



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КЛИНИЧКА МЕДИЦИНА



АНТИДИЈАБЕТЕСНИ УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА ЦРНОГ ДУДА (*MORUS NIGRA*, L) КОД МИШЕВА

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:

Проф. др Саша Вукмировић

Кандидат:

Владимирка Илић

Нови Сад, 2022. године

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Владимирка Илић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Саша Вукмировић, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
Наслов рада:	АНТИДИЈАБЕТЕСНИ УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА ЦРНОГ ДУДА (<i>MORUS NIGRA</i> , L) КОД МИШЕВА
Језик публикације (писмо):	Српски (ћирилица)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 129 Поглавља 7 Референци 157 Табела 22 Слика 33 Графикона 2 Прилога /
Научна област:	Медицина
Ужа научна област (научна дисциплина):	Фармакологија са токсикологијом и клиничком фармакологијом
Кључне речи / предметна одредница:	биљке рода <i>Morus</i> ; биљни екстракти; антиоксиданси; хипогликемијски агенси; гликемија; експериментални дијабетес мелитус; експеримент на животињама, мишеви Не MeSH: црни дуд

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

Резиме на језику
рада:

Према проценама Светске здравствене организација од дијабетеса тренутно болује 537 милиона људи широм света, док у Србији од дијабетеса болује око 770 000 особа што чини око 12% одраслог становништва. Висока преваленција дијабетеса, озбиљност последица услед компликација ове болести, као и нежељена дејства конвенционалне терапије усмеравају напоре истраживача ка биљкама са антидијабетесним потенцијалом. Разноликост хемијског састава и традиционална употреба биљака рода *Morus* разлог су све чешћег испитивања антидијабетесног потенцијала ових биљака, а нарочито црног дуда с обзиром на богат и разнолик биохемијски састав.

Циљеви овог истраживања били су: извршити хемијску карактеризацију екстракта коре, листа, плода, семенки и сока црног дуда; утврдити утицај испитиваних екстраката на вредност гликемије код здравих животиња; утицај испитиваних екстраката на вредност гликемије код животиња са дијабетесом изазваним применом стрептозотоцина, као и утицај на очуваност морфолошких карактеристика у хистолошкој структури ткива панкреаса; утврдити антиоксидативни потенцијал испитиваних екстраката црног дуда.

Истраживање је спроведено на мишевима *NMRI Haan* соја. У испитивању је процењен утицај пет различитих екстраката црног дуда (етанолног екстракт листа, коре, плода, затим свеже цеђеног сока и екстракта семена црног дуда односно уља црног дуда) у три различите дозе 125 мг/кг, 250 мг/кг и 500 мг/кг код здравих животиња, као и утицај највиших доза свих 5 екстраката код животиња са дијабетесом изазваним стрептозотоцином.

У екстракту листа утврђен је висок садржај изокверцетина ($34,8 \pm 0,5$ мг/г екстракта) и рутина ($2,7 \pm 0,1$ мг/г екстракта). Етанолни екстракт листа црног дуда (500 мг/кг) снизио је вредности гликемије у поређењу са контролном групом здравих животиња. За екстракт листа утврђена је IC_{50} вредност од $7,64 \mu\text{g/ml}$. Екстракт коре снизио је вредности гликемије у односу на контролну групу. Такође примена овог екстраката довела је до статистички значајног пада вредности телесне масе у односу на контролну групу ($p < 0,05$). Укупан удео полифенолних једињења изражен у mg GAE/g суве материје је био највећи у екстракту коре ($68,3 \pm 0,7$). Екстракт плода (500 мг/кг) снизио је вредности гликемије код здравих животиња у поређењу са контролном групом. У садржају екстракта издваја се процијанидин Б1 (13,8 мг/г екстракта), чије присуство није утврђено у другим екстрактима. Сок црног дуда (125 и 250 мг/кг) снизио је вредности гликемије у поређењу са контролном групом. У саставу сока утврђено је присуство цијанидин хлорида ($7,96 \pm 0,61$ мг/г), цијанидин-3-*O*-глукозида ($7,04 \pm 0,54$ мг/г) и цијанидин-3-*O*-рутинозида ($2,10 \pm 0,11$ мг/г). Уље семенки црног дуда (500 мг/кг) снизило је вредност гликемије у поређењу са контролном групом. У саставу уља доминирају полинезасићене масне киселине линолна и олеинска са укупним уделом од 88,5%, затим палмитинска 8,6%, стераинска 2,5% и арахидонска 0,1%.

Најпотентнији антиоксидативни капацитет утврђен је код екстракта листа, и коре црног дуда, затим уља семенки, екстракта плода и свеже цеђеног сока након FRAP и DPPH анализе.

Примена екстраката код животиња са дијабетесом довела је до пада вредности гликемије при примени етанолног екстракта листа ($-3,85 \pm 3,60$ ммол/л) и примене свеже цеђеног сока ($-3,90 \pm 2,80$ ммол/л). У

	<p>групама третираним екстрактом коре и плода, те уљем семенки дошло је до пораста вредности гликемије, причему је пораст био нижи у односу на контролну групу. Примена екстракта коре снизила је телесну масу код животиња са дијабетесом ($-0,32 \pm 3,92$ г), док је телесна маса у осталим групама порасла.</p> <p>Активност ензима супероксид дисмутазе и каталазе била је статистички значајно виша у групама животиња третираним екстрактима листа и коре у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$). У групи животиња третираних уљем семенки црног дуда утврђена је статистички значајно виша активност супероксид дисмутазе у поређењу са контролном групом ($p < 0,05$). У групи животиња третираних соком црног дуда утврђена је статистички значајно виша активност ензима каталазе ($p < 0,05$). Интезитет липидне пероксидације је у свим експерименталним групама био нижи у односу на одговарајуће контролне групе. Статистички значајно нижа активност утврђена је у групама третираним екстрактом листа и коре црног, те у групи третираној уљем семенки црног дуда ($p < 0,05$).</p> <p>Хистолошком анализом ткива панкреаса утврђен је протективни ефекат екстракта листа и коре црног дуда, као и у групи животиња са дијабетесом третираној уљем семенки црног дуда. Морфометријском анализом потврђени је протективни ефекат поменутих екстраката. Хистолошком анализом ткива јетре уочен је протективни ефекат екстраката листа и коре, као и уља семенки црног дуда.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	24.10.2017.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Председник:</p> <p>Члан:</p> <p>Члан:</p> <p>Члан:</p> <p>Члан:</p>
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OR CENTER

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	PhD thesis
Author:	Vladimirka Ilić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	MD PhD Saša Vukmirović, associate professor, Faculty of Medicine University of Novi Sad
Thesis title:	ANTI-DIABETES EFFECT OF BLACK MULBERRY EXTRACTS (<i>MORUS NIGRA</i> , L) IN MICE
Language of text (script):	Serbian language (cyrilic)
Physical description:	Number of: Pages 129 Chapters 7 References 157 Tables 22 Illustrations 33 Graphs 2 Appendices /
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Pharmacology with toxicology and clinical pharmacology
Subject, Key words:	Morus; plant Extract; Antioxidants; Hypoglycemic Agents; Blood Glucose; Diabetes Mellitus; Experimental; Animal Experimentation; Mice Non MeSH: Morus nigra
Abstract in English language:	According to estimates by the World Health Organization, 537 million people worldwide currently suffer from diabetes, while in Serbia about 770,000 people suffer from diabetes, which is about 12% of the adult population. The high prevalence of diabetes, the severity of the consequences

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5b – Statement on the authority,

5b – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

due to the complications of this disease, as well as the side effects of conventional therapy direct the efforts of researchers towards testing plants with antidiabetic potential. The diversity of chemical composition and the traditional use of plants of the genus *Morus* are the reason for the increasingly frequent examination of the antidiabetic potential of these plants, especially black mulberry, given the rich and diverse biochemical composition.

The objectives of this study were: to perform chemical characterization of extracts of bark, leaves, fruits, seeds and juice of black mulberry; to determine the influence of the extracts on the glycemia in healthy animals; to determine the influence of the extracts on the glycemia in animals with streptozotocin induced diabetes, as well as the influence on the preservation of morphological characteristics in the histological structure of pancreatic tissue; to determine the antioxidant potential of black mulberry extracts.

The study was conducted on Haan strain NMRI mice. The effect of five different extracts of black mulberry (ethanol extract of leaves, bark, fruit, then freshly squeezed juice and extract of black mulberry or black mulberry seed or black mulberry oil) in three different doses 125 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg in healthy animals was evaluated, as well as the effect of the highest doses of all 5 extracts in animals with streptozotocin-induced diabetes.

A high content of isoquercetin ($34,8 \pm 0,5$ mg/g extract) and rutin ($2,7 \pm 0,1$ mg/g extract) was found in the leaf extract. Ethanol extract of black mulberry leaf (500 mg/kg) reduced glycaemic values compared to the control group in healthy animals. An IC_{50} value of $7,64$ μ g/ml was determined for the leaf extract. The bark extract reduced glycaemic values compared to the control group. Also, the application of this extract led to a statistically significant decrease in body weight in relation to the control group ($p < 0,05$). The total proportion of polyphenolic compounds expressed in mgGAE/g was highest in bark extract ($68,3 \pm 0,7$). Fruit extract (500 mg/kg) reduced glycaemic values in healthy animals compared to the control group. Procyanidin B1 ($13,8$ mg/g of extract) was isolated in the fruit extract, the presence of which has not been determined in other extracts. Black mulberry juice (125 and 250 mg/kg) reduced glycaemic values compared to the control group. The presence of cyanidin chloride ($7,96 \pm 0,61$ mg/g), cyanidin-3-*O*-glucoside ($7,04 \pm 0,54$ mg/g) and cyanidin-3-*O*-rutinoside was detected in the juice ($2,10 \pm 0,11$ mg/g). Black mulberry seed oil (500 mg/kg) reduced glycaemic values compared to the control group. The composition of the oil is dominated by polyunsaturated fatty acids linoleic and oleic with a total share of 88,5%, followed by palmitic 8,6%, stearic 2,5% and arachidonic 0,1% acid.

The most potent antioxidant capacity was determined in leaf extract, as well as in bark extract, then seed oil, fruit extract and freshly squeezed juice after FRAP and DPPH analysis.

The use of extracts in animals with diabetes led to a decrease in glycemia when ethanol leaf extract ($-3,85 \pm 3,60$ mmol/l) and freshly squeezed juice ($-3,90 \pm 2,80$ mmol/l) were used in animal treatment. In the groups treated with bark and fruit extract, and seed oil, the increase in glycemia was detected, while the increase was lower compared to the control group. The use of bark extract decreased body weight in animals with diabetes ($-0,32 \pm 3,92$ g), while body weight increased in other groups.

The activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase was significantly higher in the groups of animals treated with leaf and

	<p>bark extracts compared to the control group ($p < 0.05$). In the group of animals treated with black mulberry oil, a significantly higher superoxide dismutase activity was found in comparison with the control group ($p < 0.05$), while in the group of animals treated with black mulberry juice, a significantly higher activity of the enzyme catalase was found ($p < 0.05$). The intensity of lipid peroxidation was lower in all experimental groups compared to the corresponding control groups. Significantly lower activity was found in the groups treated with black leaf and bark extract, and in the group treated with black mulberry seed oil ($p < 0.05$).</p> <p>Histological analysis of pancreatic tissue verified the protective effect of black mulberry leaf and bark extract. The protective effect was also verified in animals with streptozotocine induced diabetes treated with black mulberry seed oil. Morphometric analysis confirmed the protective effect of the mentioned extracts. Histological analysis of liver tissue revealed a protective effect of leaf and bark extracts, as well as of black mulberry seed oil.</p>
Accepted on Scientific Board on:	24.10.2017.
Defended: (Filled by the faculty service)	
This is Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President:</p> <p>Member:</p> <p>Member:</p> <p>Member:</p> <p>Member:</p>
Note:	

Садржај

1. Увод.....	1
1.1 Панкреас.....	3
1.1.1. Спољашња грађа панкреаса.....	3
1.1.2. Хистолошка грађа панкреаса.....	4
1.1.3. Инсулин	7
1.2. Дијабетес	10
1.2.1. Предијабетес	10
1.2.2. Дијабетес (<i>diabetes mellitus</i>).....	12
1.3. Црни дуд (<i>Morus nigra</i> L.).....	16
1.3.1. Хемијски састав биоактивних компоненти црног дуда	18
1.3.2. Полифенолна једињења	21
1.3.3. Масне киселине.....	24
2. Циљеви рада и хипотезе	27
3. Материјал и методе	28
3.1. Биљни материјал	28
3.2. Експерименталне животиње.....	29
3.3. Хемикалије	29
3.4. Екстракција биљног материјала.....	30
3.4.1. Сокслет екстракција	30
3.4.2. Екстракција суперкритичним угљен-диоксидом (CO ₂).....	32
3.5. Квалитативна и квантитативна анализа хемијског састава	34
3.5.1. Одређивање укупних фенола.....	34
3.5.2. Одређивање укупних танина	35
3.5.3. Одређивање укупних флавоноида.....	36
3.5.4. Одређивање укупних антоцијанина	36
3.5.5. Анализа високоефикасном течном хроматографијом	38
3.5.6. Анализа гасном хроматографијом.....	40
3.6. <i>In vitro</i> методе	43
3.6.1. FRAP метода процене антиоксидативног капацитета	43
3.6.2. DPPH метода хватања слободних радикала.....	44
3.7. <i>In vivo</i> методе.....	47
3.7.1. Избор, величина и конструкција узорка експерименталних животиња	47

3.7.2.	Орални тест толеранције глукозе (ОГТТ).....	51
3.7.3.	Индукција дијабетеса стрептозотоцином (ИДС)	51
3.8.	<i>Ex vivo</i> методе	52
3.8.1.	Одређивање концентрације протеина	52
3.8.2.	Интезитет липидне пероксидације	53
3.8.3.	Одређивање укупне активности супероксид дисмутазе (СОД).....	54
3.8.4.	Одређивање специфичне активности каталазе	55
3.8.5.	Одређивање специфичне активности глутатион редуктазе (ГР)	56
3.8.6.	Одређивање специфичне активности глутатион пероксидазе (ГПх)	57
3.8.7.	Одређивање специфичне активности глутатион-С-трансферазе (ГСТ)	58
3.9.	Хистолошке и морфометријске методе	60
3.10.	Статистичка анализа резултата	61
4.	Резултати.....	62
4.1.	Резултати <i>In vitro</i> испитивања	62
4.1.1.	Резултати HPLC анализе ББЛЦД и ББКЦД.....	62
4.1.2.	Резултати HPLC анализа СЦД и ББПЦД.....	65
4.1.3.	Резултати анализе УСЦД гасномхроматографијом	68
4.1.4.	Резултати испитивања антиоксидативног капацитета FRAP методом.....	70
4.1.5.	Резултати испитивања антиоксидативне активности DPPH методом.....	70
4.2.	Резултати <i>In vivo</i> испитивања	72
4.2.1.	Здраве животиње.....	72
4.2.2.	Животиње са дијабетесом изазваним применом стрептозотина	79
4.3.	Резултати <i>Ex vivo</i> испитивања	82
4.3.1.	Активност антиоксидативних ензима.....	82
4.3.2.	Хепатосоматски индекс	83
4.4.	Хистолошка и морфометријска испитивања	84
4.4.1.	Хистолошка анализа ткива панкреаса	84
4.4.2.	Хистолошка анализа ткива јетре.....	90
5.	Дискусија	94
6.	Закључци.....	112
7.	Литература	115
	План третмана података	130

1. Увод

Дијабетес мелитус је хронична болест коју карактерише поремећај метаболизма угљених хидрата, масти и протеина услед недовољног лучења инсулина или смањене осетљивости ћелија на инсулин, при чему је хипергликемија један од примарних показатеља дијабетес мелитуса (1,2). Дијабетес мелитус је обољење које постаје глобални здравствени проблем модерног времена и водећи узрок смрти. Процењује се да тренутно од овог обољења болује 537 милиона људи широм света, с тенденцијом пораста броја оболелих. Светска здравствена организација (енгл. World Health Organization–WHO - Светска здравствена организација) и Међународна федерација за дијабетес (енгл. International Diabetes Federation – IDF - Међународна федерација за дијабетес) процењују да ће број оболелих од дијабетеса до 2030. године порастати на 643 милиона (1–3). Због озбиљности саме болести која представља метаболичко обољење и доводи до настанка бројних компликација у организму, дијабетес представља оптерећење не само са здравственог и него и социјалног аспекта за економско стање појединца и друштва због комплексности болести и трошкова терапије.

Развој дијабетеса представља резултат хроничне инсулинске резистенције, смањене функције и броја β -ћелија панкреаса. Потрага за агенсима који могу да побољшају осетљивост на инсулин и вијабилност β -ћелија може да обезбеди ефикаснију стратегију за спречавање појаве дијабетеса (4,5). Поред користи коју доноси стандардна медикаментозна терапија дијабетеса, присутан је и ризик од испољавања многих нежељених последица које се најчешће огледају у развоја гојазности, варирању нивоа гликемије, поремећаја у раду јетре, бубрега и гастроинтестиналног тракта (6,7).

Висока преваленција дијабетеса, озбиљност последица услед компликација ове метаболичке болести, као и нежељена дејства конвенционалне терапије усмеравају научноистраживачке студије ка истраживању биљака са антидијабетесним потенцијалом у погледу превентивне и терапијске активности. Разноликост хемијског састава и традиционална употреба биљака рода *Morus* популаризују студије које за предмет

истраживања имају управо антидијабетесни потенцијал ових биљака, међу којима се црном дуду посвећује све већа пажња с обзиром на богат и разнолик биохемијски састав.

Публиковане студије наговештавају постојање хипогликемијског ефекта екстракта црног дуда од различитих делова биљке (8–10). Хипогликемијски ефекат забележен је код пацова оболелих од дијабетеса приликом примене водено-алкохолног екстракта листа црног дуда, што се повезује са присуством антиоксидативних материја попут флавоноида, антоцијана и елагинске киселине. Такође, забележено је и снижавање нивоа укупног холестерола, триглицерида, као и пораст нивоа HDL (енгл. High density lipoprotein – Липопротеин високе густине) холестерола (9). Антихипергликемијски и протективни ефекат антоцијанског екстракта плода црног дуда запажен је код пацова соја *Zucker* оболелих од дијабетеса (11). Захваљујући богатом садржају компоненти са антиоксидативним деловањем (фенолна једињења), који су веома потентни хватачи слободних радикала, конзумација плодова црног дуда и екстракта листа доприноси заштити биолошких мембрана и биомолекула од пероксидног оштећења (12–15). Захваљујући високом садржају флавоноида водено-метанолни екстракт листа црног дуда испољава хепатопротективни ефекат код мишева третираних високим дозама парацетамола (14). Снажну антиинфламаторну активност показују флавоноиди изоловани из коре црног дуда, а заслуге за антиоксидативни потенцијал приписују се флавоноиду кверцетину који квантитативно доминира у саставу (12,16,17). Доступни су и прелиминарни резултати о потенцијалним повољним ефектима примене различитих екстракта црног дуда код људи. Код здравих испитаника као и испитаника оболелих од дијабетеса унос екстракта листа црног дуда и раствора сахарозе доводи до стимулације инсулинске секреције и пада гликемије (18). Такође, конзумација концентрованог сока код здравих испитаника и чаја од листа црног дуда код испитаника оболелих од дијабетеса снижава вредност гликемије након оброка (19,20).

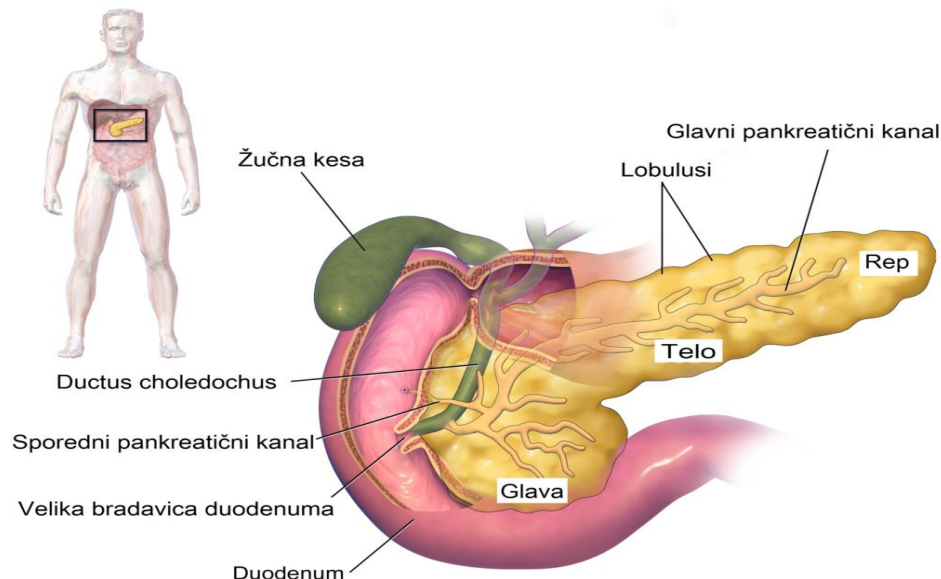
Досадашњи резултати истраживања антидијабетесног потенцијала црног дуда, наговештавају потенцијални протективни и терапијски ефекат код лечења дијабетеса, уз повољан профил нежељених дејстава. Ради систематичнијег приказа профилактоичког и терапијског потенцијала ове биљке упознаћемо се прво са грађом и функцијом панкреаса те патоанатомским и патофизиолошким основама дијабетеса.

1.1 Панкреас

Панкреас представља орган који улази у састав гастроинтестиналног тракта и смештен је у горњем левом углу абдомена иза желуца, у кривини дванаестопалачног црева. Облик панкреаса подсећа на слово Ј. Маса панкреаса се креће од 70 до 90 г, а дужина износи од 12-15 цм.

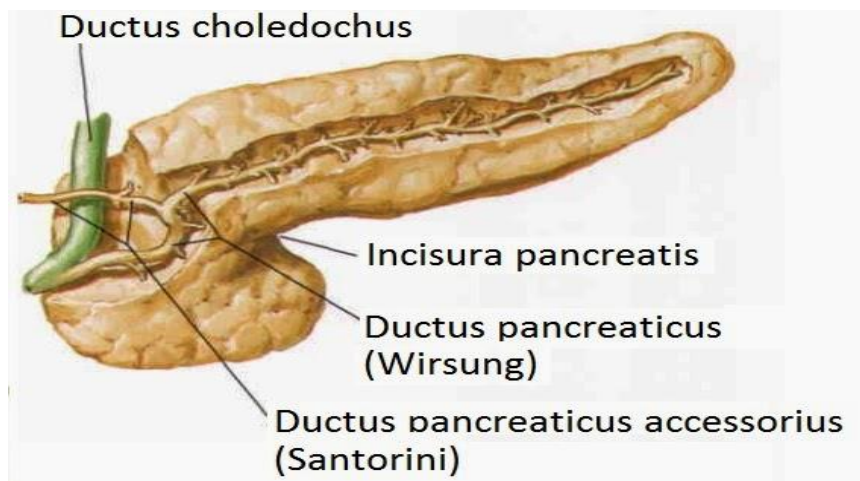
1.1.1. Спољашња грађа панкреаса

На панкреасу се разликује његов проширени део или глава панкреаса (лат. *caput pancreaticum*) окренута у десну страну у кривини дванаестопалачног црева, средишњи део или тело панкреаса (лат. *corpus pancreaticum*) и реп панкреаса (лат. *cauda pancreaticum*). Врат панкреаса (лат. *collum pancreaticum*) је део који се налази између главе и тела панкреаса. Од врата на ниже и у лево се пружа кукасти наставак (лат. *processus uncinatus – Winslow*). Између врата и кукастог наставка налази се сужење или усек (лат. *incisura pancreaticum*) кроз који пролази *arteria pancreatic superior*. Панкреас има три стране (лат. *facies anterosuperior*, *facies anteroinferior* и *facies posterior*) и три ивице (лат. *margo superior*, *margo anterior* и *margo inferior*). На горњој ивици панкреаса је смештено испупчење (лат. *tuberculum mentale*)(21).



Слика 1. Спољашња грађа панкреаса, преузето из (22)

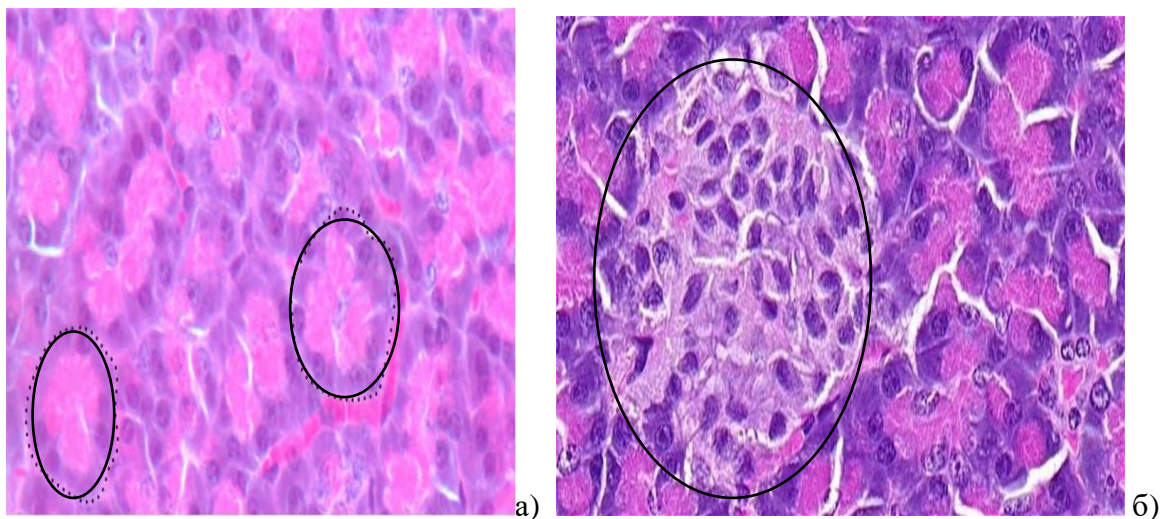
Изводни канали панкреаса. - Панкреас је орган са двојаким функцијама. То је уједно и једини орган у телу који се карактерише ендокрином и екзокрином функцијом. Екзокрини панкреас излучује панкреасни сок чији главни састав чине ензими за варење хране попут трипсина, химотрипсина, карбоксипептидаза а и б, панкреасна амилаза и липаза. Продукти екзокриног панкреаса се излучују у дванаестопалачно црево преко главног изводног канала (лат. *ductus pancreaticus*), познатог и као Вирсунгов панкреасни канал, и споредног канала (лат. *ductus pancreaticus accessorius – Santorini*). Главни изводни канал панкреаса се пружа његовом дужином и у њега се уливају мањи одводни канали. Главни изводни канал панкреаса (лат. *ductus pancreaticus*) се пружа готово целом дужином панкреаса, све до врата где се савија и улива у *ductus choledochus*. Канали *ductus pancreaticus* и *ductus choledochus* се уливају у дуоденум где на заједничком месту формирају Ватерову ампулу (лат. *ampulla hepatopancreatica*) (21). Панкреас инервишу панкреасни плексус, цилијачна ганглија и нерв луталац.



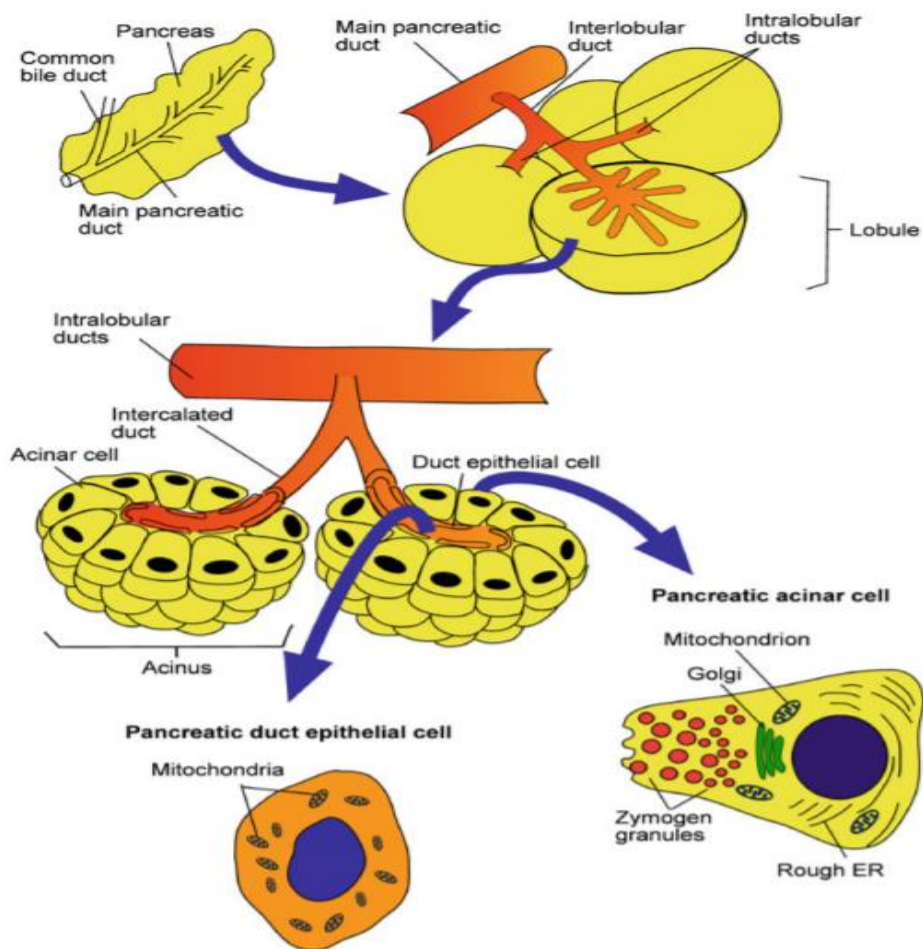
Слика 2. Изводни канали панкреаса, преузето из (21)

1.1.2. Хистолошка грађа панкреаса

Екзокрини панкреас се састоји од лобуса чији се изводни канали уливају у главни панкреасни канал. Лобуси су изграђени од ацинуса и изводног дукталног система (Слика 2). Ћелије ацинуса луче ензиме панкреасног сока, док епителне ћелије изводног дукталног система луче воду и бикарбонате.



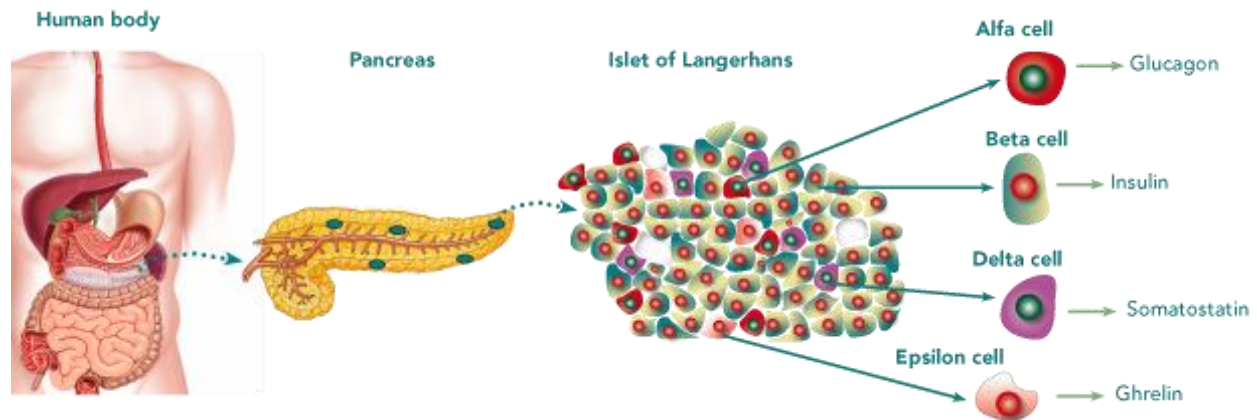
Слика 3. Хистолошка грађа панкреаса: а) ацинус, б) Лангерхансово острвце, преузето из (23).



Слика 4. Шематска грађа егзокриног панкреаса, преузето из (24)

У састав панкреасног сока улазе ензими за варење хране попут трипсина, химотрипсина, карбоксипептидаза а и б, панкреасна амилаза и липаза. Улога протеолизичких ензима панкреаса је у варењу протеина. У ћелијама ацинуса се поред ензима излучују и инхибитори који спречавају превремену активацију панкреасних ензима. Протеолитички ензими захтевају накнадну активацију након излучивања. Такав је трипсиноген који под утицајем ензима ентерокиназе у дуоденуму прелази у активну форму трипсин. Под утицајем трипсина химотрипсиноген прелази у своју активну форму химотрипсин. Карбоксипептидаза А и Б и еластаза свој активан облик стичу под утицајем трипсина. За разлику од протеолитичких ензима панкреаса амилаза се излучује у активном облику и учествује у процесу варења скроба и гликогена разлажући ове молекуле до глукозе, малтозе и декстрина. Липазе су одговорне за хидролизу триглицерида на моноглицериде и масне киселине. Фосфолипаза захтева претходну активацију трипсином како би испољила своју улогу у процесу разлагања фосфолипида (25).

Ендокрини панкреас се састоји од групе ћелија које чине Лангерхансова острвца. Лангерхансова острвца се састоје из пет врста ћелија: α ћелије, β ћелије, δ ћелије, ϵ ћелије и ПП ћелије.



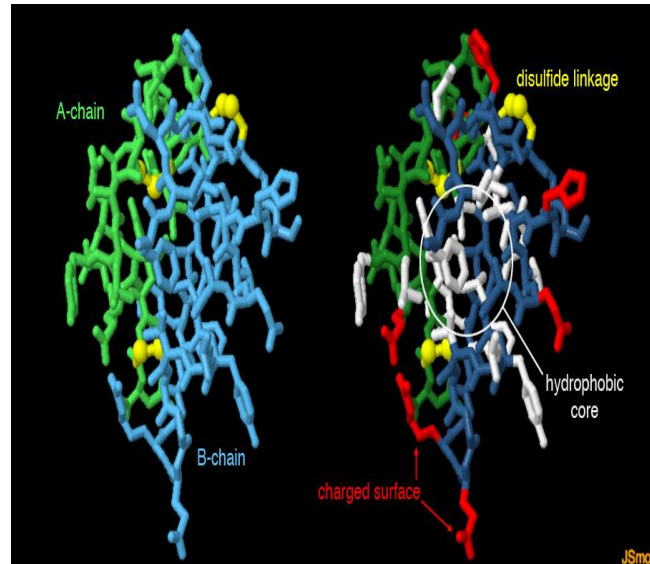
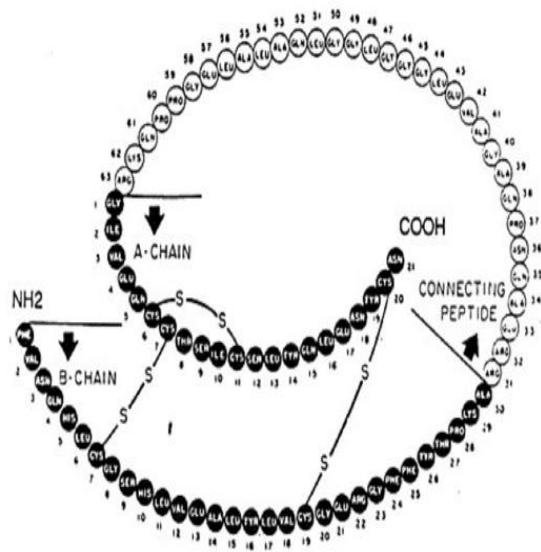
Слика 5. Грађа Лангерхансовог острва, преузето из (26)

α ћелије Лангерхансових острваца луче глукагон, β ћелије луче инсулин, δ ћелије излучују соматостатин, ϵ ћелије секретују грелин док ПП ћелије излучују панкреасни полипептид. Улога инсулина заснива се на регулисању нивоа глукозе у плазми крви и олакшавању транспорта глукозе у ћелије. Инсулин има улогу и у инхибицији

гликогенолизе, синтези кетонских тела и стимулацији синтезе протеина. Глукагон кога излучују α ћелије Лангерхансових острваца има за улогу такође да контролише ниво глукозе у крви. За разлику од инсулина који снижава ниво глукозе у крви, глукагон повећава концентрацију глукозе у крви процесима гликогенолизе и гуконеогенезе. По својој улози соматостатин је паракрини хормон кога излучују δ ћелије Лангерхансових острваца и који регулише лучење инсулина и глукагона. Панкреасни полипептид учествује у регулацији секреције и ендокриног и екзокриног дела панкреаса. Панкреасни полипептид утиче на ниво гликогена у јетри и на секрецију ензима желуца и дванаестопалачног црева (25).

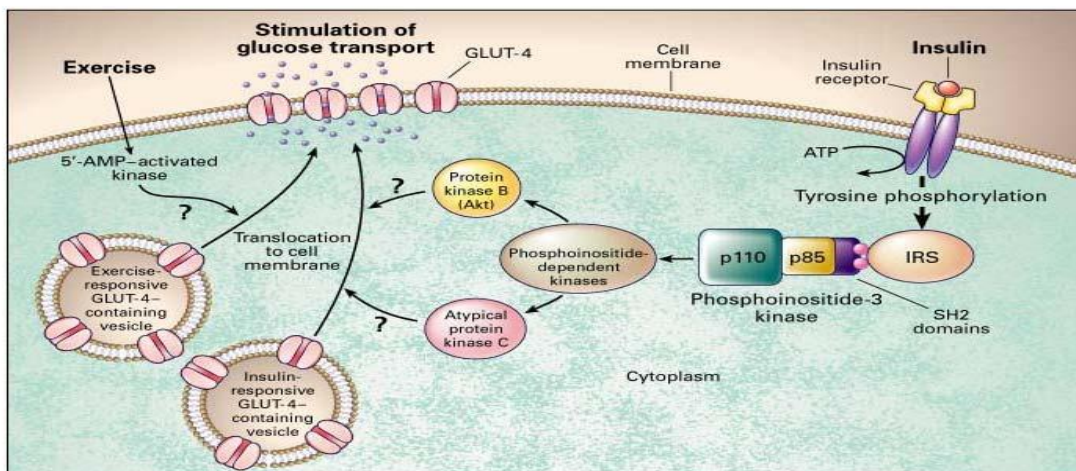
1.1.3. Инсулин

Хормон инсулин открили су Фредерик Бантин (Frederick G. Banting), Чарлс Бест (Charles H. Best) и Џон Маклеод (John J.R. Macleod) 1921. године на Универзитету Торонто. Инсулин у пречишћеном облику изоловао је Џејмс Колип (James B. Collip). До открића инсулина и добијања његове чисте форме особе оболеле од дијабетеса тип 1 нису могле да живе дуже од годину дана (27). Откриће инсулина представља једно од највећих открића XX века. Инсулин представља ендокрини хормон којег луче β -ћелије Лангерхансових острваца у панкреасу. Основна улога инсулина јесте регулисање метаболизма угљених хидрата. По својој структури инсулин је протеин који се састоји из 51 аминокиселине чија молекуларна маса износи 6000 Да. Људски инсулин се састоји од А и Б ланца. А ланац се састоји од 21 аминокиселине, док се Б ланац састоји од 30 аминокиселина (слика 7). Ова два ланца су међусобно повезана двома дисулфидним везама. Прва дисулфидна веза се налази између CysA7-CysB7, док је друга лоцирана између CysA20-CysA1. Додатна интрасулфидна веза се налази у А ланцу и спаја CysA6 и CysA11 аминокиселине (28).



