0001$), KB ($t = -17,159$; $p < 0,0001$), MET ($t = -6,135$; $p = 0,002$), GLIK ($t = -5,539$; $p = 0,003$), PYC + MET ($t = -6,301$; $p = 0,001$), PYC + GLIK ($t = -5,782$; $p = 0,002$), KB + MET ($t = -18,003$; $p < 0,0001$), KB + GLIK ($t = -6,606$; $p = 0,001$). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa životinja ($F = 7,589$; $p < 0,0001$). Promena telesne mase je statistički značajno manja u grupi PYC + MET u odnosu na grupe PYC, FIZ, KB + MET, KB + GLIK. Promena telesne mase je statistički značajno veća u grupi KB + GLIK u odnosu na grupu MET. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u masi jetre između ispitivanih grupa životinja ($F = 5,749$; $p < 0,0001$). Promena mase jetre je statistički značajno veća u grupi FIZ u odnosu na grupe MET, PYC + MET, PYC + GLIK (*tabela 13*).

U *tabeli 14* su prikazani rezultati telesne mase na početku, nakon završetka sedmodnevnog tretmana, promena telesne mase u posmatranom periodu i masa jetre nakon sedmodnevnog tretmana kod dijabetičnih životinja, izraženi u gramima (g).

Tabela 14. Vrednosti telesne mase na početku (TM Start (g), $\bar{x} \pm SD$), nakon završetka sedmodnevnog tretmana (TM Kraj (g), $\bar{x} \pm SD$), promena telesne mase u posmatranom periodu (TM Δ (g), $\bar{x} \pm SD$) i masa jetre nakon sedmodnevnog tretmana (M jetre (g), $\bar{x} \pm SD$) kod dijabetičnih životinja.

Grupa	TM start (g)	TM kraj (g)	Δ TM (g)	M jetre (g)
FIZ	183,8 \pm 9,0	201,5 \pm 8,2 ^a	17,7 \pm 8,7 ^d	9,7 \pm 0,7
PYC	165,7 \pm 6,8	208,0 \pm 13,6 ^a	42,3 \pm 20	10,3 \pm 0,8
KB	261,33 \pm 5,7	262,0 \pm 15,2	0,7 \pm 16,1 ^b	9,2 \pm 0,4 ^f
MET	166,3 \pm 16,8	199,0 \pm 11,0 ^a	32,7 \pm 14,5 ^e	9,6 \pm 0,7
GLIK	178,0 \pm 14,2	254,5 \pm 26,2 ^a	76,5 \pm 14,4	11,8 \pm 1,9
PYC + MET	162,5 \pm 13,2	231,7 \pm 25,7 ^a	69,2 \pm 28,3	10,4 \pm 1,0
PYC + GLIK	181,3 \pm 22,6	225,8 \pm 18,5 ^a	44,5 \pm 22,5	11,2 \pm 1,7
KB + MET	271,5 \pm 13,0	265,2 \pm 23,0	-6,3 \pm 19,5 ^{b,c}	10,2 \pm 1,4
KB + GLIK	258,7 \pm 13,7	267,3 \pm 14,0	8,7 \pm 12,4 ^b	9,8 \pm 1,2

^ap<0.05 u odnosu na TM Start

^bp<0.05 u odnosu na GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na PYC, MET

^dp<0.05 u odnosu na GLIK, PYC+MET

^ep<0.05 u odnosu na GLIK, PYC+MET, KB+MET

^fp<0.05 u odnosu na GLIK

Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da postoji statistički značajno povećanje telesne mase na kraju, u odnosu na telesnu masu na početku sedmodnevnog tretmana u sledećim grupama dijabetičnih životinja: FIZ (t=-4,995; p=0,004), PYC (t=-5,178; p=0,004), MET (t=-5,508; p=0,003), GLIK (t=-13,009; p<0,0001), PYC + MET (t=-5,988; p=0,002), PYC + GLIK (t=-4,840; p=0,005). U grupi životinja KB + MET se uočava da postoji sniženje telesne mase na kraju, u odnosu na telesnu masu na početku sedmodnevnog tretmana, ali bez statističke značajnosti (t=0,793; p=0,463). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u promeni telesne mase između ispitivanih grupa životinja (F=15,383; p<0,0001). Promena telesne mase je statistički značajno manja u grupi FIZ u odnosu na grupe GLIK i PYC + MET. Promena telesne mase je statistički značajno manja u grupi MET u

odnosu na grupe GLIK, PYC + MET, KB + MET. Promena telesne mase je statistički značajno manja u grupama KB, KB + GLIK i KB + MET u odnosu na grupe GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK. Promena telesne mase je statistički značajno manja u grupi KB + MET i u odnosu na grupe PYC i MET. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u masi jetre između ispitivanih grupa životinja ($F=2,92$; $p=0,01$). Promena mase jetre je statistički značajno manja u grupi KB u odnosu na grupu GLIK (*tabela 14*).

5.2.2. Vrednost glukoze u krvi

U *tabeli 15* su prikazani rezultati nivoa glukoze u krvi pre tretmana, poslednjeg dana tretmana i promena nivoa glukoze u krvi u posmatranom periodu kod normoglikemičnih životinja, izraženi kao milimoli glukoze po litru (mmol/L).

Tabela 15. Vrednosti glukoze u krvi pre tretmana (GUK pre (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), poslednjeg dana tretmana (GUK kraj (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) i promena nivoa glukoze u krvi u posmatranom periodu (ΔGUK (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) kod normoglikemičnih životinja.

Grupa	GUK pre (mmol/L)	GUK posle (mmol/L)	ΔGUK (mmol/L)
FIZ	7,60±1,29	7,25±0,33 ^{a,b,c}	-0,35±1,26 ^{b,e}
PYC	7,97±0,46	6,20±0,17 ^a	-1,77±0,57
KB	7,02±0,32	6,43±0,41 ^a	-0,58±0,42 ^b
MET	7,98±0,56	5,87±0,78 ^a	-2,15±0,62
GLIK	7,72±0,82	6,67±0,75 ^a	-1,05±0,59
PYC + MET	7,77±0,31	6,10±0,27 ^a	-1,57±0,22
PYC + GLIK	7,63±0,60	6,42±0,79 ^a	-1,22±0,73
KB + MET	7,05±0,27	5,75±0,39 ^a	-1,30±0,61
KB + GLIK	7,30±0,74	5,25±0,53 ^{a,d}	-2,05±0,94

^ap<0.05 u odnosu na GUK pre

^bp<0.05 u odnosu na MET, KB+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na PYC, PYC+MET, KB+MET

^dp<0.05 u odnosu na GLIK, PYC+GLIK, KB

^ep<0.05 u odnosu na PYC

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti glukoze u krvi pre početka sedmodnevnog tretmana između ispitivanih grupa životinja ($F=1,739$; $p=0,115$). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednosti glukoze u krvi poslednjeg dana sedmodnevnog tretmana između ispitivanih grupa životinja ($F=7,332$; $p<0,0001$). Vrednosti glukoze u krvi poslednjeg dana tretmana je statistički značajno veća u grupi FIZ u odnosu na grupe MET, KB+GLIK, PYC+MET, KB+MET. Vrednosti glukoze u krvi poslednjeg dana tretmana je statistički značajno niža u grupi KB+GLIK u odnosu na grupe GLIK, PYC+GLIK, KB (*tabela 15*).

Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da postoji statistički značajno niža vrednost glukoze u krvi poslednjeg dana tretmana, u odnosu na vrednost glukoze u krvi pre početka sedmodnevnog tretmana u svim grupama normoglikemičnih životinja: FIZ ($t=8,944$; $p<0,0001$), PYC ($t=7,414$; $p<0,001$), KB ($t=3,390$; $p=0,019$), MET ($t=7,440$; $p<0,001$), GLIK ($t=4,366$; $p=0,007$), PYC + MET ($t=17,049$; $p<0,0001$), PYC + GLIK ($t=4,095$; $p=0,009$), KB + MET ($t=5,193$, $p=0,003$), KB + GLIK ($t=5,332$; $p=0,003$). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u promeni vrednosti glukoze u krvi između ispitivanih grupa životinja ($F=4,351$; $p=0,001$). Promena vrednosti glukoze u krvi je statistički značajno manja u grupama FIZ i KB u odnosu na grupe MET i KB + GLIK. Promena vrednosti glukoze u krvi je statistički značajno manja u grupi FIZ u odnosu na grupu PYC (*tabela 15*).

U *tabeli 16* su prikazani rezultati nivoa glukoze u krvi pre davanja aloksana, 48 sati nakon davanja aloksana, poslednjeg dana tretmana i promena vrednosti glukoze u krvi u periodu od 48

sati nakon davanja aloksana do poslednjeg dana tretmana kod dijabetičnih životinja, izraženi kao milimoli glukoze po litru (mmol/L).

Tabela 16. Vrednosti glukoze u krvi pre davanja aloksana (GUK pre (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), 48 sati nakon davanja aloksana (GUK 0 (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), poslednjeg dana tretmana (GUK kraj (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) i promena nivoa glukoze u krvi u periodu od 48 sati nakon davanja aloksana do poslednjeg dana tretmana (ΔGUK (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) kod dijabetičnih životinja.

Grupa	GUK pre (mmol/L)	GUK 0 (mmol/L)	GUK kraj (mmol/L)	Δ GUK (mmol/L)
FIZ	6,76 \pm 0,30	32,5 \pm 0,2	33,0 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3
PYC	6,73 \pm 0,23	33,0 \pm 0,3	32,0 \pm 0,5	-1,0 \pm 0,4
KB	6,75 \pm 0,31	28,3 \pm 4,4 ^{a,b}	11,8 \pm 10,5 ^{c,b}	-16,5 \pm 9,0 ^b
MET	6,77 \pm 0,35	34,0 \pm 2,1	29,7 \pm 5,5	-3,3 \pm 5,5
GLIK	6,73 \pm 0,27	33,5 \pm 2,9	31,4 \pm 2,4	-2,1 \pm 2,4
PYC + MET	6,70 \pm 0,30	32,7 \pm 3,0	32,3 \pm 3,2	-0,4 \pm 3,0
PYC + GLIK	6,68 \pm 0,36	34,5 \pm 3,8	32,5 \pm 2,4	-2,0 \pm 2,4
KB + MET	6,73 \pm 0,34	25,6 \pm 3,2 ^b	5,2 \pm 1,9 ^{c,b}	-20,4 \pm 4,8 ^b
KB + GLIK	6,77 \pm 0,26	23,6 \pm 1,3 ^b	4,6 \pm 1,6 ^{c,b}	-19,1 \pm 2,4 ^b

^ap<0.05 u odnosu na KB+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na GUK 0

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti glukoze u krvi pre davanja aloksana između ispitivanih grupa životinja (GUK pre; F=0,058; p=1,000). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednosti glukoze u krvi 48 sati nakon davanja aloksana između ispitivanih grupa životinja (GUK 0; F=24,449; p<0,0001). Vrednosti glukoze u krvi 48 sati nakon davanja aloksana je statistički značajno niža u grupama KB, KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK. Vrednosti glukoze u krvi 48 sati nakon

davanja aloksana je statistički značajno niža u grupi KB u odnosu na grupu KB + GLIK. Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednosti glukoze u krvi poslednjeg dana tretmana između ispitivanih grupa životinja (GUK kraj; $F=54,371$; $p<0,0001$). Vrednosti glukoze u krvi poslednjeg dana tretmana je statistički značajno niža u grupama KB, KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK. Primenom Student-ovog T-testa za zavisne uzorke je utvrđeno da postoje statistički značajno niže vrednosti glukoze u krvi poslednjeg dana tretmana, u odnosu na vrednost glukoze u krvi 48 sati nakon davanja aloksana u sledećim grupama životinja: KB ($t=4,521$; $p=0,006$), KB + MET ($t=10,380$; $p<0,0001$), KB+GLIK ($t=19,795$; $p<0,0001$). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u promeni vrednosti glukoze u krvi između ispitivanih grupa životinja ($F=28,798$; $p<0,0001$). Promena vrednosti glukoze u krvi je statistički značajno manja u grupama KB, KB + MET, KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK (*tabela 16*).

5.2.2.1. Test oralnog podnošenja glukoze

U *tabeli 17* su prikazani rezultati glikemije u krvi pre OGT testa i posle OGT testa kod normoglikemičnih životinja, izraženi kao milimoli glukoze po litru (mmol/L).

Tabela 17. Vrednosti glikemije u krvi pre OGT testa ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) i posle OGT testa((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) kod normoglikemičnih životinja.

Grupa	Glikemija pre OGTT (mmol/L)	Glikemija posle OGTT (mmol/L)
FIZ	7,60±1,29	8,17±0,41 ^a
PYC	7,97±0,46	7,77±0,49 ^{b,c}
KB	7,02±0,32	6,68±0,68
MET	7,98±0,56	6,70±0,48
GLIK	7,72±0,82	6,03±0,64
PYC + MET	7,77±0,31	6,18±0,45
PYC + GLIK	7,63±0,60	5,17±0,23 ^c
KB + MET	7,05±0,27	6,57±0,60
KB + GLIK	7,30±0,74	5,83±0,38

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale grupe^bp<0.05 u odnosu na GLIK, PYC+GLIK, KB+GLIK^cp<0.05 u odnosu na KB, MET, PYC+MET, KB+MET

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednosti glikemije u krvi pre OGT testa između ispitivanih grupa životinja (F=1,739; p=0,115). Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednosti glikemije u krvi posle OGT testa između ispitivanih grupa životinja (F=20,613; p<0,0001). Vrednost glikemije u krvi nakon OGT testa je statistički značajno veća u grupi FIZ u odnosu na sve ostale grupe. Vrednost glikemije u krvi nakon OGT testa je statistički značajno veća u grupi PYC u odnosu na grupe KB, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK, KB + MET, KB + GLIK. Vrednost glikemije u krvi nakon OGT testa je statistički značajno niža u odnosu na grupe KB, MET, PYC + MET, KB + MET (*tabela 17*).

5.2.3. Lipidni status

U *tabeli 18* su prikazani rezultati koncentracije ukupnog holesterola u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 18. Koncentracija ukupnog holesterola (HOL (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	HOL (mmol/L)
FIZ	1,595±0,118
PYC	1,710±0,065
KB	2,070±0,096 ^{a, b}
MET	1,457±0,083
GLIK	1,650±0,139
PYC + MET	1,662±0,125
PYC + GLIK	1,647±0,121
KB + MET	2,343±0,269 ^a
KB + GLIK	2,220±0,081 ^a

^ap<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na KB+MET

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=32,157; p<0,0001). Koncentracija holesterola u serumu normoglikemičnih životinja je statistički značajno veća u grupama KB, KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK. Koncentracija holesterola u serumu normoglikemičnih životinja je statistički značajno veća u grupi KB odnosu na grupu KB + MET (*tabela 18*).

U *tabeli 19* su prikazani rezultati koncentracije ukupnog holesterola u serumu dijabetičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 19. Koncentracija ukupnog holesterola (HOL (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	HOL (mmol/L)
FIZ	2,108±0,395
PYC	2,208±0,316
KB	1,978±0,473
MET	2,085±0,222
GLIK	1,968±0,297
PYC + MET	2,102±0,128
PYC + GLIK	2,045±0,360
KB + MET	2,103±0,187
KB + GLIK	2,167±0,078

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji holesterola u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja ($F=0,415$; $p=0,906$) (*tabela 19*).

U *tabeli 20* su prikazani rezultati koncentracije triglicerida u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 20. Koncentracija triglicerida (TG (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	TG (mmol/L)
FIZ	0,663±0,095 ^{a,b}
PYC	0,423±0,072
KB	0,477±0,101
MET	0,372±0,058
GLIK	0,430±0,152
PYC + MET	0,397±0,064
PYC + GLIK	0,468±0,094
KB + MET	0,623±0,119 ^b
KB + GLIK	0,488±0,091

^a $p < 0.05$ u odnosu na KB, PYC+GLIK

^b $p < 0.05$ u odnosu na PYC, MET, GLIK, PYC+MET

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa životinja ($F=6,128$; $p<0,0001$). Koncentraciji triglicerida u serumu normoglikemičnih životinja je statistički značajno veća u grupama FIZ i KB + MET u odnosu na grupe PYC, MET, GLIK, PYC + MET. Koncentracija triglicerida u serumu normoglikemičnih životinja je statistički značajno veća u grupi FIZ u odnosu na grupe KB, PYC + GLIK (*tabela 20*).

U *tabeli 21* su prikazani rezultati koncentracije triglicerida u serumu dijabetičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 21. Koncentracija triglicerida (TG (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	TG (mmol/L)
FIZ	1,865±0,616 ^a
PYC	0,670±0,084
KB	0,475±0,099
MET	0,868±0,218
GLIK	0,675±0,148
PYC + MET	0,517±0,209
PYC + GLIK	1,003±0,760
KB + MET	0,500±0,113
KB + GLIK	0,427±0,062

^a $p<0.05$ u odnosu na sve ostale grupe

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u serumu između ispitivanih grupa životinja ($F=9,936$; $p<0,0001$). Koncentracija triglicerida u serumu dijabetičnih životinja je statistički značajno veća u grupi FIZ u odnosu na sve ostale grupe životinja (*tabela 21*).

