

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Марко Д. Динчић

**ХЕТЕРОПОЛИВОЛФРАМАТИ КАО МОГУЋИ
АНТИДИЈАБЕТИЦИ: УТИЦАЈ НА ХИПЕРГЛИКЕМИЈУ
И ПРОЦЕНА ХЕПАТО- И НЕФРОТОКСИЧНОСТИ У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ДИЈАБЕТЕСА
ИЗАЗВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ КОД ПАЦОВА**

докторска дисертација

Београд, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Marko D. Dinčić

**HETEROPOLYTUNGSTATES AS POTENTIAL
ANTIDIABETIC AGENTS: EFFECT ON
HYPERGLYCEMIA, AND HEPATO- AND
NEPHROTOXICITY EVALUATION IN STREPTOZOTOCIN-
INDUCED DIABETIC RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

МЕНТОРИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Проф. др Јасна Тодоровић, ванредни професор, Универзитет у Београду, Медицински факултет, Институт за патолошку физиологију „Љубодраг Буба Михаиловић“,
2. Др Мирјана Б. Чоловић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду, Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

1. Проф. др Данијела З. Крстић, редовни професор, Универзитет у Београду, Медицински факултет, Институт за хемију у медицини, председник Комисије
2. Проф. др Мила Ђетковић Милисављевић, ванредни професор, Универзитет у Београду Медицински факултет, Институт за хистологију и ембриологију „Александар Ђ. Костић“
3. Проф. др Бранимир Радосављевић, ванредни професор у пензији, Универзитет у Београду, Медицински факултет, Институт за хемију у медицини
4. Доц. др Неда Милинковић, доцент, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет
5. Проф. др Зорица Јовановић, редовни професор, Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука

ДАТУМ ОДБРАНЕ:

Изради ове докторске дисертације у многоме су својим знањем, несебичном подршком и љубављу допринели моји учитељи, сарадници, пријатељи и моја породица. Користим ову прилику да им се свима срдечно захвалим.

Најискреније се захваљујем свом ментору, **проф. др Јасни Тодоровић** на подршци и помоћи у развоју моје научно-истраживачке каријере као и изради ове докторске дисертације, а пре свега на указаном великом поверењу.

Посебну захвалност дугујем и ментору **др Мирјани Б. Чоловић** на изузетној помоћи у свим фазама израде тезе, као и на великом ангажману око обликовања експерименталних резултата и публикација које су произашле из ове тезе.

Захваљујем се **проф. др Данијели Крстић** што ме је укључила у домаће и међународне пројекте и сарадње из којих је проистекла ова теза, а посебно на укључивању у сарадњу са проф. др *Ulrich Kortz* у оквиру које су синтетисани хетерополиволфраматни испитивани у овој тези. Такође сам јој посебно захвалан на сарадњи и помоћи још од студентских дана, на ефикасности, низу корисних примедби и сугестија током израде тезе, као и на увек позитивном и ведром духу.

Огромну захвалност дугујем **проф. др Ulrich Kortz** и **др Ali S. Mougharbel**, као и њиховим сарадницима са Јакобс Универзитета (*Jacobs University*, Немачка), на синтези и донацији хетерополиволфрамата и на ангажману око обликовања публикације која је произашла из ове тезе.

Проф. др Светлани Игњатовић, **проф. др Бранимиру Радосављевићу**, **доц. др Неди Милинковић** и **асист. др Марији Сарић Матутиновић** веома сам захвалан на дивном односу и професионалном приступу, као и квалитетној обради биохемијских анализа, без којих се ово истраживање не би могло спровести и завршити.

Захваљујем се **проф. др Мили Ђетковић Милисављевић**, **проф. др Тамари Кравић Стевовић** и **асист. др Александри Милосављевић** на изради препарата и тумачењу резултата конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.

Проф. др Зорица Јовановић је својим искуством и врло корисним коментарима и сугестијама помогла да ова дисертација буде квалитетнија и свеобухватнија, и на томе сам јој веома захвалан.

Захваљујем се **доц. др Бранкици Медић** и **доц. др Марку Стојановићу** на корисним саветима и сугестијама током израде ове докторске дисертације.

Захваљујем се **проф. др Силвиу Де Луки** на дугим и смисленим дискусијама, подршци и пријатељским саветима, који су ми били од велике помоћи у тренуцима када је то било најпотребније.

Најискреније се захваљујем колективима Института за патолошку физиологију и Института за хемију у медицини на подршци, помоћи и позитивној радној атмосфери.

Захваљујем се свима који су на директан и индиректан начин допринели да се ова докторска дисертација уради. Такође, посебно се захваљујем мојој породици на стрпљењу, помоћи и

подршци током лепих и лоших тренутака, због чега им посвећујем ову докторску дисертацију.

Захваљујем се коауторима радова који су произашли као резултат истраживања у оквиру ове докторске дисертације јер су учествовали у:

- креирању концепта тезе: проф. др Данијела Крстић, проф. др Јасна Тодоровић и др Мирјана Чоловић;
- лабораторијској синтези испитиваних хетерополиволфрамата: проф. др *Ulrich Kortz* и др *Ali S. Mougharbel*;
- биохемијским анализама: проф. др Бранимир Радосављевић, проф. др Светлана Игњатовић и асист. др Марија Сарић-Матутиновић;
- хистопатолошким анализама: проф. др Мила Ђетковић, проф. др Тамара Кравић-Стевовић и проф. др Милан Милисављевић;
- супервизији: проф. др Данијела Крстић и проф. др *Ulrich Kortz*;
- писању – оригинални нацрт: проф. др Јасна Тодоровић и др Мирјана Чоловић;
- писању рецензија и критичком уређивању: проф. др Данијела Крстић, проф. др Јасна Тодоровић и др Мирјана Чоловић.

**ХЕТЕРОПОЛИВОЛФРАМАТИ КАО МОГУЋИ АНТИДИЈАБЕТИЦИ: УТИЦАЈ НА
ХИПЕРГЛИКЕМИЈУ И ПРОЦЕНА ХЕПАТО- И НЕФРОТОКСИЧНОСТИ У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ДИЈАБЕТЕСА ИЗАЗВАНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ КОД
ПАЦОВА**

Сажетак

Полиоксометалати (ПОМ), поред антимикуробног и антитуморског дејства, могу бити делотворни у снижавању хипергликемије код дијабетичких животиња. Из тог разлога, циљ овог истраживања је био да испита антидијабетички и токсични потенцијал $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 31\text{H}_2\text{O}$, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\text{K}_{14}[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 22\text{H}_2\text{O} \cdot 6\text{KCl}$, $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$. Први експериментални модел била је *screening* студија у којој је испитиван утицај једнократне интраперитонеалне примене $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (5, 10 и 20 mg/kg) на снижавање хипергликемије код дијабетичких пацова. Други експериментални модел служио је за испитавање хепато- и нефротоксичности одабраних хетерополиволфрамата код здравих пацова. Како механизми деловања биоактивних ПОМ још увек нису разјашњени, циљ трећег експерименталног модела је био да се осветле могући механизми антидијабетичког деловања хетерополиволфрамата. Резултати *screening* студије су показали да су оба испитивана хетерополиволфрамата ефикасна у снижавању хипергликемије, с тим што се $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ показао као моћнији антихипергликемијски агенс у односу на $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$. Резултати токсиколошког истраживања показали су да тронедељна перорална примена $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/дан) изазива благи до умерени степен хепато- и нефротоксичности код здравих пацова. У последњем експерименталном протоколу, показано је да перорална примена $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/дан) током три недеље значајно стимулише секрецију инсулина из β -ћелија Лангерхансових острваца панкреаса код дијабетичких пацова. Такође, показано је да $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ испољава хепато-, нефро-, кардио- и неуропротективно дејство код дијабетичких пацова. Стога, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ могу се сматрати потенцијалним неинсулинским лековима-кандидатима у терапији шећерне болести типа 2, који би се подвргли даљим претклиничким испитивањима.

Кључне речи: антидијабетички, компликације шећерне болести, механизам антихипергликемијског деловања, нефротоксичност, полиоксометалати, хепатотоксичност, хетерополиволфрамата, хипергликемија, шећерна болест

Научна област: медицина

Ужа научна област: физиолошке науке

УДК број:

HETEROPOLYTUNGSTATES AS POTENTIAL ANTIDIABETIC AGENTS: EFFECT ON HYPERGLYCEMIA, AND HEPATO- AND NEPHROTOXICITY EVALUATION IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Abstract

Polyoxometalates (POMs) have been found to exhibit antimicrobial, anticancer, and antidiabetic activities. In this study, the *in vivo* antidiabetic effects of a donut-shaped polyanion salt $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 31\text{H}_2\text{O}$ $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ and its Ag-containing derivative $\text{K}_{14}[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 22\text{H}_2\text{O} \cdot 6\text{KCl}$ $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, as well as their hepatotoxicity and nephrotoxicity, were evaluated. In the hypoglycemic screening study, *Wistar albino* rats with streptozotocin-induced diabetes were treated intraperitoneally with three single doses (5, 10, and 20 mg/kg) of both investigated polyoxotungstates. Then, the second experimental model was used to examine the hepato- and nephrotoxicity of $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ and $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ in healthy rats. Finally, the potential mechanisms of their antihyperglycemic action were evaluated in the third experimental model. Screening study results showed that both investigated heteropolytungstates significantly reduced the blood glucose level of diabetic rats, and $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ was found to be a more potent antihyperglycemic agent than $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$. Additionally, hepatotoxic and nephrotoxic effects induced by two-week $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ and $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/day) treatments could be considered mild to moderate. In the final experimental protocol, the oral administration of $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/day) for three weeks significantly stimulated insulin secretion from β -cells of pancreatic islets in diabetic rats. In addition, it was shown that $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ exhibits hepato-, nephro-, cardio- and neuroprotective effects in diabetic rats. Therefore, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ and $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ could be considered promising non-insulin drug candidates in managing type 2 diabetes, which would undergo further preclinical trials.

Key words: antidiabetic drugs, diabetes, diabetes complications, hepatotoxicity, heteropolytungstates, hyperglycemia, mechanism of antihyperglycemic action, nephrotoxicity, polyoxometalates.

Scientific field: medicine

Scientific subfield: physiological sciences

UDC number:

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Метаболизам глукозе.....	1
1.1.1. Апсорпција глукозе у танком цреву.....	1
1.1.2. Метаболизам глукозе у јетри.....	3
1.1.3. Искоришћавање глукозе у екстрахепатичним периферним ткивима.....	5
1.2. Метаболизам инсулина.....	6
1.2.1. Синтеза и секреција инсулина.....	6
1.2.2. Дистрибуција и разградња инсулина.....	9
1.2.3. Молекуларни механизми дејства инсулина.....	11
1.3. Diabetes mellitus.....	14
1.3.1. Класификација Diabetes mellitus.....	14
1.3.2. Diabetes mellitus тип 1А.....	15
1.3.3. Diabetes mellitus тип 1В.....	18
1.3.4. Diabetes mellitus тип 2.....	18
1.4. Орални и инјектабилни (не-инсулински) хипогликемијски лекови.....	23
1.4.1. Деривати сулфолинуреје.....	23
1.4.2. Меглитиниди.....	24
1.4.3. Агонисти рецептора за глукагону-сличан пептид-1.....	25
1.4.4. Инхибитори дипептидил пептидазе-4.....	27
1.4.5. Бигваниди.....	27
1.4.6. Тиазолидиндиони.....	29
1.4.7. Инхибитори натријум-глукозних котранспортера 2.....	30
1.4.8. Инхибитори α -глукозидазе.....	32
1.5. Полиоксометалати у медицини.....	33
1.5.1. Антивирусна активност полиоксометалата.....	34
1.5.2. Антибактеријска активност полиоксометалата.....	36
1.5.3. Антитуморска активност полиоксометалата.....	37
1.5.4. Антидијабетичка активност полиоксометалата.....	38
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	40
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	41
3.1. Синтеза испитиваних хетерополиволфрамата.....	41

3.1.1.	$(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 31\text{H}_2\text{O}$	41
3.1.2.	$\text{K}_{14}[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 22\text{H}_2\text{O} \cdot 6\text{KCl}$	41
3.2.	Експерименталне животиње.....	42
3.3.	Експериментални модел дијабетеса	42
3.4.	Експериментални протокол.....	42
3.4.1.	Експериментални протокол испитивања утицаја $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ у растућим дозама (5, 10 и 20 mg/kg) на снижавање хипергликемије.....	43
3.4.2.	Експериментални протокол испитивања хепато- и нефротоксичности $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$	44
3.4.3.	Експериментални протокол испитивања могућих механизма антидијабетичког деловања хетерополиволфрамата.....	45
3.5.	Припрема хомогената ткива срца, јетре и бубрега	47
3.6.	Изоловање синаптозома из мозга пацова.....	47
3.7.	Одређивање биохемијских параметара функције јетре.....	48
3.7.1.	Одређивање активности аспартат аминотрансферазе.....	48
3.7.2.	Одређивање активности аланин аминотрансферазе	48
3.7.3.	Одређивање активности алкалне фосфатазе.....	49
3.7.4.	Одређивање концентрације укупних протеина	50
3.7.5.	Одређивање концентрације албумина.....	50
3.8.	Одређивање биохемијских параметара функције бубрега.....	51
3.8.1.	Одређивање концентрације урее	51
3.8.2.	Одређивање концентрације креатинина.....	52
3.8.3.	Одређивање концентрације мокраћне киселине	52
3.8.4.	Одређивање концентрације молекула оштећења бубрега-1 и липокалина повезаним са неутрофилном желатиназом.....	53
3.9.	Одређивање концентрације инсулина.....	54
3.10.	Одређивање нивоа укупног и гликозилираног хемоглобина A_{1c}	54
3.11.	Одређивање концентрације електролита	55
3.11.1.	Одређивање концентрације јона натријума, калијума и хлорида.....	55
3.11.2.	Одређивање концентрације укупног калцијума.....	56
3.11.3.	Одређивање концентрације укупног магнезијума.....	56
3.11.4.	Одређивање концентрације неорганског фосфата.....	57
3.11.5.	Одређивање концентрације јонизованог калцијума и јонизованог магнезијума.....	58

3.12.	Одређивање параметара липидног састава	58
3.12.1.	Одређивање концентрације укупног холестерола	58
3.12.2.	Одређивање концентрације холестерола у липопротеинима мале густине	59
3.12.3.	Одређивање концентрације холестерола у липопротеинима велике густине.....	59
3.12.4.	Одређивање концентрације аполипопротеина-А1.....	60
3.12.5.	Одређивање концентрације аполипопротеина-В	61
3.12.6.	Одређивање концентрације укупних триглицерида	62
3.13.	Одређивање параметара инфламације	63
3.13.1.	Одређивање концентрације С-реактивног протеина.....	63
3.13.2.	Одређивање концентрације феритина	64
3.14.	Одређивање параметара оксидативног стреса	64
3.15.	Одређивање активности ацетилхолинестеразе	65
3.16.	Одређивање активности Na^+/K^+ -АТРаза и <i>ecto</i> -АТРаза	65
3.17.	Патохистолошка анализа ткива	66
3.17.1.	Припрема ткива.....	66
3.17.2.	Обрада узорака за конвенционалну светлосну микроскопију.....	66
3.17.3.	Обрада узорака за трансмисиону електронску микроскопију.....	66
3.18.	Статистичка анализа.....	67
4.	РЕЗУЛТАТИ	68
4.1.	Утицај хетерополиволфрамата $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ на снижавање хипергликемије пацова са експерименталним дијабетесом	68
4.2.	Процена хепато- и нефротоксичности $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ на здравим пацовима.....	70
4.2.1.	Општа подношљивост $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$	71
4.2.2.	Концентрација глукозе у серуму.....	72
4.2.3.	Биохемијски параметри функције јетре.....	73
4.2.4.	Биохемијски параметри функције бубрега.....	75
4.2.5.	Патохистолошка анализа јетре.....	76
4.2.6.	Патохистолошка анализа бубрега.....	78
4.3.	Могући механизми деловања хетерополиволфрамата, који учествују у снижавању вредности хипергликемије и ублажавању дијабетичких компликација	81
4.3.1.	Принос телесне масе	81
4.3.2.	Релативна маса унутрашњих органа	82

4.3.3.	Концентрација глукозе у крви.....	84
4.3.4.	Концентрација инсулина у серуму	86
4.3.5.	Ниво укупног и гликозилираног хемоглобина A _{1c}	87
4.3.6.	НОМА-IR индекс.....	88
4.3.7.	Концентрација електролита у крви.....	89
4.3.8.	Параметри липидног статуса	93
4.3.9.	Биохемијски параметри инфламације.....	95
4.3.10.	Биохемијски параметри функције јетре.....	97
4.3.11.	Биохемијски параметри функције бубрега.....	99
4.3.12.	Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите.....	102
4.3.13.	Активности ацетилхолинестеразе, Na ⁺ /K ⁺ -АТРаза и <i>ecto</i> -АТРаза у синаптозомима.....	110
4.3.14.	Патохистолошка анализа панкреаса	111
4.3.15.	Патохистолошка анализа јетре.....	112
4.3.16.	Патохистолошка анализа бубрега.....	113
5.	ДИСКУСИЈА	115
6.	ЗАКЉУЧЦИ.....	146
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	148

1. УВОД

1.1. Метаболизам глукозе

У циљу раста, развоја и преживљавања, организам користи три основне врсте хранљивих материја: угљене хидрате, протеине и липиде. Протеини се користе као градивни молекули, липиди поседују енергетске и градивне особине, док угљени хидрати, као најзаступљенија органска једињења у природи, првенствено служе као главни извори енергије (1). Добијање енергије катаболизмом угљених хидрата посебно је значајно за мозак, еритроците, тестисе, срж бубрега, сочиво и рожњачу ока, који захтевају континуирано допремање глукозе (2). У савременој људској исхрани угљени хидрати — полисахариди, олигосахариди, дисахариди и моносахариди — чине око 50% дневног калоријског уноса (3). Пре апсорпције у танком цреву, полисахариди, олигосахариди и дисахариди се разграђују до моносахарида (глукоза, галактоза и фруктоза), посредством фамилије ензима гликозидне хидролазе (гликозидазе) које катализују хидролизу гликозидних веза. Процес разлагања почиње са пљувачном α -амилазом у усној дупљи, привремено се зауставља у желуцу (кисела средина инактивира пљувачну α -амилазу), затим се наставља у дванаестопалачном цреву под дејством панкреасне α -амилазе и завршава се у мембрани микроресица ентероцита, где се налазе трансмембрански ензими дисахаридазе које разграђују дисахариде до моносахарида (4). Међу насталим моносахаридима доминантна је глукоза (око 80%), зато што представља крајњи продукт разградње најзаступљенијег угљеног хидрата у исхрани — скроба. Преосталих 20% насталих моносахарида чине галактоза и фруктоза. Међутим, у ћелијама јетре највећи део апсорбоване фруктозе и скоро сва галактоза претварају се у глукозу; дакле, глукоза чини 95% свих циркулишућих моносахарида (5).

Глукоза представља основно енергетско „гориво“ за ћелије сисара, јер се њеном разградњом у гликолизи и Кребсовом циклусу ослобађа аденозин-трифосфат (АТФ). Поред енергетске особености, у одређеним околностима глукоза може да послужи и као супстрат за синтезу протеина и масти, као и лактозе током периода лактације у млечној жлезди. Стога, одржавање еугликемије од кључног је значаја за нормално функционисање ћелија, ткива и органа (1, 6, 7). Добро је познато да концентрација глукозе у циркулацији представља равнотежу између процеса:

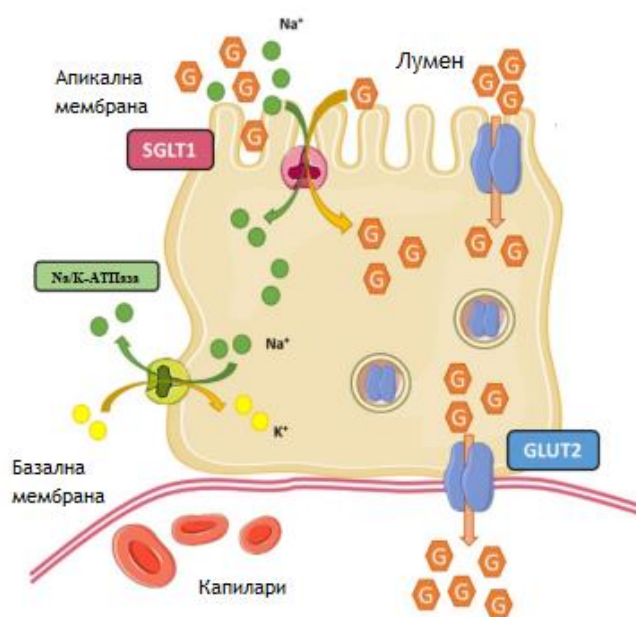
- интестиналне апсорпције глукозе у постпрандијалном стању,
- метаболизма глукозе у јетри и
- искоришћавања глукозе у екстрахепатичним периферним ткивима.

1.1.1. Апсорпција глукозе у танком цреву

Након оброка, апсорпција глукозе у танком цреву одвија се посредством натријум-калијум пумпе (Na^+/K^+ -АТПаза) и специфичних мембранских протеина — Na -глукозни котранспортер 1 (енг. *sodium-glucose cotransporter 1*; SGLT1) и транспортер глукозе 2 (енг. *glucose transporter 2*; GLUT2), који се експримирају на површини апикалне/луминалне и

базолатералне/контралуминалне мембране ентероцита (Слика 1). Модел трансепиталног транспорта глюкозе из лумена црева у крвоток први пут је 1960. године описао *Robert Crane*, и од тада је овај модел фокус истраживања многих научника (8).

Na^+/K^+ -АТПаза, активним транспортом, услед хидролизе АТФ, избацује јоне натријума из унутрашњости ентероцита и тиме обезбеђује енергију у облику електрохемијског градијента натријума за трансепитални транспорт глюкозе. Након производње енергије, улазак глюкозе у ентероците се одвија уз помоћ SGLT1, у котранспорту са два молекула натријума. У зависности од метаболичких потреба организма, глюкоза може да се фосфорилише и акумулира у ентероцитима или да се преноси олакшаном дифузијом посредством GLUT2 кроз базолатералну мембрану ентероцита у међућелијски простор, а затим у крвоток (9).



Слика 1. Схематски приказ трансепиталног преноса глюкозе из лумена црева у крвоток (преузето и модификовано из референце бр. 10)

Будући да поремећај апсорпције глюкозе у танком цреву учествује у етиопатогенези метаболичког синдрома, регулација активности/експресије SGLT1 и GLUT2 на површини ентероцита постала је предмет многих истраживања. Коришћењем различитих анималних модела, показано је да промена количине угљених хидрата у исхрани снажно модификује активност/експресију SGLT1 и GLUT2, док интравенски примењена глюкоза не мења цревну апсорпцију моносахарида код експерименталних животиња (10, 11). Такође, литературни подаци показују да висока концентрација глюкозе у лумену црева, проузрокована повишеним уносом угљених хидрата у исхрани, изазива брзу, али и привремену експресију GLUT2 на апикалној мембрани ентероцита, што доводи до троструког повећања апсорпције глюкозе — теорија „GLUT2“ транслокације (12, 13). У том смислу, показана је јасна корелација између начина исхране и степена активности/експресије (ко)транспортера глюкозе смештених на

површини ентероцита. Додатно, поред глюкозом посредоване контроле, SGLT1 и GLUT2 регулисани су и хормонским деловањем лептина и инсулина (14). Повишена концентрација лептина у крви доводи до нисходне регулације SGLT1, што последично смањује интенстиналну апсорпцију глюкозе, али прецизан молекуларни механизам дејства лептина још увек није познат. Претпоставља се да овај хормон, пореклом из адипоцита, остварује свој утицај највероватније посредством протеин киназе А (енг. *protein kinase A*; PKA) и С (енг. *protein kinase C*; PKC), као и В изоформом рецептора лептина. За разлику од лептина који делује на SGLT1, инсулин смањује GLUT2 експресију на површини базолатералне мембране, и тиме инхибира транспорт глюкозе, чак и у условима високе концентрације глюкозе у лумену црева. Ово је вероватно још један физиолошки механизам дејства инсулина, али на нивоу ентероцита, који спречава постпрандијалне скокове гликемије након оброка богатог угљеним хидратима.

У контексту претходно наведених информација, логично је размишљати да појачана интестинална експресија/активност SGLT1 и GLUT2, која је посредована повишеним дијететским уносом угљених хидрата, игра значајну улогу у етиопатогенези метаболичких поремећаја, што је већ и истакнуто у неколико студија (15, 16). Показано је да ентероцити дијабетичких пацова појачано експримирају SGLT1, пре развоја инсулинске резистенције и хиперинсулинемије. Две независне клиничке студије показале су да код болесника оболелих од шећерне болести (лат. *Diabetes mellitus*; DM) на инсулин независној терапији и код морбидно гојазних болесника без развијеног DM постоји три до четири пута већи интестинални трансепитални транспорт глюкозе због поремећене експресије SGLT1, што вероватно резултује брзим постпрандијалним порастом гликемије код ових болесника (17, 18). Стога, развој нове класе лекова за терапију метаболичког синдрома, са потпуно новим механизмом деловања на рачун инхибиције кључних интестиналних (ко)транспортера глюкозе, представља савремени изазов за фармацеутску индустрију и клиничку фармакологију.

1.1.2. Метаболизам глюкозе у јетри

Јетра своју важну функцију у одржавању еугликемије, како у стању гладовања тако и постпрандијално, остварује пре свега производњом глюкозе и депоновањем гликогена (19). Поред тога, јетра учествује и у регулацији дејства инсулина, јер се највећи део инсулина разгради током првог проласка кроз јетру. Такође, хепатоцити луче разноврсне хепатокине и липиде који аутокриним и паракриним дејством могу контролисати ниво инсулинске осетљивости (20, 21).

Након оброка, највећи део апсорбоване глюкозе путем портне циркулације доспева до јетре. Глюкоза улази у хепатоците доминантно, али не искључиво, посредством GLUT2. Затим се фосфорилише уз помоћ глюкокиназе (енг. *glucokinase*; СК) у глюкозо-6-фосфат, чиме се спречава накнадни излазак глюкозе из хепатоцита (22). У зависности од метаболичких потреба организма, глюкозо-6-фосфат може да се разгради у процесу гликолизе за добијање енергије или да се искористи као супстрат за производњу гликогена. С друге стране, у условима краткотрајног гладовања (нпр. између оброка) јетра процесом гликогенолизе

обезбеђује одговарајућу количину глукозе свим органима, посебно мозгу који се у великој мери ослања на глукозу као главном енергетском супстрату (23). Међутим, уколико гладовање дуже потраје (нпр. током спавања), неопходна је и *de novo* синтеза глукозе из неугљенохидратних извора (глицерол, лактати и α -кето киселине добијене метаболизмом глукогених аминокиселина) процесом глуконеогенезе.

Упркос великим открићима и новим сазнањима, сложени механизми регулације метаболизма глукозе у хепатоцитима још увек нису у потпуности разјашњени, како у физиолошким, тако и у патолошким стањима (24). Свакако, глуконеогенеза, гликогенолиза и производња гликогена представљају најважније процесе у контроли хомеостазе глукозе, пре свега као кључна места деловања различитих регулаторних фактора, као што су: доступност супстрата, алостерна контрола ензимске активности, хормонска регулација и редокс стање у хепатоцитима (25, 26).

Као што је речено, глуконеогенеза у јетри игра важну улогу у одржавању еугликемије током гладовања, али и у настанку хипергликемије наташте код болесника са DM тип 2, што јасно указује на важност регулације глуконеогенезе (27, 28). У литератури, пре више од пола века, описана је индиректна (екстрахепатична) контрола глуконеогенезе, а у последње време посебно је наглашен значај производа липолизе у белом масном ткиву — глицерола и неестерификованих масних киселина (енг. *non-esterified fatty acids*; NEFA), као и инсулина и глукагона (29).

Познато је да β -оксидацијом NEFA настаје једињење ацетил-CoA, које активира ензим пируват карбоксилазу. Под дејством овог ензима, пируват се конвертује у оксалацетат, што последично стимулише глуконеогенезу. Такође, фосфорилацијом глицерола настаје још један прекурсор глуконеогенезе — дихидроксиацетон фосфат (30, 31). Супротно од производа липолизе који стимулишу глуконеогенезу, најпрописиванији хипогликемијски лек — метформин је инхибира тако што делује на ензим митохондријалну глицерол-3-фосфат дехидрогеназу (32). Смањена активност овог ензима мења редокс стање у хепатоцитима и тиме инхибира редокс зависни ензим лактат дехидрогеназу, која производи пируват, што резултира смањењем глуконеогенезе из лактата. Додатно, инхибиција митохондријалне глицерол-3-фосфат дехидрогенезе под утицајем метформина смањује производњу глукозе из глицерола, јер спречава конверзију глицерола у дихидроксиацетон фосфат (33). За разлику од горе поменутих регулаторних фактора који су задужени пре свега за краткорочну контролу глуконеогенезе, инсулин и глукагон користећи комплексне интраћелијске сигналне молекуле мењају активност/експресију гена ензима глуконеогенезе — фосфоенолпируват карбоксилазу и глукоза-6-фосфатазу (20). Инсулин своје дејство у инхибицији глуконеогенезе остварује преко фосфатидилинозитол 3-киназе/протеинске киназе B (PI3K/AKT) сигналног пута, чијом активацијом долази до избацивања тзв. *Forkhead box* O1 транскрипционог фактора из једра (FOXO1) (34). У условима недостатка инсулина, FOXO1 у садејству са коактиватором 1- α рецептора активисаног пролифератором пероксизома подстиче транскрипцију и транслацију гена горе поменутих ензима глуконеогенезе (35). За разлику од инсулина који спречава транскрипцију ових гена, глукагон их стимулише следећим механизмом (36). Везивање глукагона за рецептор на површини хепатоцита доводи до повећања интраћелијске концентрације цикличног аденозин-монофосфата (сАМФ) и активира РКА, која фосфорилише рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата, што последично повећава

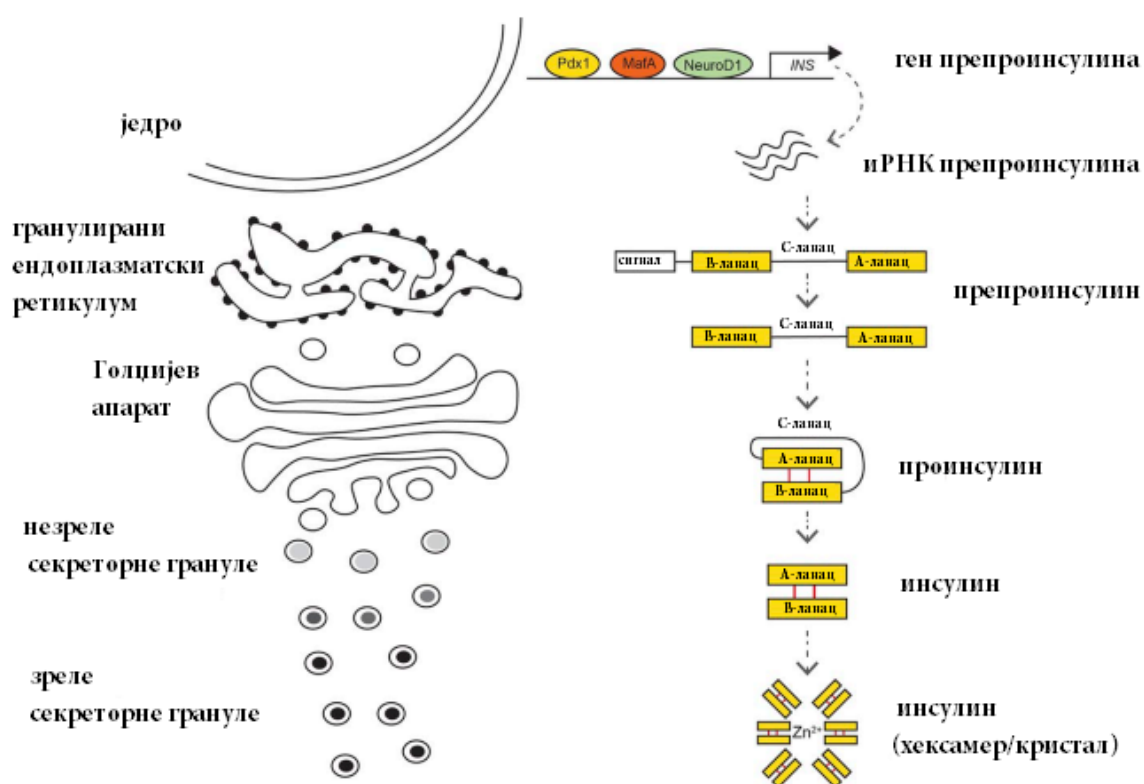
интрацелуларну концентрацију Ca^{2+} и активира CREB-регулисаног коактиватора транскрипције 2 (37, 38). Треба напоменути да инсулин и глюкагон учествују и у краткорочној регулацији глуконеогенезе; инсулин преко инхибиције липолизе и производње глюкагона у α -ћелијама панкреаса, док глюкагон инхибицијом фосфорилације регулатора гликолизе (6-фосфофруктозо-2-киназе, фруктозо-2-6-бисфосфатазе и пируват киназе) (24).

Интрахепатично депоновање глукозе у форми гликогена, поред глуконеогенезе, заузима значајно место у контроли и одржавању еугликемије (39). Познато је да нето депоновање гликогена зависи од равнотеже између процеса гликогенолизе и производње гликогена, а да су главни регулатори ове равнотеже инсулин, глюкагон и глукоза, који своје дејство остварују пре свега променом активности кључних ензима — СК, гликоген фосфорилазе и гликоген синтазе (40). У условима гладовања, глюкагон започиње серију физиолошких процеса до финалне стимулације гликогенолизе и инхибиције производње гликогена (25). Стимулацијом свог рецептора на површини хепатоцита, овај метаболички хормон најпре повећава интрацелуларну концентрацију cAMP и последично активира ензим PKA. Затим, овај ензима фосфорилацијом доводи до: (1) инхибиције транскрипције гена који кодира ензим СК; (2) инхибиције дисоцијације СК од регулаторног протеина, што доводи до разградње овог ензима у једру; (3) фосфорилације и инактивације ензима гликоген фосфорилазе и (4) активације фосфорилазне киназе која даље активира гликоген фосфорилазу (20). Додатно, инхибиција протеин фосфатазе под дејством активираних гликоген фосфорилизе спречава дефосфорилацију и инактивацију гликоген синтазе. Са друге стране, након оброка глукоза и инсулин подстичу производњу гликогена, а супримирају гликогенолизу. Познато је да је за максимално депоновање гликогена неопходно истовремено присуство хипергликемије и хиперинсулинемије (25). Глукоза своје дејство остварује инхибицијом гликоген фосфорилазе и стимулацијом дисоцијације СК од регулаторног протеина, што води у премештање овог ензима из једра у цитоплазму (41, 42). Истовремено, инсулин подстиче транскрипцију гена који кодира ензим СК, дисоцијацију СК од регулаторног протеина и активацију фосфодиестеразе 3В која смањује интрацелуларну концентрацију cAMP.