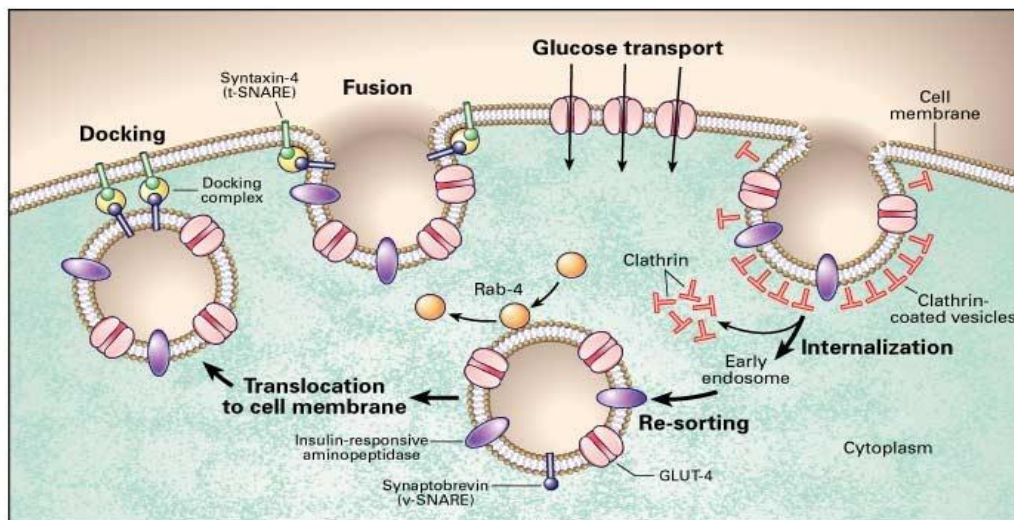
Слика 7. Грађа инсулина, преузето из (28,29)

Биосинтеза инсулина се одвија у неколико фаза. Ћелије синтетишу нешто дужи облик инсулина, који се назива препроинсулин изграђен од 110 аминокиселина. У следећој фази препроинсулин се обрађује у ендоплазматском ретикулуму и трансформише у проинсулин. Овај облик инсулина се у Голџијевом апарату преводи у мономер инсулина, активни облик самог молекула, након чега се путем егзоцитозе инсулин излучује из ћелије у капилярну мрежу Лангерхансових острваца (28).



Слика 8. Сигнали пут инсулина, преузето из (30)

Своју активност инсулин започиње везивањем за инсулински рецептор смештен у плазма мембрани ћелије. Овај рецептор представља хетеротетрамерни тирозин киназни рецептор који се састоји од две екстрацелуларне α субјединице и 2 β трансмембранске субјединице, од којих свака поседује тирозин киназни домен. Постоје две изоформе инсулинског рецептора А и Б, међутим у ћелијама јетре, мишића и у масном ткиву примарно је експримирана Б изоформа. Изоформа А инсулинског рецептора се углавном јавља током феталног развоја. Место везивања инсулина је α субјединица инсулинског рецептора. Везивање инсулина за α субјединицу доводи до конформационих промена рецептора које изазивају промене у β субјединици. Конформационе промене у субјединицама инсулинског рецептора узрокују аутофосфорилацију тирозина у овим субјединицама. Инсулински рецептор у присуству инсулина фосфорилише супстрат инсулинског рецептора одговоран за активацију 2 сигнална пута. Фосфатидилинозитол 3-киназа/протеинска киназа Б (PI3K/Akt) сингални пут је одговоран за метаболичке ефекте инсулина. Други сингални пут подразумева Ras/протеинска киназа пут који је активиран митогенима (МАРК), важан за раст и диференцијацију ћелија (Слика 8) (28,31).



Слика 9. Механизам транслокације GLUT4 до плазма мембране, преузето из (30)

Улазак глукозе у ћелије се одвија помоћу глукозних транспортних протеина (GLUT). Постоји укупно 14 типова глукозних транспортних протеина у ћелијама сисара познатих као GLUT протеини. Поред GLUT протеина, у ћелијама сисара су откривени и

натријум зависни котранспортери глукозе (SGLT). Слични по својој структури ови глукозни транспортни протеини се разликују по сингалним путевима и распрострањености у ткивима. Услед инсулинске стимулације преко инсулинског рецептора и једног од 2 наведена сигнална пута глукоза транспортни протеини из везикула се транслоцирају до ћелијске мембране где везују глукозу која ће бити даље искоришћена за метаболичке потребе ћелије. Најважнији транспортни протеин глукозе у ћелијама сисара је GLUT4 чија транслокација до плазма мембране зависи од активности протеин киназе Б (30,32,33).

1.2. Дијабетес

Развој дијабетеса представља резултат хроничне инсулинске резистенције, смањене функције и/или броја β -ћелија панкреаса. У погледу клиничких манифестација поремећаја метаболизма глукозе разликују се два клиничка ентитета: преддијабетес и дијабетес.

1.2.1. Преддијабетес

Пре самог развоја дијабетеса јавља се стање које се означава као преддијабетес. Преддијабетес се најчешће дефинише као стање током кога је ниво глукозе у крви изнад физиолошких вредности али испод оних вредности глукозе карактеристичних за сам дијабетес. Постојање преддијабетесног стања не подразумева и појаву дијабетеса. Оно што карактерише преддијабетес јесу повишене вредности глукозе наташте и поремећај толеранције глукозе који се развија услед резистентности ћелија ендокриног панкреаса на инсулин и њиховог неправилног рада (34). Промена животног стила и темпа живота услед све брже урбанизације праћена повећаним уносом биљних масти и оптерећења организма глукозом довела је последњих деценија до наглог повећања броја особа са дијагностикованим преддијабетесним стањем. Један од првих знакова преддијабетеса су резистентност на инсулин и неправилно функционисање β -ћелија панкреаса (35).

Оно што је карактеристично за особе са преддијабетесом је повећана склоност ка развоју поремећаја као што су дијабетесна ретинопатија, неуропатија, нефропатија и макроваскуларне промене крвних судова. Поред наведених поремећаја особе са дијагностикованим преддијабетесним стањем имају такође повећан ризик од развоја срчаних

обољења као и појаве инфаркта миокарда и уопште повећане смртности у поређењу са особама без инсулинске резистенције. Повишење нивоа глукозе у крви код трудница касније у току трудноће може довести до развоја дијабетеса. У готово 25% случајева преддијабетес се током 3 до 5 година развија у дијабетес типа 2 (36). Овај податак указује на потребу раног откривања преддијабетеса, правовремене терапије са циљем превенције настанка дијабетеса.

У дијагностици преддијабетеса најчешће су у употреби методе које су базиране на мерењу нивоа глукозе у крви које подразумевају претходну припрему пацијента кроз орално оптерећење раствором глукозе. Један од начина утврђивања преддијабетеса јесте и мерење нивоа гликолизираниог хемоглобина (HbA1c - гликозиларни хемоглобин). Предност ове методе се заснива на чињеници да она указује на ниво глукозе у крви у протеклих 8-12 недеља. Из тог разлога она представља много сигурнију методу одређивања поремећаја метаболизма глукозе којим се гликемија прати дужи временски период за разлику од теста оптерећења глукозом који указује на тренутно стање способности организма да метаболише глукозу. Међутим Светска здравствена организација не препоручује употребу ове методе у постављању дијагнозе преддијабетеса због разлика у нивоу HbA1c код различитих етичких група и разлика у варијантама хемоглобина. Још један од разлога зашто се одређивање вредности HbA1c не користи јесте технички проблем у неразвијеним земљама (36). Према Америчкој асоцијацији за дијабетес (енгл. American Diabetes Association-ADA – Америчка асоцијација за дијабетес) вредности HbA1c од 5,7% до 6,4% (39–47 ммол/л) поред поремећаја вредности гликемије наше и поремећене толеранције глукозе указују на постојање преддијабетеса (37). У дијагностиковању поремећаја метаболизма глукозе и поремећаја толеранције глукозе наше, који указују на преддијабетес, саветује се и извођење теста оралног оптерећења глукозом. Вредности нивоа глукозе у крви у случају поремећаја метаболизма глукозе, према водичима Светске здравствене организације, се крећу у вредности од 6,1-6,9 ммол/л (110 to 125 мг/дл). Ниво глукозе код поремећаја толеранције глукозе наше након 2 сата у крви креће се у распону од 7,8-11,00 ммол/л након оралног уноса 75 г глукозе током теста оралног оптерећења глукозом (38).

Према подацима Међународне федерације за дијабетес преваленција поремећаја метаболизма глукозе као показатеља преддијабетеса разликује се међу појединим

земљама (Слика 6). Највиша преваленција среће се у Северној Америци и Карибима (10,4%), док су најниже вредности забележене у југоисточној Азији (6,2%). Наведена преваленција поремећаја толеранције глукозе је међутим променљива и зависи од много фактора. Тако се на пример у Азији проценат особа са преддијабетесом повећава са старосном групом (39).

Table 1	
World estimates of IGT (adjusted to the world population) by the IDF region	
Region	Prevalence
Africa	8.1%
Europe	8.9%
Middle East and North Africa	8.2%
North America and Caribbean	10.4%
South and Central America	7.5%
South East Asia	6.2%
Western Pacific	7.7%

Слика 6. Процена поремећај толеранције глукозе на светском нивоу према подацима Међународне федерације за дијабетес за поједине регионе света, преузето из (39)

На основу приказаних података може се закључити да вредности глукозе у преддијабетесу нису само условљене степеном развоја неке земље. Неки од фактора који могу да утичу на наведене вредности нивоа глукозе током преддијабетеса су и методе примењене у откривању преддијабетеса, референтне вредности лабораторија које врше испитивање, као социо-економско стање, доступност здравствених услуга, године старости, начин исхране, начин живота, пол, карактеристике тестиране популације, итд. (36).

1.2.2. Дијабетес (*diabetes mellitus*)

Дијабетес мелитус је хронична болест коју карактерише поремећај метаболизма угљених хидрата, масти и протеина услед недовољног лучења инсулина или смањене осетљивости ћелија на инсулин, при чему је хипергликемија један од примарних показатеља дијабетес мелитуса (40). Сматра се да од укупног броја оболелих од дијабетеса, 90% чине пацијенти који болују од дијабетес мелитуса типа 2 („инсулин независни тип“). Дијабетолошки савез Србије наводи да у Србији од дијабетеса болује 770 000 особа, док учесталост оболевања износи 8,7% код мушкараца и 8,5% код жена, а стопа морталитета

износи 14,8% на 100 000 становника. Иако се болест данас лако дијагностикује, чак 43% пацијената који живе у Србији нема постављену дијагнозу (41).

Поред наведене дефиниције да је дијабетес поремећај у метаболизму угљених хидрата, масти и протеина услед недовољног лучења инсулина или реизистености ћелија на деловање инсулина, услед чега се јавља изражена хипергликемија, поједине дефиниције се базирају и на социјалном и индивидуалном приступу дефинисања овог обољења. Са социјалног аспекта дијабетес представља отпорењење за економско стање друштва због трошкова терапије као и прераних смртних исхода који настају услед компликација изаваних самом болешћу. Из перспективе пацијента као појединца дијабетес представља доживотно стање које захтева посебан режим живота и свакодневну терапију уз контролисање нивоа глукозе у крви. Са овог становишта дијабетес представља поремећај не само са медицинског аспекта, већ и специфично стање појединца и друштва (42).

Постоје различити облици дијабетеса који се могу груписати у следеће категорије:

1. *Diabetes mellitus* тип 1,
2. *Diabetes mellitus* тип 2,
3. Гестациски дијабетес,
4. Специфични облици дијабетеса.

Класификација дијабетеса на различите типове има првенствено терапијски значај. Пре је постојало уврежено мишљење да се дијабетес тип 1 јавља само код деце, док је дијабетес тип 2 заступљен само код одраслих особа. Данас дијабетес тип 1 може да се јавља и код млађих и код старијих особа. Може се рећи да не постоји јасно правило о развоју дијабетеса тип 1 код појединаца без обзира на старосну доб. Оно што се јасно разликује у развоју клиничке слике дијабетеса тип 1 код деце у односу на одрасле јесте јасан развој клиничке слике која готово увек прати појава полиурије, полидипсије и код готово трећине деце долази до развоја дијабетичне кетоацидозе. Код одраслих развој дијабетеса се разликује и врло често је сам почетак асимптоматски (43).

Diabetes mellitus тип 1 се карактерише аутоимунском деструкцијом β ћелија панкреаса због чега се овај тип дијабетеса карактерише потпуном немогућношћу секреције

инсулина и његовом дефицијенцијом. Развој дијабетеса тип 1 се карактерише са три фазе. У првој фази развоја дијабетес тип 1 се карактерише присуством аутоимунских маркера који укључују антитела на ћелије острваца и аутоантитела на глутамат декарбоскилазу, инсулин, тирозин фосфатазе IA-2, IA-2 β и цинк транспортер ZnT8. Кроз фазу два развоја дијабетеса тип 1 и даље је повећано присуство антитела и аутоантитела са већ израженијим поремећајем нивоа глукозе крви. Следећи корак у потврђивању треће фазе развоја дијабетеса тип 1 се заснива на спровођењу тестова оптерећења глукозом, анализом гликозилираног хемоглобина, појавом клиничких симптома и постављањем коначне дијагнозе дијабетеса тип 1 (42,43).

Идиопатски *diabetes mellitus* тип 1 је неспецифичан облик дијабетеса који се карактерише одсуством секреције инсулина, али код пацијената не постоји јасна етиологија развоја. Код особе оболелих од овог облика дијабетеса докази о аутоимуности β ћелија нису уочљиви. Особе чији преци потичу из Африке и Азије могу повремено да развијају епизоде дијабетесне кетоацидозе уз промену нивоа инсулинске дефицијенције између епизода кетоацидоза. Пошто су узроци оваквог облика дијабетеса непознати, потребне су додатне генетске анализе које би могле да утврде саму етиологију (43).

Diabetes mellitus тип 2 представља поремећај у функционисању β ћелија Лангерхансових острваца уз појаву променеиве резистениције на инсулин (42). Дијабетес тип 2 је најзастуљенији облик дијабетеса у људској популацији (90-95%). Узрок развоја дијабетеса тип 2 још увек није тачно јасан иако поједина здравствена стања могу довести до дијабетеса тип 2. Оно што је карактеристично за особе које пате од дијабетеса тип 2 јесте да код њих не постоји аутоимунска деструкција β ћелија, већ је присутан неправилан рад β ћелија или смањена остелјивост (резистенција) других ћелија на деловање инсулина. Ови поремећају се најчешће јављају код особа које су гојазне. Особе које пате од инсулинске резистенције, а нису гојазне, најчешће имају неправилан распоред масних наслага нарочито у и око абдомена. Уз смањену физичку активност и неправилан режим исхране развој дијабетеса тип 2 код ових особа је очекиван исход. Особе са дијабетесом имају повећан ризик од развоја бројних компликација. Константно висок ниво глукозе у крви може довести до оштећења у читавом организму, а посебно су значајна оштећења циљних органа попут срца, очију, бубрега, нерава и крвних судова. Поред тога, код особа оболелих од

дијабетеса постоји већи ризик од развоја инфекција. У скоро свим земљама са високим дохотком, дијабетес је водећи узрок кардиоваскуларних болести, слепила, бубрежне инсуфицијенције и ампутације доњих екстремитета. Кардиоваскуларне болести чине 1/3-1/2 смртних исхода повезаних са дијабетесом. Дијабетесна полинеуропатија која се јавља код сваке друге особе оболеле од дијабетеса, уколико болест није адекватно контролисана, узрокује настанак дијабетесног стопала и компликација на доњим екстремитетима које погађају 40-60 милиона пацијената оболелих од дијабетеса на глобалном нивоу. Дијабетесна ретинопатија представља најчешћи узрок слепила радно активног становништва. Поред хипертензије, дијабетес сам или у комбинацији са хипертензијом је узрок развоја терминалне фазе бубрежне болести. Особе оболеле од дијабетеса такође имају повећан ризик од упале десни и настанка оралне кандидијазе, уколико се ниво глукозе у крви не контролише правилно (1). Иако постоји дисфункција β ћелија у погледу секреције инсулина и поремећај осетљивости других ћелија на деловање инсулина, у већини случајева дијабетес тип 2 је стање које може да се коригује адекватним начином живота, исхраном и терапијом. Ризик од развоја дијабетеса тип 2 се повећава са годинама старости, чешћи је код жена са позитивном анамнезом у погледу гестацијског дијабетеса, као и код појединих етничких група (Индијци, Афроамериканци, Азијати Американци, Шпанци, Латино Американци). Развој дијабетеса тип 2 се одликује генетским предиспозицијама. Врло често се овај тип дијабетеса јавља код особа које су у сродству (прво или друго колена) имале особе већ оболеле од дијабетеса тип 2 (43).

Гестацијски дијабетес се дефинише као поремећај метаболизма угљених хидрата који се први пут јавља током трудноће без претходно регистроване хипергликемије. Гестацијски дијабетес може да доведе од озбиљних последица како по плод тако и по здравље мајке, због чега је неопходно током трудноће вршити проверу нивоа глукозе у крви. Гестацијски дијабетес се у већини случајева повлачи након порођаја, међутим мајке са дијагностикованим гестацијским дијабетесом имају већу шансу за настанак дијабетеса тип 2 током живота (42). Процењује се да је 2019. године 15,8% (20,4 милиона) новорођенчади било изложено утицају хипергликемије током мајчине трудноће (1). Установљено је да се хипергликемија и нежељени исходи током трудноће повећавају нарочито током периода од 24. до 28. недеље гестације (43).

Заступљеност дијабетеса у светској популацији показује тренд сталног повећања. У својој студији Saeidi и сар., наводе да је током 2019. године на основу доступних података на светском нивоу преваленција износила 9,3% што чини 463 милиона људи широм света. Процењује се да ће до 2030. године тај проценат износити 10,2% или 643 милиона људи и 10,9% или 700 милиона људи до краја 2045. године (44).

Поред наведених облика дијабетеса постоје и други мање познати облици као што су: дијабетес младих у зрелијим година, неонатални дијабетес, Волфрам синдром (енгл. Wolfram syndrome), Алструм синдром (енгл. Alström Syndrome), латентни аутоимуни дијабетес одраслих особа, тип 3ц дијабетес, дијабетес изазван стероидима, дијабетес цистичне фиброзе (45).

1.3. Црни дуд (*Morus nigra* L.)

Regnum: Plantae – биљке

Subregnum: Viridiplantae – зелене биљке

Infrangnum: Streptophyta – копнене биљке

Superphylum: Embryophyta

Phylum: Tracheophyta – васкуларне биљке, трахеофите

Subphylum: Spermatophytina – сперматофите, сјеменице

Classis: Magnoliopsida – дикотиледоне биљке

Superordo: Rosanae

Ordo: Rosales

Familia: Moraceae – породица дуд

Genus: *Morus* L. – дуд

Species: *Morus nigra* L. – црни дуд (46)



Слика 10. Црни дуд (*Morus nigra*) листи и плодови, преузето из (47,48)

Биљке породице дуда воде порекло из Азије, источне и централне Кине и Ирана. У свим осталим земљама биљке породице дуда су увезене са циљем узгајања хране за свилене бубе. На Балканском полуострву су заступљени црни, бели и црвени дуд. Припадници породице дуда су дрвенасте, ређе жбунасте, листопадне биљке (49). Због своје брзине ширења и отпорности на различите временске услове и болести у појединим земљама попут Бразила црни дуд се сматра инвазивном врстом (50).

Црни дуд (*Morus nigra* L.) (Слика 10) који потиче из породице Морасеае, рода *Morus*, листопадно је дрво које успева у различитим климатским условима (34). Биљке из породице Морасеае су угланом дрвенасте биљке. За биљке ове породице је карактеристично да у секундарној кори имају млечне цеви из који се добија каучук, као што је случај са дрветом гумијевац (*Ficus elastica*).

Цвет црног дуда је једнополан, док сама биљка може бити једнодома или дводома. Цветови су груписани у ресасте цвасти. Мушке цвасти су дуже у односу на женске које имају округласт облик. Опрашивање је углавном помоћу ветра.

Листови црног дуда су прости са јасно развијеним лисном основом, дршком и лисном плочом. Листови су правилно распоређени, широко јајасте, при основи срцасти, по ободу назубљени. Лице листа је тамније зелене боје, док је наличје листа храпаво.

Плод дуда се назива дудиња. Плод црног дуда је карактеристичне тамне до готово црне боје, по својој величини знатно већи у односу на плодове белог и црвеног дуда.

Укус плодова црног дуда је такође квалитетнији у поређењу са плодовима белог и црвеног дуда. Величина плода варира од 1,5 до 2 цм. Берба плодова се одвија од јуна до августа. Плодови се користе у исхрани, спремању мармелада, џемова, ракије или се суше и тако чувају. Плодови дуда се карактеришу високим садржајем макро- и микроелемената попут калијума (K), натријума (Na), калцијума (Ca), цинка (Zn), гвожђа (Fe), никла (Ni) (49). Плодови црног дуда се поред наведених хемијских елемената одликују и високим саставом фенолних једињења и антоцијана. Због својих лековитих својстава црни дуд се у земљама Азије користи као лек у традиционалној медицини за снижавање телесне температуре, против високог крвног притиска, у лечењу оштећења јетре и као диуретик (51).

На основу досадашњих истраживања установљено је да се црни дуд карактерише и изузетно широким спектром биолошких и фармаколошких активности попут антиоксидативних, антиинфламаторних, антидијабетесних, антиканцерогених, антихиперлипидемијских, антимикробних активности, а такође доводи до смањења прекомерне телесне масе (52).

1.3.1. Хемијски састав биоактивних компоненти црног дуда

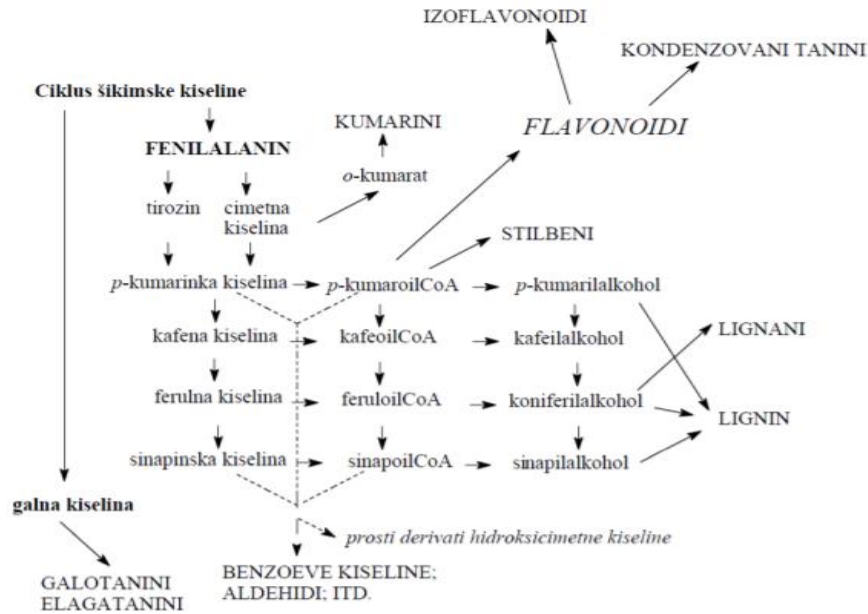
Учесталост појаве дијабетеса, али и озбиљност последица овог обољења усмеравају научноистраживачке студије ка испитивању биљака са потенцијалним антидијабетесним деловањем. Царство биљака представља неисцрпну лабораторију биоактивних компоненти и недовољно истражено поље у погледу биљака које би од користи биле у лечењу дијабетес мелитуса. Сматра се да је од процењеног броја од 250 000 врста виших биљака, мање од 1% испитано у погледу фармаколошке активности која би била од користи у лечењу дијабетеса (53). Једна од биљака којој се посвећује све већа пажња јесте црни дуд.

Црни дуд (*Morus nigra* L.), потиче из породице Морасеае, рода *Morus*, листопадно је дрво које успева у различитим климатским условима (8). Активни принципи су најзаступљенији у дудињама, листу и кори црног дуда. Хемијски састав је разноврстан и обилује мноштвом секундарних метаболита међу којима су најзначајнији флавоноиди, антоцијани, хидроксистилбени и алкалоиди (8,54). Међу доминантним флавоноидима кверцетином и рутином, и фенолним антоцијанским једињењима присутни су и фолна

киселина, аденин, витамини Ц, витамин Б2, аспарагинска, јабучна и лимунска киселина, каротин, пектин, танини, витамини и минерали (12,55–57). Постоје подаци који говоре о употреби биљкака рода *Morus* као антидијабетесних фитопрепарата у традиционалној медицини, док публикована научна експериментална истраживања показују назнаке постојања антиоксидативне, антихипергликемијске и хепатопротективне активности различитих екстраката црног дуда. Ови резултати служе као путоказ за додатна испитивања у погледу антидијабетесног потенцијала црног дуда у превенцији и лечењу дијабетес мелитуса (9,10,12,58). Употреба екстракта листа црног дуда богатог флавоноидима доводи до смањења нивоа глукозе и повећања нивоа инсулина у крви код пацова третираних стрептозотоцином. Поједина фенолна једињења и изпорени флавоноиди изоловани из вршних гранчица црног дуда су такође показали антидијабетесну активност. (52).

На основу хемијских анализа утврђено је да плод црног дуда садржи антоцијане попут цијанидина и пеларгонидина, који су карактеристични само за плодове црног дуда. Од флавоноида у плоду црног дуда су заступљени кверцетин, кемферол и рутин. У плодовима су идентификована и три типа аминокиселина 1-деоксидојиримицин, Н-нонил деоксидојиримицин и фагомин. Ова три типа аминокиселина се могу наћи и у плодовима белог дуда. За наведене аминокиселине је утврђено да показују инхибиторно дејство према ензиму α -глукозидази, те на тај начин утичу на гликемију. Пиперидински алкалоиди и изомери кафеене киселине су такође идентификовани у плодовима црног и белог дуда (59). Димитријевић Д. наводи детаљнију анализу фенолних једињења заступљених у плоду, листу, корену, и стаблу различитих врста дудова од којих је овде само наведен састав фенолних једињења у црном дуду: цијанидин-3-гликозид, камферол-3-О-рутинозид, рутин, кверцетин, кверцетин-3-О-глукозид, кверцетин-3-О-рутинозид, катехин, кафеена киселина, ферулна киселина, хлорогенска киселина, *n*-кумаринска киселина, *m*-кумаринска киселина, *o*-кумаринска киселина, ванилинска киселина, гална киселина (49). Плодови црног дуда су изузетно богати и масним киселинама попут линолне киселине, миристинске киселине, стеаринске киселине, олеинске киселине, палмитинске киселине и наонадеканске киселине. Линолна киселина као есенцијална масна киселина је од посебне важности за човеково здравље с обзиром да се не може синтетисати у организму. Оно што је од посебне важности јесте разлика у количини заступљених масних киселина, β -каротена и флавоноида међу

различитим генотиповима црног дуда (49,60). Разлике у квалитативним и квантитативним особинама биоактивних компоненти црног дуда такође наводе и други аутори што може да се искористи ради екстракције најпотентнијих једињења приликом узгоја биљака црног дуда.



Слика 11. Процес синтезе различитих фенолних једињења, преузето из (49)

Фенолна једињења су група секундарних метаболита широко распрострањених у биљном свету. Сва фенолна једињења садрже ароматични прстен који може да служи као антиоксидативно средство због хидроксилних група као донора протона што омогућује настајање мање реактивних форми феноксил радикала (61). Најзаступљенија фенолна једињења су фенолне киселине, а од флавоноида флавоноли и дихидроалкони. Фенолна једињења поседују особине киселина због дисоцијације хидроксилне групе. Једна од важних особина фенолних једињења јесте њихова способност везивања са тешким металима. У биљкама фенолна једињења се обично налазе у комбинацији са остацима сумпорне или сирћетне киселине, или шећера, када граде гликозиде.

Биосинтеза фенолних једињења почиње од шикимске киселине (Слика 11) током чега настају гална киселина, циметска киселина и протокатехинска киселина као и поједине аминокиселине попут фенилаланина. Деаминацијом фенилаланина у присуству

ензима фенилаланинамонијумлизе настаје циметна киселина од које даље настају фелилпропаноид, кумаринска киселина, кафена киселина, ферулна киселина, синапринска киселина и њихови деривати (Слика 11).

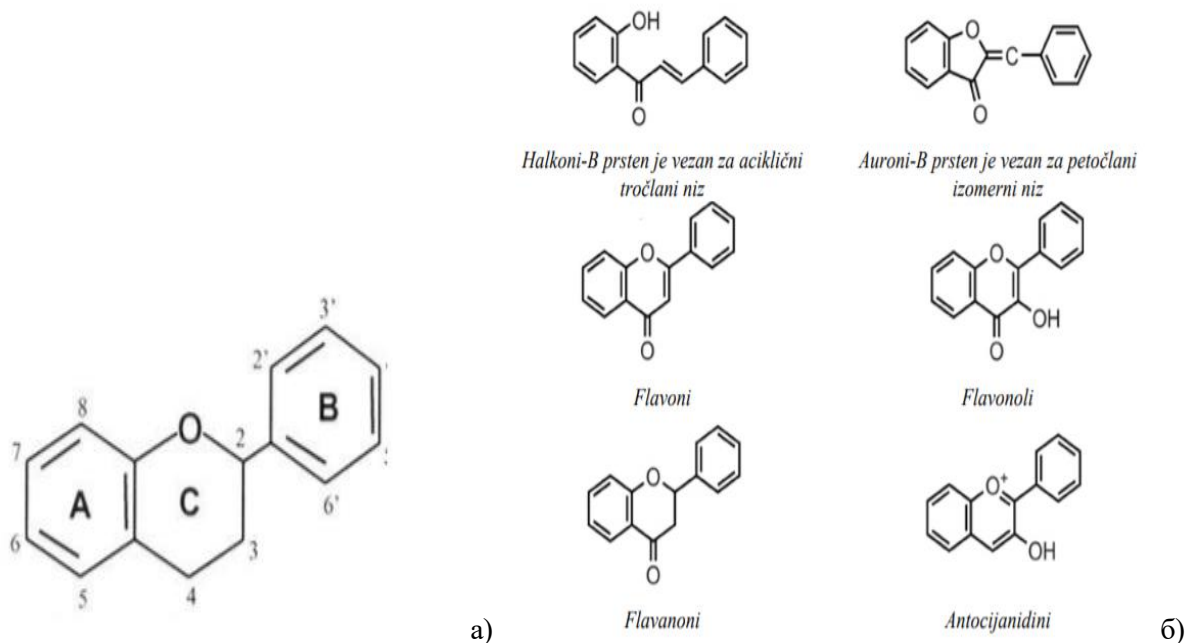
1.3.2. Полифенолна једињења

Најразноврснији и најзаступљенији секундарни биљни метаболити су полифеноли. Састојци су воћа, поврћа, лековитог, зачинског биља, алги, гљива, лишајева, маховина. Садржај фенолних једињења утиче на интезитет мириса, боје и ароме биљака, па су биљке интензивног мириса, ароме и боје најбогатије полифенолима. До сада је из биљака изоловано неколико хиљада фенолних једињења који се могу наћи у слободном облику или чешће у форми гликозида. Њихова структура се креће од једноставних једињења мале молекулске масе до комплексних једињења велике молекулске масе. У својој структури садрже ароматичан прстен са једном или више хидроксилних група. Постоје различите поделе полифенола, али најзаступљенија је класификација на основу броја угљеникових атома у основном скелету. Једноставни феноли имају основни скелет са шест угљеникових атома (C₆), флавоноиде карактерише структура основног скелета C₆-C₃-C₆, док бифлавоноиди у структури основног скелета имају (C₆-C₃-C₆)₂.

Снажно антиоксидативно дејство предстваља најзначајнију улогу полифенолних једињења. Претпоставља се да је антиоксидативна активност полифенолних једињења последица њихове способности да донирају атом водоника, а затим уклањају слободне радикале при чему настају мање реактивни феноксил радикали. Бројне су студије које доказују корист од природних полифенола у организму у погледу заштите организма од многих обољења попут атеросклерозе, различитих врста карцинома или неуродегенеративних обољења што се повезује са њиховим снажним антиоксидативним потенцијалом (62,63).

Флавоноиди су најзаступљенија полифенолна једињења која садрже 15 угљеникових атома, а у основном скелету имају C₃-C₆-C₃ (Слика 12). Флавоноиди представљају биљне секундарне метаболите присутне у листу, кори, плоду и семенкама воћа и поврћа. Ова једињења су подељена у неколико група које се међусобно разликују по оксидативном статусу прстена Ц и месту везивања Б прстена (Слика 12). Основне класе

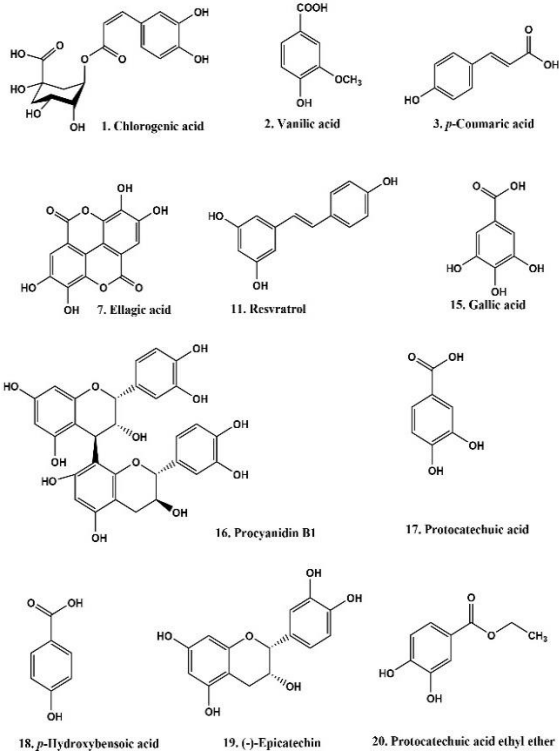
флавоноида су: флаволи, флавоноли, флаваноли (катехини), флаванони, антоцијанидини, хлакони-Б и халкони А.



Слика 12. Скелет флавоноида (а), најзастуљенији флавоноиди (б), преузето из (49)

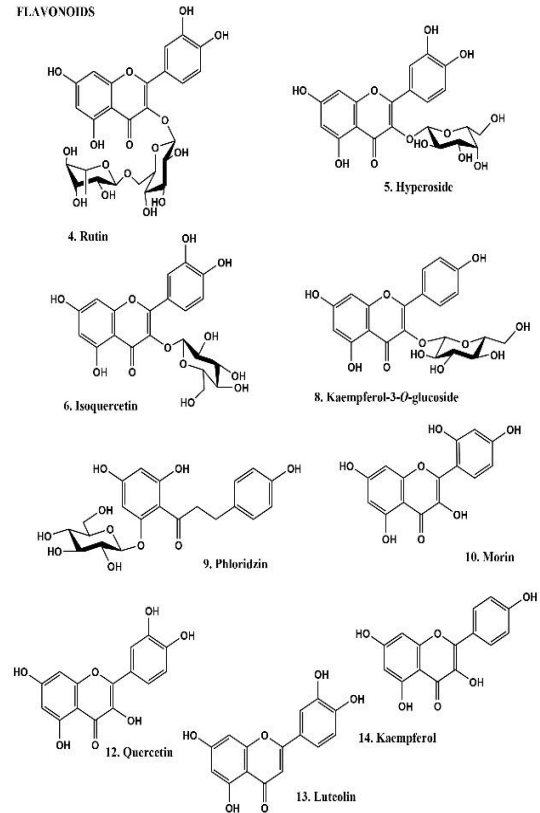
У природи су флавоноиди најчешће заступљени у виду моногликозида, нешто ређе у облици ди- и три-гликозида који најчешће настају у реакцији са Д-глукозом, Д-галактозом и Л-рамнозом. Флавоноиди представљају врло важне пигменте у биљном свету, само име им потиче од латинске речи *flavus* што значи жуто. Поред наведених група флавоноида постоје још две групе означене као изофлавоноиди и неофлавоноиди. Постоје бројне публикације о вишеструком и благотворном утицају флавоноида на организам попут антиоксидативног, хипогликемијског, антиинфламаторног, хепаторпективног, антиканцерогеног, антимикробног, антикоагулантног, кардиопротективног, диуретичког и антихипертензивног дејства (62,63).

PHENOLCARBOXYLIC ACIDS AND OTHER PHENOLS



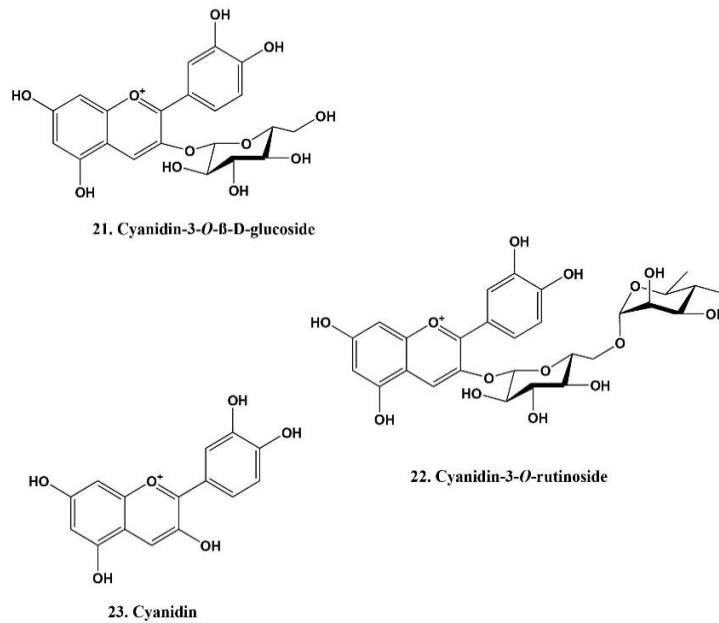
a)

FLAVONOIDS



б)

ANTHOCYANINS



в)

Слика 13. а) Фенолна јединиња, б) флавоноиди в) антоцијани изоловани из листа, коре, плода и сока црног дуда (формуле су добијене употребом Chemdraw програма)

1.3.3. Масне киселине

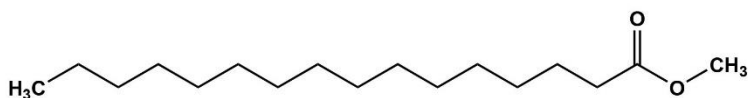
Масне киселине представљају карбоксилне киселине са угљоводоничним низом различите дужине и степена засићености који има метил групу на једном, а карбоксилну функционалну групу на другом крају молекула. У природи су широко распрострањене у слободном облику или као део комплексних липида у биљном и животињском свету, али и као саставни део људског организма где имају значајну градивну и метаболичку улогу.