U **tabeli 22** su prikazani rezultati koncentracije HDL holesterola u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 22. Koncentracija HDL holesterola (HDL (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	HDL (mmol/L)
FIZ	0,507±0,138 ^a
PYC	0,802±0,049
KB	1,053±0,112 ^b
MET	0,700±0,067
GLIK	0,802±0,056
PYC + MET	0,837±0,077
PYC + GLIK	0,782±0,104
KB + MET	1,195±0,150 ^b
KB + GLIK	1,200±0,060 ^b

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

^bp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa normoglikemičnih životinja (F=34,058; p<0,0001). Koncentracija HDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi FIZ u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija HDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupama KB, KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK (**tabela 22**).

U **tabeli 23** su prikazani rezultati koncentracije HDL holesterola u serumu dijabetičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 23. Koncentracija HDL holesterola (HDL (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	HDL (mmol/L)
FIZ	0,582±0,088 ^a
PYC	0,945±0,126 ^b
KB	1,142±0,153 ^c
MET	0,770±0,124
GLIK	0,700±0,141
PYC + MET	0,872±0,080
PYC + GLIK	0,712±0,116
KB + MET	1,060±0,072 ^{b,d}
KB + GLIK	1,123±0,083 ^c

^ap<0.05 u odnosu na PYC, KB, PYC+MET, KB+MET, KB+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na FIZ, GLIK, PYC+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na FIZ, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

^dp<0.05 u odnosu na MET

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji HDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja ($F=19,293$; $p<0,0001$). Koncentracija HDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi FIZ u odnosu na grupe PYC, KB, PYC + MET, KB + MET, KB + GLIK. Koncentracija HDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupama PYC i KB + MET u odnosu na grupe FIZ, GLIK, PYC + GLIK. Koncentracija HDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupama KB i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK. Koncentracija HDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi KB + MET u odnosu na grupu MET (*tabela 23*).

U *tabeli 24* su prikazani rezultati koncentracije LDL holesterola u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 24. Koncentracija LDL holesterola (LDL (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	LDL (mmol/L)
FIZ	0,762±0,051 ^a
PYC	0,692±0,039
KB	0,800±0,042 ^b
MET	0,643±0,061
GLIK	0,728±0,051
PYC + MET	0,652±0,030
PYC + GLIK	0,680±0,068
KB + MET	0,865±0,083 ^{b,c}
KB + GLIK	0,800±0,023 ^b

^ap<0.05 u odnosu na MET, PYC+MET, KB+MET

^bp<0.05 u odnosu na MET, PYC, PYC+MET, PYC+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na FIZ, GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa normoglikemičnih životinja ($F=12,453$; $p<0,0001$). Koncentracija LDL holesterola u serumu normoglikemičnih životinja je statistički značajno različita između grupe FIZ i grupa MET, PYC + MET, KB + MET. Koncentracija LDL holesterola u serumu normoglikemičnih životinja je statistički značajno veća u grupama KB, KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe MET, PYC, PYC + MET, PYC + GLIK. Koncentracija LDL holesterola u serumu normoglikemičnih životinja je statistički značajno veća u grupi KB + MET u odnosu na grupe FIZ, GLIK (*tabela 24*).

U *tabeli 25* su prikazani rezultati koncentracije LDL holesterola u serumu dijabetičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 25. Koncentracija LDL holesterola (LDL (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	LDL (mmol/L)
FIZ	0,952±0,024
PYC	1,005±0,074 ^a
KB	0,800±0,097 ^b
MET	0,957±0,090
GLIK	0,912±0,048
PYC + MET	0,950±0,064
PYC + GLIK	0,868±0,079
KB + MET	0,865±0,057
KB + GLIK	0,848±0,021

^ap<0.05 u odnosu na KB, PYC+GLIK, KB+MET, KB+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, PYC+MET

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji LDL holesterola u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja (F=5,764; p<0,0001). Koncentracija LDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno veća u grupi PYC u odnosu na grupe KB, PYC + GLIK, KB + MET, KB + GLIK. Koncentracija LDL holesterola u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi KB u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, PYC + MET (*tabela 25*).

5.2.4. Parametri funkcije jetre

U *tabeli 26* su prikazani rezultati koncentracije aspartat aminotransferaze u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi u jedinicama po litru (U/L).

Tabela 26. Koncentracija aspartat aminotransferaze (AST (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	AST (U/L)
FIZ	127,50±19,94 ^a
PYC	137,50±12,65 ^{a,b}
KB	119±4,203
MET	131,67±33,93 ^a
GLIK	104,50±13,78
PYC + MET	137,83±15,50 ^{a,b}
PYC + GLIK	113,00±5,86
KB + MET	81,00±6,03
KB + GLIK	73,67±7,89

^ap<0.05 u odnosu na GLIK, KB+MET, KB+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na KB, PYC+GLIK,

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji aspartat aminotransferaze u serumu između ispitivanih grupa normoglikemičnih životinja (F=79,327; p<0,0001). Koncentracija aspartat aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi FIZ, PYC, MET i PYC + MET u odnosu na grupe GLIK, KB + MET, KB + GLIK. Koncentracija aspartat aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi PYC, PYC + MET u odnosu na grupe KB, PYC + GLIK (*tabela 26*).

U *tabeli 27* su prikazani rezultati koncentracije aspartat aminotransferaze u serumu dijabetičnih životinja, izraženi u jedinicama po litru (U/L).

Tabela 27. Koncentracija aspartat aminotransferaze (AST (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	AST (U/L)
FIZ	139,00±26,56
PYC	137,17±24,47
KB	79,33±3,39 ^a
MET	134,33±29,52
GLIK	120,67±15,27
PYC + MET	109,67±16,28 ^b
PYC + GLIK	113,17±11,97
KB + MET	67,83±4,96 ^a
KB + GLIK	63,34±2,94 ^a

^ap<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji aspartat aminotransferaze u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja (F=61,087; p<0,0001). Koncentracija aspartat aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupama KB, KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK. Koncentracija aspartat aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno različita između grupe PYC + MET i grupa FIZ, PYC, MET (*tabela 27*).

U *tabeli 28* su prikazani rezultati koncentracije alanin aminotransferaze u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi u jedinicama po litru (U/L).

Tabela 28. Koncentracija alanin aminotransferaze (ALT (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	ALT (U/L)
FIZ	51,67±8,73 ^a
PYC	46,83±4,55 ^a
KB	41,50±3,11 ^a
MET	26,00±4,82
GLIK	24,33±4,18
PYC + MET	23,17±2,48
PYC + GLIK	19,00±1,09
KB + MET	19,17±0,75
KB + GLIK	16,83±0,98

^ap<0.05 u odnosu na MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK, KB+MET, KB+GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji alanin aminotransferaze u serumu između ispitivanih grupa normoglikemičnih životinja (F=52,707; p<0,0001). Koncentracija alanin aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupama FIZ, PYC, KB u odnosu na sve ostale grupe životinja (*tabela 28*).

U *tabeli 29* su prikazani rezultati koncentracije alanin aminotransferaze u serumu dijabetičnih životinja, izraženi u jedinicama po litru (U/L).

Tabela 29. Koncentracija alanin aminotransferaze (ALT (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	ALT (U/L)
FIZ	93,17±25,58 ^a
PYC	62,67±13,47
KB	96,67±67,76 ^a
MET	56,17±24,23
GLIK	46,50±15,40 ^b
PYC + MET	47,00±15,28 ^b
PYC + GLIK	80,00±13,37
KB + MET	74,17±23,11
KB + GLIK	82,67±17,96

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

^bp<0.05 u odnosu na PYC+GLIK, KB+MET i KB+GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji alanin aminotransferaze u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja ($F=17,633$; $p<0,0001$). Koncentracija alanin aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno veća u grupama FIZ i KB u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija alanin aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi GLIK i PYC + MET u odnosu na grupe PYC + GLIK, KB + MET i KB + GLIK (*tabela 29*).

U *tabeli 30* su prikazani rezultati koncentracije alkalne fosfataze u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi u jedinicama po litru (U/L).

Tabela 30. Koncentracija alkalne fosfataze (ALP (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	ALP (U/L)
FIZ	603,33±26,58 ^a
PYC	361,50±11,15 ^a
KB	127,83±11,39
MET	268,33±25,21 ^b
GLIK	247,33±19,04 ^b
PYC + MET	300,67±17,77 ^{b,c}
PYC + GLIK	119,83±13,09
KB + MET	125,83±16,33
KB + GLIK	122,50±12,34

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

^bp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, PYC+GLIK, KB, KB+MET, KB+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji alkalne fosfataze u serumu između ispitivanih grupa normoglikemičnih životinja (F=479,801; p<0,0001). Koncentracija alkalne fosfataze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno veća u grupama FIZ i PYC u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija alkalne fosfataze u serumu ispitivanih životinja se statistički značajno razlikuje između grupa MET, GLIK i PYC + MET i grupa FIZ, PYC, PYC + GLIK, KB, KB + MET, KB + GLIK. Koncentracija alkalne fosfataze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno veća u grupi PYC + MET u odnosu na grupu GLIK (*tabela 30*).

U *tabeli 31* su prikazani rezultati koncentracije alkalne fosfataze u serumu dijabetičnih životinja, izraženi u jedinicama po litru (U/L).

Tabela 31. Koncentracija alkalne fosfataze (ALP (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	ALP (U/L)
FIZ	1554,00±179,95
PYC	1255,83±234,13
KB	460,83±13,20 ^a
MET	1221,83±175,94
GLIK	1409,67±233,14
PYC + MET	579,17±182,88
PYC + GLIK	1653,67±619,37
KB + MET	355,17±17,87 ^a
KB + GLIK	373,00±18,44 ^a

^ap<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji alkalne fosfataze u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja ($F=37,298$; $p<0,0001$). Koncentracija alkalne fosfataze u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupama KB, KB + MET I KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK (*tabela 31*).

U *tabeli 32* su prikazani rezultati koncentracije direktnog bilirubina u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi kao mikromoli po litru ($\mu\text{mol/L}$).

Tabela 32. Koncentracija direktnog bilirubina (DB ($\mu\text{mol/L}$), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	DB ($\mu\text{mol/L}$)
FIZ	0,683 \pm 0,075 ^a
PYC	0,700 \pm 0,063 ^{a,b}
KB	0,100 \pm 0,000 ^d
MET	0,567 \pm 0,082 ^a
GLIK	0,400 \pm 0,089
PYC + MET	0,417 \pm 0,041
PYC + GLIK	0,350 \pm 0,138
KB + MET	0,100 \pm 0,000 ^c
KB + GLIK	0,100 \pm 0,000 ^c

^ap<0.05 u odnosu na GLIK, KB, PYC+MET, PYC+GLIK, KB+MET, KB+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na MET

^cp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji direktnog bilirubina u serumu između ispitivanih grupa normoglikemičnih životinja (F=70,065; p<0,0001). Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi FIZ, PYC i MET u odnosu na grupe GLIK, KB, PYC + MET, PYC + GLIK, KB + MET, KB + GLIK. Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi PYC u odnosu na grupu MET. Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupama KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK (*tabela 32*).

U *tabeli 33* su prikazani rezultati koncentracije direktnog bilirubina u serumu dijabetičnih životinja, izraženi kao mikromoli po litru ($\mu\text{mol/L}$).

Tabela 33. Koncentracija direktnog bilirubina (DB ($\mu\text{mol/L}$), $\bar{x} \pm \text{SD}$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	DB ($\mu\text{mol/L}$)
FIZ	0,683±0,098
PYC	0,550±0,122 ^a
KB	0,133±0,052 ^d
MET	0,583±0,075 ^b
GLIK	0,933±0,052 ^c
PYC + MET	0,733±0,082
PYC + GLIK	0,750±0,084
KB + MET	0,183±0,075 ^d
KB + GLIK	0,167±0,103 ^d

^ap<0.05 u odnosu na PYC+MET, PYC+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na PYC+GLIK

^cp<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

^dp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, KB, MET, GLIK, PYC+MET, PYC+GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji direktnog bilirubina u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja ($F=70,761$; $p<0,0001$). Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi PYC u odnosu na grupe PYC + MET i PYC + GLIK. Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi MET u odnosu na grupu PYC + GLIK. Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi GLIK u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupama KB, KB + MET i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, KB, MET, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK (*tabela 33*).

5.2.5. Parametri bubrežne funkcije

U *tabeli 34* su prikazani rezultati koncentracije uree u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 34. Koncentracija uree ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	Urea (mmol/L)
FIZ	6,733±0,287
PYC	5,933±0,480
KB	3,833±0,441 ^b
MET	5,167±0,480 ^a
GLIK	6,217±0,354
PYC + MET	5,983±0,387
PYC + GLIK	3,050±0,464 ^b
KB + MET	3,317±0,450 ^b
KB + GLIK	3,417±0,519 ^b

^ap<0.05 u odnosu na FIZ, GLIK

^bp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC + MET

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa normoglikemičnih životinja (F=64,291; p<0,0001). Koncentracija uree u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi MET u odnosu na grupe FIZ i GLIK. Koncentracija uree u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupama KB, KB + MET, KB + GLIK i PYC + MET u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK, PYC + MET (*tabela 34*).

U *tabeli 35* su prikazani rezultati koncentracije uree u serumu dijabetičnih životinja, izraženi kao milimoli po litru (mmol/L).

Tabela 35. Koncentracija uree ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	Urea (mmol/L)
FIZ	10,767±0,571 ^a
PYC	10,300±1,666
KB	8,300±2,139
MET	9,617±1,269
GLIK	9,383±1,853
PYC + MET	7,750±1,211
PYC + GLIK	8,817±1,248
KB + MET	8,017±1,275
KB + GLIK	3,517±1,546 ^b

^ap<0.05 u odnosu na PYC+MET, KB+GLIK

^bp<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji uree u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja (F=12,356; p<0,0001). Koncentracija uree u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi FIZ u odnosu na grupe PYC + MET i KB + GLIK. Koncentracija uree u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi KB + GLIK u odnosu na sve ostale grupe (*tabela 35*).

U *tabeli 36* su prikazani rezultati koncentracije kreatinina u serumu normoglikemičnih životinja, izraženi kao mikromoli po litru (μmol/L).

Tabela 36. Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih životinja.

Grupa	Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)
FIZ	47,17 \pm 3,31
PYC	44,33 \pm 4,41
KB	19,00 \pm 4,69 ^{a,b}
MET	35,33 \pm 4,55 ^b
GLIK	42,67 \pm 4,13
PYC + MET	46,50 \pm 5,17
PYC + GLIK	16,33 \pm 4,76 ^{a,b}
KB + MET	27,67 \pm 3,08 ^{b,c}
KB + GLIK	22,67 \pm 4,18 ^{a,b}

^ap<0.05 u odnosu na MET^bp<0.05 u odnosu na FIZ, PYC, GLIK, PYC+MET^cp<0.05 u odnosu na PYC+GLIK, KB

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja ($F=49,342$; $p<0,0001$). Koncentracija kreatinina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupama KB, PYC + GLIK i KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, PYC, MET, GLIK i PYC + MET. Koncentracija kreatinina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi MET u odnosu na grupe FIZ, PYC, GLIK, PYC + MET. Koncentracija kreatinina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno različita između grupe KB + MET i grupa FIZ, PYC, GLIK, PYC + MET, PYC + GLIK, KB (*tabela 36*).

U *tabeli 37* su prikazani rezultati koncentracije kreatinina u serumu dijabetičnih životinja, izraženi kao mikromoli po litru ($\mu\text{mol/L}$).

Tabela 37. Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm SD$) u serumu dijabetičnih životinja.

Grupa	Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)
FIZ	57,00 \pm 10,431
PYC	48,667 \pm 13,823
KB	36,833 \pm 4,535
MET	51,833 \pm 13,963
GLIK	48,667 \pm 12,941
PYC + MET	35,667 \pm 14,459
PYC + GLIK	50,833 \pm 9,559
KB + MET	32,00 \pm 6,723 ^a
KB + GLIK	27,833 \pm 12,813 ^b

^ap<0.05 u odnosu na FIZ^bp<0.05 u odnosu na FIZ, MET, PYC+GLIK

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji kreatinina u serumu između ispitivanih grupa dijabetičnih životinja ($F=4,764$; $p<0,0001$). Koncentracija kreatinina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi KB + MET u odnosu na grupu FIZ. Koncentracija kreatinina u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi KB + GLIK u odnosu na grupe FIZ, MET i PYC + GLIK (*tabela 37*).

5.3. *Ex vivo* ispitivanja antioksidativne aktivnosti

5.3.1. Uticaj na oksidativno oštećenje lipida

U *tabeli 38* su prikazani rezultati intenziteta lipidne peroksidacije u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao nanomoli malondialdehida po miligramu proteina (nmol MDA/mg proteina).

Tabela 38. Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx (nmol MDA/mg proteina), $\bar{x} \pm SD$) u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola (nmol MDA/mg proteina)	Paracetamol (nmol MDA/mg proteina)
FIZ	3,145±0,140 ^a	12,873±1,052
PYC 20	2,918±0,540 ^a	11,934±0,739
PYC 50	2,488±0,442 ^a	11,220±1,113 ^c
KB	1,855±0,111 ^a	5,498±0,814 ^b

^ap<0.05 u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom

^bp<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

^cp<0.05 u odnosu na FIZ grupu tretiranu paracetamolom

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji MDA u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=233,455; p<0,0001). Koncentracija MDA u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno različita u kontrolnim grupama FIZ, PYC 20, PYC 50 i KB u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom. Koncentracija MDA u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno različita u grupi KB tretiranoj paracetamolom u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija MDA u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi PYC 50 tretiranoj paracetamolom u odnosu na grupu FIZ tretiranu paracetamolom (*tabela 38*).