1.1.3. Искоришћавање глукозе у екстрахепатичним периферним ткивима

Глукоза не може слободно да дифундује кроз ћелијску мембрану, те у ћелије улази посредством GLUT и SGLT транспортних система. GLUT транспортни систем представља фамилију трансмембранских протеина састављену од 14 изоформи транспортера глукозе, означених од GLUT-1 до GLUT-14 (43). Оно што је битно нагласити да изоформе GLUT показују ткивно-специфичан образац експресије. На пример, GLUT-3 је главни транспортер глукозе у неуронима; највећа дистрибуција GLUT-1 је у еритроцитима и крвно-можданој баријери; GLUT-4 је највише заступљен у мишићима и масном ткиву и експримирање ове изоформе је под утицајем инсулина; GLUT-2 је специфичан за јетру, бубрег и β ћелије панкреаса. GLUT-1, GLUT-3 и GLUT-4 могу транспортовати глукозу само у једном смеру, из циркулације до ћелија у условима хипергликемије (након оброка), док GLUT-2 могу транспортовати глукозу у оба смера, тј. у условима гладовања могу транспортовати глукозу и у супротном смеру, из ћелија јетре и бубрега у циркулацију.

пептидазе, препроинсулин се преводи у проинсулин. Истовремено се награде и три дисулфидне везе, како би молекула проинсулина задобио карактеристичну конфигурацију. Даља обрада овог једињења наставља се у Голџијевом апарату, где се пакује у незреле секреторне „програнуле“. Унутар ових гранула, ензими прохормон конвертазе 2 и 3 одвајају средишњи део молекула проинсулина (тзв. С-пептид), при чему настаје хормон инсулин састављен од А- (21 аминокиселина) и В- (30 аминокиселина) пептидних ланаца међусобно повезаних дисулфидним везама. Инсулин и С-пептид се затим транспортују у зреле секреторне грануле Голџијевог апарата. Претпоставља се да је овај транспорт посредован цинк транспортерима, пре свега ZnT8 транспортером (54). У овим гранулама инсулин се спаја са катјонима Zn^{2+} и формира хексамере, које даље сазревају у кристале инсулина нерастворљиве у води.

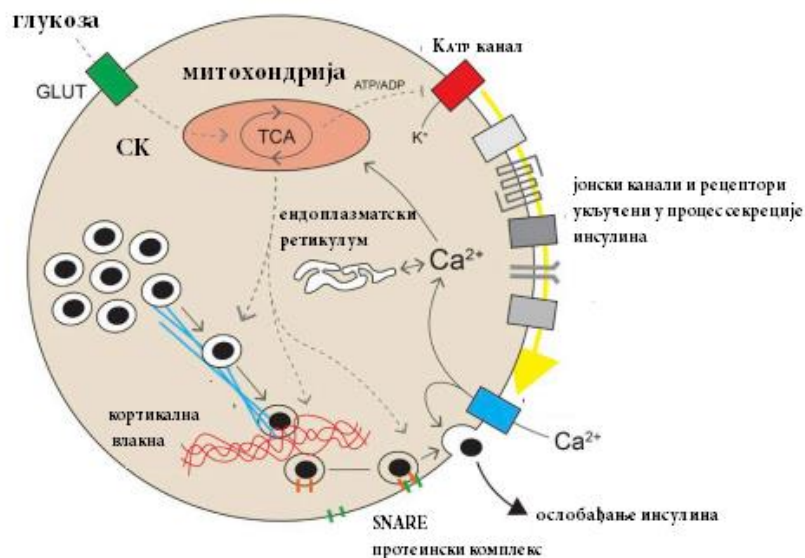


Слика 3. Схематски приказ синтезе инсулина у β -ћелији Лангерхансових острваца панкреаса (преузето и модифицирано из референце бр. 50)

Након продукције, највећи проценат зрелих гранула (око 75–95% на 100 000 гранула) складишти се у цитоплазми β -ћелија на одређеној удаљености од ћелијске мембране (51, 55) (Слика 3). То су резервне грануле инсулина. Преостали мањи део зрелих гранула, означене као грануле усидрене на мембрани (енг. *readily releasable pool*; RRP грануле), мобилише се ка периферији β -ћелија. Овај транспорт се одвија уз помоћ мрежа микротубула и на начин зависан од $5'$ -активираних протеин киназа А (АМПК) и кинезина-1 (56). Међутим, да би ове грануле доспеле до ћелијске мембране морају да прођу кроз кортикалну актинску мрежу која делује као физичка баријера (57). С тим у вези, реорганизација актинске мреже посредована АТФ зависним реакцијама представља важну компоненту укључену у контролу лучења

инсулина. Када грануле прођу актинску баријеру и дођу до ћелијске мембране, неопходан је пораст интрацелуларне концентрације Ca^{2+} да би дошло до фузије секреторних гранула са мембраном и последичног лучења инсулина и С-пептида (58). Описани догађаји вероватно леже у основи добро описаног двофазног модела лучења инсулина. Брза фаза лучења инсулина, која код људи траје око 10 минута, резултат је фузије и секреције RRP гранула, док је фаза одложене секреције повезана са реорганизацијом актинске мреже, што указује да је ова фаза енергетски зависан процес (59).

Добро је позната чињеница да глукоза представља најважнији стимулус секреције инсулина (Слика 4). Процесом олакшане дифузије и посредством GLUT1, глукоза улази у β -ћелију панкреаса, а затим се брзо фосфорилише уз помоћ СК, при чему настаје глукозо-6-фосфат (60). Зато се у литератури GLUT1 и СК описују као сензори глукозе који играју важну улогу у регулацији еугликемије (61). Фосфорилисана глукоза се даље метаболише кроз гликолизу до пируват, а затим унутар митохондрија пируват се разграђује у Кребсовом циклусу, при чему настаје редукована форма никотинамид аденин динуклеотида (NADH) која омогућава синтезу АТФ из аденозин-дифосфата (ADP) у електрон-транспортном ланцу (62). Треба напоменути да интрацелуларна концентрација Ca^{2+} учествује негативном повратном спрегом у регулацији производње АТФ (63). Глукозом посредован пораст АТФ/ADP односа, затварањем АТФ осетљивих K^+ канала, доводи до промене мембранског потенцијала (64). Наиме, деполаризација ћелијске мембране отвара волтажно зависне канале за Na^+ и Ca^{2+} , што последично доводи до генерисања акционог потенцијала, пораста интрацелуларне концентрације Ca^{2+} и следствене егзоцитозе секреторних гранула инсулина, која је посредована SNARE протеинским комплексом. Такође, глукоза омогућава и миграцију резервних гранула инсулина, јер потрошња АТФ у процесу егзоцитозе активира АМПК (63).



Слика 4. Схематски приказ секреције инсулина из β -ћелије Лангерхансових острваца панкреаса (преузето и модификовано из референце бр. 50)

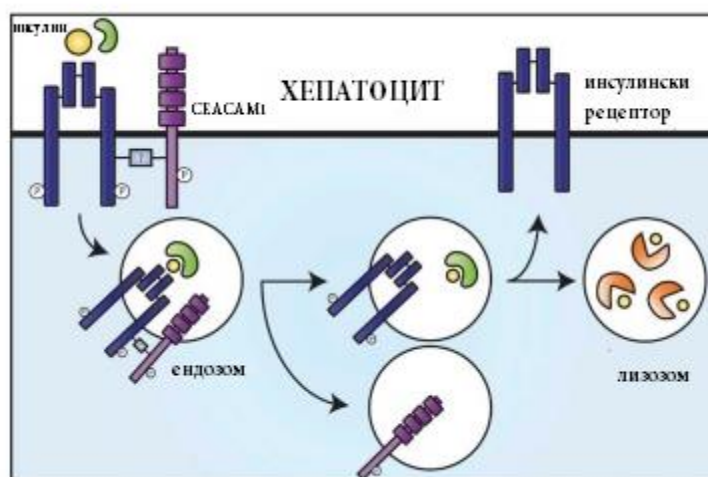
Поред глукозе, у регулацији секреције инсулина учествују и инсулинотропни хормони гастроинтестиналног тракта (ГИТ), аутономни нервни систем, као и паракрини сигнални молекули из суседних α - и δ -ћелија панкреаса који делују на различите начине. Тако на

пример, стимулатори секреције инсулина, као што су вазоактивни интестинални пептид и глукагону сличан пептид-1 (енг. *glucagon-like peptide-1*; GLP-1) своје дејство остварују активацијом аденил циклазе, која повећава интрацелуларну концентрацију cAMP и последично активира ензим пируват-киназу А (65, 66). Активирана киназа затим фосфорилише волтажно зависне канале за Ca^{2+} и следствено доводи до пораста интрацелуларне концентрације Ca^{2+} . Овим механизмом инсулинотропни хормони ГИТ спречавају високе скокове гликемије одмах након оброка, као и хипогликемије у касном постпрандијалном периоду. Поред тога, поједини хормони (нпр. холецистокинин) стимулишу секрецију инсулина посредством фосфолипазе С (6). Као резултат активације овог ензима, настају секундарни гласници диацилглицерол и инозитол трифосфат који или директно доводе до пораста интрацелуларне концентрације Ca^{2+} или индиректно активацијом РКС. Такође, у стимулацији секреције инсулина учествује и сигнални пут фосфолипаза А2-арахидонска киселина преко повећаног преузимања ванћелијског и ослобађања унутарћелијског Ca^{2+} , као и стимулацијом РКС (67). С друге стране, инхибитори лучења инсулина (норадреналин, галанин, соматостатин и др.) своје дејство остварују активацијом пертусис-токсин осетљивих Gi/Go протеина (68).

1.2.2. Дистрибуција и разградња инсулина

Након ослобађања из β -ћелија панкреаса, инсулин улази у трбушну портну вену, а затим се портном циркулацијом допрема до јетре (69). Уочено је да се процес транспортовања инсулина до јетре одвија у пулсевима, који се отприлике јављају на сваких пет минута, при чему јачина пулса износи 0,5-1 pmol/L у условима гладовања, док се после оброка повећа на око 5 pmol/L (70). Процењује се да половину (по неким ауторима и до 80%) новоизлученог инсулина преузимају хепатоцити приликом првог проласка, што јасно указује да јетра делује као „капија“ за инсулин — испоручује ткивима само ону количину инсулина која је неопходна да задовољи метаболичке потребе. Овај регулаторни механизам дистрибуције инсулина први пут је примећен код паса, и сада се у литератури означава као „клиренс“ инсулина (71). Поред тога, показано је да концентрација инсулина која стиже у јетру портном вену може бити и до 10 пута већа од његове концентрације у периферној циркулацији (71, 72). Стога, може да се закључи да ниво инсулинемије првенствено зависи од равнотеже између секреције и „клиренса“ инсулина (73).

Познато је да инсулин из портне циркулације улази у синусоидалне капиларе. Будући да овај тип капилара није обложен базалном мембраном и да ендотелне ћелије садрже фенестре, инсулин лако дифундује у перисинусоидни простор, где долази у контакт са хепатоцитима (74). Инсулин се за хепатоците везује преко рецептора и трансмембранског гликопротеина тзв. карциноембрионски антиген везан са ћелијским адхезивним молекулом 1 (енг. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*; CEACAM1) (75, 76). Одмах након везивања, пре егзоцитозе, започиње његова разградња под дејством ванћелијских деградационих ензима, која се затим наставља у киселој средини ендозома, где се инсулин одваја од рецептора, а након тога се завршава у лизозомима под дејством протеолитичких ензима (Слика 5) (77).



Слика 5. Схематски приказ разградње инсулина у хепатоцитима (преузето и модификовано из референце бр. 50)

Поред тога, путем периферне циркулације један део инсулина доспева до инсулин зависна периферна ткива (скелетни мишићи и масно ткиво). За разлику од синусоида јетре, капилари ових ткива имају базалну мембрану и ендотелне ћелије које нису фенестриране, тако да зид капилара делује као снажна баријера за инсулин (78, 79). Иако је познато да инсулин може на два начина да прође кроз ову баријеру: трансцелуларно (кроз саму ендотелну ћелију) или парацелуларно (између суседних ендотелних ћелија), молекуларни механизам његовог транспорта није у потпуности разјашњен (80). Након што инсулин прође кроз зид капилара, везује се за инсулински рецептор на површини скелетних мишићних ћелија и адипоцита како би остварио своје дејство. Затим, егзоцитозом се уноси у унутрашњост ових ћелија, како би се разградио под дејством ензима лизозома (81).

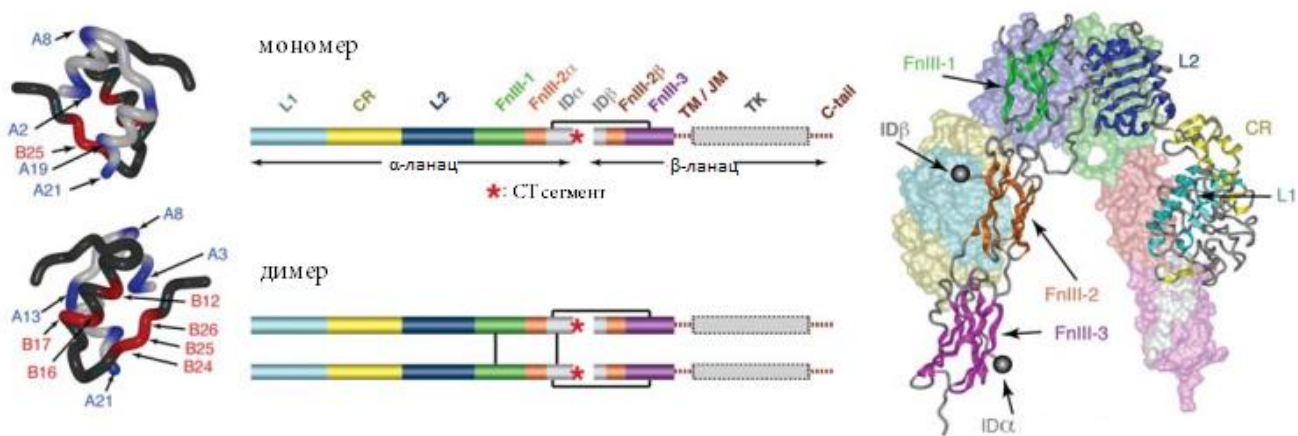
Истраживања су показала да се мали проценат инсулина разграђује и на нивоу бубрега. Након филтрације кроз гломерулску капиларну мембрану, у проксималним каналићима инсулин се реапсорбује процесом ендоцитозе која је посредована мегалином и кубулином. Затим се реапсорбовани инсулин унутар тубулоцита разграђује уз помоћ лизозомалног система (82, 83). Поред тога, инсулин улази и у тубулоците дисталног дела нефрона, али са контралуминалне стране која је окренута према перитубулским капиларима. За разлику од претходно описаног транспорта, овде инсулин улази посредством инсулинског рецептора (84). Стога, процењено је да бубрег разгради 6-8 IJ инсулина у току 24 часа, што објашњава чињеницу да болесници са инсулин зависним DM, који касније развију хроничну слабост бубрега као компликацију, захтевају смањење дозе инсулина (85).

1.2.3. Молекуларни механизми дејства инсулина

Инсулин своје метаболичке и плејотропне утицаје остварује активацијом трансмембранског рецептора за инсулин, који поседује тирозин-киназну активност (86). Овај рецептор је широко распрострањен у многим типовима ћелија феталних и постнаталних ткива, док се највећи број (око 300 000 по ћелији) налази на површини ћелија јетре и адипоцита (87). Међутим, треба нагласити да осетљивост ткива на дејство инсулина не зависи само од броја рецептора на површини ћелија, већ и од комплексног функционисања интрацелуларних сигналних путева.

Ген за инсулински рецептор смештен је на хромозому 19 и састоји се од 22 егзона и 21 интрона. Посебно је интересантан егзон 11 који кодира кратку секвенцу од 12 аминокиселина, јер на основу присуства/одсуства ове аминокиселинске секвенце разликујемо две изоформе рецептора – А и В (88). За обе изоформе рецептора везују се, како инсулин, тако и фактори раста слични инсулину (енг. *insulin-like growth factor*; IGF), али различитим афинитетима везивања. В изоформа рецептора има већи афинитет за инсулин него за IGF. Стога, ова изоформа рецептора учествује у метаболичкој хомеостази. С друге стране, IGF-1, а посебно IGF-2, доминантно се везују за А изоформу рецептора, што сугерише да ова изоформа рецептора вероватно игра значајну улогу у феталном расту и развоју, као и у настанку и развоју тумора (89).

Хумани инсулински рецептор (Слика 6) се састоји од два идентична $\alpha\beta$ мономера, који су међусобно повезани са две дисулфидне везе у $(\alpha\beta)_2$ структуру (90). Екстрацелуларни регион $\alpha\beta$ мономера (ектодомен или аро-рецептор) садржи: два понављачка домена богата леуцином (L1 и L2), регион богат цистеином (CR), три домена фибронектина типа III (FnIII-1, -2, и -3) и уметнути домен (ID), који се налази унутар FnIII-2 домена и садржи $\alpha\beta$ протеолитичко место. Ектодомен инсулинског рецептора формира просторну конфигурацију у Λ -облику, при чему један крак садржи L1, L2 и CR, а супротни FnIII домene, тако да је конфигурација $(\alpha\beta)_2$ хомодимера двоструко симетрична. ID у оквиру α ланца завршава се аминокиселинским остатком који формира α -хеликс на површини централне β -плоче L1 домена супротног $\alpha\beta$ мономера. Овај пептидни остатак сачињен од 16 аминокиселина означава се као α СТ. Данашњи ставови су да ектодомен поседује два везујућа места за инсулин. Прво везујуће место сачињавају централна β -плоча L1 домена и полипептидни α СТ сегмент, док друго везујуће место формирају FnIII-1 и FnIII-2 домени супротног $\alpha\beta$ мономера. Поред ектодомена, $\alpha\beta$ мономер IR поседује и трансмембрански и интрацелуларни домен (јукстамембрански домен, тирозин киназни домен и С-терминални реп), који су искључиво грађени од β ланца.



Слика 6. Структура инсулина и инсулинског рецептора, као и кристална структура ектодомена инсулинског рецептора (преузето и модификовано из референце бр. 90)

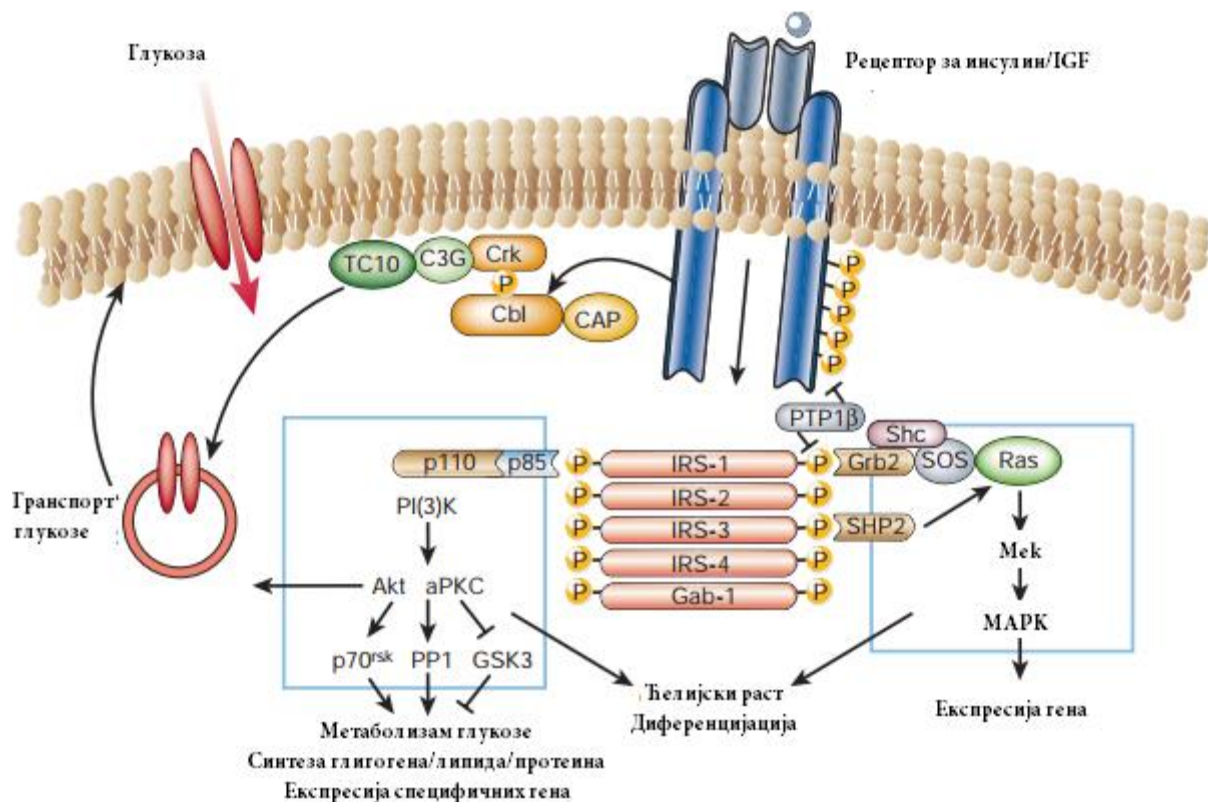
Упркос великим открићима и новим сазнањима, тачан механизам активације инсулинског рецептора након везивања лиганда и даље није у потпуности разјашњен. *Mariyama* и сарадници (91) су предложили „ротациони модел“ активације димерних трансмембранских рецептора, који може да важи и за инсулински рецептор. Наиме, када инсулин није везан за рецептор, трансмембрански домени одржавају конфигурацију у којој тирозин киназа није активна. С друге стране, везивањем инсулина долази до ротације трансмембранских домена и преуређења интрацелуларних домена. То последично активира тирозин киназне домene, који најпре аутофосфорилишу тирозинске остатке на положајима 1162, 1158 и 1163, а затим тирозински остатак на позицији 960 јукстамембранског региона рецептора, који након тога постаје везно место за адаптерске протеине. Основна улога адаптерских протеина је да повезују различите протеине укључене у унутарћелијској сигнализацији, који могу да садрже SH2 домene (енг. *Src-homology-2-containing protein*; Shc) или фосфотирозин-везујуће домene (енг. *phosphotyrosine-binding*; PTB), као што је фамилија протеина супстрата рецептора за инсулин (енг. *insulin receptor substrate*; IRS) (92). До сада је описано шест различитих изоформи IRS протеина, означених од IRS1 до IRS6 (93).

У литератури се наводе два најважнија сигнална пута инсулина (Слика 7): (1) PI3K/AKT и (2) пут протеинских киназа активираних митогенима (енг. *Ras-mitogen-activated protein kinase*; MAPK) (93, 94). PI3K/AKT сигнални пут је одговоран за метаболичко дејство инсулина, док је MAPK сигнални пут укључен у генску експресију, ћелијски раст и диференцијацију (88).

Први корак у активацији PI3K/AKT сигналног пута је везивање ензима PI3K посредством регулаторних субјединица (p85 или p55) за IRS1 и IRS2 (95). На овај начин се активира каталитичка субјединица (p110) PI3K, која фосфорилацијом преводи фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (енг. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*; PIP2) у фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат (енг. *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*; PIP3). Новоформирани PIP3 уз помоћ фосфатидилинозитол зависних протеин киназа 1 и 2 доводи до активације AKT/PKB. Модулаторну улогу AKT/PKB остварује одвајањем од ћелијске мембране и фосфорилацијом бројних супстрата у цитоплазми и једру. Литературни подаци

посебно истичу значај четири кључна супстрата: (1) циљ рапамицина сисара (енг. *mammalian target of rapamycin*; mTOR) — укључен у регулацију синтезе протеина; (2) киназа гликоген синтазе 3 (енг. *glycogen synthase kinase 3*; GSK3) — укључена у регулацију синтезе гликогена; (3) FOXO1 транскрипциони фактор — важан у регулацији генске експресије регулаторних ензима глуконеогенезе и липогенезе; и (4) AS160 — учествује у инсулин зависном транспорту глукозе унутар ћелија (96).

Везивање протеина 2 везаног за рецепторе фактора раста (енг. *growth factor receptor bound protein 2*; GRB2) за IRS и/или Shc протеине започиње активацију MAPK сигналног пута (97). Активисана GRB2 формира комплекс са SOS (енг. *son of sevenless*) протеином, који потом катализује одвајање GDP и везивање GTP за RAS (енг. *rat sarcoma*) протеин.



Слика 7. Пренос сигнала у инсулинском деловању (преузето и модификовано из референце бр. 94)

Контрола сигналних путева инсулина остварује се различитим, и још увек у потпуности неразјашњеним, хомологним и хетерологним регулационим механизмима. Међу значајним регулационим ензимима у литератури се наводи ензим фосфотирозин фосфатаза 1 В (енг. *phosphotyrosine phosphatase 1 B*; PTP-1B), која дефосфорилацијом тирозинских остатака активираниог рецептора смањује дејство инсулина (98). У складу са тим, доказано је на анималним моделима да одсуство овог ензима повећава ниво инсулинске осетљивости у ткивима и спречава настанак гојазности код животиња које су биле на исхрани са високим

садржајем масти (99). Са друге стране, коришћењем β ћелијске линије панкреаса показано да прекомерна експресија РТР-1В смањује инсулином посредовану фосфорилацију тирозинских остатака у инсулинском рецептору, као и секрецију инсулина стимулисану глукозом (86). Поред овога, фосфорилација β -ланаца инсулинског рецептора и IRS протеина на серин/треонин (Ser/Thr) остацима, посредована активношћу ензима РКС и других Ser/Thr киназа, представља један од значајних регулационих механизма дејства инсулина (100). Наиме, показано је да Ser/Thr киназе инхибирају сигналне путеве инсулина и тиме смањују осетљивост ткива на инсулин. Такође, регулација на нивоу експресије гена инсулинских рецептора јесте још један регулациони механизам деловања инсулина (35). Заправо, у присуству инсулина, АКТ фосфорилише FOXO1 транскрипциони фактор, што последично доводи до избацивања овог фактора из једра и његове разградње у цитоплазми, чиме се спречава транскрипција гена за инсулински рецептор.

1.3. Diabetes mellitus

DM представља метаболички синдром који подразумева хроничну хипергликемију праћену поремећајем метаболизма угљених хидрата, липида и протеина, и настаје због апсолутног и/или релативног недостатка инсулина или изостанка његовог ефекта на периферним ткивима (101). Драматичан пораст броја оболелих и умрлих од DM у последње две деценије, како у свету, тако и у нашој земљи, указује да ова хронична незаразна болест поприма размере епидемије. Према последњем издању Атласа Међународне дијабетолошке федерације (енг. *International Diabetes Federation*; IDF) из 2019. године, око 463 милиона људи (старости 20-79 година) широм света болује од DM и његових компликација. Процењено је да ће до 2045. године бити око 700 милиона оболелих, да ће повећање броја оболелих првенствено бити у неразвијеним земљама и земљама у развоју (102). На основу испитивања Института за јавно здравље „Др Милан Јовановић Батут“ које је спроведено 2016. године, DM је и у Републици Србији озбиљан здравствени проблем, са 750 000 оболелих, односно са стопом инциденције од 13,1% (103).

1.3.1. Класификација Diabetes mellitus

Према последњој класификацији заснованој на етиопатогенези (104), DM се може поделити на четири главне категорије:

- I. DM тип 1 (раније инсулин зависан или јувенилни)
 1. имунски посредован (тип 1А)
 2. идиопатски (тип 1Б)
- II. DM тип 2 (раније инсулин независан или адултни)
- III. Гестацијски DM
- IV. Друге специфичне форме
 1. генетски поремећаји улоге β -ћелија
 - MODY 1 – мутација гена за хепатоцитни нуклеарни транскрипциони фактор 4 α
 - MODY 2 – мутација гена за глукокиназу

- MODY 3 – мутација гена за хепатоцитни нуклеарни транскрипциони фактор 1
 - MODY 4 – мутација гена за инсулин промотор фактор-1
 - MODY 5 – мутација гена за хепатоцитни нуклеарни транскрипциони фактор 1 β
 - MODY 6 – мутација гена NeuroD1
 - Митохондријска ДНК
2. болести егзокриног панкреаса,
 3. ендокринопатије
 4. изазван лековима или хемијским средствима
 5. инфекције
 6. други генетски синдроми понекад праћени DM.

1.3.2. Diabetes mellitus тип 1A

DM тип 1A представља хронично, мултифакторско и аутоимунско обољење у чијој патофизиологији се налази деструктивни аутоимунски одговор усмерен према β -ћелијама Лангерхансових острваца панкреаса, који последично доводи до апсолутног недостатка инсулина (105). Раније схватање је било да се DM тип 1A јавља само код деце и адолесцената, али према најновијим истраживањима може се јавити у било ком узрасту — због чега је напуштен назив јувенилни DM. У досадашњим опсервацијским студијама процењено је да 10-15% болесника са DM има овај тип болести (106). Позната је и повезаност DM тип 1A са другим аутоимуним болестима, и то преваходно са: аутоимунским болестима штитасте жлезде, Адисоновом болешћу и пернициозном анемијом (107). Ова повезаност је истраживана и у генетским студијама, где је показано да више различитих аутоимунских болести могу имати исту основу у виду заједничких генских локуса осетљивости (108).

Сложени имунопатогенетски механизам DM тип 1A хронолошки се може поделити на неколико фаза (**Слика 8**): (1) генетска предиспозиција (2) покретање аутоимуности, (3) аутоимунска реакција усмерена против аутоантигена β -ћелија, (4) губитак секреције инсулина и (5) манифестни DM (109, 110). Генетска предиспозиција представља први услов за настанак највећег броја аутоимунских болести, укључујући и имунски-посредован DM. Механизми наслеђивања DM тип 1A нису још увек у потпуности разјашњени, али највероватније се ради о полигенском наслеђивању — већи број гена за осетљивост, од којих сваки појединачно даје мали допринос у настанку болести (111). До сада су генетска истраживања на хуманим и анималним моделима успела да идентификују око 80% наследних компоненти. Резултати ових истраживања су указали да генски сегменти главног комплекса ткивне подударности (енг. *major histocompatibility complex*; MHC) II класе, који се код људи назива комплекс леукоцитних антигена (енг. *human leukocyte antigen*; HLA) II класе, у највећој мери доприносе предиспозицији за развој DM тип 1A (112). Тачније, истакнуте су генске варијанте HLA II класе гена у DR и DQ локусима, а посебно два хаплотипа HLA-DR4-DQ8 и HLA-DR3-DQ2, која су присутна код 90% оболелих (111, 113). Поред тога, постоје докази да и генске промене одређених локуса који не припадају HLA II класи гена могу допринети наследној основи за развој DM тип 1 (114). Међу њима најпознатији су генски локуси за препроинсулин, тирозин киназу укључену у пренос сигнала Т ћелијског рецептора, интерлеукин-2 и антиген који је удружен са цитотоксичним Т лимфоцитима.



Слика 8. Стадијуми у развоју DM тип 1 (преузето и модификовано из референце бр. 110)

Поред наследних фактора, у настанку DM тип 1A кључну улогу вероватно имају и веома разноврсни фактори спољашње средине (115). Мишљење да генски фактори самостално не могу довести до развоја болести подржано је чињеницом да постоји значајно мањи проценат оболелих у односу на укупан број особа које поседују познате наследне факторе ризика. Такође, троструки пораст стопе инциденције у последње три деценије, посебно код деце у узрасту до 5 године, не може се повезати са променом наследних фактора (116). Стога, претпоставља се да фактори спољашње средине код генетски предиспонираних особа покрећу деструктивни аутоимунски процес у острвцима панкреаса који ће довести до апсолутног недостатка инсулина. Фактори спољашње средине су углавном непознати, али највећа пажња истраживача усмерена је према инфективним агенсима и факторима исхране (115, 117, 118). Уочено је да конгенитална инфекција рубеолом повећава ризик за настанак DM тип 1A, али и других аутоимунских болести, вероватно због оштећења имунског система у периоду феталног развоја. Међутим, за остале испитиване инфективне агенсе, као што су ентеровируси и ротавируси, постоје контрадикторни резултати те су и мишљења научника различита.

У новије време, пажња истраживача је усмерена са инфективних агенаса на „хигијенску хипотезу“ због значајног пораста стопе инциденције аутоимунских болести, посебно у развијеним земљама, упркос данашњој бољој превенцији и благовременом лечењу инфекција (119). Према наведеној хипотези, одсуство контакта са инфективним агенсима ремети нормалан развој имунског система, што највероватније утиче на настанак имунске аутореактивности. С тим у вези, постоје и студије на анималним моделима чији резултати указују на могућност учествовања хигијенске хипотезе у настанку DM тип 1A. Заправо, у

овим студијама је показано да се развој ДМ може спречити инфекцијом младих мишева микобактеријама, лимфоцитним вирусом хориоменингитиса, муриним херпес вирусом, лактат дехидрогеназа вирусом, шистозомом и филаријом (120). Поред тога, у једном раду говори се да успешно лечење инфестације цревним глистама повећава ризик за настанак ДМ тип 1А (121).

Подељена су мишљења и за специфичне састојке хране као могуће спољашње факторе ризика за настанак ДМ тип 1А. Неки аутори су на основу добијених резултата дошли до закључка да рано излагање протеинима крављег млека повећава ризик за развој ДМ тип 1А, док неке студије нису успеле да докажу ову повезаност (118, 122). Такође, неке студије су показале да рано (пре трећег месеца живота) или касно (после седмог месеца живота) увођење житарица у исхрану детета може бити окидач деструктивне аутоимунске реакције (123). Свеукупно, још увек не постоје чврсти докази да специфични састојци хране могу представљати факторе ризика за настанак ДМ тип 1А.