Најзначајнија подела масних киселина је на засићене и незасићене масне киселине. Засићене масне киселине су засићене водоником и углавном имају раван угљоводонични низ са најчешће 12-22 атома угљеника. Незасићене масне киселине садрже двоструку везу која може бити на различитим позицијама угљоводоничног ланца који најчешће има 16-22 угљеникових атома. Положај двоструке везе утиче на физичко-хемијске особине па се тако незасићене масне киселине могу поделити на ω -3 (ако је двострука веза на положају између трећег и четвртог угљениковог атома од краја угљениковог ланца), ω -6, ω -9 и друге зависно од позиције незасићене везе у ланцу. ω -3 и ω -6 су незасићене есенцијалне масне киселине које људски организам не може сам синтетисати и потребно их је унети храном која их садржи. Такође, незасићене масне киселине карактеришу два изомера *cis* и *trans*.

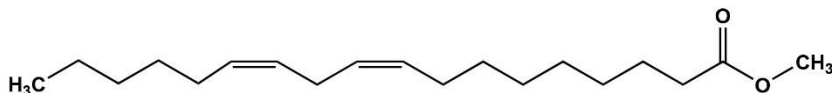
У природи се незасићене масне киселине готово увек јављају у облику *cis* изомера, док се *trans* изомер углавном добија у индустрији хране. Извори засићених масних киселина су масти животињског порекла, биљна уља и пуномасни млечни производи. Најзаступљеније засићене масне киселине су палмитинска, стеаринска и миристинска киселина. Извори мононезасићених масних киселина од који су најзаступљеније олеинска (ω -9) и палмитолеинска киселина (ω -7) су биљна уља попут маслиновог, сунцокретовог, репичиног и уља орашастих плодова. Од полинезасићених масних киселина линолна (ω -6) је главна незасићена масна киселина биљних липида, док је арахидонска киселина (ω -6) главна компонента мембранских фосфолипида животиња. Еикозапентаенска киселина (ω -3) и докозахексаенска киселина (ω -3) су главне масне киселине, рибе и рибљег уља и морских алги.

Масне киселине у људском организму имају бројне физиолошке улоге и представљају значајан извор и депо енергије, имају важну улогу у расту и развоју организма јер улазе у састав хормона, липида, ћелијских мембрана, а учествују у регулацији генске активности. Бројне публикације наводе позитиван утицај незасићених масних киселина у погледу побољшања ендотелне функције крвних судова, кардиопротективног ефекта, антиинфламаторног, антиоксидативног, антидијабетесног, антихиперлипидемичног и антиатеросклеротског дејства (64).

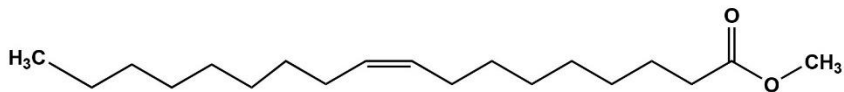
FATTY ACID METHYL ESTERS



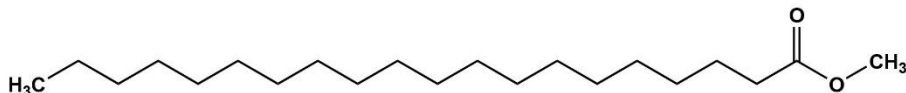
Hexadecanoic acid, methyl ester (Palmitic acid, methyl ester)



(9Z,12Z)-Octadecadienoic acid methyl ester (Linoleic acid, methyl ester)



(9Z)-Octadecenoic acid, methyl ester (Oleic acid, methyl ester)



Eicosanoic acid, methyl ester (Arachidic, methyl ester)

Слика 14. Естри масних киселина изолованих из уља семенки црног дуда (формуле добијене у употребом Chem draw програма)

Савремена конвенционална терапија дијабетеса заснива се на примени оралних антидијабетика, лекова из система хормона инкретина и инсулина. Применом поменутих група лекова мање или више успешно се контролише хипергликемија код пацијената, уз неизбежну појаву нежељених дејстава. Неки аутори скептично сматрају да ови лекови (изузев строге контроле гликемије која се постиже применом инсулина) немају потенцијал да значајно утичу на појаву и ток компликација дијабетеса (65). При неадекватној контроли дијабетеса долази до развоја компликација које карактерише оштећење и дисфункција многих органа попут ока, бубрега, срца, крвних судова и нерава. Идеалну гликемију је тешко постићи, а у исто време избећи нежељена деловања која карактеришу све расположиве лекове. Стога постоји потреба за испитивањем нових терапијских средстава која би била ефикаснија и са мање нежељених дејстава.

Биљке су одувек представљале богат извор лековитих супстанци, а бројни постојећи лекови добијени су директно или индиректно из биљака. Чак и широко коришћени антихипергликемијски лек метформин потиче из традиционалне употребе биљке ждраљевине (лат. *Galega officinalis* L., Fabace) (65). Стога се биљке могу сматрати потенцијалним извором антидијабетских лекова.

Употреба црног дуда у терапијске сврхе позната је још од античких времена. За разлику од других врста дуда, научним студијама није детаљно испитан биохемијски састав црног дуда и његов антидијабетски потенцијал. Досадашња испитивања која наговештавају антиоксидативни, антихипергликемијски и хепатопротективни ефекат црног дуда оправдавају потребу за детаљнијим испитивањима ове биљке као потенцијалног антидијабетесног агенса.

2. Циљеви рада и хипотезе

Циљеви овог истраживања били су следећи:

1. Извршити хемијску карактеризацију екстраката коре, листа, плода, семенки и сока црног дуда ради детекције присуства активних супстанци којима се могу приписати претпостављени фармакодинамски и хистолошки ефекти.
2. Утврдити да ли експерименталне групе животиња третиране екстрактима црног дуда имају ниже вредности гликемије у односу на одговарајуће контролне групе.
3. Утврдити да ли постоји боља очуваност морфолошких карактеристика у хистолошкој структури ткива панкреаса при стрептозоцином изазваном дијабетесу код експерименталних група животиња третираних екстрактима црног дуда у поређењу са одговарајућом контролном групом.
4. Утврдити да ли постоји антиоксидативни потенцијал испитивних екстраката црног дуда *in vitro* и *in vivo* методама.

Очекивани резултати (хипотезе) били су:

1. Хемијски састав испитиваних екстраката црног дуда показује присуство активних супстанци којима се могу приписати утврђени фармакодинамски и хистолошки ефекти.
2. Експерименталне групе животиња третиране екстрактима црног дуда имају ниже вредности гликемије у односу на одговарајуће контролне групе.
3. Постоји боља очуваност морфолошких карактеристика у хистолошкој структури ткива панкреаса при стрептозоцином изазваном дијабетесу код експерименталних група животиња третираних екстрактима црног дуда у односу на одговарајуће контролне групе.
4. Испитивани екстракти црног дуда поседују антиоксидативни потенцијал.

3. Материјал и методе

3.1. Биљни материјал

За припрему екстраката чији су ефекти испитивани током експеримента коришћени су листови, кора, плод и семенке црног дуда. Листови, кора и плод црног дуда сакупљени су на територији Босне и Херцеговине, Бијељина, у јуну 2015. године. Идентификација материјала је извршена на Ботаничком одсеку Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, а ваучери су депоновани у хербаријум поменутог одељења.

Након сакупљања листови црног дуда сушени су на ваздуху на собној температури до постизања константне масе, а затим складиштени у папирним врећама на сувом и тамном месту, на собној температури, заштићени од влаге и светлости. Пре испитивања припремљен је етанолни екстракт листа црног дуда (ЕЕЛЦД) поступком Сокслет екстракције.

Кора црног дуда добијена је ручним одстрањивањем коре са младих грана након чега је сушена на собној температури до постизања константне масе. Узорци су затим складиштени у папирним врећама на сувом и тамном месту, на собној температури, заштићени од влаге и светлости. Пре испитивања припремљен је етанолни екстракт коре црног дуда (ЕЕКЦД) поступком Сокслет екстракције.

Свеж, зрео плод црног дуда након брања је замрзнут и складиштен у стакленим теглама на температури од $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Пре испитивања припремљен је етанолни екстракт плода црног дуда (ЕЕПЦД) поступком Сокслет екстракције.

Сок црног дуда (СЦД) добијен је ручним цеђењем кроз сито свеже убраних, зрелих плодова, затим је сок замрзнут и складиштен у стакленој флаши на температури од $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ до почетка испитивања.

Семенке црног дуда су добијене ручним цеђењем плода и одстрањивањем остатка тропа. Семенке су затим сушене на собној температури до константне масе и складиштене у стакленој теглици на собној температури. Пре испитивања припремљено је уље семенки црног дуда (УСЦД) поступком екстракције суперкритичним угљен-диоксидом (CO_2).

3.2. Експерименталне животиње

У огледу су коришћени здрави, полно зрели мишеви *NMRI Naan* соја, мушког пола, телесне масе 20–30 грама одабрани методом случајног избора. Порекло животиња је одгајивачница Војно-техничког института, Београд. Протокол огледа одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду, одобрење број 01-90/17-1, односно Управа за ветерину, Министарства пољопривреде и заштите животне средине, број решења: 323-07-09649/2015-05. Током експеримента животиње су боравиле у *Uni protect Nem* (Ehret, Emmendingen, Germany) ормарима за чување лабораторијских животиња у стандардним лабораторијским условима у штали Завода за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду. Температура на којој су боравили мишеви била је собна (20–25° C), влажност ваздуха $55\% \pm 1,5\%$, са циклусом светлост-тама од по 12 сати, животињама је омогућен слободан приступ води и храни за ситне лабораторијске животиње (Ветеринарски институт Суботица). Животиње су аклиматизоване недељу дана у виваријуму пре почетка огледа. Приступ храни био је онемогућен 12 сати пре жртвовања. По завршетку огледа животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом, након чега је извршено узорковање ткива панкреаса и ткива јетре. Брига о животињама и све експерименталне процедуре су спровођене у складу са “Водичем за негу и употребу лабораторијских животиња” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Commission of Life Sciences, National Research Council, USA) (66). Сви екстракти су апликовани оралним путем, помоћу гастричне сонде.

3.3. Хемикалије

Аналитички реагенси Folin-Ciocalteu реагенс, апсолутни етанол (96%, в/в), метанол, хлороводонична киселина (HCl), натријум хидрогенкарбонат (NaHCO_3), сумпорна киселина (H_2SO_4), натријум сулфат (Na_2SO_4), сирћетна киселина (CH_3COOH), натријум ацетат (CH_3COONa), 2,4,6-трипиридил-триазин, гвожђе (III)-хлорид хексахидрат ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), гвожђе (II)-сулфат хептахидрат ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил, стандард л-аскорбинска киселина, бакар (II)-сулфат (CuSO_4), калијум јодид (KI), натријум хидроксид (NaOH), водоник пероксид (H_2O_2), натријум нитрид (NaN_3), трихлорсирћетна

киселина, тиобарбитуратна киселина, етилендиаминтетрасирћетна киселина (EDTA), цитохром ц, глутатион, ксантин су набављени од произвођача Sigma-Aldrich (Немачка). Ацетонитрил, вода (HPLC чистоће), метилен хлорид, етил ацетат, ацетон, етар, стандард албумина, 1,2-хлоро-2,4-динитробезен, никотинамид аденин динуклеотод (NADPH), парафин су набављени су од Merck (Germany). Стрептозотоцин (СТЗ) је набављен од произвођача Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA). Референтни HPLC стандарди, гална киселина, елагинска киселина, протокатехуинска киселина, етил етар протокатехуинске киселине, хлорогенска киселина, ванилинска киселина, *n*-кумаринска киселина, рутин, хиперозид, изокверцетин, кемферол-3-*O*-глукозид, ресвератрол, кверцетин, лутеолин, кемферол (чистоће $\geq 99\%$) купљене су од Extrasynthese (France).

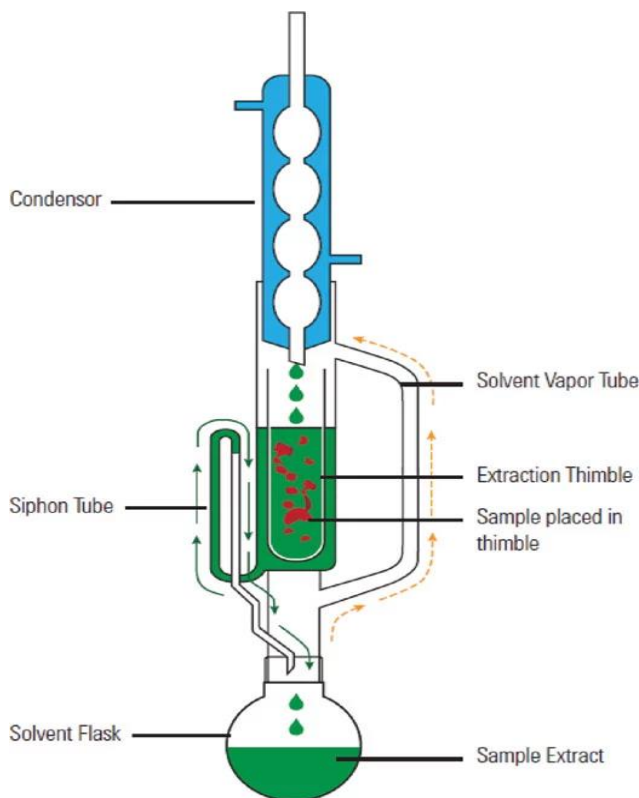
3.4. Екстракција биљног материјала

У испитивању антидијабетесног утицаја црног дуда код мишева као биљне сировине коришћени су лист, кора, плод, уље семенки и сок црног дуда. За испитивање су припремљени етанолни екстракти листа, коре и плода методом Сокслет екстракције, док је уље из семенки добијено екстракцијом суперкритичним CO₂. Сок је добијен ручним цеђењем кроз сито зрелих, свежих плодова црног дуда.

3.4.1. Сокслет екстракција

Сокслет екстракција се широко користи за екстракцију вредних термостабилних биоактивних једињења из различитих природних извора. Ова метода екстракције користи се за екстракцију чврстих узорака са ограниченом растворљивошћу у растварачу у присуству нерастворљивих нечистоћа. Узорак треба да буде сув и што финије уситњен пре екстракције. Суви узорак се ставља у папирну чауру која се затим ставља у екстрактор, који се спаја са кондензатором и балоном за дестилацију који се загрева и садржи растварач за екстракцију. Екстрактор се пуни растварачем за екстракцију и након достизања нивоа преливања, раствор се усисава сифоном, који испушта раствор у дестилациони балон и на тај начин преноси екстраховане растворене супстанце које остају у посуди за дестилацију, а растварач се враћа назад у екстрактор. Процес се понавља док се не изврши потпуна екстракција континуираним кружењем растварача кроз матрикс,

кључањем и кондензацијом. Екстракција се прекида када се растварач из екстрактора у потпуности прелије у дестилациони балон, а чаура у екстрактору остане без растварача (67).



Слика 15. Шематски приказ Соклет екстрактора, преузето из (67)

Поступак рада.

Етанолни Екстракт листа црног (ЕЕЛЦД). Екстракт листа црног дуда припремљен је екстракцијом од претходно осушених и млевених листова црног дуда и 70% в/в етанола као растварача добијеног мешавином етанола и дестиловане воде у односу 70:30. Осушени листови су уситњени у прах у лабораторијском електричном млину (Braun Aromatic KS2). Одмерена су четири узорка за екстракцију масе 28,5 г и запремина од 200 мл етанола (70% в/в) као растварача. Процес екстракције листа црног дуда трајао је 5 дана. По звршетку екстракције екстракт је филтрирани и упараван до сува на ротавалуру (Buchі, Switzerland) на температури од 50 °Ц. Процент влаге у узорку после упаравања је износио 9,48%, а принос екстракције је био 52,13%.

Етанолни екстракт коре црног дуда (ЕЕКЦД). Екстракт коре црног дуда припремљен је екстракцијом од претходно осушене и млевене коре црног дуда и 70% в/в етанола као растварача добијеног мешавином етанола и дестиловане воде у односу 70:30. Осушена кора је уситњена у прах у лабораторијском електричном млину (Braun Aromatic KS2). За екстракцију су одмерена четири узорка коре црног дуда масе 17,34 г и запремина од 250 мл етанол (70% в/в) као растварача. Екстракција коре црног дуда трајала је 7 дана. Након екстракције, екстракт је филтриран и упараван до сува на ротавапору (Buchi, Switzerland) на температури од 50 °Ц. Процент влаге у узорку после упаравања износио је 8,85%, а принос екстракције је био 23,63%.

Етанолни екстракт плода црног дуда (ЕЕПЦД). Екстракт плода црног дуда припремљен је од претходно одмрзнутих плодова и 70% в/в етанола као растварача добијеног мешавином етанола и дестиловане воде у односу 70:30. Одмерена маса узорка плода износила је 295,22 г, а запремина растварача етанола (70% в/в) износила је 450 мл. Екстракција плода црног дуда трајала је 7 дана. Након екстракције, екстракт је филтриран и упараван до сува на ротавапору (Buchi, Switzerland) на температури од 50 °Ц. Процент влаге у узорку после упаравања износио је 69,19%, а принос екстракције је био 60,17%.

Након припреме сви екстракти су чувани на температури од +4 °Ц (68,69).

3.4.2. Екстракција суперкритичним угљен-диоксидом (CO₂)

Екстракција суперкритичним CO₂ је тип екстракције суперкритичним флуидом који представља посебан вид растварача који настаје при притиску и температури изнад критичне тачке коришћеног флуида. Флуид у том стању поседује особине течности и особине гаса. Ова метода представља иновативну методу екстракције биолошки активних метаболита као алтернативу класичној екстракцији помоћу органских растварача. Најчешће коришћен растварач је угљен-диоксид који је хемијски стабилан, јефтин, незапаљив и ниске токсичности, а већ при температури од 30 °Ц постиже критичну температуру што је погодно за екстракцију термолабилних метаболита. Екстракција суперкритичним угљен-диоксидом омогућава високу селективност у погледу екстраховања активних принципа јер нема секундарних производа, а време екстракције је краће. Овом методом екстракције постиже се боља дифузија, мањи површински напон и нижи вискозитет што омогућава боље

продирање у екстраховани материјал. Узорак треба да буде сув и смрвљен да би екстракција била потпунија. Услови од 40 °Ц и 300 бара представљају оптималне услове екстракције висококвалитетног уља из семенки (70).

Поступак рада.

Уље семенки црног дуда (УСЦД). Уље семенки црног дуда добијено је поступком екстракције суперкритичним CO₂. Екстракција са суперкритичним CO₂ је спроведене у Autoclave Engineers Screening систему. Систем за испитивање суперкритичне екстракције је дизајниран за мале серије узорака користећи CO₂ као суперкритични медијум, са максималним дозвољеним радним притиском од 413 бара на 237,85 °Ц. Течни CO₂ се доводи из CO₂ цилиндра преко сифонске цеви. Овај гас се хлади у криостату између излаза цилиндра и пумпе да би се спречило испаравање. Пумпа за дозирање течности је са максималним излазним притиском од 413 бара и подесивим протоком од 38 до 380 мл/ч. CO₂ се пумпа у систем док се не постигне потребан притисак. Регулатори повратног притиска се користе за подешавање притиска система (у екстрактору и сепаратору). Екстракторска посуда (150 мл) се пуни биљним материјалом из којег треба екстраховати супстанцу. Екстракторска посуда се загрева грејачима ради постизања радне температуре. Суперкритични CO₂ тече кроз екстрактор и улази у посуду сепаратора (500 мл). Узорци екстраховане супстанце се сакупљају отварањем кугличног вентила који се налази на дну посуде. Обезбеђен је мерач протока који показује брзину протока CO₂ који пролази кроз систем и проток се може подесити микромерним вентилом. CO₂ наставља да тече из сепаратора кроз мерач протока/тотализатор и излази у атмосферу. Претходно описаним поступком звршена је екстракција припремљеног семена при изабраним радним условима притиска, температуре и времена. Добијено масно уље је сакупљено у посуду за узорке и израчунат је укупан принос екстракта. Екстракти су чувани у фрижидеру (на +4 °Ц) за анализу гасном спектроскопијом (GC и GC/MS).

3.5. Квалитативна и квантитативна анализа хемијског састава

Квантитативна анализа сока, етанолних екстраката листа, коре и плода црног дуда добијена је течном хроматографијом високих перформанси HPLC (енгл. High performance liquid chromatography - течна хроматографија високих перформанси). Квалитативна анализа је вршена на основу карактеристичног UV (енгл. Ultra Violet – ултра љубичасти) спектра и ретенционог времена детектованих једињења. Квантитативна анализа извршена је методом екстерног стандарда (71). Садржај укупних фенола, танина, флавоноида и антоцијана је одређен применом UV/VIS (енгл. Ultraviolet/Visible – Ултраљубичаста/Видљива) спектрофотометрије.

Квалитативна и квантитативна анализа уља семенки црног дуда добијена је методом гасне хроматографије. Квантификација различитих једињења урађена је методом нормализације пикова. Квалитативна анализа извршена је упоређивањем масених спектра идентификованих састојака и ретенционих индекса (РИ) са онима добијеним од аутентичних узорака и/или наведених у библиотекама NIST/Wiley mass-spectra libraries, користећи различите врсте претрага (PBM/NIST/AMDIS) и доступним подацима из литературе (72).

3.5.1. Одређивање укупних фенола

Садржај укупних фенола је одређен спектрофотометријском Folin-Ciocalteu методом. Метода се заснива на реакцији фенолних компонента и Folin-Ciocalteu реагенса који се састоји од фосфоволфрамвоске и фосфомолибденске киселине, а које приликом реакције редукују у плаво обојене оксиде. Интензитет плавог обојења је пропорционалан концентрацији фенолних компоненти. Интензитет промене боје одређиван је спектрофотометријски на таласној дужини од 725 nm.

Поступак рада.

Сто микролитара етанолног раствора испитиваних екстраката црног дуда (лист, кора, плод и сок методом континуиране екстракције (Сокслет) 1,9, 1,2, 8,6, 4,5, 1,6 мг/мл респективно) помешано је са 0,75 мл Folin-Ciocalteu реагенса претходно разблаженог 10 пута дестилованом водом и остављено да стоји на 22 °C 5 мин. У смешу је додато 0,75

мл раствора натријум бикарбоната (60 г/л). После 90 мин на 22 °Ц, мерена је апсорпција на таласној дужини од 725 нм. За калибрацију стандардне криве коришћена је гална киселина (0-100 мг/л). Калибрациона крива је показала линеарну регресију на $p > 0,99$, а резултати су изражени као милиграми еквивалената галне киселине GAE (енгл. Galic acid Equivalent – еквивалент Галне киселине) по граму суве материје биљних екстраката (мгGAE/г суве материје). Садржај укупних фенола представља средњу вредност три одређивања.

3.5.2. Одређивање укупних танина

Садржаја укупних танина израчунат је методом описаном у Европској фармакопеји 9.0 (Савет Европе. Европска фармакопеја, 9. ЕД; Савет Европе: Стразбур, Француска, 2016).

Поступак рада.

Декокти припремљени од испитиваних екстраката третирани су фосфолибдоволфрамним реагентом у алкалној средини, након и без третмана. Апсорбанца је мерена UV-VIS (енгл. Ultraviolet/Visible – Ултразубичаста/Видљива) спектрофотометром HP 8453 (Agilent Technologies, USA), на таласној дужини од 760 нм. Процент танина (средња вредност за три одређивања) изражен као проценат w/w, израчунат је из разлике у апсорпцији укупних полифенола (A_1) и полифенола који нису адсорбовани (A_2), користећи следећи израз:

$$\frac{62,5(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 - m_1}$$

где је:

- A_1 апсорбанца укупних полифенола
- A_2 апсорбанца полифенола који нису адсорбовани
- m_1 - представља масу узорка који се испитује, у грамима
- m_2 - масе пирогалолола, у грамима

3.5.3. Одређивање укупних флавоноида

Садржај укупних флавоноида израчунат је методом описаном у Европској фармакопеји 9.0 (Савет Европе. Европска фармакопеја, 9. ЕД; Савет Европе: Стразбур, Француска, 2016).

Поступак рада.

Узорак је екстрахован са мешом ацетон/НСL под рефлукс кондензатором; комплекс алуминијум (III) - хлорида ($AlCl_3$) флавоноидне фракције екстрахован етил ацетатом мерен је UV-VIS спектрофотометром HP 8453, при таласној дужини од 425 nm. Садржај флавоноида (средња вредност од три одређивања), изражен као проценат хиперозида, израчунат је коришћењем следећег израза:

$$\frac{A \times 1,25}{m}$$

где је:

- **A** - апсорбанца на 425 nm
- **m** - маса екстраката који се испитују у грамима

3.5.4. Одређивање укупних антоцијанина

Укупни садржај антоцијанина испитан је у складу са поступком описаним у европској фармакопеји 9.0 [Савет Европе. Европска фармакопеја, 9. ЕД; Савет Европе: Стразбур, Француска, 2016].

Поступак рада.

Испитивани узорак свеже цеђеног сока црног дуда је хидролизован под рефлуксом са метанол/НСL мешом. Апсорбанца раствора је мерена HP 8453 UV-VIS спектрофотометром на таласној дужини од 528 nm. Процент садржаја антоцијанина (средња вредност од три одређивања), изражен је као цианидин-3-глукозид хлорид и израчунат следећим изразом:

$$A \times 5000 / (718 \times m)$$

где је:

- **A** апсорбанца на 528 нм
- **m** маса екстракта у грамама

Процентни садржај процијанидина је израчунат коришћењем методе описане у европској фармакопеји 9.0 [Савет Европе. Европска фармакопеја, 9. ЕД; Савет Европе: Стразбур, Француска, 2016].

Поступак рада.

Испитани етанолни екстракт плода црног дуда је хидролизован под рефлуксом помоћу метанол/НСЛ смеше. Процијанидини су одвојени бутанолом из воденог слоја. Апсорбанца је мерена HP 8453 UV-VIS спектрофотометром на таласној дужини од 545 нм. Процент садржаја процијанидина (средња вредност од три одређивања), изражена је као цијанидин хлорид, израчунат је помоћу следећег израза:

$$A \times 500 / (75 \times m)$$

где је:

- **A** апсорбанција на 528 нм
- **m** је маса екстракта у грамама

Хидролиза антоцијана

Садржај антоцијанидина, као цијанидин хлорид, одређен је коришћењем методе (73) Zhang и сар. (2004), уз мале модификације. У анализи хидролизе, 0,59 г испитиваног узорка свежег воћног сока црног дуда растворено је у 8мл смеше раствора вода/метанол у односу 1:1 који садржи 2N HCL (50 мл метанола + 33мл H₂O + 17 мл 37% HCL) под утицајем ултразвучних таласа у трајању од 20 мин. Затим је бочица смештена у претходно загрејане суве купке (Instrumentaria ST-01/02, Zagreb, Croatia) и хидролиза урађена на 100 ± 2°Ц током 60 мин. Хидролизоване узорци су одмах охлађени до собне температуре за анализу.

3.5.5. Анализа високоефикасном течном хроматографијом

Хемијска карактеризација екстраката црног дуда анализирана је HPLC (*engl.* High Performance Liquid Chromatography – течна хроматографија високих перформански) методом (73). Принцип рада ове методе заснива се на пролазу анализираних супстанци кроз непокретну, стационарну фазу, пумпањем течности односно мобилне фазе под високим притиском кроз колону. Сам поступак подразумева ињектирање малих запремина испитиваног узорка у ток мобилне фазе, при чему долази до различитог задржавања компонената анализе на стационарној фази, на основу специфичних физичких и хемијских интеракција, као и природе анализираних супстанци, стационарне и мобилне фазе. Ретенционо време представља време за које супстанца дође до краја колоне, односно елуира и карактеристично је за одређену супстанцу.

Поступак рада.

За хемијску карактеризацију коришћена је градијентна елуација која подразумева промену састава мобилне фазе у току елуирања.

Идентификација, испитиваних фенолних једињења је постигнута помоћу Agilent Technologies 1200 HPLC уређаја.

Услови HPLC анализе етанолних екстраката листа и коре црног дуда

- **Колона:** Lichrospher 100RP 18e, 250 x 4 мм, величина честица 5 μм
- **Мобилна фаза:** А/Б; А: 0,2М раствор фосфорне киселине, и Б: чисти ацетонитрил
- **Градијентна елуација:** 89-75% А (0-35 мин); 75-60% А (35-55 мин); 60-35% А (55-60 мин) и 35-0% А (60-70 мин)
- **Ињектовање:** 4 μл
- **Проток:** 1 мл/мин
- **Температура:** 25 °Ц
- **Притисак:** 134 бар
- **Детекција:** 260 нм, фотодиодни детектор
- **Укупно трајање анализе:** 45 мин

Концентрације испитиваних узорака биле су 27,1 и 33,4 мг/мл за етанолне екстракте листа и коре, респективно. Пре убризгавања, узорци су филтрирани кроз PTFE (*engl.* Polytetrafluoroethylene - Политетрафлуороетилен) мембрански филтер (Fisher, Pitsburg, PA). Концентрације раствора стандарда коришћених у истраживању су биле: 0,15 мг/мл за изокверцетин, 0,26 мг/мл за хиперозид, 0,28 мг/мл за кемферол-3-*O*-глукозид, 0,30 мг/мл за ванилинску киселину и кемферол, 0,34 мг/мл за галну киселину, 0,36 мг/мл за кверцетин, 0,38 мг/мл за ресвератрол, 0,40 мг/мл за рутин, 0,56 мг/мл за хлорогенску киселину, 0,74 мг/мл за *n*-кумаринску киселину. Запремина убризганих стандардних раствора, као и за испитиване екстракте узорака, износила је 4 μ л.

Идентификација је заснована на ретенционом времену и преклапањима спектра стандарда и циљног једињења. Када се покаже подударност спектра одређеног пика и одговарајућег стандарда, праћено проверавањем чистоће одговарајућег пика, постиже се потпуна идентификација. Они пикови који не испуњавају ове захтеве нису квантификовани. Квантификација је извршена калибрацијом са екстерним стандардом.

Услови HPLC анализе етанолног екстракта плода и свежег воћног сока црног дуда

- **Колона:** Lichrospher 100RP 18e, 250 x 4 мм, величина честица 5 μ м
- **Мобилна фаза:** А/Б; А: [500 мл H₂O плус 9,8 мл 85% H₃PO₄ (в/в)], Б: чист ацетонитрил
- **Градијентна елуација:** 89-75 % А (0-35 мин); 75-60% А (35-55 мин); 60-35% А (55-60 мин); 35-0% А (60-70 мин)
- **Ињектовање:** 4 μ л
- **Проток:** 0,8 мл/мин
- **Температура:** 25°C
- **Притисак:** 134 бар
- **Детекција:** 520 нм, диодни детектор
- **Укупно трајање анализе:** 45 мин

Стандардни раствори за одређивање антоцијанина и антоцијанидина припремљени су у коначној концентрацији од 0,2, 0,3 и 0,4 мг/мл (цијанидин хлорид и цијанидин-3-*O*-глукозид и цијанидин-3-*O*-рутинозид, ретроспективно) у метанолу/*HCl*. Концентрација испитиваних екстраката биле су 51,0 и 49,9 мг/мл за свеж воћни сок, и етанолни екстракт плода, респективно у метанолу/*HCl*. Запремина стандардних раствора, као и тестираних екстраката, била је 4 μ л. Пре HPLC анализе, узорци су филтрирани кроз 0,2 μ м PTFE мембранске филтере. Идентификација је била заснована на ретенционом времену и облику спектра. Поређењем спектра пикова са одговарајућим стандардима, примењујући и тест чистоће пикова, постиже се потпуна идентификација у случају потпуног преклапања одговарајућих спектра и задовољавајућег излазног резултата за чистоћу пика. Пикови који не испуњавају ове захтеве нису квантификовани. Квантификација је извршена методом екстерног стандарда, а резултати су изражени средња вредност \pm СД (стандардна девијација) од три мерења.

3.5.6. Анализа гасном хроматографијом

Гасна хроматографија (ГХ) је метода која се користи за детекцију и раздвајање лако испарљивих једињења органског порекла, која се без деградације преводје у гасовито стање. Гасну хроматографију карактерише покретна, мобилна фаза која представља гас инертне природе у којој је растворен испитивани узорак и непокретна, стационарна фаза такође инертна и која представља микроскопски слој течности или полимера у колони кроз коју се креће аналит. Принцип анализе гасне хроматографије заснива се на раздвајању компоненти анализираних узорка на основу различитог афинитета ка стационарној фази, те долази до успореног кретања истих кроз колону. Аналит након елуације долази до детектора који је повезан са рачунаром и приказује очитани хроматограм. Свако детектовано једињење одговара одређеном сигналу на хроматограму и детерминисано је квалитативно и квантитативно ретенционим временом као и површином пика. Узорак уља црног дуда је анализиран након претварања масних киселина у метил естре користећи АОАС (енгл. Association of official Agricultural Chemists – Удружење званичних пољопривредних хемичара) поступак 965,49 (74).

Поступак рада.

Екстракт (45-55 мг) је помешан са мешавином метанол-сумпорне киселине. Смеша је пажљиво загревана током два сата под рефлуксом како би се омогућило умерено кључање. Након завршене реакције, охлађена смеша је испрана два пута са 50 мл нафтног етра и још једном са 20 мл дестиловане воде. Сакупљена фракција петрол етра била је осушена употребом безводног натријум сулфата (Na_2SO_4) и растварач је издвојен упаравањем употребом вакумског испаривача.

Хемијски састав уља анализиран је помоћу GC/FID (енгл. Gas Chromatography/Flame Ionization Detector – Гасна Хроматографија куплована са Детектором Пламене Јонизације) и GC/MS (енгл. Gas Chromatography/Mass spectrometry – Гасна Хроматографија куплована са Масеним детектором) технике. GC/MS анализе су изведене на Shimadzu GCMSQP2010 ултра масеном спектрометру опремљеним пламеним детектором јона и GC2010 гасним хроматографом. За раздвајање је коришћена InertCap 5 капиларна колона ($60,0 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$). Хелијум у односу од 1:5 и линеарна брзина $35,2 \text{ cm/s}$ коришћен је као носач. Температура извора јона била је $200 \text{ }^\circ\text{C}$, а температура ињектора $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Температура детектора била је $300 \text{ }^\circ\text{C}$, док је температура колоне била линеарно програмирана да расте од 40 до $260 \text{ }^\circ\text{C}$ (повећањем температуре брзином од $4 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$), од $260 \text{ }^\circ\text{C}$ до $310 \text{ }^\circ\text{C}$ (повећањем температуре брзином од $4 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$). Након достизања температуре колоне од $310 \text{ }^\circ\text{C}$ (повећањем температуре брзином од $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) изотермично је задржана у трајању од 10 мин. Дериватизовани узорци су растворени у метилен хлориду и узастопно убризгавани у количини од 1 μl . Садржај различитих једињења утврђен је на основу хроматограма и дефинисан као садржај према GC површини (средња вредност три детерминанте) (72). Идентификација је извршена помоћу Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System software (AMDIS ver. 2.1, 2005) софтвера.

Табела 1. Услови рада и принос суперкритичне екстракције из семена црног дуда при различитим експерименталним условима

Редни број	п (бар)	Т (°С)	в (ч)	М _с (Г)	М _{СО₂} /М _с (g/g)	у (%)	Дијаграм
1	250	40	5,57	60,67	49,45	17,10	а)
2	300	40	5,03	90,44	24,33	15,73	б)
3	300	40	6,67	58,36	46,27	18,03	в)

п - притисак,

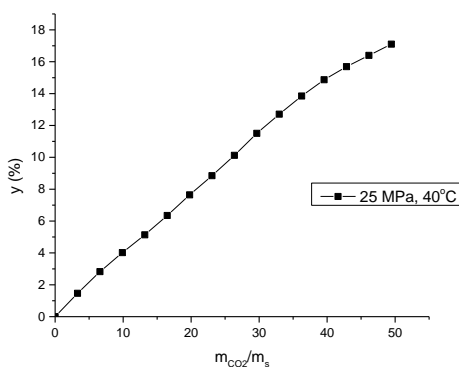
Т - температура,

в - време трајања експеримента,

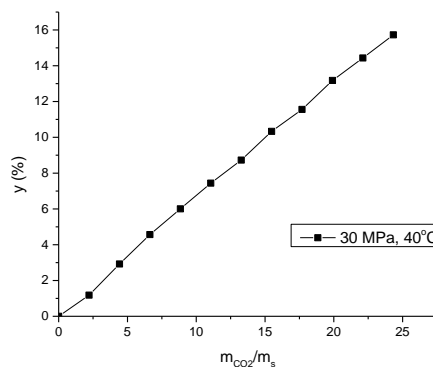
М_с - почетна маса биљног материјала,

М_{СО₂}/М_с - потрошња суперкритичног СО₂ по маси биљног материјала,

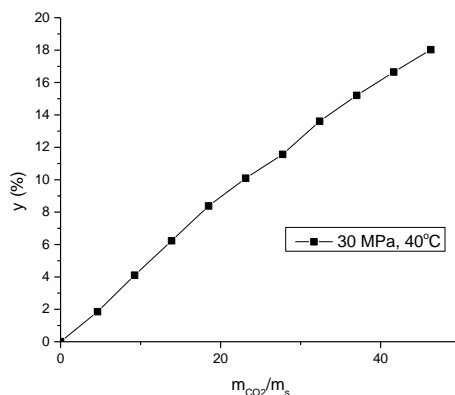
у - екстракциони принос



а)



б)



в)

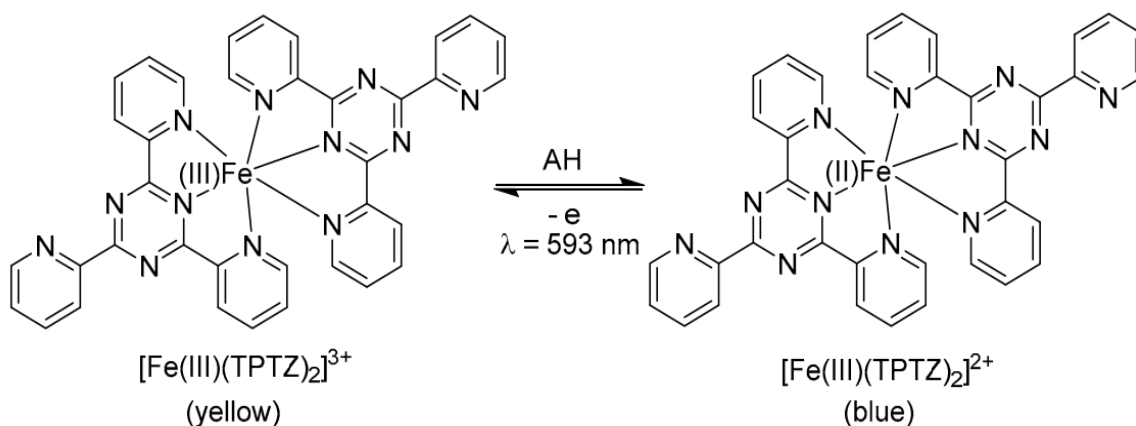
Слика 16. Дијаграми зависности приноса суперкритичне екстракције из семена дуда од потрошње суперкритичног СО

3.6. *In vitro* методе

In vitro Методе обухватале су одређивање антиоксидативне активности етанолних екстраката листа, коре и плода црног дуда, затим свеже цеђеног сока и уља семенки црног дуда применом FRAP и DPPH спектофотометријских метода.