5.3.2. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite

U *tabeli 39* su prikazani rezultati aktivnosti ksantin oksidaze u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao nanomoli po miligramu proteina po minutu (nmol/mg proteina/min).

Tabela 39. Aktivnost ksantin oksidaze (XOD (nmol/mg proteina/min), $\bar{x} \pm SD$) u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola (nmol/mg proteina/min)	Paracetamol (nmol/mg proteina/min)
FIZ	1,982±0,101 ^a	3,840±0,710
PYC 20	1,902±0,255 ^a	3,248±0,306
PYC 50	1,835±0,387 ^a	2,984±0,450 ^b
KB	1,617±0,170 ^a	2,916±0,355 ^b

^ap<0.05 u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom

^bp<0.05 u odnosu na grupu FIZ tretiranu paracetamolom

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji enzima XOD u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=33,945; p<0,0001). Koncentracija XOD u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u kontrolnim grupama FIZ, PYC 20, PYC 50 i KB u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom. Koncentracija XOD u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi FIZ tretiranoj paracetamolom u odnosu na grupu PYC 50 i KB tretirane paracetamolom (**tabela 39**).

U **tabeli 40** su prikazani rezultati koncentracije redukovano glutationa u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao nanomoli po miligramu proteina (nmol/mg proteina).

Tabela 40. Koncentracija redukovanog glutationa (GSH (nmol/mg proteina), $\bar{x} \pm SD$) u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola (nmol/mg proteina)	Paracetamol (nmol/mg proteina)
FIZ	5,090±0,177 ^a	2,188±0,318
PYC 20	4,983±0,232 ^a	2,531±0,279
PYC 50	5,053±0,217 ^a	3,392±0,516 ^b
KB	4,555±0,316 ^a	1,816±0,242

^ap<0.05 u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom

^bp<0.05 u odnosu na grupe tretirane paracetamolom FIZ, KB

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSH u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=70,523; p<0,0001). Koncentracija GSH u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u kontrolnim grupama FIZ, PYC 20, PYC 50 i KB u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom. Koncentracija GSH u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi PYC 50 tretiranom paracetamolom u odnosu na grupe tretirane paracetamolom FIZ i KB (*tabela 40*).

U *tabeli 41* su prikazani rezultati aktivnosti gliutation peroksidaze u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao nanomoli po miligramu proteina po minutu (nmol/mg proteina/min).

Tabela 41. Aktivnost glutation peroksidaze (GSHPx (nmol/mg proteina/min), $\bar{x} \pm SD$) u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola (nmol/mg proteina/min)	Paracetamol (nmol/mg proteina/min)
FIZ	8,412±0,646 ^a	27,630±5,452 ^b
PYC 20	7,488±0,824	20,303±3,105 ^b
PYC 50	7,042±0,913	10,483±2,342 ^c
KB	9,115±0,155	17,140±1,001 ^b

^ap<0.05 u odnosu na kontrolnu grupu PYC 50

^bp<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

^cp<0.05 u odnosu na sve kontrolne grupe

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GSHPx u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=94,545; p<0,0001). Koncentracija GSHPx u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupama tretiranim paracetamolom FIZ, PYC 20 i KB u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija GSHPx u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u kontrolnoj grupi FIZ u odnosu na kontrolnu grupu PYC 50. Koncentracija GSHPx u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi PYC 50 tretiranoj paracetamolom u odnosu na sve kontrolne grupe (*tabela 41*).

U *tabeli 42* su prikazani rezultati aktivnosti glutation reduktaze u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao nanomoli po miligramu proteina po minutu (nmol/mg proteina/min).

Tabela 42. Aktivnost glutation reduktaze (GR (nmol/mg proteina/min), $\bar{x} \pm SD$) u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola (nmol/mg proteina/min)	Paracetamol (nmol/mg proteina/min)
FIZ	5,905±0,286 ^a	3,943±0,645
PYC 20	6,037±0,315 ^a	2,967±0,480 ^c
PYC 50	5,117±0,772 ^b	4,568±0,492 ^d
KB	6,720±0,344 ^a	3,024±0,125

^ap<0.05 u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom

^bp<0.05 u odnosu na kontrolnu grupu KB i grupe tretirane paracetamolom FIZ, PYC 20 i KB

^cp<0.05 u odnosu na grupe tretirane paracetamolom FIZ i PYC 50

^dp<0.05 u odnosu na grupe tretirane paracetamolom FIZ i KB

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji GR u serumu između ispitivanih grupa životinja ($F=30,086$; $p<0,0001$). Koncentracija GR u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u kontrolnim grupama FIZ, PYC 20 i KB u odnosu na sve grupe tretirane paracetamolom. Koncentracija GR u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno različita u kontrolnoj grupi PYC 50 u odnosu na kontrolnu grupu KB i grupe tretirane paracetamolom FIZ, PYC 20 i KB. Koncentracija GR u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi PYC 20 tretiranoj paracetamolom u odnosu na grupe FIZ i PYC 50 tretirane paracetamolom. Koncentracija GR u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupi PYC 50 tretiranoj paracetamolom u odnosu na grupe FIZ i KB tretirane paracetamolom (*tabela 42*).

U *tabeli 43* su prikazani rezultati aktivnosti katalaze u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao nanomoli po miligramu proteina po minutu (nmol/mg proteina/min).

Tabela 43. Aktivnost katalaze (CAT (nmol/mg proteina/min), $\bar{x} \pm SD$) u jetri normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola (nmol/mg proteina/min)	Paracetamol (nmol/mg proteina/min)
FIZ	10,707±0,921	6,456±1,237 ^c
PYC 20	10,925±1,203	6,242±0,451 ^c
PYC 50	11,970±1,877 ^a	9,870±1,445 ^d
KB	7,892±0,578 ^b	4,820±0,386 ^a

^ap<0.05 u odnosu na sve ostale grupe

^bp<0.05 u odnosu na kontrolne grupe FIZ, PYC 20 i grupu PYC 50 tretiranu paracetamolom

^cp<0.05 u odnosu na kontrolne grupe FIZ, PYC 20 i KB

^dp<0.05 u odnosu na kontrolne grupe FIZ i PYC 20

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji CAT u serumu između ispitivanih grupa životinja ($F=36,003$; $p<0,0001$). Koncentracija CAT u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u kontrolnoj grupi PYC 50 u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija CAT u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u KB grupi tretiranoj paracetamolom u odnosu na sve ostale grupe. Koncentracija CAT u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u KB kontrolnoj grupi u odnosu na kontrolne grupe FIZ, PYC 20 i grupu PYC 50 tretiranu paracetamolom. Koncentracija CAT u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u grupi FIZ i PYC 20 tretiranim paracetamolom u odnosu na grupu PYC 50 tretiranu paracetamolom i kontrolne grupe FIZ, PYC 20 i KB. Koncentracija CAT u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno niža u PYC 50 grupi tretiranoj paracetamolom u odnosu na kontrolne grupe FIZ i PYC 20 (*tabela 43*).

5.3.3. Uticaj na nivo enzima jetre

U *tabeli 44* su prikazani rezultati koncentracije aspartat aminotransferaze u serumu normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao jedinice po litru (U/L).

Tabela 44. Koncentracija aspartat aminotransferaze (AST (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamolom.

Grupa	Kontrola (U/L)	Paracetamol (U/L)
FIZ	127.50±19.94	133.83±7.14
PYC 20	140.17±16.36 ^a	138.33±14.90
PYC 50	137.50±12.65 ^a	130.50±16.38
KB	119±4,203	125±6,676

^ap<0.05 u odnosu na kontrolne grupe FIZ, KB i grupu KB tretiranu paracetamolom

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji AST u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=6,238; p<0,0001). Koncentracija AST u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u kontrolnim grupama PYC 20 i PYC 50 u odnosu na kontrolne grupe FIZ i KB, kao i u odnosu na grupu KB tretiranu paracetamolom. Koncentracija AST u serumu ispitivanih životinja je statistički značajno viša u grupama FIZ, PYC 20, PYC 50 tretiranim paracetamolom u odnosu na kontrolnu grupu KB (*tabela 44*).

U *tabeli 45* su prikazani rezultati koncentracije alanin aminotransferaze u serumu normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao jedinice po litru (U/L).

Tabela 45. Koncentracija alanin aminotransferaze (ALT (U/L), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola (U/L)	Paracetamol (U/L)
FIZ	51.67±8.73	51.00±6.57
PYC 20	42.83±8.73	52.83±7.11
PYC 50	46.67±4.55	54.67±4.50
KB	41,50±3,11	47,00±5,96

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ALT u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=2,176; p=0,059) (*tabela 45*).

U *tabeli 46* su prikazani rezultati koncentracije direktnog bilirubina u serumu normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola, izraženi kao mikromoli po litru ($\mu\text{mol/L}$).

Tabela 46. Koncentracija direktnog bilirubina (DB ($\mu\text{mol/L}$), $\bar{x} \pm SD$) u serumu normoglikemičnih i životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola.

Grupa	Kontrola ($\mu\text{mol/L}$)	Paracetamol ($\mu\text{mol/L}$)
FIZ	0.35±0.10	0.43±0.08
PYC 20	0.48±0.12	0.47±0.19
PYC 50	0.45±0.10	0.43±0.10
KB	0,43±0,15	0,42±0,09

Primenom jednofaktorske ANOVE utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji DB u serumu između ispitivanih grupa životinja (F=2,306; p=0,058) (*tabela 46*).

6. DISKUSIJA

6.1. Hemijski sastav piknogenola i ekstrakata kore crnog bora

Poslednjih decenija značajno je poraslo ineteresovanje za polifenolne sastojke različitih biljaka, uglavnom zbog mnogobrojnih bioloških aktivnosti koje se dovode u vezu sa polifenolima [94]. U zemljama Evrope i Sjedinjenim Američkim Državama postoje dijetetski suplementi koji u svom sastavu imaju kompleksne mešavine polifenola, a jedan od njih je i piknogenol (*Pycnogenol*[®]), standardizovani ekstrakt kore Francuskog primorskog bora (*Pinus pinaster* Aiton sin. *Pinus maritima*). U njegovom sastavu detektovano je nekoliko vrsta fenola (katehin, epikatehin i taksifolin), kondenzovani flavonoidi (proantocijanidini) i fenolne kiseline (kafena, ferulna i p-hidroksibenzojeva kiselina) i njihovi glikozidi. Ipak, $70 \pm 5\%$ piknogenola čine procijanidini, podgrupa proantocijanidina, koji se sastoje od kondenzovanih katehina i epikatehina [95]. Studije su pokazale da piknogenol ima mnogobrojne pozitivne efekte na zdravlje: antioksidativno, antiinflamatorno dejstvo i sposobnost da utiče na funkciju enzima. U kliničkim ispitivanjima pokazano je da piknogenol doprinosi glikoregulaciji i otklanjanju komplikacija kod obolelih od dijabetes melitusa tip 2 [37]. Najispitivanija vrsta bora u porodici *Pinaceae* je svakako Francuski primorski bor, međutim, i kod ostalih ispitivanih vrsta bora je pokazan značajan antioksidativni kapacitet [70]. U istraživanju Jerez i sar. ispitivan je fenolni sastav kore bora *Pinus radiata* HPLC metodom, gde su identifikovane slične komponente koje su sadržane i u piknogenolu, sa značajnim sadržajem katehina, jedne od komponenti sa izraženim antioksidativnim delovanjem [96]. Cretu i sar. su detektovali visok sadržaj fenolnih komponenti i posledično visok antioksidativni potencijal ekstrakata kore *Pinus brutia* [37]. U studiji Sharma-e i sar. kvalitativnom i kvantitativnom fitohemijskom analizom ekstrakata kore *Pinus roxburghii*,

Pinus wallichiana i *Pinus gerardiana* dokazano je prisustvo fenola, flavonoida, glikozida i drugih biohemijских supstanci koje su ispoljile značajno antioksidativno, antiinflamatorno i antimikrobno dejstvo [97]. Yesil-Celiktas i sar. su dokazali da ekstrakti kore *Pinus nigra* i *Pinus brutia* poseduju veći sadržaj fenolnih komponenti i antioksidativni potencijal u odnosu na ekstrakte kore *Pinus sylvestris* i *Pinus pinea*, dok je najveći sadržaj taksifolina, fenolne komponente koja ispoljava izraženo antioksidativno delovanje, imao ekstrakt *Pinus brutia* [19].

Cilj našeg ispitivanja je bio da utvrdimo hemijski sastav ekstrakata kore crnog bora (*Pinus nigra* Arnold), procenimo njihovu biološku aktivnost i uporedimo rezultate sa piknogenolom.

HPLC analizom metanolnih i etanolnih ekstrakata kore crnog bora sa Mokre gore i Tare, identifikovan je i kvantifikovan sledeći sastav: protokatehinska kiselina, katehin, kafena kiselina, siringična kiselina, epikatehin, p-kumarinska kiselina, taksifolin, ferulna kiselina i kempferol. Veći sadržaj identifikovanih komponenti su pokazali ekstrakti kore crnog bora poreklom sa Mokre gore u odnosu na ekstrakte kore crnog bora poreklom sa Tare, a poredeći sadržaj pojedinačnih komponenti taksifolin, epikatehin i katehin su pokazali najveći sadržaj. Dobijeni rezultati su komparabilni sa prethodno navedenim studijama koje su ispitivale ekstrakte kora različitih vrsta bora. Poređenjem sadržaja ispitivanih ekstrakata kore crnog bora sa piknogenolom, možemo zaključiti da su identifikovane supstance uporedive, ali se u piknogenolu u većim koncentracijama nalaze katehin i epikatehin, dok je u našim ekstraktima, iz grupe fenola, najviše zastupljen taksifolin. Rezultati našeg ispitivanja doprinose otkrivanju potencijalno korisnih sastojaka kore crnog bora (*Pinus nigra* Arnold) uopšte, a naročito ispitivanju crnog bora sa područja Republike Srbije (sa dva lokaliteta: Mokra gora i Tara), u čijoj kori do sada nije određivan kvantitativni sastav polifenola.

6.2. Sadržaj fenolnih jedinjenja u piknogenolu i ekstraktima kore crnog bora

Kao što je prethodno rečeno, fenolna jedinjenja su jedna od najznačajnijih grupa sekundarnih metabolita biljaka koja doprinose njihovom antioksidativnom potencijalu [98]. Antioksidativna aktivnost polifenola, fenolnih kiselina i flavonoida bazirana je na hemijskoj strukturi njihovih komponenti sastavljenih od jednog ili više aromatičnih prstenova koji imaju jednu ili više fenolnih grupa. Ove fenolne grupe imaju sposobnost da vežu slobodne radikale stvaranjem rezonantno stabilizovanih fenoksil-radikala [95]. U literaturi se navodi da sadržaj fenolnih komponenti varira u zavisnosti od biljne vrste, lokaliteta i uslova sredine rasta [98, 99, 100].

Rezultati našeg ispitivanja su pokazali značajnu varijaciju u sadržaju ukupnih fenola, flavonoida, tanina i proantocijanidina u ekstraktima piknogenola, kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i kore crnog bora poreklom sa Tare. Poredeći ekstrakte piknogenola sa ekstraktima kore crnog bora primećuje se značajno veći sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, tanina, poantocijanidina i sledstveno značajnija antioksidativna aktivnost ekstrakata piknogenola. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa studijama koje konzistentno potvrđuju da mešavina fenolnih jedinjenja iz kore Francuskog primorskog bora ima ogroman antioksidativni potencijal. Ovakvi rezultati se mogu delom objasniti posebnim klimatskim uslovima u kojima raste Francuski primorski bor, koji značajno utiču na karakteristike ove podvrste roda *Pinus*. Različiti naponi da se ista podvrsta bora kultiviše u drugim geografskim područjima, kao što su Iberijsko poluostrvo i Koreja, nisu uspeali, što govori u prilog ovoj teoriji. Poredeći ekstrakte piknogenola različitim rastvaračima, zaključujemo da je metanolni ekstrakt piknogenola pokazao najbolja

antioksidativna svojstva. Dobijeni rezultati su u skladu sa dostupnim literaturnim podacima [101, 102]. Ukoliko napravimo poređenje sadržaja ukupnih fenola, tanina, flavonoida i proantocijanidina između ekstrakata kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i Tare, najveći sadržaj ispitivanih sastojaka je pokazao etanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Metanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare, pokazao je drugi po redu najveći sadržaj ukupnih fenola i tanina, dok je acetonski ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Tare pokazao najniži sadržaj opisanih komponenti. Izbor rastvarača, njegova polarnost i stepen rastvorljivosti ispitivanih komponenata u rastvaraču značajno utiču na sadržaj fenolnih jedinjenja ekstrahovanih iz biljnog materijala. Alkoholni rastvarači se veoma često koriste za ekstrakciju prirodnih proizvoda i pokazuju vrlo dobre rezultate. Etanol se češće primenjuje u odnosu na metanol, s obzirom na njegovu potencijalnu upotrebu u ishrani [103]. Studije su pokazale da polarni rastvarači, kao što su metanol i etanol, bolje ekstrahuju fenolna jedinjenja iz biljnih materijala nego manje polarni rastvarači, kao što je aceton, što je u skladu sa našim rezultatima [98]. Moguće objašnjenje različitih rezultata između ekstrakata poreklom sa Mokre gore i Tare možemo potražiti u hipotezi o genetskoj varijabilnosti crnog bora [104]. Arbez i sar. su pre više decenija istakli visok stepen varijabilnosti u genotipu posmatranih podvrsta *Pinus nigra*, koji je uticao na biohemijsku varijabilnost ovih biljaka [100]. U istraživanju Alonso-Amelot-a i sar. dokazano je da drveće poreklom sa iste nadmorske visine ima različit sadržaj fenola u nadzemnim delovima [105]. S druge strane, Boscau i sar. su utvrdili da postoji pozitivna korelacija između stresa prouzrokovanog faktorima sredine i sadržaja fenolnih jedinjenja koja se nalaze u biljkama, što nam govori da fenolna jedinjenja mogu biti dobri markeri stresa u biljnim vrstama [99]. Na osnovu prethodno navedenog možemo pretpostaviti da je crni bor poreklom sa Mokre gore, čiji je ekstrakt kore pokazao veći sadržaj ispitivanih sastojaka u odnosu na ekstrakt

kore crnog bora poreklom sa Tare, bio više izložen stresnim faktorima sredine u odnosu na crni bor poreklom sa Tare.