Први знаци аутоимунске реакције код особа са ДМ тип 1А представљају специфична циркулишућа антитела усмерена према аутоантигенима β -ћелија панкреаса, која често могу да се детектују месецима или годинама пре појаве манифестног облика болести (124). У дијагностици коришћењем радиоимуноесеја најчешће се одређују аутоантитела на: (1) инсулин, (2) 65 изоформу декарбоксилазе глутаминске киселине (енг. *glutamic acid decarboxylase 65*; GAD65), (3) аутоантиген 512 ћелије острвца (енг. *islet cell antigen 512*; ICA512 или IA-2), (4) аутоантиген 2 β ћелије острвца (енг. *islet cell antigen 2 β* ; IA-2 β) или фогрин и (5) ZnT8 транспортер цинка. Данас се сматра да прво долази до стварања аутоантитела на инсулин (енг. *insulin autoantibodies*; IAA), која се могу регистровати чак и у првим месецима живота (125). Истраживања су показала да уколико се код одојчади открију IAA, постоји велика вероватноћа да ће касније током живота доћи и до продукције других претходно наведених аутоантитела, односно развиће се ДМ тип 1А. Поред тога, процењено је да више од 90% деце оболеле од ДМ тип 1А у узрасту до 5. године позитивно на IAA (126). Треба нагласити да се и код болесника са ДМ који су на терапији инсулинским препаратима дуже од неколико недеља могу открити IAA. Поред тога, IAA регистрована у првих 9 месеци живота могу бити трансплаценталног порекла, што посебно представља проблем уколико је мајка оболела од ДМ на терапији инсулинским препаратима. Стога, сматра се да је најспецифичнији маркер аутоимунске реакције усмерене против аутоантигена β -ћелија аутоантитело на IA-2 (125). Међутим, проблем са овим аутоантителом је његово касно регистровање у серуму, тек након регистровања аутоантитела на IAA и GAD65, те се данас тестирање на минимално два аутоантитела сматра стандардом у дијагностици ДМ тип 1А (127).

У четвртој фази ДМ тип 1А долази до прогресивног смањења масе β -ћелија панкреаса али се не зна тачно колико, зато што још увек не постоји одговарајући директни тест за мерење масе ових ћелија (128). Међутим, маса ових ћелија може се индиректно проценити мерењем С-пептида у циркулацији, јер се овај пептид излучује у еквимоларним концентрацијама са инсулином, а није присутан у инсулинским препаратима (129). Поред тога, патохистолошком анализом панкреаса болесника оболелих од ДМ тип 1А утврђено је да су лезије острвца хетерогене. Заправо, најзаступљенија су острвца без β -ћелија и лимфоцитног инфилтрата — псеудоатрофична острвца, али налазе се и нормална острвца

без инфилтрата, као и острвца са преосталим β -ћелијама и лимфоцитним инфилтратима (130). Ова појава може бити аналогна прогресивном равоју витилига код пацијента, односно неки делови коже су са потпуно уништеним меланоцитима, док је на неким местима кожа потпуно нормална. Поред тога, треба нагласити да током ове фазе оболели немају хипергликемију наташте, али извођењем оралног или интравенског теста оптерећења глукозом региструје се метаболички поремећај (131).

Почетак пете фазе DM тип 1A обично настаје нагло, јасном хипергликемијом, а понекад је праћен и тежим метаболичким компликацијама попут кетозе и кетоацидозе. Процењено је да приближно 1 од 200 деце заврши летално на почетку манифестног облика болести (132). Стога је јако битан *screening* деце, посебно оне са позитивном породичном анамнезом, на присуство специфичних аутоантитела како би се спречиле по живот опасне метаболичке компликације тешких хипергликемија (133). Нажалост, још увек не постоји специфична терапија која би предупредила губитак масе β -ћелија. До сада је покушавано са анти-CD3 и анти-CD20 моноклоналним антителима, али резултати нису били задовољавајући – само пролазно одлажу губитак лучења C-пептида (134, 135). Тренутно се највише верује терапији усмереној према аутореактивним имунским ћелијама и трансплатацији острваца панкреаса (136).

1.3.3. Diabetes mellitus тип 1B

Стручни комитет Америчког удружења за DM недавно је поделио DM тип 1 на тип 1A (имунски-посредован) и 1B (идиопатски), али до данас не постоје чврсти и јасни докази постојања типа 1B (137). Заправо, недавно објављена студија из Јапана приказала је болеснике који су изузетно брзо развили DM тип 1 — имали су изражену хипергликемију са приближно нормалним вредностима гликозилираног хемоглобина A_{1c} (HbA_{1c}) (138). У крви ових болесника нису била регистрована специфична аутоантитела усмерена према аутоантигенима β -ћелија, иако је код већине њих доказана генетска предиспозицију за имунски-посредован тип. Такође, код једног броја болесника била је измерена повишена активност ензима панкреаса у крви. Поред тога, патохистолошка анализа панкреаса утврдила је деструкцију β -ћелија, присуство лимфоцита у ацинусном делу, али одсуство типичног инсулитиса, односно инвазије острваца панкреаса лимфоцитима. Стога, и даље је нејасно да ли је ово заиста тип 1 B или се само ради о изузетно брзој варијанти типа 1A.

1.3.4. Diabetes mellitus тип 2

Опсервацијске студије показују да је тип 2 најчешћи облик DM од кога болује 80-85% болесника са DM и стога представља изузетно значајан проблем савремене цивилизације, који изискује велике трошкове здравственог осигурања (137). Према широко прихваћеном моделу патогенезе, у основи овог типа DM налази се заједничко деловање више различитих поремећаја, а пре свега, смањена осетљивост циљних места за дејство инсулина (јетра, скелетни мишићи и масно ткиво) и постепена опадајућа секреција инсулина из β -ћелија панкреаса (48). Могућност одређивање концентрације инсулина у крви коришћењем

радиоимуноесеј технике 1960. године доводи до открића да старије особе оболеле од DM немају дефицит инсулина, већ хиперинсулинемију, што је било супротно тадашњем схватању патогенезе DM — болести у чијој основи се налази недостатак инсулина (139). Након овог открића, дошло се до хипотезе да се у основи хиперинсулинемије код болесника са DM налази смањена осетљивост периферних ткива на дејство инсулина. Међутим, за потврду наведене хипотезе било је неопходно развити методу за детекцију рецептора за инсулин, што се десило 70-их година прошлог века када се дошло до сазнања да је овај рецептор присутан у различитим ћелијским системима, као и да је његова експресија/активност под строгим контролом пре свега инсулина и то механизмом нисходне регулације (140). Затим, опсежна истраживања на анималним моделима доказују хипотезу да је неосетљивост ткива на дејство инсулина, која настаје као последица поремећаја на нивоу инсулинског рецептора, узрок повишеног нивоа инсулина у крви код болесника са DM. Након овог револуционарног открића, уследила су даља бројна експериментална истраживања која су довела до развоја и методе за мерење степена инсулинске резистенције — еугликемијски хиперинсулинемијски кламп, што је касније расветлило механизме деловања инсулина на нивоу периферних ткива (141). Будући да је ова метода јако сложена за извођење у рутинској клиничкој пракси, истраживачи су открили једноставније маркере за процену степена инсулинске резистенције, а међу њима посебно се издваја хомеостазни модел инсулинске резистенције (НОМА-IR), који се израчунава из базалних вредности гликемије и инсулинемије, те је у доброј корелацији са наведеном методом клампа (142).

Инсулинска резистенција се дефинише као стање умањеног одговора циљних периферних ткива на нормалне концентрације инсулина у циркулацији, што значи да је за одржавање еугликемије у стању инсулинске резистенције неопходна знатно виша концентрација инсулина, односно хиперинсулинемија, која ће компензовати постојећу резистенцију. Имајући у виду да јетра, бубрег, скелетни мишићи и масно ткиво представљају главна места деловања инсулина, јасно је да ће у условима инсулинске резистенције настати поремећаји у неким њиховим функцијама, који ће довести до развоја и одржавања хипергликемије и других пратећих метаболичких поремећаја DM (143).

Познато је да након ингестије глукозе долази до појачане секреције инсулина у портну вену, али и смањене секреције глукагона, чиме се спречава продукција глукозе у јетри и последична изразита хипергликемија након узимања угљено-хидратног obroка (144). Наиме, инсулин својим директним деловањем на регулаторне ензиме глуконеогенезе и гликогенолизе, али и индиректно преко инхибиције липолизе, спречава продукцију глукозе у јетри. Стога, у условима инсулинске резистенције, услед неосетљивости регулаторних ензима јетре на директно дејство инсулина, али и због повећаног степена липолизе у масном ткиву, која узрокује повећан прилив прекурсора глуконеогенезе и NEFA, повећава се продукција глукозе у јетри, пре свега у реакцијама глуконеогенезе из не-угљенохидратних прекурсора, а у мањој мери гликогенолизом, што повећава вредност гликемије (145). Иако је очекивано да настала хиперинсулинемија и хипергликемија компензаторно инхибирају повећану продукцију глукозе, истраживања су показала да код болесника са DM тип 2 постоји значајно повећан степен глуконеогенезе и гликогенолизе у јетри. Заправо, показано је да код болесника са DM тип 2 који имају повишену вредност гликемије наташте (7,8-11,1 mmol/L) постоји повећана продукција глукозе у јетри за око ~ 0,5 mg/kg/min (146). Ово указује да

јетра код болесника са ДМ тип 2 који је тежине око 80 kg додаје у циркулацију око 35 g глукозе током осмочасовног сна, и тиме значајно доприноси развоју хипергликемије наташте, односно у условима гладовања, што је и документовано у бројним студијама (147-149).

Последњих неколико година, бројне студије које су истраживале патогенезу ДМ тип 2, указале су на изузетно важну улогу бубрега у одржавању хомеостазе глукозе (150). У литератури се може наћи студија чији резултати показују да и повећан степен глуконеогенезе у бубрезима може допринети развоју хипергликемије код болесника са ДМ тип 2 (151). Са друге стране, резултати одређених истраживања нису потврдили ову могућност (152), те стога овај податак треба узети са резервом. Међутим, оно што је евидентно јесте да бубрези учествују у развоју и одржавању хипергликемије путем повећаног степена реапсорпције глукозе у проксималним каналићима нефрона. Заправо, сматра се да повећана концентрација глукозе у примарном филтрату повећава активност/експресију SGLT-2 у мембрани тубуларних епителних ћелија проксималних каналића, што додатно доприноси одржавању хипергликемије код болесника са ДМ тип 2. Ипак, новије студије спроведене на болесницима са ДМ тип 2 који су били подвргнути једностраној нефректомији, нису потврдиле прекомерну експресију SGLT-1 и SGLT-2 у тубуларним епителним ћелијама проксималних каналића у поређењу са особама без ДМ тип 2 (153). Стога, данас се сматра да се у основи повећане реапсорпције глукозе у проксималним каналићима налази само функционално повећана активност наведених ко-транспортера, односно да се код болесника са ДМ тип 2 повећава бубрежни праг за глукозу, што представља такође изузетно важан механизам у патогенези.

Као што је претходно наведено, скелетни мишићи представљају главно место искоришћавања глукозе. Уз помоћ еугликемијског-хиперинсулинемијског клампа показано је да се око 80% унете глукозе искоришћава у скелетним мишићима, само око 5% у масном ткиву, док је кост метаболички инертно ткиво у погледу метаболизма глукозе (143). С тим у вези, скелетни мишићи представљају уједно и примарно место инсулинске резистенције. Истраживања су показала да је код болесника са ДМ тип 2 стопа преузимања глукозе у мишиће снижена за око 50%, у односу на особе без овог обољења (154). Стога, неосетљивост скелетних мишића на дејство инсулина заузима значајно место у настанку и развоју хипергликемије и пратећих метаболичких поремећаја код ДМ.

Поред тога, значајно је споменути да ендотел крвних судова строго контролише прелазак инсулина из циркулације у мишићни интерстицијум, и тиме значајно учествује у регулацији искоришћавања глукозе у скелетним мишићима (155). Заправо, на површини ендотелних ћелија налази се рецептор за инсулин који након активације стимулише синтезу азот-мооксида, што последично покреће комплексне механизме везикуларног транспорта који омогућавају пролазак инсулина кроз ендотелни слој капилара у интерстицијум. У складу са тим, постоје и докази да кашњење приликом транспорта инсулина из плазме у мишићни интерстицијум може имати битну улогу у развоју хипергликемије (156). Такође, уочено је да инсулин изазива вазодилатацију капилара преко ослобађања азот-оксида из ендотела, посебно након obroка, како би се олакшао транспорт и искоришћавање глукозе у периферним ткивима. Стога, функционални и структурни поремећаји микроциркулације, у смислу редукције густине капиларне мреже, неодговарајућег повећања протока крви или

неадекватне реактивности капилара, који се пре свега јављају код гојазних особа, могу учествовати у патогенези DM тип 2.

Улога адипоцита у развоју и одржавању хипергликемије и пратећих метаболичких поремећаја код DM тип 2 позната је још одавнина. У последњих неколико година пажња истраживача је посебно усмерена ка испитивању повезаности између хроничне инфламације ниског степена у масном ткиву гојазних особа и настанка DM тип 2 (157). Наиме, сматра се да услед хипертрофије адипоцита долази до оштећења њихове ћелијске мембране. То узрокује нагомилавање ћелија моноцитно/макрофагног система, односно долази до развоја прво локалне, а након тога и системске инфламације. На тај начин, масно ткиво са својим еутопичним и ектопичним локацијама постаје главни извор секреције проинфламаторних адипокина, од којих се посебно издвајају: лептин, висфатин, оментин, липокалин-2, интерлеукин 1 β , фактор некрозе тумора α и ретинол везујући протеин 4. Функција наведених цитокина у развоју инсулинске резистенције документована је у бројним студијама (158). Поред тога, код гојазних особа, као и код особа са инсулинском резистенцијом, постоји хронично повећана концентрација NEFA у циркулацији, што такође ремети нормалан метаболизам глукозе. Заправо, пре четири деценије *Randle* (159) је показао да повећана оксидација NEFA смањује оксидацију глукозе у периферним ткивима, превасходно у скелетним мишићима, тако што: (1) доводи до прекомерне интрацелуларне акумулације ацетил-СоА, снажног инхибитора пируват дехидрогеназе, (2) повећава однос NADH/NAD и тиме успорава Кребсов циклус и (3) доводи до интрацелуларне акумулације цитрата, снажног инхибитора 6-фосфофруктозо-2-киназе, што надаље доводи до акумулације глукозо-6-фосфата који затим инхибира хексокиназу. Услед тога, долази до нагомилавања слободне глукозе унутар ћелија, чиме се инхибирају глукозни транспортери, пре свега GLUT4, што блокира преузимање и искоришћавање глукозе у периферним ткивима. Такође, интрацелуларно нагомилавање слободне глукозе инхибира синтезу гликогена, поред директног инхибиторног деловања ацетил-СоА на гликоген синтазу (160). Наведен редослед догађаја, путем које повећана оксидација NEFA инхибира транспорт глукозе, оксидацију глукозе и синтезу гликогена у периферним ткивима, значајно доприноси развоју хипергликемије код болесника са DM тип 2. Такође, треба напоменути да су релативно новија истраживања показала да повећана концентрација NEFA у циркулацији, путем различитих механизма, учествује и у настанку инсулинске резистенције, заједно са проинфламаторним цитокинима из масног ткива (161). Поред тога, у *in vitro* студијама примећено је да повећана концентрација NEFA инхибира синтазу азот-моноксида и тиме смањује његову производњу у ендотелним ћелијама, те као последица тога ремети вазодилататорни ефекат инсулина, који је изузетно значајан у процесима преузимања глукозе у периферним ткивима (162). Имајући у виду наведене чињенице, може се закључити да повећан ниво NEFA у циркулацији, поред јетре, мишића и β -ћелија панкреаса, заузима значајно место у патофизиологији DM тип 2.

Познато је да у даљем току DM тип 2 услед неосетљивости периферних ткива на дејство инсулина, долази до компензаторног пораста инсулинске секреције, те у овој фази глукозна толеранција није поремећана (48). Касније секреторна способност β -ћелија панкреаса постепено опада, све до испољавања хипергликемије и манифестног DM тип 2. С друге стране, треба истаћи да неке истраживачке групе заступају хипотезу да се у развоју DM

тип 2 најпре јавља хиперинсулинемија, а након тога долази до настанка инсулинске резистенције, гојазности и дисфункције β -ћелија панкреаса (163). Сматра се да инсулинска резистенција представља компензаторни одговор који спречава развој хипогликемије услед хипепродукције инсулина из β -ћелија панкреаса. Наведену хипотезу поткрепљују следеће чињенице: (1) уочено је да се код болесника са инсулиномом развија инсулинска резистенција у циљу спречавања хипогликемије (164); (2) показано је да хиперинсулинемија постигнута интравенском применом инсулина код здравих особа са нормалном толеранцијом глукозе током 3-5 дана доводи до настанка инсулинске резистенције (165); (3) код неких болесника са DM тип 2 повишен базални ниво инсулина је документован, пре развоја гојазности и инсулинске резистенције. Међутим, насупрот ове хипотезе је чињеница да уколико би хиперсекреција инсулина, која је констатна, била примарни догађај, акутно побољшање последичне инсулинске резистенције требало би да изазове хипогликемију код болесника, што се не дешава. С тим у вези, за потврђивање ове хипотезе неопходна су даља истраживања која ће довести до чврстих доказа. Поред тога, треба напоменути да су одређена истраживања показала да код животиња са инсулинском резистенцијом постоји и смањена разградња инсулина у јетри, што може бити компензаторни механизам на инсулинску резистенцију, који има за циљ да ублажи стрес на β -ћелије панкреаса, настао услед прекомерне потражње за инсулином (166).

Свеукупно (Слика 9), смањено преузимање глукозе у периферним ткивима, повећана продукција глукозе у јетри, повећан степен липолизе, повећана реасорпција глукозе у бубрезима, смањен ефекат инкретина, дисфункција неуротрансмисије у мозгу, смањена секреција инсулина и повећана секреција глукагона представљају добро познати „злогласни октет“ који је одговоран за настанак хипергликемије и пратећих метаболичких поремећаја код болесника са DM тип 2.



Слика 9. „Злогласни октет“ у настанку и одржавању хипергликемије код болесника са DM тип 2

1.4. Орални и инјектабилни (не-инсулински) хипогликемијски лекови

Циљеви лечења ДМ укључују ублажавање и одстрањење симптома повезаних са повишеним нивоом глукозе у крви, спречавање развоја и прогресије хроничних макро- и микроваскуларних компликација и обезбеђивање да активности и животни стил болесника буду што ближи нормалном. Кључна фармаколошка опција у постизању ових циљева јесте примена не-инсулинских хипогликемијских лекова и инсулина (167).

Према основном процесу који мењају, не-инсулински хипогликемијски лекови који су данас на располагању за примену код ДМ тип 2 могу се поделити у више групе (168). Треба напоменути да поједини представници делују на више процеса и стога је наведена подела арбитрарна. То су следеће групе:

- секретогоги инсулина — **деривати сулфониуреје и меглитиниди**;
- миметици инкретина — **агонисти рецептора за GLP-1 и инхибитори дипептидил пептидазе-4** (енг. *dipeptidyl peptidase IV inhibitors*; DPP-4);
- супресори глуконеогенезе — **бигваниди**;
- лекови који смањују резистенцију на инсулин и повећавају искоришћавање глукозе — **тиазолидиндиони**;
- лекови који повећавају излучивање глукозе путем урина — **SGLT-2 инхибитори**;
- лекови који утичу на брзину или обим апсорпције глукозе — **аналози амилоидног полипептида Лангерхансових острваца (амилина) и инхибитори α -глукозидазе**.

Међу наведеним не-инсулинским хипогликемијским лековима, агонисти рецептора за GLP-1 и аналози анилина примењују се парентерално, док су остале класе намењене за пероралну примену. Такође, треба напоменути да се понекад у терапији ДМ тип 2 адјувантно могу применити секвестранти жучних киселина (колесевелам) и агонисти допаминских рецептора (бромокриптин), чији механизми снижавања хипергликемије нису јасни.

1.4.1. Деривати сулфолинуреје

Примена деривата сулфониуреје у терапији ДМ тип 2 започиње 50-их година прошлог века, након клиничког запажања да антимикуробни лек са једним сулфонамидом изазива хипогликемију као нежељени ефекат (169). Данас се ова класа оралних хипогликемијских лекова дели на прву (ацетохексамид, хлорпропамид, толбутамид и толазамид) и другу генерацију моћнијих представника са нижим терапијским дозама (глибенкламид, глипизид, гликлазид и глимеперид). Они остварују антихипергликемијско дејство тако што преко истог ефекторног система имитирају утицај глукозе као физиолошког стимулуса за секрецију инсулина из β -ћелија панкреаса. Наиме, на површини ових ћелија блокирају АТР-зависну киназу за калијум (K_{ATP}), чиме изазивају њихову делимичну деполаризацију и улазак јона калцијума, што снажно стимулише одложено, другу фазу секреције инсулина након уноса хране, а мало утиче на прву фазу секреције (170). Сходно томе, може се закључити да су деривати сулфониуреје најефикаснији у снижавању

хипергликемије у раним фазама развоја DM тип 2, када још увек постоји резидуална ендогена секреција инсулина (Табела 1). Другим речима, ову класу лекова првенствено треба применити код особа које имају DM тип 2 краће од 5 година.

Најчешћи нежељени ефекат деривата сулфонилуреје је појава епизода хипогликемије, које су углавном повезане са закаснелим оброцима, повећаном физичком активношћу, конзумирањем алкохолних пића и бубрежном слабошћу, али и са предозирањем, када је увек неопходна хоспитализација, због продужених и по живот озбиљних хипогликемија (Табела 1) (171). Такође, показано је и да примена одређених лекова (варфарин, аспирин, флуконазол и др.) може појачати хипогликемијски ефекат деривата сулфонилуреје, што је вероватно последица конкуренције за ензиме који учествују у метаболизму и протеине плазме. Поред епизода хипогликемије, показано је да ова класа оралних хипогликемијских лекова, услед стимулације апетита, умерено повећава телесну масу болесника (1-3 kg) (172). Донедавно се мислило да деривати сулфонилуреје испољавају кардиоваскуларну токсичност, јер се у срцу и крвним судовима експримира сродна изоформа K_{ATP} , за коју глибенкламид има знатан, а други представници класе низак афинитет. Међутим, резултати велике рандомизоване студије спроведене на 4360 испитаника су показали да болесници који су добијали глибенкламид имају нижи ризик од кардиоваскуларног догађаја у односу на болеснике који су добијали росиглитазон, док је ризик са метформином био ближи ризику са росиглитазоном (172).

Табела 1. Предности и недостаци примене деривата сулфонилуреје

Предности	Недостаци
Ниска цена	Хипогликемија
Брз наступ дејства	Повећање телесне масе
Могућа примена једном дневно	Смањена ефикасност након хроничне примене
Дуга историја употребе	Неопходно титрирање дозе

1.4.2. Меглитиниди

У поређењу са дериватима сулфонилуреје, меглитиниди (репаглинид и натеглинид) имају бржи наступ и краће трајање дејства, односно појачавају прву фазу секреције инсулина и стога се примењују пре сваког главног оброка (препрандијално), како би се спречила појава постпрандијалне хипогликемије (Табела 2) (173). Иако ова класа секретатора инсулина носи мањи ризик од појаве епизода хипогликемије, као и мањи потенцијал повећања телесне масе, за сада нема довољно клиничких доказа да побољшана превенција постпрандијалне хипергликемије постигнута њиховом применом доводи до бољих клиничких исхода код болесника са DM тип 2.

Табела 2. Предности и недостаци примене меглитинида

Предности	Недостаци
Снижавање постпрандијалне хипергликемије	Хипогликемија
Флексибилно дозирање	Повећање телесне масе
Релативно ниска цена	Често дозирање
Кратко дејство омогућава пропуштање оброка	Неопходно титрирање дозе

1.4.3. Агонисти рецептора за глукагону-сличан пептид-1

Инкретини представљају ГИТ хормоне који се секретују у крвоток као одговор на унос хране, чија је основна улога стимулација лучења инсулина и смањење секреције глукагона на зависан начин од глукозе, уз повећање осећаја ситости (174). Два највише проучавана инкретина су глукоза-зависни инсулинотропни полипептид (енг. *glucose-dependent insulintropic peptide*; GIP) и GLP-1. Мада наведени инкретини имају доста сличности, разликују се у томе што GIP није ефикасан у стимулацији лучења инсулина и смањењу хипергликемије код болесника са DM тип 2. Као последица тога, молекуларне компоненте GLP-1 сигналног система постале су потенцијалне терапијске мете за развој нових класа антидијабетика. Дошло се до развоја пептидних агониста рецептора за GLP-1 који су отпорни на инактивацију ензимом DPP-4 и специфичних инхибитора DPP-4 мале молекулске масе (168) (одељак 1.5.4).

Захваљујући различитим фармаколошким модификацијама нативног GLP-1, данас се на тржишту могу наћи његови аналози, који се могу поделити на краткоделујуће и дугоделујуће (175). Ексенатид и ликсисенатид спадају у краткоделујуће аналоге GLP-1, који се примењују једном или два пута дневно, док се дугоделујући аналози — ексенатид са продуженим отпуштањем, лираглутид, дулаглутид и семаглутид — примењују једном недељно. Сви наведени аналози примењују се субкутано, осим семаглутида који се од 2019. године може применити и перорално.

Рецептори за GLP-1 су врло распрострањени у организму и могу се наћи на β -ћелијама панкреаса, периферном и централном нервном систему, срцу, крвним судовима, бубрезима, плућима и ГИТ мукози. У складу са оваквим положајем рецептора, примена GLP-1 аналога има бројне фармаколошке ефекте (Табела 3) (171). Поред тога што побољшавају гликорегулацију код болесника са DM тип 2, показано је да примена ових не-инсулинских хипогликемијских лекова деловањем на нервни систем смањује апетит и повећава осећај ситости, услед чега долази до смањења уноса хране и телесне масе. Такође, недавна мета-анализа кардиоваскуларног исхода са агонистима рецептора за GLP-1 (176) која је укључила 7 слично дизајнираних, рандомизованих и плацебо контролисаних студија (*ELIXA*, *LEADER*, *SUSTAIN-6*, *EXSCEL*, *Harmony Outcomes*, *REWIND* и *PIONEER 6*) показала је да ови лекови имају кардиопротективно дејство код болесника са DM тип 2. Тачније, показано је да примена агониста рецептора за GLP-1 значајно смањује ризик за настанак кардиоваскуларне

смртности (12%), нефаталног и фаталног инфаркта миокарда (9%) и нефаталног и фаталног мозданог удара (16%) код болесника са DM тип 2. Стога, данашњи савремени терапијски водичи саветују да уколико болесник има кардиоваскуларну болест и/или висок кардиоваскуларни ризик неопходно је након почетне терапије метформином, у другом кораку применити агонисте рецептора за GLP-1, и то независно од базалног HbA_{1c} или индивидуално одређене циљне вредности HbA_{1c}, а у каснијем току, ако се не постигне задовољавајућа гликорегулација, интензивирање терапије постиже се додавањем других класа пероралних хипогликемијских лекова (177). Поред кардиопротективности, одређена истраживања показују да примена ових антидијабетика смањује албуминурију и повећава јачину гломерулске филтрације код болесника са дијабетичком нефропатијом, али неке студије не показују овај ефекат, те су неопходна даља истраживања у будућности (178). Неколико мањих студија показало је позитивне ефекте примене аналога GLP-1 у терапији неалкохолне масне болести јетре и неалкохолног стеатохепатитиса, али за потврду ових дејстава неопходне су студије са већим бројем испитаника и дужим трајањем (179).

Најчешћа нежељена дејства су од стране ГИТ (наузеја, повраћење и дијареја) која се на почетку терапије јављају готово код сваког другог болесника, те се за њихово избегавање саветује постепено повећање дозе (**Табела 3**) (171). Такође, локална реакција на месту апликације (еритем и нодуси), холелитијаза, медуларни тироидни карцином, панкреатитис и ретинопатија примећени су као могући нежељени ефекти примене аналога GLP-1. Могућност изазивања хипогликемије услед примене самих аналога GLP-1 је релативно ниска, али како се ови лекови углавном примењују у комбинованој терапији, важно је праћење могуће појаве хипогликемије. Међутим, комплетна процена безбедносног профила аналога GLP-1 неће бити завршена пре него што се добију подаци од великог броја болесника.

Табела 3. Предности и недостаци примене агониста рецептора за GLP-1

Предности	Недостаци
Губитак телесне масе	Гастроинтестинални нежељени ефекти
Нема хипогликемије	Парентерална примена
Смањење кардиоваскуларног ризика	Панкреатитис?
Побољшање неалкохолне масне болести јетре	Медуларни тироидни карцином?
Примена једном недељно	Холелитијаза
Смањење албуминурије	Висока цена
Смањење постпрандијалне глукозе	

1.4.4. Инхибитори дипептидил пептидазе-4

DPP-4 је серин протеаза која се налази на површини ендотелних ћелија и Т лимфоцита, као и у циркулацији, и њена основна функција је разградња и инаktivација инкретина. Стога, инхибитори DPP-4 (ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин и видиглиптин) остварују своје дејство тако што повећавају концентрацију GIP и GLP-1 у крви изнад нивоа који се постиже секрецијом услед уноса хране, чиме повећавају секрецију инсулина (посебно у првој фази) и смањују лучење глукагона. На тај начин побољшавају хипергликемију како наташте, тако и постпрандијално (180). Поред ефекта у снижавању хипергликемије, показано је да ова класа антидијабетика има незнатан антихипертензивни и антихиперлипидемијски ефекат, без доказаног кардиопротективног и нефропротективног дејства (Табела 4). Генерално, инхибитори DPP-4 имају минималне нежељене ефекте и добру подношљивост. Ретки нежељени ефекти су алергијске реакције, акутни панкреатитис и атралгије (181).

Табела 4. Предности и недостаци примене инхибитора DPP-4

Предности	Недостаци
Неутрални ефекат на телесну масу	Обољења панкреаса
Нема хипогликемије	Артритис
Смањење постпрандијалне хипергликемије	Срчана слабост?
Побољшање неалкохолне масне болести јетре	Булозни пемфигоид
Примена једном дневно	Слаб терапијски ефекат
Смањење артеријског притиска	Релативно висока цена
Добра подношљивост	

1.4.5. Бигваниди

Једини представник класе бигванида у клиничкој употреби, који је данас уједно и најпрописиванији перорални хипогликемијски лек, јесте метформин — синтетски аналог природног производа гванида (171). Метформин је развијен за терапијску примену у Француској још 1957. године, али је његова широка примена започела тек у последње две деценије, након многобројних истраживања која су потврдила да метформин не изазива лактатну ацидозу код болесника са нормалном функцијом бубрега.

Постоје бројни докази да је јетра примарно место деловања метформина (182). Наиме, у условима гладовања, метформин снижава прекомерну продукцију глукозе у јетри, пре свега смањењем глуконеогенезе и, у мањем степену, гликогенолизе. Такође, постпрандијално побољшава и осетљивост јетре на дејство инсулина и стога је делотворан у снижавању

хиперинсулинемије и хипергликемије како наташте, тако и постпрандијално. Поред тога, постоје студије у којима је показано да метформин свој ефекат на гликорегулацију остварује и дејством на ГИТ (183). Показано је да примена метформина повећава степен анаеробног метаболизма глукозе у цревима, чиме се смањује степен апсорпције глукозе. Метформин повећава синтезу и лучење GLP-1, и на тај начин повећава лучење инсулина и смањује лучење глукагона. Показано је да метформин може да промени и цревну микробиоту, и да тиме додатно утиче на метаболизам глукозе у ГИТ (184). Може да се закључи да овај перорални хипогликемијски агенс има више потенцијалних механизма деловања у снижавању хипергликемије.

Сматра се да метформин своје дејство остварује тако што инхибира производњу АТФ у респираторном ланцу митохондрија услед инхибиције митохондријалног комплекса I и глицерол-3-фосфат дехидрогеназе која је неопходна за пренос редуccionих еквивалената из цитоплазме у митохондрије ради поновне оксидације (183). Као последица смањеног ниво АТФ и повећаног ниво АМФ (снажан алостерни инхибитор регулаторног ензима глуконеогенезе — фруктозо-1,6 бисфосфатазе) долази до смањене глуконеогенезе и гликогенолизе у јетри. Поред тога, метформин активира АМФ-зависну протеин киназу, која надаље смањује глуконеогенезу и липогенезу, а повећава оксидацију слободних масних киселина.

Клиничка испитивања су показала да у монотерапији метформин снижава ниво HbA_{1c} у крви за око 1-2% у зависности од старости, телесне масе и трајања DM тип 2 (Табела 5) (185). Поред побољшане гликорегулације, употреба метформина смањује ниво триглицерида и холестерола у липопротеинима мале густине (LDL-холестерол) у плазми, док не делује на ниво холестерола у липопротеинима велике густине (HDL-холестерол). Као посебно сложен и актуелан аспект испитивања фармаколошког профила метформина издваја се могућност примене овог лека или његових аналога у различитим типовима карцинома. Опсервацијске студије су показале да је примена метформина код болесника са DM тип 2 повезана са дозно зависним смањењем ризика од настанка карцинома (186).

У монотерапији, метформин не доводи до епизода хипогликемија и углавном нема дејство на телесну масу (Табела 5) (185). Најчешћа нежељена дејства су дозно зависни ГИТ поремећаји (мука, гађење, повраћење и дијареја), који се углавном избегавају постепеним повећањем дозе приликом увођења метформина у терапију. Треба посебно напоменути да је употреба метформина код болесника са оштећеном бубрежном функцијом контраиндикована, јер може доћи до ексцесивног пораста концентрације метформина у плазми и развоја лактатне ацидозе. Примена метформина је контраиндикована и код оних стања која могу довести до ткивне хипоксије и последичне лактатне ацидозе, као што су: тешке дехидратације, септична стања, шок, терминални стадијум срчане слабости и акутна интоксикација алкохолом (185). Поред тога, познато је да хронична употреба метформина (> 5 година) може довести до дефицита витамина B₁₂ и развоја мегалобластне анемије, стога је неопходно контролисати ниво овог витамина у крви и одговарајућом надокнадом спречити његов недостатак (187). Треба напоменути да код сваког болесника који не уноси храну преко уста или интравенски прима радиографско контрастно средство које може довести до наглог пада бубрежне функције, треба прекинути употребу метформина.

Табела 5. Предности и недостаци примене метформина

Предности	Недостаци
Ниска цена	Гастроинтестинални нежељени ефекти
Нема хипогликемије	Дефицит витамина B ₁₂
Могућа примена једном дневно	Лактатна ацидоза (ретко)
Дуга историја употребе	Поремећај бубрежне функције?
Без дејства на телесну масу	
Може смањити кардиоваскуларни ризик?	