3.6.1. FRAP метода процене антиоксидативног капацитета

Антиоксидативни капацитет свих екстраката црног дуда одређивн је спектрофотометријски по процедури који су описали Бензије & Страин. Укупна редукциона способности припремљених екстраката одређивана је помоћу FRAP (*engl.* feric reducing antioxidant power – гвожђе редукујућа антиоксидативна активност) методе. FRAP метода се заснива на редукцији безбојног комплекса Fe^{3+} -ТПТЗ (Fe^{3+} -трипиридил-триазина) у плаво обојени комплекс Fe^{2+} -ТПТЗ (Fe^{2+} -трипиридил-триазина) који настаје дејством антиоксиданата који донирају електроне при ниским рН вредностима. Редуковани трипиридил-триазин комплекс поседује интензивну плаву боју чији је интензитет одређен спектрофотометријски на таласној дужини од 593 нм (75).



Слика 17. Шематски приказ механизма реакције FRAP методе, преузето из (76)

Поступак рада.

FRAP реагенс је припремљен у односу 10:1:1 од 300 мМ ацетатног пуфера рН = 3,6 (6,4 мл 2М раствора Натријум ацетата и 93,6 мл 2М сирћетне киселине), 10 мМ ТПТЗ реагенса (у 40мМ HCl) и 20 мМ Гвожђе (III) – хлорида хексахидрата. Стандардна

калибрациона крива је конструисана користећи водене растворе Гвожђе (II) - сулфата хептахидрата припремљених у пет различитих концентрација у опсегу од 0,1-1 mM. Сам поступак одређивања антиоксидативне активности заснивао се на томе да се у кивети помеша 100 μ l етанолног екстракта узорка (1 мг сувог екстракта/мл) са 3мл FRAP реагенса. Слепа проба је садржала 100 μ l етанола (70% в/в) и 3мл FRAP реагенса. Након 30 минута инкубације раствора на тамном месту, апсорбанца слепе пробе, узорка и стандарда мерена је спектрофотометријски на таласној дужини од 593 nm. FRAP вредност је израчуната и изражена као милимол Fe (II) еквивалентно по граму екстракта (mM Fe(II)/г) на основу стандардне калибрационе криве. Л-аскорбинска киселина (АК) (1 мг/мл) је коришћена као стандард. 0,0176 г стандарда је растворено у етанолу (70% в/в), поступак је изведен према претходно описаној процедури. Апсорбанце су мерене у три понављања.

Добијена једначина стандардне калибрационе криве:

$$y = 0,7022x - 0,0258, R^2 = 0,997$$

Концентрација у Fe(II) је представљена на апсциси, док је на ординати представљена разлика апсорпције $\Delta A = A \text{ узорка} - A \text{ слепе пробе}$

где је:

- **A узорка** апсорбанца узорка тестираног екстракта.
- **A слепе пробе** апсорбанца слепе пробе

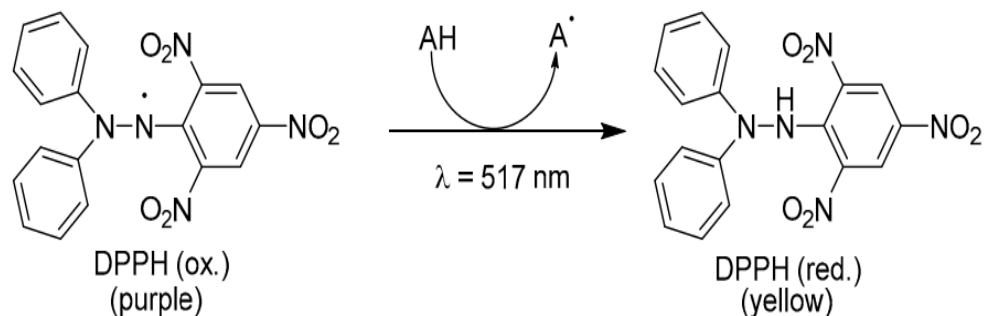
Формула за израчунавање је:

$$\text{mM Fe(II)/г} = \Delta A - 0,0258 / 0,7022$$

3.6.2. DPPH метода хватања слободних радикала

Процена антиоксидативне активности екстракта црног дуда је извршена употребом спектрофотометријске DPPH (*engl.* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) методе хватања слободних радикала, која подразумева одређивање способности испитиваних екстраката да неутралишу DPPH радикал, према процедури коју је предложио Блоис. Евалуација резултатата спроведена је одређивањем ИК₅₀ (концентрација испитиване супстанце при којој се неутралише 50% радикала). DPPH је стабилан азотни радикал који када реагује са антиоксидативном компонентом, односно са

донором водоникових атома бива редукован у облик DPPH-H и изазива промену боје из љубичасто обојеног DPPH у жуто обојени неутрални DPPH-H. Интензитет промене боје одређен је спектрофотометријски на таласној дужини од 517 нм и сразмеран је броју ухваћених радикала (55,77).



Слика 18. Шематски приказ механизма реакције DPPH методе, преузето из (76)

Поступак рада.

Одређивање антиоксидативне активности екстраката спроведено је припремањем серије од пет радних раствора различитих концентрација датих екстраката. 80 μl екстракта концентрације 10 мг/мл разблаживано је етанолом (70% в/в) да би се добила серија радних раствора различите концентрације у опсегу (0,625-10 мг/мл). Радним растворима је додато 2,92 мл етанола и 1 мл свеже припремљеног DPPH етанолног раствора (100 $\mu\text{mol/l}$), затим се реакциона смеша интензивно промућка, инкубира 30 мин на собној температури и тамном месту након чега се мери апсорбанца на 517 нм. Као слепа проба се користио етанол (70% в/в), а као контрола смеша од 3 мл етанола (70% в/в) и 1 мл DPPH реагенса. Л-аскорбинска киселина (100 $\mu\text{mol/l}$) је коришћена као позитивна контрола, припремана је серија од пет раствора различитих концентрација (10-100 $\mu\text{mol/l}$), као растварач коришћен је етанол (70% в/в), а поступак је изведен према претходно описаној процедури. Апсорбанце узорка, контроле и позитивне контроле су мерене у три понављања.

Инхибиција DPPH радикала изражена је у процентима Π (%) користећи приказану једначину:

$$\Pi \text{ инхибиције (\%)} = [A \text{ контрола} - A \text{ узорка} / A \text{ контрола}] \times 100$$

где је:

- **A контрола** апсорбанца контролног узорка
- **A узорка** апсорбанца узорка тестираног екстракта.

На основу добијених вредности **Π инхибиције** одређена је вредност ИК₅₀. Вредност ИК₅₀ израчуната је из регресионе једначине добијене линеарном зависношћу концентрације екстракта и процента инхибиције слободних радикала.

3.7. *In vivo* методе

Експериментално *in vivo* истраживање изведено је на Заводу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду. *In vivo* методе обухватале су испитивање утицаја етанолних екстраката листа, коре и плода, затим свеже цеђеног сока и уља семенки црног дуда на гликемију (тест оралног оптерећења глукозом (ОГТТ) код здравих мишева; гликемија наше код мишева са стрептозотоцином индукованим дијабетесом) и телесну масу експерименталних животиња.

3.7.1. Избор, величина и конструкција узорка експерименталних животиња

Експерименталне животиње, мишеви *NMRI Haan* соја биле су подељене у 24 групе, од по 6 животиња (укупно 144 животиње). У испитивању је утврђиван ефекат примене пет различитих екстраката црног дуда (екстракт коре, листа, плода, сок добијен цеђењем свежег плода, и до сада неиспитан екстракт семенки), који су примењивани помоћу гастричне сонде у три различите дозе (125 мг/кг, 250 мг/кг, 500 мг/кг), при чему је антидијабетесни утицај утврђиван у три временска периода (1. дан, 7. дан и 28. дан). Утицај екстраката на метаболизам глукозе код мишева испитиван је мерењем нивоа гликемије наше, тестом оралног оптерећења глукозом као и одређивањем гликемије код мишева са дијабетес мелитусом изазваним применом стрептозоточина. Здраве експерименталне животиње су биле расподељене у 17 група, док је у преосталих 7 група животињама изазван дијабетес интраперитонеалном апликацијом раствора стерептозоточина (СТЗ), припремљеним непосредно пре примене, у дози од 240 мг/кг телесне масе (Табела 2).

- Прва група здравих животиња (КФ) је перорално преко гастричне сонде, током 28 дана, добијала физиолошки раствор у дози од 10 мл/кг.
- Друга група здравих животиња (КУ) је перорално преко гастричне сонде, током 28 дана, добијала маслиново уље у дози од 10 мл/кг.
- Трећа групи здравих животиња (Л125) је перорално, преко гастричне сонде током 28 дана, добијала 125 мг/кг етанолног екстракта листа црног дуда.

- Четврта група здравих животиња (Л250) је перорално преко гастричне сонде током 28 дана, добијала 250 мг/кг етанолног екстракта листа црног дуда.
- Пета групи здравих животиња (Л500) је перорално, преко гастричне сонде током 28 дана, добијала 500 мг/кг етанолног екстракта листа црног дуда.
- Шестој групи здравих животиња (К125) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, у дози од 125мг/кг апликован етанолни екстракт коре црног дуда.
- Седмој групи здравих животиња (К250) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован етанолни екстракт коре црног дуда у дози од 250 мг/кг.
- Осмој групи здравих животиња (К500) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован етанолни екстракт коре црног дуда у дози од 500 мг/кг.
- Девета група здравих животиња (П125) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, добијала 125 мг/кг етанолног екстракта плода црног дуда.
- Десета група здравих животиња (П250) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, преко гастричне сонде, добијала 250 мг/кг етанолног екстракта плода црног дуда.
- Једанаеста група здравих животиња (П500) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, добијала 500 мг/кг етанолног екстракта плода црног дуда.
- Дванаестој групи здравих животиња (С125) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован сок црног дуда у дози од 125 мг/кг.
- Тринаестој групи здравих животиња (С250) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован сок црног дуда у дози од 250 мг/кг.
- Четрнаестој групи здравих животиња (С500) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован сок црног дуда у дози од 500 мг/кг.
- Петнаеста група здравих животиња (У125) је перорално, преко гастричне сонде током 28 дана, добијала 125 мг/кг уља семенки црног дуда.
- Шеснаеста група здравих животиња (У250) је перорално, преко гастричне сонде током 28 дана, добијала 250 мг/кг уља семенки црног дуда.
- Седамнаеста група здравих животиња (У500) је перорално, преко гастричне сонде током 28 дана, добијала 500 мг/кг уља семенки црног дуда.
- Првој групи животиња са дијабетесом (КФС) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован физиолошки раствор у дози од 10 мл/кг.

- Друга група животиња са дијабетесом (КУС) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, добијала 10 мг/кг маслиновог уља.
- Трећој групи животиња са дијабетесом (К500С) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован етанолног екстракта коре црног дуда у дози од 500мг/кг.
- Четвртој групи животиња са дијабетесом (Л500С) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован етанолни екстракт листа црног дуда у дози од 500мг/кг
- Петој групи животиња са дијабетесом (П500С) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован етанолни екстракт плода црног дуда у дози од 500мг/кг.
- Шестој групи животиња са дијабетесом (С500С) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликован сок црног дуда у дози од 500мг/кг.
- Седмој групи животиња са дијабетесом (У500С) је перорално, преко гастричне сонде, током 28 дана, апликовано уље семенки црног дуда у дози од 500мг/кг.

Табела 2. Приказ група експерименталних животиња

Група	Третман	Доза	Дужина примене – 1 доза на дан	Број животиња
1.	физиолошки раствор	10мл/кг	1,7,28 дана	6
2.	маслиново уље	10мл/кг	1,7,28 дана	6
3.	физиолошки раствор + СТЗ *	10мл/кг	1,7,28 дана	6
4.	маслиново уље + СТЗ *	10мл/кг	1,7,28 дана	6
5.	ЕЕЛЦД	125мг/кг	1,7,28 дана	6
6.	ЕЕЛЦД	250мг/кг	1,7,28 дана	6
7.	ЕЕЛЦД	500мг/кг	1,7,28 дана	6
8.	ЕЕКЦД	125мг/кг	1,7,28 дана	6
9.	ЕЕКЦД	250мг/кг	1,7,28 дана	6
10.	ЕЕКЦД	500мг/кг	1,7,28 дана	6
11.	ЕЕПЦД	125мг/кг	1,7,28 дана	6
12.	ЕЕПЦД	250мг/кг	1,7,28 дана	6
13.	ЕЕПЦД	500мг/кг	1,7,28 дана	6
14.	СЦД	125мг/кг	1,7,28 дана	6
15.	СЦД	250мг/кг	1,7,28 дана	6
16.	СЦД	500мг/кг	1,7,28 дана	6
17.	УСЦД	125мг/кг	1,7,28 дана	6
18.	УСЦД	250мг/кг	1,7,28 дана	6
19.	УСЦД	500мг/кг	1,7,28 дана	6
20.	ЕЕЛЦД + СТЗ *	500мг/кг	1,7,28 дана	6
21.	ЕЕКЦД + СТЗ *	500мг/кг	1,7,28 дана	6
22.	ЕЕПЦД + СТЗ *	500мг/кг	1,7,28 дана	6
23.	СЦД + СТЗ *	500мг/кг	1,7,28 дана	6
24.	УСЦД + СТЗ *	500мг/кг	1,7,28 дана	6

*стрептозотцин, 240мг/кг, једна доза, интраперитонеално

3.7.2. Орални тест толеранције глукозе (ОГТТ)

Тест оралног оптерећења глукозом ОГТТ започиње одређивањем вредности гликемије пре оралне примене раствора глукозе код експерименталних животиња. Животињама се након тога перорално даје раствор глукозе у дози 500мг/кг. Тридесет минута након примене раствора глукозе (орално оптерећење глукозом), понавља се мерење гликемије (78). Током огледа који је трајао 28 дана животиње су 1., 7. и 28. дана третмана (орално давање екстраката црног дуда) биле подвргнуте тесту оралног оптерећења глукозом чиме је испитан утицај екстраката црног дуда на метаболизам глукозе код здравих животиња.

Гликемија код мишева одређивана је у узоркованој капиларној крви инцизијом близу врха репа. Концентрација глукозе у капиларној крви, узета из репне вене миша, одређивана је комерцијалним китовима на парату Accu-check Active, Roche (Basel, Switzerland).

3.7.3. Индуција дијабетеса стрептозотоцином (ИДС)

Испитивање утицаја екстраката црног дуда на ниво гликемије код дијабетес мелитуса изазваног применом стрептозотоцина започиње мерењем гликемије пре једнократне примене стрептозотоцина раствореног у цитратном пуферу. Након тога интраперитонеалним путем примењује се 1 доза стрептозотоцина (240мг/кг). Након 48 сати од примене стрептозотоцина, понавља се мерење нивоа глукозе у крви. Сматра се да је дошло до развоја дијабетеса уколико вредност гликемије износи преко 15 ммол/л (79). Експерименталне групе животиња третиране стрептозотоцином код којих је дошло до развоја дијабетеса су третиране испитиваним екстрактима у трајању од 28 дана. Током предвиђеног периода 1., 7. и 28. дана третмана животињама је одређивана вредност гликемије наше како би се утврдио утицај екстраката на метаболизам глукозе код животиња оболелих од дијабетеса.

3.8. *Ex vivo* методе

У истраживању је узорковано и ткиво јетре помоћу којег је извршена *ex vivo* процена ангиоксидативног ефекта испитиваних екстраката утврђивањем нивоа липидне пероксидације, активности ензима супероксид дисмутазе, каталазе, глутатион редуктазе, глутатион-S-трансферазе и глутатион пероксидазе.

Узорци ткива јетре од 1 грама су у циљу добијања грубог хомогената помешани са физиолошким раствором у односу 1:4 (ткиво јетре : физиолошки раствор) и хомогенизовани на температури 0-4 °Ц употребом електричног хомогенизатора типа Б, Braun, Potter S (Melsungen, Germany). Након хомогенизације узорак је стављен у водено ултразвучно купатило у трајању од 2 минута. Потом је узорак центрифугиран у трајању од 15 минута, при брзини од 3500 обртаја/мин. Након центрифугирања издвојен је супернатант и добијена је денуклеирана фракција.

Одређивање параметара оксидативног стреса у хомогенату ткива је вршено спектрофотометром Agilent 8453 UV/Vis (St. Clare, USA) (80).

3.8.1. Одређивање концентрације протеина

Одређивање концентрације протеина у грубом хомогенату и цитосолној фракцији узорака ткива јетре извршено је биуретском методом, заснованој на реакцији пептидске везе са јонима бабра у алкалној средини. При овој реакцији настаје љубичасто обојен комплекс, а интензитет боје сразмеран је концентрацији протеина. Мерење се врши спектрофотометром при 540 нм. Концентрација протеина је одређена помоћу комерцијалног сета Sentinel Diagnostics (Milan, Italy) пратећи упутства произвођача.

Поступак рада.

10 μ л узорка додато је у 1 мл реагенса (6 ммол CuSO_4 , 6 ммол KI , 0,75 ммол NaOH , $\text{pH} \geq 10$). У слепу пробу је додато 10 μ л дестиловане воде. У стандард је додато 10 μ л стандардног раствора албумина (6 г/дл). Пре читавања апсорбанце реакциона смеша је добро измешана. Након 15 минута је измерена апсорбанца стандарда (Ас) и узорка (Ау) која је нормализована у односу на слепу пробу.

Израчунавање резултата: Одређивање концентрације протеина извршено је према формули:

$$\text{Концентрација протеина} = \left(\frac{A_c}{A_u} \right) \times \text{концентрација стандардног раствора}$$

3.8.2. Интезитет липидне пероксидације

Интезитет липидне пероксидације процењен је одређивањем количине малондиалдехида (МДА), крајњег производа у разградњи липида у процесу липидне пероксидације, односно крајњег производа који настаје у процесу разградње полинезасићених масних киселина из ћелијске мембране приликом оштећења која настају услед пероксидације. У киселој средини при високој температури МДА реагује са тиобарбитуратном киселином, реакцијом нуклеофилне адиције, при чему настаје коњугат црвене боје са максимумом апсорпције монохроматске светлости на таласној дужини од 535 нм (81).

Поступак рада.

Узорак хомогената јетре у количини од 0,3 мл помешан је са 1мл смеше 15% w/v трихлоросирћетне киселине, 0,375% w/v тиобарбитурне киселине у 0,25 N хлороводоничној киселини. Узорак је затим измешан вортексовањем, након чега је загреван у воденом купатилу у трајању од 15 минута при температури од 90 °Ц. Након тога узорак је охлађен држањем на леду у трајању од 5 минута, а потом центрифугиран при брзини од 10000 обртаја у минути у трајању од 10 минута. Концентрација МДА одређивана је спектрофотометријски из супернатанта при 535 нм. При високим температурама и у киселој средини, МДА учествује у реакцији нуклеофилне адиције са тиобарбитурном киселином стварајући коњугат црвене боје. Овај коњугат показује максимум апсорпције монохроматске светлости при таласној дужини д 535 нм.

Израчунавање резултата: Активност липидне пероксидације је одређена према формули:

$$Ц_{мда} = \frac{(\Delta A_{уз} - \Delta A_{сп}) \times V_{рс} \times 1000}{1.56 \times V_{уз} \times Ц_{рп}}$$

$\Delta A_{уз}$ -средња промена апсорбанце у минути

$\Delta A_{сп}$ -средња промена апсорбанце слепе пробе

$Ц_{рп}$ -концентрација протеина у узорку (мг/мл)

$V_{рс}$ -запремина реакционе смеше

$V_{уз}$ -запремина узорка

Моларни апсорпциони коефицијент за коњугат МДА-ТБА износи $1,56 \times 10^5$ $лмол^{-1}цм^{-1}$. Концентрација МДА је изражена у $нмол/мг$ протеина (81).

3.8.3. Одређивање укупне активности супероксид дисмутазе (СОД)

Одређивање укупне активности супероксид дисмутазе (СОД) извршено је помоћу система ксантин оксидаза/ксантин/цитохром c . При реакцији ксантина са ксантин оксидазом настају супероксид анион радикали који затим редукују ферицитохром c , доводећи до повећања апсорпције при таласној дужини од 550 нм. Брзина реакције редуције прати се спектрофотометром на 550 нм. Ензим СОД уклања супероксид анионе каталишући реакцију дисмутације, и на тај начин смањује брзину редуције цитохрома c . Смањење брзине редуције пропорционално је активности ензима СОД. Активност ензима СОД потребна за смањење брзине редуције цитохрома c за 50%, при промени апсорбанце од 0,025/мин, дефинисана је као јединица активности овог ензима (82).

Поступак рада.

За одређивање активности СОД припремљена су два раствора: Раствор 1 (50 μ л 100 $ммол$ EDTA, 50 μ л 30 $ммол$ NaN_3 , 500 μ л 5 $мМ$ ксантина, 200 μ л 5 $ммол$ цитохрома c , допуњено до 50 $мл$ 0,1М фосфатним пуфером рН 7,8); Раствор 2 (400 μ л 1 $ммол$ /EDTA, 3595 μ л 0,1 $М$ фосфатни пуфер рН=7,8, 20 μ л ксантин оксидазе активности 50У/2 $мл$). У кивету је затим пипетом пренето 650 μ л раствора 1, 200 μ л узорка (супернатант хомогената

ћелија) и 50 μ л раствора 2. Додавањем раствора 2 започела је посматрана реакција, при чему је апсорбанца праћена током 3 минута на таласној дужини од 550 нм.

Израчунавање резултата: Специфична активност резултата СОД је израчуната према формули:

$$\text{Специфична активност СОД} = \frac{\Delta A_{\text{сп}} \times 50 \times 1000}{\Delta A_{\text{уз}} \times 100 \times \text{Црп}}$$

$\Delta A_{\text{уз}}$ -средња промена апсорбанце у минути

$\Delta A_{\text{сп}}$ -средња промена апсорбанце слепе пробе

Црп-концентрација протеина у узорку (мг/мл)

Специфична активност ензима СОД изражена је као јединица кативности ензима на мг протеина у узорку (82).

3.8.4. Одређивање специфичне активности каталазе

Одређивање специфичне активности каталазе вршена је употребом спектрофотометра приликом чега је праћена брзина разлагања водоник-пероксида у присуству каталазе при таласној дужини од 240 нм. На овој таласној дужини водоник пероксид показује максимум апсорпције светлости (83).

Поступак рада.

У 0,05 М фосфатни пуфер (рН=7,0) дадат је 30% водоник пероксид (H_2O_2) тако да апсорбанца слепе пробе на 240 нм буде између 0,525-0,550. У подешеном раствору H_2O_2 (1,5 мл) у фосфатном пуферу додато је 10 μ л узорка након чега је започета реакција. Пад апсорбанце је праћен на 240 нм током 3 минута на температури од 25°C.

Израчунавање резултата: Специфична активност каталазе је израчуната према формули:

$$\text{Специфична активност КАТ} = \frac{(\Delta A_{\text{уз}} - \Delta A_{\text{сп}}) \times V_{\text{рс}} \times 1000}{43,6 \times V_{\text{уз}} \times \text{Црп}}$$

$\Delta A_{\text{уз}}$ -средња промена апсорбанце у минути

$\Delta A_{\text{сп}}$ -средња промена апсорбанце слепе пробе

Црп-концентрација протеина у узорку (мг/мл)

$V_{\text{рс}}$ -запремина реакционе смеше

$V_{\text{уз}}$ -запремина узорка

Специфична кативност каталазе је изражена у јединицама активности на мг протеина у узорку.

3.8.5. Одређивање специфичне активности глутатион редуктазе (ГР)

Одређивање специфичне активности глутатион редуктазе се заснива на праћењу оксидације NADPH при таласној дужини од 320 нм при чему ензим катализује редукцију оксидованог (ГССГ) у редуковани облик глутатиона (ГСХ).

Поступак рада.

У спектрофотометријску кивету је сипано 0,2 мл фосфатног пуфера (0,5 М, рН=7,4), 0,035 мл оксидованог глудатиона ГССГ (2 мМ), 0,035 мл узорка и вода до укупне запремине од 1 мл. Реакција је започела додавањем 0,035 мл NADPH (0,1 мМ) при температури од 37 °Ц. Промене у апсорбанци су праћене током 3 минута.

Израчунавање резултата: Специфична активност глутатион редуктазе је израчуната према формули:

$$\text{Специфична активност ГР} = \frac{(\Delta A_{\text{уз}} - \Delta A_{\text{сп}}) \times V_{\text{рс}} \times 1000}{6,22 \times V_{\text{уз}} \times \text{Цпр}}$$

$\Delta A_{\text{уз}}$ -средња промена апсорбанце у минути

$\Delta A_{\text{сп}}$ -средња промена апсорбанце слепе пробе

Цпр-концентрација протеина у узорку (мг/мл)

$V_{\text{рс}}$ -запремина реакционе смеше

$V_{\text{уз}}$ -запремина узорка

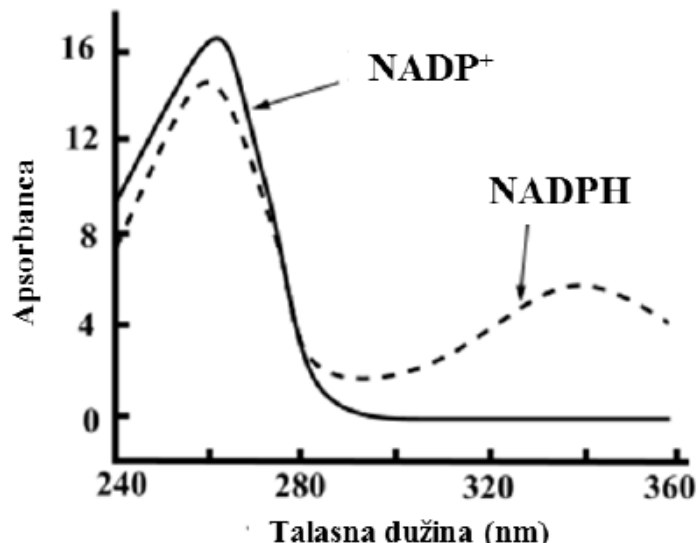
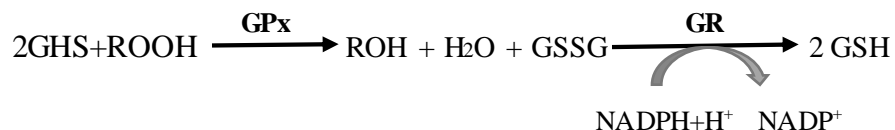
Моларни апсорпциони коефицијент NADP⁺ на 340 нм износи 6,22x10³ лмол⁻¹цм⁻¹. Активност глутатион редуктазе је изражена у специфичним јединицама активности

ензима на мг протеина, при чему је специфична јединица дефинисана као број нмол NADPH који су оксидовани у минути на 1 мг протеина (84).

3.8.6. Одређивање специфичне активности глутатион пероксидазе (ГПх)

Одређивање активности глутатион пероксидазе (ГПх) је засновано на реакцији током које ГПх катализује редукцију органског пероксида уз настајање оксидованог глутатиона (ГССГ) након чега следи редукција ГССГ до редукованог глутатиона (ГСХ) у присуству NADPH, као донора редукционих еквивалената. Ова реакција је катализована у присуству ензима глутатион редуктазе (ГР). Активност ГПх је посматрана спектрофотометријски при чему се прати пад апсорбанце на 340 нм јер на тој таласној дужини NADPH апсорбује светлост, док NADPH⁺ не показује апсорпциони максимум (Слика 19) (85).

Реакција одређивања активности ГПх:



Слика 19. Одређивање активности глутатион пероксидазе и глутатион редуктазе при паду апсорбанце на 340 нм који потиче од NADPH (80)

Поступак рада.

У епрувете је додато по 500 μl воде, 100 μl 1 mM раствора ГСх, 200 μl 0,2 mM раствора NADPH, 35 μl 1 mM раствора EDTA, 100 μl 0,5 M фосфатног пуфера (pH=7,0), 35 μl 30 mM т-бутил-хидропероксида и 50 μl узорка. Након додавања свих састојака вршена је инкубација смеше током 10 мин на 37 °Ц. Реакција је започела након додавања 1,7 μl глутатион редуктазе (ГР) активности 105 У/мг протеина. Током 3 минута је читаван пад апсорбанце на 340nm. У слепој пробу је уместо ГР додато 1,7 μl дестиловане воде.

Израчунавање резултата: Специфична активност ГПх је израчуната према формули:

$$\text{Специфична активност ГПх} = \frac{(\Delta A_{\text{уз}} - \Delta A_{\text{сп}}) \times V_{\text{рс}} \times 1000}{6.22 \times V_{\text{уз}} \times C_{\text{пр}}}$$

$\Delta A_{\text{уз}}$ -средња промена апсорбанце у минути

$\Delta A_{\text{сп}}$ -средња промена апсорбанце слепој пробе

$C_{\text{пр}}$ -концентрација протеина у узорку (мг/мл)

$V_{\text{рс}}$ -запремина реакционе смеше

$V_{\text{уз}}$ -запремина узорка

Моларни апсорпциони коефицијент NADP⁺ на 340 nm износи 6,22x10³ лмол⁻¹cm⁻¹. Специфична активност ГПх је изражена као број нмол NADPH оксидованих током 1 минута по мг протеина (85).

3.8.7. Одређивање специфичне активности глутатион-С-трансферазе (ГСТ)

Глутатион-С-трансфераза (ГСТ) учествује у одвијању реакције коњугације 1-хлоро-2,4-динитро-бензена (ХДНБ) са тиолном групом глутатиона. Једињење настало у овој реакцији је коњугат ХДНБ-С-глутатион који има максимум апсорпције на 340 nm. Активност ензима је одређена мерењем промене апсорбанце на 340nm (86).

Поступак рада.

По 200 μl 0,5 M фосфатног пуфера (pH= 6,5), 20 μl 25 mM раствора ХДНБ у концентрованом етанолу и 680 μl дестиловане воде је додано у епрувете након чега је извршена инкубација на 37°Ц у трајању од 10 мин. Након завршене инкубације у смешу је

пипетирано 50 μ л 20 mM редукованог глутатиона (ГСХ) и 50 μ л узорака хомогената ткива. У слепу пробу је додано 50 μ л дестиловане воде. Током 3 минута праћена је промена апсорбанце на 340 nm.

Израчунавање резултата: Специфична активност ГСТ је израчуната према формули:

$$\text{Специфична активност ГСТ} = \frac{(\Delta A_{уз} - \Delta A_{сп}) \times V_{рс} \times 1000}{9.6 \times V_{уз} \times Цпр}$$

$\Delta A_{уз}$ -средња промена апсорбанце у минути

$\Delta A_{сп}$ -средња промена апсорбанце слепе пробе

Цпр-концентрација протеина у узорку (мг/мл)

$V_{рс}$ -запремина реакционе смеше

$V_{уз}$ -запремина узорка

Моларни апсорпциони коефицијент за коњугат ХДНБ-глутатион износи 9,6 лмол⁻¹цм⁻¹. Специфична активност ГСТ представља број нмол коњугата ХДНБ формираног у минути на 1 мг протеина (86).

3.9. Хистолошке и морфометријске методе

За хистолошку анализу узето је ткиво јетре десног лобуса и спленичног дела панкреаса димензија 5x5 cm. Узетоткиво фиксирано је у пуферисаном формалину у трајању од 24 часа на температури од 4 °C. Након фиксације, узорци ткива су дехидрирани у изорпопил алкохолу. Потом су препарати калушљени у парафину, након чега је извршено сечење узорака (5 µm дебљина препарата) помоћу ротационог микротом (Leica, Germany). Исечци ткива су бојени стандардним хематоксилин еозин методом, након чега је извршена хистолошка анализа узорака ткива (79). Хистолошка анализа изведена је на светлосном микроскопу Leica DMLB 100T, (Germany), а исечци су фотографисани камером Leica MC190HD (Germany).

Морфометријска (квантитативна) анализа ткива панкреаса извршена је након квалитативне анализе ради утврђивања степена оштећења. На исечцима панкреаса камером је фотографисано по 10 насумично одабраних видних поља, при увећању од 50 пута за сваку експерименталну групу. На свакој од фотографија утврђен је проценат ендокриног ткива панкреаса (однос ендокриног : егзокрином паренхима панкреаса). Помоћу софтвера Image J методом бројања тачака које падају на ендокрини део паренхима панкреаса утврђен проценат, односно површинска густина.

3.10. Статистичка анализа резултата

Статистичка обрада података добијених резултата испитивања урађена је помоћу статистичког софтверског програма SPSS (верзија 21; Institute Inc., USA). Као мера централне тенденције неке групе коришћена је аритметичка средина (\bar{x}), док је стандардном девијацијом (\pm СД) изражена мера варијације међу подацима. За обраду *in vitro* резултата коришћена је регресиона анализа, а јачина зависности је утврђена Pearson-овим коефицијентом линеарне корелације. За обраду *in vivo* резултата, за међусобно поређење група унутар једног временског интервала примењена је једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) са Tukey *post hoc* или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* тестовима.

4. Резултати

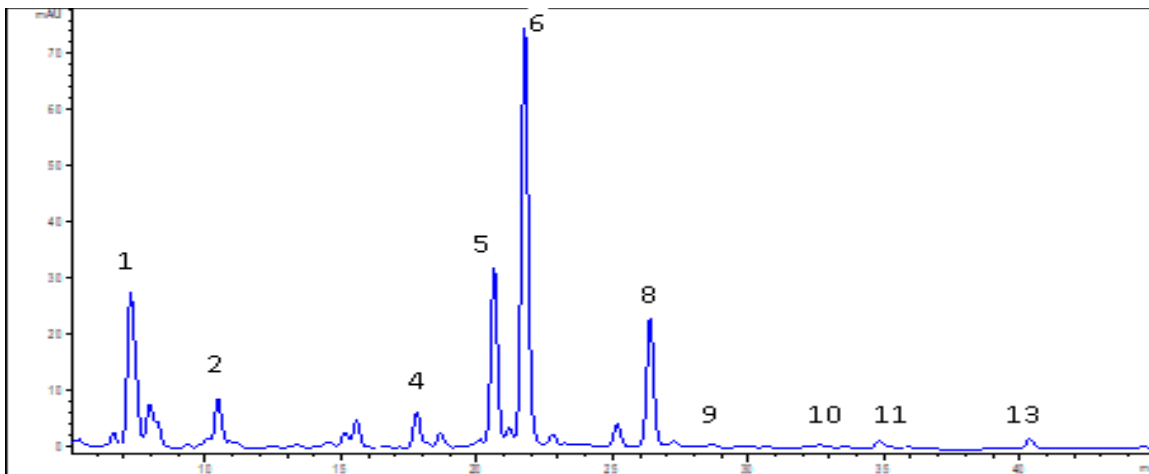
4.1. Резултати *In vitro* испитивања

У оквиру *in vitro* испитивања извршена је квалитативна и квантитативна анализа екстракта коришћених у *in vivo* огледима, као и процена њихове антиоксидативне активности.

Анализа свеже цеђеног воћног сока, етанолних екстракта листа, коре и плода црног дуда вршена је HPLC методом, док је анализа уља добијеног из семенки црног дуда вршена методом гасне хроматографије. Процена антиоксидативне активности испитана је FRAP и DPPH спектрофотометријским методама.

4.1.1. Резултати HPLC анализе ЕЕЛЦД и ЕЕКЦД

На Слици 20. приказана је HPLC анализа ЕЕЛЦД и идентификована фенолна једињења.

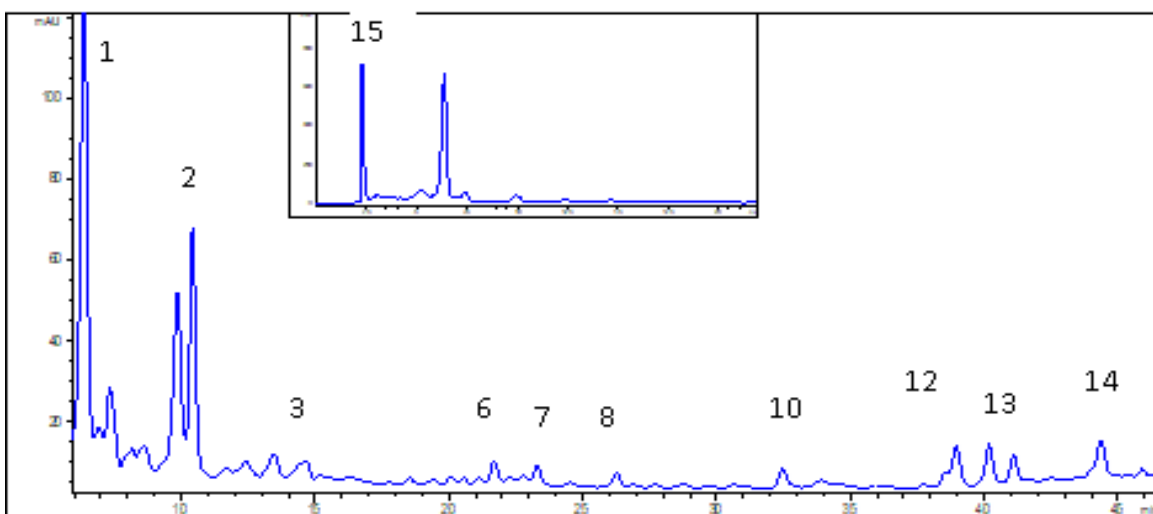


Слика 20. HPLC хроматограм ЕЕЛЦД. Идентификована једињења су: хлорогенска киселина (1), ванилинска киселина (2), рутин (4), хиперозид (5), изоквертецин (6), кемферол-3-О-глукозид (8), флоридзин (9), морин (10), ресвертарол (11), лутеолин (13)

Компонента (6) је изоквертецин, док су остала идентификована једињења хлорогенска киселина (1), ванилинска киселина (2), рутин (4), хиперозид (5), кемферол-3-О-глукозид (8), флоридзин (9), морин (10), ресвертарол (11) и лутеолин (13). У екстракту

листа једињења са највећом измереном концентрацијом била су хлорогенска киселина (1), хиперозид (5), изоквертецин (6) и кемферол-3-*O*-глукозид (8) (Табела 3).

HPLC анализа ЕЕКЦД указала је на присуство фенолних једињења од којих је идентификовано 10 (Слики 21). Хлорогенска киселина (1) је била присутна у највећој концентрацији. Поред хлорогенске киселине у ЕЕКЦД потврђено је и присуство следећих једињења: ванилинске киселине (2), *n*-кумаринске киселине (3), изокверцетина (6), елагинске киселине (7), кемферол-3-*O*-глукозида (8), морина (10), кверцетина (12), лутеолина (13), кемферола (14), галне киселина (15).