Uzevši u obzir razlike u okolini, biljnom materijalu, metodama ekstrakcije i kvantifikacije, kao i nedostatak radova u kojima je ispitivan crni bor, teško je uporediti rezultate našeg istraživanja sa rezultatima dobijenim u drugim studijama. Ipak, pronašli smo studiju u kojoj su rezultati sadržaja ukupnih fenola (15.67 - 47.53 mg GAE/g SM) u ekstraktu iglica *Pinus nigra* Arnold, ispitivani metodom po *Folin–Ciocalteu*, komparabilni sa rezultatima ekstrakata kore *Pinus nigra* koje smo dobili u našem istraživanju [70]. Guri i sar. su istom metodom ispitivali sadržaj ukupnih fenola u svežim iglicama *Pinus nigra* i dobili rezultate u rangu od 1.7 do 1.8 mg GAE/100 g tkiva iglica, što je manje u poređenju sa rezultatima ekstrakata kore *Pinus nigra* koje smo prikazali u ovom istraživanju [106].

Drugi autori su ispitivali sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima drugih podvrsta roda *Pinus* koje su dobili različitim metodama ekstrakcije. U poređenju sa rezultatima ekstrakata kore *Pinus nigra* u našem ispitivanju, sadržaj ukupnih fenola je niži u ekstraktima kore i iglica *Pinus roxburghii* i *Pinus wallichiana* (394 - 1331 mg GAE/100 g SM) (107) i *Pinus sylvestris* (48.16 mg GAE/100 g SM) [108]. Yesil-Celiktas i sar. navode da ekstrakt kore *Pinus nigra* ima veći sadržaj fenolnih jedinjenja i posledično pokazuje jaču antioksidativnu aktivnost (87,2%) u poređenju sa ekstraktima *Pinus sylvestris* i *Pinus pinea* [19]. U istraživanju Aspe-a i Fernandez-a najveći sadržaj fenola određen je u ekstraktu kore *Pinus radiata* korišćenjem manje polarnog acetona kao rastvarača [66], što nije u skladu sa teorijom o polarnosti rastvarača kao ni sa rezultatima naše studije. Ipak, većina drugih autora je zaključila da je etanolno-vodeni rastvarač dao najbolji prinos ekstrakcije kore *Pinus radiata*, kao i da je isti ekstrakt pokazao značajan

antioksidativni kapacitet, što je u skladu sa rezultatima ekstrakata kore *Pinus nigra* u ovom istraživanju [109].

Poznato je da flavonoidi ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti kao i da su sastojci mnogih lekovitih biljaka. Kao što je već rečeno, na ukupan sadržaj fenola i flavonoida u biljkama može uticati više faktora: okolina, deo biljke koji se ispituje, metoda ekstrakcije, izbor rastvarača itd., što otežava poređenja između istraživanja [98]. U istraživanju Maimoona i sar. sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima kore i iglica *Pinus roxburghii* i *Pinus wallichiana* (76.9 - 943 mg QE/100 g SM) bio je viši nego rezultat koji smo dobili u ekstraktima kore *Pinus nigra*, što može biti objašnjeno ispitivanjem različite podvrste bora i upotrebom različitih rastvarača i metoda ekstrakcije [107]. Ekstrakt iglica *Pinus nigra* Arnold u studiji Fkiri-a i sar. pokazao je detektabilan sadržaj flavonoida (1.69 - 3.97 mg RE /g), što je slično sa rezultatima dobijenim u našoj studiji, uz napomenu da su za poređenje korišćeni različiti referentni standardi flavonoida [70].

Rezultati našeg ispitivanja dokazali su da ekstrakti kore *Pinus nigra* imaju veći sadržaj fenola i tanina u odnosu na sadržaj flavonoida i proantocijanidina, a da je etanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore pokazao najbolje rezultate. Neki autori sugerišu da kondenzovani i hidrolizovani tanini pokazuju veću efikasnost za uklanjanje slobodnih radikala u odnosu na fenole, koji su jedinjenja sa malom molekulskom težinom [110]. Zanimljivo je da su Aspe i Fernandez u ispitivanju ekstrakata kore drugih podvrsta roda *Pinus*, kao što su *Pinus pinaster*, *Pinus massoniana* i *Pinus radiata*, odredili veći sadržaj proantocijanidina u odnosu na druga fenolna jedinjenja [66], što može biti objašnjeno različitostima u podvrsti biljke, uslovima rasta i metodama ekstrakcije. Ipak neki autori su vanilinskom metodom ispitivali ekstrakt kore

Pinus pinaster i dobili vrednosti kondenzovanih tanina koji su uporedivi sa našim rezultatima ispitivanja ekstrakata kore crnog bora [46].

6.3. Antioksidativni potencijal piknogenola i ekstrakata kore crnog bora *in vitro*

Slobodni radikali se svakodnevno proizvode u živim organizmima. Živi organizmi poseduju mehanizme kojima neutrališu slobodne radikale i na taj način sprečavaju njihovo štetno dejstvo. Međutim, kada se naruši ova ravnoteža, može doći do različitih patoloških stanja. Hronične nezarazne bolesti poput dijabetes melitusa i njegovih komplikacija, karcinoma, ateroskleroze, reumatoidnog artritisa, autoimune bolesti, itd. se povezuju sa prevelikom produkcijom slobodnih radikala koji izazivaju oksidativno oštećenje tkiva i biomolekula: lipida, proteina, i DNK, kao i disbalansom između reaktivnih kiseoničnih vrsta i antioksidativnog sistema odbrane [97]. Reaktivne kiseonične vrste kao što su hidrosil radikal, superoksid anjon radikal i vodonik peroksid mogu biti zaustavljeni endogenim antioksidativnim sistemom i/ili egzogenim antioksidantima [15]. Kao što je već rečeno, veliki broj lekovitih biljaka se danas ispituje u cilju pronalaska one koja najefikasnije može da neutrališe reaktivne kiseonične vrste. Određivanje sadržaja ukupnih fenola, tanina, proantocijanidina i flavonoida može biti od koristi prilikom ispitivanja antioksidativne aktivnosti, ali sa druge strane njihova rastvorljivost varira u različitim rastvaračima, te ispitivanja njihove koncentracije mogu dati lažan rezultat. Zbog toga, procena antioksidativnog potencijala zahteva implementaciju više različitih metoda koje testiraju kapacitet “hvatanja” sintetskih radikala. U ovoj studiji korišćeno je pet metoda kako bi se ispitao antioksidativni potencijal piknogenola i ekstrakata kore crnog bora *in vitro*: DPPH, ABTS, FRAP, SOD metoda i određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala metodom sa

fosfomolibdenom. Zbog poteškoća u merenju pojedinačnih antioksidativnih komponenti kompleksne smeše, kao što je naš biljni materijal, u nekim merenjima kao referentnu vrednost smo koristili Trolox ekvivalent. Trolox je analog vitamina E koji je rastvorljiv u vodi, a koristi se kao standardni antioksidant u istraživanjima. Poredeći ekstrakte piknogenola sa ekstraktima kore crnog bora sa Mokre gore i Tare primećuje se statistički značajno veći antioksidativni potencijal ekstrakata piknogenola u DPPH, FRAP, ABTS testovima i pri određivanju ukupne antioksidativne aktivnosti pomoću fosfomolibdena. Ukoliko posmatramo pojedinačno grupu ekstrakata kore crnog bora, najbolji rezultat u svim testovima je pokazao etanolni ekstrakt kore crnog bora poreklom sa Mokre gore. Kao što je već predloženo, jedno od objašnjenja različitih rezultata antioksidativne aktivnosti ekstrakata kore crnog bora poreklom sa Mokre gore i poreklom sa Tare, može biti varijabilnost u genotipu posmatranih vrsta *Pinus nigra* koji je uticao na biohemijsku varijabilnost ovih biljaka [100] ili razlika u starosti uzorkovanih stabala.

Budući da su fenolna jedinjenja u velikoj meri odgovorna za antioksidativni potencijal biljnih ekstrakata, u najvećem broju slučajeva sadržaj fenola korelira sa antioksidativnom aktivnosti. U našem istraživanju je to takođe potvrđeno određivanjem visokog koeficijenta korelacije između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakata kore crnog bora. Literaturni podaci govore da antioksidativna aktivnost ekstrakata kore bora u značajnoj meri zavisi od sadržaja proantocijanidina u ekstraktima [39, 111]. Rezultati naše studije takođe podržavaju ove literaturne podatke: određeni koeficijent korelacije između proantocijanidina i ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata kore crnog bora je 0.902. Međutim, još veći koeficijent korelacije određen je između sadržaja ukupnih tanina i ukupne antioksidativne aktivnosti u ekstraktima kore crnog bora. Ovi rezultati ukazuju na to da su tanini i fenoli važna fenolna jedinjenja koja doprinose antioksidativnom kapacitetu ekstrakata kore crnog bora.

Najveći koeficijent korelacije u ekstraktima kore crnog bora je utvrđen između TTC i FRAP, TTC i ABTS, TTC i DPPH redom i između TPC i FRAP, TPC i ABTS, TPC i DPPH redom. Ovi rezultati su komparabilni sa rezultatima Kim-a i sar. gde je koeficijent korelacije između sadržaja ukupnih fenola i ABST testa u ekstraktima kora nekoliko podvrsta roda *Pinus* bio 0.989 [39]. Pojedini autori prijavljuju da su FRAP testom odredili više vrednosti antioksidativne aktivnosti u ekstraktima biljaka nego one koje su odredili DPPH testom [112], što je u saglasnosti i sa našim rezultatima u ekstraktima piknogenola i kore crnog bora. Moguće objašnjenje za niže vrednosti antioksidativne aktivnosti ekstrakata koje su određene DPPH testom može biti prisustvo komponenti u ekstraktima koje ne reaguju sa DPPH. Antioksidativna jedinjenja kao što su polifenoli mogu biti efikasniji u redukciji jona gvožđa, ali pokazuju manju efikasnost za vezivanje sa DPPH usled sternog ometanja [112].

6.4. Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na telesnu masu

pacova

Aloksan je derivat ureje koji je, pored streptozotocina, jedan od najčešće korišćenih dijabetogenih agenasa u studijama za procenu antidijabetesnog potencijala biljnih ekstrakata [113]. Kod životinja tretiranih aloksanom dolazi je do oštećenja ćelija pankreasa, te se izaziva aloksanski dijabetes melitus i posledično smanjen nivo insulina. Pošto je insulin, koji je zadužen da transportuje glukozu do ćelija u nedostatku, organizam koristi druge izvore energije i povećava katabolizam proteina i masti [114].

Kod normoglikemičnih životinja, u svim ispitivanim grupama došlo je do statistički značajnog porasta telesne mase nakon 7-dnevnog tretmana u odnosu na telesnu masu na početku tretmana. Porast telesne mase može biti objašnjen time da su životinje koje smo koristili u

eksperimentu tek dostigle polnu zrelost i da su u uzrastu kada se još uvek razvijaju i rastu. Primenom aloksana, došlo je do smanjenja koncentracije insulina i njegovih anaboličkih efekata što je dovelo do redukcije porasta telesne mase dijabetičnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu životinja tokom 7-dnevnog tretmana, što je u skladu sa rezultatima sličnih studija [18, 115]. U uslovima deficita insulina, u organizmu prevladavaju katabolički procesi, pojačavaju se glikogenoliza i lipoliza, a usled viška slobodnih masnih kiselina i amino kiselina, u jetri se potencira glukoneogeneza. Sve ovo dovodi do gubitka mišića i tkivnih proteina, kao i do gubitka telesne mase [116, 117].

Upotreba piknogenola kod dijabetičnih životinja nije dovela do statistički značajne promene telesne mase u odnosu na dijabetičnu grupu životinja koja je primala fiziološki rastvor, što je u korelaciji sa sličnom studijom [118]. Zanimljivo je da je ekstrakt kore bora značajno smanjio rast telesne mase dijabetičnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu životinja tokom 7-dnevnog tretmana.

Primenom gliklazida kod dijabetičnih životinja došlo je do statistički značajnog povećanja telesne mase u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koje su primale fiziološki rastvor. Gliklazid je oralni hipoglikemik koji spada u grupu derivata sulfonilureje druge generacije i koristi se u terapiji pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2. Ispoljava svoje dejstvo stimulišući β -ćelije pankreasa da oslobađaju insulin, a takođe povećava upotrebu periferne glukoze i smanjuje hepatičnu glukoneogenezu. Upotreba gliklazida je povezana sa povećanjem telesne mase [119], što je u skladu sa rezultatima naše studije.

Metformin je jedan od najčešće korišćenih lekova u kontroli hiperglikemije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i spada u grupu bigvanidina. Njegovo dejstvo se zasniva

na smanjenju intestinalne apsorpcije ugljenih hidrata i slično, kao gliklazid, povećava preuzimanje periferne glukoze u ćelije ciljnih tkiva i smanjuje hepatičnu glukoneogenezu. Literaturni podaci pokazuju da metformin ne dovodi do povećanja telesne mase i da može smanjiti količinu masnog tkiva u telu [115]. Opisani efekti metformina objašnjavaju i naše rezultate gde primena metformina kod dijabetičnih životinja nije dovela do statistički značajne promene telesne mase u odnosu na dijabetičnu grupu životinja koja je primala fiziološki rastvor.

Istovremena upotrebe ekstrakta kore bora i metformina je značajno smanjila porast telesne mase dijabetičnih životinja u odnosu na grupu koja je primala ekstrakt kore bora, što ukazuje na sinergistički efekat kore bora i pomenutog leka u odnosu na sprečavanje porasta telesne mase tipičnog za dijabetes melitus tip 2. Sa druge strane istovremena upotreba ekstrakta kore bora i gliklazida je povećala rast telesne mase dijabetičnih životinja u odnosu na grupu koja je primala ekstrakt kore bora. Nedovoljan broj studija postoji na temu interakcija lekova i biljnih preparata. Istovremena upotreba lekova i biljnih preparata može predstavljati rizik za nepoznate neželjene događaje, dok sa druge strane može imati pozitivan terapijski efekat. Gupta i sar., su u njihovoj studiji objedinili literaturne podatke o interakciji lekovitog bilja i antidijabetika. Na osnovu prikupljenih podataka zaključili su da biljni preparati u kombinaciji sa antidijabeticima mogu promeniti njihove farmakokinetičke i farmakodinamičke osobine. Ove interakcije su složene i nepredvidive, jer varijacije u hemijskom sastavu biljnih preparata i različiti mehanizmi delovanja lekova utiču na prirodu interakcija. Ipak, moguće je da istovremena upotreba antidijabetika i lekovitih biljaka ima više pozitivnih kliničkih implikacija, kao što je potencijalno smanjenje terapijske doze antidijabetika [120]. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da ekstrakt kore bora sinergistički deluje sa metforminom i gliklazidom i potencira njihov uticaj na telesnu masu dijabetičnih životinja.

6.5. Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na vrednost glukoze u krvi

Dijabetes melitus je metabolički poremećaj koji karakteriše hronična hiperglikemija nastala kao rezultat nedostatka u sekreciji i/ili dejstva insulina. Ovo stanje prate mnogobrojne dijabetesne komplikacije koje nastaju uglavnom zbog visokih nivoa glukoze u krvi. Supstance koje imaju antioksidativne osobine ili sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, mogu inhibisati reakcije oksidacije povezane sa proteinskom glikolizacijom, koja predstavlja ključni momenat u razvoju dijabetesne neuropatije i mikrovaskularnih komplikacija prisutnih kod dijabetesa [13]. Piknogenol kao supstanca sa izraženim antioksidantnim delovanjem ispoljava antidijabetesno delovanje koje je potvrđeno studijama na ljudima i na životinjama [18].