1.4.6. Тиазолидиндиони

Током испитивања антихиперлипидемијске активности једног аналога клофибрата, примећено је да овај агенс снижава вредност глукозе у крви, што је довело до развоја нове класе лекова који повећавају осетљивост ткива на дејство ендогеног инсулина. Ти лекови су означени као тиазолидиндиони или глитазони (188). Први уведен у клиничкој пракси био је троглитазон, који је 2000. године повучен из употребе због повезаности са ретким случајевима идиосинкразијског потенцијално фаталног оштећења јетре. Данас се на тржишту могу наћи два представника ове класе лекова, росиглитазон и пиоглитазон, који своје антихипергликемијско дејство остварују тако што се везују за нуклеарне рецепторе који активирају пролиферацију пероксизома класе γ (енг. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; PPAR γ) (189). Ови рецептори, који су структурно и функционално блиски рецепторима преко којих делују фибрати (PPAR α), укључени су у регулацију експресије гена повезаних са метаболизмом глукозе и липида. Крајњи ефекат њихове активације је повећана осетљивост ткива на дејство ендогеног инсулина. PPAR γ су превасходно заступљени у масном ткиву, док је њихова експресија у скелетним мишићима ниска, а у јетри расте са повећањем телесне масе. Сматра се да је примарни ефекат тиазолидиндиона на масно ткиво, а да је осетљивост ткива на дејство инсулина секундарни ефекат (188). Наиме, ови лекови подстичу унос и акумулацију масних киселина у адипоцитима, што доводи до смањене концентрације слободних масних киселина у циркулацији, као и смањене акумулације масти у екстра-адипозним ткивима, чиме се ова ткива штите од липотоксичности. Смањена акумулација масти у јетри и мишићима повећава њихову осетљивост на дејство инсулина, док смањено складиштење у панкреасу побољшава секрецију инсулина. Поред тога, повећана осетљивост ткива на инсулин може бити и последица повећане концентрације адипонектина у циркулацији, која је примећена након примене тиазолидиндиона (171).

Клиничка истраживања су показала да у монотерапији тиазолидиндиони снижавају ниво HbA_{1c} у крви за 1,0-1,5%, слично као метформин и деривати сулфониуреје (190). Оно што их разликује од осталих оралних хипогликемијских лекова је то што се њихов максималан терапијски ефекат јавља тек након 10-14 недеља од почетка примене, а показано је да снижавају хипергликемију како наташте, тако и постпрандијално (Табела 6). Њихов

ефекат на параметре липидног статуса у крви је различит, односно пиоглитазон смањује ниво укупних триглицерида у плазми за око 10-15% и благо повећава ниво HDL-холестерола, док росиглитазон има минималне ефекте на концентрације триглицерида и холестерола у плазми (191). Поред тога, показано је да тиазолидиндиони снижавају албуминурију и протеинурију код дијабетичке нефропатије, благо снижавају вредности систолоног и дијастолог притиска, а неке студије су показале и да смањују кардиоваскуларни ризик, иако се раније мислило да повећавају ризик од настанка инфаркта миокарда и можданог удара (188).

Оштећење јетре није примећено код примене нових представника тиазолидиндиона, али редовно праћење функције јетре је неопходно код свих болесника који користе росиглитазон или пиоглитазон (Табела 6). Најчешће нежељено дејство ове класе лекова је добијање у телесној маси и едеми, који слабо реагују на диуретике, те тиазолидиндионе не би требало употребљавати код болесника са срчаном слабошћу (192). Показано је да ови лекови повећавају ризик од фрактура костију, јер доводе до настанка и погоршања остеопеније и остеопорозе, што се објашњава преусмеравањем мезенхимских матичних ћелија у линију адипоцита (193). Због задржавања течности, примена ових лекова доводи до сниженог хематокрита услед експанзије волумена плазме, али овоме додатно доприноси и преусмеравање еритроидних прекурсора у масно ткиво. Поједине опсервацијске студије су показале да тиазолидиндиони повећавају ризик за настанак карцинома мокраћне бешике (194). Међутим, у великим рандомизованим студијама овај податак није потврђен, што треба узети са резервом, јер кратко трајање студија и ретка појава карцинома мокраћне бешике отежавају тумачење налаза.

Табела 6. Предности и недостаци примене тиазолидиндиона

Предности	Недостаци
Примена једном дневно	Едеми
Смањење кардиоваскуларног ризика	Добијање у телесној маси
Нема хипогликемије	Погоршање срчане слабости
Релативно ниска цена	Остеопороза
Повећавају ниво HDL-холестерола у плазми	Карцином мокраћне бешике?
Смањују ниво укупних триглицерида у плазми	

1.4.7. Инхибитори натријум-глукозних котранспортера 2

Откриће да бубрези играју важну улогу у одржавању хипергликемије код болесника са DM тип 2 довело је до развоја нове класе пероралних хипогликемијских лекова, SGLT-2 инхибитора (глифлизони) (171). У физиолошким условима, у проксималним каналићима

бубрега активацијом SGLT-2 спречава се губитак глукозе путем урина и тиме се остварује одржавање нивоа гликемије у уским нормалним вредностима. Услед инхибиције SGLT-2, који су појачано активирани код DM тип 2 због веће количине глукозе у примарном ултрафилтрату, долази до снажне натриурезе, осмотске диурезе и гликозурије, са последичним снижавањем хипергликемије, и то инсулин независним механизмом (195). Поред побољшане гликорегулације, као резултат примене SGLT-2 инхибитора долази до губитка у телесној маси, као и до инхибиције ренин-ангиотензин система, што уз прекомерни губитак натријума и воде путем урина узрокује смањење интраваскуларног волумена, снижење артеријског притиска и побољшање интратрениалне хемодинамике (Табела 7).

Мета-анализа која је укључила 66 рандомизованих клиничких студија утврдила је да монотерапија SGLT-2 инхибиторима снижава ниво HbA_{1c} у крви за око 0,4-1,1%, што је приближно дејству метформина и тиазолидиндиона (196). Међутим, треба нагласити да ефикасност ове групе лекова зависи од функције бубрега, односно са смањењем јачине гломерулске филтрације смањује се и способност SGLT-2 инхибитора да снижавају ниво HbA_{1c} у крви. Ова група лекова смањује хипергликемију како наташте, тако и постпрандијалну. Оно што посебно издваја SGLT-2 инхибиторе, од осталих пероралних хипогликемијских лекова, јесте њихов нефропротективни потенцијал (197). Многобројна испитивања показују да ова класа лекова спречава развој и прогресију хроничне бубрежне болести код болесника са DM тип 2. SGLT-2 инхибитори испољавају нефропротективни потенцијал и код испитаника без DM и бубрежне болести, као и код болесника са срчаном слабошћу, што указује на чињеницу да они спречавају оштећење бубрега независно од побољшане гликорегулације. Механизам који објашњава овај ефекат је непознат, али водећа хипотеза јесте да повећана концентрација NaCl у дисталном делу нефрона инхибира ренин-ангиотензин систем, што смањује гломерулски хидростатски притисак и јачину гломерулске филтрације услед вазоконстрикције аферентне артериоле (тубулогломерулска повратна спрега). Иако долази до иницијалног смањења јачине гломерулске филтрације, дугорочно гледано ово штити бубрег од оштећења и побољшава његову функцију. Поред заштитне улоге на бубрег, мета-анализа која је укључила 9 рандомизованих клиничких студија (197), показала је да примена SGLT-2 инхибитора значајно смањује ризик за настанак кардиоваскуларне смртности, несмртоносног инфаркта миокарда и несмртоносног шлога, као и ризик за хоспитализацију због срчане слабости, како код болесника са DM тип 2, тако и код особа без овог обољења. Посебно треба истаћи да је показано да примена SGLT-2 инхибитора значајно побољшава срчану функцију код болесника са систолном и дијастолном срчаном слабошћу, али без DM тип 2, што је довело до тога да се данас ова група лекова користи као прва линија у лечењу срчане слабости (198). Најновији водичи за лечење DM тип 2 препоручују да уколико болесник има срчану слабост и/или хроничну бубрежну болест неопходно је, након почетне терапије метформином, у другом кораку применити SGLT-2 инхибиторе, и то независно од базалног HbA_{1c} или индивидуално одређене циљне вредности HbA_{1c}. У каснијем току, ако се не постигне задовољавајућа гликорегулација, даље интензивирање терапије постиже се додавањем других класа пероралних хипогликемијских лекова (177).

Најчешћи нежељени ефекти (Табела 7) ове групе лекова јесу вулвовагинална кандидијаза, уринарне инфекције, полиурија и полакиурија, који се превасходно јављају због

прекомерне гликозурије (171, 199). Због осмотске диурезе и последичног губитка интраваскуларног волумена могу се јавити постурална омаглица, ортостатска хипотензија, али и акутно бубрежно оштећење са наглим падом јачине гломерулске филтрације. Поред тога, могућа је појава и фрактура због повећаног лучења калцијума урином, мада се ова повезаност још увек испитује. Пријављени су и тешки случајеви дијабетичке кетоацидозе, чији механизам настанка није до краја разјашњен, али се претпоставља да је повезан са инхибицијом SGLT-2 на површини α -ћелија панкреаса, при чему долази до појачаног лучења глукагона, а могућа је и инхибиција транспортера за кетоне у бубрегу.

Табела 7. Предности и недостаци примене SGLT-2 инхибитора

Предности	Недостаци
Смањење телесне масе	Уринарне инфекције
Нема хипогликемије	Вулвовагинална кандидијаза
Смањење срчане слабости	Повећан ризик за кетоацидозу
Смањење бубрежне слабости	Ортостатска хипотензија
Смањење артеријског притиска	Фрактуре
Примена једном дневно	Висока цена

1.4.8. Инхибитори α -глукозидазе

Акарбоза, миглитол и воглибоза припадају класи пероралних хипогликемијских лекова који своје дејство у снижавању хипергликемије остварају инхибицијом ензима α -глукозидазе у четкастом покрову црева (171). Услед инхибиције овог ензима смањује се интестинална апсорпција скроба, декстрина и дисахарида, што ублажава брзину раста постпрандијалне глукозе у плазми. У клиничким испитивањима је показано да монотерапија овим лекова снижава ниво HbA_{1c} у крви за 0,5-1,0%, глукозу наташте за око 1 mmol/L, а постпрандијалну глукозу за 2,0-2,5 mmol/L (**Табела 8**) (200). Примена ових лекова не доводи до повећања телесне масе и нема ефекте на параметре липидног статуса у крви. Монотерапија овим лековима не доводи до настанка епизода хипогликемије, али будући да се често примењују у комбинацији са другим лековима који могу имати овај озбиљан нежељени ефекат, уколико дође до развоја хипогликемије болесник треба да унесе глукозу као моносахарид, имајући у виду успореност деградације и апсорпције сложених угљених хидрата. Најчешћи нежељени ефекти примене инхибитора α -глукозидазе јесу малапсорпција, надутост, дијареја и абдоминална дистензија, који су последица велике доступности угљених хидрата у доњем делу интестиналног тракта и њиховог метаболизма у цревним бактеријама (201).

Табела 8. Предности и недостаци примене инхибитора α -глюкозидазе

Предности	Недостаци
Нема хипогликемије	Гастроинтестинални нежељени ефекти
Неутрални ефекат на телесну масу	Примена три пута дневно
Снижавање постпрандијалне хипергликемије	Контраиндиковани код бубрежне слабости
Релативно ниска цена	

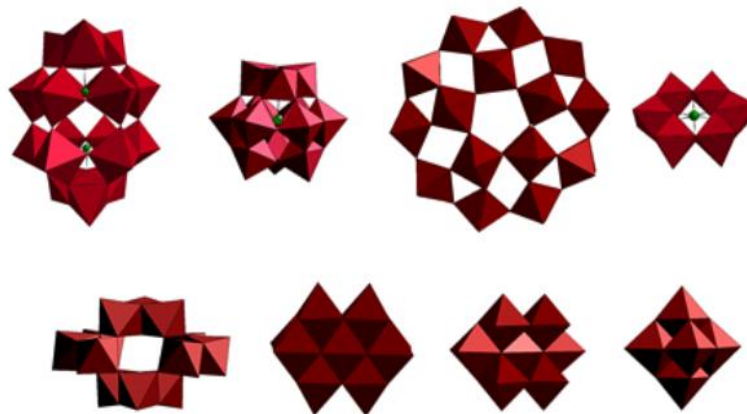
1.5. Полиоксометалати у медицини

Полиоксометалати (ПОМ) представљају класу полианјонских олигомерних агрегата прелазних метала (нпр. Mo^{6+} , W^{6+} и V^{5+}) повезаних кисеоничним мостовима, са великом густином негативног наелектрисања (202). Према броју и врсти метала који их граде, ПОМ се деле на изополианјоне и хетерополианјоне (Слика 10). Изополианјони садрже само d -метал и атоме кисеоника, и њихова општа структурна формула је $[\text{M}_m\text{O}_y]^{p-}$. Супротно, хетерополианјони, као што им сам назив говори, садрже више различитих атома метала и/или неметала из p , d и f блока периодног система, и њихова општа структурна формула је $[\text{X}_x\text{M}_m\text{O}_y]^{q-}$, $x \leq m$. Према структурним карактеристикама разликују се два основна типа хетерополианјона — *Keggin* и *Dawson*, који уједно представљају почетне градивне блокове за синтезу осталих структурно различитих ПОМ.

ПОМ су најпре нашли примену у магнетним, електронским и светлосним апаратима, након тога у катализи хемијских реакција, да би последњих неколико година пажња истраживача била посебно усмерена према испитивању њихове биолошке активности (203). Након открића да 12-волфрамсилицијумова киселина испољава биолошку активност, уследила су многобројна *in silico*, *in vitro* и *in vivo* истраживања која су показала да ова класа сложених неорганских једињења испољава разноврсне фармаколошке ефекте, пре свега антибактеријске, антивирусне, антипролиферативне и антидијабетичке (204-207). У биомедицинским и хемијским истраживањима интересантнији су хетерополианјони у односу на изополианјоне, јер су бројнији и лакши за модификацију, али и њихове карактеристике, у смислу поларности, редокс потенцијала, дистрибуције површинског набоја, облика и киселости, чине их погодним за могућу терапијску примену.

Мада су досадашње студије потврдиле биолошку активност ПОМ, још увек нису у потпуности разјашњени молекуларни механизми њиховог деловања. На основу физичко-хемијских својстава, претпоставља се да ова неорганска једињења прелазних метала реагују преваходно са протеинима, и стога су у литератури највише заступљени подаци о утицају ПОМ на активност различитих ензима, као што су: холинестеразе, фосфатазе, екто-нуклеотидазе и киназе, које се углавном налазе у екстрацелуларном простору (208-211). Познато је да због нанометарских димензија (1 – 3 nm) и великог негативног наелектрисања (од -3 до -20) ПОМ отежано пролазе кроз негативно наелектрисану ћелијску мембрану, што указује на чињеницу да своје биолошке ефекте вероватно остварују деловањем на протеине у екстрацелуларном простору и/или протеине уграђене у плазма мембране, који имају

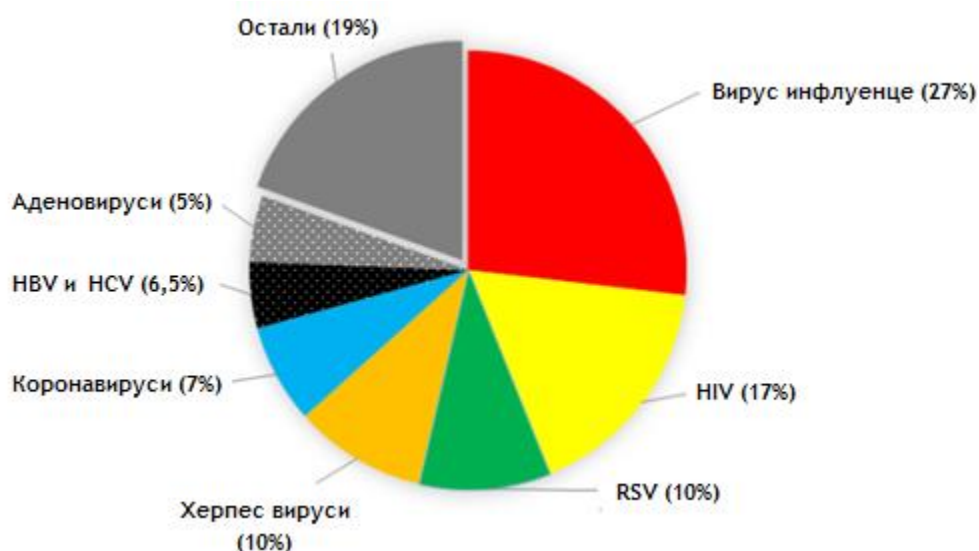
екстрацелуларни везујући домен (212). Треба нагласити да је већина досадашњих истраживања имала за циљ да докаже биолошку активност ПОМ, док се мањи број бавио молекуларним механизмима и токсичним ефектима ПОМ, што указује на потребу за опсежнијим испитивањима механизма њиховог деловања, ефикасности и безбедности.



Слика 10. Полиедарски молекулски модели хетеро- (горњи ред) и изополианјона (доњи ред).
У горњем реду с лева на десно: *Wells-Dawson* јон, *Keggin* јон, *Preyssler-Pope-Jeannin* јон и *Anderson-Evans* јон. У доњем реду с лева на десно: јон параволфрамата, јон декаванадата, јон хептамолибдата и *Lindqvist* јон. (преузето и прилагођено из референце бр. 199)

1.5.1. Антивирусна активност полиоксометалата

У литератури се могу пронаћи бројни докази који недвосмислено потврђују постојање антивирусне активности ПОМ према различитим, како РНК, тако и ДНК вирусима (Слика 11). Антивирусни потенцијал ПОМ први пут је забележен још 70-тих година прошлог века, када је у *in vitro* студији показано да 12-волфрамсилицијумова киселина блокира репликацију вируса леукемије мишева (213). Након скоро три деценије од тог открића, *Rhule* и сарадници у својој ревијалној студији (214), у којој су сумирали резултате постојећих истраживања, показали су да ова неорганска комплексна једињења испољавају активност према ретро-, тога-, парамиксо- и флавиовирусима, као и према херпес симплекс вирусу тип 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2), цитомегаловирусу (CMV) и вирусу хумане имунодефицијенције (HIV). Међутим, њихови молекуларни механизми путем којих остварују своју антивирусну активност нису у потпуности разјашњени, али се претпоставља да су повезани са инхибицијом вирусних протеина и ензима (215). Студије које су испитивале антивирусну активност структурно различитих ПОМ према HIV, показале су да ова једињења инхибирају HIV-1 реверзну транскриптазу и HIV-1 протеазу, као и везивање вирусне партикуле за CD4 + Т лимфоците, чиме се спречава улазак и даља репликација вируса унутар ћелија домаћина (216-219).



Слика 11. Објављене студије антивирусне активности ПОМ према различитим типовима вируса: НIV, вирус хумане имунодефицијенције; RSV, респираторни синцицијални вирус; НВV, вирус хепатитиса В; НCV, вирус хепатитиса С (преузето и модификовано према референци бр. 212)

У студији *Witvrouw* и сарадника (218) проучаван је инхибиторни ефекат различитих мономерних, димерних и тримерних полиоксоволфрамата *Keggin* и *Dawson* типа на репликацију НIV-1(ИИВ) и НIV-2(ROD) у МТ-4 ћелијској линији. Показано је да антивирусна активност испитиваних полиоксоволфрамата према НIV-1(ИИВ) не зависи од величине испитиваних полиоксоволфрамата ($IC_{50} = 0,4-0,5 \mu\text{g/mL}$). Насупрот овоме, утврђено је да мономерни полиоксоволфрамати *Keggin* и *Dawson* типа у односу на димерне и тримерне испољавају снажнији инхибиторни потенцијал према НIV-2(ROD) ($IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ за мономере, $IC_{50} > 71,8 \mu\text{g/mL}$ за тримере).

У *in vitro* и *in vivo* истраживањима *Shigeta* и сарадника (219) анализирана је антивирусна активност полиоксоволфрамата *Keggin* типа, који у својој структури садрже титанијум и ванадијум, према РНК вирусима. Добијени резултати показују да испитивани ПОМ испољавају значајну антивирусну активност према РНК вирусима изазивачима акутних респираторних инфекција и НIV-1. *In vitro* је показано да хетерополи-пероксоволфрамаат *Keggin* типа са титаном $[\text{Pr}^{\text{IV}}\text{NH}_3]_6[\text{PTi}_2\text{W}_{10}\text{O}_{38}(\text{O}_2)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ испољава селективно и снажно инхибиторно дејство према вирусу инфлуенце типа А. Поред тога, у *in vivo* експерименту утврђено је да удисање аеросола са наведеним ПОМ има значајан терапијски ефекат код експерименталних мишева који су били инфицирани вирусом инфлуенце типа А. У студији је запажено да испитивани ПОМ инхибира први корак у репликацији вируса, односно спречава фузију вирусног омотача са ћелијском мембраном, што може бити један од механизма његовог антивирусног дејства. У *in vitro* експерименту наведене студије показано је и да хетерополиволфрамати $\text{K}_{10}\text{Na}[(\text{V}^{\text{VO}})(\text{V}^{\text{IV}}\text{O})_2(\text{SbW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ и $\text{K}_{11}\text{H}[(\text{V}^{\text{IV}}\text{O})_3(\text{SbW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ поседују снажно инхибиторно дејство према НIV. Такође, у истој студији утврђено је да $\text{K}_{10}\text{Na}[(\text{V}^{\text{VO}})(\text{V}^{\text{IV}}\text{O})_2(\text{SbW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ спречава везивање анти- $\text{gp}120$ антитела за $\text{gp}120$ антиген, као и да испитивани хетерополиволфрамаат испољава

антивирусну активност у раној фази инфекције, што упућује на закључак да један од могућих механизма дејства може бити инхибиција уласка HIV унутар CD4 + Т лимфоцита.

Qi и сарадници (220) анализирали су антивирусну активност мономерног ПОМ *Keggin* типа $\text{Cs}_2\text{K}_4\text{Na}[\text{SiW}_9\text{Nb}_3\text{O}_{40}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ према вирусу хепатитиса Ц (HCV). Показали су да испитивано једињење у наномоларном опсегу ($\text{EC}_{50} = 0,8 \mu\text{M}$) спречава репликацију HCV, као и да испољава слабу цитотоксичност. Према њима, испитивани ПОМ директно нарушава интегритет омотача HCV, без утицаја на вирусну репликацију. Друга истраживачка група испитивала је *in vitro* утицај $\text{Cs}_2\text{K}_4\text{Na}[\text{SiW}_9\text{Nb}_3\text{O}_{40}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ на вирус хепатитиса Б (HBV) користећи HepG2.2.15 ћелијску линију (221). Њихови резултати показују да испитивано једињење, како дозно, тако и временски зависно инхибира секрецију антигена и репликацију HBV.

Имајући у виду антивирусну активност ПОМ према различитим типовима вируса, у глобалној борби против COVID-19 разматрана је могућност утицаја ових једињења на тешки акутни респираторни синдром коронавирус 2 (енг. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*; SARS-CoV-2). У *in silico* студији *Shahabadi* (222) и сарадника анализирана је интеракција ПОМ α -*Keggin* типа $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{-4}$ са једне стране, и хуманог ангиотензин-конвертујућег ензима 2 (ACE), хумане трансмембранске серин протеазе 2 (енг. *human transmembrane protease serine 2*; TMPRSS2) и шиљатог гликопротеина омотача SARS-CoV-2 са друге стране. Добијени резултати показују да испитивани ПОМ може да спречи улазак SARS-CoV-2 унутар ћелија тако што блокира TMPRSS2, која има важну улогу у првом контакту вируса и ћелије домаћина. Уочено је и да испитивани хетерополиволфрамат има способност да поремети везивање шиљатог гликопротеина омотача SARS-CoV-2 за хумани ангиотензин-конвертујући ензим 2, чиме се додатно инхибира улазак вируса и његова даља репликација.

1.5.2. Антибактеријска активност полиоксометалата

Доступни подаци у научној литератури указују да структурно различити ПОМ испољавају изузетно широк спектар антибактеријске активности, како према грам-позитивним, тако и према грам-негативним бактеријама, а посебно према оним сојевима бактерија које су развиле резистенцију на више стандарних антибиотика (202).

Микробиолошка истраживања показују да ПОМ, а посебно они са *Keggin* и *Dawson* структуром (планарни, лакунарни и „сендвич“ типови), испољавају значајну антибактеријску активност, и то према сојевима бактерија отпорним на β -лактамске антибиотике. *Yamase* и сарадници (223) су показали да $\text{K}_7[\text{PTi}_2\text{W}_{10}\text{O}_{40}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_6[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]\cdot 14\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_9\text{H}_5[\alpha\text{-Ge}_2\text{Ti}_6\text{W}_{18}\text{O}_{77}]\cdot 16\text{H}_2\text{O}$ и $\text{K}_4[\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ значајно побољшавају антибактеријску активност β -лактамских антибиотика према метицилин-резистентном *S. Aureus* (MRSA) и ванкомицин-резистентном *S. Aureus* (VRSA). Овај феномен делимично може да се објасни тиме да је уочено да испитивани ПОМ могу да инхибирају процесе транскрипције и транслације *tesA* гена, чији је продукт пеницилин-везујући протеин 2' који је укључен у механизам резистенције MRSA и VRSA на β -лактамске антибиотике, односно смањује везивање ове класе антибиотика за ћелијски зид бактерија, при чему бактерија наставља нормално да синтетише пептидогликане (224, 225).

У истраживању *Inoue* и сарадника (226) испитивана је антибактеријска активност 13 структурно различитих ПОМ *Keggin* и не-*Keggin* типа, који садрже волфрам и молибден, према сојевима *H. Pylori* отпорним на стандардне антибиотици, а пре свега на метроинидазол и кларитромицин. Добијени резултати показују да изузетно негативно наелектрисани полиоксоволфрамат не-*Keggin* типа $K_{27}[KAs_4W_{40}O_{140}]$ и $K_{18}[KSb_9W_{21}O_{86}]$ испољавају значајну антибактеријску активност према резистентним сојевима *H. Pylori*. Насупрот овоме, добијене су високе вредности минималне инхибиторне концентрације (МИК) за већину испитиваних полиоксоволфрамата *Keggin* типа и полиоксомолибдата, како *Keggin*, тако и не-*Keggin* типа. Коришћењем скенирајућег електронског микроскопа показано је да негативно наелектрисани $K_{27}[KAs_4W_{40}O_{140}]$ и $K_{18}[KSb_9W_{21}O_{86}]$, за разлику од осталих испитиваних ПОМ, имају способност да промене бациларни облик *H. Pylori* у кокоидни/U-облик, што може да објасни њихову антибактеријску активност према овом соју бактерија.

Ayass и сарадници (227) су показали да ПОМ са талијумом $[Tl_2\{B-\beta-SiW_8O_{30}(OH)\}_2]^{12-}$ испољава и до 36 пута већу антибактеријску активност према грам-позитивним бактеријама (*B. aquimaris* и *B. subtilis*) у поређењу са Tl^+ и Tl^{3+} солима - $Tl(CH_3COO)$ и $Tl(NO_3)_3$, које су познате као неоргански антибиотски агенси. У истраживањима је показана и антибактеријска активност декаванадата $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ према сојевима *S. Aureus* и *S. Pneumonia* (228). *Fukuda* и *Yamase* (229) процењивали су антибактеријску активност неколико различитих полиоксованадата, који се међусобно разликују по наелектрисању и броју додатих атома, према 6 сојева *S. Pneumonia*. Сви испитивани полиоксованадати испољили су значајне антибактеријске могућности, са вредностима МИК од 4 до 32 $\mu g/mL$, док су вредности МИК за стандардне антибиотици биле у опсегу од 2 до 32 $\mu g/mL$. Међу испитиваним полиоксованадатима, најнижа вредност МИК добијена је за декаванат, који је испољио како бактериостатску, тако и бактерицидну активност у већим концентрацијама. Будући да је показано да декаванат има способност да инхибира АТФ-азе Р-типа (вредности IC_{50} у микроларним концентрацијама), може се претпоставити да је механизам његовог бактерицидног дејства уско повезан са инхибицијом јонских пумпи, што ремети нормалан транспорт јона кроз бактеријску ћелијску мембрану и доводи до смрти бактерије (230).

1.5.3. Антитуморска активност полиоксометалата

Последњих година, пажња истраживача посебно је усмерена ка испитивању антитуморске активности ПОМ, која је први пут примећена 90-тих година прошлог века. *Fujita* и сарадници (231) су показали да четири структурно различита полиоксомолибдата испољавају изузетно снажан антитуморски ефекат према хуманим туморима плућа, колоне и дојке, трансплатираним код атимичних голих мишева. Уочено је да међу испитиваним полиоксомолибдатима, $[NH_3Pr^I]_6[Mo_7O_{24}] \cdot 3H_2O$ испољава најснажније дејство у спречавању туморског раста, који је једнак или чак већи у односу на конвенционалне цитотоксичне агенсе. Студија *Ogata* и сарадника (232) открила је да $[NH_3Pr^I]_6[Mo_7O_{24}] \cdot 3H_2O$ испољава дозно зависан цитотоксични ефекат према хуманим ћелијама рака панкреаса (AsPC-1), а индукција апоптозе предложена је као могући механизам његовог антитуморског деловања, јер је уочена појачана фрагментација ДНК молекула и повећан степен апоптозе туморских ћелија након примене испитиваног ПОМ. Фоторедукцијом $[NH_3Pr^I]_6[Mo_7O_{24}] \cdot 3H_2O$ синтетисан је

полиоксомолибдат $[\text{Me}_3\text{NH}]_6[\text{H}_2\text{Mo}^{\text{V}}_{12}\text{O}_{28}(\text{OH})_{12}(\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3)_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ који је у различитим *in vitro* и *in vivo* истраживањима испољио снажније антипролиферативно дејство у односу на нативно једињење (233).

У циљу истраживања механизма антитуморског деловања ПОМ, *Leon* и сарадници (234) испитивали су утицај полиоксоволфрамата са бавром $\text{K}_7\text{Na}_3[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2]\cdot 20\text{H}_2\text{O}$ на степен оксидативног стреса и апоптозе код ћелија хуманог остеосаркома (MG-63). Добијени резултати показују да испитивано једињење, у опсегу концентрација 25-100 $\mu\text{mol/L}$, изазива дозно зависно повећање концентрације реактивних слободних радикала, као и смањење односа GSH/GSSG, који је задужен за покретање ћелијског циклуса заустављеног у G2 фази, чиме се повећава степен апоптозе туморских ћелија. Поред тога, треба напоменути да је испитивани ПОМ испољио моћнији антипролиферативни ефекат према ћелијској линији MG-63 ($\text{IC}_{50} = 22 \mu\text{mol/L}$) у односу на ћелијску линију нормалних остеобласта MC3T3-E1 ($\text{IC}_{50} = 92 \mu\text{mol/L}$), што указује на његову селективност према туморским ћелијама. У поређењу са стандардним антитуморским леком (цисплатин), $\text{K}_7\text{Na}_3[\text{Cu}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2]\cdot 20\text{H}_2\text{O}$ се показао као моћнији антипролиферативни агенс према ћелијској линији MG-63.

Имајући у виду да алкална фосфатаза и екто-нуклеотидазе имају значајну улогу у канцерогенези, *Iqbal* и *Kortz* са сарадницима (235) истраживали су инхибиторни потенцијал седам структурно различитих полиоксоволфрамата на активност ових ензима, након доказивања да ова једињења (у распону концентрација 100 nM - 100 μM) испољавају значајан, али и селективан, антипролиферативни потенцијал према ћелијама хуманог карцинома плућа (H157). Добијени резултати показују да сви испитивани ПОМ имају способност да инхибирају активности алкалне фосфатазе и екто-нуклеотидаза, што је предложено као могући механизам њиховог антитуморског деловања. Након овог истраживања, *Müller* и сарадници (236) су у свом истраживању такође потврдили да одређени полиоксофолфрамат испољавају снажно инхибиторно дејство према хуманим екто-нуклеотидазама. Они су показали да димер *Weakley* типа $[\text{Co}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$ изузетно снажно инхибира активност изоензима 1, 2 и 3 ектонуклеозид-трифосфат дифосфохидролазе (NTPDазе), и то у изразито ниским наномоларним концентрацијама, те се ово једињење данас сматра најјачим инхибитором NTPDазе.

1.5.4. Антидијабетичка активност полиоксометалата

Антидијабетичка активност ПОМ позната је више од две деценије, али је релативно мали број студија у којима су документовани и расветљени механизми њиховог антидијабетичког деловања (202, 215). Подаци из литературе показују да ПОМ: побољшавају секрецију инсулина у β -ћелијама Лангерхансових острваца панкреаса, поспешују метаболизам глукозе и липида и поправљају ћелијску осетљивост на дејство инсулина.

У *in vivo* студији *Nomiya* и сарадника (206) испитиван је и упоређиван утицај структурно различитих ПОМ *Keggin* и *Dawson* типа на снижавање хипергликемије код мишева са експерименталним ДМ изазваним једнократним давањем стрептозотоцина. Добијени резултати показују да примена оралних раствора ПОМ *Dawson* типа $[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]^6$,

као и ПОМ са ванадијумом $[P_2W_{17}VO_{62}]^{7-}$ и $[P_2W_{15}V_3O_{62}]^{9-}$, за разлику од ПОМ *Keggin* типа, доводи до значајног смањења хипергликемије код дијабетичких мишева, што је ауторе навело на закључак да антидијабетичка активност ових комплексних неорганских једињења углавном зависи од геометријског облика, а не од врсте (не)метала у комплексу.

У циљу истраживања механизма антихипергликемијског деловања ПОМ, у *in vitro* студији *Pereira* и сарадника (237) анализиран је утицај декаванадата $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ на преузимање глукозе у изолованим адипоцитима пацова, након што је показано да испитивани ПОМ има могућност да снизи хипергликемију код дијабетичких мишева. Резултати показују да испитивани ПОМ у концентрацији од 1 mmol/L повећава за око 6 пута преузимање глукозе у адипоцитима пацова у односу на базални ниво. Поред тога, примећено је и да заједничка инкубација декаванадата и инсулина појачава преузимање глукозе у адипоцитима пацова за око 50%, у односу на самостално дејство инсулина, као и да присуство декаванадата снижава инсулином стимулирано преузимање глукозе које је узроковано применом дексаметазона. Све ово наводи на закључак да декаванадат, као представник ПОМ, снижава хипергликемију код дијабетичких животиња тако што испољава „инсулину сличан ефекат“. Сматра се да услед оксидације декаванадата долази до настанка пероксованадата, који има способност да инхибира протеинску тирозинску фосфатазу, чиме се покреће транслокација глюкозних транспортера у ћелијску мембрану и повећава преузимање глукозе (238, 239).