Слика 21. HPLC хроматограм ЕЕКЦД. Идентификована једињења су: хлорогенска киселина (1), ванилинска киселина (2), *n*-кумаринска киселина (3), изоквертецин (6), елагинска киселина (7), кемферол-3-*O*-глукозид (8), морин (10), кверцетин (12), лутеолин (13), кемферол (14), гална киселина (15)

У Табели 3 су приказане концентрације једињења изолованих из ЕЕКЦД и ЕЕЛЦД. Једињење које се издваја својом количином у оба етанолна екстракта је хлорогенска киселина (лист црног дуда $40,7 \pm 0,7$ мг/г екстракта; кора црног дуда $142,1 \pm 2,1$ мг/г екстракта). У ЕЕЛЦД поред хлорогенске киселине у значајној концентрацији је присутан изокверцетин ($34,8 \pm 0,5$ мг/г екстракта) и хиперозид ($25,9 \pm 0,2$ мг/г екстракта). Концентрације ових једињења биле су значајно ниже у ЕЕКЦД (изокверцетин $2,6 \pm 0,1$ мг/г екстракта; присуство хиперозида није утврђено). С друге стране у ЕЕКЦД утврђено је значајно присуство галне киселине ($66,2 \pm 0,9$ мг/г екстракта), чије присуство није утврђено у ЕЕЛЦД. Ванилинска киселина је била присутна у оба екстракта, с тим да је концентрација

ове киселине већа у ЕЕКЦД ($13,9 \pm 0,2$ мг/г екстракта) у односу на ЕЕЛЦД ($1,3 \pm 0,1$ мг/г екстракта). Укупан садржај фенолних једињења, танина и удела полифенола је био већи у ЕЕКЦД у односу на ЕЕЛЦД (ЕЕКЦД $68,3 \pm 0,7$ мг/г екстракта; ЕЕЛЦД $23,4 \pm 0,7$ мг/г екстракта).

Табела 3. Квалитативни и квантитативни састав фенолних једињења екстракта листа и коре црног дуда утврђен HPLC анализом

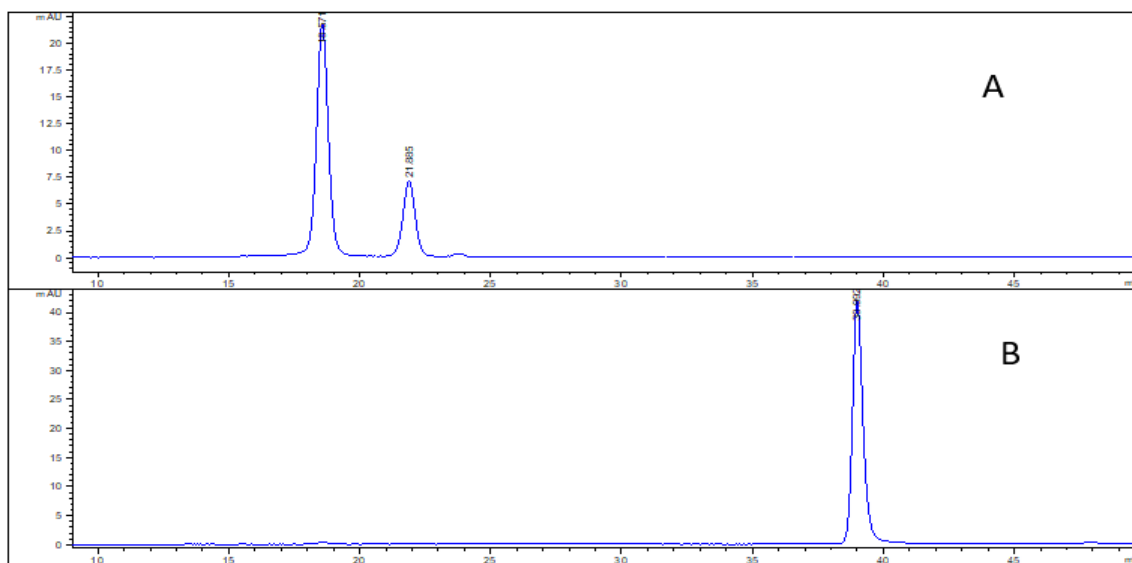
	Једињење	ЕЕЛЦД (мг/г екстракта)	ЕЕКЦД (мг/г екстракта)
1.	хлорогенска киселина	$40,7 \pm 0,7$	$142,1 \pm 2,1$
2.	ванилинска киселина	$1,3 \pm 0,1$	$13,9 \pm 0,2$
3.	<i>n</i> -кумаринска киселина		$2,8 \pm 0,1$
4.	рутин	$2,7 \pm 0,1$	
5.	хиперозид	$25,9 \pm 0,2$	
6.	изокверцетин	$34,8 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,1$
7.	елагинска киселина		$0,8 \pm 0,1$
8.	кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	$4,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
9.	флоридзин	t	
10.	морин	t	$0,9 \pm 0,1$
11.	ресвератрол	$1,0 \pm 0,1$	
12.	кверцетин		$2,4 \pm 0,1$
13.	лутеолин	$0,3 \pm 0,0$	$2,2 \pm 0,1$
14.	кемферол		$2,1 \pm 0,1$
15.	гална киселина		$66,2 \pm 0,9$
	Укупни танини(%)	$0,4 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$
	Укупни флавоноиди (%)	$1,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
	Удео полифенола мгGAE/г сувог остатка	$23,4 \pm 0,5$	$68,3 \pm 0,7$

На основу резултата приказаних у Табели 3 уочљиво је да су састав и концентрације једињења у ЕЕКЦД дуда значајно различите у односу на ЕЕЛЦД. На основу добијених резултата показано је да се ЕЕКЦД одликује присуством већег броја активнијих фенолних једињења, као и приближно три пута већим укупним садржајем ових једињења. Такође концентрација појединих једињења попут хлорогенске киселине је знатно већа у поређењу са концентрацијом хлорогенске киселине у ЕЕЛЦД. Сличан однос постоји и

између концентрација ванилинске киселине, при чему је концентрација овог једињања у ЕЕКЦД готово десет пута већа у односу на ЕЕЛЦД.

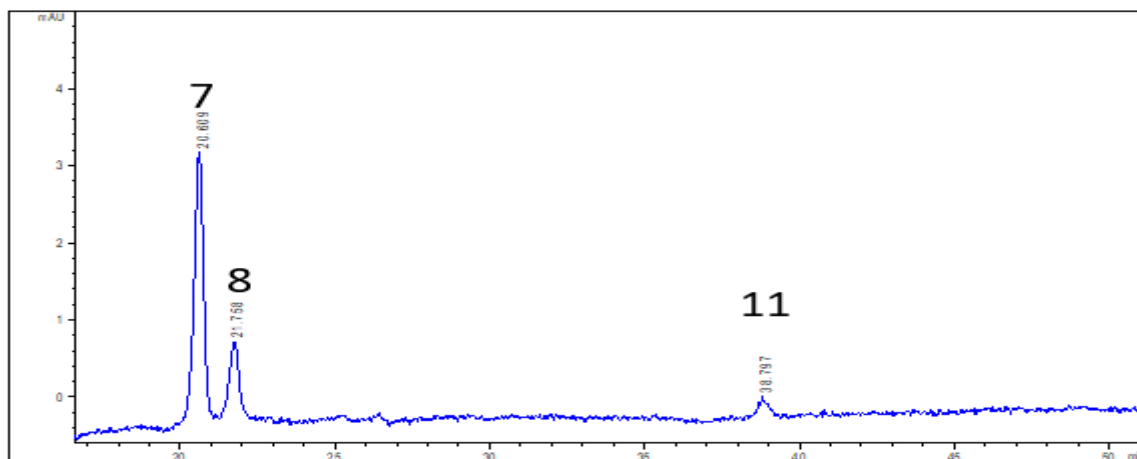
4.1.2. Резултати HPLC анализа СЦД и ЕЕПЦД

HPLC анализа узорака СЦД урађена је пре и након извршене хидролизе. На хроматограму (Слика 22 А) се уочавају два пика регистрована у СЦД пре хидролизе, који одговарају цијанидин-3-*O*-глукозиду (18,51 мин), цинанидин-3-*O*-рутинозиду (21,97 мин). Након хидролизе HPLC хроматограм се састојао само из једног пика који је идентификован као цијанидин хлорид (38,89 мин) (Слика 22 Б). Након хидролизе, HPLC анализом узорака утврђено је присуство само једног агликона – цијанидина што је потврдило налазе да испитивани узорци садрже глукозиде цијанидног агликона (глукозид, рутинозид).



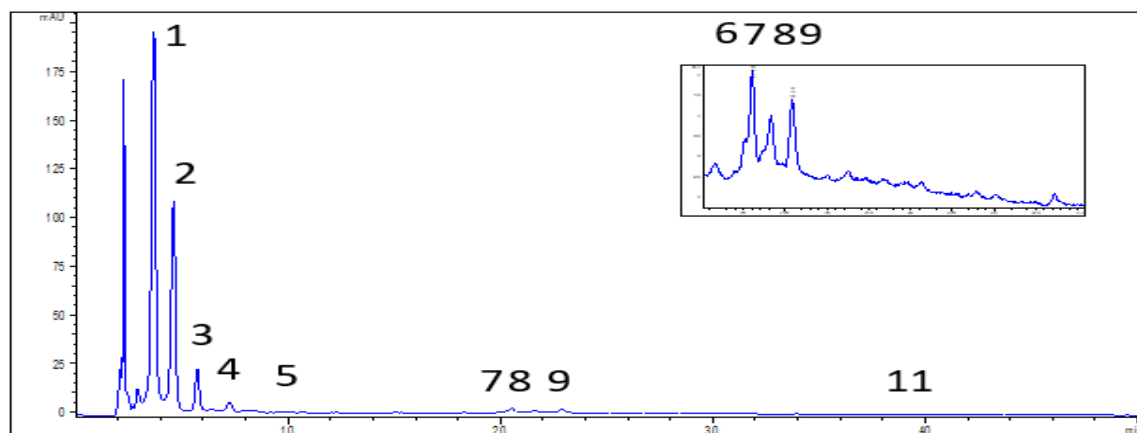
Слика 22. HPLC хроматограм са приказом антоцијана идентификованих у СЦД пре хидролизе (А) и након хидролизе (Б) снимљено на 520нм

HPLC анализом СЦД при таласној дужини од 360 нм идентификовани су флавоноиди хиперозид, изокверцетин и кверцетин (Слика 23).



Слика 23. Хроматограм HPLC анализе СЦД снимљен на 360nm: хиперозид (7), изоквертецин (8) и кверцетин (11)

HPLC анализом ЕЕПЦД на 260 nm утврђено је присуство следећих једињења (Слика 24): процијанидина Б1 (1), протокатехуинске киселине (2), *n*-хидроксибензоева киселине (3), хлорогенске киселине (4), епикатехина (5), хиперозида (7), рутина (6), изоквертецина (8), етил етар протокатехуинске киселине (9), кверцетина (11).



Слика 24. HPLC хроматограм ЕЕПЦД снимљен на 260 nm: процијанидин Б1 (1), протокатехуинска киселина (2), *n*-хидроксибензоева киселина (3), хлорогенска киселина (4), епикатехин (5), рутин (6), хиперозид (7), изоквертецин (8), етил етар протокатехуинске киселине (9), кверцетин (11)

У Табели 4 приказане су концентрације једињења изолованих из етанолног екстракта плода црног дуда и свеже цеђеног сока црног дуда. На основу измерених вредности уочљива је разлика у саставу екстраката. Најзначајнија разлика јесте у садржају антоцијанина при чему је садржај у соку ($0,84 \pm 0,11\%$) готово осам пута већи у односу на екстракт плода ($0,11 \pm 0,01\%$). У свежем соку утврђено је присуство цијанидин хлорида

($7,96 \pm 0,61$ мг/г), цинанидин-3-*O*-глукозида ($7,04 \pm 0,54$ мг/г) и цијанидин-3-*O*-рутинозида ($2,10 \pm 0,11$ мг/г) који нису били присутни у екстракту плода, док је с друге стране у екстракту плода утврђено присуство процијанидина Б1 ($13,81$ мг/г) који није детектован у свеже цеђеном соку црног дуда. Присуство процијанидина утврђено је само у екстракту плода ($1,88 \pm 0,02\%$), док у узорку сока ова једињења нису детектована.

Табела 4. Квалитативни и квантитативни састав фенолних једињења свеже цеђеног сока црног дуда и екстракта плода утврђен HPLC анализом

	Једињење	Сок (мг/г екстракта)	ЕЕПЦД (мг/г екстракта)
1.	цијанидин хлорид	$7,96 \pm 0,61$	/
2.	цинанидин-3- <i>O</i> -глукозида	$7,04 \pm 0,54$	/
3.	цијанидин-3- <i>O</i> -рутинозида	$2,10 \pm 0,11$	/
4.	процијанидина Б1	/	13,81
5.	протокатехинска киселина	/	1,33
6.	<i>l</i> -хидроксибензоева киселина	/	0,10
7.	хлорогенска киселина	/	0,51
8.	епикатехин	3,04	0,10
9.	хиперозид	0,10	0,03
10.	изокверцетин	0,07	0,02
11.	етил естар прокатехуинске киселине	/	0,03
12.	кверцетин	0,01	/
	Укупни танини (%)	$0,05 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,01$
	Укупни флавоноиди (%)	/	/
	Садржај полифенолна мгGAE/г суве материје	$14,69 \pm 0,09$	$18,68 \pm 0,11$
	Антоцијанини (%)	$0,84 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
	Садржај процијанидина (%)	-	$1,88 \pm 0,02$

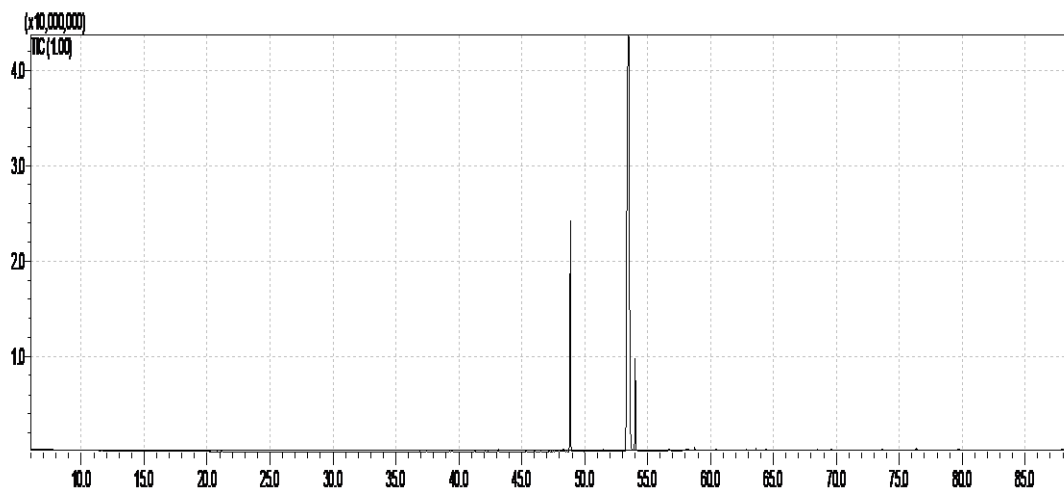
Укупан садржај полифенола био је већи у екстракту плода црног дуда ($18,68 \pm 0,11$ мгGAE/г суве материје) у односу на свеже цеђени сок плода црног дуда ($14,69 \pm 0,09$ мгGAE/г суве материје). У екстракту плода је такође утврђено присуство протокатехуинске киселине ($1,33$ мг/г), која није детектована у свеже цеђеном соку.

Укупан садржај танина био је десет пута већи у екстракту плода ($0,52 \pm 0,01\%$) у односу на садржај у свеже цеђеном соку ($0,05 \pm 0,01\%$).

У значајно већој концентрацији у свеже цеђеном соку плода црног дуда био је присутан епикатехин (3,04 мг/г екстракта), чија је концентрација у екстракту плода износила само 0,10 мг/г екстракта.

4.1.3. Резултати анализе УСЦД гасном хроматографијом

Резултати гаснохроматографске анализе уља семенки црног дуда приказани су на Слици 25 и у Табели 5.



Слика 25. GC хроматограм УСЦД

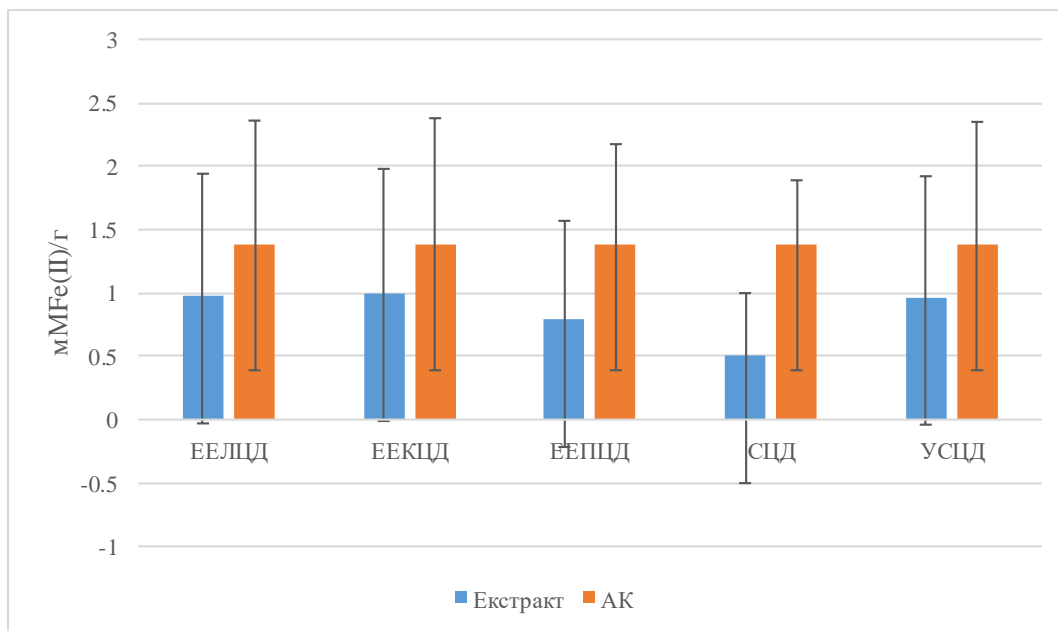
Квантификацијом састава установљено је да доминирају метил естри октадеканске, линолне и олеинске масне киселине (88,5%). Метил палмитат и метил хексадеканат заступљени су са 8,6% у анализираном узорку уља семенки плода црног дуда, док је метил стеарат заступљен са 2,5%. Најнижи удео у анализираном уљу семенки имао је метил естар арахидонске киселине који је присутан са само 0,1%.

Табела 5. Квалитативни и квантитативни састав метил естара масних киселина УСЦД утврђен методом гасне хроматографије

	Једињење	Ковачев индекс	Процент (%)
1.	Метил естар хексадеканске киселине (метил палмитат)	1925	8,6
2.	Метил естар (Z)-9, (Z)-12-октадекадиенске киселине (метил линолеат MW 294) + Метил естар (Z)-9-октадекенске киселине (метил олеат; MW 296)	2085, 2101	88,5
3.	Метил естар n-октадеканске киселина (метил стеарат)	2123	2,5
4.	Метил естар еикозаноичне киселине (метил арахидонат)	2134	0,1
		Укупно	99,7

4.1.4. Резултати испитивања антиоксидативног капацитета FRAP методом

Антиоксидативни капацитет етанолних екстраката листа, коре, плода, свеже цеђеног сока и уља црног дуда одређен је *in vitro* FRAP методом. Антиоксидативни капацитет је изражен као концентрација антиоксиданса који има способност редукције гвожђа која је еквивалентна оној коју поседује 1 mM феро сулфата. На Графикону 1 приказан је антиоксидативни капацитет испитиваних узорака. Добијене вредности биле су у опсегу од $0,499 \pm 0,27$ до $0,97 \pm 0,27$ mMFe(II)/г екстракта. Највећи антиоксидативни капацитет је установљен за етанолне екстракте коре и листа, као и уља семенки црног дуда са вредностима од $0,989 \pm 0,27$ mMFe(II)/г за ЕЕКЦД, $0,97 \pm 0,27$ mMFe(II)/г за ЕЕЛЦД и $0,96 \pm 0,27$ mMFe(II)/г за УСЦД.

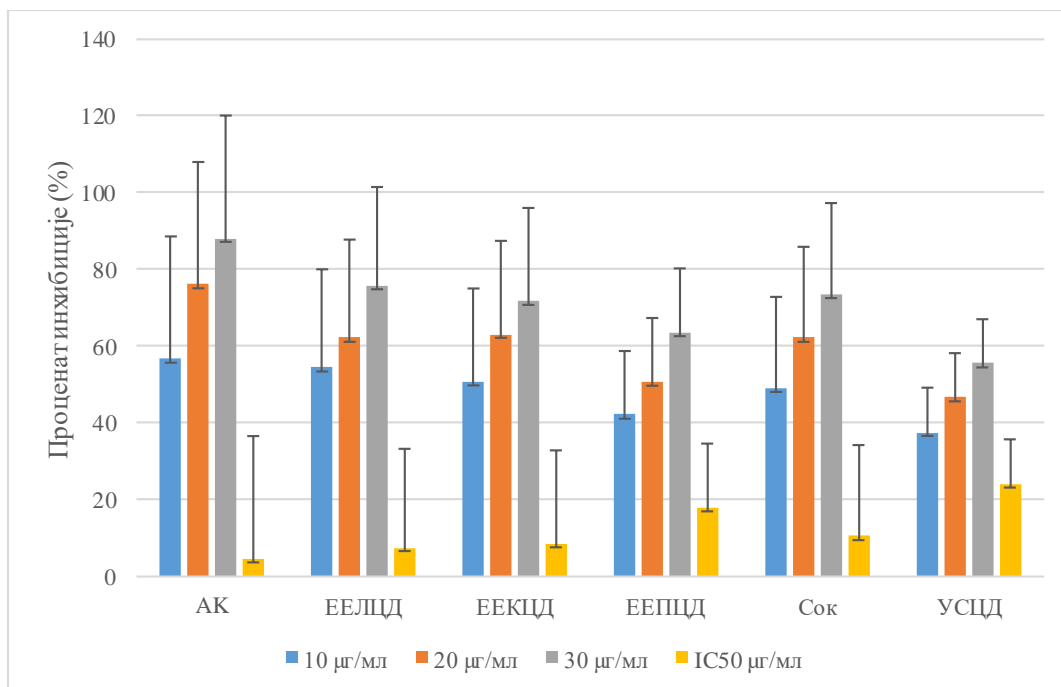


Графикон 1. FRAP антиоксидативни капацитет екстраката црног дуда

4.1.5. Резултати испитивања антиоксидативне активности DPPH методом

На Графикону 2 приказани су резултати DPPH теста помоћу којег су анализирани антиоксидативне способности етанолних екстраката коре, листа и плода, сока и уља црног дуда, а бољу антиоксидативну активност поседују узорци који имају мању вредност IC_{50} . Сви испитивани екстракти и сок црног дуда су показали антиоксидативну

активност, са вредностима ИК₅₀ у распону од 7,64 до 24,19 µг/мл. Добијени резултати показују да испитивани етанолни екстракти листа и коре црног дуда, као и сока црног дуда показују бољу антиоксидативну активност у поређењу са етанолним екстрактом плода и уља семенки. Највећа антиоксидативна активност утврђена је за ЕЕЛЦД, ЕЕКЦД и за сок са вредностима ИК₅₀ од 7,64 µг/мл за ЕЕЛЦД, 8,62 µг/мл за ЕЕКЦД и 10,49 µг/мл за сок.



Графикон 2. Процент инхибиторних вредности DPPH и вредности ИК₅₀

4.2. Резултати *In vivo* испитивања

У *In vivo* испитивањима извршена је процена антидијабетесног потенцијала етанолних екстраката листа, плода и коре, затим сока и уља семенки црног дуда, одређивањем вредности гликемије и телесне масе здравим и дијабетичним мишевима, након спровођења ОГТТ и индукције дијабетеса стрептозотоцином.

4.2.1. Здраве животиње

4.2.1.1. Лист

У Табели 6 приказане су разлике у вредности гликемије током ОГТТ спроведеног након 1, 7 и 28 дана примене етанолних екстраката листа црног дуда у дозама од 125, 250 и 500 мг/кг телесне масе. У свим временским тачкама у којима је вршено извођење теста у групи животиња третираних екстрактом Л500 забележен је најмањи скок вредности гликемије (изузев након примене 1 дозе када је најнижа вредност разлике утврђена у контролној групи) у поређењу са контролном групом и групама третираним екстрактом Л250 и Л125. Поредићи разлике у вредности гликемије у посматраним временским тачкама уочава се да је утицај етанолних екстраката листа у дози од 125 мг/кг и 250 мг/кг телесне масе приближан ефекту испољеном у контролној групи третираној физиолошким раствором, изузев након примене 1 дозе када је најнижа вредност разлике утврђена у контролној групи, а разлике у односу на две поменуте групе третиране екстрактом (Л250 и Л125) статистички значајне.

Табела 6. Вредности гликемије нормогликемичних животиња. Средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey post hoc (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney post hoc где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	Старт	$\Delta 1$ д	$\Delta 7$ д	$\Delta 28$ д
КФ	8,12 \pm 0,78	3,46 \pm 1,64	6,34 \pm 2,35	5,52 \pm 0,82
Л125	7,47 \pm 1,52	7,38 \pm 3,17 ²	6,02 \pm 2,79	6,06 \pm 2,91
Л250	8,17 \pm 1,02	8,25 \pm 1,27 ^{1,2}	7,10 \pm 0,77	6,60 \pm 1,47
Л500	6,27 \pm 1,12	3,90 \pm 1,80	3,78 \pm 2,09	4,36 \pm 1,07

¹ $p < 0,05$ у односу на Л500

² $p < 0,05$ у односу на КФ

Вредности телесних маса нормогликемичних животиња, мерених током 28 дана, су приказане у Табели 7. Примена свих доза етанолних екстраката листа црног дуда након 28 дана није довела до значајнијег смањења телесне масе третираних животиња. Разлика у измереним вредностима телесних маса нормогликемичних мишева, ТМ28 и ТМ старт, указује на приближне или слабије ефекте етанолних екстраката листа црног дуда на смањење телесне масе мишева у поређењу са утицајем физиолошког раствора којим су биле третиране животиње контролне групе. При том није утврђено постојање статистички значајне разлике у измереним вредностима телесне масе.

Tabela 7. Вредности телесне масе нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	ТМстарт	ТМ7	ТМ14	ТМ21	ТМ28	Δ 28-старт
КФ	28,29 \pm 1,34	29,38 \pm 1,33	32,02 \pm 1,01	32,46 \pm 0,90	35,42 \pm 1,07	7,14 \pm 0,57
Л125	27,40 \pm 3,10	27,78 \pm 1,87	29,28 \pm 3,08	30,84 \pm 3,38	31,70 \pm 3,93	6,30 \pm 3,00
Л250	27,45 \pm 2,42	28,68 \pm 2,16	33,33 \pm 1,72	33,90 \pm 1,57	35,20 \pm 1,44	7,75 \pm 2,03
Л500	26,58 \pm 0,60	27,64 \pm 1,55	31,86 \pm 1,55	30,50 \pm 1,26	31,94 \pm 1,09	11,16 \pm 1,18

4.2.1.2. Кора

Вредности разлика гликемије током ОГГТ спроведеног након 1, 7 и 28 дана примене етанолних екстраката коре црног дуда у дозама од 125, 250 и 500 мг/кг телесне масе приказане у Табели 8. Упоредјујући разлике у вредности гликемије у посматраним временским тачкама уочава се да је утицај етанолних екстраката коре у свим дозама приближан или бољи од ефекта испољеног у контролној групи третираној физиолошким раствором, изузев након примене 1 дозе када је најнижа вредност разлике утврђена у контролној групи. Након примене 7 доза екстракта у групи К500, пораст гликемије био је мањи у поређењу са контролном групом и групама К125 и К250. Након 28-дневног третмана (Δ 28д) забележене су ниже вредности пораста гликемије у ОГГТ за сва три екстракта коре црног дуда (К125, К250, К500) у поређењу са физиолошким раствором али без утврђене статистичке значајности.

Табела 8. Вредности гликемије нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	Старт	$\Delta 1$ д	$\Delta 7$ д	$\Delta 28$ д
КФ	8,06 \pm 0,94	3,46 \pm 1,64	6,34 \pm 2,35	5,52 \pm 0,82
К125	6,24 \pm 0,29 ¹	12,83 \pm 1,06 ¹	6,98 \pm 0,93	4,74 \pm 0,84
К250	6,20 \pm 0,12 ¹	10,57 \pm 1,39	6,00 \pm 0,65	4,68 \pm 0,29
К500	6,18 \pm 0,58 ¹	8,18 \pm 3,29	5,10 \pm 0,84	3,99 \pm 0,55

¹ $p < 0.05$ у односу на КФ

Вредности телесних маса нормогликемичних животиња након третмана етанолним екстрактима коре црног дуда су приказане у Табели 9. Испитивањем етанолних екстраката коре црног дуда различитих концентрација (К125, К250 и К500 мг/кг телесне масе) регистровано је смањење ($\Delta 28$ -старт) вредности телесних маса након 28 дана од почетка третмана наведеним екстрактима у односу на физиолошки раствор при чему је разлика била статистички значајна ($p < 0,05$). Примењени екстракти коре црног дуда довели су до заустављања раста телесне масе (К125, К500) током посматраног периода, односно до минималног пораста (К250; 1,21 \pm 0,93г) док је у контролној групи пораст телесне масе био значајно виши након 28 дана (КФ 7,14 \pm 0,57г).

Табела 9. Вредности телесне масе нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	ТМ старт	ТМ7	ТМ14	ТМ21	ТМ28	$\Delta 28$ -старт
КФ	28,29 \pm 1,34	29,38 \pm 1,33	32,02 \pm 1,01	32,46 \pm 0,90	35,42 \pm 1,07	7,14 \pm 0,57
К125	31,94 \pm 1,53	29,91 \pm 1,71	30,41 \pm 1,53	30,79 \pm 1,65	31,89 \pm 1,62	-0,06 \pm 0,64 ¹
К250 ^{##}	29,63 \pm 1,47	29,11 \pm 1,12	29,70 \pm 1,06	29,49 \pm 1,19	31,27 \pm 1,28	1,21 \pm 0,93 ¹
К500	33,05 \pm 1,52	31,60 \pm 1,50	31,78 \pm 1,51	31,77 \pm 1,48	32,95 \pm 1,64	-0,10 \pm 1,13 ¹

¹ $p < 0.05$ у односу на КФ

^{##}Тестом repeated measures ANOVA упоређене су вредности телесних маса експерименталних животиња мерених у пет различитих временских интервала. Утврђен је значајан утицај времена за групу третирану екстрактом коре 250. За групу К250 су добијене следеће вредности: Wilks' Lambda = 0.012, F (3, 4) = 60.46, $p < 0.05$, Multivariate Partial Eta Squared = 0.98. Како нису били испуњени сви услови за спровеђење mixed between-within subjects ANOVA (или split-plot ANOVA – SPANOVA) теста није била могућа свеобухватна анализа заједничког утицаја две различите променљиве, а то су време и различити третмани.

4.2.1.3. Плод

Утицај етанолних екстраката плода на пораст вредности гликемије нормогликемичних животиња при ОГТТ је приказан у Табели 10. Упоредјујући разлике у измереним вредностима гликемије уочава се да је утицај етанолних екстраката плода у дозама од 125 и 250 мг/кг слабији од ефекта испољеног у контролној групи третираној физиолошким раствором, након примењене 1 и 7 доза, док је након примењених 28 доза, пораст гликемије био мањи у свим групама третираним екстрактом плода у поређењу са контролном групом. У групи третираној екстрактом плода у дози од 500мг/кг пораст гликемије био је мањи у свим временским тачкама извођења ОГТТ, при чему разлике између измерених вредности (П500 и КФ) нису биле статистички значајне.

Табела 10. Вредности гликемије нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	Старт	$\Delta 1$ д	$\Delta 7$ д	$\Delta 28$ д
КФ	8,06 \pm 0,94	3,46 \pm 1,64	6,34 \pm 2,35	5,52 \pm 0,82
П125	7,18 \pm 0,71	5,58 \pm 4,01	8,48 \pm 1,15 ²	4,79 \pm 1,61
П250	7,81 \pm 0,93	5,24 \pm 3,15	8,06 \pm 2,42 ²	3,41 \pm 1,97
П500	6,99 \pm 0,94	2,46 \pm 3,80	4,87 \pm 2,14	2,98 \pm 1,02

¹ $p < 0.05$ у односу на КФ

² $p < 0.05$ у односу на П500

Вредности телесних маса нормогликемичних животиња након третирања етанолним екстрактом плода црног дуда су приказане у Табели 11. Након 28 дана примене физиолошког раствора, дошло је до пораста телесне масе у свим експерименталним групама. Пораст телесне масе био је приближан (П250 и П500), или већи (П125) у поређењу са контролном групом, при чему није утврђено постојање статистички значајне разлике у промени телесне масе након 28 дана третмана.

Табела 11. Вредности телесне масе нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	ТМстарг	ТМ7	ТМ14	ТМ21	ТМ28	Δ28-старг
КФ	28,29 \pm 1,34	29,38 \pm 1,33	32,02 \pm 1,01	32,46 \pm 0,90 ²	35,42 \pm 1,07	7,14 \pm 0,57
П125	23,80 \pm 1,78	31,72 \pm 1,35	30,44 \pm 0,98	33,14 \pm 0,66 ²	34,20 \pm 0,59	10,40 \pm 1,47
П250	25,69 \pm 1,90	31,24 \pm 1,31	28,79 \pm 1,15	29,97 \pm 1,33	31,96 \pm 1,70	6,27 \pm 0,69
П500	22,79 \pm 2,32	28,54 \pm 0,43	27,44 \pm 0,99 ¹	28,07 \pm 0,52	30,04 \pm 0,72 ¹	7,26 \pm 1,20

¹ $p<0.05$ у односу на КФ

² $p<0.05$ у односу на П500

³ $p<0.05$ у односу на П125

4.2.1.4. Сок

Утицај свеже цеђеног сока црног дуда на разлике у вредностима гликемије нормогликемичних животиња у ОГТТ су приказане у Табели 12. Након примене 1 дозе сока црног дуда у свим групама (С125, С250, С500) утицај на пораст гликемије био је истоветан (С125) или слабији (С250, С500) у поређењу са контролном групом. Након 7 и 28 дана примене сока црног дуда пораст гликемије у ОГТТ био је нижи у поређењу са контролном групом, изузев у групи С500 након примене 28 доза, у којој је пораст гликемије у тој временској тачци био виши у поређењу са контролном групом. Измерена разлика у вредности гликемије била је статистички значајно већа у поређењу са контролном групом и групама С125 и С250 ($p<0,05$).

Табела 12. Вредности гликемије нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	Старг	Δ1д	Δ7д	Δ28д
КФ	8,06 \pm 0,94	3,46 \pm 1,64	6,34 \pm 2,35	5,52 \pm 0,82 ²
С125	5,40 \pm 0,88 ¹	3,43 \pm 2,41	4,77 \pm 1,70	4,06 \pm 0,85 ²
С250	5,72 \pm 0,85 ¹	4,27 \pm 2,25	5,89 \pm 2,86	4,57 \pm 0,70 ²
С500	6,47 \pm 0,91 ¹	4,57 \pm 1,31	5,27 \pm 1,27	7,53 \pm 1,68

¹ $p<0.05$ у односу на КФ

² $p<0.05$ у односу на С500

Утицај свеже цеђеног сока црног дуда на вредности телесних маса нормогликемичних животиња током 28 дана је представљен у Табели 13. Примена сока

црног дуда у дозама од 125, 250 и 500 мг/кг телесне масе, није довела до снижавања телесне масе експерименталних животиња. Промена вредности телесне масе након 28 дана третмана била је уједначена између експерименталних група, и при том приближна промени установљеној у контролној групи.

Tabela 13. Вредности телесне масе нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала

Групе	ТМстарг	ТМ7	ТМ14	ТМ21	ТМ28	Δ 28-старг
КФ	28,29 \pm 1,34	29,38 \pm 1,33	32,02 \pm 1,01	32,46 \pm 0,90	35,42 \pm 1,07	7,14 \pm 0,57
С125	24,04 \pm 1,18	26,77 \pm 1,22	28,77 \pm 1,27 ²	29,67 \pm 1,47	30,81 \pm 1,48	6,77 \pm 0,87
С250	21,63 \pm 0,82 ¹	25,11 \pm 0,78	30,10 \pm 1,04	28,66 \pm 1,26	29,50 \pm 1,34 ¹	7,87 \pm 1,05
С500	24,55 \pm 1,33	26,95 \pm 1,18	33,73 \pm 1,10	31,17 \pm 0,86	32,35 \pm 1,04	7,80 \pm 0,95

¹ $p < 0.05$ у односу на КФ

² $p < 0.05$ у односу на С500

³ $p < 0.05$ у односу на С125

4.2.1.5. Уље

Утицај уља семенки црног дуда на пораст гликемије нормогликемичних животиња при ОГТТ приказан је у Табели 14. Након примене 1 дозе уља у свим експерименталним групама утврђен је знајачно нижи пораст гликемије у поређењу са контролном групом (У125, У250 $p < 0,05$; У500 $p < 0,05$). Поменути ефекат није уочен након седмодневног третмана, при чему је пораст гликемије био истоветан (У250, У500) или већи (У125) у односу на контролну групу. Након примене у трајању од 28 дана уочен је ефекат сличан након примене од 7 дана. Пораст гликемије у ОГТТ био је већи у експерименталној групи У125 у поређењу са контролном групом. У групи У250 пораст је био сличан порасту у контролној групи, док је у групи У500 пораст био уочљиво нижи, при чему статистички значајна разлика у односу на контролну групу није утврђена.

Tabela 14. Вредности гликемије нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	ШУКулаз	$\Delta 1$ д	$\Delta 7$ д	$\Delta 28$ д
КУ	3,88 \pm 0,40	7,51 \pm 3,04	3,32 \pm 1,59	4,45 \pm 2,61
У125	6,00 \pm 0,97 ¹	5,34 \pm 1,00	5,02 \pm 2,10	5,62 \pm 1,30 ²
У250	5,44 \pm 0,53 ¹	3,69 \pm 2,05 ¹	3,41 \pm 1,61	4,10 \pm 1,00
У500	5,00 \pm 1,01 ¹	3,68 \pm 1,84 ¹	3,52 \pm 1,77	2,62 \pm 0,95

¹ $p < 0.05$ у односу на КУ

² $p < 0.05$ у односу на У500

Вредности телесним маса нормогликемичних животиња под утицајем уља семенки црног дуда су приказане у Табели 15. Примена уља семенки црног дуда током 28 дана у дозама од 125мг/кг, 250 мг/кг и 500 мг/кг телесне масе, довела је до промене телесне масе која је била уједначена и истоветна промени у контролној групи. У свим групама забележен је пораст телесне масе у посматраном периоду, при чему нису утврђене статистички значајне разлике у погледу промена вредности телесне масе након 28 дана третмана.