Literaturni podaci govore da piknogenol snižava povišeni nivo glukoze u krvi kod pacova kod kojih je dijabetes melitus izazvan streptozotocinom [14, 18, 121]. Liu i sar. su pokazali da piknogenol u dozi od 100 mg/dan primenjivan zajedno sa standardnim antidijabeticima snižava nivo preprandijalne glikemije kao i nivo HbA_{1c} kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 [122]. Druga studija u kojoj je piknogenol bio primenjivan u različitim dozama (50, 100, 200 i 300 mg/dan) tokom 12 nedelja kod pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 pokazala je dozno-zavisno statistički značajno sniženje postprandijalne glikemije i glikemije natašte sve do doze od 200 mg/dan. Doza od 300 mg/dan nije pokazala značajnije efekte u poređenju sa dozom od 200 mg/dan [123]. Jankyova i sar. su potvrdili dozno-zavisni efekat piknogenola (10, 20 i 50 mg/dan) na sniženje preprandijalnog nivoa glukoze kod dijabetičnih životinja [18]. Pokazano je da piknogenol ima sposobnost da se vezuje za proteinske komponente ćelija [11], te mogući mehanizam hipoglikemijskog delovanja piknogenola kod dijabetičnih pacova može biti

povećanje aktivnosti heksokinaze, čijom aktivnošću se potencira transport glikoze u ćelije, kao što je potvrđeno u studijama gde su ispitivane druge lekovite biljke [18]. Drugi mogući mehanizam delovanja piknogenola koji dovodi do efekata snižavanja glukoze je vezan za prisustvo oligomera procijanidina, monomera epikatehina i katehina u njegovom sastavu. Ova jedinjenja deluju različitim mehanizmima: procijanidin inhibira aktivnost alfa-glukozidaze [124], epikatehin indukuje regeneraciju ćelija pankreasa [125], katehin inhibiše apsorpciju glukoze u crevima [126], taksifolin inhibira aktivnost azotnog oksida [127]. Takođe, jedan od mogućih mehanizama delovanja piknogenola može biti inhibicija ekspresije azot-monoksid sintaze što dovodi do stimulacije β -ćelija pankreasa da luče insulin. Na ovaj način se sprečava smanjenje glikogenolize u jetri zbog stimulacije oslobađanja insulina iz ćelija. Parveen i sar. takođe navode da povećana proizvodnja insulina, do koje dovodi tretman piknogenolom, može biti odgovorna za promenu sadržaja glikogena u jetri. Za piknogenol je potvrđeno da stimuliše GLUT4 ekspresiju regulacijom kinaza koje indukuju insulinsku rezistenciju utičući na ekspresiju GLUT4 i insulinsku signalizaciju. Konačno, piknogenol podstiče preuzimanje glukoze u ćelijama osetljivim na insulin efektom kojim imitira efekte insulina, što može pomoći u objašnjenju antihiperглиkemijskog dejstva piknogenola *in vivo* [13].

U ovom istraživanju tretman normoglikemičnih pacova piknogenolom nakon 7 dana je uspeo da značajno snizi glikemiju u odnosu na normoglikemičnu grupu životinja koja je primala fiziološki rastvor. Ovo potvrđuje i značajna promena glikemije u krvi pacova koji su primali piknogenol u odnosu na one životinje koje su primale fiziološki rastvor. Upotreba metformina je takođe nakon 7 dana uspeła da značajno snizi vrednost glukoze u krvi normoglikemičnih pacova u poređenju sa grupom životinja koja je primala fiziološki rastvor, što je u skladu sa njegovim farmakološkim dejstvom. Sinergističkim dejstvom piknogenol i metformin doveli su do još

značajnijeg antihyperglikemijskog efekta u poređenju sa grupom normoglikemičnih životinja koja je primala fiziološki rastvor. Zanimljivo je da je primena ekstrakta kore crnog bora snizila vrednost glukoze u krvi normoglikemičnih pacova u poređenju sa grupom životinja koja je primala fiziološki rastvor, ali bez statističke značajnosti, dok je istovremena upotreba ekstrakta kore crnog bora i gliklazida pokazala značajno sniženje glukoze u krvi normoglikemičnih pacova.

Izazivanje dijabetes melitusa kod pacova davanjem aloksana potvrđeno je određivanjem visokih statistički značajnih vrednosti glukoze u krvi pacova u odnosu na vrednosti glukoze u krvi ovih životinja pre davanja aloksana. Nakon 7-dnevne primene metformina, gliklazida i pknogenola, došlo je do sniženja glikemije u krvi dijabetičnih životinja, ali bez statističke značajnosti u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koje su primale fiziološki rastvor. Pretpostavlja se da bi se pri dužoj primeni ovih supstanci postigla statistička značajnost sniženja vrednosti glukoze u krvi kod dijabetičnih životinja. Zanimljivo da je upotreba ekstrakta kore crnog bora nakon 7 dana statistički značajno snizila vrednost glukoze u krvi dijabetičnih životinja u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koje su primale fiziološki rastvor, a istovremena primena ekstrakta kore crnog bora sa metforminom i gliklazidom potencirala je njihovo antidijabetesno delovanje, što govori u prilog sinergističkog delovanja biljnih ekstrakata i standardnih antidijabetika.

Rezultati OGT testa pokazuju da je u grupi životinja koje su primale pknogenol dokazana statistički značajno niža vrednost glikemije nakon testa opterećenja glukozom u odnosu na grupu životinja koja je primala fiziološki rastvor. Ekstrakt kore crnog bora je takođe sprečio porast glikemije nakon testa oralnog opterećenja glukozom u odnosu na kontrolnu grupu i uporediv je sa rezultatom grupe životinja koje su primale metformin. Istovremena upotreba

piknogenola/ekstrakta kore crnog bora značajno je potencirala sprečavanje porasta glikemije izazvano metforminom i gliklazidom tokom OGT testa.

6.6. Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na lipidni status

Dislipidemija predstavlja najčešću i potencijalno najopasniju komplikaciju dijabetesa [13]. Devaraj i sar. su objavili rezultate *in vivo* studije u kojoj je ispitivan uticaj piknogenola na lipidni status zdravih ljudi. Piknogenol je primenjivan kod zdravih dobrovoljaca u dozi od 150 mg/dan tokom 6 nedelja. Rezultati su pokazali značajnu redukciju LDL holesterola (7%) i značajno povećanje HDL holesterola (10,4%) u poređenju sa početnim merenjem, što ukazuje na povoljan efekat piknogenola na lipidni profil. Značajne promene nivoa ukupnog holesterola i triglicerida nisu zabeležene. Pretpostavlja se da piknogenol može redukovati LDL holesterol povećanjem LDL receptora u jetri i/ili poboljšanjem ekskrecije sterola, dok se potencijalni uticaj piknogenola na povećanje HDL holesterola dovodi u vezu sa inhibicijom CETP (proteina koji vrše transfer holesterola) aktivnosti [16]. Možemo pretpostaviti da je ovaj rezultat velikim delom posledica antioksidativne aktivnosti piknogenola. U još jednom objavljenom istraživanju piknogenola u tretmanu venske insuficijencije rutinski su proveravani krvni parametri. Prijavljeno je značajno sniženje vrednosti LDL holesterola, dok je vrednost HDL holesterola ostala nepromenjena u grupi osoba koje su primale piknogenol [128].

U našoj studiji piknogenol je nakon 7 dana povećao nivo ukupnog holesterola kod normoglikemičnih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom, ali bez statističke značajnosti. Takođe, porast ukupnog holesterola je prisutan u svim eksperimentalnim grupama, a statistički značajno povećanje je prisutno u grupama tretiranim ekstraktom kore crnog bora i kombinacijom ekstrakta sa metforminom i gliklazidom. U grupi dijabetičnih životinja nije utvrđena statistički

značajna razlika vrednosti ukupnog holesterola između kontrolne i eksperimentalnih grupa životinja. Iako povećane vrednosti ukupnog holesterola normoglikemičnih životinja nisu u korelaciji sa rezultatima prethodno opisane studije Devaraj-a i sar. na ljudima, dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da su vrednosti protektivnog HDL holesterola povećane kod svih eksperimentalnih grupa, što je za posledicu imalo i povećanje vrednosti ukupnog holesterola. Ukoliko posmatramo uticaj ispitivanih supstanci na nivo ukupnih triglicerida u serumu eksperimentalnih životinja, kod normoglikemičnih pacova vidi se statistički značajno sniženje nivoa triglicerida u grupama koje su primale piknogenol (36%), ekstrakt kore crnog bora (29%), metformin (44%) i gliklazid (36%) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Ovi rezultati mogu biti uporedivi sa studijom Mei-a i sar. koja su pokazali značajno sniženje serumskih triglicerida kod pacova koji su tokom 5 nedelja primali piknogenol. Pretpostavlja se da sniženje serumskih triglicerida nastaje zbog svojstva piknogenola da redukuje apsorpciju lipida [129]. Istovremena primena kombinacija ovih supstanci nije uspela dodatno da snizi vrednosti triglicerida. Značajno sniženje serumskih triglicerida kod dijabetičnih životinja dala je primena piknogenola (178%), ekstrakta kore crnog bora (293%), gliklazid (176%) i metformina (115%) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

U istraživanju Belcaro-a i sar. koji su ispitivali uticaj suplementacije 150 mg/dan piknogenola kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, nakon 6 meseci je uočeno sniženje nivoa serumskih triglicerida i povećanje HDL holesterola, što implicira na značajnu ulogu piknogenola u poboljšanju faktora rizika kod pacijenata sa metaboličkim sindromom [14].

Ukoliko posmatramo uticaj ispitivanih supstanci na nivo HDL i LDL holesterola u serumu normoglikemičnih životinja primenom piknogenola značajno je povišen nivo HDL holesterola (58%) i snižen nivo LDL holesterola (10%) u odnosu na kontrolnu grupu, što je u

korelaciji sa rezultatima istraživanja Deveraj-a i sar. Primena ekstrakta kore crnog bora uspela je statistički značajno da poveća nivo HDL holesterola (107%) u odnosu na kontrolnu grupu, ali nije značajnije uticala na nivo LDL holesterola kod normoglikemičnih životinja. Primenom metformina u serumu normoglikemičnih životinja značajno je povišen nivo HDL holesterola (38%) i značajno snižen nivo LDL holesterola (18%) u odnosu na kontrolnu grupu, dok je primena gliklazida značajno uticala na povišenje nivoa HDL holesterola (58%). Ukoliko posmatramo uticaj ispitivanih supstanci na nivo HDL i LDL holesterola u serumu dijabetičnih životinja primenom piknogenola značajno je povišen nivo HDL holesterola (62%) u odnosu na kontrolnu grupu. Primena ekstrakta kore crnog bora uspela je statistički značajno da poveća nivo HDL holesterola (96%) i značajno snizi nivo LDL holesterola (19%) kod dijabetičnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, primenom metformina (32%) i primenom gliklazida (20%) u serumu dijabetičnih životinja značajno je povišen nivo HDL holesterola u odnosu na kontrolnu grupu. Nekoliko kliničkih studija potvrdilo je korisne promene indeksa ateroskleroze nakon unosa flavonoida i antioksidanata iz hrane. Fuhrman i sar. su ukazali da je suplementacija bogata flavonoidima povezana sa redukcijom LDL holesterola kod osoba sa hiperholesterolemijom i inhibicijom biosinteze holesterola [16].

6.7. Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na parametre jetre

Jetra je organ primarno odgovoran za održavanje homeostaze glukoze u krvi. Ona vrši tu funkciju sposobnošću da apsorbuje, da skladišti glukozu u obliku glikogena, a zatim da produkuje glukozu iz tog istog glikogena ili iz prekursora glukoneogeneze [15]. Prema tome, interesantno je ispivati uticaj ekstrakata lekovitih biljaka ili njihovih pojedinačnih komponenata na tkivo jetre, organa koji je odgovoran za regulaciju metabolizma glukoze. Testovi funkcije jetre se obično

koriste u kliničkoj praksi za otkrivanje bolesti jetre, praćenje progresije postojeće bolesti i praćenje efekata potencijalno hepatotoksičnih supstanci. Najčešći testovi funkcije jetre koji se koriste su određivanje serumskih vrednosti AST, ALT, ALP, bilirubina, albumina i protrombinskog vremena. Aminotransferaze, kao što su AST i ALT, mere koncentraciju intracelularnih hepatičnih enzima koji su se izlili u cirkulaciju i služe kao marker oštećenja hepatocita. ALP i bilirubin predstavljaju markere bilijarne funkcije i holestaze. Albumin i protrombin reflektuju ulogu jetre u procesima sinteze proteina. Veruje se da insulin suprimira transkripciju glukoneogeneznog enzima ALT, a da porast nivoa ovog enzima može ukazati na oštećenje u insulinskoj signalizaciji [130].

Mei i sar. su dokazali da kod pacova sa nealkoholnim steatohepatitisom (NASH) primena piknogenola 10 mg/dan nakon 5 nedelja značajno popravlja vrednost ALT u poređenju sa grupom pacova sa NASH koji nisu primali piknogenol. U zaključku iste studije autori navode da iako piknogenol nije uspeo da vrati vrednosti ALT na nivo vrednosti kontrolne grupe, on jeste potentan antioksidant koji može prevenirati progresiju NASH [129]. U studiji Devaraj-a i sar. kod grupe zdravih ispitanika koji su primali 150 mg/dan piknogenola tokom 6 nedelja nije pokazana značajna promena serumskih vrednosti enzima pokazatelja funkcije jetre AST i ALT [16].

U našem ispitivanju, u kontrolnoj grupi dijabetičnih životinja zabeleženo je povećanje aktivnosti serumskih aminotransferaza u odnosu na normoglikemične životinje tretirane fiziološkim rastvorom. Iako se u uslovima aloksanom indukovano dijabetes melitusa postiže selektivno oštećenje β -ćelija endokrinog pankreasa, ne može se isključiti uticaj oksidativnog stresa na jetru i poremećaj aktivnosti transaminaza, prisutan u ovom ispitivanju.

Antidijabetici su uglavnom pokazali da sa većim smanjenjem nivoa glukoze u krvi snižavaju i alanin aminotransferazu [130], što je u skladu sa rezultatima naše studije. Primenom

metformina i gliklazida statistički značajno snižena je vrednost ALT kod dijabetičnih i kod normoglikemičnih pacova u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je zajednička primena sa pknogenolom ili ekstraktom kore crnog bora dodatno snizila vrednosti ALT u grupi normoglikemičnih pacova. Zajednička primena ekstrakta kore crnog bora i standardnih antidijabetika značajno je snizila vrednosti AST, ALP i direktni bilirubin u grupi dijabetičnih i normoglikemičnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Ovim rezultatom se ukazuje na potencijalno hepatoprotektivno delovanje ekstrakta kore crnog bora i pknogenola.

6.8. Uticaj pknogenola i ekstrakta kore crnog bora na bubrežne parametre

Već je rečeno da kod dijabetes melitusa hiperglikemija dovodi do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta kroz autooksidaciju glukoze i neenzimsku glikozilaciju. Smanjenje aktivnosti antioksidativnog odbrambenog mehanizma povećava osetljivost osoba sa dijabetes melitusom na oksidativna oštećenja. Oštećenje bubrega kao jedna od dugoročnih komplikacija dijabetesa takođe je vezana za povećani oksidativni stres [117, 131]. Dijabetes melitus dovodi do renalne hipertrofije koja je povezana sa povećanom stopom glomerularne filtracije. Dalje dolazi do povećanja intraglomerularnog pritiska koji doprinosi hipertrofiji mezangijalnih ćelija i povećanoj sekreciji materija iz mezangijalnog ekstracelularnog matriksa [117]. *In vivo* studije su pokazale protektivni efekat pknogenola na ishemijom/reperfuzijom izazvano bubrežno oštećenje. Objavljeni rezultati ukazuju da ishemija/reperfuzija uzrokuje značajno sniženje nivoa GSH u tkivu i značajno povećanje bubrežne MDA aktivnosti. U istoj studiji primenom pknogenola popravljeni su poremećeni biohemijski parametri kao što su vrednosti serumskog kreatinina i uree, LDL nivoi, kao i histopatološke promene koje su bile izazvane ishemijom ili reperfuzijom

[95]. U studiji Lee-a i sar. tretman pknogenolom je snizio vrednosti serumskog kreatinina i uree kod pacova sa akutnim oštećenjem bubrega izazvanim cisplatinom. Rezultati ove studije ukazuju da pknogenol ima citoprotektivni efekat na oksidativni stres izazvan cisplatinom u bubrezima pacova, što se može pripisati povećanju aktivnosti antioksidativnih enzima i inhibiciji lipidne peroksidacije [132]. U studiji Devaraj-a i sar. kod grupe zdravih ispitanika koji su primali 150 mg/dan pknogenola tokom 6 nedelja nije pokazana značajna promena u vrednosti kreatinina u uzorku krvi [16]. U našem ispitivanju dijabetična grupa životinja je imala značajan porast vrednosti serumske ureje u odnosu na kontrolnu grupu normoglikemičnih životinja. Primena pknogenola je snizila vrednost serumske ureje i kreatinina ali bez statističke značajnosti, dok je zajednička primena sa standardnim antidijabeticima značajno snizila vrednosti ureje u krvi dijabetičnih i normoglikemičnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati su u delimičnoj korelaciji sa prethodno navedenim studijama.

Primena ekstrakta kore crnog bora i kombinacija ekstrakta kore crnog bora sa standardnim antidijabeticima je značajno snizila vrednosti ureje i kreatinina u krvi dijabetičnih i normoglikemičnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Na osnovu svega navedenog proizilazi da lekovito bilje, stupanjem pre svega u metaboličke i farmakodinamske interakcije sa klasičnim lekovima, može značajno menjati njihove farmakološke osobine, ali i bezbednost primene u humanoj populaciji.