Слични ефекти, у смислу инхибиције липолизе и појачаног преузимања глукозе у хуманим адипоцитима, примећени су и код примене бензил амонијумове соли декаванадата (240). Додатно, показано је да хибридни молекул метформина и декаванадата значајније снижава хипергликемију и хиперлипидемију код животиња са експерименталним ДМ типа 1 и 2 у односу на групу животиња третирану само метформином (205).

У *in vitro* и *in vivo* студији *Ilyas* и сарадника (241) истраживано је антихипергликемијско дејство седам структурно различитих полиоксоволфрамата. Добијени резултати показују да је међу испитиваним полиоксоволфраматима $[H_2W_{12}O_{40}]^{6-}$ најефикаснији у снижавању хипергликемије, односно 8 h након његове примене долази до нормализације концентрације глукозе у крви мишева са експерименталним ДМ изазваним једнократном применом алоксана.

Balici и сарадници су у *in vivo* студији (204) показали да $[(VO)_3(SbW_9O_{33})_2]^{12-}$ и $[Na(n-BuSn)_3Sb_9W_{21}O_{86}]^{9-}$ испољавају значајан антихипергликемијски ефекат код пацова са експерименталним ДМ изазваним једнократним давањем стрептозотина. Тронедељна перорална примена испитиваних ПОМ у кумулативној дози од 4 mg/kg значајно снижава хипергликемију код дијабетичких пацова, и то $[(VO)_3(SbW_9O_{33})_2]^{12-}$ за око 30,9% и $[Na(n-BuSn)_3Sb_9W_{21}O_{86}]^{9-}$ за око 35,7% у поређењу са контролном нормогликемијском групом. Показано је да примена испитиваних једињења не доводи до хипогликемије код контролних нормогликемијских пацова. Коришћењем трансмисионе електронске микроскопије нађено је да примена испитиваних једињења значајно смањује апоптозу β -ћелија панкреаса, али и повећава број и величину секреторних гранула инсулина у цитоплазми дијабетичких животиња, што може бити један од механизма антидијабетичког дејства испитиваних ПОМ.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

- I Испитивање утицаја хетерополиволфрамата $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 31\text{H}_2\text{O}$, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\text{K}_{14}[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 22\text{H}_2\text{O} \cdot 6\text{KCl}$, $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ на снижавање хипергликемије код пацова са експерименталним дијабетесом изазваним једнократним убризгавањем раствора стрептозотоцина.
- II Испитивање хепато- и нефротоксичности $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ код здравих пацова праћењем:
1. биохемијских параметара функције јетре у серуму (концентрације укупних протеина и албумина, као и активности аспартат аминотрансферазе /AST/, аланин аминотрансферазе /ALT/ и алкалне фосфатазе /ALP/);
 2. биохемијских параметара функције бубрега у серуму (концентрације урее, креатинина и мокраћне киселине);
 3. хистопатолошких промена на јетри и бубрезима коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.
- III Расветљавање могућих механизма деловања $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, који учествују у снижавању хипергликемије и ублажавању дијабетичких компликација праћењем:
1. концентрације глукозе, инсулина, хемоглобина и HbA_{1c} у крви;
 2. инсулинске резистенције израчунавањем НОМА-IR индекса;
 3. концентрације електролита у крви (натријума, калијума, хлорида, неорганских фосфата, као укупног и јонизованог калцијума и магнезијума);
 4. параметара инфламације (серумске концентрације феритина и С-реактивног протеина /CRP/);
 5. параметара липидног статуса (серумске концентрације укупног холестерола, LDL-холестерола, HDL-холестерола, укупних триглицерида и аполипопротеина А1 /Аро-А1/ и В /Аро-В/);
 6. биохемијских параметара функције јетре (серумске концентрације укупних протеина и албумина, као и серумске активности AST, ALT и ALP);
 7. биохемијских параметара функције бубрега (серумске концентрације урее, креатинина, мокраћне киселине, липокалина повезаним са неутрофилном желатиназом /енг. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*; NGAL/ и молекула оштећења бубрега-1 /енг. *Kidney Injury Molecule-1*; KIM-1/);
 8. параметара оксидативног стреса (концентрације супероксид дизмутаза /SOD/, глутатион пероксидаза /GPx/ и малондиалдехида /MDA/) у хомогенатима јетре, срца и бубрега, као и у синаптозомима;
 9. активности ензима ацетилхолинестеразе (AChE), Na^+/K^+ -АТРаза и *ecto*-АТРаза у синаптозомима изолованим из целих мозгова пацова;
 10. хистопатолошких промена на панкреасу, јетри и бубрезима коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Синтеза испитиваних хетерополиволфрамата

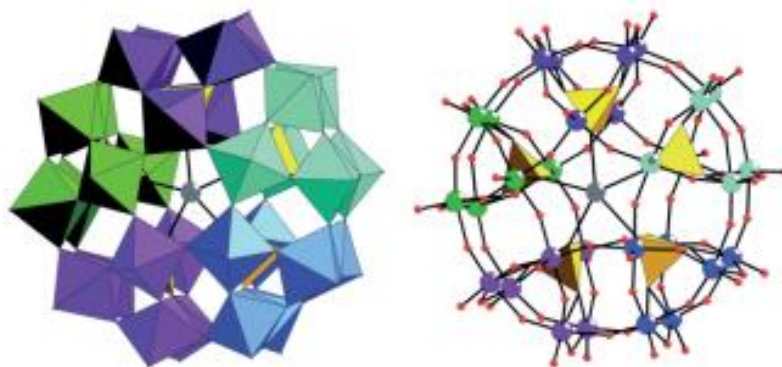
Испитивани хетерополиволфраматаи синтетисани су према претходно описаним процедурама (242) у лабораторији проф. др *Ulrich Kortz* (*Department of Life Sciences and Chemistry, Jacobs University*, Немачка).

3.1.1. $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]\cdot 31\text{H}_2\text{O}$

За синтезу полианјонског хетерополиволфрамата $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (Слика 12), раствор H_3PO_4 (13 mL; 85%) укапаван је у раствор Na_2WO_4 (15 mL; 3,34 mol/L). Безбојна смеша мешана је 2 сата на температури од 120°C . Добијени раствор жуте боје охлађен је до собне температуре, а затим је исталожен у прах беле боје (242).

3.1.2. $\text{K}_{14}[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]\cdot 22\text{H}_2\text{O}\cdot 6\text{KCl}$

За синтезу полианјонског хетерополиволфрамата $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (Слика 12), најпре је раствор $\text{K}_{11}\text{Na}_3[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]\cdot 29\text{H}_2\text{O}$ (0,500 g; 0,059 mmol) растворен у HNO_3 (8 mL). Смеша је затим загревана на температури од 60°C . Након тога, у смешу је укапаван водени раствор AgNO_3 . Добијени замућен раствор мешан је 2 сата на температури од 120°C , а затим је охлађен на собној температури. Након додатка KCl (1 g) у охлађени раствор, исталожен је прах беле боје (242).



Слика 12. Полиедарски (лево) и „ball-and-stick“ (десно) молекулски модели синтетисаних хетерополиволфрамата (преузето из референце бр. 165). Сива лоптица у центру молекула означава Na^+ у $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и Ag^+ у $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$. Сви октаедри приказани у пет различитих боја представљају WO_6 , док тетраеди приказани жутом бојом означавају PO_4 . У сваком PW_6 градивном блоку, шест WO_6 октаедара приказана су истом бојом како би се нагласила структура $(\text{PW}_6)_5$ омотача

3.2. Експерименталне животиње

У огледима су коришћени албино пацови мушког пола, соја *Wistar*, стари 6 недеља и телесне масе 250-300 g, набављени од Управе за војно здравство (Војномедицинска академија, Београд, Република Србија). Животиње су чуване у поликарбонским кавезима (48 × 37,5 × 21 cm) у групама од по 3 до 4 животиње под стандардним условима: температура 23 ± 2 °C, релативна влажност ваздуха 65 ± 5 % и дефинисан дневно-ноћни циклус са сменом на 12:00 h. Све животиње током извођења експеримента имале су *ad libitum* приступ води и стандардној лабораторијској храни за глодаре (Ветеринарски завод, Суботица, Република Србија). Сви огледи у оквиру ове дисертације урађени су у складу са начелима Европске комисије за заштиту животиња (2010/63/EU) и одобрени су од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Медицинског факултета Универзитета у Београду (Мишљење број 7089/2 од 15.04.2021. године), уз финалну сагласност Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије (Решење број 323-07-9561/2021-05 од 07.10.2021. године).

3.3. Експериментални модел дијабетеса

Експериментални модел дијабетеса код насумично одабраних пацова изазван је стрептозотоцином раствореним у свежем натријум-цитратном пуферу (0,1 mol/L; pH 4,5) (204). Након претходног двадесетчетворочасовног гладовања, експерименталним пацовима убризган је једнократно интраперитонеално раствор стрептозотоцина у дози од 50 mg/kg. Развој дијабетеса потврђен је коришћењем *Bayer Contour Plus* глукометра (Леверкузен, Немачка) за одређивање гликемије у периферној венској крви, узоркованој из репне вене пацова 96 h након примене стрептозотоцина. Вредност гликемије од 12 mmol/L узета је као гранична вредност за постављање дијагнозе дијабетеса код експерименталних животиња (243).

3.4. Експериментални протокол

Фармаколошка и токсиколошка својства одабраних хетерополиволфрамата као могућих антидијабетика испитивана су коришћењем три експериментална модела.

1. Први експериментални модел била је *screening* студија у којој је испитиван утицај синтетисаних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ на снижавање хипергликемије у експерименталном моделу дијабетеса код пацова (Слика 13). Доза хетерополиволфрамата од 20 mg/kg која се показала као најефикаснија у снижавању хипергликемије, коришћена је за даља токсиколошка и фармаколошка испитивања.

2. Пошто токсиколошка истраживања у открићу нових лекова играју значајну улогу, други експериментални модел служио је за испитавање хепато- и нефротоксичности одабраних хетерополиволфрамата, јер се већина супстанци најчешће елиминише путем јетре и/или бубрега (Слика 14).

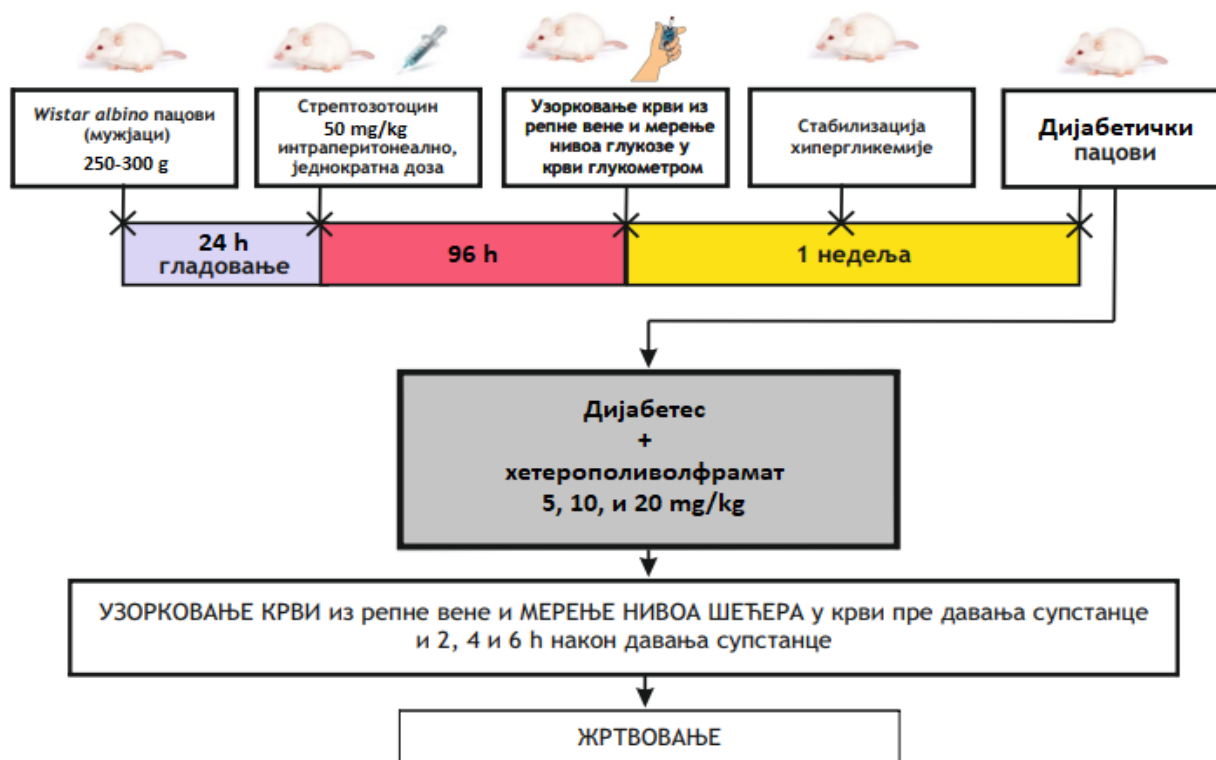
3. Како биолошки механизми дејства ПОМ још увек нису разјашњени, трећи експериментални модел коришћен је са циљем да се расветле могући механизми антидијабетичког деловања хетерополиволфрамата, који доводе до снижавања хипергликемије и ублажавања дијабетичких компликација (Слика 15).

3.4.1. Експериментални протокол испитивања утицаја $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ у растућим дозама (5, 10 и 20 mg/kg) на снижавање хипергликемије

Након седам дана од изазивања дијабетеса (Слика 13), колико је било потребно да се хипергликемија устали, дијабетички пацови су насумично били подељени у шест група од по пет ($n = 5$) пацова:

- група 1 — дијабетички пацови третирани $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у дози од 5 mg/kg;
- група 2 — дијабетички пацови третирани $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у дози од 10 mg/kg;
- група 3 — дијабетички пацови третирани $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у дози од 20 mg/kg;
- група 4 — дијабетички пацови третирани $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ у дози од 5 mg/kg;
- група 5 — дијабетички пацови третирани $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ у дози од 10 mg/kg;
- група 6 — дијабетички пацови третирани $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ у дози од 20 mg/kg.

За потребе експеримента $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ су били растворени у свежем 0,9 % раствору NaCl. Након растварања, дијабетички пацови су добијали одговарајући раствор хетерополиволфрамата, интраперитонеално једнократно. Коришћењем *Bayer Contour Plus* глукометра (Леверкузен, Немачка), гликемија је одређивана у периферној венској крви узоркованој из репне вене пацова пре и (2, 4 и 6 h) након примене одговарајућег раствора хетерополиволфрамата. Након тога, животиње су жртвоване предозирањем анестетиком – једнократним интраперитонеалним давањем 1 mL 3% тиопентал-натријума.



Слика 13. Схематски приказ екперименталног протокола испитивања утицаја {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀} на снижавање хипергликемије

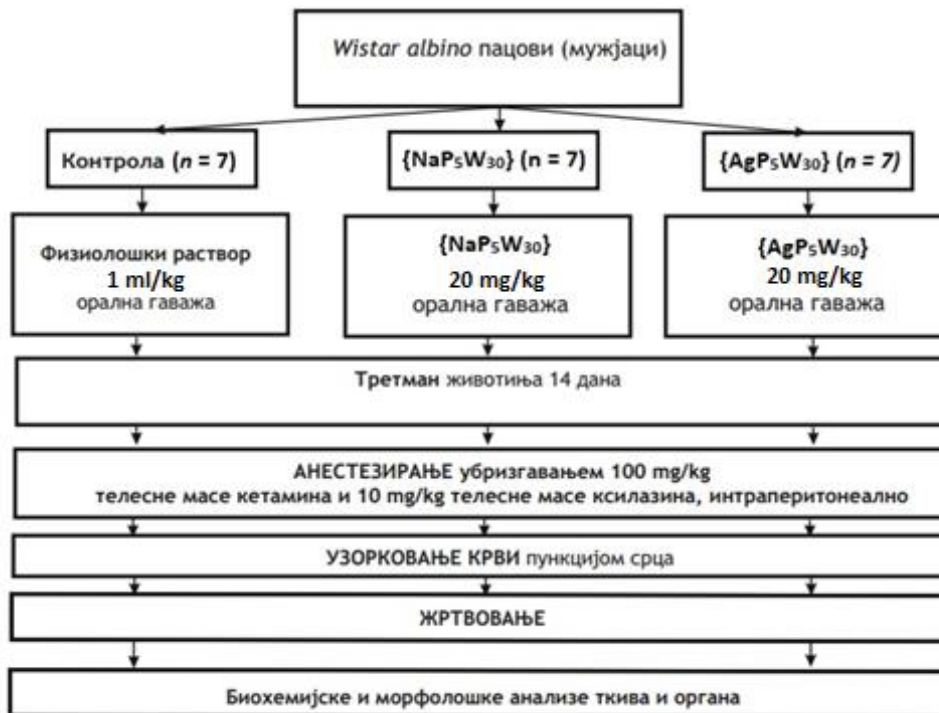
3.4.2. Експериментални протокол испитивања хепато- и нефротоксичности {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀}

Огледне животиње коришћене током овог дела експеримента (Слика 14) биле су насумично подељене у три групе од по седам ($n = 7$) пацова:

- група 7 — здрави пацови перорално третирани 0,9% раствором NaCl (*per os*) током две недеље;
- група 8 — здрави пацови перорално третирани {NaP₅W₃₀} у дози од 20 mg/kg током две недеље;
- група 9 — здрави пацови перорално третирани {AgP₅W₃₀} у дози од 20 mg/kg током две недеље.

За потребе експеримента {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀} били су растворени у свежем 0,9% раствору NaCl. Током две недеље, животиње су свакодневно и перорално добијале одговарајући хетерополиволфрамаат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg. Дневни унос хране и воде, као и телесне масе животиња одређивани су свакодневно. Након две недеље (временски период за испитивање акутне оралне токсичности према протоколу — *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*), животиње су биле уведене у дубоку анестезију једнократним интраперитонеалним убризгавањем кетамина (100 mg/kg) и ксилазина (10 mg/kg). Након увођења пацова у анестезију, крв је узоркована директно из срчаних комора, а затим је држана у епендорф тубама (1,5 mL) током два сата на

собној температури како би се крв згрушала. После згрушавања, узорци су центрифугирани 10 минута на $30000 \times g$ на 4°C и издвојени серуми чувани су на температури од -80°C . У узорцима серума одређиване су концентрације глукозе и биохемијски параметри функције јетре (концентрације укупних протеина и албумина и активности AST, ALT и ALP) и бубрега (концентрације уреје, креатинина и мокраћне киселине). Животиње, које су претходно уведене у дубоку анестезију, биле су жртвоване предозирањем анестетиком – једнократним интраперитонеалним давањем 1 mL 3% тиопентал-натријума. Ткива бубрега и јетре пажљиво су била изолована за даља патохистопатолошка испитивања коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.



Слика 14. Схематски приказ екперименталног протокола испитивања хепато- и нефротоксичности $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$

3.4.3. Експериментални протокол испитивања могућих механизма антидијабетичког деловања хетерополиволфрамата

Циљ ово експерименталног протокола био је да се испитају могући механизми који учествују у снижавању хипергликемије и ублажавању дијабетичких компликација. Животиње коришћене током овог дела експеримената (Слика 15) биле су насумично подељене у четири групе од по шест ($n = 6$) пацова:

- група 10 — нормогликемични пацови перорално третирани 0,9% раствором NaCl током три недеље,
- група 11 — дијабетички пацови перорално третирани 0,9% раствором NaCl током три недеље,

- група 12 — дијабетички пацови перорално третирани {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током три недеље и
- група 13 — дијабетички пацови субкутано (sc) третирани хуманим дугоделујућим инсулином (*Insulatard, NovoNordisk*, Шартр, Француска) у појединачној дневној дози од 6 IJ током три недеље.

Током три недеље, животиње су свакодневно перорално добијале хетерополиволфрамат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg. Пре давања, хетерополиволфрамат је био растворен у 0,9% раствору NaCl. Доза инсулина одређена је на основу доступне литературе (244). Дневни унос хране и воде, као и телесне масе животиња праћени су свакодневно. На крају експерименталног периода, израчунат је принос телене масе животиња према формули:

$$\left[\frac{\text{маса животиње на крају експеримента} - \text{маса животиње првог дана експеримента}}{\text{маса животиње првог дана експеримента}} \right] \times 100.$$

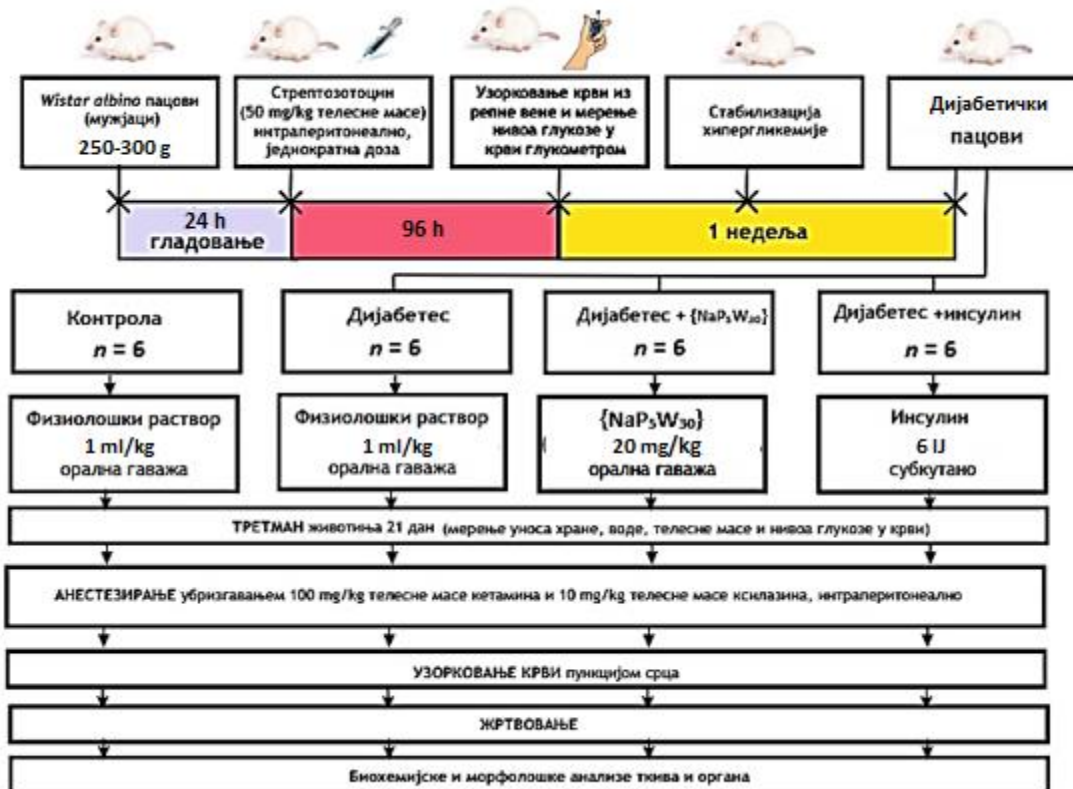
Коришћењем *Bayer Contour Plus* глукометра (Леверкузен, Немачка), сваког 7. дана мерена је гликемија у периферној венској крви, узоркованој из репне вене пацова. Након три недеље, животиње су биле уведене у дубоку анестезију једнократним интраперитонеалним убризгавањем кетамина (100 mg/kg) и ксилазина (10 mg/kg) у циљу узорковања крви из срчаних комора. У узорцима некоагулисане пуне крви мерени су нивои укупног Hb, HbA_{1c}, јонизованог калцијума и јонизованог магнезијума, док су у серуму мерене концентрације инсулина, електролита (натријум, калијум, хлориди, неоргански фосфат, укупни калцијум и укупни магнезијум), параметара инфламације (феритин и CRP), липидних параметара (укупни холестерол, HDL-холестерол, LDL-холестерол, Apo-A1, Apo-B и укупни триглицериди), биохемијских параметара функције јетре (укупни протеин и албумини и активности AST, ALT и ALP) и биохемијских параметара функције бубрега (уреа, креатинин, мокраћна киселина, NGAL и KIM-1). Добијене вредности серумске концентрације инсулина даље су искоришћене за израчунавање степена инсулинске резистенције према формули:

$$\text{НОМА-IR} = \left[\frac{\text{инсулинемија (mIU/L)} \times \text{гликемија (mmol/L)}}{22,5} \right].$$

Животиње, које су претходно уведене у дубоку анестезију, биле су жртвоване путем предозирања анестетиком – једнократним интраперитонеалним давањем 1 mL 3% тиопентал-натријума. Одмах по жртвовању експерименталних животиња, измерене су масе срца, јетре и бубрега и израчуната је релативна маса ових органа коришћењем формуле:

$$\text{релативна маса (\%)} = \left(\frac{\text{маса органа (g)}}{\text{коначна маса животиње (g)}} \right) \times 100.$$

У синаптозомима, који су били изоловани из целих мозгава, одређиване су активности AChE, Na⁺/K⁺-ATPaze и *ecto*-ATPaza и параметри оксидативног стреса (концентрације SOD, GPx и MDA). Наведени параметри оксидативног стреса одређивани су и у хомогенату јетре, срца и бубрега. Додатно, ткива панкреаса, јетре и бубрега била су хистопатолошки анализирана коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.



Слика 15. Схематски приказ експерименталног протокола испитивања могућих механизма антидијабетичког деловања $\{NaP_5W_{30}\}$ и $\{AgP_5W_{30}\}$

3.5. Припрема хомогената ткива срца, јетре и бубрега

Делови ткива срца, јетре и бубрега хомогенизовани су са девет пута већом запремином 0,1 mol/L фосфатног пуфера (pH 7,4) који садржи 1,15% KCl. Добијени хомогенати подељени су у порције које су тренутно замрзаване у течном азоту, након чега су чуване на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ за даље анализе.

3.6. Изоловање синаптозома из мозга пацова

Изоловани цели мозгови су испрани, а затим хомогенизовани у 10 mL хладне пуферисане 0,32 mol/L сахарозе, pH 7,4, помоћу стакленог хомогенизера са тефлонским клипом. Клип је причвршћен на мотор, док је брзина хомогенизације 900 rpm са двадесет завеслаја тучком. Добијени хомогенат ткива је центрифугиран 10 минута на $1000 \times g$ у центрифуги *Sorvall (Fisher Scientific, Волтам, САД)*, чиме се таложе једра. Након одливања супернатанта, талог је испран са 10 mL хладне пуферисане 0,32 mol/L сахарозе и центрифугиран на исти начин. Супернатанти, који садрже синаптозома (пресинаптичке нервне завршетке), се споје и центрифугирају 20 минута на $10000 \times g$ на $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ у ултрацентрифуги *Beckman L7-55 (Beckman Coulter Inc, Бреја, Калифорнија, САД)*. Добијени талог представља непречишћену синаптозомалну фракцију у којој се налазе синаптозома, митохондрије и мембрански фрагменти (245, 246). Талог непречишћених синаптозома је

ресуспендован у 3 mL хладне пуферисане 0,32 mol/L сахарозе и чуван на -80 °C за даља испитивања.

3.7. Одређивање биохемијских параметара функције јетре

3.7.1. Одређивање активности аспартат аминотрансферазе

Активности AST одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору Olympus AU2700 (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

AST катализује реакцију преноса аминок-групе са L-аспартата на α -оксоглутарат, при чему настају L-глутамат и оксалацетат. Оксалацетат се даље, у присуству коензима NADH уз каталитичко дејство малат-дехидрогеназе, редукује до L-малата. Промена апсорбанције на $\lambda = 340 \text{ nm}$ у времену директно је пропорционална активности AST у узорку.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 80 mmol/L TRIS пуфер pH 7,65
- $\geq 0,9 \text{ kU/L}$ лактат дехидрогеназа
- 240 mmol/L L-аспартат
- 12 mmol/L α -оксоглутарат
- 0,20 mmol/L NADH
- $\geq 0,6 \text{ kU/L}$ малат-дехидрогеназа
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизирани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 1 дан на 15-25 °C, а 30 дана на 2-8 °C. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 3-1000 IU/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 1 IU/L. Поновљивост методе је до 5% коефицијента варијације (Кв), док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.7.2. Одређивање активности аланин аминотрансферазе

Активности ALT одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору Olympus AU2700 (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

ALT катализује реакцију преноса аминок-групе са L-аланина на α -оксоглутарат при чему настају L-глутамат и пируват. Пируват се даље, у присуству коензима NADH уз каталитичко дејство лактат-дехидрогеназе, редукује до лактата. Промена апсорбанције на $\lambda = 340 \text{ nm}$ у времену директно је пропорционална активности AST у узорку.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 100 mmol/L TRIS пуфер рН 7,13
- $\geq 1,8 \text{ kU/L}$ лактат дехидрогеназа
- 500 mmol/L L-аланин
- 12 mmol/L α -оксоглутарат
- 0,20 mmol/L NADH
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 3 дана на 2-8 °C. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 3-500 IU/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 1 IU/L. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.7.3. Одређивање активности алкалне фосфатазе

Активности ALP у серуму одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

ALP, у базној средини 2-амино-2-метил-1-пропранолола, катализује реакцију хидролизе 4-нитрофенилфосфата (pNP) до 4-нитрофенола. Активност ALP се одређује бихроматским мерењем промена апсорбанције жуто обојеног анијона 4-нитрофенола на $\lambda = 410/480 \text{ nm}$.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 350 mmol/L 2-амино-2-метил-1-пропранолол рН 10,4
- 16 mmol/L pNP
- 2 mmol/L хидроксил етилен диамин триацетилна киселина (HEDTA)
- 1 mmol/L цинк(II)-сулфат
- 2 mmol/L магнезијум(II)-ацетат
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолитовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 7 дана на 2-25 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 3-1000 IU/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 1 IU/L. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.7.4. Одређивање концентрације укупних протеина

Концентрације укупних протеина одређиване су биурет колориметријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Хамбург, Немачка)* коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Укупни протеини реагују са бакар(II)-јонима формирајући љубичасто обојено комплексно једињење. Промена апсорбанција на $\lambda = 540/660 \text{ nm}$ у времену директно је пропорционална концентрацији укупних протеина у узорку.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 200 mmol/L натријум-хидроксид
- 32 mmol/L калијум-натријум-тартарат
- 18,8 mmol/L бакар(II)-сулфат
- 30 mmol/L калијум-јодид
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолитовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 7 дана на 15-25 °С, а 30 дана на 2-8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 30-120 g/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,5 g/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 4% Кв.

3.7.5. Одређивање концентрације албумина

Концентрације албумина одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Хамбург, Немачка)* коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Албумин реагује у киселој средини са бојом бром-крезол-зелено (BCG) градећи једињење зелене боје. Промена апсорбанција на $\lambda = 600/800 \text{ nm}$ у времену директно је пропорционална концентрацији албумина у узорку.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 100 mmol/L сукцинатни пуфер рН 4,2
- 2 mmol/L BCG
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 7 дана на 15-25 °С, а 30 дана на 2-8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 15-60 g/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,6 g/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 3% Кв.

3.8. Одређивање биохемијских параметара функције бубрега

3.8.1. Одређивање концентрације урее

Концентрације урее одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Каталитичким дејством уреазе, уреа се хидролизује до амонијака и угљеник(IV)-оксида. Настали амонијак, у присуству глутамат-дехидрогеназе (GLDH), са α -кетоглутаратом и NADH гради глутамат. Промена апсорбанција на $\lambda = 340 \text{ nm}$ у времену директно је пропорционална концентрацији урее.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 100 mmol/L TRIS пуфер
- $\geq 0,26 \text{ mmol/L}$ NADH
- 100 mmol/L тетранатријум-дифосфат
- 2,65 mmol/L етилен диамин тетра сирћетна киселина (EDTA)
- α -кетоглутарат
- $\geq 9,8 \text{ mmol/L}$ уреазе
- $\geq 17,76 \text{ KU/L}$ ADP
- $\geq 0,16 \text{ KU/L}$ GLDH (говеђа јетра)
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизирани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је неколико дана на 2-8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 0,7-46,0 mmol/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,1 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.8.2. Одређивање концентрације креатинина

Концентрације креатинина одређиване су колориметријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Креатинин у алкалној средини реагује са пикратом градећи једињење жуто-наранџасте боје. Интензитет промене апсорбација измерен на $\lambda = 600/800$ nm пропорционалан је концентрацији креатинина.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 120 mmol/L натријум-хидроксид
- 2,9 mmol/L пикринска киселина
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизирани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 7 дана на 2-8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 17-2210 $\mu\text{mol/L}$, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 4 $\mu\text{mol/L}$. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 6% Кв.

3.8.3. Одређивање концентрације мокраћне киселине

Концентрације мокраћне киселине одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Каталитичким дејством уриказе мокраћна киселина се оксидује до алантоина уз настајање хидроген-пероксида. Издвојени хидроген-пероксид се укључује у реакцију оксидативног купловања између реагенса за купловање — 4-аминоантипирина (4-ААР) и хидроген донор реагенса — динатријумове соли *N,N*-бис(4-сулфобутил)-3,5-диметиланилин (MADB). Интензитет боје насталог хромофора пропорционалан је концентрацији мокраћне киселине.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 42 mmol/L фосфатни пуфер рН 7,5
- $\geq 5,9$ kU/L пероксидаза
- 0,15 mmol/L MADB
- 0,30 mmol/L 4-аминофеназон
- 0,44 mmol/L EDTA
- ≥ 250 IU/L уриказа
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 3-5 дана на 2-8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 80-1770 $\mu\text{mol/L}$, а за више вредности препоручује се разблажење узорка серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 4 $\mu\text{mol/L}$. Поновљивост методе је до 2% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 3% Кв.

3.8.4. Одређивање концентрације молекула оштећења бубрега-1 и липокалина повезаним са неутрофилном желатиназом

Концентрације KIM-1 и NGAL одређиване су ELISA „сендвич“ тестом коришћењем комерцијалних ELISA китова фирме *Cusabio* (Хјустон, САД). У ту сврху примењени су: RT2600-С аутомат за испирање микротитар плоча, RT 6100 аутоматски читач микротитар плоча и PC софтвер за квантификацију резултата, произвођача *Rayto (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd.,* Кина). Поступак извођења ELISA методе обављен је употребом комерцијалних реагенса и према упутствима произвођача. Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Такође, у процесу калибрације коришћен је стандардни калибратор сет, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.9. Одређивање концентрације инсулина

Концентрације инсулина одређиване су ELISA „сендвич“ тестом коришћењем комерцијалних ELISA китова фирме *Abcam* (Кембриџ, Велика Британија). У ту сврху примењени су: RT2600-С аутомат за испирање микротитар плоча, RT 6100 аутоматски читач микротитар плоча и РС софтвер за квантификацију резултата, произвођача *Rayto (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd., Кина)*. Поступак извођења ELISA методе обављен је употребом комерцијалних реагенса и према упутствима произвођача. Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. У процесу калибрације коришћен је стандардни калибратор сет, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума. Најнижи ниво детекције је 0,15 $\mu\text{U/mL}$. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.10. Одређивање нивоа укупног и гликозилираног хемоглобина A_{1c}

Нивои укупног Hb и HbA_{1c} одређивани су латекс имунотурбидиметријском методом на *Architect ci8200* анализатору (*Abbott Diagnostics*, Келн, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Укупни Hb и HbA_{1c} имају неспецифични адсорпциони ниво за латекс честице. Када се мишја анти-хумани HbA_{1c} моноклонска антитета додају, формира се латекс- HbA_{1c} -антитело комплекс. Аглутинација се одиграва када козја анти-мишји IgG поликлонска антитета реагују са моноклонским антителом. Интензитет аглутинације је пропорционалан количини адсорбованог HbA_{1c} на латекс честице и мерљив је променом апсорбанције. Вредност HbA_{1c} се израчунава из калибрационе криве.