Tabela 15. Вредности телесне масе нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала

Групе	ТМстарг	ТМ7	ТМ14	ТМ21	ТМ28	$\Delta 28$ -старг
КУ	22.49 \pm 1.00	27.90 \pm 1.65	32.80 \pm 2.60	34.39 \pm 3.51	36.45 \pm 4.20	13.96 \pm 3.73
У125	28.85 \pm 2.00 ¹	32.88 \pm 1.96 ¹	38.21 \pm 2.34 ¹	39.46 \pm 2.63	42.42 \pm 2.26 ¹	13.58 \pm 2.08
У250	28.76 \pm 1.77 ¹	33.14 \pm 2.02 ¹	37.02 \pm 2.30	37.84 \pm 2.35	41.11 \pm 3.04	12.35 \pm 2.65
У500	26.92 \pm 3.51 ¹	31.38 \pm 4.24 ¹	35.79 \pm 5.95	36.82 \pm 5.98	39.85 \pm 5.94	12.92 \pm 4.51

¹ $p < 0.05$ у односу на КУ

Вредности промене гликемије нормогликемичних животиња при ОГТТ у групама третираним екстракцима листа, коре, сока, плода и семена у највећој испитиваној дози од 500 мг/кг телесне масе приказане су у Табели 16. Посматрајући разлике у порасту гликемије након 28 дана примене испитиваних екстраката уочавају се ниже вредности у групама третираних екстракцима Л500, К500, П500, С500 у поређењу са групом која је третирана соком у дози од 500 мг/кг, при чему су вредности у групи С500 биле статистички значајно више у поређењу са осталим експерименталним групама.

Tabela 16. Вредности гликемије нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	Старт	$\Delta 1$ д	$\Delta 7$ д	$\Delta 28$ д
Л500	6.00 \pm 1.15	3.90 \pm 1.80	3.78 \pm 2.09	4.36 \pm 1.07 ¹
К500	6.18 \pm 0.58	8,18 \pm 3,29	5,10 \pm 0,84	3,99 \pm 0,55 ¹
П500	6.99 \pm 0.94 ¹	2.46 \pm 3.80	4.87 \pm 2.14	2,98 \pm 1,02 ¹
С500	6.47 \pm 0.91	4.57 \pm 1.31	5.27 \pm 1.27	7.53 \pm 1.68
У500	5.00 \pm 1.01	3.68 \pm 1.84	3.52 \pm 1.77	2,62 \pm 0, 95 ¹

¹ $p < 0.05$ у односу на С500

Вредности телесне масе нормогликемичних животиња третираних максималним дозама естраката листа, коре, плода, сока и семена (500 мг/кг телесне масе) приказане су у Табели 17. Испитивањем промена телесне масе након 28 дана третмана, забележен је пораст телесне масе у свим експерименталним групама изузев у групи третираној етанолним екстрактом коре у којој је забележено минимално смањење телесне масе.

Tabela 17. Вредности телесне масе нормогликемичних животиња, средња вредност \pm СД; $n=6$, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где је било потребно) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала

Групе	ТМстарг	ТМ7	ТМ14	ТМ21	ТМ28	$\Delta 28$ -старг
Л500	26.58 \pm 0.60 ¹	27.64 \pm 1.55	31.86 \pm 1.55	30.50 \pm 1.26 ³	31.94 \pm 1.09 ³	11.16 \pm 1.18 ¹
К500	33.05 \pm 1.52	31.60 \pm 1.50	31.78 \pm 1.51	31.77 \pm 1.48	32.95 \pm 1.64 ³	-0.10 \pm 1.13
П500	22.79 \pm 2.32 ¹	28.54 \pm 0.43	27.44 \pm 0.99 ³	28.07 \pm 0.52 ³	30.04 \pm 0.72 ³	7.26 \pm 1.20 ¹
С500	24.55 \pm 1.33 ¹	26.95 \pm 1.18	33.73 \pm 1.10	31.17 \pm 0.86	32.35 \pm 1.04 ³	7.80 \pm 0.95 ¹
У500	26.92 \pm 3.51 ¹	31.38 \pm 4.24	35.79 \pm 5.95	36.82 \pm 5.98	39.85 \pm 5.94	12.92 \pm 4.51 ¹

¹ $p < 0.05$ у односу на К500

³ $p < 0.05$ у односу на У500

4.2.2. Животиње са дијабетесом изазваним применом стрептозотоцина

Промене вредности гликемије животиња код којих је дијабетес изазван применом стрептозотоцина, приказане су у Табели 18. Након индукције дијабетеса експерименталне животиње третиране су у трајању од 28 дана физиолошким раствором (контролна група), те етанолним екстрактима листа, коре и плода (500мг/кг телесне масе) и свеже цеђеног сока црног дуда (500мг/кг телесне масе). У контролној групи КУС су

третиране маслиновим уљем, а вредности гликемија служиле су за поређење са експерименталном групом животиња третираној уљем из семенки црног дуда у концентрацији од 500 мг/кг телесне масе.

Поређењем промена вредности нивоа гликемије пре почетка третмана и након примене 28 доза испитиваних екстраката значајно смањење вредности гликемија утврђене су код примене етанолног екстракта листа у групи Л500С (-3,85±3,60 ммол/л) и примене свеже цеђеног сока у групи С500С (-3,90±2,80 ммол/л). Поред поменутих експерименталних група, бољи ефекат забележен је и у групама К500С и П500С, у којима је пораст гликемије био нижи у односу на контролну групу третирану физиолошким раствором. Такође, утврђен је повољан утицај примене уља из семенки црног дуда, код којих је пораст гликемије био минималан и истовремено нижи у поређењу са контролном групом КУС, која је третирана маслиновим уљем.

Табела 18. Вредности гликемије животиња са дијабетесом, средња вредност ± СД; n=6, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где треба) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала

Групе	Улаз	Старт(ДМ)	Δ1доза	Δ7-старт	Δ14-7	Δ21-14	Δ28-21	Δ28-старт
КФС	4,80±0,86	28,95±5,84	0,20±0,86 ^{1,2}	2,78±5,79	1,30±1,72	0,04±0,11	-1,79±2,88 ²	2,52±5,94
Л500С	3,68±0,42	32,20±1,70	-1,82±2,20	-1,52±5,89	3,52±5,20	-1,92±2,72	-2,12±2,95 ²	-3,85±3,60
К500С	3,98±0,65	29,18±4,20	0,22±2,27 ^{1,2}	3,20±4,60	-2,62±3,19 ²	2,06±2,67	-1,24±2,05	1,62±5,65
П500С	3,85±0,59	27,21±8,25	0,81±2,96 ^{1,2}	-0,69±2,98	2,29±3,55	-3,15±3,61	3,05±4,48	2,31±3,24
С500С	4,41±0,74	32,21±2,22	-1,27±2,68	1,17±2,08	0,79±1,47	-4,67±3,72 ³	0,09±2,77	-3,90±2,80
КУС	4,90±0,80	30,03±4,19	-6,07±4,95	0,90±7,73	5,07±4,07	-3,41±3,06 ³	4,86±5,48	1,34±2,01
У500С	4,67±0,86	24,33±8,34	-6,01±2,70	6,20±3,58	-0,77±4,05 ²	-0,89±3,42	1,51±3,87	0,04±4,53

¹p<0.05 у односу на У500

²p<0.05 у односу на КУС

³p<0.05 у односу на К500

Тестом repeated measures ANOVA нити за једну групу није постигнута статистичка значајност мерена показатељем Wilks' Lambda што говори да се током времена није значајно мењала вредност ШУК унутар једне групе. Како ниси били испуњени сви услови за спороврђење mixed between-within subjects ANOVA (или split-plot ANOVA – SPANOVA) теста није била могућа свеобухватна нализа заједничког утицаја две различите променљиве, а то су време и различити третмани.

У Табели 19. представљене се вредности телесних маса животиња са дијабетесом третираних етанолним екстрактима листа, коре, плода, свеже цеђеним соком и уљем из семена црног дуда у периоду посматрања од 28 дана. Група третирана физиолошким раствором коришћена је као поредбена група за групе третиране етанолним

екстрактима листа, коре, плода и сока црног дуда, док је група третирана малсиновим уљем послужила као поредбена група за експерименталну групу третирану уљем из семенки црног дуда.

Најзначајнији утицај у погледу смањивања телесне масе утврђен је код групе третиране екстрактом коре црног дуда. У осталим групама забележен је пораст телесне масе који је у групи С500С био нижи у поређењу са одговарајућом контролном групом, док је у групама Л500С и П500С био виши у односу на одговарајућу контролну групу третирану физиолошким раствором. У експерименталној групи третираној уљем семенки црног дуда, утврђен је пораст телесне масе који је био виши у односу на контролну групу третирану маслиновим уљем.

Tabela 19. Вредности телесне масе животиња са дијабетесом, средња вредност±СД; n=6, једнофакторска ANOVA са Tukey *post hoc* (или Kruskal-Wallis са Mann-Whitney *post hoc* где треба) за међусобно поређење група унутар једног временског интервала.

Групе	ТМулаз	ТМстарт(ДМ)	ТМ7	ТМ14	ТМ21	ТМ28	Δ28-старт
КФС##	24,20±2,22	26,86±3,55	27,18±4,39	25,88±4,18	27,00±4,55	27,95±5,36	3,75±5,25
Л500С	23,68±1,72	25,15±0,93	24,32±1,47	24,68±1,34	25,10±2,11	28,35±3,79	4,67±3,11
К500С##	23,40±2,24	22,96±2,36	21,54±2,87	22,36±2,64	22,52±2,71	23,08±3,01	-0,32±3,92
П500С##	23,49±1,95	25,31±1,77	24,86±2,46	25,71±4,94	27,34±5,53	28,44±6,72	4,95±7,87
С500С	24,30±2,30	26,57±4,08	26,44±4,17	24,29±3,40	26,30±4,24	26,20±3,84	1,90±2,72
КУС##	24,11±2,05	26,57±4,08	24,97±4,50	25,26±4,19	26,51±4,16	26,19±4,05	2,07±2,85
У500С##	25,53±1,16	27,03±2,98	28,20±6,66	29,54±7,52	30,63±8,17	31,31±9,35	5,79±9,38

¹p<0.05 у односу на С500

##Тестом repeated measures ANOVA упоређене су вредности телесних маса експерименталних животиња мерених у шест различитих временских интервала. Утврђен је значајан утицај времена за групе третиране физиолошким раствором, маслиновим уљем, екстрактом коре, уљем семенки.

За групу КФС добијене су следеће вредности: Wilks' Lambda = 0.064, F (3, 5) = 11,01, p<0.05, Multivariate Partial Eta Squared = 0.94.

За групу К500С добијене су следеће вредности: Wilks' Lambda = 0.010, F (2, 5) = 50,60, p<0.05, Multivariate Partial Eta Squared = 0.99.

За групу П500С добијене су следеће вредности: Wilks' Lambda = 0.051, F (3, 5) = 11,17, p<0.05, Multivariate Partial Eta Squared = 0.949.

За групу КУС добијене су следеће вредности: Wilks' Lambda = 0.014, F (2, 5) = 28,80, p<0.05, Multivariate Partial Eta Squared = 0.986.

За групу У500С добијене су следеће активности: Wilks' Lambda = 0.008, F (2, 5) = 48,06, p<0.05, Multivariate Partial Eta Squared = 0.992.

4.3. Резултати *Ex vivo* испитивања

4.3.1. Активност антиоксидативних ензима

У истраживању је узорковано и ткиво јетре помоћу којег је извршена *ex vivo* процена антиоксидативног ефекта испитиваних екстраката утврђивањем нивоа липидне пероксидације, активности ензима супероксид дисмутазе, каталазе, глутатион редуктазе, глутатион-S-трансферазе и глутатион пероксидазе (Табела 20).

Tabela 20. Активност антиоксидативних ензима

Групе	СОД (x ± СД) У/мг протеина	КАТ (x ± СД) У/мг протеина	ГПх (x ± СД) нмолNADPH/ мин/мг протеина	ГР (x ± СД) нмолNADPH/ мин/мг протеина	ГСТ (x ± СД) нмол коњугата/ мин/мг протеина	ЛПх (x ± СД) нмолМДА/мг протеина
КФС	19,98 ± 2,26	27,00 ± 2,36	39,24 ± 4,76	6,01 ± 0,97	21,64 ± 7,67	0,056 ± 0,021
Л500С	26,17 ± 2,98*	33,46 ± 2,19*	41,66 ± 3,98	6,33 ± 0,66	25,68 ± 6,43	0,043 ± 0,009*
К500С	28,69 ± 3,66*	32,86 ± 3,67*	40,94 ± 4,81	6,81 ± 1,03	24,47 ± 6,77	0,045 ± 0,007*
П500С	21,14 ± 2,24	28,29 ± 4,87	37,52 ± 4,79	5,73 ± 1,11	22,03 ± 7,98	0,055 ± 0,008
С500С	24,63 ± 3,39	30,87 ± 1,09*	39,93 ± 4,46	6,02 ± 0,88	23,77 ± 7,44	0,048 ± 0,011
КУС	22,14 ± 2,44	29,83 ± 2,09	40,53 ± 5,08	6,57 ± 0,96	22,64 ± 6,23	0,049 ± 0,021
У500С	27,36 ± 2,72*	32,35 ± 2,49	42,18 ± 3,39	7,04 ± 0,79	25,54 ± 3,18	0,039 ± 0,016*

*p<0.05

Активност ензима супероксид дисмутазе (Л500С 26,17±2,98; К500С 28,69±3,66, КФС 19,98±2,26) и каталазе (Л500С 33,46±2,19; К500С 32,86±3,67; КФС 27,00±2,36) била је статистички значајно виша у групама животиња третираним екстрактима листа и коре у поређењу са контролном групом третираном физиолошким раствором (*p<0.05). Такође у групи животиња третираних уљем семенки црног дуда утврђена је статистички значајно виша активност супероксид дисмутазе у поређењу са контролном групом (У500С 27,36 ± 2,72*; КУС 22,14 ± 2,44; *p<0.05), док је у случају ензима каталазе активност била виша, али разлика није била статистички значајна (У500С 32,35 ± 2,49; КУС 29,83 ± 2,09). С друге стране у групи животиња третираних соком црног дуда утврђена је статистички значајно виша активност ензима каталазе (С500С 30,87 ± 1,09*, КФС 27,00 ± 2,36; p<0.05), док је активност ензима супероксид дисмутазе била виша у поређењу са контролном групом, али разлика није била статистички значајна (С500С 24,63 ± 3,39, КФС 19,98 ± 2,26).

Активности ензима глутатион пероксидазе, глутатион редуктазе и глутатион-С-трансферазе биле су сличне или више у експерименталним групама третираним екстрактима црног дуда и уља семенки, у односу на одговарајуће контролне групе, при чему разлика није била статистички значајна.

Интезитет липидне пероксидације је у свим експерименталним групама био нижи у односу на одговарајуће контролне групе. Статистички значајно нижи интезитет липидне пероксидације утврђен је у групама третираним екстрактом листа и коре црног дуда (Л500С $0,043 \pm 0,009^*$; К500С $0,045 \pm 0,007^*$, КФС $0,056 \pm 0,021$), те у групи третираној уљем семенки црног дуда (У500С $0,039 \pm 0,016^*$; КУС $0,049 \pm 0,021$) ($p < 0.05$)

4.3.2. Хепатосоматски индекс

Вредности хепатосоматског индекса израчунате су као количник масе јетре и телесне масе животиња. У Табели 21 приказане су вредности хепатосоматског индекса у групама животиња код којих је применом стрептозотоцина изазван дијабетес. Најнижа вредност хепатосоматског индекса забележена је у групама које су третиране екстрактом коре и соком црног дуда, што говори у прилог мањег степена оштећења ткива јетре услед прооксидативног деловања стрептозотоцина.

Табела 21. Хепатосоматски индекс

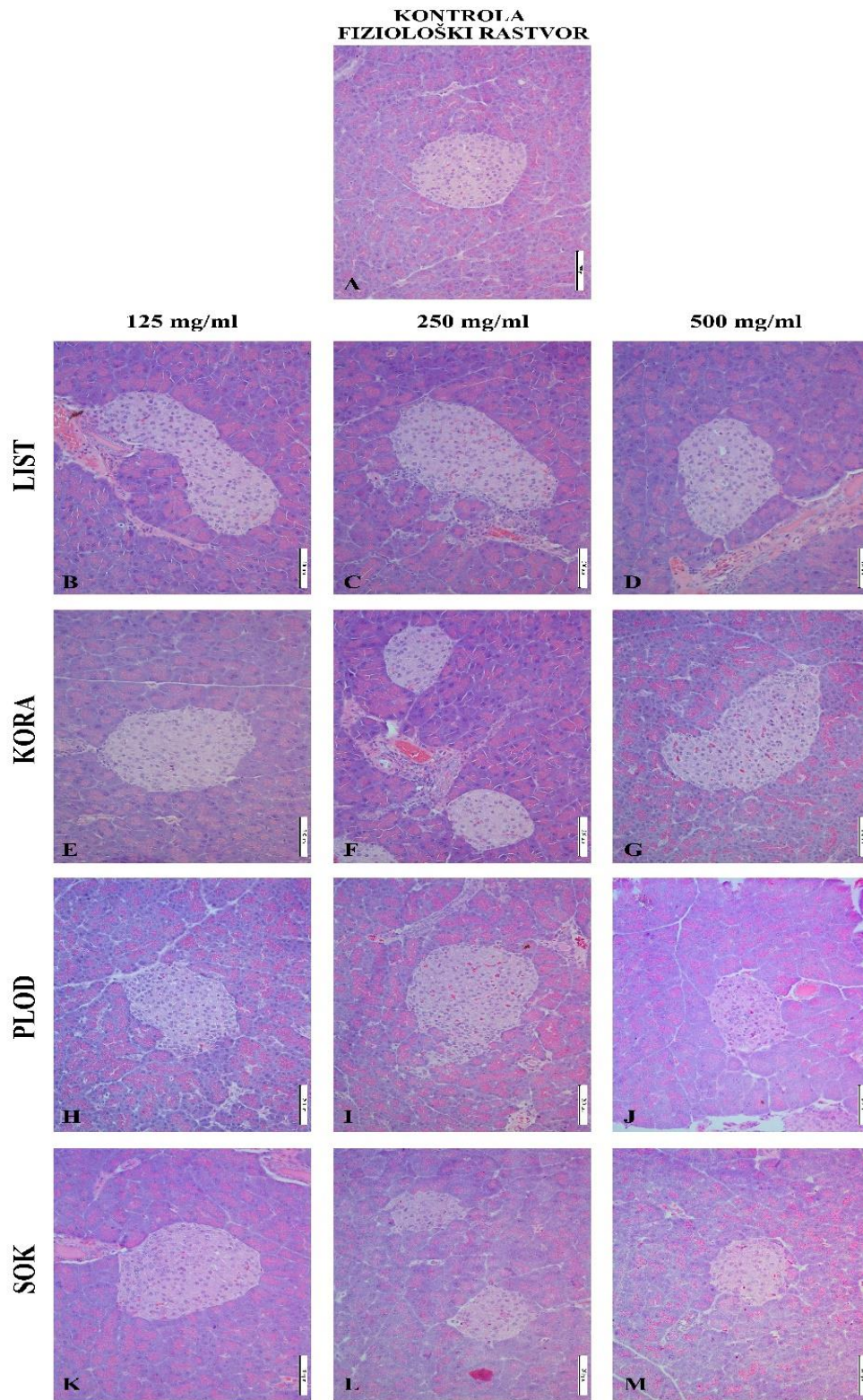
Групе	$\bar{x} \pm \text{СД}$
КФС	$0,058 \pm 0,01$
Л500С	$0,057 \pm 0,02$
К500С	$0,052 \pm 0,005$
П500С	$0,055 \pm 0,006$
С500С	$0,053 \pm 0,002$
КУС	$0,062 \pm 0,006$
У500С	$0,059 \pm 0,013$

4.4. Хистолошка и морфометријска испитивања

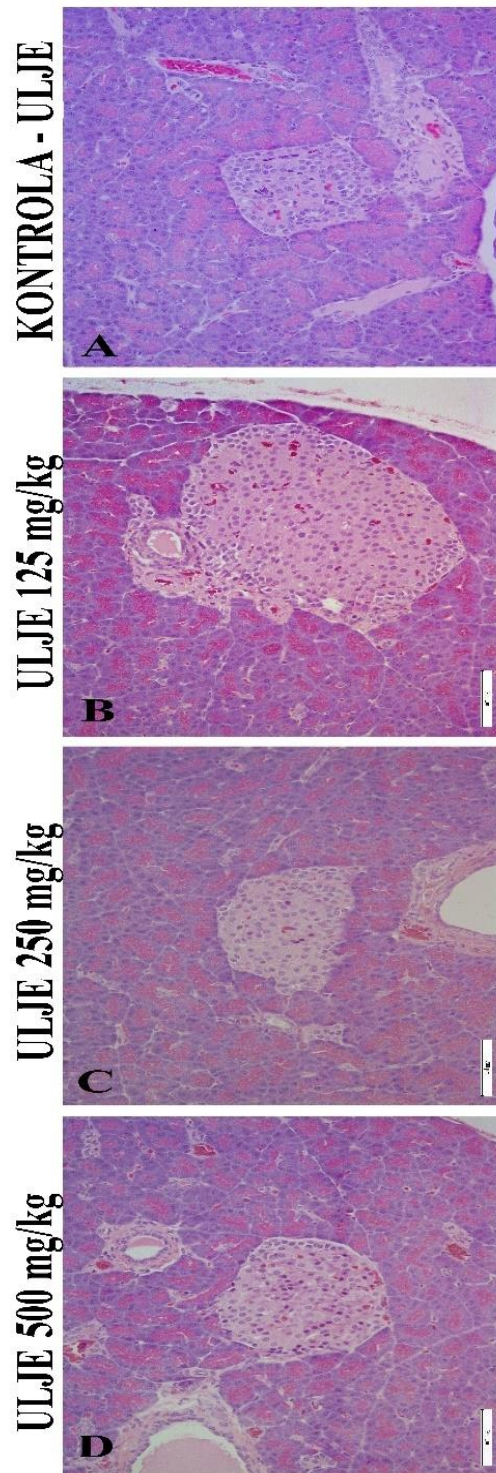
4.4.1. Хистолошка анализа ткива панкреаса

У контролној групи здравих експерименталних животиња третираних физиолошким раствором као ни у групама здравих животиња третираних етанолним екстрактима листа, коре, плода и сока црног дуда у концентрацијама од 125, 250 и 500мг/кг није дошло до нарушавања цитоморфолошких карактеристика ендокриног и екзокриног компартмана панкреатичног ткива. Лангерхансова острвца су очуваних карактеристика, правилног односа са околним ацинусима. Цитоморфолошки профил острваца чиниле су централно позициониране бета ћелије и периферни венац алфа ћелија (Слика 26).

У контролној групи здравих експерименталних животиња третираних маслиновим уљем као ни у групама здравих животиња третираних уљем семенки црног дуда у концентрацијама од 125, 250 и 500мг/кг није дошло до нарушавања цитоморфолошких карактеристика ендокриног и екзокриног компартмана панкреатичног ткива. Лангерхансова острвца су очуваних карактеристика, правилног односа са околним ацинусима. Цитоморфолошки профил острваца чиниле су централно позициониране бета ћелије и периферни венац алфа ћелија (Слика 27).

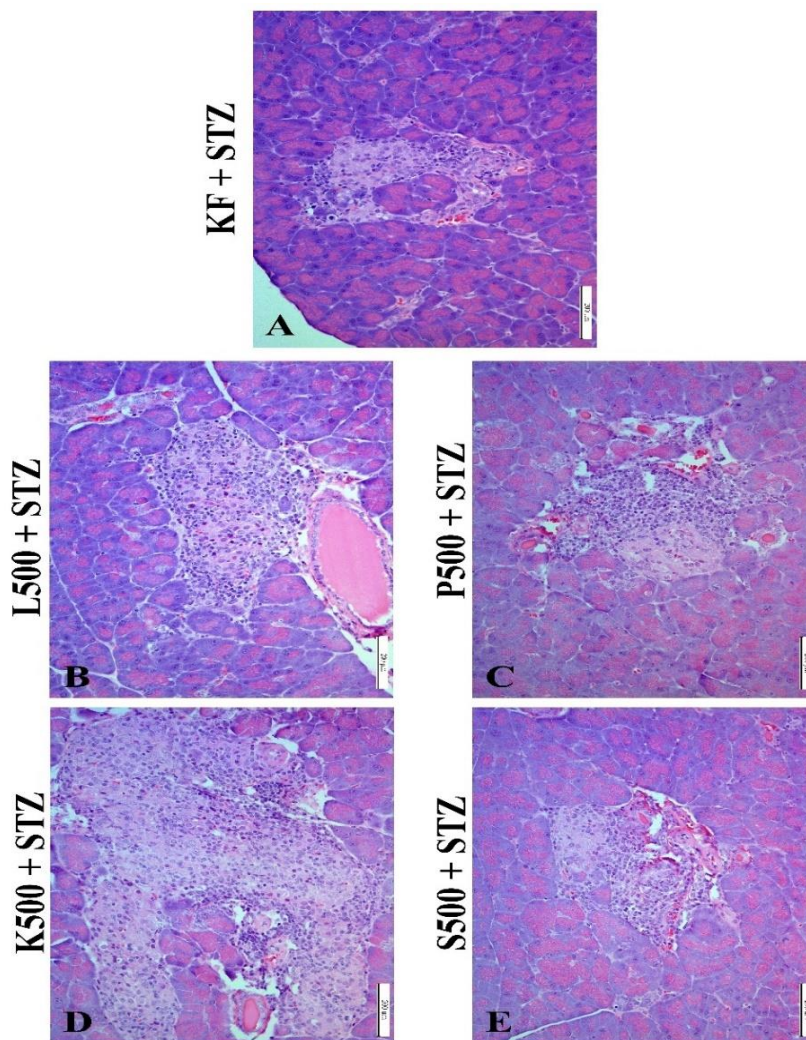


Слика 26. Хистолошке карактеристике ткива панкреаса здравих животиња, бојење хематоксилин-еозин, скала 200µм



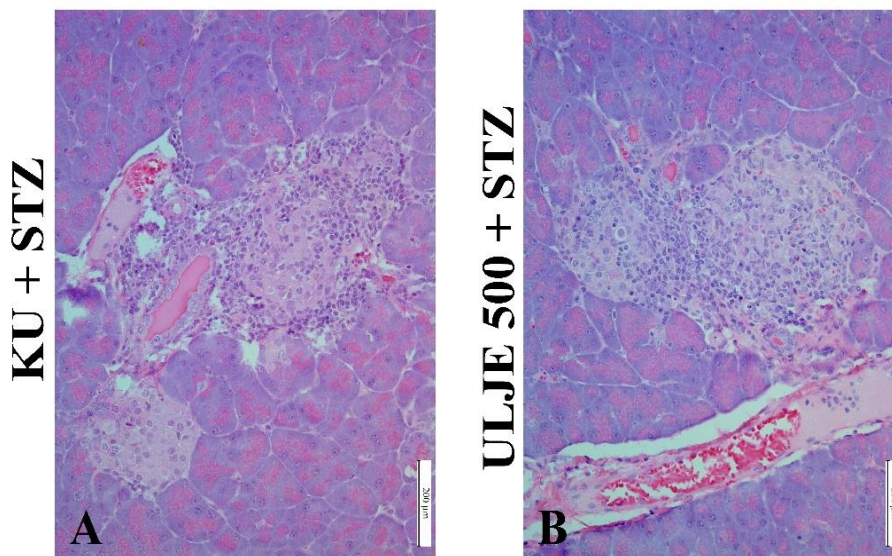
Слика 27. Хистолошке карактеристике ткива панкреаса здравих животиња, бојење хематоксилин-еозин, скала 200 µм

Хистолошком анализом ткива панкреаса у контролној групи јединки (КФС) утврђено је оштећење Лангерхансових острваца са оскудним регенераторним карактеристикама истих. Острвца су нарушене цитоархитектонике са евидентном деплацијом бета ћелија и преминацијом алфа ћелијске компоненте (А). Сличан степен оштећења детектован је у групи третирној етанолним екстрактом плода (С) и соком црног дуда (Е), док се наглашен степен регенераторних карактеристика могао уочити у групи третирној етанолним екстрактом листа (В), а нарочито у групи третираној етанолним екстрактом коре црног дуда (D). Острвца у поменитим групама је карактерисао знатно већи број централно позиционираних бета, али и периферно лоцираних алфа ћелија (Слика 28).



Слика 28. Хистолошке карактеристике ткива панкреаса животиња са дијабетесом, бојење хематоксилин-еозин, скала 200 µм

Хистолошком анализом ткива панкреаса у контролној групи јединки са дијабетесом утврђено је оштећење Лангерхансових острваца са оскудним регенераторним карактеристикама истих. Највећи део стрвца чиниле су алфа ћелије, док се мањи број бета ћелија могао спорадично уочити у централним деловима истих (А). У групи животиња са дијабетесом третираној уљем семенки црног дуда поред евидентног токсичног ефекта стрептозотоцина уочен је наглашен степен регенерације бета ћелија у већем степену (В) него у контролној групи јединки (Слика 29).



Слика 29. Хистолошке карактеристике ткива панкреаса животиња са дијабетесом, бојење хематоксилин-еозин, скала 200 μ м

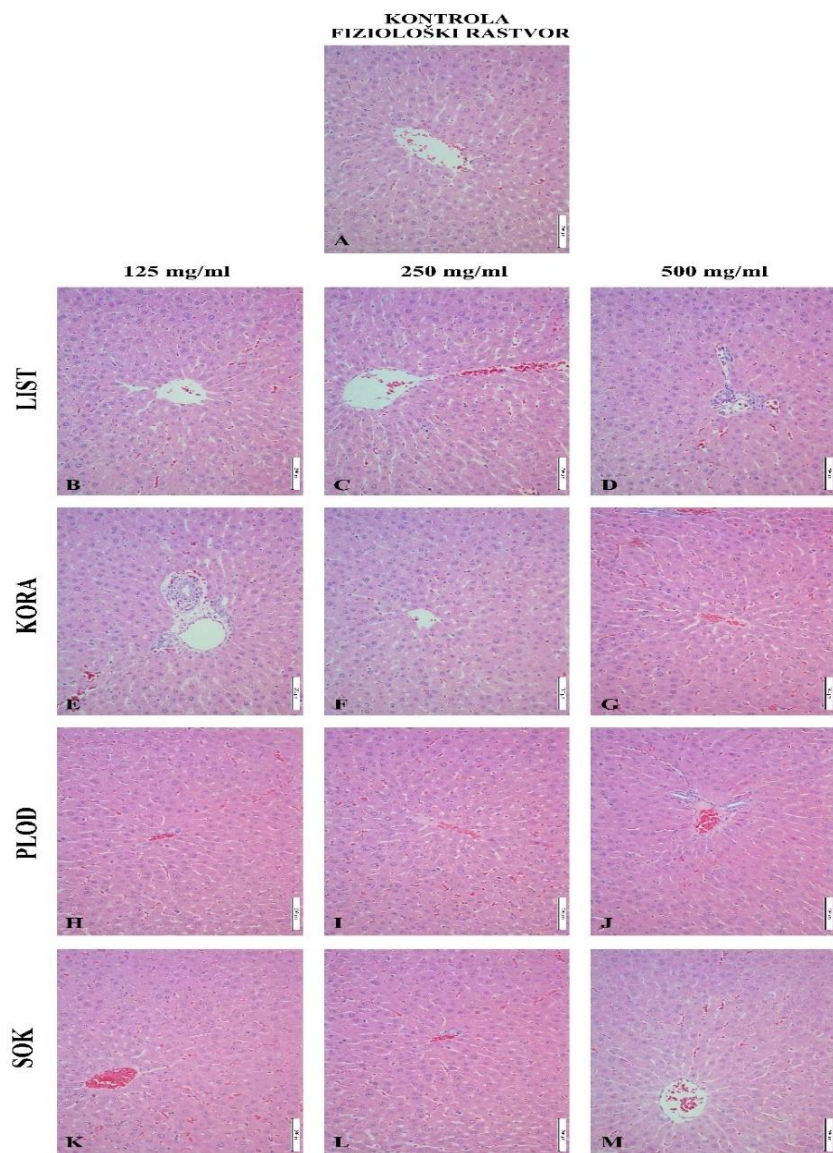
Морфометријска (квантитативна) анализа ткива панкреаса извршена је након квалитативне анализе ради утврђивања степена оштећења. Морфометријском анализом утврђено је да је протективни ефекат примењених екстраката био најизраженији у групама животиња које су третиране екстрактом коре црног дуда односно уљем семенки, у којима је удео ендокриног панкреаса био највећи (Табела 22).

Табела 22. Морфометријска (квантитативна) анализа ткива панкреаса

Групе	Ендокрини ($\bar{x} \pm \text{СД}$)	Егзокрини ($\bar{x} \pm \text{СД}$)
КФС	$0,70 \pm 0,58$	$99,30 \pm 0,58$
Л500С	$0,25 \pm 0,21$	$99,75 \pm 0,21$
К500С	$1,69 \pm 1,66$	$98,31 \pm 1,66$
П500С	$0,37 \pm 0,18$	$99,63 \pm 0,18$
С500С	$0,50 \pm 0,43$	$99,50 \pm 0,43$
КУС	$0,89 \pm 0,43$	$99,11 \pm 0,43$
У500С	$1,93 \pm 1,77$	$98,07 \pm 1,77$

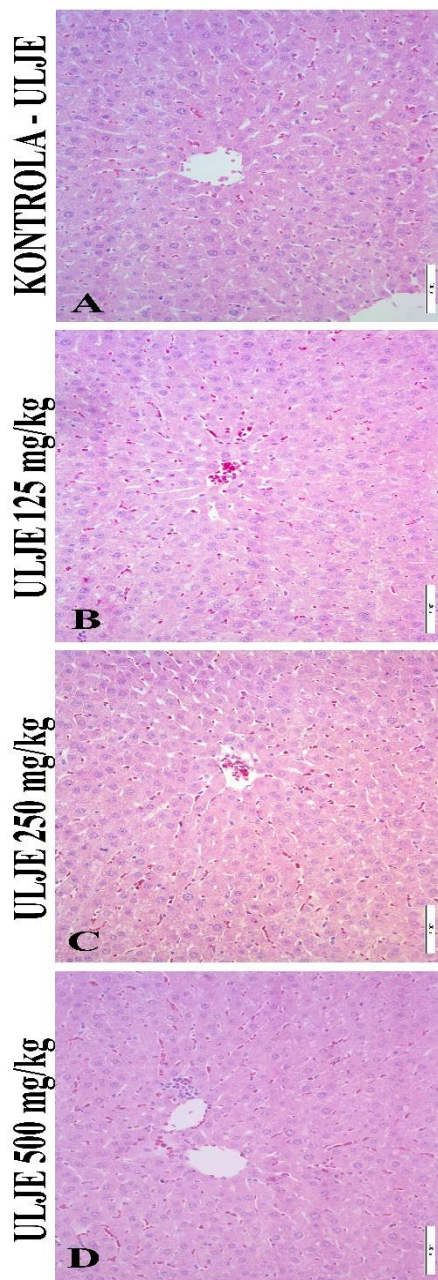
4.4.2. Хистолошка анализа ткива јетре

У контролној групи здравих експерименталних животиња третираних физиолошким раствором као ни у групама здравих животиња третираних екстрактима листа, коре, плода и сока црног дуда у концентрацијама од 125, 250 и 500 мг/кг није дошло до нарушавања цитоморфолошких карактеристика јетреног ткива. Хепатоцити су правилног архитектонског аранжмана, а перисинусоидални простори су правилни, без видљивих патолошких акумулација (Слика 30).



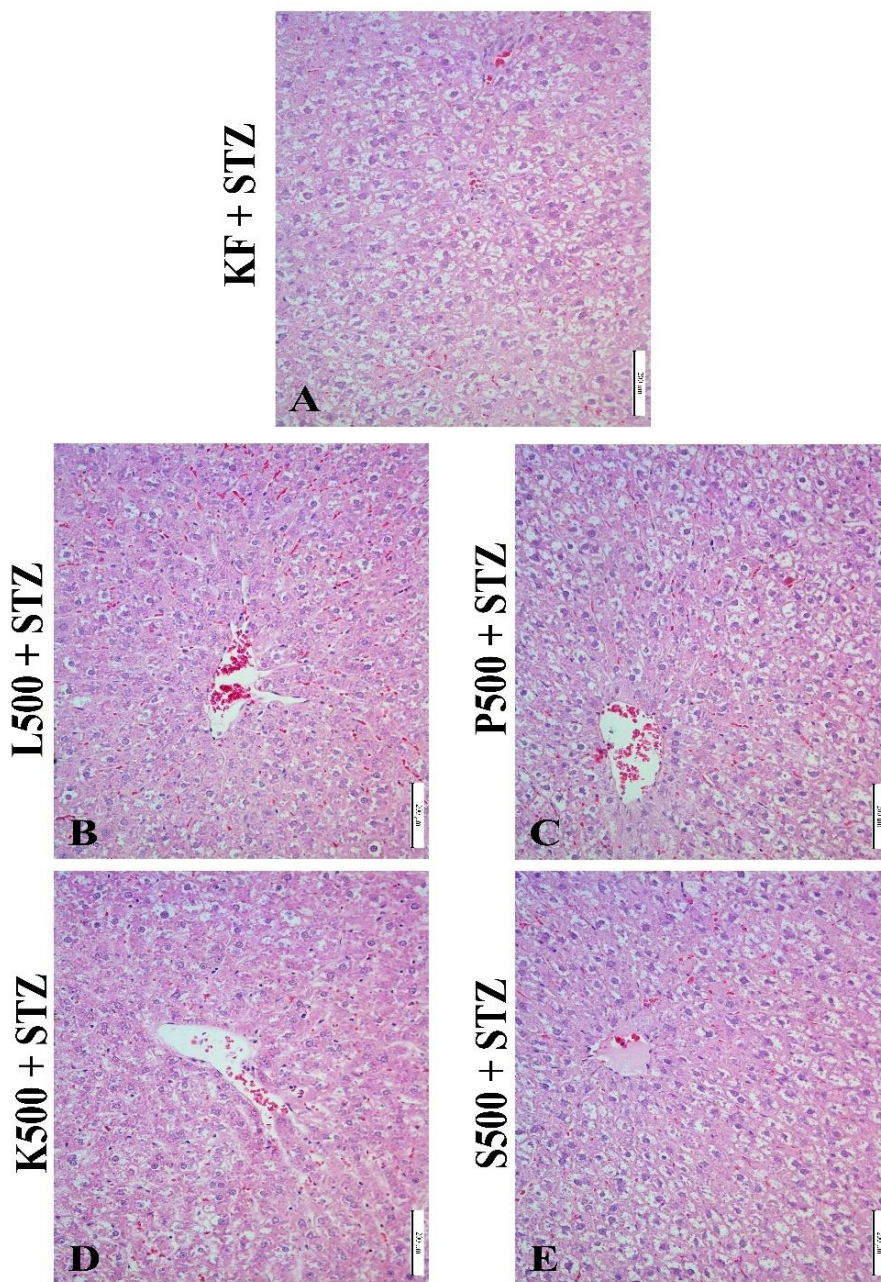
Слика 30. Хистолошке карактеристике ткива јетре здравих животиња, бојење хематоксилин-еозин, скала 200µм

У контролној групи здравих експерименталних животиња као ни у групама здравих животиња третираних уљем семенки црног дуда у концентрацијама од 125, 250 и 500мг/кг није дошло до нарушавања цитоморфолошких карактеристика јетреног ткива. Хепатоцити су правилног архитектонског аранжмана, а перисинусоидални простори су правилни, без видљивих патолошких акумулација (Слика 31).