6.9. Uticaj piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na parametre oksidativnog stresa indukovane paracetamolom i hepatoprotektivno delovanje

Dobro je poznato da je piknogenol potentan antioksidant, što je potvrđeno u nekoliko *in vitro* i *in vivo* studija. Studije su pokazale da piknogenol može da ukloni hidroksil radikale i superoksid anjone [133], produži životni vek i pojača antioksidativnu funkciju askorbat radikala (vitamina C) [134], kao i da može da poveća aktivnost drugih unutrašnjih antioksidativnih sistema – superoksid dizmutaze, glutacion peroksidaze i katalaze [135]. Iako je nekoliko studija pokazalo da piknogenol ima protektivno delovanje kod različitih patoloških stanja izazvanih oksidativnim stresom [136], hepatoprotektivni efekat piknogenola nije bio često ispitivan, posebno kada je hepatotoksičnost bila indukovana toksičnom dozom paracetamola. Smatra se da je za antioksidativno dejstvo odgovorna kompleksna mešavina fenolnih jedinjenja, kondenzovanih flavonoida i fenolnih kiselina koja je u sastavu piknogenola. U hemijskoj strukturi ovih komponenata nalazi se jedan ili više aromatičnih prstena za koje su vezane jedna ili više hidroksilnih grupa, potencijalno sposobnih da uklone slobodne radikale kreiranjem rezonantno stabilizovanog fenoksil-radikala [95].

Paracetamol (sin. acetaminofen) je supstanca koji se u terapijskim dozama često koristi kao analgetik i antipiretik, međutim toksične doze paracetamola uzrokuje tešku centrilobularnu hepatičnu nekrozu [137] kod ljudi i eksperimentalnih životinja. Mehanizam dejstva paracetamola proizilazi iz njegovog metabolizma u jetri, gde putem citohroma P450 nastaje reaktivni metabolit, N-acetil-p-benzokvinon imin (NAPQI) koji se kovalentno vezuje za proteine. NAPQI se detoksikuje glutationom (GSH) do acetaminofen-GSH konjugata, pa pri toksičnim dozama

paracetamola sadržaj GSH u jetri se značajno smanjuje i do 90%. Kada se potroši GSH, paracetamol se kovalentno vezuje za cisteinske grupe proteina jetre što dovodi do početnog stadijuma u smrti ćelija [32]. Cilj našeg ispitivanja je bio da procenimo efekat piknogenola i ekstrakta kore crnog bora na paracetamolom indukovanu hepatotoksičnost kod pacova, određivanjem biohemijskih parametara u serumu i oksidativnog statusa u homogenatu jetre ispitivanih životinja.

Aktivnost serumskih aminotransferaza se smatra dobrim pokazateljem oštećenja jetre. Oštećenje hepatocita dovodi do poremećaja ćelijskog transporta i povećane propustljivosti ćelijske membrane, što dalje vodi ka izlasku enzima iz ćelija i povećanja njihovih vrednosti u cirkulaciji [138, 139]. Međutim, rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajno povećanje aktivnosti transaminaza jetre i direktnog bilirubina u serumu životinja tretiranih paracetamolom u poređenju sa kontrolnom grupom. Kao što je prethodno opisano, slobodan pristup laboratorijskih životinja hrani može ograničiti hepatotoksičnost indukovanu paracetamolom i posledično povećanje aktivnosti transaminaza jetre [140]. U našoj pridruženoj sudiji, histološki pregled jetre životinja tretiranih paracetamolom je pokazao minimalne razlike u citoarhitektonici jetre, pri čemu je jedina uočena promena bila mikrosteatoza hepatocita [71]. Ova reverzibilna promena hepatocita nije bila dovoljna da dovede do značajnog povećanja nivoa ALT i AST.

Ipak, oštećenje jetre izazvano toksičnom dozom paracetamola je potvrđeno drugim ispitivanim parametrima, uključujući oksidativni status u homogenatu jetre i druga histološka ispitivanja. Oksidativni stres ima ključnu ulogu u bolestima jetre. Oštećenje jetre nastaje kao posledica delovanja toksičnog metabolita NAPQI koji je proizveden putem citohroma P450 u jetri. U normalnim okolnostima, ovaj metabolit biva detoksikovano konjugacijom sa GSH u drugoj

fazi reakcije, tako da samo mali deo NAPQI oksidiše putem citohroma P450. Kao što je već rečeno, toksična doza paracetamola prouzrokuje hiperprodukciju NAPQI, što dovodi do oštećenja ćelija jetre. Semikvinon radikali dobijeni redukcijom jednog elektrona iz NAPQI se vezuju za molekule ćelijske membrane i povećavaju LPx [136]. U našoj studiji, pretretman eksperimentalnih životinja piknogenolom sprečio je porast proteinske ekspresije citohroma P450 indukovane primenom paracetamola. Stoga, možemo pretpostaviti da je hepatoprotektivni efekat piknogenola kod paracetamolskog modela usko povezan sa supresijom citohroma P450, što može dovesti do redukcije formiranja NAPQI.

Glavni produkt LPx koji se koristi kao indikator oštećenja ćelijske membrane jeste vrednost MDA u jetri [141]. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da piknogenol u dozi od 50 mg/kg, kao i ekstrakt kore bora u dozi od 100 mg/kg značajno smanjuju nivo MDA u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom koja je primala paracetamol. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa rezultatima studija koja su ispitivala efekte piknogenola kod pacova kod kojih je oksidativno oštećenje jetre indukovano ugljen-tetrahloridom (CCl₄), gde je dozno-zavisna primena piknogenola sprečila porast nivoa MDA i ispoljila hepatoprotektivni efekat inhibicijom LPx [138, 139]. Naš rezultat je takođe u dobroj korelaciji sa objavljenom studijom [142] koja je pokazala značajno sniženje nivoa MDA u dozno-zavisnom modelu životinja tretiranih cisplatinom i piknogenolom u poređenju sa grupom koja je primala samo cisplatinu. Slično, nivoi MDA u jetri su značajno porasli u grupi životinja sa indukovanom sepsom u poređenju sa kontrolnom grupom, dok su nivoi MDA značajno bili niži u grupi životinja sa indukovanom sepsom koji su primali piknogenol u poređenju sa kontrolnom grupom [95].

Ksantin oksidaza je enzim koji katalizuje konverziju ksantina u mokraćnu kiselinu. Mokraćna kiselina, produkt katabolizma purina, može biti "hvatač" reaktivnih kiseoničnih vrsta kao što su OH^{\bullet} i $\text{O}_2^{\bullet -}$. Mokraćna kiselina pruža antioksidativnu zaštitu, sprečava nastajanje kancera i starenje izazvano slobodnim radikalima [143].

U našem istraživanju, nivo XOD je značajno veći u grupi životinja tretiranih paracetamolom u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je istovremena primena piknogenola u dozi od 50 mg/kg značajno redukovala aktivaciju ovog enzima. Takođe, u poređenju sa kontrolnom grupom koja je tretirana paracetamolom, istovremena primena ekstrakta kore crnog bora je značajno redukovala aktivaciju XOD. Moini i sar. su u svom istraživanju pokazali da je piknogenol u dozno-zavisnom modelu inhibirao aktivnost XOD, za šta se veruje da nastaje kao posledica vezivanja fenolnih komponenata piknogenola za XOD [94].

CAT i GSHPx pretvaraju perokside u alkohol i vodu. CAT biva lako inaktivisana od strane LPx i reaktivnih kiseoničnih vrsta, što posledično dovodi do smanjenja aktivnosti ovog enzima u paracetamolom indukovanoj toksičnosti. Ovom studijom je to potvrđeno, a istovremena upotreba piknogenola u dozi od 50 mg/kg regulisala je izmenjene nivoe CAT u homogenatu jetre do nivoa veoma bliskog vrednostima kontrolne grupe. Takvi rezultati su u dobroj korelaciji sa već objavljenim rezultatima Ahn i sar. gde je značajno sniženje CAT aktivnosti u jetri pacova tretiranih CCl_4 bilo sprečeno istovremenom upotrebom piknogenola [138]. Zanimljivo je da primena ekstrakta kore crnog bora u grupi životinja koje nisu primale paracetamol smanjila aktivnost ovog enzima u poređenju sa kontrolnom grupom. Iznenadujuće, aktivnost antioksidantnog enzima GSHPx u homogenatu jetre je bila povećana nakon administracije paracetamola, dok je bila smanjena nakon tretmana piknogenolom u dozi od 50 mg/kg. Ovakav

rezultat nije u saglasnosti sa prethodnim rezultatima gde je tretman piknogenolom značajno povećao nivo GSHPx kod pacova sa indukovanom sepsom [95]. Međutim, naš rezultat je uporediv sa sličnim studijama [144] gde je potvrđeno da je paracetamol indukovao povećanje GSHPx aktivnosti. Zapravo, tokom stanja oksidativnog stresa može doći do povećanja GSHPx aktivnosti kao odgovor adaptacije hepatocita na oksidativno oštećenje, što je u skladu sa rezultatima naše studije [141].

GSH je glavni neenzimski antioksidant koji ima ulogu u konjugaciji sa različitim enzimskim procesima koji redukuju H_2O_2 i hidroperokside direktnom interakcijom -SH grupa sa reaktivnim kiseoničnim vrstama [145]. Naši rezultati pokazuju značajno sniženje sadržaja GSH u jetri paracetamolom intoksiciranih pacova u odnosu na kontrolnu grupu. Istovremena upotreba piknogenola u dozi od 50 mg/kg uspeła je da spreči paracetamolom indukovano sniženje aktivnosti GSH. Dokazano je da piknogenol sprečava cisplatinom indukovanu supresiju sadržaja GSH [142], što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Naši rezultati su takođe u pozitivnoj korelaciji sa rezultatima Taner-a i sar. koji su pokazali značajno sniženje nivoa GSH kod pacova sa indukovanom sepsom [95]. Pored toga, ista studija je pokazala da istovremena primena piknogenola u dozi od 50 mg/kg značajno prevenira CCl_4 -indukovano sniženje sadržaja GSH u jetri, potvrđujući antioksidantni efekat piknogenola kod CCl_4 -indukovane hepatotoksičnosti [142]. Ipak, ekstrakt kore bora nije uspeo da spreči paracetamolom indukovano sniženje aktivnosti GSH u homogenatu jetre.

Smanjenje GSH je praćeno značajnom redukcijom aktivnosti GR, što može biti objašnjeno inaktivacijom enzima koja je indukovana prekomernom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta. GR je odgovoran za redukciju glutacion disulfida (GSSG) u sulfhidrilnu formu

GSH. Piknogenol u dozi od 50 mg/kg je pokazao sposobnost da vrati vrednost ovog parametra na vrednosti bliže onim vrednostima koje je pokazala kontrolna grupa. Ukoliko se osvrnemo na rezultate aktivnosti transaminaza jetre, jasno je da je GSH nivo u hepatocitima bio nedovoljan da neutrališe paracetamolom indukovanu toksičnost. Međutim, ukoliko pogledamo rezultate pridružene studije u kojoj su hepatociti obojeni PAS (engl. *Periodic acid–Schiff*) metodom, možemo delimično objasniti ovakve rezultate [71]. Naime, nivo GSH je na neki način povezan sa nivoom glikogena u hepatocitima. U istoj studiji, bojenje specifično za glikogen otkrilo je da administracija paracetamola dovodi do značajnog trošenja glikogena, ali u manjoj meri kod životinja pretretiranih piknogenolom. Sniženje GSH izazvano paracetamolom dovodi do sniženja nivoa NADPH, koji ima ulogu u redukciji oksidovanog glutationa. Stoga se aktiviraju putevi glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i pentoza fosfata kako bi se održao normalan NADPH nivo u hepatocitima. Ovi procesi vode u glikogenolizu, ili drugim rečima do smanjenja glikogena u citoplazmi ćelija jetre [146, 147].

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da:

1. Postoji statistički značajna razlika hemijskog sastava kore crnog bora i komercijalnog preparata piknogenola zbog čega se i potencijal njihovog antioksidativnog delovanja značajno razlikuje;
2. Primena piknogenola i ekstrakta kore crnog bora sprečava poremećaj glikoregulacije u serumu životinja sa hemijski izazvanim dijabetes melitusom;
3. Primena piknogenola i ekstrakta kore crnog bora sprečava porast triglicerida i sniženje HDL holesterola u serumu životinja sa hemijski izazvanim dijabetes melitusom;
4. Primena komercijalnog preparata piknogenola i ekstrakta kore crnog bora statistički značajno potencira antihiperглиkemijsko delovanje metformina i hipoglikemijski efekat gliklazida kod životinja sa hemijski izazvanim dijabetes melitusom;
5. Primena komercijalnog preparata piknogenola i ekstrakta kore crnog bora sprečava poremećaj biohemijskih parametara pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu životinja sa hemijski izazvanim dijabetes melitusom;
6. Primena komercijalnog preparata piknogenola ispoljava značajno *in vitro* antioksidativno delovanje i povećava antioksidativni kapacitet jetre laboratorijskih životinja kod kojih je oksidativni stres izazvan primenom toksične doze paracetamola. Ovi efekti su slabiji izraženi pri primeni ekstrakta kore crnog bora.

8. LITERATURA

1. Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga; 2002.
2. Reader's Digest Association. The Reader's Digest guide to vitamins, minerals and supplements. London: Reader's Digest Association; 2000.
3. Jović D. Šumarstvo i prerada drveta u Srbiji kroz vekove. Beograd: Savez inženjera i tehničara šumarstva i industrije za preradu drveta Srbije; 1992.
4. Medarević M, Aleksić P, Milić S, Sklenar K. Stanje četinarskih kultura i veštački podignutih sastojina četinara kojima gazduje JP "Srbijašume". In: Stojanović Lj, editor. Prorede u kulturama bora. Beograd: Javno preduzeće gazdovanje šumama "Srbijašume". Beograd: Šumarski fakultet; 2002. p. 17-23.
5. Dall'Acqua S, Minesso P, Shresta BB, Comai S, Jha PK, Gewali MB, et al. Phytochemical and antioxidant-related investigations on bark of *Abies spectabilis* (D. Don) Spach. from Nepal. *Molecules*. 2012;17(2):1686-97.
6. Anon J. Taking heart, taking pycnogenol. *Natural Pharm*. 1998;2(9):14-5.
7. The United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeial Convention. Washington, DC: United States Pharmacopeial Convention; 2007. p. 965-6.
8. Alía R, Martín S. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Maritime pine (*Pinus pinaster*). Rome: International Plant Genetic Resources Institute; 2003.
9. Chen P, Song F, Lin LZ. Chromatographic fingerprint analysis of Pycnogenol® dietary supplements. *JAOAC Int*. 2009;92(2):624-32.
10. Masquelier J. Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof [United States patent US 4,698,360]. Bordeaux: Horphag Overseas; 1987.
11. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(5-6):704-24.
12. American Botanical Council [homepage on the Internet]. Scientific and clinical monograph for pycnogenol [cited 2019 Jan 21]. Available from: <https://www.herbalgram.org>

13. Parveen K, Khan MR, Mujeeb M, Siddiqui WA. Protective effects of pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chem Biol Interac.* 2010;186(2):219-27.
14. Belcaro G, Cornelli U, Luzzi R, Cesarone MR, Dugall M, Feragalli B, et al. Pycnogenol supplementation improves health risk factors in subjects with metabolic syndrome. *Phytother Res.* 2013;27(10):1572-8.
15. Parveen K, Ishrat T, Malik S, Kausar MA, Siddiqui WA. Modulatory effects of Pycnogenol in a rat model of insulin-dependent diabetes mellitus: biochemical, histological, and immunohistochemical evidences. *Protoplasma.* 2013;250(1):347-60.
16. Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schonlau F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids.* 2002;37(10):931-4.
17. Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Wurthwein G, Rohdewald P. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci.* 2004;75(21):2505-13.
18. Jankyova S, Kucera P, Goldenberg Z, Yaghi D, Navarova J, Kyselova Z, et al. Pycnogenol efficiency on glycaemia, motor nerve conduction velocity and markers of oxidative stress in mild type diabetes in rats. *Phytother Res.* 2009;23(8):1169-74.
19. Yesil-Celiktas O, Ganzera M, Akgun I, Sevimli C, Korkmaz KS, Bedir E. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *J Sci Food Agric.* 2009;89(8):1339-45.
20. World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016.
21. Aydın S, Bacanlı M, Anlar HG, Çal T, Arı N, Ündeğer Bucurgat Ü, et al. Preventive role of Pycnogenol® against the hyperglycemia-induced oxidative stress and DNA damage in diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2018;124:54-63.
22. Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut". Incidencija i mortalitet od dijabetesa u Srbiji. Registar za dijabetes u Srbiji. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut"; 2016.
23. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med.* 2001;344(18):1343-50.

24. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(6):749-62.
25. Yoshikawa T, Naito Y. What is oxidative stress? *JMAJ.* 2002;45(7):271-6.
26. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(4):186-90.
27. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049.
28. Aguilar TAF, Navarro BCH, Pérez JAM. Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. In: Morales-Gonzalez JA, Morales-Gonzalez A, Madrigal-Santillan EO, editors. *A master regulator of oxidative stress - the transcription factor Nrf2.* Rijeka: IntechOpen. 2016. p. 3–19.
29. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.
30. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(5):567-75.
31. European Nutraceutical Association (ENA) [homepage on the Internet]. Science behind Nutraceuticals [cited 2017 Aug 18]. Available from: <https://www.enaonline.org/index.php?lang=en&path=news>.
32. Abdel-Daim M, Abushouk AI, Reddi R, Yarla NS, Palmery M, Peluso I. Association of antioxidant nutraceuticals and acetaminophen (paracetamol): Friend or foe? *J Food Drug Anal.* 2018;26(2S):S78-87.
33. Dogan E, Yanmaz L, Gedikli S, Ersoz U, Okumus Z. The effect of pycnogenol on wound healing in diabetic rats. *Ostomy Wound Manage.* 2017;63(4):41-7.
34. Ola MS, Al-Dosari D, Alhomida AS. Role of oxidative stress in diabetic retinopathy and the beneficial effects of flavonoids. *Curr Pharm Des.* 2018;24(19):2180-7.
35. Parmar MS, Syed I, Gray JP, Ray SD. Curcumin, hesperidin, and rutin selectively interfere with apoptosis signaling and attenuate streptozotocin-induced oxidative stress-mediated hyperglycemia. *Curr Neurovasc Res.* 2015;12(4):363-74.
36. Hadi A, Pourmasoumi M, Mohammadi H, Javaheri A, Rouhani MH. The impact of pycnogenol supplementation on plasma lipids in humans: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Phytother Res.* In press. DOI: 10.1002/ptr.6234.

37. Cretu E, Karonen M, Salminen JP, Mircea C, Trifan A, Charalambous C, et al. In vitro study on the antioxidant activity of a polyphenol-rich extract from *Pinus brutia* bark and its fractions. *J Med Food*. 2013;16(11):984-91.
38. Jančić R. Botanika farmaceutika. Beograd: Službeni list SRJ; 2008.
39. Kim SM, Kang SW, Jeon JS, Um BH. A comparison of Pycnogenol® and bark extracts from *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora*: Extractability, antioxidant activity and proanthocyanidin composition. *J Med Plants Res*. 2012;6(14):2839-49.
40. Igić R, Vukov D. Praktikum iz sistematike viših biljaka. Novi Sad: Prirodno-matematički fakultet; 2000.
41. Vukićević E. Dekorativna dendrologija. 2. dop. izd. Beograd: Privredno-finansijski vodič; 1982.
42. Kivrak I, Kivrak S, Harmandar M, Cetintas Y. Phenolic compounds of *Pinus brutia* Ten.: Chemical investigation and quantitative analysis using an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization source. *Rec Nat Prod*. 2013;7(4):313-9.
43. The Lovett Pinetum Charitable Foundation [homepage on the Internet]. Classification of the genus *Pinus* [cited 2018 Dec 23]. Available from: <https://www.pinetum.org/Lovett/classification.htm>.
44. Gernandt DS, López GG, García SO, Liston A. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*. 2005;54(1):29-42.
45. Gaspar MJ, Velasco T, Feito I, Alía R, Majada J. Genetic variation of drought tolerance in *Pinus pinaster* at three hierarchical levels: a comparison of induced osmotic stress and field testing. *PLoS One*. 2013;8(11):e79094.
46. Chupin L, Motillona C, Charrier-El Bouhtoury F, Pizzi A, Charrier B. Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC. *Ind Crop Prod*. 2013;49:897-903.
47. Rushforth K. The pocket guide to trees. 2nd ed. Bern: Hallwag; 1986. p. 63.
48. Gascogne [Internet]. Maritime pine [cited 2018 Dec 17]. Available from: <http://www.gascognebois.com/en/maritime-pine/>
49. Nursery Supply Co [Internet]. Mulch Supplier [cited 2018 Dec 17]. Available from: http://www.nurserysupplyco.com/mulch_supplier.html

50. Ebay [Internet]. PINE BARK - 10:1 Extract Powder - Strength & Quality [cited 2018 Dec 18]. Available from: https://www.ebay.co.uk/itm/PINE-BARK-10-1-Extract-Powder-Strength-Quality/172964175917?hash=item284577e02d:m4-5FHMFpwankIkAq4U_wRQ&var=471726988753
51. Anjum S, Sundaram S, Rai GK. Nutraceutical application and value addition of banana (*Musa paradisica* L. variety “Bhusawal keli”): a review [Internet]. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(10):81-5. Available from: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/3584/9454>
52. Wikipedia [Internet]. Catechin [cited 2018 Dec 22]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Catechin>
53. Parets L, Alechaga E, Núñez O, Saurina J, Hernández-Cassouab S, Puignouab S. Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural extracts [Internet]. *Analytical Methods* [cited 2018 Dec 26]. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2016/AY/c6ay00929h#!divAbstract>
54. The separation of groups of compounds of PYC by normal phase silica gel HPLC using an acidid polar solvent system and UV detection as described by Cheynier and coworkers [Internet]. Chemical structures of catechin and procyanidine B1 and B6 are shown as examples. The chromatogram has been kindly provided by Drs. Shirly and Waterhouse of the Department of Viticulture and Enology of the University of California at Davis [cited 2018 Dec 26]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584999000908>
55. Iravani S, Zolfaghari B. Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res Pharm Sci.* 2011;6(1):1-11.
56. Blazso G, Gabor M, Schonlau F, Rohdewald P. Pycnogenol® accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother Res.* 2004;18(7):579-81.
57. Petrassi C, Mastromarino A, Spartera C. Pycnogenol in chronic venous insufficiency. *Phytomedicine.* 2000;7(5):383-8.
58. Xia YF, Zhang JH, Xu ZF, Deng XM. Pycnogenol, a compound isolated from the bark of *pinus maritime* mill, attenuates ventilator-induced lung injury through inhibiting NF-κB-mediated inflammatory response. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(2):1824-33.
59. Harvey D. *Modern analytical chemistry.* New York: McGraw-Hill; 2000.

60. Rohdewald PJ. Pycnogenol, French maritime pine bark extract. In: Coates PM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Moss J, White JD, editors. Encyclopedia of dietary supplements. New York: Marcel Dekker; 2005.
61. Rushforth K. Conifers. 1st ed. London: Helm; 1987.
62. Sarac Z, Matejić JS, Stojanović-Radić ZZ, Veselinović JB, Džamić AM, Bojović S, et al. Biological activity of *Pinus nigra* terpenes - evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Comput Biol Med.* 2014;54:72-8.
63. Guida alla Flora Spontanea [Internet]. *Pinus nigra* J.F. Arnold subsp. *nigra* (Pino nero) [cited 2019 Jan 12]. Available from: http://www.pontassievenatura.it/gb2/1sp/Pinus_nigra.html
64. Ebben [Internet]. *Pinus nigra* subsp. *nigra* [cited 2019 Jan 12]. Available from: <https://www.ebben.nl/en/treeebb/pinnigra-pinus-nigra-subsp-nigra/>
65. Šoškić B. Svojstva, prerada i upotreba drveta crnog bora (*Pinus nigra* Arn.). *Šumarstvo.* 2008;4:1-13.
66. Aspe E, Fernandez K. Comparison of phenolic extracts obtained of *pinus radiata* bark from pulp and paper industry and sawmill industry. *Maderas-Cienc Tecnol.* 2011;13(3):243-52.
67. Miranda I, Gominho J, Mirra I, Pereira H. Chemical characterization of barks from *Picea abies* and *Pinus sylvestris* after fractioning into different particle sizes. *Ind Crop Prod.* 2012;36(1):395-400.
68. Valentin L, Kluczek-Turpeinen B, Willfor S, Hemming J, Hatakka A, Steffen K, et al. Scots pine (*Pinus sylvestris*) bark comparison and degradation by fungi: potential substrate for bioremediation. *Bioresour Technol.* 2010;101(7):2203-9.
69. Bocalandro C, Sanhuenza V, Gomez-Caravaca AM, Gonzalez-Alvarez J, Fernandez K, Roeckel M, et al. Comparison of the composition of *Pinus radiata* bark extracts obtained at bench- and pilot-scales. *Ind Crop Prod.* 2012;38(1):21-6.
70. Fkiri S, Mezni F, Ouarghi A, Ghazghazi H, Khouja ML, Khaldi A, et al. Variability of phenolic compounds and antioxidant efficacy in needles extracts of *Pinus nigra* Arn. *J New Sci.* 2018;53(1):3528-35.
71. Rašković A, Bukumirović N, Paut Kusturica M, Milić N, Čabarkapa V, Borišev I, et al. Hepatoprotective and antioxidant potential of Pycnogenol® in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* In press. DOI: 10.1002/ptr.6251.
72. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 1965;16:144-58.

73. Makkar HPS, Bluemmel M, Borowy NK, Becker K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric.* 1993;61(2):161-5.
74. Sun B, Silva RJM, Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem.* 1998;46(10):4267-74.
75. Grujić N, Lepojević Ž, Srđenović B, Vladić J, Sudić J. Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition on mate tea extracts. *Molecules.* 2012;17(3):2518-28.
76. Živanović Lj. Odabrane metode za farmaceutsku analizu: analitika lekova. Deo I. Zemun: Nijansa; 1995.
77. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.
78. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7.
79. Nićiforović N, Mihailović V, Mladenović M, Solujić S, Stanković M, Ivanović D. Antioksidativna aktivnost tri biljne vrste roda *Verbascum*. In: 23th Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem; 2011 Mar 9-10; Čačak, Serbia: Agronomski fakultet; 2011. p. 563-8.
80. Etuk EU. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am.* 2010;1(2):130-4.
81. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):536-46.
82. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(2):216-26.
83. Knopfholz J, Disserol CCD, Pierin AJ, Schirr FL, Streisky L, Takito LL, et al. Validation of the Friedewald formula in patients with metabolic syndrome. *Cholesterol.* 2014;2014:261878.
84. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
85. Bergmayer UH. *Methoden der enzymatischen analyse.* Weinheim: Bergstr; 1963.
86. Beuthler E, Duron O, Kelly B. Improved methods for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1983;611:882-9.

87. Chin PTY, Stults FH, Tappel AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1976;445(3):558-66.
88. Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Basel: Weinheim; 1983. p. 258-65.
89. Beers RF Jr, Sizer IW. Spectrophotometric method for measuring of break down of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*. 1952;195(1):133-40.
90. Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. *Medicinska biohemija*. Beograd: Zavod za udžbenike; 2003.
91. Majkić-Singh NT, Spasić S, Stojanov M, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. *Medicinska biohemija: principi i metodi*. Beograd: Praktikum; 1995.
92. Dean RL. Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *Biochem Mol Biol Edu*. 2002;30(6):401-7.
93. Landis JB, Pardue HL. Kinetics of the reactions of unconjugated and conjugated bilirubins with p-diazobenzenesulfonic acid. *Clin Chem*. 1978;24(10):1690-9.
94. Moini H, Guo Q, Packer L. Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich French maritime pine bark extract, pycnogenol: effect on xanthine oxidase. *J Agric Food Chem*. 2000;48(11):5630-9.
95. Taner G, Aydin S, Bacanlı M, Sarigöl Z, Sahin T, Başaran AA, et al. Modulating effects of Pycnogenol on oxidative stress and DNA damage induced by sepsis in rats. *Phytother Res*. 2014;28(11):1692-700.
96. Jerez M, Sineiro J, Nunez MJ. Fractionation of pine bark extracts: selecting procyanidins. *Eur Food Res Technol*. 2009;229(4):651-9.
97. Sharma A, Goyal R, Sharma L. Potential biological efficacy of Pinus plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. *BMC Comp Alter Med*. 2016;16:35.
98. Kharabsheh SA, Al-Dabbas M, Ghazzawi H, Zatimeh A, Abulaila K. Antioxidant activity and α -amylase inhibitory effect of selected medicinal plants grown in Jordan: an in-vitro study. *J Arab Soc Med Res*. 2017;12(1):19-26.
99. Boscaiu M, Sánchez M, Bautista I, Donat P, Lidón A, Llinares J, et al. Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitats. *Bull UASVM Horticulture*. 2010;67(1):44-9.
100. Fratianni F, Tucci M, De Palma M, Pepe R, Nazzaro F. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. scolymus (L.) Fiori). *Food Chem*. 2007;104(3):1282-6.

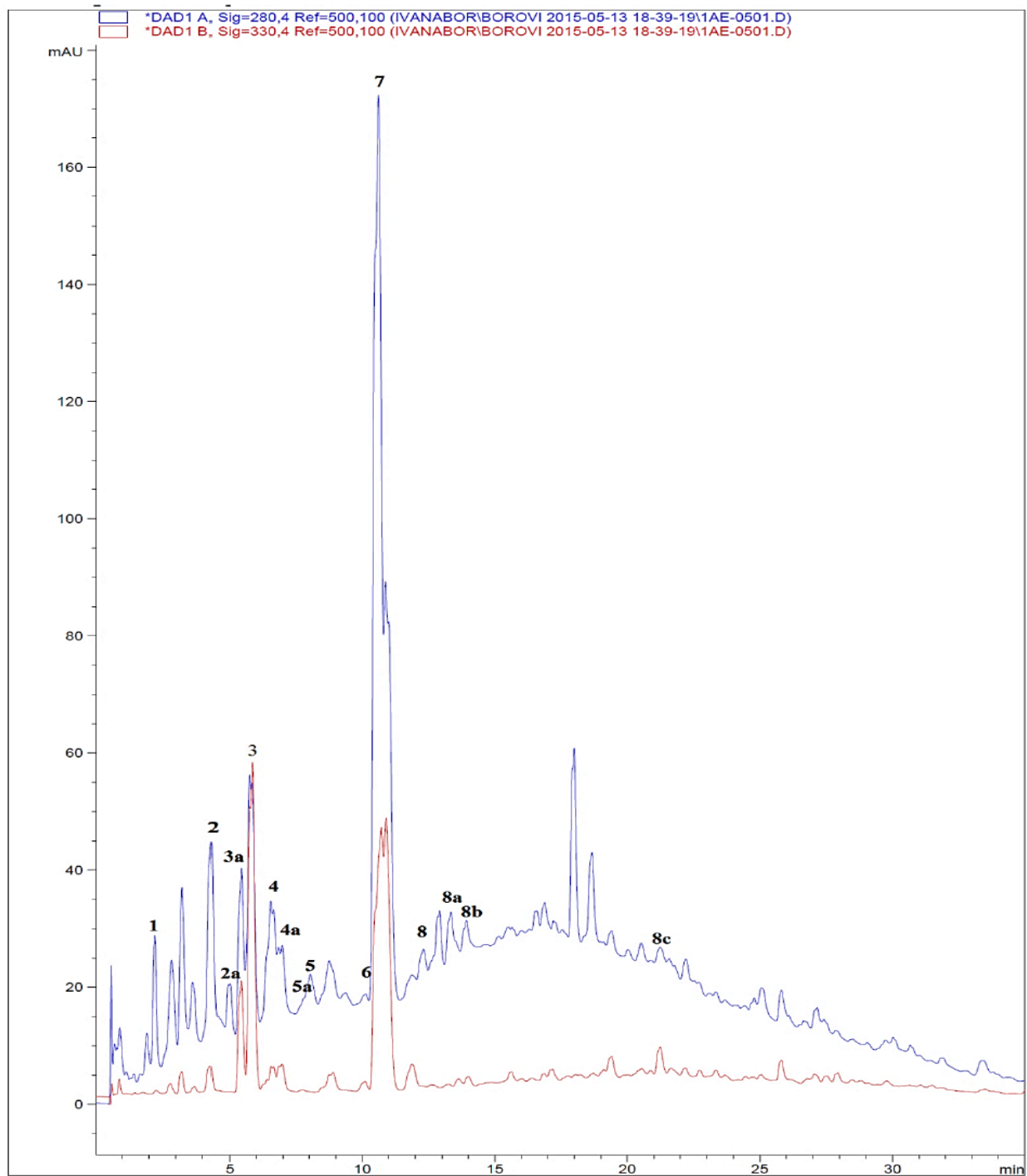
101. Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 2009;14(6):2167-80.
102. Moonmun D, Majumder R, Lopamudra A. Quantitative phytochemical estimation and evaluation of antioxidant and antibacterial activity of methanol and ethanol extracts of heliconia rostrata. *Indian J Pharm Sci*. 2017;79(1):79-90.
103. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effets of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng*. 2007;81(1):200-8.
104. Arbez M, Bernard-Dagan C, Fillon C. Variabilité intraspécifique des monoterpènes de *Pinus nigra* arn. bilan des premiers résultats. *Ann Sci For*. 1974;31(1):57-70.
105. Alonso-Amelot ME, Oliveros-Bastidas A, Calgagno-Pisarelli MP. Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation and rain regime. *Biochem Syst Ecol*. 2007;35(1):1-10.
106. Guri A, Kefalas P, Roussis V. Antioxidant potential of six pine species. *Phytother Res*. 2006;20(4):263-6.
107. Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Ali N, Ahmed G, Shah I. Analysis of total flavonoids and phenolics in different fractions of bark and needle extracts of *Pinus roxburghii* and *Pinus wallichiana*. *J Med Plants Res*. 2011;5(13):2724-8.
108. Amalinei RL, Trifan A, Cioanca O, Miron SD, Mihai CT, Rotinberg P, et al. Polyphenol-rich extract from *Pinus sylvestris* L. bark-chemical and antitumor studies. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2014;118(2):551-7.
109. Ramos V, Bocalandro C, Riquelme S, SanhuesaV, Aspé E, Roeckel M, et al. Effect of the bench scale extraction conditions *Pinus radiata* bark extract yield, antioxidant properties and composition. *Maderas-Cienc Tecnol*. 2013;15(1):31-44.
110. Riedl KM, Hagerman AE. Tannin protein complexes as radical scavengers and radical sinks. *J Agric Food Chem*. 2001;49(10):4917-23.
111. Ku CS, Jang JP, Mun SP. Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *J Wood Sci*. 2007;53(6):524-8.
112. Kopjar M, Piližota V, Hribar J, Simcic M. Total phenol content and antioxidant activity of water solutions of plant extracts. *Croat J Food Sci Technol*. 2009;1(1):1-7.
113. Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*. 2017;53(6):365-74.

114. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
115. Pournaghi P, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S, Foroughi A. An investigation on body weights, blood glucose levels and pituitary-gonadal axis hormones in diabetic and metformin-treated diabetic female rats. *Vet Res Forum*. 2012;3(2):79-84.
116. Kim MJ, Ha BJ. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of fermented *Rhynchosia nulubilis* in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicol Res*. 2013;29(1):15-9.
117. Oluwatomilayo OP, Oluwole AB. Estimation of plasma glucose and creatinine level in alloxan-induced diabetic wistar rats treated with metformin and thiazolidinediones. *Ulutas Med J*. 2018;4(2):73-7.
118. Jankyova S, Hlavackova L, Kralova E, Slazneva J, Drobna V, Zuzik P, et al. The evaluation of efficacy of Pycnogenol fractions on endothelial dysfunction. *Acta Fac Pharm Univ Comen*. 2013;60(1):7-14.
119. Sarkar A, Tiwari A, Bhasin PS, Mitra M. Pharmacological and pharmaceutical profile of gliclazide: a review. *J Appl Pharm Sci*. 2011;1(9):11-9.
120. Gupta RC, Chang D, Nammi S, Bensoussan A, Bilinski K, Roufogalis BD. Interactions between antidiabetic drugs and herbs: an overview of mechanisms of action and clinical implications. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9(1):59.
121. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.
122. Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Wurthwein G, Rohdewald P. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci* 2004;75(21):2505-13.
123. Liu X, Zhou HJ, Rohdewald P. French maritime pine bark extract pycnogenol dose-dependently lower glucose in type 2 diabetes patients. *Diabetes Care*. 2004;27(3):839.
124. Schäfer A, Högger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(1):41-6.
125. Kim MJ, Ryu GR, Chung JS, Sim SS, Min DS, Rhie DJ, et al. Protective effects of epicatechin against the toxic effects of streptozotocin on rat pancreatic islets: in vivo and in vitro. *Pancreas*. 2003;26(3):292-9.
126. Shimizu M, Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Miyamoto Y. Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *Biofactors*. 2000;13(1-4):61-5.

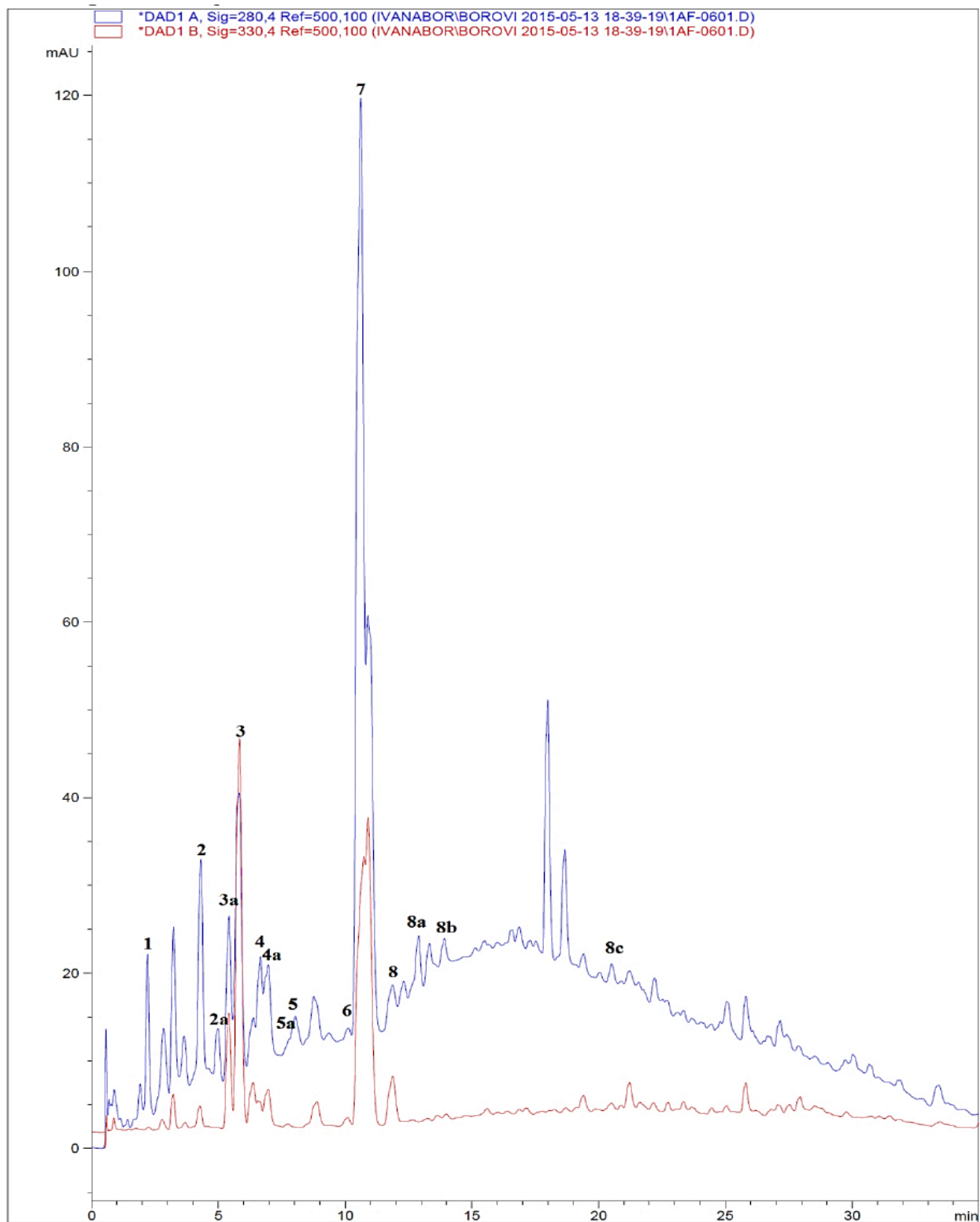
127. Raj U, Aier I, Varadwaj PK. Taxifolin: a wonder molecule in making multiple drug targets. *Ann Pharmacol Pharm.* 2017;2(16):1083.
128. Koch R. Comparative study of venostasin and pycnogenol in chronic venous insufficiency. *Phytother Res.* 2002;16(1):1-5.
129. Mei L, Mochizuki M, Hasegawa N. Hepatoprotective effects of pycnogenol in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Phytother Res.* 2012;26(10):1572-4.
130. Harris EH. Elevated liver function tests in type 2 diabetes. *Clin Diab.* 2005;23(3):115-9.
131. Kozic A, Popovic M, Ivetic V, Pilija V. Aktivnosti glutation peroksidaze, glutationa i glutation reduktaze kod zdravih ljudi i dijabetičara (insulin zavisnih). *Praxis medica.* 2002;30(1-2):13-20.
132. Lee IC, Ko JW, Park SH, Shin NR, Shin IS, Kim JB, et al. Ameliorative effects of pine bark extract on cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Ren Fail.* 2017;39(1):363-71.
133. Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinmei M, Packer L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;42(1):35-44.
134. Cossins E, Lee R, Packer L. ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;45(3):583-97.
135. Bayeta E, Lau BH. Pycnogenol inhibits generation of inflammatory mediators in macrophages. *Nutr Res.* 2000;20(2):249-59.
136. Ko JW, Park SH, Shin NR, Shin JY, Kim JW, Shin IS, et al. Protective effect and mechanism of action of diallyl disulfide against acetaminophen-induced acute hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2017;109(Pt 1):28-37.
137. Pandit A, Sachdeva T, Bafna P. Drug-induced hepatotoxicity: a review. *J Appl Pharm Sci.* 2012;2(5):233-43.
138. Ahn TH, Yang YS, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, et al. Ameliorative effects of pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage in rats. *Phytother Res.* 2007;21(11):1015-9.
139. Yang YS, Ahn TH, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, et al. Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(1):380-7.
140. McGill MR, Li F, Sharpe MR, Williams CD, Curry SC, Ma X, et al. Circulating acylcarnitines as biomarkers of mitochondrial dysfunction after acetaminophen overdose in mice and humans. *Arch Toxicol.* 2014;88(2):391-401.

141. Rašković A, Gigov S, Čapo I, Paut Kusturica M, Milijašević B, Kojić-Damjanov S, et al. Antioxidative and protective actions of apigenin in a paracetamol-induced hepatotoxicity rat model. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017;42(5):849-56.
142. Ko JW, Lee IC, Park SH, Moon C, Kang SS, Kim SH, et al. Protective effects of pine bark extract against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Lab Anim Res.* 2014;30(4):174-80.
143. Pandey S, Parvez S, Sayeed Haque R, Bin-Hafeez B, Raisudd S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ.* 2003;309(1-3):105-15.
144. Rašković A, Pavlović N, Kvirgić M, Sudji J, Mitić G, Čapo I, et al. Effects of pharmaceutical formulations containing thyme on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:442.
145. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Dikalova AE, Sohal RS, Hatch GE, et al. Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2000;28(6):838-45.
146. Yan M, Huo Y, Yin S, Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biol.* 2018;17:274-83.
147. Gusarov I, Nudler E. Glycogen at the crossroad of stress resistance, energy maintenance, and pathophysiology of aging. *Bioessays.* 2018;40(9):e1800033.

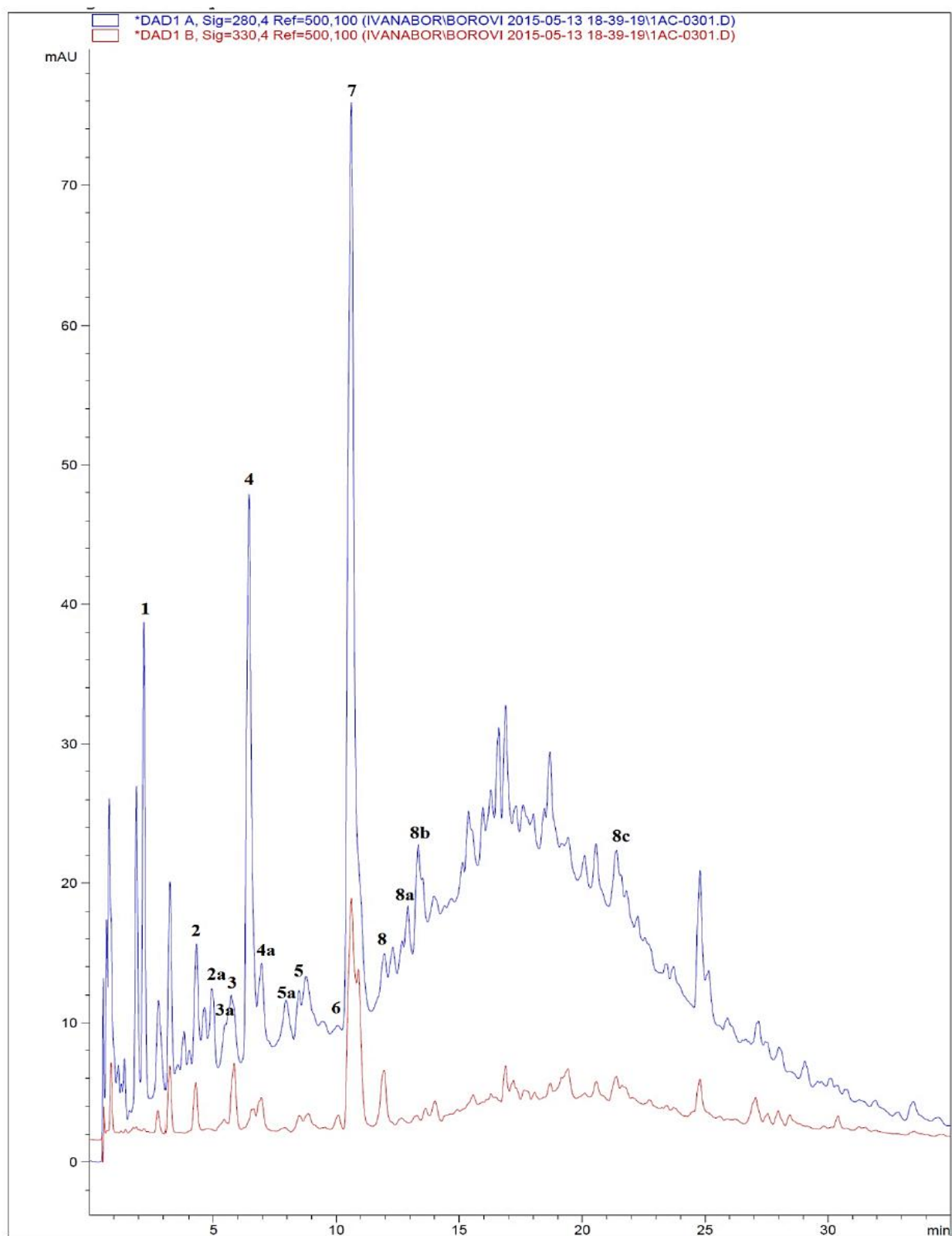
9.PRILOG



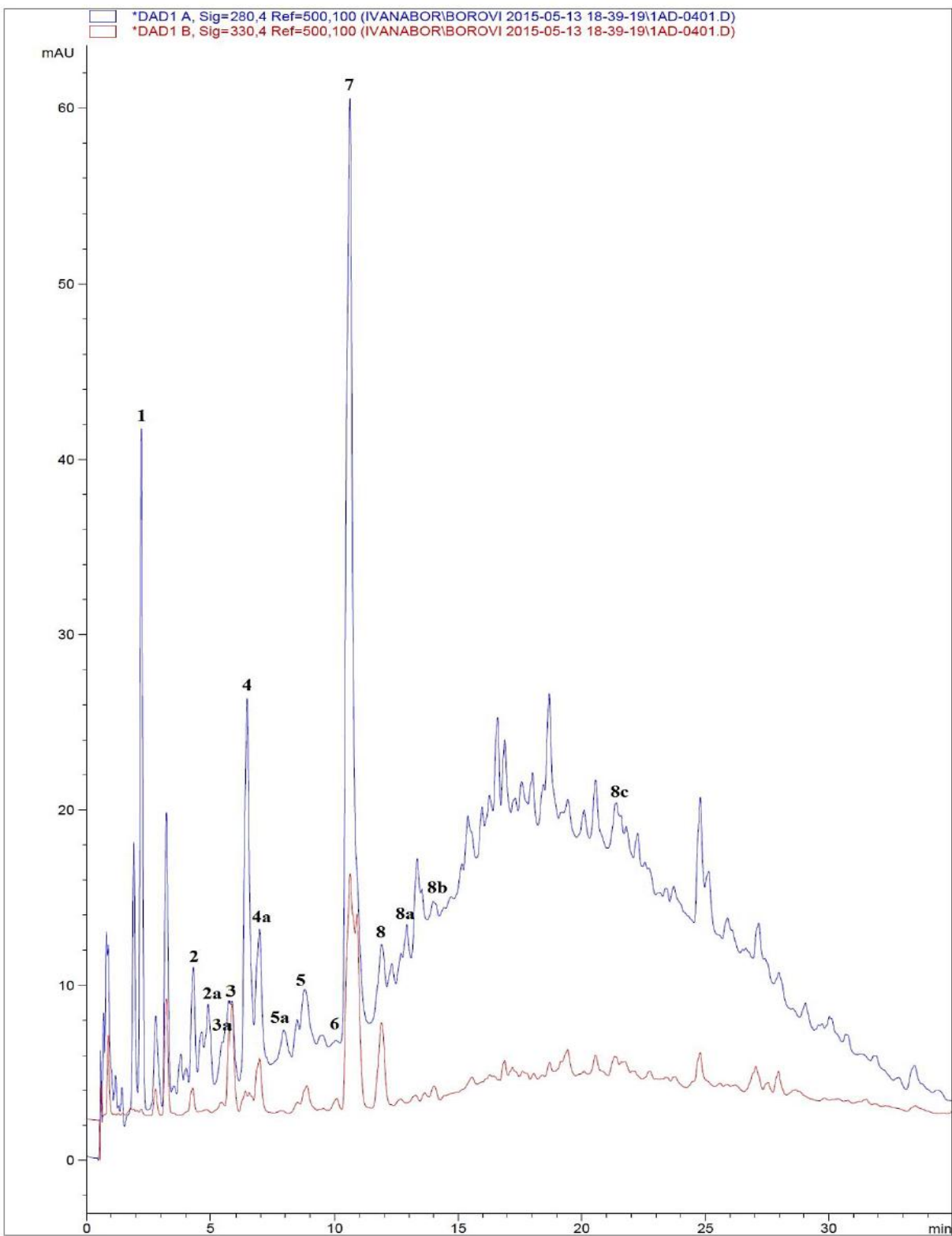
Prilog 1. Hromatogram metanolnog ekstrakta kore Pinus nigra poreklom sa Mokre gore



Prilog 2. Hromatogram etanolnog ekstrakta kore Pinus nigra poreklom sa Mokre gore



Prilog 3. Hromatogram metanolnog ekstrakta kore *Pinus nigra* poreklom sa Tare



Prilog 4. Hromatogram etanolnog ekstrakta kore Pinus nigra poreklom sa Tare