Састав комерцијалног тест реагенса

HbA_{1c} реагенс 1

- мишја анти-хумани HbA_{1c} унакрсно везана антитета
- говеђи серум албумин
- пуфер рН 8,1
- сурфактант — 0,6% нејонизовани детерцент
- стабилизатори и конзерванси

HbA_{1c} реагенс 2

- HbA_{1c} хаптен
- говеђи серум албумин
- пуфер рН 2,0
- сурфактант
- стабилизатори и конзерванси

Укупни Hb реагенс 1

- 0,4% натријум-хидроксид рН 13,0
- сурфактант — 0,7% нејонизовани детерцент
- стабилизатори и конзерванси

Нивои укупног Нб и Нб_{A1c} одређивани су узорцима некоагулисане пуне крви експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак је стабилан 7 дана на 25 °С, а 2 недеље уколико се чува на 2–8 °С. У процесу калибрације коришћен је Нб_{A1c} калибратор сет, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци крви.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 2,6-14,0%, а за више вредности не препоручује се разблажење узорака, већ се издаје вредност >14,5%. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 4% Кв.

3.11. Одређивање концентрације електролита

3.11.1. Одређивање концентрације јона натријума, калијума и хлорида

Концентрације јона натријума, калијума и хлорида одређиване су методом индиректне потенциометрије на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем јон-селективних електрода и комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Одређује се разлика електрохемијског потенцијала између јон-селективне електроде и референтне електроде; добијена разлика директно је пропорционална концентрацији одређиваних јона у узорку.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 0,1 mmol/L триетаноламин пуфер рН 7,5
- 1 mol/L и 3,3 mol/L калијум-хлорид
- сребро-хлорид
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолитизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума за јоне натријума и калијума стабилан је најмање 7 дана на 2-8 °С, а за јоне хлорида до 7 дана на 2-30 °С. У процесу калибрације коришћени су стандарди, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 50-200 mmol/L за јоне натријума, 1-10 mmol/L за јоне калијума и 50-200 mmol/L за јоне хлорида, а за вредности преко препоручује се разблажење узорака серума са дејонизованом водом. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.11.2. Одређивање концентрације укупног калцијума

Концентрације укупног калцијума одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Принцип се заснива на реакцији јона калцијума у киселој средини са Арсеназо III (2,2'-[1,8-дихидрокси-3,6-дисулфонафтилен-2,7-бисазо]-бисбензенарсонична киселина) при чему се формира интензиван љубичаст комплекс, бихроматски се мери апсорбанција Са-Арсеназо III комплекса на $\lambda = 660/700 \text{ nm}$.

Састав комерцијалног тест реагенса

- имидазол рН 6,9
- 0,1-0,2% Арсеназо III
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 7 дана на 15-25 °С, а 3 недеље на 2-8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 1–5 mmol/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,01 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.11.3. Одређивање концентрације укупног магнезијума

Концентрације укупног магнезијума одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Принцип се заснива на директној методи у којој јони магнезијума, у јако базној средини, формирају обојено комплексно једињење са ксилидил-плавим комплексирајућим реагенсом. Мери се апсорбанција настале боје бихроматски на $\lambda = 520/800 \text{ nm}$ и пропорционална је концентрацији магнезијума у узорку. Интерференција која потиче од присуства калцијума елиминише се додатком гликол-етар-диамин-*N,N,N',N'*-тетрасирћетне киселине (GEDTA).

Састав комерцијалног тест реагенса

- 450 mmol/L аминок-п капроинска киселина

- 100 mmol/L TRIS пуфер
- 0,12 mmol/L GEDTA
- 0,18 mmol/L ксилидил-плаво
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 7 дана на 15-25 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 0,2–3,3 mmol/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,01 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.11.4. Одређивање концентрације неорганског фосфата

Концентрације неорганског фосфата одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Хамбург, Немачка)* коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

У киселом медијуму, неоргански фосфат гради са амонијум-молибдатом хетерополикисели комплекс. Додати детерџенти спречавају преципитацију протеина и стабилизују систем. Апсорбанција на $\lambda = 340/380 \text{ nm}$ директно је пропорционална концентрацији неорганског фосфата у узорку.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 0,35 mmol/L амонијум-молибдат
- 200 mmol/L сумпорна киселина
- 50 mmol/L глицин
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 1 дан на 15-25 °С, а 4 дана уколико се чува на 2–8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 0,32–6,40 mmol/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,10 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.11.5. Одређивање концентрације јонизованог калцијума и јонизованог магнезијума

Концентрације јонизованог калцијума и јонизованог магнезијума одређиване су у узорцима некоагулисане пуне крви на аутоматском гасном анализатору *Profile Prime Plus® Critical Care Analyzer* (Nova Biomedical Co, Волтам, Масачусетс, САД).

3.12. Одређивање параметара липидног састава

3.12.1. Одређивање концентрације укупног холестерола

Концентрације укупног холестерола одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Diagnostic BioSystem* (Плезантон, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Принцип теста се заснива на реакцији хидролизе естара холестерола (на С-3) до холестерола и масних киселина, под дејством холестеролестеразе (CHE). Слободан холестерол и холестерол ослобођен из естара оксидују се кисеоником, под утицајем холестеролоксидазе (CHOD), до холест-4-ен-3-он уз издвајање хидроген-пероксида. Оксидативном кондензацијом хидроген донора – фенола са реагенсом за купловање - 4-амино антипирином (4-АА) и хидроген-пероксидом, у присуству пероксидазе (POD), настаје хромоген хинонимин са максимумом апсорбанције на $\lambda = 500 \text{ nm}$.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 35 mmol/L пипес
- 0,5 mmol/L натријум-холат
- 28 mmol/L фенол
- > 0,2 IU/mL CHE
- > 0,1 IU/mL CHOD
- > 0,8 IU/mL POD
- 0,5 mmol/L 4-АА рН 7,0
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолитизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 7 дана на 2-8 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 0,1– 26,0 mmol/L, а за вредности преко препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,109 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.12.2. Одређивање концентрације холестерола у липопротеинима мале густине

Концентрације LDL-холестерола одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Вуоаналитика* (Београд, Р. Србија).

Принцип методе

Метода је заснована на директном одређивању LDL-холестерола комбинацијом одговарајућег сурфактанта, органских и неорганских фосфорних једињења која инхибирају реакцију са холестеролом из HDL, липопротеини веома ниске густине (VLDL) и хиломикрона. У првој реакцији холестерол из HDL, VLDL и хиломикрона је блокиран наведеним супстанцама. У другој реакцији додатком CHE и CHOD, а затим купловањем са хромогеном, у присуству POD одређује се само холестерол из LDL.

Састав комерцијалног тест реагенса

Реагенс 1

- натријумова со N-(2-хидрокси-3-сулфопропил)-3,5-диметоксоанилин (HDAOS)
- аскорбат-оксидаза
- POD
- стабилизатори и конзерванси

Реагенс 2

- 380 IU CHOD
- 380 IU CHE
- 1 mmol/L 4-AA
- NaN₃
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолитизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 5 дана на 2-8 °C. У процесу калибрације коришћени су HDL/LDL калибратор и стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 0,01– 25,6 mmol/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,012 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.12.3. Одређивање концентрације холестерола у липопротеинима велике густине

Концентрације HDL-холестерола одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*,

Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Вуоаналитика* (Београд, Р. Србија).

Принцип методе

Метода је заснована на директном одређивању HDL-холестерола комбинацијом одговарајућег сурфактанта, органских и неорганских фосфорних једињења која инхибирају реакцију са холестеролом из LDL, VLDL и хиломикрона. У првој реакцији холестерол из LDL, VLDL и хиломикрона је блокиран наведеним супстанцама. У другој реакцији додатком CHE и CHOD, а затим купловањем са хромогеном, у присуству POD одређује се само холестерол из HDL.

Састав комерцијалног тест реагенса

Реагенс 1

- HDAOS
- аскорбат-оксидаза
- фосфорна киселина
- стабилизатори и конзерванси

Реагенс 2

- < 1000 IU/L CHOD
- < 1200 IU/L CHE
- < 1 mmol/L 4-AA
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизирани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 4 дана на 2-8 °C. У процесу калибрације коришћени су HDL/LDL калибратор и стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 0,129 до 3,103 mmol/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,066 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.12.4. Одређивање концентрације аполипопротеина-А1

Концентрације Apo-A1 одређиване су имунотурбидиметријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Мери се повећање турбидитета узорака узроковано формирањем нерастворљивих имуних комплекса када се антитела на Apo-A1 додају узорку. Узорак који садржи Apo-A1

инкубира се са пуфером (реагенс 1), а слепа проба узорка се одреди пре додавања антитела на Аро-А1 (реагенс 2). У присуству одговарајућег антитела у вишку, концентрација Аро-А1 мери се као функција турбидитета.

Састав комерцијалног тест реагенса

Реагенс 1

- 100 mmol/L TRIS пуфер
- 35 g/L полиетилен-гликол
- стабилизатори и конзерванси

Реагенс 2

- 50% козја анти-хумани Аро-А1 антитела
- 100 mmol/L TRIS пуфер
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолитизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 3 дана на 2-8 °С или 2 месеца на -20 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 2,2-43,0 $\mu\text{mol/L}$, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,11 $\mu\text{mol/L}$. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.12.5. Одређивање концентрације аполипопротеина-В

Концентрације Аро-В одређиване су имунотурбидиметријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Beckman Coulter Inc* (Бреја, Калифорнија, САД).

Принцип методе

Мери се повећање турбидитета узорака узроковано формирањем нерастворљивих имуних комплекса када се антитела на Аро-В додају узорку. Узорак који садржи Аро-В инкубира се са пуфером (реагенс 1), а слепа проба узорка се одреди пре додавања антитела на Аро-В (реагенс 2). У присуству одговарајућег антитела у вишку, концентрација Аро-В мери се као функција турбидитета.

Састав комерцијалног тест реагенса

Реагенс 1

- 100 mmol/L TRIS пуфера
- 30 g/L полиетилен-гликол

- стабилизатори и конзерванси

Реагенс 2

- 50% козја анти-хумани Аро-В антитела
- 100 mmol/L TRIS пуфера
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 3 дана на 2-8 °С или 2 месеца на -20 °С. У процесу калибрације коришћени је стандардни мултикалибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 1,5-33,3 $\mu\text{mol/L}$, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,3 $\mu\text{mol/L}$. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.12.6. Одређивање концентрације укупних триглицерида

Концентрације укупних триглицерида одређиване су спектрофотометријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Booanalytica* (Београд, Р. Србија).

Принцип методе

Метода је заснована на хидролизи триглицерида до глицерола и масних киселина, под дејством липопротеинске липазе. Фосфорилацијом глицерола, у присуству глицерол киназе (ГК), а затим оксидацијом глицерол-3-фосфата, под дејством глицерол-3-фосфат оксидазе (ГРО), настаје хидроген-пероксид. Хидроген-пероксид са 4-хлорфенолом и 4-АА оксидативном кондензацијом, у присуству POD, гради хинонимин чији је интензитет боје директно пропорционалан концентрацији триглицерида у серуму.

Састав комерцијалног тест реагенса

- 40 mmol/L пипес пуфер рН 7,6
- 5,4 mmol/L 4-хлорфенол
- 5,0 mmol/L Mg^{2+}
- 1,2 kU/L POD
- 0,4 mmol/L 4-АА
- > 0,4 kU/L GK
- > 1,5 kU/L GRO
- 1 mmol/L ATP
- > 1,5 kU/L липаза
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 3 дана на 2-8 °С или 3 месеца на -20 °С. У процесу калибрације коришћени је стандардни калибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу активности 0,05-12,4 mmol/L, а за вредности преко препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Најнижи ниво детекције је 0,02 mmol/L. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 5% Кв.

3.13. Одређивање параметара инфламације

3.13.1. Одређивање концентрације С-реактивног протеина

Концентрације CRP одређиване су латекс имунотурбидиметријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Вуоаналитика* (Београд, Р. Србија).

Принцип методе

Латекс честице обложене специфичним анти-хумани CRP антителима се аглутинишу када се помешају са узорцима који садрже CRP. Аглутинација доводи до промене апсорбације у зависности од концентрације CRP која може бити одређена поређењем са калибратором познате концентрације.

Састав комерцијалног тест реагенса

Реагенс 1

- 20 mmol/L TRIS пуфер рН 8,2
- 0,95 g/L натријум-азид
- стабилизатори и конзерванси

Реагенс 2

- латекс честице обложене анти-CRP антителима
- 0,95 g/L натријум-азид
- стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 3 дана на 2-8 °С или 3 месеца на -20 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни калибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 2-150 mg/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Ефекат прозоне није примећен до

800 mg/L. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.13.2. Одређивање концентрације феритина

Концентрације феритина одређиване су латекс имунотурбидиметријском методом на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU2700* (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) коришћењем комерцијалног реагенса фирме *Byoanalytica* (Београд, Р. Србија).

Принцип методе

Латекс честице обложене специфичним анти-хумани феритин антителом се аглутинишу када се помешају са узорцима који садрже феритин. Аглутинација доводи до промене апсорбанције у зависности од концентрације феритина која може бити одређена поређењем са калибратором познате концентрације.

Састав комерцијалног тест реагенса

Реагенс 1

- 20 mmol/L TRIS пуфер рН 8,2
- 0,95 g/L натријум-азид
- стабилизатори и конзерванси

Реагенс 2

- Латекс честице обложене анти-феритин антителом
- 0,95 g/L натријум-азид
- Стабилизатори и конзерванси

Као узорци коришћени су нехемолизовани серуми експерименталних животиња. Према препоруци произвођача узорак серума стабилан је 3 дана на 2-8 °С или 3 месеца на -20 °С. У процесу калибрације коришћен је стандардни калибратор, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци серума.

Тест је линеаран у опсегу концентрације 6,6-600 µg/L, а за више вредности препоручује се разблажење узорака серума физиолошким раствором. Поновљивост методе је до 3% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 4% Кв.

3.14. Одређивање параметара оксидативног стреса

Концентрације SOD-1, GPx-1 и MDA одређиване су ELISA „сендвич“ тестом коришћењем комерцијалних ELISA китова фирме *Abcam* (Кембриџ, Велика Британија). У ту сврху примењени су: RT2600-С аутомат за испирање микротитар плоча, RT 6100 аутоматски читач микротитар плоча и РС софтвер за квантификацију резултата; набављени од *Rayto* (Мадрид, Шпанија). Поступак извођења ELISA методе обављен је употребом комерцијалних

реагенса и према упутствима произвођача. Као узорци коришћени су хомогенати срца, јетре и бубрега, као и синаптозоми експерименталних животиња. Такође, у процесу калибрације коришћен је стандардни калибратор сет, док су за контролу квалитета коришћени комерцијални контролни узорци. Поновљивост методе је до 5% Кв, док је унутарлабораторијска прецизност до 10% Кв.

3.15. Одређивање активности ацетилхолинестеразе

Активност АСhЕ у синаптозомама одређивана је спектрофотометријски модификованом *Ellman* методом (247), коришћењем комерцијалних реагенса и раствора фирме *Sigma-Aldrich Chemical Co.* (Минхен, Немачка).

У 50 mmol/L фосфатни пуфер рН 8,0 се дода 10 μL узорка синаптозома. Смеша се преинкубира на 37 °С током 15 минута. Ензимска реакција започиње додатком супстрата (10 μL 0,075 mol/L ацетилтиохолин-јодид) у комбинацији са реагентом за бојење (20 μL 0,1 mmol/L 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензоева киселина)), на 37 °С. Слепа проба не садржи синаптозома. Производ ензимске реакције, тиохолин-јодид и 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензоева киселина) дају једињење жуте боје, 5-тио-2-нитробензоеву киселину чије настајање се прати спектрофотометријски, мерењем апсорбанције на $\lambda = 412 \text{ nm}$. Ензимска реакција се зауставља након 5 минута додавањем 50 μL 0,01 mol/L натријум-додецил-сулфата. Активност АСhЕ се изражава као $\Delta\text{A}/\text{min}$.

3.16. Одређивање активности Na^+/K^+ -АТРаза и *ecto*-АТРаза

Активности Na^+/K^+ -АТРаза и *ecto*-АТРаза одређиване су по модификованој методи аутора *Seals* и сарадника која се заснива на одређивању концентрације неорганског фосфата ослобођеног хидролизом АТР у присуству АТРаза (248), при чему су коришћени комерцијални реагенси и раствори фирме *Sigma-Aldrich Chemical Co.* (Минхен, Немачка).

Активност Na^+/K^+ -АТРаза се одређује као разлика активности тоталне-АТРаза и *ecto*-АТРаза, које се независно мере. Најпре се припреми инкубациона смеша која садржи 50 mmol/L TRIS-HCl рН 7,4, 5 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L NaCl и 20 mmol/L KCl. У 50 μL инкубационе смеше се додаје 25 μL синаптозома. За мерење активности *ecto*-АТРаза додаје се и 20 μL 20 mmol/L оубаина који селективно инхибира активност Na^+/K^+ -АТРаза. Смеша се преинкубира 10 минута на 37 °С, након чега се додаје 20 μL 20 mmol/L АТР за започињање ензимске реакције. Након 10 минута инкубације на 37 °С, реакција се зауставља додавањем 22 μL 3 mol/L хладне перхлорне киселине и стављењем епрувете на лед. У слепој проби инкубациона смеша не садржи MgCl_2 , NaCl и KCl, већ само пуфер TRIS-HCl (рН 7,4). Финална запремина реакционе смеше износи 200 μL , и подешава се додатком одговарајуће запремине дејонизоване воде. У реакциону смешу, која садржи неоргански фосфат и ADP, који су ослобођени током хидролизе АТР каталитичким деловањем тоталне-АТРаза, односно *ecto*-АТРаза, додаје се 4,5 mL воде. Концентрација ослобођеног неорганског фосфата одређује се бојеном реакцијом са 200 μL 0,2 mol/L амонијум-молибдата у 30% сумпорној киселини и

две капи 2,5% раствора SnCl_2 у глицеролу. Активност тоталне-АТРазе, односно *ecto*-АТРазе је пропорционална апсорбацији формираног раствора плаве боје, која се мери на $\lambda = 690 \text{ nm}$.

3.17. Патохистолошка анализа ткива

Током патохистолошких анализа коришћени су комерцијални реагенси и раствори фирме *Sigma-Aldrich Chemical Co* (Минхен, Немачка).

3.17.1. Припрема ткива

Делови панкреаса, јетре и бубрега животиња фиксирани су имерзионом фиксацијом у 10% неутралном пуферисаном формалину за испитивање на светлосном микроскопу или у 2,5% глутаралдехиду за испитивање на електронском микроскопу.

3.17.2. Обрада узорака за конвенционалну светлосну микроскопију

Узорци ткива претходно фиксирани у 4% формалдехиду калупљени су у парафинске калупе и сечени на микротому. Добијени исечци дебљине 5 μm монтирани су на предметна стакла и бојени хематоксилином и еозином. Узорци су били анализирани на *Leica DM4000BLED* микроскопу (*Leica Microsystems*, Вецлар, Немачка) и фотографисани камером *Leica DFC295* (*Leica Microsystems*, Вецлар, Немачка).

3.17.3. Обрада узорака за трансмисиону електронску микроскопију

Узорци ткива фиксирани у 2,5% глутаралдехиду су додатно фиксирани у 1% раствору осмијум-тетоксида у какодилатном пуферу (pH 7,3). Након дехидрације растућим концентрацијама етанола, ткива су испрана 2 пута у пропилен-оксиду, а онда је преко узорака сипана мешавина пропилен-оксида и епоксидних смола. По завршеној процедури, укалупљени узорци су сечени на ултрамикротому (*Leica UltraCut UCT*, *Leica Microsystems*, Вецлар, Немачка), након чега су ултратанки исечци монтирани на бакарне мрежице. После сушења, бакарне мрежице са узорцима контрастиране су 4% раствором уранил-ацетата у метанолу и раствором олово-цитрата. Узорци су после сушења посматрани на трансмисионом електронском микроскопу (*Morgagni 268D*, Хилсборо, САД).

3.18. Статистичка анализа

Нормалност расподеле тестирана је *Kolmogorov-Smirnov* и *Shapiro-Wilk* тестовима. За испитивање статистичке значајности разлика одређиваних параметара коришћена је једнострука анализа варијансе (*ANOVA*) са *post hoc* анализом, као и непараметарски *Kruskal-Wallis* тест, у зависности од расподеле података. Софтверски пакет *SPSS 21.0 (SPSS, Inc, Чикаго, САД)* је коришћен за израду базе података и анализу резултата, а вредност $p < 0,05$ сматрала се статистички значајном.

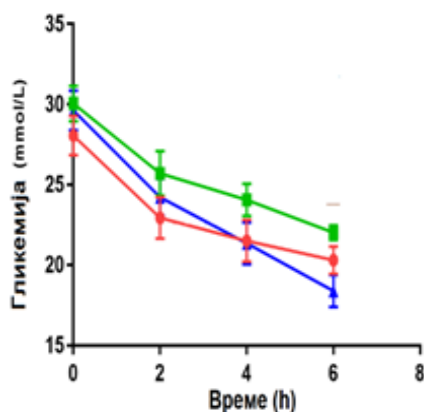
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Утицај хетерополиволфрамата $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ на снижавање хипергликемије пацова са експерименталним дијабетесом

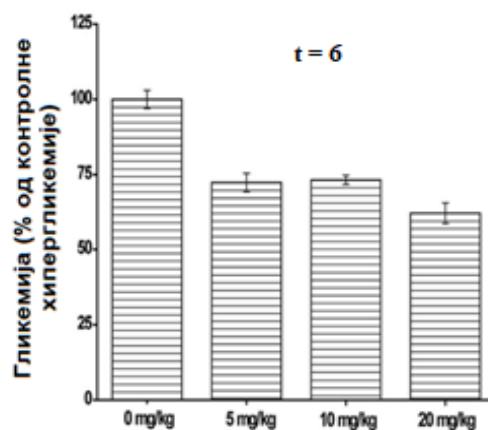
У циљу процене утицаја хетерополиволфрамата $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ на снижавање вредности хипергликемије, пацовима са експериментално изазваним дијабетесом су једнократно интраперитонеално даване растуће дозе (5, 10 и 20 mg/kg) испитиваних супстанци. Вредности концентрације глукозе у крви огледних животиња одређиване су пре и (2, 4 и 6 h) након примене $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$. Добијени резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка мерења (SEM).

Испитивање утицаја растућих доза и мерење гликемије у различитим временским интервалима показали су да хетерополиволфрамаат $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ дозно (**Графикон 1Б**) и временски зависно (**Графикон 1А**) снижава вредности глукозе у крви. Наиме, примењен у једнократној дози од 5 mg/kg значајно ($p < 0,05$) снижава вредности хипергликемије (mmol/L) након 2 h ($22,94 \pm 1,28$), 4 h ($21,51 \pm 1,31$) и 6 h ($20,30 \pm 0,86$) у односу на вредности хипергликемије пре третмана ($28,06 \pm 1,20$; $t = 0$ h). Сличан тренд пада глукозе у крви дијабетичких пацова примењен је и при примени 10 mg/kg $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, док је највећа ефикасност постигнута применом дозе од 20 mg/kg. Сprovedено испитивање показало је да једнократна примена 20 mg/kg $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ значајно ($p < 0,05$) снижава вредности хипергликемије (mmol/L) након 2 h ($24,22 \pm 1,16$), 4 h ($21,36 \pm 1,30$) и 6 h ($18,40 \pm 1,02$) у односу на вредности хипергликемије пре третмана ($29,62 \pm 1,24$; $t = 0$ h) (**Графикон 1А**). Поред тога, на **Графикону 1Б**, који показује дозну зависност, може се уочити да је 6 h након примене 20 mg/kg $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ добијен највећи пад вредности гликемије, у поређењу са вредностима гликемије након примене 5 и 10 mg/kg испитиваног хетерополиволфрамата, односно највећа примењена доза од 20 mg/kg се уједно и показала као најефикаснија доза у снижавању хипергликемије.

А

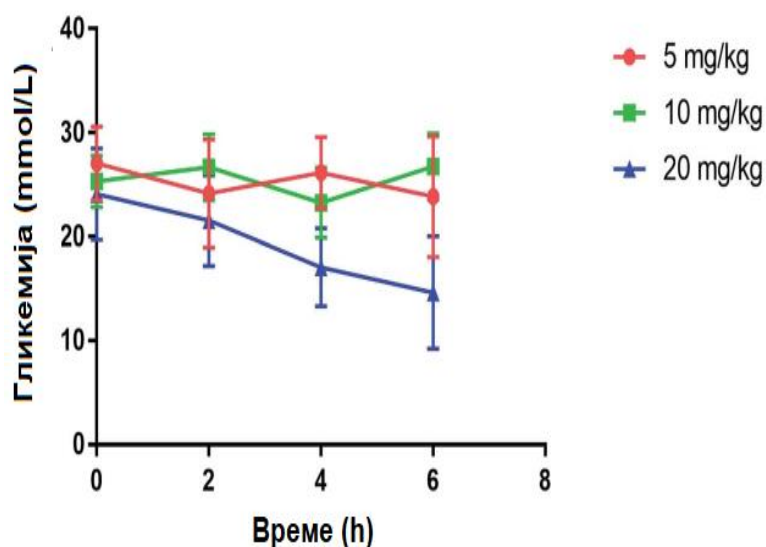


Б



Графикон 1. Утицај $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ на снижавање вредности хипергликемије дијабетичких пацова. Испитивано једињење је примењено једнократно интраперитонеално ($t = 0$ h) у растућим дозама (5 mg/kg, 10 mg/kg и 20 mg/kg). (А) Вредности концентрације глукозе у крви огледних животиња пре (0 h) и након примене (2, 4, и 6 h) $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у све три испитиване дозе. (Б) Концентрација глукозе у крви (изражена као % од одговарајуће контролне хипергликемије ($t = 0$ h)) 6 h након примене $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у све три испитиване дозе. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка мерења (SEM). ANOVA тест за поновљена мерења је коришћен за израчунавање статистичке значајности.

Са друге стране, анализирајући вредности гликемије добијене након једнократне интраперитонеалне примена $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (Графикон 2) утврђено је да дозе 5 mg/kg и 10 mg/kg не доводе до значајног ($p > 0,05$) пада глукозе у крви у односу на одговарајуће контролне вредности ($t = 0$ h). Насупрот овим резултатима, давање 20 mg/kg $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ дијабетичким пацовима значајно ($p < 0,05$) снижава вредности хипергликемије (mmol/L) након 2 h ($21,54 \pm 4,36$), 4 h ($17,06 \pm 3,74$) и 6 h ($14,60 \pm 3,54$) у односу на вредности хипергликемије пре третмана ($24,08 \pm 4,41$; $t = 0$ h).



Графикон 2. Утицај $\{AgP_5W_{30}\}$ на снижавање вредности хипергликемије дијабетичких пацова. Испитивано једињење је примењено једнократно интраперитонеално ($t = 0$ h) у растућим дозама (5 mg/kg, 10 mg/kg и 20 mg/kg). Вредности концентрације глукозе у крви огледних животиња одређиване су у временским интервалима пре (0 h) и (2, 4, и 6 h) након примене $\{AgP_5W_{30}\}$. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка мерења (SEM). ANOVA тест за поновљена мерења је коришћен за израчунавање статистичке значајности.

На основу анализираних вредности гликемија измерених пре и након једнократног давања хетерополиволфрамата $\{NaP_5W_{30}\}$ и $\{AgP_5W_{30}\}$ пацовима са експерименталном дијабетесом, може се закључити да су оба једињења ефикасна у снижавању вредности хипергликемије; чиме су се стекли услови за даља токсиколошка и фармаколошка истраживања. Такође, закључено је да тренд пада вредности гликемије корелира са повећањем дозе једињења; највећа испитивана доза од 20 mg/kg је најефикаснија доза у снижавању вредности хипергликемије. Зато је за даљи ток истраживања у смислу утврђивања акутне оралне токсичности испитиваних хетерополиволфрамата $\{NaP_5W_{30}\}$ и $\{AgP_5W_{30}\}$ као могућих антидијабетика, коришћена најефикаснија доза од 20 mg/kg.

4.2. Процена хепато- и нефротоксичности $\{NaP_5W_{30}\}$ и $\{AgP_5W_{30}\}$ на здравим пацовима

Већина досадашњих студија истраживала је углавном биолошке активности ПОМ и молекуларне механизме њиховог деловања (202, 214). Међутим, токсиколошки профил ових комплексних једињења још увек није довољно испитан. Будући да ризици које лек носи морају да буду мањи од очекиване користи, у даљем току истраживања анализирана је безбедност и сигурност примене испитиваних хетерополиволфрамата као могућих нових антидијабетика.

Имајући у виду да се већина унетих супстанци најчешће метаболише у јетри, а елиминише путем бубрега, у студији је испитивана *in vivo* хепато- и нефротоксичност {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀}. У складу са протоколом *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*, током две недеље здраве животиње су перорално добијале одговарајући хетерополиволфрамат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg. За процену хепато- и нефротоксичности праћени су основни биохемијски параметари функције јетре и бубрега, као и степен и карактер патоморфолошких промена у овим органима коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.

4.2.1. Општа подношљивост {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀}

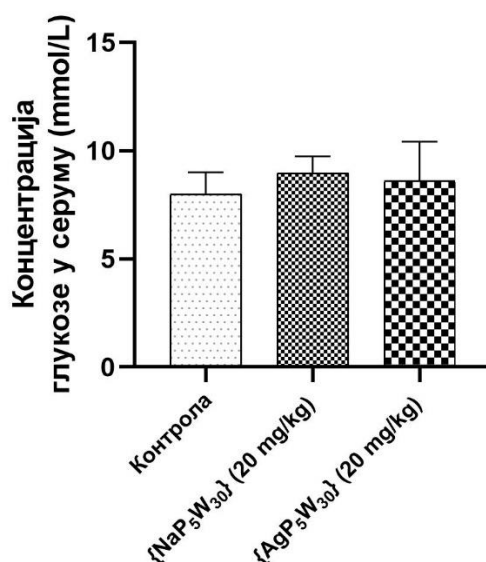
У циљу провере опште подношљивости испитиваних хетерополиволфрамата, испитиван је њихов утицај на: дневни унос хране и воде, телесну масу пацова, опште здравствено стање, понашање и леталитет пацова. Током двонедељног периода праћења није примећен смањен дневни унос хране и воде у третираним групама пацова, у односу на контролну групу здравих, нетретираних пацова (резултати нису приказани). Такође, телесне масе контролне групе пацова и оних третираних испитиваним хетерополиволфраматима повећавале су се током три недеље без значајних варијација (Табела 9). Статистичком анализом је утврђено да испитивани хетерополиволфраматима, примењивани у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током две недеље, нису статистички значајано утицали на телесну масу експерименталних животиња. Поред тога, није забележен поремећај понашања и смртни исход у експерименталним групама.

Табела 9. Утицај испитиваних хетерополиволфрамата на телесну масу животиња

	Контрола (n =7)	{NaP ₅ W ₃₀ }	{AgP ₅ W ₃₀ }
	(n =7)	(n =7)	(n =7)
	Телесна маса у грамима (средња вредност ± стандардна грешка мерења)		
Време			
0. дан	258,00 ± 16,85	254,50 ± 16,47	255,40 ± 5,10
2. дан	268,10 ± 16,81	270,60 ± 17,80	256,40 ± 6,02
4. дан	281,20 ± 16,92	282,10 ± 18,22	259,89 ± 6,58
6. дан	280,60 ± 14,64	281,00 ± 16,25	254,40 ± 6,82
8. дан	272,60 ± 12,97	286,00 ± 14,37	257,20 ± 6,83
10. дан	290,60 ± 17,51	290,60 ± 17,51	290,61 ± 17,51
12. дан	293,20 ± 16,77	300,40 ± 15,66	297,90 ± 6,65
14. дан	290,10 ± 13,31	301,77 ± 16,11	296,10 ± 9,93

4.2.2. Концентрација глукозе у серуму

Измерене вредности концентрације глукозе у серуму експерименталних животиња приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 3**. Концентрација глукозе у серуму (mmol/L) је била [8,00 (7,60–9,00)] код контролних животиња, [8,97 (8,16–9,74)] код животиња третираних {NaP₅W₃₀} и [8,61 (8,28–10,42)] код животиња третираних {AgP₅W₃₀}. Статистичком анализом утврђено је да се вредности гликемија значајно не разликују (p > 0,05) између испитиваних група животиња. Добијени резултати наводе на закључак да испитивани хетерополиволфрамата не утичу на промену нивоа глукозе у крви код нормогликемичких пацова.