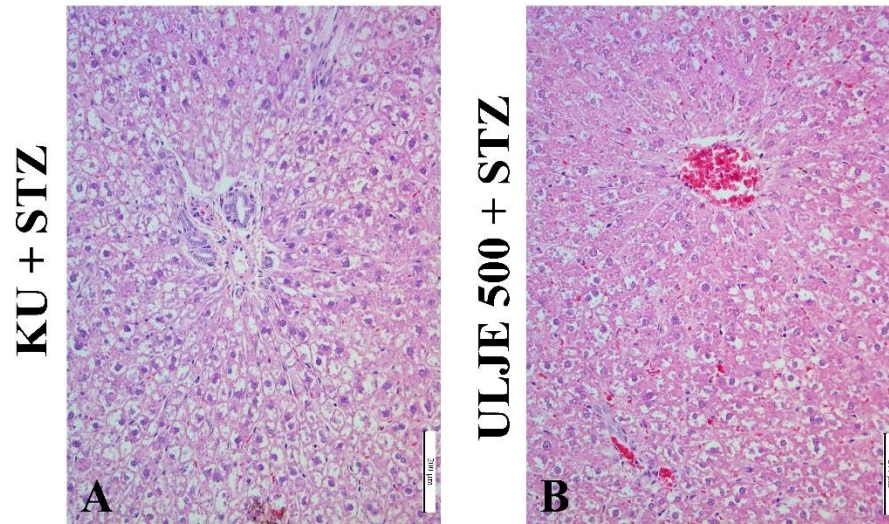
Слика 31. Хистолошке карактеристике ткива јетре здравих животиња, бојење хематоксилин-еозин, скала 200µм

Хистолошком анализом ткива јетре ткива у контролној групи животиња, те групама третираним етанолним екстрактима листа, плода, коре те соком црног дуда могу се уочити вакуоларне дегенерације хепатоцита. Промене су биле дифузног карактера, нешто слабијег интензитета у групама третираних екстрактима листа (В) и коре (D) црног дуда у односу на контролну групу јединки (А) (Слика 32).



Слика 32. Хистолошке карактеристике ткива јетре животиња са дијабетесом, бојење хематоксилин-еозин, скала 200 µм

Хистолошком анализом ткива јетре у контролној групи животиња са дијабетесом и групи животиња са дијабетесом третираној уљем семенки црног дуда могу се уочити реверзибилне промене у виду вакуоларне дегенерације хепатоцита. Промене су биле дифузног карактера са нешто слабијим интензитетом у групи животиња третираних уљем семенки црног дуда (В) у односу на контролну групу јединки (А) (Слика 33).



Слика 33. Хистолошке карактеристике ткива јетре животиња са дијабетесом, бојење хематоксилин-еозин, скала 200 µм

5. Дискусија

Дијабетес мелитус је хронична болест коју карактерише поремећај метаболизма угљених хидрата, масти и протеина услед недовољног лучења инсулина или смањене осетљивости ћелија на инсулин, при чему је хипергликемија један од примарних показатеља *diabetes mellitus*-а (1,2). Данас *diabetes mellitus* представља обољење које постаје глобални здравствени проблем и један од водећих узрока смрти у свету (1,2). Процењује се да тренутно од овог обољења болује 537 милиона људи широм света старости између 20-79 година (1). Светска здравствена организација (енг. World Health Organization – WHO) и Међународна федерација за дијабетес (енг. International Diabetes Federation – IDF) процењују да ће број оболелих од дијабетеса до 2030. године износити 643 милиона, док се до 2045. године процењује пораст броја оболелих од дијабетеса на 783 милиона. Од наведеног броја оболелих од дијабетеса широм света у Европи болује 61 милион људи, односно свака 11. особа, са проценом да ће у Европи до 2030. године од дијабетеса оболети 67 милиона, а до 2045. године 69 милиона људи (2). Према подацима Међународне федерације за дијабетес број умрлих од дијабетеса у 2021. години у Европи износио је 1,1 милион (1). С друге стране број умрлих у свету у 2021. години, према WHO и IDF, процењен је на 6,7 милиона људи, што значи да је на сваких 5 секунди живот изгубила једна особа (1).

Према подацима Центра за контролу болести (енг. Center for Disease Control and Prevention-CDC) Сједињених Америчких Држава у последњих 10 година установљен је значајан пораст броја оболелих од оба типа дијабетеса у млађој популацији, што није тренд у популацији средњих година. У старијој популацији појава дијабетеса је очекивана, најчешће типа 2, углавном због година живота као и појаве других придружених хроничних обољења (3). Сматра се да је појава повећања броја оболелих од дијабетеса у млађој популацији условљена расом и економским статусом, а процена је да 3 од 4 особе оболеле од дијабетеса живе у земљама са ниским и средњим животним стандардом (1,3). Установљено је да 541 милион људи пати од инсулинске резистенције што повећава ризик од развоја дијабетеса типа 2 (1,2).

На основу података IDF укупан трошак лечења дијабетеса на светском нивоу током 2021. године је износио око 966 милијарди америчких долара, са порастом од 316%

последњих 15 година (1). У Европи је потрошено 189 милијарди долара од наведеног укупног износа (2). Према доступним подацима евидентно је да се број оболелих од дијабетеса повећава из године у годину, као и да расте број особа са повећаним ризиком од развоја дијабетеса услед појаве инсулинске резистенције. Због свега наведеног неопходно је праћење и контрола особа оболелих од дијабетеса и/или његових компликација, а такође и особа које су у високом ризику од развоја дијабетеса.

Према подацима Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ у Србији од дијабетеса болује око 770 000 особа што чини око 12% одраслог становништва. Поражавајућа је чињеница да од укупног броја оболелих у Републици Србији око 43% особа нема постављену дијагнозу (41). Посматрајући укупан број оболелих од дијабетеса тип 1 и 2, већи је удео дијабетеса тип 2 (95%), док број особа које годишње изгубе битку са овом болешћу у Србији износи преко 3000 (41). На основу података Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ стандардизована стопа морталитета од дијабетеса у Србији износи 14,8 на 100 000 становника, што Србију сврстава у земље са високом стопом морталитета од дијабетеса у поређењу са другим европским државама. Сматра се да је стопа морталитета и већа од наведене због грешака које се јављају приликом идентификовања узрока смрти где се дијабетес наводи као претходно стање, а не као сам узрок смрти, што је нарочито честа појава код настанка смрти услед инфаркта миокарда, хроничне бубрежне инсуфицијенције, инzulта или других могућих компликација дијабетеса (41). Заступљеност дијабетеса у Србији из године у годину расте и повећава се са старашћу, при чему је готово половина оболелих од дијабетеса тип 2 старија од 65 година и приликом чега је већ дошло до развоја кардиоваскуларних обољења и других метаболичких компликација дијабетеса (41). Дијабетес се као узрочник смртности налази на петом месту у Србији, што је слично подацима у развијеним земљама (41). Захваљујући успостављеном регистру за шећерну болест и модернизацији вођења документације употребом електронских система могуће је детаљније праћење и откривање нових случајева дијабетеса чиме се стиче реалнија слика о тренутној заступљености дијабетеса у Републици Србији, што ће у многоме олакшати правовремени третман.

Поред стандардне терапије дијабетеса оралним антидијабетицима или парентералном применом инсулина, данас се све више у превенцији и третману дијабетеса

трага за новим потенцијалним агенсима укључујући и биоактивне молекуле биљног порекла. На основу тренутних истраживања утврђено је да многе биљке поседују биоактивне компоненте са израженом хипогликемијском активношћу. Неке од најчешћих биљака код којих је испитивана антидијабетесна активност припадају породицама Lamiaceae, Asteraceae, Moringaceae, Moraceae, Arosynaceae. Најзаступљенији екстракти биљака наведених породица су водени, водено-етанолни, етанолни и метанолни екстракти, који су најчешће добијени од листа или коре биљака (87). Према Abu-Odex и сар. (87) у фитохемијском саставу испитиваних екстраката као основне биоактивне супстанце наводе се феноли, флавоноиди, антоцијани, гликозиди, танини, терпени и фитостероли што указује на постојање потенцијалне антиоксидативне, антиинфламаторне, антидијабетесне, хепатопротективне и антимикробне активности. На основу прегледа доступних публикација *Morus alba*, *M. rubra* и *M. indica* су чешће испитиване биљке из породице Moraceae у односу на црни дуд, *M. nigra*. Најчешће коришћен део биљке црног дуда у испитивању биоактивних компоненти је лист у форми воденог, водено-етанолног и етанолног екстракта.

Црни дуд одликује богатство присуства секундарних метаболита међу којима се по количини издвајају полифенолна једињења флавоноиди и антоцијани, изванредним антиоксидативним активностима из којих произилазе и многе здравствене користи (52). Испитивања различитих врста екстраката (воденог, етанолног, водено-етанолног) црног дуда добијених из листа, коре и плода указала су на значајан потенцијал у погледу антидијабетесне активности која је у блиској вези са количином заступљених полифенолних једињења (52). Антидијабетесна активност црног дуда огледа се у испољавању хипогликемијског ефекта и повећању нивоа инсулина код животиња оболелих од дијабетеса (52,55). Према досадашњим истраживањима може се закључити да екстракти црног дуда поседују значајна антиинфламаторна својства која се у највећем степену испољавају код водено-етанолних екстраката коре младица и корена, плода и листа црног дуда (16,88). Антиинфламаторни ефекат наведених делова црног дуда манифестује се у значајном паду нивоа проинфламаторних цитокина попут интерлеукина (IL-1 β), тумор-некротис фактора- α (TNF- α), гама интерферона (IFN- γ) као и смањењу цитотоксичности у случају ксиленом индуковане инфламације (17). На основу доступне литературе и

забележене антиоксидативне активности, у фокусу појединих истраживања било је испитивање органопротективног дејства црног дуда у циљу спречавања настанка компликација многих болести укључујући и компликације дијабетеса. Неуропротективни ефекат установљен је за лиофилизовани екстракт листа црног дуда, који је показао способност спречавања неуродегенеративних промена код мишева са дијабетесом (89). Екстракти плода црног дуда показали су нефропротективно дејство код дијабетесне нефропатије и других поремећаја у раду бубрега, доводећи до израженог побољшања функције бурега код пацова са дијабетесом (90). Хепатопротективна активност екстракта плода црног дуда је највероватније повезана са његовим антиоксидативним способностима и богатим садржајем флавоноида, фенола и антоцијана (91). Екстракт листа црног дуда доводи до смањења дегенеративних промена у јетри насталих услед таложења масти у ћелијама јетре код пацова са дијабетесом изазваним применом стрептозотоцина, док употреба екстракта плода црног дуда доводи до пада вредности ензима јетре смањујућу експресију гена одговорних за синтезу ових ензима (92). Према до сада објављеним резултатима установљено је да екстракти плода црног дуда испољавају и антиатеросклеротско и антихиперлипидемијско дејство смањујући ниво укупног холестерола, LDL (енгл. Low density lipoprotein – Липопотеин мале густине) холестерола, триглицерида, и повећавајући ниво HDL холестерола код пацова, а забележена је и редукција телесне масе након третмана етанолним екстрактом плода (8,52,92,93). Поред наведених ефеката црног дуда, досадашња истраживања су показала да екстракти листа, коре и плода поседују антиинфламаторни и антиканцерогени потенцијал, антимикробну активност која је установљена за лист, кору, корен и врхове младих гранчица црног дуда, али и кардиопротективне особине које се доводе у везу са богатим и разноликим полифенолним саставом (52).

Због ограниченог броја систематичних истраживања биљке црног дуда која обилује широким спектром биолошки и фармаколошки активних супстанци, као и због непостојања потпуног консензуса по питању антидијабетесног и антиоксидативног ефекта, за предмет овог истраживања изабрано је утврђивање ефеката екстракта који до сада нису довољно, или нису уопште испитивани.

Утврђено је да врсте рода *Morus* обиљују фенолним једињењима, флавоноидима и антоцијанинима који делују као важни антиоксиданси неутралисањем слободних радикала или лимитирањем њиховог формирања. Ова фитохемијска једињења се разликују међу врстама. Црни дуд је богат флавоноидима, док бели дуд карактеришу ниже концентрације флавоноида и антоцијана (94). Резултати студија спроведених на ћелијским културама и животињским моделима показују да флавоноиди могу директно да неутралишу слободне радикале, а могу и да заштите и обнове ензиме антиоксидативне одбране као што је супероксиддисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза (4,95–97). Међу флавоноидима, флавоноли су најзаступљенији у врстама рода *Morus* од којих су главни гликолизовани облици кверцетин, кемферол, изорамнетин, изокверцетин и рутин. Поменути флавоноли смањују ризик од настанка дијабетес мелитуса тип 2, као и од неких врста карцинома, што је утврђено у студији Ergisli и Orhan, у којој су у лиофилованим узорцима листа, коре и плода црног дуда рутин и изокверцетин били најзаступљенији (98). Анализом састава екстракта коришћених у нашој студији такође је потврђено присуство кверцетина, кемферола, изокверцетина и рутина. Рутин као главни флавоноид је детектован само у ЕЕЛЦД (2,7±0,1 мг/г екстракта). Изокверцетин је доминантно био заступљен у ЕЕЛЦД у концентрацији 34,8±0,5 мг/г екстракта, у ЕЕКЦД 2,4±0,5 мг/г, док су у СЦД и ЕЕПЦД измерене ниске концентрације изокверцетина ≤0,07 мг/г екстракта. Кверцетин је највише био заступљен у ЕЕКЦД (2,4±0,1 мг/г) и у ниској концентрацији у СЦД (0,01 мг/г). Кемферол је детектован у ЕЕКЦД (2,1±0,1 мг/г), а кемферол-3-О-глукозид у ЕЕЛЦД (4,2±0,10 мг/г). Флавоноиди рутин, кемферол и кверцетин испољавају хипогликемијски ефекат инхибицијом апсорпције и варења угљених хидрата у *in vitro* и *in vivo* експерименталним студијама. Рутин као главни флавоноид инхибира активност дигестивног ензима угљених хидрата α-глукозидазе *in vitro* директним везивањем за ензим путем хидрофобне везе, а сличну активност је показао и кемферол (99,100). Рутин је показао и протективну активност од општећења β-ћелија панкреаса код СТЗ индукованог дијабетеса кроз заштиту од оксидативног стреса (4,101). Хипогликемијски ефекат кверцетина доводи се у везу са инхибисањем активности малтазе и сукразе у *in vitro* и *in vivo* експерименталним студијама, а установљено је да *in vitro* инхибира GLUT2 посредовану апсорпцију глукозе, што су могући механизми за смањење постпрандијалне гликемије код мишева са дијабетесом (102)(103). Лутеолин као најчешћи флавоноид у *in vitro* условима инхибише

дигестивне ензиме α -глюкозидазу и α -амилазу, али не испољава утицај на постпрандијалну гликемију код здравих пацова (104). Присуство лутеолина установљено је у кори и листу у екстрактима коришћеним у нашој студији, при чему је већа концентрација детектована у ЕЕКЦД ($2,2 \pm 0,1$ мг/г) за разлику од ЕЕЛЦД ($0,3 \pm 0,1$ мг/г). Епикатехин, изузетно потентан биофлавоноид у погледу антиоксидативне активности, доводи до снижавања вредности гликемије стимулишући регенерацију β -ћелија панкреаса код пацова са дијабетесом индукованим алоксаном, услед заштите од оксидативног стреса (101,105,106). Присуство епикатехина утврђено је у ЕЕПЦД и свеже цеђеном соку, а квантитативно је био више заступљен у соку ($3,04$ мг/г) у односу на плод ($0,10$ мг/г). Због способности флавоноида рутина, кверцетина, кемферола, мориана, лутеолина и хиперозида да смањују ниво оксидативног стреса, инфламацију и њихове способности елиминисања слободних радикала, ова једињења испољавају нефропротективно дејство код СТЗ индуковане нефропатије, код мишева и пацова (107). Хиперозид ($25,9 \pm 0,2$ мг/г) је други најзаступљенији флавоноид идентификован у ЕЕЛЦД поред изокверцетина ($34,8 \pm 0,5$ мг/г), док су у СЦД и ЕЕПЦД забележене ниске концентрације $\leq 0,1$ мг/г, а у ЕЕКЦД није детектован.

Најбогатији садржај фенолних киселина је био у кори црног дуда. У саставу се највише истицала хлорогенска киселина са концентрацијом $142,1 \pm 2,1$ мг/г у ЕЕКЦД и $40,7 \pm 0,7$ мг/г у ЕЕЛЦД, док је ЕЕПЦД садржао само $0,51$ мг/г екстракта. Гална киселина је такође била заступљена у значајној мери у ЕЕКЦД ($66,2 \pm 0,9$ мг/г). Ванилинска киселина као трећа по заступљености у ЕЕКЦД била је присутна у концентрацији $13,9 \pm 0,2$ мг/г екстракта, док је у ЕЕЛЦД била заступљена са концентрацијом $1,3 \pm 0,1$ мг/кг екстракта. Кумаринска киселина ($2,8 \pm 0,1$ мг/г) је била најмање заступљена у ЕЕКЦД. У ЕЕПЦД утврђен је низак садржај прокатехинске, хлорогенске и *n*-хидроксibenзоеве киселине, док у соку нису забележене наведене фенолне киселине. Као и друга полифенолна једињења и фенолне киселине испољавају антиоксидативне ефекте, а у биљкама су најзаступљеније хлорогенска, гална, ванилинска и кумаринска киселина (108,109).

У поређењу са другим врстама рода *Morus*, антоцијани квантитативно доминирају у црном дуду међу којима су главни цијанидин-3-*O*-глюкозид и цијанидин-3-*O*-рутинозид (17). Антидијабетесна својства антоцијана описана су у неколико

експерименталних студија, а приписују се вишеструким и синергистичким ефектима ових фенолних једињења укључујући смањење нивоа глукозе у крви, гликозилираног хемоглобина, смањења гликозурије и спречавања производње слободних радикала, али и повећања секреције инсулина (110). Sancho и Pastore (110) наводе да је код мишева третираних храном богатом антоцијанима са повећаним садржајем цијанидин-3-*O*-глукозида дошло до смањења нивоа глукозе у крви што се може повезати са утицајем на смањење инсулинске резистенције, док је третман дијабетичних мишева липозомалним цијанидин хлоридом довео до редукције нивоа гликозилираног хемоглобина (111). Процијанидину Б1 приписује се способност супресије развоја хепатоцелуларног карцинома услед инхибиције миграције и пролиферације туморских ћелија карцинома јетре (112). Примена дијете која садржи 0,1% антоцијана дуда код пацова *Wistar* соја са СТЗ индукованим дијабетесом доводи до смањења концентрације оксидованог глутатиона у јетри. Ова једињења такође на моделу пацова са дијабетесом испољавају и антидијабетесни ефекат (110). Међу квантификованим антоцијанима који су регистровани у СЦД, у нашој студији, најзаступљенији је био цијанидин хлорид ($7,96 \pm 0,61$ мг/г), затим цијанидин-3-*O*-глукозид ($7,04 \pm 0,54$ мг/г) и цијанидин-3-*O*-рутинозид ($2,10 \pm 0,11$ мг/г). Процијанин Б1 заступљен је био само у ЕЕПЦД у концентрацији од 13,8 мг/г екстракта.

Укупан удео полифенолних једињења изражен у мгGAE/г суве масе је најзаступљенији био у ЕЕКЦДУ ($68,3 \pm 0,7$), затим у ЕЕЛЦД ($23,4 \pm 0,3$), па у ЕЕПЦД ($18,68 \pm 0,11$) и на крају у СЦД ($14,69 \pm 0,09$). У испитиваним екстрактима црног дуда укупан удео фенолних једињења показао је линеарну везу са антиоксидативним капацитетом, што указује да су феноли и флавоноиди били најзаслужнији за антиоксидативну активност екстракта, која је процењена помоћу DPPH и FRAP тестова. Резултативних тестова указују на корелацију између антиоксидативне активности и садржаја фенолних једињења, и у складу су са резултатима *in vivo* испитивања у погледу изражености антидијабетесног деловања испитиваних екстракта црног дуда. Најпотентнији антиоксидативни капацитет утврђен је код ЕЕЛЦД и ЕЕКЦД, а затим УСЦД и СЦД. Ови резултати указују на драгоцен и богат биохемијски састав црног дуда, који резултује многим фармаколошким активностима и поставља основу за додатна испитивања ове биљке.

Прегледом врло малог броја доступних публикација може се закључити да су састав уља семенки црног дуда као и потенцијалин терапијски ефекти недовољно испитани. Према доступним публикацијама у саставу уља доминирају масне киселине, од којих су најзаступљеније линолна, праћена олеинском, палмитинском и стеаринском киселином, док је присуство арахидонске киселине забележено у врло ниском проценту <0.5% (113,114). На основу састава масних киселина може се закључити да је уље семенки црног дуда добар извор есенцијалних масних киселина. Услови средине и генетика семена црног дуда утичу на састав масних киселина у уљу, а температура између цветања и сазревања је можда најважнији фактор који утиче на састав масних киселина (113). Нивои већине масних киселина чије је присуство утврђено у нашој студији у складу су са резултатима претходно публикованих студија у којима је коришћен цео плод дуда (113). У испитиваном УСЦД које је коришћено у нашој студији најзаступљеније су биле полинезасићене масне киселине линолна и олеинска, са укупним уделом од 88,5%, затим палмитинска 8,6%, стеаринска 2,5% и арахидонска 0,1%. Хексанском Соклет екстракцијом уља из семенки црног дуда коју наводе Gesgel и сар. (113) и Yilmaz и сар. (114) добијени удео линолне и олеинске масне киселине износио је 76,61% (113) и 83,37% (114), док је у нашој студији примењена суперкритична екстракција CO₂ и добијен је већи удео наведених полинезасићених масних киселина (88,5%). На основу публикованих резултата и резултата наше студије претпоставља се да избор методе екстракције уља из семенки утиче на заступљеност полинезасићених масних киселина. УСЦД је показало изражен антиоксидативни капацитет према резултатима FRAP и DPPH анализе. Прегледом доступне литературе установљено је да ω -6 незасићене масне киселине попут линолне и олеинске испољавају бројне позитивне фармаколошке ефекте који се углавном повезују са кардиопротективним дејством у погледу антиаритмогеног, хиполипидемијског и ангиатеросклеротског дејства, као и спречавања настанка крвних угрушака инхибицијом агрегације тромбоцита. Поред наведеног, ω -3 масне киселине карактерише додатни ефекат у погледу редукције инсулинске резистенције и антидијабетесни ефекат што за сада није потврђено за ω -6 масне киселине (64).

У *In vivo* испитивањима у оквиру ове докторске дисертације утврђиван је утицај екстракта црног дуда у различитим дозама код здравих и животиња оболелих од дијабетеса.

У групи здравих животиња третираних ЕЕЛЦД, поредећи разлике у вредности гликемије након ОГТТ код животиња за $\Delta 1$ д, $\Delta 7$ д и $\Delta 28$ д установљено је да утицај етанолних екстратакта листа у дози од 125 мг/кг и 250 мг/кг телесне масе приближан ефекту испољеном у контролној групи КФ третираној физиолошким раствором. Етанолни екстракт листа црног дуда у дози од 500 мг/кг телесне масе у свим тачкама мерења у већој мери је снизио вредност гликемије у поређењу са контролном групом третираном физиолошким раствором. Према подацима објављеним од стране Silva и сар. (116) након подвргавања животиња оралном оптерећењу различитим врстама угљених хидрата установљено је смањење нивоа гликемије након примене различитих концентрација етанолног екстракта листа црног дуда. У истој студији екстракт листа у дозама од 500 мг/кг и већим показао је најзначајнији утицај на смањење нивоа гликемије при ОГТТ код пацова. Флавоноиди изокверцетин и рутин утичу на активност ензима α -глукозидазе и α -амилазе као и на брзину апсорпције угљених хидрата у танком цреву, те на тај начин доводе до снижавања нивоа гликемије код животиња подвргнутих ОГТТ (116). Према резултатима Агаујо и сар. (55) водено-етанолни екстракти листа црног дуда код пацова са дијабетесом доводе до смањења експресије матриксне металопротеиназе 2 у јетри, што доводи до снижења нивоа гликемије. Матриксна металопротеиназа 2 је ензим чији је ниво експресије и активности повећан код дијабетеса и који се повезује са настанком инфламације и компликација различитих хроничних болести. Према квантитативној анализи етанолног екстракта листа црног дуда, спроведеној у нашој студији, изокверцетин ($34,8 \pm 0,5$ мг/г екстракта) и рутин ($2,7 \pm 0,1$ мг/г екстракта) су били више заступљени у ЕЕЛЦД, у односу на ЕЕКЦД, чиме се на основу литературних навода потврђује ефикасност овог екстракта у погледу снижавања вредности гликемије. Испитивањем антиоксидативне активности ЕЕЛЦД установљена ИК₅₀ је износила 7,64 μ г/мл. Silva и сар. (116) такође наводе значајну вредност ИК₅₀ екстракта листа при 3,05 мг/мл, уз разлику да је екстракција раствора листа вршена хексаном. Повећање гликемије у крви води до пораста оксидативног стреса и развоја могућих компликација хипергликемије, због чега Da Silva и сар. (115) наводе позитиван утицај фенола и флавоноида добијених хлороформ екстракцијом као потентних антиоксиданаса изолованих из листа црног дуда. Антиоксидативна активност екстракта листа црног дуда утиче на смањење нивоа оксидативног стреса и потенцијално превенира настанак компликација дијабетеса, захваљујући повећаној активности СОД како код

нормогликемичних тако и код животиња са дијабетесом (117,118). Метанолни екстракт листа црног дуда (у дозама од 100 до 400 мг/кг) утиче и на ниво липида код мишева, доводећи дозно зависно до пада нивоа липида у серму (119). Пад вредности нивоа липида у серуму третираних мишева резултат је комплексног утицаја фенолних једињења заступљених у екстракту листа црног дуда на метаболизам липида, при чему најбољи утицај на липидни статус имају једињења попут кверцетина, значајно утичући на формирање депозита масног ткива код испитиваних животиња (115,119,120).

Ниједна од испитиваних доза етанолних екстраката листа црног дуда код здравих животиња у нашем истраживању након 28 дана није довела до смањења телесне масе код третираних мишева. Разлика у измереним вредностима телесних маса нормогликемичних мишева, ТМ28 и ТМ старт, указује на приближне или слабије ефекте етанолних екстраката листа црног дуда на смањење телесне масе мишева у поређењу са утицајем физиолошког раствора којим су биле третиране животиње контролне групе. Према доступним публикацијама утицај екстракта листа црног дуда је усмерен на метаболизам липида, а у мањој мери на регулисање телесне масе.

Након 28-дневног третмана ($\Delta 28d$) здравих животиња ЕЕКЦД забележен је нижи ниво гликемије у ОГТТ за сва три екстракта коре црног дуда (K125, K250, K500) у поређењу са групом третираном физиолошким раствором, али без статистичке значајности. На основу добијених резултата закључује се да је утицај на ниво гликемије етанолних екстраката коре код здравих јединки приближан ефекту контролне групе третиране физиолошким раствором. Екстракт коре корена црног дуда доводи до пада у нивоу гликемије захваљујући дејству деоксинојиримицина (ДНЈ). ДНЈ, по својој природи алкалоид, доводи до смањења гликемије делујући инхибиторно на активност α -глукозидазе (121). У регулисању нивоа гликемије екстракти добијени од младих гранчица црног дуда своју активност остварују путем активације механизма пероксизом пролифератор-активирајућих гама рецептора и инхибиције α -глукозидазе (122,123). Слабије изражена активност ЕЕКЦД на ниво гликемије код животиња изложених ОГТТ, а према добијеним резултатима теста и у складу са доступном литературом, је највероватније последица смањене концентрације појединих биоактивних компоненти, у првом реду флавоноида и полифенола.

Примена етанолних екстраката коре црног дуда различитих концентрација (K125, K250 и K500 мг/кг телесне масе) довела је код здравих мишева до смањења (Δ 28-старт) вредности телесних масе након 28 дана од почетка третмана наведеним екстрактима, при чему је разлика у постигнутом ефекту у односу на физиолошки раствор била статистички значајна ($p < 0,05$). Водени екстракти црног дуда испољавају значајан ефекат на смањење телесне масе. Овај ефекат доводи се у везу са садржајем полифенола попут галне киселине, хлорогене киселине, рутина и антоцијана, који узрокују пад вредности липида у серуму, смањење количине висцералне масти, повећање активности ензима јетре укључених у метаболизам масти, чиме се постиже и хепатопротективна активност коре црног дуда уз значајно смањење телесне масе (124–126).

Примена ЕЕПЦД код здравих животиња довела је до мањег пораста гликемије у ОГТТ у односу на контролну групу након 28 дана примене екстракта у све три примењене дозе. Додатно, у групи третираној највећом дозом етанолног екстракта плода, измерене су ниже вредности у свим временским тачкама у којима је извођен ОГТТ у односу на контролну групу третирану физиолошким раствором. Антидијабетесна активност плодова белог дуда заснива се на регулисању гликемије и осетљивости ћелија на инсулин путем активације АМП-протеин киназе (127). Mahmoud и сар. (10) утврдили су да код примене екстраката белог и црног дуда код пацова са дијабетесом долази до пада гликемије, при чему ниједан од примењених екстракта, независно од примењене дозе, не доводи до нормализовања нивоа глукозе у крви испитиваних животиња. У истој студији утврђен је и адитиван ефекат код примене мешавине екстраката плодова белог и црног дуда (10).

Иако је антихипергликемијски утицај ЕЕПЦД био благ, антиоксидативна активност била је значајније изражена. Овај екстракт карактерише богат садржај флавоноида. Према доступним студијама антиоксидативна активност екстракта плода црног дуда управо је последица високог садржаја флавоноида (94,128,129).

Утицај примене етанолних екстраката плода у све три примењене дозе код здравих животиња није довео до значајнијег утицаја на промену телесне масе у поређењу са контролном групом која је третирана физиолошким раствором. Утицај примењених екстраката је био приближан или чак слабији од утицаја физиолошког раствора што указује на недовољан ефекат екстракта плода црног дуда на смањене телесне масе.

Део истраживања било је и испитивање утицаја СЦД на гликемију здравих животиња. Повољан ефекат забележен је у групама третираним са дозама од 125 и 250 мг/кг, у којима је разлика у вредностима гликемија у ОГТТ била мања у поређењу са контролном групом третираном физиолошким раствором. С друге стране, супротан ефекат забележен је у групи С500, где је забележена виша вредност разлике гликемије у ОГТТ у поређењу како са контролном групом, а тиме и виша вредност у поређењу са групама С125 и С250. Mahmoud и сар. (10) такође указују на слабији утицај сока црног дуда на вредности гликемије. Претпоставља се да је пораст вредности гликемије под утицајем сока у дози од 500 мг/кг телесне масе, током 28 дана, највероватније последица повећане концентрације шећера у зрелом свежем плоду црног дуда чијим цеђењем је добијен сок.

Укупан садржај полифенола и антоцијана у плоду и соку црног дуда зависи превентивно од степена зрелости плода, генетских разлика и утицаја спољашње средине попут температуре, осунчаности, влаге, састава земљишта што се одражава на антиоксидативну активност (98,118,130–132). Антиоксидативна активност сока црног дуда коришћеног у нашој студији у сразмери је са садржајем укупних полифенола која је износила $14,69 \pm 0,09$ мг/г екстракта и тиме била мања у поређењу са садржајем ових једињења у екстрактима листа и коре.

Према прикупљеним резултатима, није установљено смањење телесне масе код испитиваних група здравих животиња третираних са три наведене дозе сока црног дуда, што је у сагласности са резултатима других студија (10).

Испитивањем утицаја уља УСЦД на вредност гликемије најповољнији ефекат утврђен је у групи У500 код које је у све три временске тачке забележен бољи ефекат у поређењу са контролном групом третираном физиолошким раствором. У две преостале експерименталне групе животиња утврђен је ефекат који је био слабији (У125) или истоветан (У250) ефекту постигнутом применом физиолошког раствора. Повољан ефекат уља семенки црног дуда могао би се објаснити високим садржајем полинезасићених масних киселина којима се приписује повољан хипогликемијски ефекат код пацијената оболелих од дијабетес мелитуса тип 2 (133).

Праћењем промена телесне масе у експерименталним групама третираним са три различите дозе уља семенки црног дуда утврђен је изостанак ефекта. Промена телесне

масе била је готово истоветна промени забележеној у контролној групи третираној физиолошким раствором, те примена уља није довела до пада у вредностима телесних маса испитиваних нормогликемичних животиња, што би се могло објаснити високим садржајем незасићених масних киселина, што за собом повлачи висок калоријски садржај.

Део спроведеног истраживања обухватио је испитивање утицаја највећих доза екстраката код животиња са дијабетесом изазваним применом стрептозотоцина.

Стрептозотин је антибиотик који је по својој хемијској структури дериват Д-глукозамина, а први пут је добијен из бактерије *Streptomyces achromogenes* (134). Захваљујући сличности хемијске структуре са структуром глукозе СТЗ се веже за GLUT2 глукозни транспорт-рецептор на β ћелији панкреаса (135). Након уласка у ћелије панкреаса СТЗ доводи до оштећења и дисфункције бета ћелија панкреаса, изазивајући апоптозу у нижим дозама, односно некрозу у вишим дозама (136).

Један од начина изазивања оштећења јесте изазивање оксидативног стреса услед ослобађања азот-моноксида и производње слободних радикала (137–139). Уништавањем бета ћелија долази до појаве хипоинсулинемије, што за последицу има спречавање уласка глукозе у ћелије, појаву хипергликемије и губитка телесне масе (140).

Поређењем промена вредности нивоа гликемије након примене 28 доза испитиваних екстраката значајно смањење вредности гликемија утврђено је код примене етанолног екстракта листа у групи Л500С ($-3,85 \pm 3,60$ ммол/л) и примене свеже цеђеног сока у групи С500С ($-3,90 \pm 2,80$ ммол/л). Поред поменутих експерименталних група, бољи ефекат забележен је и у групама К500С и П500С, у којима је пораст гликемије био нижи у односу на контролну групу третирану физиолошким раствором. Такође, утврђен је повољан утицај примене уља из семенки црног дуда, код којих је пораст гликемије био минималан и истовремено нижи у поређењу са контролном групом КУС, која је третирана маслиновим уљем.

Потенцијални механизам који стоји у основи утицаја етанолног екстракта коре на ниво гликемије код животиња са дијабетесом могао би бити утицај на PI3K/Акт сигнални пут, неопходан у синтези инсулина, што доводи до постепеног опоравка ћелија панкреаса и повећања концентрације инсулина (141). С друге стране претпоставља се да је

повољнији утицај уља семенки црног дуда у поређењу са контролном групом, резултат квалитативног састава у погледу садржаја масних киселина од којих доминирају ω -6 незасићене масне киселине. У неким од доступних студија предложени механизми снижавања вредности гликемије јесу хепатички или панкреасни „клиренс“ који за последицу имају појачану екскрецију глукозе код дуже употребе екстракта црног дуда (118,142,143). Утицај екстракта листа и свеже цеђеног сока црног дуда се према доступним подацима може приписати богатом садржају фенолних једнићења, флавоноида и антоцијана (128). Механизам који стоји иза ефекта екстракта листа би према Ivanildo и сар. (116) могао да се заснива на утицају на процесе глугонезогенезе у јетри. Повољан ефекат третмана етанолним екстрактом листа, па чак и плода црног дуда, потврђен је и у студији Араујо и сарадника у којој је хронична примена поменутих екстракта довела до пада вредности гликемије дијабетичних животиња, као и потенцирања активности антиоксидативних ензима (СОД, каталазе) што отвара могућност за даљу примену ЕЕЛЦД и плода у лечењу дијабетеса као и превенцију могућих компликација (55).

Током експерименталног периода у трајању од 28 дана, приликом праћења промене телесне масе код животиња са дијабетесом, једино је у групи С500С забележен пад телесне масе ($-0,32 \pm 3,92$ г), док је телесна маса у осталим групама порасла. У групи С500 пораст масе био је нижи у поређењу са контролном групом. У литератури је описан позитиван утицај екстракта плода црног дуда на гојазност. У студији Fabroni и сар. (144) применом 80% водено-алкохолног екстракта замрзнутог плода црног дуда потврђен је утицај у смислу смањења телесне масе, а предложени механизам подразумевао је инхибицију панкреасне липазе која је резултат деловања антоцијана и фенола. Повољан ефекат на прекомерну телесну масу утврђен је и код примене етанолног екстракта коре и гранчица црног дуда, при чему се предложени механизми заснивају на потенцирању ефеката инсулина (142) као и активирању механизма који утичу на смањење нивоа липида у серуму путем активације PPAR α s (58). Још један од предложених механизма деловања екстракта коре корена дуда јесте и инхибиција активности диацилглицерол ацилтрансферазе 1 као једног од кључних ензима у развоју хиперлипидемије и дијабетеса тип 2 (145).

Хипергликемија, која је директна последица оштећења функције панкреаса главни је узрочник метаболичких поремећаја и компликација у дијабетесу. Сматра се да хипергликемија доводи до појаве оксидативног стреса (146).

Код оболелих од дијабетеса утврђено је да долази до пораста липидне пероксидације, измењене активности глутатион редуктазе, снижавања нивоа природне антиоксидативне одбране, те свеукупно смањене активности антиоксидативних ензима (147). Слободни радикали који прате хипергликемију доводе до оштећења разних ткива, а посебно ткива крвних судова, због чега се сматра да значајно доприносе процесу атерогенезе. Поремећена равнотежа између прооксидативних агенаса и антиоксидативне одбране организма (глутатион-пероксидаза (ГПц), супероксид-дисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ) сматра се главним чиниоцем у патогенези микро и макроваскуларних компликација које се срећу код оболелих од дијабетеса (146,148).

Према резултатима Раза и сарадника стрептозотин индукује оксидативни стрес који не оштећује само ткиво панкреаса већ и ткиво јетре, бубрега и других органа. Из тог разлога у групама животиња код којих је дијабетес изазван применом стрептозотина процењиван је утицај екстракта на систем антиоксидативне одбране експерименталних животиња третираних највишим дозама екстракта црног дуда (149,150).

Мерењем активности антиоксидативних ензима и нивоа липидне пероксидације у узорцима јетре експерименталних животиња утврђен је позитиван ефекат примењених екстракта на повећање капацитета антиоксидативне заштите, уз смањење нивоа малонилалдехида, маркера за интензитет липидне пероксидације. Активност ензима супероксид дисмутазе и каталазе била је статистички значајно виша у групама животиња третираним екстрактима листа и коре у поређењу са контролном групом третираном физиолошким раствором. Примећени истовремени пораст активности оба ова ензима је посебно значајан. Супероксид дисмутаза и каталаза представљају ензиме прве линије заштите ћелија од оксидативног стреса. У физиолошким условима, супероксид радикал, продукт реакција у ћелијском метаболизму, се неутралише под дејством супероксид дисмутазе, при чему настаје водоник пероксид, који разграђује ензим каталаза (у митохондријама глутатион-пероксидаза). У случају израженог оксидативног стреса, са повећаном количином супероксид радикала, повећање активности супероксид дисмутазе

омогућава неутрализацију супероксида до кисеоника, и мање токсичног водоник пероксида. Настали водоник пероксид служи као прекурсор за настанак других, много реактивнијих слободних радикала, стога је неопходна његова благовремена разградња. Ипак, разградња насталог водоник пероксида, захтева адекватну активност каталазе. Смањење активности каталазе препознато је као један од фактора који код дијабетеса, а и других дегенеративних болести, доприноси настанку оштећења посредованих оксидативним стресом. Способност испитиваних екстраката да доводе до повећања активности оба наведена ензима, указује на значајан потенцијал адекватне антиоксидативне заштите у стањима са повећаним оксидативним стресом. Такође у групи животиња третираних уљем семенки црног дуда утврђена је статистички значајно виша активност супероксид дисмутазе у поређењу са контролном групом, док је у случају ензима каталазе активност била виша, али разлика није била статистички значајна. С друге стране у групи животиња третираних соком црног дуда утврђена је статистички значајно виша активност ензима каталазе, док је активност ензима супероксид дисмутазе била виша у поређењу са контролном групом, али разлике није била статистички значајна. Интезитет липидне пероксидације је у свим експерименталним групама био нижи у односу на одговарајуће контролне групе. Статистички значајно нижа активност утврђена је у групама третираним екстрактом листа и коре, те у групи третираној уљем семенки црног дуда.

Хепатопротективни ефекат екстракта црног дуда утврђен је у моделу парацетамолом изазваног оштећења јетре, где примена високих доза парацетамола доводи до настанка оксидативног стреса и последичних структурних и функционалних абнормалности хепатобилијарног тракта (151). Исто тако, хепатопротективни ефекат екстракта листа црног дуда утврђен је и при оштећењу јетре код животиња са стрептозотоцином индукованим дијабетесом (152). У још једном моделу оштећења јетре потврђен је протективни ефекат екстракта листа. У студији Agha и сар. (2012) (153) у којој је коришћен сок плода црног дуда богат различитим супстанцама са израженим антиоксидативним деловањем, утврђено је смањење оштећења јетре изазвано применом прооксидативне супстанце, угљен тетраоксида.

Сматра се да се хепатопротективни ефекат у поменутиим студијама заснива на неутралисању слободних радикала и антиоксидативној активности састојака црног дуда

попут флавоноида (кверцетин, рутин и изокверцетин) (154,155). Поред флавоноида, за антиоксидативни ефекат битни су и алкалоиди присутни у листу црног дуда (154).

Протективни ефекат утврђен у нашој студији може се приписати богатом садржају флавоноида, који поседују изузетну антиоксидативну активност која може да заштити ћелије од оксидативног стреса и ћелијске смрти (156).

Ублажавање стрептозотоцином изазваног оштећења јетре екстрактом листа црног дуда могуће да је засновано на хватању слободних радикала. Хватањем липидних и пероксид радикала екстракт листа може да спречи њихову интеракцију са незасићеним масним киселинама и на тај начин спречити процес пероксидације липида (157).

Протективни антиоксидативни ефекат потврђен је хистолошким анализом ткива панкреаса и јетре. Док је у контролној групи јединки са дијабетесом које су биле третиране физиолошким раствором утврђено присуство оштећења Лангерхансових острваца са оскудним регенераторним карактеристикама, наглашен степен регенераторних карактеристика могао се уочити у групи третираној екстрактом листа, а нарочито у групи третираној екстрактом коре црног дуда које карактерише богат садржај једињења са антиоксидативном активношћу. Наглашен степен регенерације бета ћелија у већем степену у односу на контролну групи јединки утврђен је и у групи животиња са дијабетесом третираној уљем семенки црног дуда. Морфометријском анализом потврђени су квалитативни резултати, при чему је протективни ефекат примењених екстраката био најизраженији у групама животиња које су третиране екстрактом коре црног дуда односно уљем семенки. Заштитн антиоксидативни ефекат уочен је и при анализи исечака ткива јетре. Присутна вакуоларна дегенерација хепатоцита била је мање изражена у групама третираним екстрактима листа и коре црног дуда у односу на контролну групу јединки. Сличан ефекат утврђен је и у групи јединки третираних уљем семенки црног дуда.

Спроведеним истраживањем утврдили смо да црни дуд представља богат извор биоактивних компоненти које помажу у борби против једињења са прооксидативним деловањем. Антиоксидативна активност потврђена је како *in vitro*, тако и *ex vivo* методама. Такође утврђено је да коришћени екстракти могу да буду од користи у регулацији нивоа гликемије и телесне масе, како на моделу здравих животиња тако и на моделу животиња са дијабетесом. У наредним истраживањима од користи би било спровести испитивање

ефеката коришћених екстраката на моделу дијабетес мелитуса тип 2, с обзиром на чињеницу да је тип 2 врста дијабетеса која се најчешће среће у људској популацији. Такође једно од будућих истраживања могло би за циљ да има детаљније испитивање антиоксидативне активности на моделима оксидативног стреса изазваног применом парацетамола и угљен тетрахлорида код огледних животиња. Додатно би било од користи утврдити *ex vivo* антиоксидативни ефекат екстраката у различитим временским интервалима, односно након различитие дужине примене екстраката.

Према доступним публикацијама ово је прво истраживање у којем је у једном истраживању испитиван ефекат свих надземних делова биљке црни дуд (лист, кора, плод, сок, семенке). Посебно треба истаћи чињеницу да нема доступних података о употреби, односно испитивању ефеката семенки црног дуда, прецизније уља добијеног из семенки. У нашем истраживању у *in vitro* и *ex vivo* условима утврђено је да уље семенки карактерише значајна антиоксидативна активност. Ефекат је додатно потврђен хистолошком анализом ткива панкреаса и јетре те морфометријским методама код животиња изложених прооксидативном деловању стрептозотоцина. Поред антиоксидативног потврђен је органопротективни и ангидијабетесни ефекат уља. Додатно треба истаћи чињеницу да је начин добијања уља из семенки црног дуда заснован на примени „зелене технологије“ - екстракције суперкритичним CO₂, што подразумева да нису коришћени органски растварачи у процесу екстракције, односно да није било отпадних производа токсичних по животну средину.

6. Закључци

На основу резултата истраживања утврђени су следећи закључци:

- Хемијски састав испитиваних екстраката црног дуда показује присуство активних супстанци којима се могу приписати утврђени антиоксидативни потенцијал, антидијабетесни фармакодинамски ефекти као и органопротективни ефекти утврђени хистолошком анализом ткива.
- Испитивани етанолни екстракти црног дуда су показали богатство састава у погледу полифенолних једињења. Идентификоване и квантификоване активне компоненте су биле фенолне киселине хлорогенска, ванилинска, *n*-кумаринска, елагинска, гална, протокатехинска и *n*-хидроксибензоева киселина, затим етил естар прокатехуинске киселине, фенол ресвератрол, као и флавоноиди рутин, хиперозид, изокверцетин, кемферол-3-*O*-глукозид, морин, кверцетин, лутеолин, кемферол, епикатехин и процијанидин Б1, док су представници антоцијана цијанидин хлорид, цијанидин-3-*O*-глукозид и цијанидин-3-*O*-рутинозид,
- Испитивани екстракт уља семенки црног дуда након квалитативе и квантитативне анализе показао је присуство великог удела масних киселина. Од полинезасићених масних киселина утврђено је присуство линолне, олеинске и арахидонске киселина, док су од незасићених масних киселина биле забележене у палмитинска и стеаринска.
- Суперкритична екстракција CO₂ примењена за екстракцију уља из семенки црног дуда омогућава добијање чистог производа, представља „зелену технологију“ еколошки прихватљиву.
- Испитивани екстракти црног дуда примењени код здравих мишева као и код мишева са дијабетесом изазваним стрептозотоцином утичу на ниво гликемије.
- Код здравих животиња мањи пораст гликемије при ОГТТ у односу на контролну групу третирану физиолошким раствором утврђен је код примене: етанолног екстракта листа L500 у трајању од 7 и 28 дана; три етанолна екстракта коре (K125,

К250 и К500) у трајању од 28 дана, односно 7 и 28 дана након примене К500; три етанолна екстракта плода (П125, П250 и П500) у трајању од 28 дана, односно применом П500 у трајању од 1, 7 и 28 дана; три дозе сока (С125, С250, С500) у трајању од 7 дана, односно С125 и С 250 у трајању 7 и 28 дана. Исти ефекат испољило је и уље семенки (У250, У500) након 28 дана третмана у односу на контролну групу третирану маслиновим уљем. Најинтезивнији ефекат на ниво гликемије утврђен је код примене екстракта плода и коре црног дуда.

- Код здравих животиња нижи пораст телесне масе у односу на контролну групу КФ након 28 дана примене утврђен је код: етанолног екстракта листа (Л125); сва три етанолна екстракта коре (К125, К250, К500); етанолног екстракта плода П250. Најинтезивнији ефекат утврђен је код примене екстракта коре.
- У групи животиња са дијабетесом пад вредности гликемије након 28 дана третмана утврђен је код примене етанолног екстракта листа (Л500) и сока црног дуда (С500). Нижи пораст вредности гликемије у односу на контролну групу третирану физиолошким раствором након 28 дана третмана утврђен је код примене етанолног екстракта коре К500, као и уља семенки црног дуда У500 у односу на контролну групу третирану маслиновим уљем.
- Редукција телесне масе код животиња са дијабетесом, након третмана у трајању од 28 дана утврђена је код примене етанолног екстракта коре (К500).
- Испитивани екстракти црног дуда поседују антиоксидативни потенцијал потврђен *in vitro* и *ex vivo* методима.
- Највећи антиоксидативни капацитет FRAP методом је установљен за етанолне екстракте коре и листа, као и уља семенки црног дуда.
- DPPH тестом највећа антиоксидативна ативност је утврђена за етанолни екстракт листа, коре и сок црног дуда.

- Највећи антиоксидативни капацитет измерен је *ex vivo* методама у групама животиња третираних етанолним екстрактом коре, листа те уља семенки црног дуда.
- Третман етанолним екстрактима црног дуда значајно потенцира активност ензима антиоксидативне заштите услед оксидативног стреса изазваног стрептозотоцином. Повећана активност супероксид дисмутазе и каталазе испољена је у свим групама али статистички значајна након примене БЕЛЦД, БЕКЦД и УСЦД у дози од 500 мг/кг телесне масе. Такође, интезитет липидне пероксидације је био смањен у свим групама, а статистички значајно смањење било је уочено у групама К500, П500 и У500.
- Боља очуваност морфолошких карактеристика у хистолошкој структури ткива панкреаса при стрептозотоцином изазваном дијабетесу, у односу на контролну групу, утврђена је код експерименталних група животиња третираних екстрактима коре (К500) и листа (Л500) црног дуда, односно уље семенки (У500). Морфометријском анализом потврђен је органо протективни ефекат екстракта коре и уља семенки црног дуда.
- Боља очуваност морфолошких карактеристика у хистолошкој структури ткива јетре при стрептозотоцином изазваном дијабетесу, у односу на одговарајуће контролне групе, утврђена је код експерименталних група животиња третираних екстрактима коре (К500) и листа (Л500) црног дуда, односно уља семенки (У500). Морфометријском анализом утврђен је хепатопротективни ефекат екстраката коре, листа и уља црног дуда.

7. Литература

1. Cho N, Kirigia J, Ogurustova K, Reja A. IDF Diabetes Atlas, tenth edition. International Diabetes Federation. 2017; 1–150.
2. WHO. Diabetes. Review. 2021. [приступљено 04.01.2022.]. Доступно на адреси: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
3. CDC. The Facts, Stats, and Impacts of Diabetes. 2022. [приступљено 4.01.2022.]. Доступно на адреси: https://www.cdc.gov/diabetes/library/spotlights/diabetes-facts-stats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdiabetes%2Flibrary%2Ffeatures%2Fdiabetes-stat-report.html
4. Alkhalidy H, Wang Y, Liu D. Dietary flavonoids in the prevention of T2D: An overview. *Nutrients*. 2018; 10(4):438:1-33.
5. Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, et al. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases β -cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2002; 283(4):745-752.
6. Li Y, Bao T, Chen W. Comparison of the protective effect of black and white mulberry against ethyl carbamate-induced cytotoxicity and oxidative damage. *Food Chem*. 2018; 243:65–73.
7. Xu L, Li Y, Dai Y, Peng J. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacol Res*. 2018; 130:451–65.
8. Volpato GT, Calderon IMP, Sinzato S, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2011; 138(3):691–696.
9. Mamoreh AM. The Effect of Hydro-Alcoholic Extract of *Morus nigra* leaf on Lipids and Sugar in Serum of Diabetic Rats. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2012; 2(15):38-40.
10. Mahmoud HI, El Rab SMG, Khalil AF, Ismael SM. Hypoglycemic effect of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits in diabetic rat. *Eur J Chem*. 2014; 5(1):65–72.

11. Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, et al. Preventive effects of *Morus alba* L. anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Exp Ther Med*. 2013; 6(3):689–695.
12. Venkataramegowda S, Ramesh HL, Sivaram V, Murthy VNY. Antioxidant and Medicinal properties of Mulberry (*Morus* sp.): A Review Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. *World J Pharm Res*. 2014; 3:320.
13. Thabti I, Marzougui N, Elfalleh W, Ferchichi A. Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves. *Acta Bot Gall*. 2011; 158(2):205–214.
14. Mallhi TH, Qadir MI, Khan YH, Ali M. Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Bangladesh J Pharmacol*. 2014; 9(1):60–66.
15. Feng RZ, Wang Q, Tong WZ, Xiong J, Wei Q, Zhou WH, et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(12):22328–22336.
16. Zelová H, Hanáková Z, Čermáková Z, Šmejkal K, Dal'Acqua S, Babula P, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of prenylated substances isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*. *J Nat Prod*. 2014; 77(6):1297–12303.
17. Chen H, Pu J, Liu D, Yu W, Shao Y, Yang G, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L). *PLoS One*. 2016; 11(4):e0153080.
18. Mudra M, Ercan-Fang N, Zhong L, Furne J, Levitt M. Influence of mulberry leaf extract on the blood glucose and breath hydrogen response to ingestion of 75 g sucrose by type 2 diabetic and control subjects. *Diabetes Care*. 2007; 30(5):1272–1274.
19. Banu S, Jabir NR, Manjunath NC, Khan MS, Ashraf GM, Kamal MA, et al. Reduction of post-prandial hyperglycemia by mulberry tea in type-2 diabetes patients. *Saudi J Biol Sci*. 2015; 22(1):32–6.
20. Zhang P, Bucheli P, Balleve O, Zhang W. *Morus* Berries and Avoiding Glucose Peaks. Patent. WO2013078658A1, 2013.
21. Medicinski fakultet Novi Sad: Gušterača ili Pankreas. [приступљено 10.01.2022.] Доступно на адреси: <http://medicinskifakultet.blogspot.com/2014/04/gusteraca-ili-pankreas.html>

22. Pankreas, Gušterača, Budi zdrav, produži život. [приступљено 10.01.2022.] Доступно на адреси: <http://produzizivot.com/pankreas-gusteraca/>
23. Pancreas - Slide WSU_2_060. [приступљено 17.01.2022.] Доступно на адреси: https://undergraduate.vetmed.wsu.edu/courses/vph-308/histology/lab-1-histology-cells-and-organelles/pancreas-slide-wsu_2_060b
24. Leung P.S. Overview of the Pancreas. In: The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas. Adv Exp Med Biol. 2010; 690: 3–12.
25. Спасић М. Анализа фактора повезаних са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом. PhD thesis. Универзитет у Крагујевцу Факултет медицинских наука; 2016.
26. Diabetes as a disease. BioCrine. [приступљено 21.01.2022.] Доступно на адреси: <https://biocrine.com/development-programs-home/role-of-pancreas-in-diabetes/>
27. Who discovered insulin? Diabetes research. Diabetes UK. [приступљено 21.01.2022.] Доступно на адреси: <https://www.diabetes.org.uk/research/research-impact/insulin>
28. Dağaçan S. Insulin Structure, Function and Diabetes Models in Animals. J Exp Basic Med Sci. 2021; 1(3):96–101.
29. PDB-101: Molecule of the Month: Insulin. [приступљено 21.01.2022.] Доступно на адреси: <https://pdb101.rcsb.org/motm/14>
30. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose Transporters and Insulin Action — Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. N Engl J Med. 1999; 341(4):248–57.
31. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. Physiological Reviews. American Physiological Society. 2018; 98:2133–223.
32. Lizák B, Szarka A, Kim Y, Choi KS, Németh CE, Marcolongo P, et al. Glucose transport and transporters in the endomembranes. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20:5898
33. Mayer JP, Zhang F, DiMarchi RD. Insulin structure and function. Biopolymers - Peptide Science Section. 2007; 88:687–713.
34. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: A high-risk state for diabetes development. The Lancet. 2012; 379:2279–90.
35. Edwards CM, Cusi K. Prediabetes: A Worldwide Epidemic. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2016; 45:751–64.

36. Hostalek U. Global epidemiology of prediabetes - present and future perspectives. Clin Diabetes Endocrinol. 2019; 5(1):1–5.
37. American Diabetes Association. Diagnosis. ADA. The path to understanding diabetes starts here. 2018. [приступљено 23.01.2022.] Доступно на адреси: <https://www.diabetes.org/a1c/diagnosis>
38. Bansal N. Prediabetes diagnosis and treatment: A review. World J Diabetes. 2015; 6(2):296.
39. Colagiuri S. Epidemiology of Prediabetes. Med Clin North Am. 2011; 95(2):299–307.
40. Welsbie DS, Yang Z, Ge Y, Mitchell KL, Zhou X, Martin SE, et al. Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key mediator of retinal ganglion cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(10):4045–50.
41. Ракочевић И., Миљуш Д., Божић З. Инциденција и морталитет од дијабетеса у Србији 2020. Регистар за дијабетес у Србији, Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ Београд. 2020.
42. Egan AM, Dinneen SF. What is diabetes? Med (United Kingdom). 2019; 47(1):1–4.
43. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. Diabetes Care. 2020; 43:S14–31.
44. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract. 2019; 157.
45. Bilous R, Donnelly R. Other Types of Diabetes [Internet]. Handbook of Diabetes. 2010; 53–7.
46. ITIS - Report: Morus nigra. [приступљено 25.01.2022.] Доступно на адреси: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19069#null
47. Posadite dud i brzo Vam vraća lekovitim uticajem. Agro Info Net. [приступљено 25.01.2022.] Доступно на адреси: <https://agroinfonet.com/zdravlje/posadite-dud-i-brzo-vam-vraca-lekovitim-uticajem/>
48. Crni dud - Rasadnik “Reva dva”. [приступљено 25.01.2022.] Доступно на адреси: <https://revadva.co.rs/prodavnica/vocne-sadnice/dud/crni-dud/>

49. Danica S. Dimitrijević. Analysis of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Mulberry Extracts. PhD thesis. Univerzitet u Nišu prirodno-matematički fakultet departman za hemiju. 2014.
50. Elwes HJ, Henry A. *Morus Nigra*, Black Mulberry [Internet]. The Trees of Great Britain and Ireland. 2014; 1606–1608.
51. Ercisli S, Tosun M, Duralija B, Voća S SM. (PDF) Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra* L.) and Purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes. *Food Technology and Biotechnology*. 2010; 48(1):102-106
52. Lim SH, Choi CI. Pharmacological properties of *morus nigra* L. (Black Mulberry) as a promising nutraceutical resource. *Nutrients*. 2019; 11(2):437.
53. Arumugam G, Manjula P, Paari N. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *J Acute Dis*. 2013; 2(3):196–200.
54. Donno D, Cerutti AK, Prgomet I, Mellano MG, Beccaro GL. Foodomics for mulberry fruit (*Morus* spp.): Analytical fingerprint as antioxidants' and health properties' determination tool. *Food Res Int*. 2015; 69:179–88.
55. Araujo CM, Lúcio KDP, Silva ME, Isoldi MC, De Souza GHB, Brandão GC, et al. *Morus nigra* leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. *Food Funct*. 2015; 6(11):3490–9.
56. Sánchez-Salcedo EM, Mena P, García-Viguera C, Martínez JJ, Hernández F. Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. *J Funct Foods*. 2015; 12:399–408.
57. Sánchez-Salcedo EM, Mena P, García-Viguera C, Hernández F, Martínez JJ. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *J Funct Foods*. 2015; 18:1039–1046.
58. Abd El-Mawla AMA, Mohamed KM, Mostafa AM. Induction of biologically active flavonoids in cell cultures of *Morus nigra* and testing their hypoglycemic efficacy. *Sci Pharm*. 2011; 79(4):951–61.
59. D'urso G, Mes JJ, Montoro P, Hall RD, de Vos RCH. Identification of bioactive phytochemicals in mulberries. *Metabolites*. 2020; 10(1):7.

60. Ercisli S, Orhan E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2008; 116(1):41–46.
61. Radovanović AN. Karakterizacija i korelacija bioaktivnih fenolnih jedinjenja crvenih vina Balkana i njihova antioksidaciona i antimikrobna svojstva. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. 2014.
62. Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R. Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*. Taylor & Francis. 2017; 20:1700–1741.
63. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2:270–278.
64. Rustan AC, Drevon CA. Fatty Acids: Structures and Properties. eLS. 2005; 1-7.
65. Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81(1):81–100.
66. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US). 2011; 327(3):220.
67. Raynie DE. Looking at the Past to Understand the Future: Soxhlet Extraction. *Lc Gc North Am*. 2019; 37(8):510–3.
68. Azwanida N. A Review Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, 04(03). *Medicinal & Aromatic Plants*. 2015; 4(3):1-6.
69. Péres VF, Saffi J, Melecchi MIS, Abad FC, De Assis Jacques R, Martinez MM, et al. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. In: *Journal of Chromatography A*. 2006; 1105(1-2):115–118.
70. Reverchon E, De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier. 2006; 38:146–66.
71. Liu WHW. Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies. John Wiley and Sons. 2010.

72. Adams RP. Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 2007; 16:65-120.
73. Zhang Z, Kou X, Fugal K, McLaughlin J. Comparison of HPLC Methods for Determination of Anthocyanins and Anthocyanidins in Bilberry Extracts. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(4):688–691.
74. AOAC (2000) Official methods of analysis, 17th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia. - References - Scientific Research Publishing.
[приступљено 29.01.2022.] Доступно на адреси:
[https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=383351](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=383351)
75. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1):70–76.
76. Santos CMM, Silva AMS. The antioxidant activity of prenylflavonoids. *Molecules.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2020; 25(3):696.
77. Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(3):648–656.
78. Sabo A, Stilinovic N, Vukmirovic S, Bukumiric Z, Capo I, Jakovljevic V. Pharmacodynamic action of a commercial preparation of the mushroom *Coprinus comatus* in rats. *Phyther Res.* 2010; 24(10):1532–1537.
79. Popovic M, Vukmirovic S, Stilinovic N, Capo I, Jakovljevic V. Anti-oxidative activity of an aqueous suspension of commercial preparation of the mushroom *coprinus comatus*. *Molecules.* 2010; 15(7):4564–4571.
80. Pavlović N. The Role of Bile Acids in Epigenetic Regulation of Oxidative Stress and Apoptosis in Normal and Malignant Cells. PhD thesis Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet. 2018.
81. Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid x receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 313(2):604–12.

82. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22):6049–6055.
83. Aebi H. Catalase. *Methods Enzym Anal.* 1974; 673–84.
84. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia.* 1974; 30(6):665–7.
85. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1):158–169.
86. Grimes A. Red Cell Metabolism. *A Manual of Biochemical Methods.* 3rd Edition. *Biochem Soc Trans.* 3rd ed. 1985; 13(6):1259–1259.
87. Abu-Odeh AM, Talib WH. Middle East Medicinal Plants in the Treatment of Diabetes: A Review. *Molecules.* 2021; 26(3).
88. De Pádua Lúcio K, Rabelo ACS, Araújo CM, Brandão GC, De Souza GHB, Da Silva RG, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of black mulberry (*Morus nigra* L.) in a Model of LPS-Induced Sepsis. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 5048031
89. Turgut NH, Mert DG, Kara H, Egilmez HR, Arslanbas E, Tepe B, et al. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d -galactose-induced aging mice. *Pharm Biol.* 2016; 54(6):1052–1064.
90. Hassanalilou T, Payahoo L, Shahabi P, Abbasi MM, Jafar-Abadi MA, Bishak YK, et al. The protective effects of *Morus nigra* L. leaves on the kidney function tests and histological structures in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Res.* 2017; 28(14):6113–6118.
91. Youssef FS, Labib RM, Eldahshan OA, Singab ANB. Synergistic Hepatoprotective and Antioxidant Effect of Artichoke, Fig, Blackberry Herbal Mixture on HepG2 Cells and Their Metabolic Profiling Using NMR Coupled with Chemometrics. *Chem Biodivers.* 2017; 14(12).
92. Jiang Y, Dai M, Nie WJ, Yang XR, Zeng XC. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2017; 200:228–235.
93. Mahmoud MY. Natural antioxidants effect of mulberry fruits (*Morus nigra* and *Morus alba* L.) on lipids profile and oxidative stress in hypercholesterolemic rats. *Pakistan J Nutr.* 2013; 12(7):665–672.

94. Rodrigues EL, Marcelino G, Silva GT, Figueiredo PS, Garcez WS, Corsino J, et al. Nutraceutical and medicinal potential of the *Morus* species in metabolic dysfunctions. *International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. 2019; 20:301.
95. Yao X, Zhu L, Chen Y, Tian J, Wang Y. In vivo and in vitro antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. *Food Chem*. 2013; 139(1–4):59–66.
96. Yi L, Chen CY, Jin X, Zhang T, Zhou Y, Zhang QY, et al. Differential suppression of intracellular reactive oxygen species-mediated signaling pathway in vascular endothelial cells by several subclasses of flavonoids. *Biochimie*. 2012; 94(9):2035–2044.
97. Kravchenko L V., Morozov S V., Tutel'yan VA. Effects of flavonoids on the resistance of microsomes to lipid peroxidation in vitro and ex vivo. *Bull Exp Biol Med*. 2003; 136(6):572–575.
98. Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chem*. 2007; 103(4):1380–1384.
99. Li YQ, Zhou FC, Gao F, Bian JS, Shan F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(24):11463–11468.
100. Zhang X, Liu Z, Bi X, Liu J, Li W, Zhao Y. Flavonoids and its derivatives from *Callistephus chinensis* flowers and their inhibitory activities against α -glucosidase. *EXCLI J*. 2013; 12:956–966.
101. Choi JS, Yokozawa T, Oura H. Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin. *Planta Med*. 1991; 57(3):208–211.
102. Fontana Pereira D, Cazarolli LH, Lavado C, Mengatto V, Figueiredo MSRB, Guedes A, et al. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*. 2011; 27(11–12):1161–1167.
103. Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, et al. Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and glucose. *J Biol Chem*. 2002; 277(18):15252–15260.

104. Matsui T, Kobayashi M, Hayashida S, Matsumoto K. Luteolin, a flavone, does not suppress postprandial glucose absorption through an inhibition of α -glucosidase action. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002; 66(3):689–692.
105. Alkhalidy H, Wang Y, Liu D. Dietary flavonoids in the prevention of T2D: An overview. *Nutrients. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* 2018; 10(4):438.
106. Martín MÁ, Fernández-Millán E, Ramos S, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Mol Nutr Food Res.* 2014; 58(3):447–456.
107. Hu Q, Qu C, Xiao X, Zhang W, Jiang Y, Wu Z, et al. Flavonoids on diabetic nephropathy: advances and therapeutic opportunities. *Chinese Medicine.* 2021; 16:74.
108. Kiokias S, Proestos C, Oreopoulou V. Phenolic acids of plant origin-a review on their antioxidant activity in vitro (O/W emulsion systems) along with their in vivo health biochemical properties. *Foods. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.* 2020; 9:534.
109. Memon AA, Memon N, Luthria DL, Bhanger MI, Pitafi AA. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) Leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish J Food Nutr Sci.* 2010; 60(1):25–32.
110. Sancho RAS, Pastore GM. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International. Elsevier.* 2012; 46: 378–86.
111. Gharib A, Faezizadeh Z, Godarzee M. Treatment of diabetes in the mouse model by delphinidin and cyanidin hydrochloride in free and liposomal forms. *Planta Med.* 2013; 79(17):1599–1604.
112. Na W, Ma B, Shi S, Chen Y, Zhang H, Zhan Y, et al. Procyanidin B1, a novel and specific inhibitor of Kv10.1 channel, suppresses the evolution of hepatoma. *Biochem Pharmacol.* 2020; 178.
113. Gecgel U, Velioglu SD, Velioglu HM. Investigating some physicochemical properties and fatty acid composition of native black mulberry (*Morus nigra* L.) seed oil. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc.* 2011; 88(8):1179–1187.
114. Yilmaz MA, Durmaz G. Mulberry seed oil: A rich source of δ -Tocopherol. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc.* 2015; 92(4):553–559.

115. Da Silva DHA, Barbosa HM, Da Silva JF, Moura CA, Gomes DA, Almeida JRGS, et al. Antidiabetic properties of oral treatment of hexane and chloroform fractions of morus nigra leaves in streptozotocin-induced rats. *An Acad Bras Cienc.* 2021; 93.
116. Silva DHA da, Barbosa H de M, Beltrão RL de A, Silva C de FO, Moura CA, Castro RN, et al. Hexane fraction from Brazilian Morus nigra leaves improved oral carbohydrate tolerance and inhibits α -amylase and α -glucosidase activities in diabetic mice. *Nat Prod Res.* 2021; 35(22):4785–4788.
117. Volpato GT, Calderon IMP, Sinzato S, Campos KE, Rudge MVC, Damasceno DC. Effect of Morus nigra aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2011; 138(3):691–696.
118. Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojy H, Afshin-Nia F. Antioxidant activity of three extracts of Morus nigra. *Phyther Res.* 2004; 18(5):365–369.
119. Zeni ALB, Moreira TD, Dalmagro AP, Camargo A, Bini LA, Simionatto EL, et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of Morus nigra leaves extract. *An Acad Bras Cienc.* 2017; 89(4):2805–2815.
120. Fan L, Peng Y, Wu D, Hu J, Shi X, Yang G, et al. Dietary supplementation of Morus nigra L. leaves decrease fat mass partially through elevating leptin-stimulated lipolysis in pig model. *J Ethnopharmacol.* 2020; 249:112416.
121. Almeida JRGS, Souza GR, Araújo ECdC, Silva FS, de Lima JT, de Araújo Ribeiro LA, Nunes XP, Filho JMB, Júnior LJQ, Santos MRVd. Medicinal Plants and Natural Compounds from the Genus Morus (Moraceae) with Hypoglycemic Activity: A Review. In: Chackrewarthy, S., editor. *Glucose Tolerance.* London: IntechOpen. 2012.
122. Xu LJ, Yu MH, Huang CY, Niu LX, Wang YF, Wu CZ, et al. Isoprenylated flavonoids from Morus nigra and their PPAR γ agonistic activities. *Fitoterapia.* 2018; 127:109–114.
123. Xu L, Yu M, Niu L, Huang C, Wang Y, Wu C, et al. Phenolic compounds isolated from Morus nigra and their α -glucosidase inhibitory activities. *Nat Prod Res.* 2020; 34(5):605–612.
124. Peng CH, Liu LK, Chuang CM, Chyau CC, Huang CN, Wang CJ. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(6):2663–2671.

125. Chang JJ, Hsu MJ, Huang HP, Chung DJ, Chang YC, Wang CJ. Mulberry anthocyanins inhibit oleic acid induced lipid accumulation by reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(25):6069–6076.
126. Yuan Q, Zhao L. The Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit - A Review of Characteristic Components and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* American Chemical Society. 2017; 65:10383–10394.
127. Choi KH, Lee HA, Park MH, Han JS. Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit Extract Containing Anthocyanins Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic C57BL/Ksj-db/db Mice. *J Med Food.* 2016; 19(8):737–45.
128. Arfan M, Khan R, Rybarczyk A, Amarowicz R. Antioxidant activity of mulberry fruit extracts. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(2):2472–80.
129. Budiman A, Praditasari A, Rahayu D, Aulifa DL. Formulation of antioxidant gel from black mulberry fruit extract (*Morus nigra* L.). *J Pharm Bioallied Sci.* 2019; 11(3):216–22.
130. Kaewkaen P, Tong-Un T, Wattanathorn J, Muchimapura S, Kaewrueng W, Wongcharoenwanakit S. Effects of mulberry fruit powder in animal model of stroke. *Am J Agric Biol Sci.* 2012; 7(3):322–329.
131. Butkhup L, Samappito W, Samappito S. Phenolic composition and antioxidant activity of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits. *Int J Food Sci Technol.* 2013; 48(5):934–940.
132. Zadernowski R, Naczek M, Nesterowicz J. Phenolic acid profiles in some small berries. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(6):2118–24.
133. Telle-Hansen VH, Gaundal L, Myhrstad MCW. Polyunsaturated fatty acids and glycemic control in type 2 diabetes. Vol. 11, *Nutrients.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2019; 11:1067.
134. Lewis C, Barbiere AR. Streptozotocin, a new antibiotic. In vitro and in vivo evaluation. *Antibiot Annu.* 1959; 7:247–254.
135. Hosokawa M, Dolci W, Thorens B. Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing β cells to streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(5):1114–1117.

136. Liu HK, McCluskey JT, McCleghan NH, Flatt PR. Streptozotocin-resistant BRIN-BD11 cells possess wide spectrum of toxin tolerance and enhanced insulin-secretory capacity. *Endocrine*. 2007; 32(1):20–29.
137. Friederich M, Hansell P, Palm F. Diabetes, Oxidative Stress, Nitric Oxide and Mitochondria Function. *Curr Diabetes Rev*. 2009; 5(2):120–144.
138. Simmons RA. Developmental origins of diabetes: The role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. *Free Radic Biol Med*; 2006; 40:917–22.
139. Van Dyke K, Ghareeb E, Van Dyke M, Sosa A, Hoeldtke RD, Van Thiel DH. Luminescence experiments involved in the mechanism of streptozotocin diabetes and cataract formation. *Luminescence*. 2008; 23(6):386–91.
140. Islam MS, Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: A comparative study. *Pharmacology*. 2007; 79(4):243–249.
141. Liu HY, Wang J, Ma J, Zhang YQ. Interference effect of oral administration of mulberry branch bark powder on the incidence of type II diabetes in mice induced by streptozotocin. *Food Nutr Res*. 2016; 60.
142. Júnior IIDS, Barbosa HDM, Carvalho DCR, Barros RDA, Albuquerque FP, Da Silva DiHA, et al. Brazilian *Morus nigra* Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Sci World J*. 2017; 2017.
143. Rizza RA. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: Implications for therapy. *Diabetes*. 2010; 59(11):2697–2707.
144. Fabroni S, Ballistreri G, Amenta M, Romeo F V., Rapisarda P. Screening of the anthocyanin profile and in vitro pancreatic lipase inhibition by anthocyanin-containing extracts of fruits, vegetables, legumes and cereals. *J Sci Food Agric*. 2016; 96(14):4713–4723.
145. Qi SZ, Li N, Tuo ZD, Li JL, Xing SS, Li BB, et al. Effects of *Morus* root bark extract and active constituents on blood lipids in hyperlipidemia rats. *J Ethnopharmacol*. 2016; 180:54–59.
146. Chaudhry J, Ghosh NN, Roy K, Chandra R. Antihyperglycemic effect of a new thiazolidinedione analogue and its role in ameliorating oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2007; 80(12):1135–1142.

147. Gumieniczek A. Effects of pioglitazone on hyperglycemia-induced alterations in antioxidative system in tissues of alloxan-treated diabetic animals. *Exp Toxicol Pathol.* 2005; 56(4–5):321–326.
148. Can S, Cigsar G, Ozabacigil FG, Karamese SA, Selli J, Bacak G, et al. Hepatoprotective effect of 17 β -estradiol as antioxidant modulators against stress damage. *Hepat Mon.* 2015; 15(2):e22633
149. Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(5):3133–3147.
150. Raza H, Ahmed I, John A. Tissue specific expression and immunohistochemical localization of glutathione S-transferase in streptozotocin induced diabetic rats: Modulation by *Momordica charantia* (karela) extract. *Life Sci.* 2004; 74(12):1503–1511.
151. Mallhi TH, Qadir MI, Khan YH, Ali M. Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Bangladesh J Pharmacol.* 2014; 9(1):60–6.
152. Nazari M. Comparative Regulatory Effects of *Morus Alba* Leaf Extracts on Hepatic Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic and Non-Diabetic Rats. *Med Chem (Los Angeles).* 2014; S(1):1-6.
153. Agha FG, Fyiad AA, El Safi H. Comparative study of the protective role of black berry juice and silymarin against liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J Appl Sci Res.* 2012; 8(2):727–738.
154. Radojković MM, Zeković ZP, Vidović SS, Kočar DD, Mašković PZ. Antioksidativna aktivnost i ukupan sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima duda (*morus* spp. L., *moraceae*). *Hem Ind.* 2012; 66(4):547–52.
155. Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, Yamazaki Y, Shiwaku K, Yamane Y. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.* 2006; 97(1):25–31.
156. Mukherjee S, Ghosh S, Choudhury S, Adhikary A, Manna K, Dey S, et al. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF- κ B pathways. *J Nutr Biochem.* 2013; 24(12):2040–2050.

157. Kutlu T, Durmaz G, Ateş B, Yılmaz I, Çetin MŞ. Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Turkish J Biol.* 2011; 35(1):103–110.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
АНТИДИЈАБЕТЕСНИ УТИЦАЈ ЕКСТРАКАТА ЦРНОГ ДУДА (<i>MORUS NIGRA</i>, L) КОД МИШЕВА
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Завод за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду б) в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије, клиничка медицина Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Спроведено истраживање је обухватило претклиничко испитивање ефеката пет различитих екстраката црног дуда на модлеу миша– утицај на гликемије код здравих и животиња са експериментално изазваним дијабетесом; антиоксидативни ефекат – <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i>; хистолошка евалуација ефеката.</p> <p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови – FRAP, DPPH, ОГТТ</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту _____</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p> <p>д) узорци ткива: панкреас, јетра</p>

ђ) снимци, фотографије: фотографије хистолошких препарата

е) текст, навести врсту _____

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx**б) SPSS фајл, датотека .sav****в) PDF фајл, датотека .pdf****г) Текст фајл, датотека .doc****д) JPG фајл, датотека .jpeg**

ф) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли __13__

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) _____

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) **временски размак између поновљених мера је __7 дана__**

б) варијабле које се више пута мере односе се на _____

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, претклиничка истраживања

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом различитих статистичких тестова, одбацивањем екстрема поређењем са литературним подацима.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Протокол огледа одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду, одобрење број 01-90/17-1, 02.10.2015., односно Управа за ветерину, Министарства пољопривреде и заштите животне средине, број решења: 323-07-09649/2015-05.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима**6. Улоге и одговорност**

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Владимирка Илић, vladimirka88@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Владимирка Илић, vladimirka88@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Владимирка Илић, vladimirka88@gmail.com