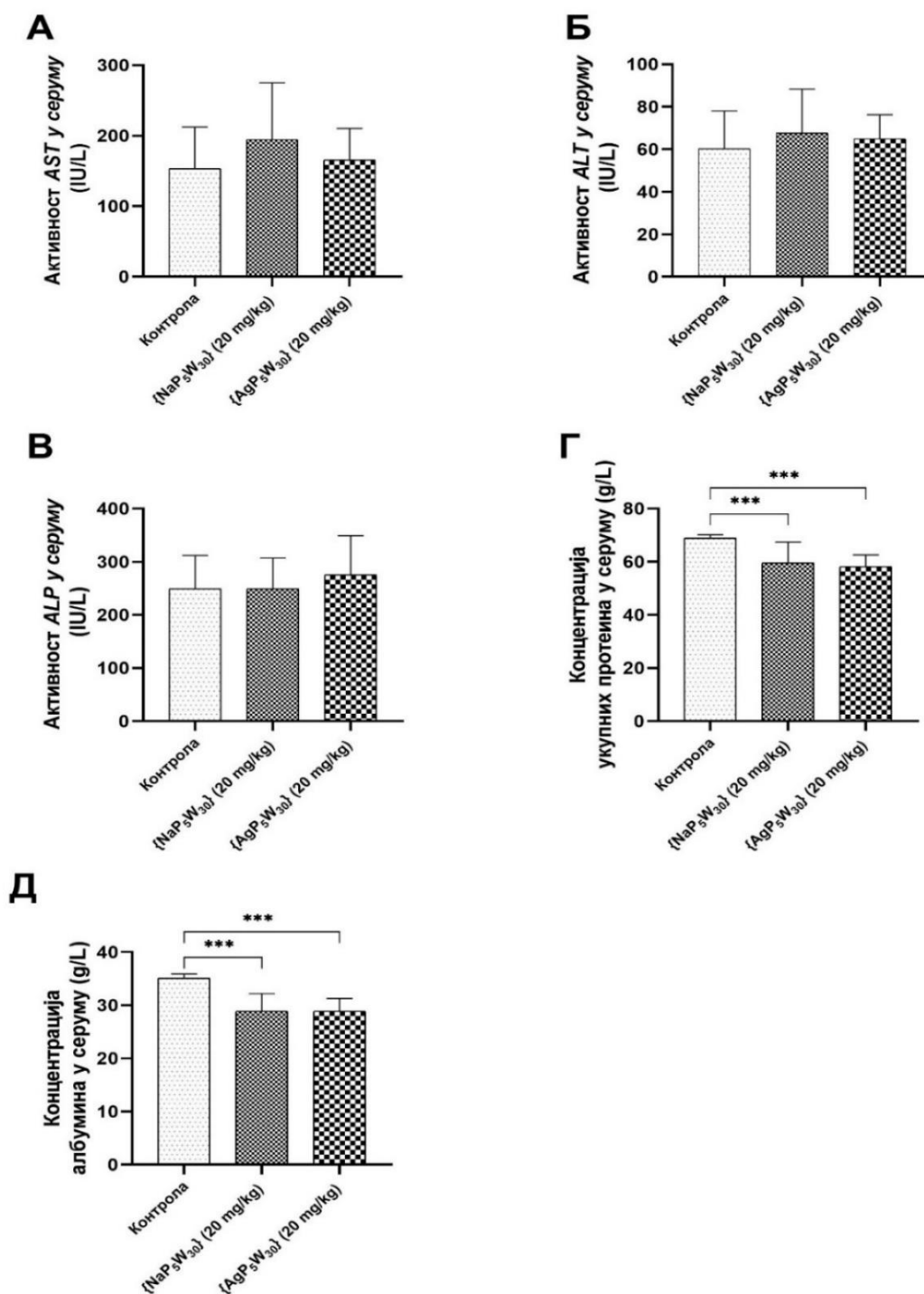
Графикон 3. Утицај $\{NaP_5W_{30}\}$ (20 mg/kg, *per os*) и $\{AgP_5W_{30}\}$ (20 mg/kg, *per os*) на вредности нивоа глукозе у серуму код нормогликемичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) две недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група.

4.2.3. Биохемијски параметри функције јетре

Добро је позната чињеница да јетра представља главно место метаболисања већине унетих супстанци и због тога уједно је и мета њихове токсичности. У том смислу, најпре смо желели да истражимо да ли испитивани хетерополиволфрамат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg доводе до поремећаја функције јетре код пацова, након две недеље третмана. Имајући у виду да очување интегритета мембране хепатоцита представља приоритет и неопходан услов за остваривање свих виталних функција јетре, мерене су активности AST и ALT у серуму испитиваних јединки. Поред тога, холестазни тип оштећења јетре одређиван је на основу мерења активности ALP, док је синтетска функција јетре процењена на основу мерења концентрације укупних протеина и албумина у серуму огледних животиња.

Добијени резултати су приказани као медијана (опсег) на **Графикону 4**. Резултати статистичке анализе указују да се добијене вредности активности AST (**Графикон 4А**), ALT (**Графикон 4Б**) и ALP (**Графикон 4В**) у серуму нетретираних (контрола) и третираних пацова не разликују значајно ($p > 0,05$). Насупрот овим резултатима, вредности концентрације укупних протеина (g/L) у серуму животиња третираних $\{NaP_5W_{30}\}$ [59,60 (57,30–61,40)] и $\{AgP_5W_{30}\}$ [58,20 (57,20–59,60)] су значајно ниже ($p < 0,0001$) у поређењу са контролном групом животиња [68,90 (64,50–69,90)] (**Графикон 4Г**). Слично, статистички значајна разлика ($p < 0,0001$) у концентрацији албумина у серуму (g/L) може се приметити уколико се пореде групе животиња третиране $\{NaP_5W_{30}\}$ [28,90 (28,30–30,50)] и $\{AgP_5W_{30}\}$ [28,90 (28,40–30,30)] са нетретираном групом животиња [35,10 (34,00–35,90)] (**Графикон 4Д**). Са друге стране, не уочава се статистички значајна ($p > 0,05$) разлика у концентрацији

укупних протеина и албумина између група животиња третираних испитиваним хетерополиволфраматима.



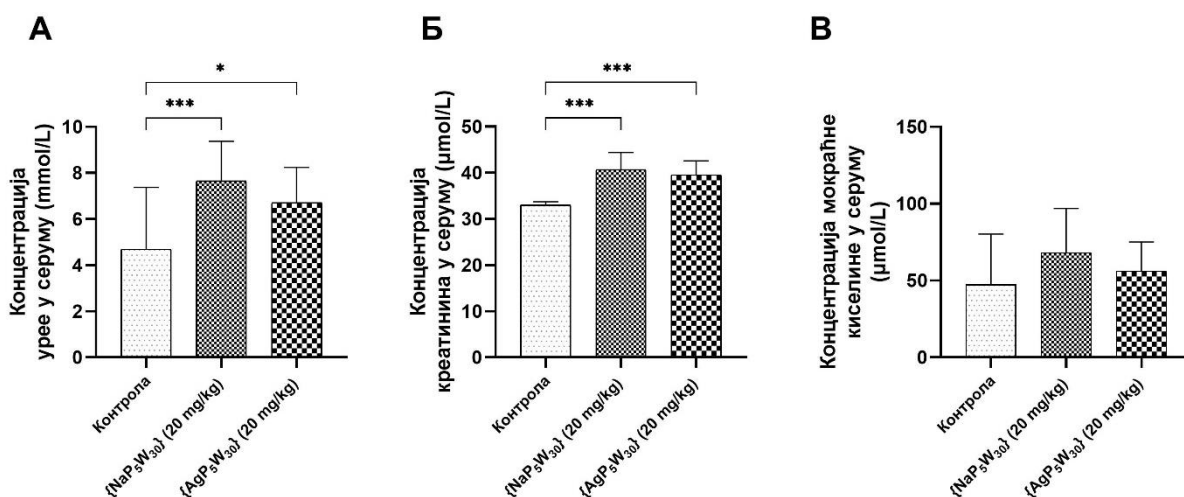
Графикон 4. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*) и {AgP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*) на биохемијске параметре функције јетре — серумске активности AST (А), ALT (Б) и ALP (В), и серумске концентрације укупних протеина (Г) и албумина (Д). У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) две недеље. Резултати су приказани као медијана (опсер). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група; ****p* < 0,0001. AST, аспартат аминотрансфераза; ALT, аланин аминотрансфераза; ALP, алкална фосфатаза.

На основу резултата лабораторијских тестова функције јетре, може се закључити да испитивани хетерополиволфрамат (20 mg/kg; две недеље) не доводе до хепатоцелуларног и холестазног типа оштећења јетре; али имају утицаја на синтетску функцију јетре, односно доводе до њеног смањења. Будући да хепатотоксични потенцијал неког једињења не може проценити само на основу лабораторијских резултата, у даљем току истраживања анализирано је ткиво јетре испитиваних група животиња, у циљу утврђивања патоанатомског супстрата оштећења.

4.2.4. Биохемијски параметри функције бубрега

Познато је да бубрези филтрирају велику количину крви дневно (20-25% крви која долази од срца), тако да су потенцијално изложени високим концентрацијима ендогених и екзогених токсичних супстанци. Стога, нефротоксичност је пријављена као чест нежељени ефекат током претклиничких и клиничких фаза истраживања лекова, што сугерише на неопходност испитивања нефротоксичности у раним фазама развоја новог лека. Данас се претклиничка процена нефротоксичности потенцијалног лека углавном базира на стандардним биохемијским параметрима функције бубрега и хистопатолошкој анализи ткива бубрега. У складу са тим, а у циљу бољег дефинисања токсичног потенцијала испитиваних хетерополиволфрамата као потенцијалних антидијабетика, испитиван је утицај ових једињења на концентрације урее, креатинина и мокраћне киселине у серуму експерименталних животиња.

Добијене вредности биохемијских параметара функције бубрега приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 5**. Вредности концентрације урее (mmol/L) у серуму животиња третираних {NaP₅W₃₀} [7,65 (7,13–8,87)] и {AgP₅W₃₀} [6,71 (6,30–7,07)] су значајно више у поређењу са контролном групом животиња [4,69 (4,05–5,76)]; $p < 0,0001$ и $p < 0,05$, редом (**Графикон 5А**). Сличан тренд се уочава и за вредности серумског креатинина (**Графикон 5Б**). Статистички значајна разлика ($p < 0,0001$) у концентрацији креатинина у серуму ($\mu\text{mol/L}$) може се приметити уколико се пореде групе животиња третиране {NaP₅W₃₀} [40,7 (39,5–43,8)] и {AgP₅W₃₀} [39,5 (38,9–40,1)] са нетретираниом групом [33,00 (31,7–33,7)] (**Графикон 5Б**). Насупрот овим резултатима, анализирајући вредности концентрације мокраћне киселине у серуму утврђено је да није дошло до статистичке значајне промене у вредностима између испитиваних група ($p > 0,05$) (**Графикон 5В**).



Графикон 5. Утицај $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg, *per os*) и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg, *per os*) на биохемијске параметре функције бубрега — серумске концентрације уреје (А), креатинина (Б) и мокраћне киселине (В). У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) две недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група; * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$.

Пораст вредности серумског креатинина и уреје у третираним групама животиња наводи на закључак да испитивани хетерополиволфрамат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, након две недеље третмана, доводе до благог погоршања бубрежне функције. Међутим, како маркери бубрежне функције дају врло мало информација о патофизиолошким механизмима и морфолошким променама у бубрежном паренхиму, у даљем току акутне пероралне токсиколошке студије анализирано је ткиво бубрега третираних јединки коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.

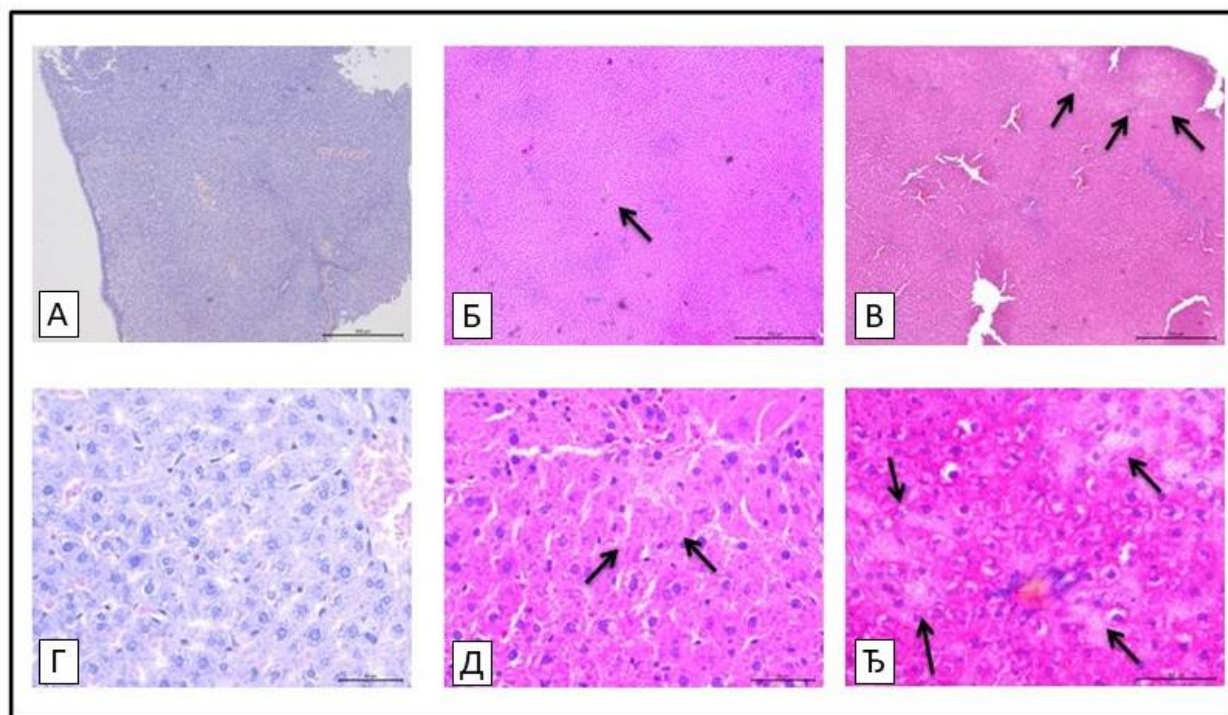
4.2.5. Патохистолошка анализа јетре

У складу са смањеном синтетском функцијом јетре насталом под дејством испитиваних хетерополиволфрамата, а у циљу бољег дефинисања хепатотоксичног ефекта ових једињења, даље су испитивани микроморфолошки и ултраструктурни поремећаји јетре третираних група животиња, коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.

Конвенционална светлосна микроскопија

На препаратима јетре, обојеним хематоксилином и еозином, групе пацова третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ уочавају се дискретна поља фокалне некрозе између лобулуса (Слика 16, Б и Д). Такође, у јетри пацова третираних $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ могу се видети поља фокалне некрозе у

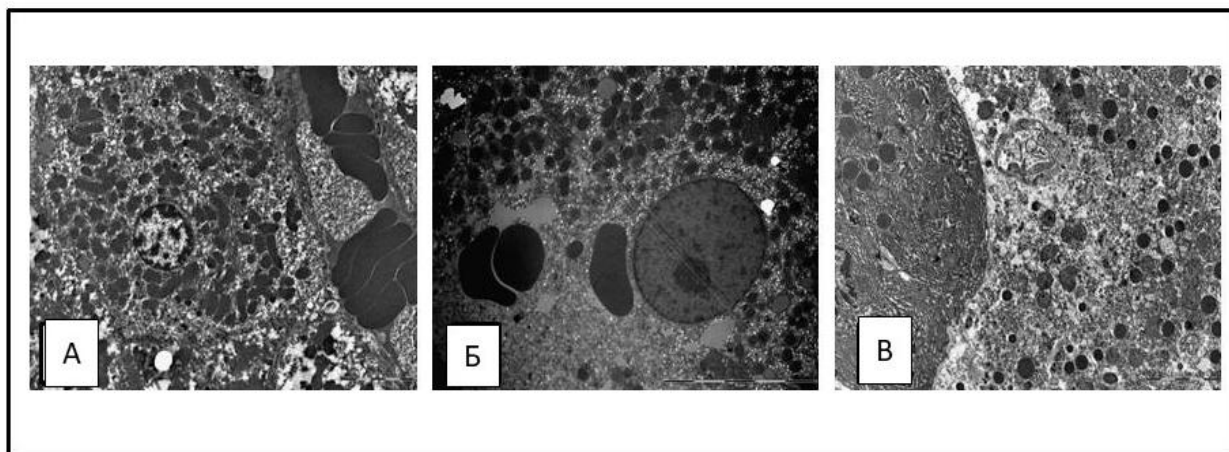
перипортним просторима (Слика 16, В и Ђ). Наведене промене нису биле присутне у ткиву јетре контролне групе пацова (Слика 16, А и Г).



Слика 16. Фотомикрографије ткива јетре бојене хематоксилином и еозином (А, Б и В увеличање $\times 5$; Г, Д и Ђ увеличање $\times 40$). Стрелице — поља некрозе. (А и Г) — контролна група животиња третирана 0,9% раствором NaCl (*per os*); (Б и Д) — група животиња третирана {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*); (В и Ђ) — група животиња третирана {AgP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*).

Трансмисиона електронска микроскопија

Анализом ултраструктурних особина хепатоцита уочена су дискретна поља фокалне перилобуларне некрозе удружена са екстравазацијом еритроцита код пацова третираних {NaP₅W₃₀} (Слика 17Б). Међутим, у јетри пацова третираних {AgP₅W₃₀} уочавају се израженија поља фокалне некрозе (Слика 17В) у односу на групу третирану {NaP₅W₃₀}.



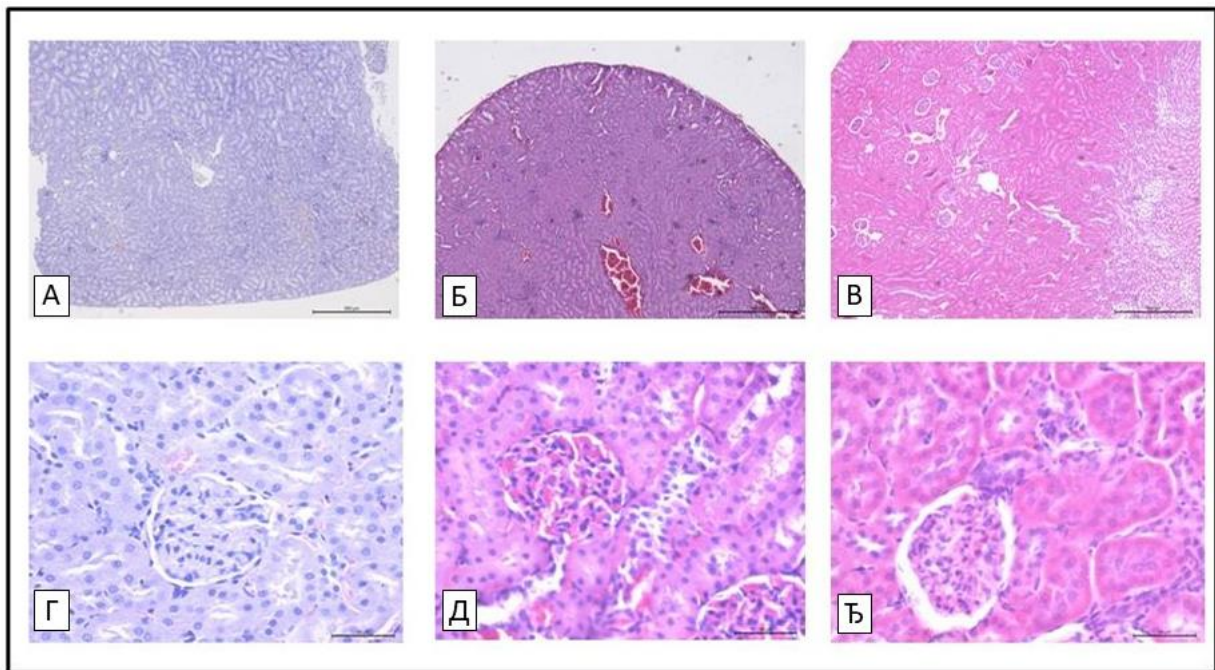
Слика 17. Фотографије трансмисионе електронске микроскопије (увеличање $\times 3500$) хепатоцита огледних пацова. (А) уобичајен изглед хепатоцита контролне групе животиња третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*); (Б) поље некрозе удружено са екстравазацијом еритроцита код животиње третиране {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*); (В) израженије поље коагулационе некрозе код животиње третиране {AgP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*).

4.2.6. Патохистолошка анализа бубрега

Будући да се претклиничка процена нефротоксичности потенцијалног лека базира на стандардним биомаркерима функције бубрега и патохистолошкој анализи ткива, у даљем току токсиколошке студије испитиване су патоморфолошке промене у бубрезима експерименталних пацова, коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије.

Конвенционална светлосна микроскопија

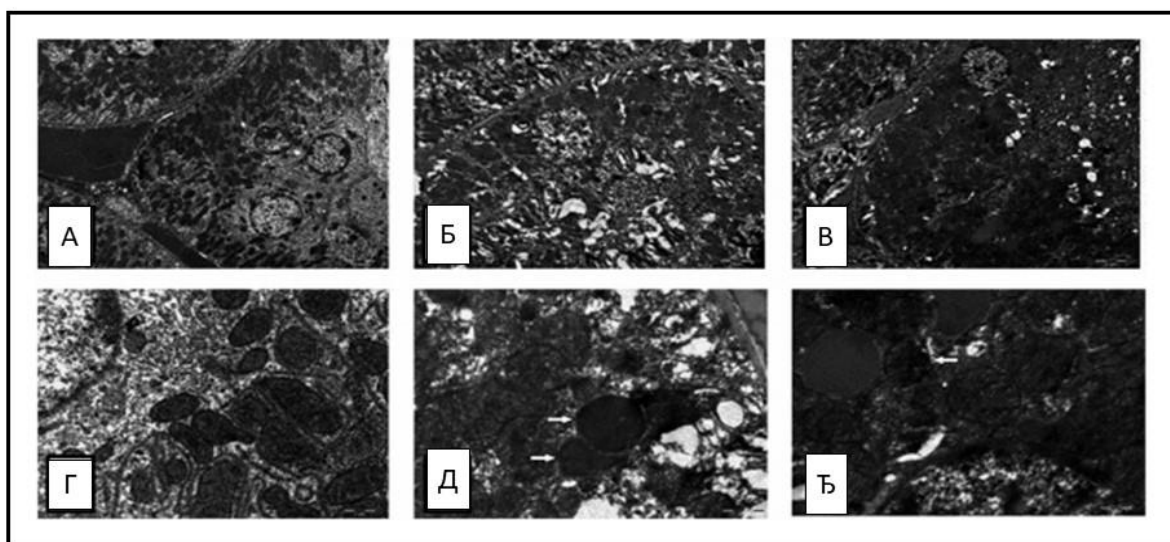
На препаратима бубрега, обојеним хематоксилином и еозином, животиња свих експерименталних група (нетретираних-контрола и третираних {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀}), уочава се нормалан изглед гломерула са капсулом, тубулоинтерстицијума и крвних судова (Слика 18).



Слика 18. Фотографије ткива бубрега бојених хематоксилином и еозином (А, Б и В увељичање \times ; Г, Д и Ђ увељичање $\times 40$). (А и Г) контролна група животиња третирана 0,9% раствором NaCl (*per os*); (Б и Д) група животиња третирана {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*); (В и Ђ) група животиња третирана {AgP₅W₃₀} (20 mg/kg, *per os*). Без знакова оштећења ткива бубрега у свим експерименталним групама.

Трансмисиона електронска микроскопија

Ултраструктурне анализе препарата бубрега показале су присуство тамних и едематозних митохондрија у епителним ћелијама бубрежних тубула обе третиране групе животиња, док су гломерули без знакова оштећења (Слика 19; Б, В, Д и Ђ). Наведене промене нису биле присутне у ткивима бубрега контролне групе пацова (Слика 19, А и Г).



Слика 19. Фотографије трансмисионе електронске микроскопије бубрежних тубула контролне групе пацова (А и Г), групе пацова третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg, *per os*) (Б и Д) и групе пацова третираних $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg, *per os*) (В и Ђ). Увеличање $\times 2800$: очувана структура бубрежних тубула у контролној групи животиња (А); бубрежни тубули са неорганизованим базалним лавиринтом и кондензованим митохондријалним матриксом у групи животиња третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (Б) и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (В). Увеличање $\times 14000$: нормалан изглед цитоплазме бубрежних тубулоцита са очуваним митохондријама у контролној групи животиња (Г); електронски густе митохондрије (стрелица) у цитоплазми епителних ћелија бубрежних тубула у групи животиња третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (Д); цитоплазма епителних ћелија бубрежних тубула са оштећеним митохондријама (стрелица) у групи животиња третираних $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (Ђ).

Оштећене митохондрије тубулоцита виђене на трансмисионој електронској микроскопији и нормална архитектоника ткива бубрега на конвенционалној светлосној микроскопији сугеришу на закључак да испитивани хетерополиволфрамати доводе до сублеталног оштећења тубулоцита (не доводе до акутне тубулске некрозе) и тиме погоршавају бубрежну функцију.

На основу анализираних вредности биохемијских параметара функције јетре и бубрега, као и степена и карактера патоморфолошких промена у овим органима процењеним коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије, може се закључити да хетерополиволфрамати $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, након две недеље третмана, изазивају благи до умерени степен хепатотоксичности и нефротоксичности код здравих пацова. Такође, резултати биохемијске и патохистолошке анализе показују да $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, у односу на $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ поседује израженији хепатотоксични и нефротоксични потенцијал. Поред тога, претходно наведени резултати *screening* студије (Графикон 1 и 2) показују да је $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, у односу на $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, моћнији антихипергликемијски агенс. Стога, даљи ток истраживања у циљу расветљавања могућих механизма деловања хетерополиволфрамата усмерили смо на испитивања на дијабетичким

пацовима које смо *per os* третирали три недеље {NaP₅W₃₀}, у појединачној дневној дози од 20 mg/kg која је показала најбољи антихипергликемијски ефекат.

4.3. Могући механизми деловања хетерополиволфрамата, који учествују у снижавању вредности хипергликемије и ублажавању дијабетичких компликација

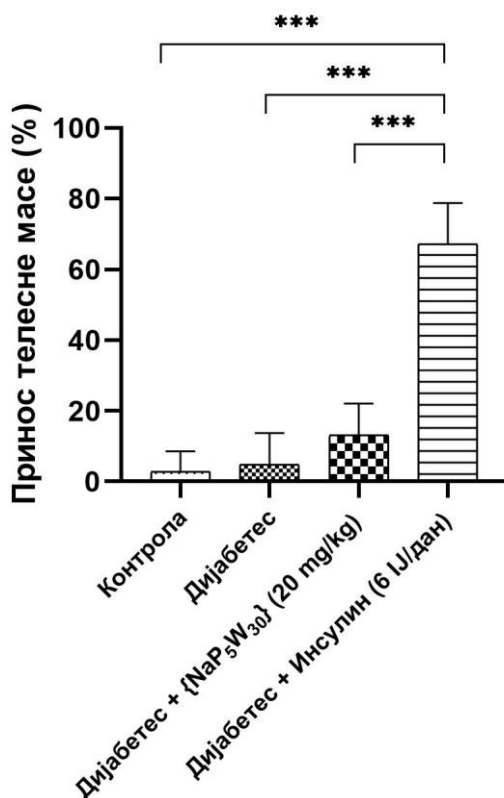
Побољшана гликорегулација дијабетичких животиња постигнута применом ПОМ показана је пре више од две деценије (202), али њихов тачан механизам снижавања концентрације глукозе у крви није у потпуности разјашњен. Имајући у виду наведену чињеницу, у даљем току експеримента испитивани су могући антидијабетички механизми деловања хетерополиволфрамата, који учествују у снижавању вредности хипергликемије и ублажавању дијабетичких компликација. Поред тога, будући да се у претходно наведеним истраживањима (одељци 4.1 и 4.2) {NaP₅W₃₀}, у односу на {AgP₅W₃₀} показао као безбеднији и ефикаснији антихипергликемијски агенс, у овом последњем експерименталном протоколу (одељак 3.4.3), коришћен је само {NaP₅W₃₀} и то у појединачној дневној дози од 20 mg/kg.

У циљу испитивања антидијабетичких механизма деловања ПОМ, током три недеље дијабетичке животиње су перорално добијале испитивани хетерополиволфрамаат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg. Поред тога, ради поређења испитиваног хетерополиволфрамата са деловањем антидијабетика који се стандардно користи у клиничкој пракси у експерименту је коришћена и група дијабетичких пацова који су субкутано добијали хумани дугоделујући инсулин, у појединачној дневној дози од 6 IJ.

4.3.1. Принос телесне масе

На **Графикону 6** приказан је принос телесне масе (% повећања телесне масе у односу на почетну вредност измерену непосредно пре одговарајућег третмана) експерименталних животиња након три недеље. Добијени резултати приказани су као медијана (опсег). Вредности показују да није дошло до статистичке значајне промене у вредностима приноса телесне масе између контролне нормогликемијске [2,74 (-7,66–8,57)] и (контролне) дијабетичке групе [4,87 (-19,80–13,71)]. Примена {NaP₅W₃₀}, у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, није довела до статистички значајне промене приноса телесне масе дијабетичких животиња [13,07 (4,00–22,08)], у поређењу са контролним групама — нормогликемијска [2,74 (-7,66–8,57)] и дијабетичка [4,87 (-19,80–13,71)]. Дакле, на основу приказаних резултата може се закључити да испитивани хетерополиволфрамаат не утиче на принос телесне масе дијабетичких пацова, односно не доводи до повећања или смањења телесне масе као могући нежељени ефекат. За разлику од испитиваног ПОМ, забележен је изразити и статистички значајан ($p < 0,0001$) пораст вредности приноса телесне масе у дијабетичкој групи третираној инсулином [67,12 (56,07–78,76)] у поређењу са контролним групама — нормогликемијска [2,74 (-7,66–8,57)] и дијабетичка [4,87 (-19,80–13,71)] и са дијабетичком групом која је добијала испитивани хетерополиволфрамаат [13,07 (4,00–22,08)]. Према томе, инсулин је

значајно утицао на принос телесне масе дијабетичких пацова, што представља његов чест нежељени ефекат (249).



Графикон 6. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на принос телесне масе дијабетичких пацова, након три недеље третмана. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. *** $p < 0,0001$.

4.3.2. Релативна маса унутрашњих органа

Раније је показано да примена стрептозотицина код експерименталних животиња доводи до низа морфолошких промена у ткивима, што последично изазива промену у структури и маси унутрашњих органа (250). Стога, је у овој студији анализиран утицај тронедељне примене одабраног хетерополиволфрамата у појединачној дневној дози од 20 mg/kg на релативну масу унутрашњих органа пацова са експерименталним дијабетесом изазваним стрептозотоцином. Као што је претходно наведено у одељку 3.4.3, одмах по жртвовању експерименталних животиња, измерене су масе срца, јетре и бубрега и израчуната је релативна маса ових органа коришћењем формуле: релативна маса (%) = (маса органа (g) / коначна маса животиње (g)) × 100. Добијене вредности приказане су на **Графикону 7**.

Срце

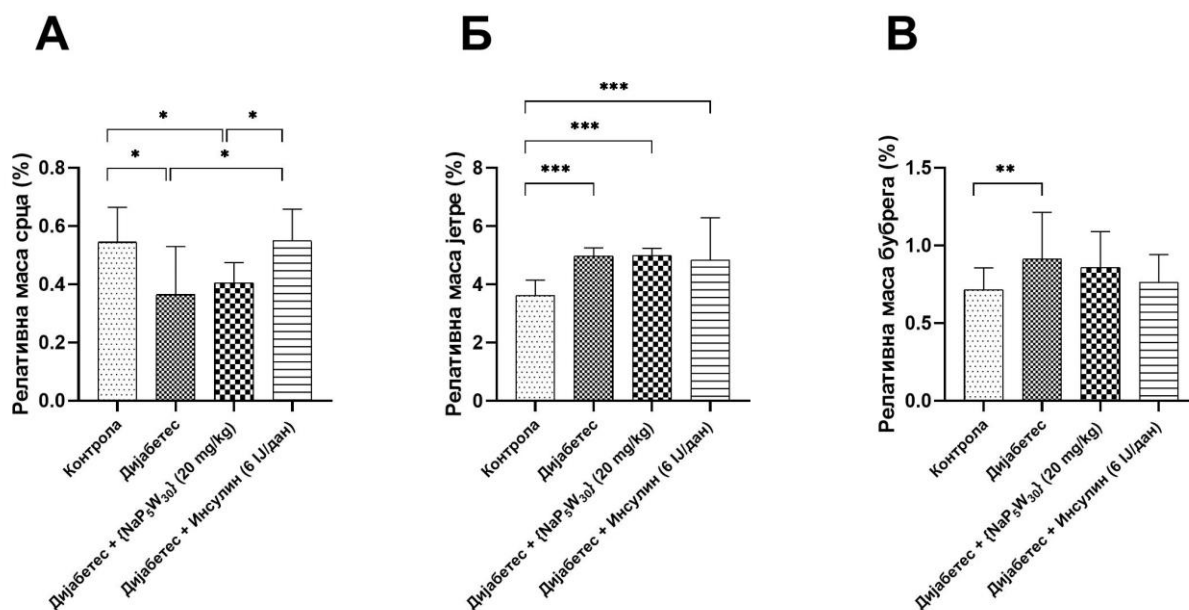
Релативна маса срца (%) након тронедељног третмана у групи (контролних) дијабетичких животиња [0,37 (0,24–0,53)] је статистички значајно нижа ($p < 0,05$) у односу на контролну нормогликемичку групу [0,55 (0,48–0,67)] (**Графикон 7А**), односно, показано је да примена стрептозотоцина смањује релативну масу срца пацова. Такође, може се уочити да дијабетичка група која је добијала испитивани хетерополиволфрамаат током три недеље има статистички значајну ($p < 0,05$) нижу вредност релативне масе срца [0,41 (0,18–0,48)] у односу на контролну нормогликемичку групу [0,55 (0,48–0,67)]. Са друге стране, не уочава се статистички значајна разлика у релативној маси срца између (контролне) дијабетичке групе и дијабетичке групе која је добијала испитивани хетерополиволфрамаат. Стога, може се закључити да примена испитиваног хетерополиволфрамата није утицала на промену релативне масе срца дијабетичких пацова. Насупрот резултатима са {NaP₅W₃₀}, уочава се да је тронедељна примена хуманог дугоделујућег инсулина, у појединачној дневној дози од 6 IU, довела до статистички значајног ($p < 0,05$) пораста релативне масе срца [0,55 (0,41–0,66)] у односу на (контролну) дијабетичку групу [0,37 (0,24–0,53)]. Такође, запажа се и статистичка значајна разлика у вредностима релативне масе срца ($p < 0,05$) између дијабетичке групе третиране хетерополиволфрамаатом и дијабетичке групе која је добијала инсулин.

Јетра

Резултати (**Графикон 7Б**) показују да је добијена статистичка значајна промена ($p < 0,0001$) у вредностима релативне масе јетре (%) између контролне нормогликемичке [3,62 (3,30–4,15)] и (контролне) дијабетичке групе [4,97 (3,99–5,26)], односно показано је да примена стрептозотоцина повећава релативну масу јетре пацова. Такође, примећена је статистички значајно виша вредност релативне масе јетре у дијабетичким групама које су добијале испитивани хетерополиволфрамаат [4,99 (4,67–5,24)] и хумани дугоделујући инсулин [4,84 (4,56–6,29)] током три недеље у односу на контролну нормогликемичку групу [3,62 (3,30–4,15)] ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$, редом). Међутим, не уочава се статистички значајна разлика у релативној маси јетре између (контролне) дијабетичке групе и дијабетичких група које су добијале испитивани хетерополиволфрамаат/егзогени инсулин током три недеље. Дакле, може се закључити да тронедељна примена {NaP₅W₃₀} и егзогеног инсулина није утицала на вредности релативне масе јетре дијабетичких пацова.

Бубрези

Добијени резултати (**Графикон 7В**) показују да је примена стрептозотоцина довела до статистички значајног ($p < 0,001$) повећања релативне масе бубрега (%) пацова [0,91 (0,81–1,21)], у поређењу са контролном нормогликемичком групом [0,71 (0,58–0,85)] (**Графикон 7В**). Насупрот овим резултатима, не запажа се статистички значајна разлика између (контролне) дијабетичке групе [0,91 (0,81–1,21)] и дијабетичких група које су третиране испитиваним хетерополиволфрамаатом [0,85 (0,76–1,09)] и инсулином [0,76 (0,69–0,94)]. Заправо, тронедељна примена {NaP₅W₃₀} и инсулина није утицала на промену релативне масе бубрега дијабетичких пацова.

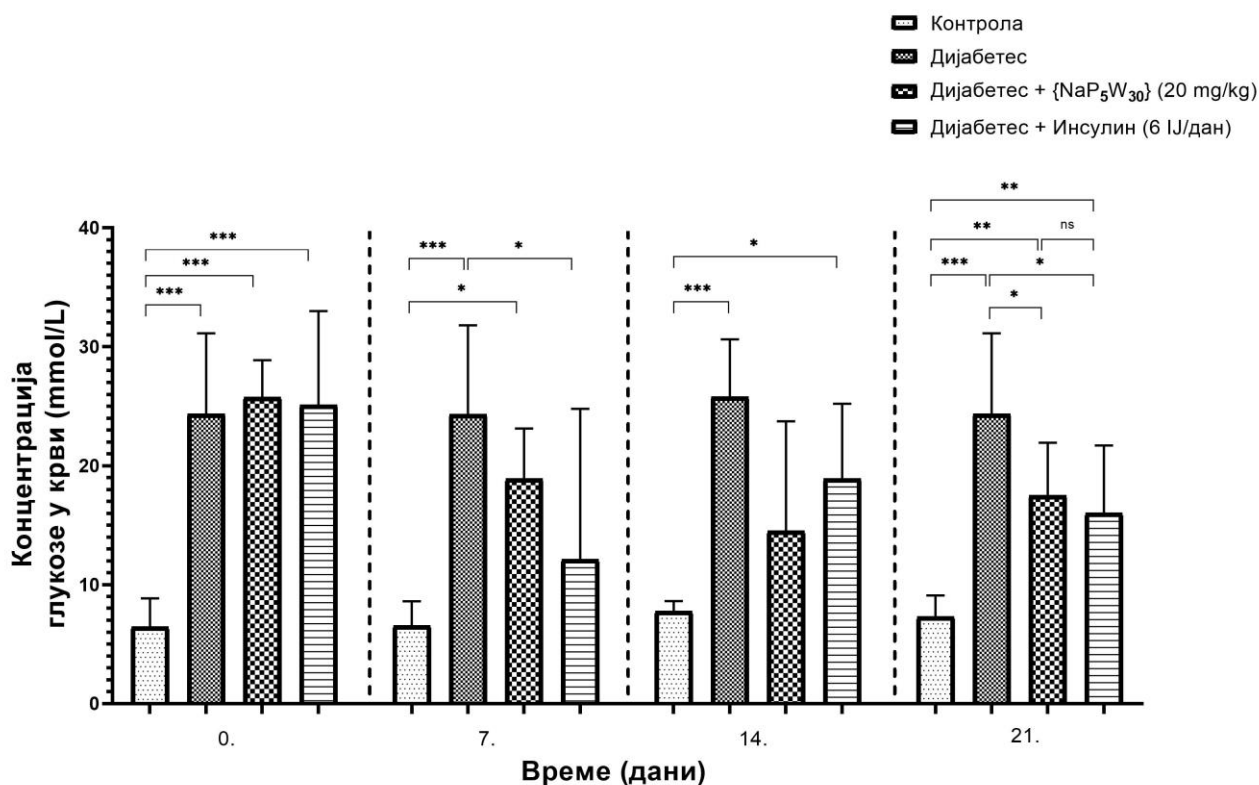


Графикон 7. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугodelујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на релативну масу срца (А), јетре (Б) и бубрега (В) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. *** *p* < 0,0001; ** *p* < 0,001; * *p* < 0,05.

4.3.3. Концентрација глукозе у крви

У циљу испитивања антидијабетичког потенцијала одабраног хетерополиволфрамата {NaP₅W₃₀}, најпре је испитиван његов ефекат на вредности хипергликемије дијабетичких пацова. Током три недеље, дијабетички пацови су перорално добијали {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg. Вредности концентрације глукозе у крви (mmol/L) свих огледних животиња, одређиване 0, 7, 14 и 21. дана третмана, приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 8**. Вредности гликемија у контролној нормогликемичкој и дијабетичкој групи нису се значајно мењале током експерименталног периода посматрања, односно статистички значајна разлика у вредностима гликемије између ове две испитиване групе одржавала се током укупног периода праћења (21 дан). Насупрот овим резултатима, уочава се да испитивани хетерополиволфрамат и инсулин статистички значајно снижавају вредности хипергликемије дијабетичких пацова. Заправо, 7. дана третмана може се приметити статистички значајан пад вредности (*p* < 0,05) гликемије у дијабетичкој групи која је добијала инсулин [12,1 (8,5–24,8)], у односу на (контролну) дијабетичку групу [24,3 (19,7–31,8)]. Истог дана, пад вредности хипергликемије у дијабетичкој групи која је перорално добијала испитивани хетерополиволфрамат [18,6 (14,6–23,1)] је такође приметан, али није статистички значајан у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [24,3 (19,7–31,8)]. Затим, 14. дана третмана уочава се да испитивани хетерополиволфрамат и инсулин снижавају хипергликемију, али не до вредности које су статистички значајно ниже у односу

на (контролну) дијабетичку групу. Насупрот овим резултатима, на крају експерименталног периода (21. дан) уочава се статистички значајна редукција гликемије у дијабетичкој групи третираној {NaP₅W₃₀} [17,5 (13,5–31,8)], као и у дијабетичкој групи третираној инсулином [16,0 (15,2–21,7)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [24,3 (21,7–31,3)] (p < 0,05 и p < 0,05, редом). Затим, уочава се да третмани испитиваним хетерополиволфрамом и инсулином смањују вредности хипергликемије, али их не враћају на нормалне вредности, тако да постоји статистички значајна разлика између контролне нормогликемичке групе [7,3 (6,4–9,1)] и дијабетичких група третираних {NaP₅W₃₀} [17,5 (13,5–31,8)] и инсулином [17,5 (13,5–21,9)] (p < 0,001 и p < 0,001, редом). Насупрот овим резултатима, не уочава се статистичка значајна разлика у вредностима гликемије између дијабетичке групе третиране {NaP₅W₃₀} и дијабетичке групе третиране инсулином.



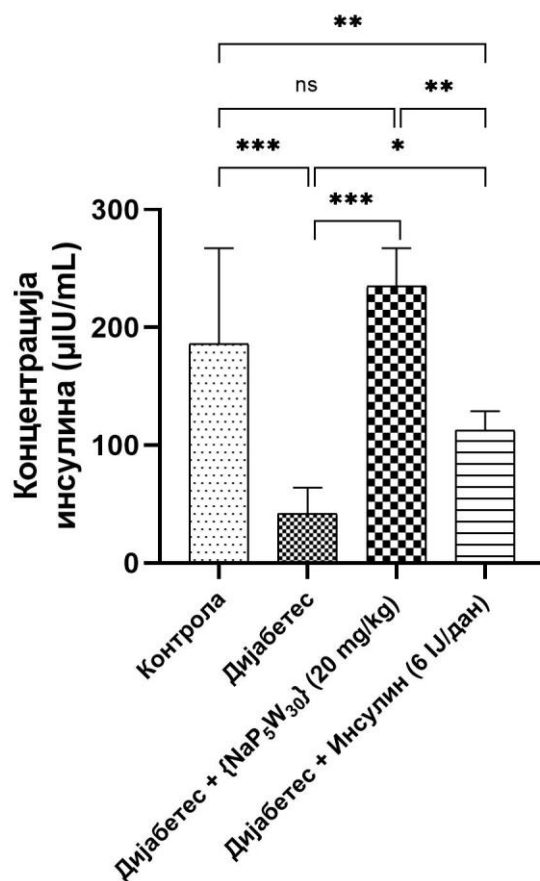
Графикон 8. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на вредности концентрације глукозе у крви дијабетичких пацова. Вредности концентрације глукозе у крви огледних животиња одређиване су 0, 7, 14 и 21 дана експеримента. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. *** p < 0,0001; ** p < 0,001; * p < 0,05; ns — без статистичке значајности.

4.3.4. Концентрација инсулина у серуму

Будући да су поједине студије показале да одређени метални комплекси повећавају секрецију инсулина у β -ћелијама Лангерхансових острваца панкреаса (205), надаље је испитиван утицај $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ на концентрацију инсулина у серуму дијабетичких пацова, у циљу расветљавања механизма добијеног антихипергликемијског деловања синтетисаних хетерополиволфрамата код дијабетичких пацова.

Измерене вредности серумске концентрације инсулина ($\mu\text{IU/mL}$) свих експерименталних група приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 9**. Запажа се статистички значајан пад вредности серумске концентрације инсулина у (контролној) дијабетичкој групи [41,9 (28,7–62,3)], у поређењу са контролном групом [186,2 (164,2–267,2)] ($p < 0,0001$). Са друге стране, перорална примена хетерополиволфрамата $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ код дијабетичких пацова статистички значајно повећава ниво серумског инсулина [235,0 (175,3–267,2)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [41,9 (28,7–62,3)] и дијабетичком групом третираном инсулином [112,9 (100,6–124,0)] ($p < 0,0001$ и $p < 0,05$, редом). Не уочава се статистички значајна разлика у вредностима серумске концентрације инсулина између контроле групе и дијабетичке групе третиране $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$. Додатно се уочава да су вредности серумске концентрације инсулина у дијабетичкој групи која је третирана инсулином [112,9 (100,6–124,0)] статистички значајно више у односу на (контролну) дијабетичку групу [41,9 (28,7–62,3)], али су статистички значајно ниже у односу на контролну групу [186,2 (164,2–267,2)] ($p < 0,05$ и $p < 0,001$, редом)

На основу добијених резултата може се закључити да испитивани хетерополиволфрамаат $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ повећава секрецију инсулина из β -ћелија Лангерхансових острваца панкреаса дијабетичких пацова. То би могло да представља један од могућих механизма деловања хетерополиволфрамата у снижавању вредности хипергликемије (202).



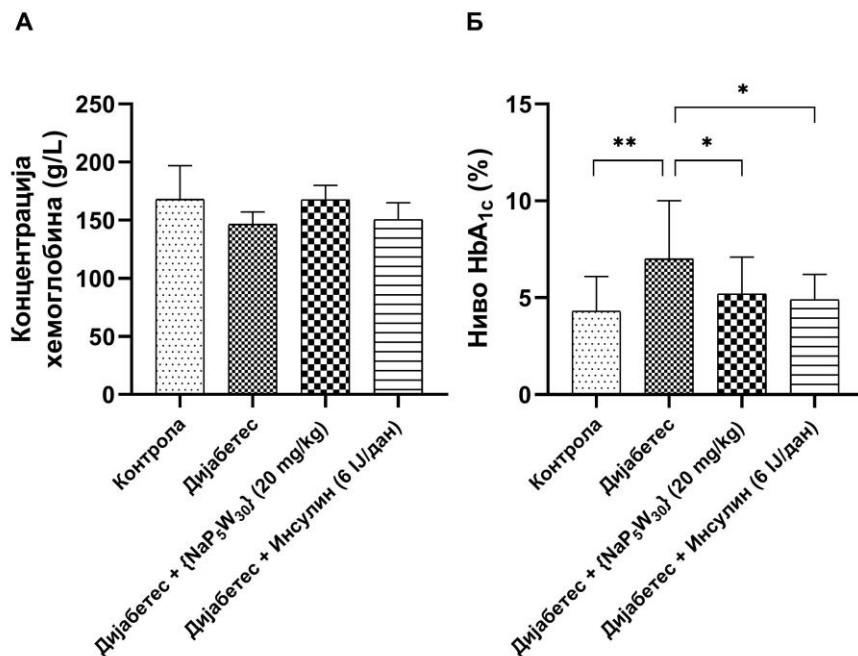
Графикон 9. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на вредности нивоа инсулина у серуму дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns — без статистичке значајности.

4.3.5. Ниво укупног и гликозилираног хемоглобина A_{1c}

Имајући у виду да HbA_{1c} представља кључни параметар за праћење регулисаности DM и процену ризика од микроваскуларних компликација, испитиван је утицај {NaP₅W₃₀} у дневној дози од 20 mg/kg током три недеље на ниво HbA_{1c} у некоагулисаном пуној крви дијабетичких пацова. Такође, због позитивне корелације између анемије и повишених вредности нивоа HbA_{1c}, одређивана је и концентрација хемоглобина код експерименталних животиња.

На **Графикону 10** приказане су вредности концентрације укупног хемоглобина (g/L) и нивоа HbA_{1c} (% од укупног хемоглобина) свих експерименталних група. Поређење вредности концентрације укупног хемоглобина испитиваних група није показало постојање статистички значајне разлике. Насупрот овим резултатима, запажа се статистички значајан пораст нивоа HbA_{1c} у контролној (дијабетичкој) групи [7,0 (5,5–8,9)] у односу на контролну нормогликемичку групу [4,3 (3,8–5,2)] ($p < 0,001$). Такође, третман дијабетичке групе

{NaP₅W₃₀} [5,2 (4,3–5,9)] и инсулином [4,9 (4,4–6,1)] током три недеље доводи до статистички значајног пада нивоа HbA_{1c} у односу на (контролну) дијабетичку групу [7,0 (5,5–8,9)] ($p < 0,05$ и $p < 0,05$, редом). Не уочава се статистички значајна разлика у нивоу HbA_{1c} између контролне нормогликемичке групе и дијабетичких група које су добијале {NaP₅W₃₀}/инсулин током три недеље.



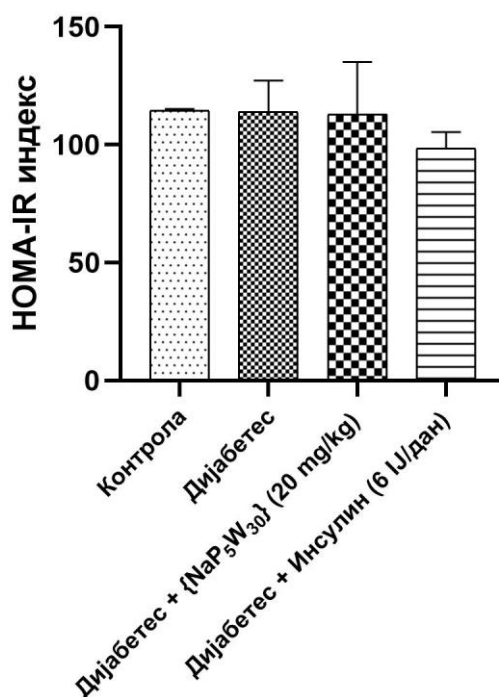
Графикон 10. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугodelујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на концентрацију укупног хемоглобина и ниво HbA_{1c} у крви дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

4.3.6. НОМА-IR индекс

Добро је познато да је смањена осетљивост ткива (јетра, скелетни мишићи и масно ткиво) на дејство инсулина укључена у развој хипергликемије код особа оболелих од DM тип 2. Стога у циљу расветљавања могућих механизма антидијабетичког деловања ПОМ, испитиван је утицај одабраног хетерополиволфрамата, {NaP₅W₃₀} на инсулинску резистенцију дијабетичких пацова помоћу хомеостазног модела инсулинске резистенције, који се израчунава као: $\text{НОМА-IR} = [(\text{инсулинемија (mIU/L)} \times \text{гликемија (mmol/L)}) / 22,5]$. Добијене вредности приказане су на **Графикону 11**.

Не запажа се статистички значајна разлика у вредностима НОМА-IR индекса између (контролне) дијабетичке [114,00 (73,23–127,30)] и контролне нормогликемичке групе [114,60 (109,2–115,2)]. Такође, не запажа се статистички значајна разлика у вредностима НОМА-IR индекса између (контролне) дијабетичке групе [114,60 (73,23–127,30)] и дијабетичких група

које су добијале испитивани хетерополиволфрамат [113,00 (102,20–135,10)], односно инсулин [98,49 (84,16–105,30)] током три недеље. Додатно, не уочава се статистички значајна разлика у вредностима НОМА-IR индекса између дијабетичке групе третиране испитиваним хетерополиволфраматом и дијабетичке групе третиране инсулином.



Графикон 11. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугodelујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на вредности НОМА-IR индекса дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група.

4.3.7. Концентрација електролита у крви

Будући да хипергликемија може довести до поремећаја хомеостазе микронутријената у организму, као и да одређени микронутријенти учествују у регулацији метаболизма глукозе и инсулина, у току истраживања одређиване су серумске концентрације натријума, калијума, хлорида, фосфата, укупног калцијума и магнезијума, као и концентрације јонизованог калцијума и јонизованог магнезијума у некоагулисаној пуној крви експерименталних животиња. Измерене вредности концентрација наведених јона (електролита) приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 12**.

Натријум

Резултати добијени за серумску концентрацију натријума (mmol/L) (**Графикон 12А**) показују да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [147,0 (146,0–155,0)] и (контролне) дијабетичке групе [143,0 (140,0–155,0)]. Такође, вредности серумске концентрације натријума нису се статистички значајно

мењале у дијабетичким групама третираним $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ [145,5 (142,0–149,0)] и инсулином [143,0 (140,0–157,0)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [143,0 (140,0–155,0)].

Калијум

Измерене вредности серумске концентрације калијума (mmol/L) износиле су [7,1 (5,8–7,9)] код контролних нормогликемичких животиња, [6,5 (5,1–7,2)] код (контролних) дијабетичких животиња, [6,8 (5,0–7,6)], код дијабетичких животиња третираним $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и [6,7 (5,5–10,2)] код дијабетичких животиња третираним инсулином (**Графикон 12Б**). Статистичком анализом утврђено је да се вредности серумске концентрације калијума статистички значајно не разликују између испитиваних група животиња.

Хлориди

Сличан тренд се може запазити и код серумске концентрације хлорида (mmol/L). Измерене вредности показују да није дошло до статистичке значајне промене у вредностима серумске концентрације хлорида између контролне нормогликемичке [103,5 (101,0–105,0)] и (контролне) дијабетичке групе [99,0 (94,0–104,0)] (**Графикон 12В**). Такође, тронедељна примена 20 mg/kg/дан $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ [99,5 (96,0–104)], као и 6 IJ/дан хуманог дугodelујућег инсулина [101,0 (97,0–107,0)] није довела до статистички значајне промене серумске концентрације хлорида код дијабетичких животиња, у односу на (контролну) дијабетичку групу [99,0 (94,0–104,0)].

Неоргански фосфат

Измерене вредности серумске концентрације неорганског фосфата (mmol/L) износиле су [3,3 (2,8–3,8)] код контролних нормогликемичких животиња, [3,1 (2,3–3,8)] код (контролних) дијабетичких животиња, [2,7 (2,3–3,2)] код дијабетичких животиња третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и [3,3 (2,5–3,7)] код дијабетичких животиња третираних инсулином (**Графикон 12Г**). Статистичком анализом утврђено је да се вредности серумске концентрације неорганског фосфата статистички значајно не разликују између испитиваних група животиња.

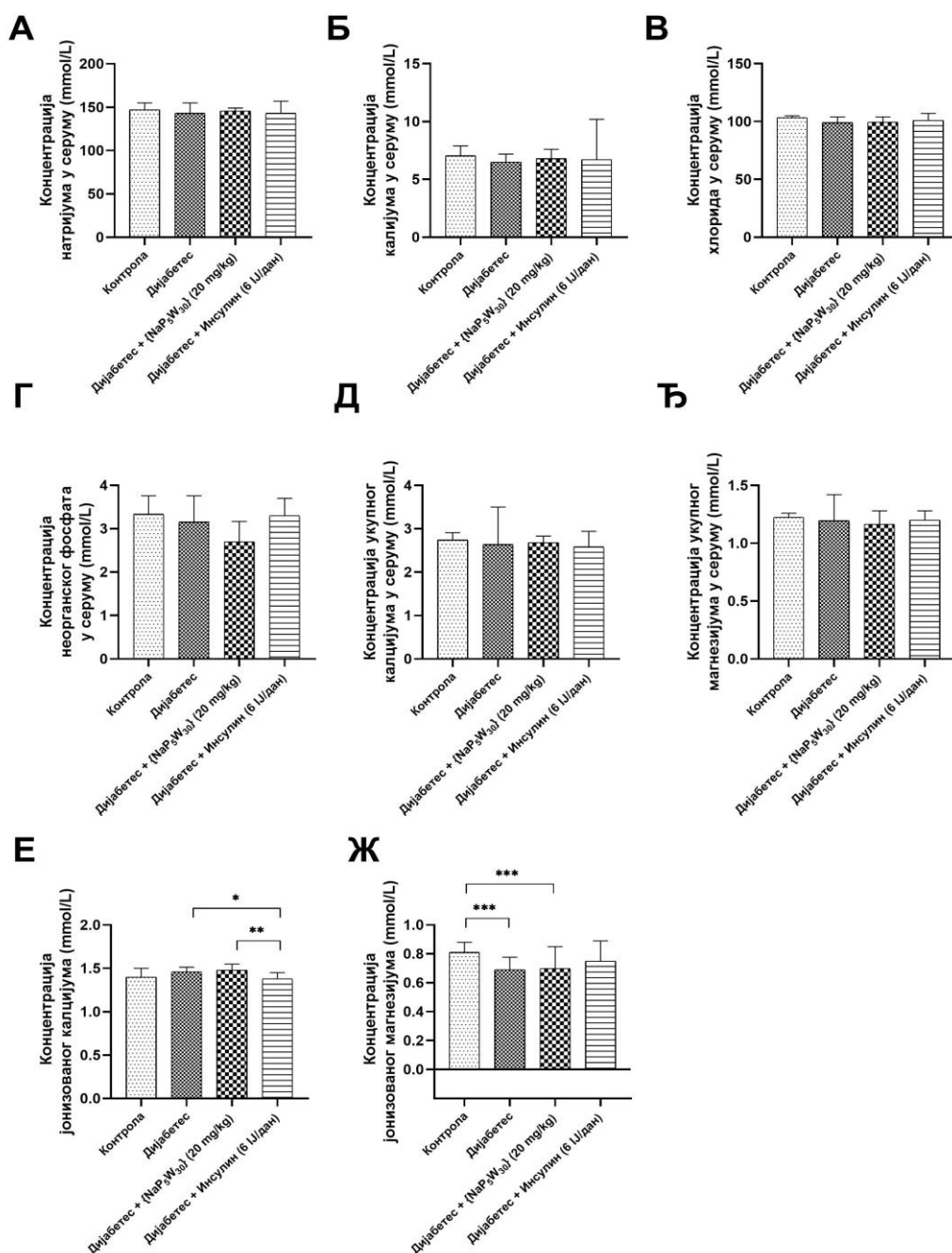
Калцијум

Резултати за концентрацију укупног калцијума (mmol/L) у серуму експерименталних животиња (**Графикон 12Д**), показују да није дошло до статистички значајне промене у добијеним вредностима између посматраних експерименталних група. За концентрацију јонизованог калцијума у некоагулисаној пуној крви (**Графикон 12Е**), може се уочити тренд ка повећању вредности (mmol/L) у (дијабетичкој) контролној групи [1,46 (1,35–1,51)] и дијабетичкој групи третираној $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ [1,48 (1,27–1,55)], али без статистичке значајности у односу на контролну нормогликемичку групу [1,40 (1,31–1,50)]. Насупрот овим резултатима,

запажа се статистички значајно смањење концентрације јонизованог калцијума у дијабетичкој групи третираној инсулином [1,38 (1,29–1,45)], у односу на (контролну) дијабетичку групу [1,46 (1,35–1,51)] и дијабетичку групу која је добијала {NaP₅W₃₀} [1,48 (1,27–1,55)] (p < 0,05 и p < 0,001, редом).

Магнезијум

Статистичком анализом утврђено је да не постоји статистичка значајна разлика у серумској концентрацији укупног магнезијума између посматраних експерименталних група (**Графикон 12Б**). Са друге стране, запажа се статистички значајно смањење концентрације јонизованог магнезијума (mmol/L) (**Графикон 12Ж**) у (контролној) у дијабетичкој групи [0,69 (0,53–0,77)] и дијабетичкој групи третираној {NaP₅W₃₀} [0,70 (0,54–0,85)], у поређењу са контролном нормогликемичком групом [0,81 (0,70–0,88)] (p < 0,0001 и p < 0,0001). Затим, приметан је пораст концентрације јонизованог магнезијума у дијабетичкој групи третираној инсулином [0,75 (0,61–0,89)], али без статистичке значајности, у односу на дијабетичку контролну групу [0,69 (0,53–0,77)].



Графикон 12. Серумска концентрација натријума (А), калијума (Б), хлорида (В), фосфата (Г), укупног калцијума (Д) и укупног магнезијума (Љ), као и концентрација јонизованог калцијума (Е) и јонизованог магнезијума (Ж) у некоагулисаној пуној крви експерименталних животиња. У контролној нормогликемичкој/дијабетичкој групи, здрави/дијабетички пацови су третирали 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. У дијабетес + {NaP₅W₃₀} групи, дијабетички пацови су перорално добијали испитивани хетерополивофрамат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током три недеље. У дијабетес + инсулин групи, дијабетичке животиње су субкутано добијале хумани дугоделујући инсулин у појединачној дневној дози од 6 IU током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ****p* < 0,0001; ***p* < 0,001; * *p* < 0,05.

4.3.8. Параметри липидног статуса

Будући да корекција липидних поремећаја, поред снижавања хипергликемије, представља значајан корак у лечењу особа оболелих од DM, као и да су раније студије показале антихиперлипидемијски ефекат ПОМ (205), у студији је испитиван утицај одабраног хетерополиволфрамата, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, на параметре липидног статуса (серумска концентрација укупног холестерола, LDL-холестерола, HDL-холестерола, Apo-A1 и Apo-B и укупних триглицерида) код животиња са експерименталним DM. Добијени резултати приказани су као медијана (опсег) на **Графикон 13**.

Укупни холестерол

Резултати статистичке анализе показују да испитивани хетерополиволфрамаат статистички значајно снижава вредност укупног холестерола (mmol/L) у серуму дијабетичких животиња [1,65 (1,48–1,74)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [2,22 (2,00–2,86)] и дијабетичком групом третираном инсулином [2,75 (2,26–3,37)] (**Графикон 13А**) ($p < 0,001$ и $p < 0,0001$, редом). Такође, запажа се да примена егзогеног инсулина 6 IJ/дан током три недеље статистички значајно повећава вредност концентрације укупног холестерола у серуму дијабетичких животиња [2,75 (2,26–3,37)], у поређењу са контролном нормогликемичком групом [1,94 (1,87–2,15)] ($p < 0,001$).

Холестерол у липопротеинима мале густине

Серумска концентрација LDL-холестерола (mmol/L) износила је [0,45 (0,43–0,64)] код контролних нормогликемијских животиња, [0,70 (0,58–0,86)] код (контролних) дијабетичких животиња, [0,69 (0,46–1,14)] код дијабетичких животиња третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и [0,82 (0,60–1,06)] код дијабетичких животиња третираних инсулином (**Графикон 13Б**). Статистичком анализом утврђено је да се вредности серумске концентрације LDL-холестерола статистички значајно не разликују између испитиваних група животиња.

Холестерол у липопротеинима велике густине

Запажа се да испитивани $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (**Графикон 13В**), у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, статистички значајно снижава серумску концентрацију HDL-холестерола (mmol/L) код дијабетичких пацова [0,58 (0,54–0,66)] након три недеље третмана, у односу на (контролну) дијабетичку групу [0,99 (0,89–1,44)] и дијабетичку групу третирану хуманим дугоделујућим инсулином [1,42 (1,14–1,61)] ($p < 0,001$ и $p < 0,0001$, редом). Затим, уочава се статистички значајно виша вредност серумске концентрације HDL-холестерола у дијабетичкој групи третираној инсулином [1,42 (1,14–1,61)], у односу на контролну нормогликемијску групу [0,83 (0,81–0,86)] ($p < 0,001$).

Аполипопротеин-А1

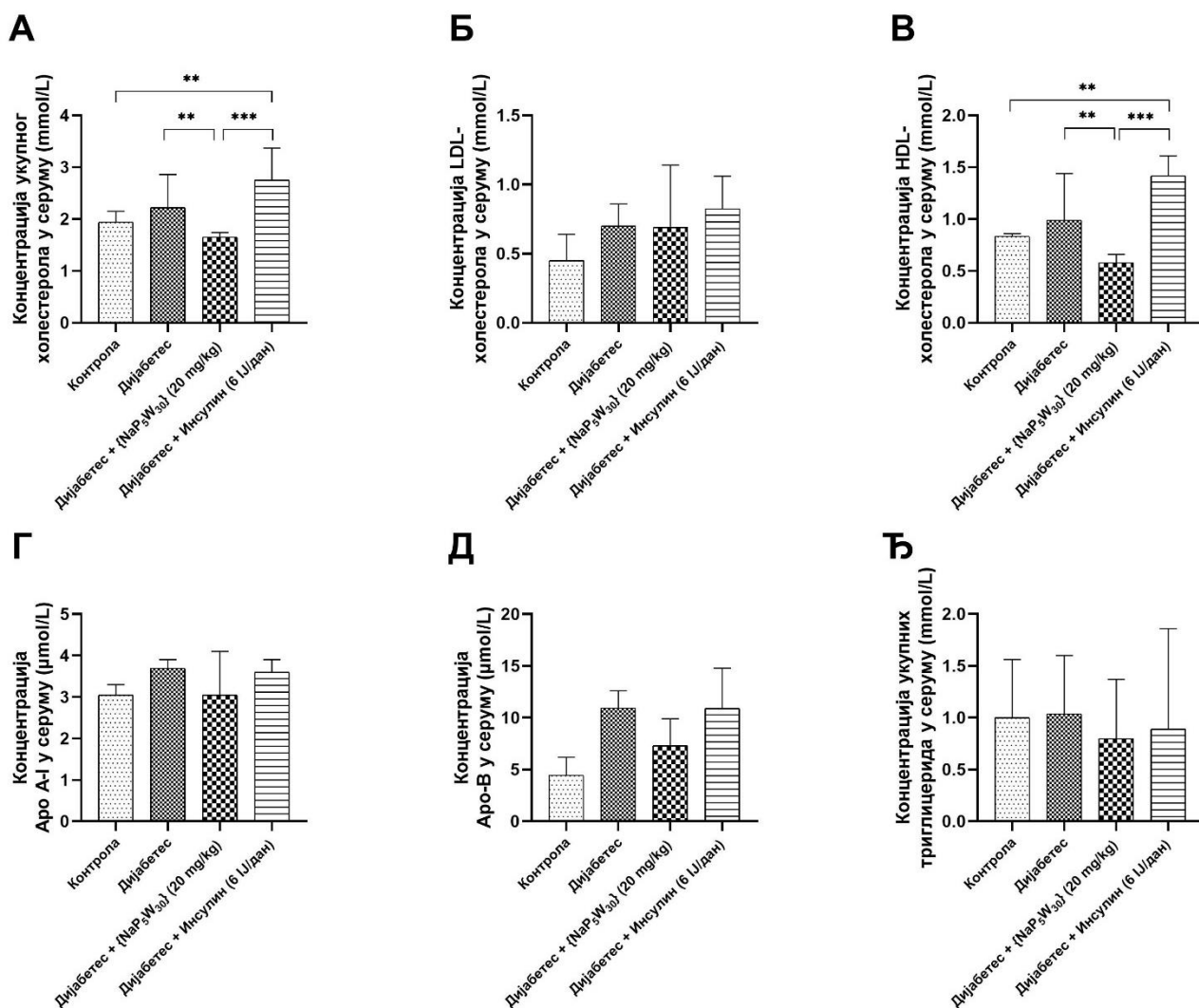
Измерене вредности серумске концентрације Аро-А1 ($\mu\text{mol/L}$) показују да није дошло до статистичке значајне промене између посматраних експерименталних група (**Графикон 13Г**). Уочава се тренд пораста вредности концентрације Аро-А1 у (контролној) дијабетичкој групи [3,70 (3,20–3,90)], у односу на контролну нормогликемичку групу [3,05 (2,80–3,30)], али без статистичке значајности. Такође, запажа се да тронедељна примена 20 mg/kg/дан {NaP₅W₃₀} [3,05 (2,80–4,10)], као и 6 IJ/дан хуманог дугоделујућег инсулина [3,60 (2,50–3,90)] нема статистички значајан утицај на серумску концентрацију Аро-А1 код дијабетичких животиња, у односу на (контролну) дијабетичку групу [3,70 (3,20–3,90)].

Аполипопротеин-В

Сличан тренд се запажа и код серумске концентрације Аро-В ($\mu\text{mol/L}$). Резултати показују да није дошло до статистичке значајне промене у вредностима серумске концентрације Аро-В између контролне нормогликемичке и (контролне) дијабетичке групе (**Графикон 13Д**). Такође, тронедељна примена 20 mg/kg/дан {NaP₅W₃₀} [7,30 (3,60–9,90)] и 6 IJ/дан хуманог дугоделујућег инсулина [10,90 (2,70–14,80)] нема статистички значајан утицај на серумску концентрацију Аро-В код дијабетичких животиња, у односу на (контролну) дијабетичку групу [10,95 (9,90–12,60)].

Укупни триглицериди

Серумска концентрација укупних триглицерида (mmol/L) износила је [1,00 (0,50–1,56)] код контролних нормогликемичких животиња, [1,03 (0,71–1,60)] код контролних дијабетичких животиња, [0,80 (0,57–1,37)] код дијабетичких животиња третираних {NaP₅W₃₀} и [0,89 (0,39–1,86)] код дијабетичких животиња третираних инсулином (**Графикон 13Б**). Статистичком анализом утврђено је да се вредности серумске концентрације укупних триглицерида статистички значајно не разликују између испитиваних група животиња.



Графикон 13. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на вредности концентрације укупног холестерола (А), LDL-холестерола (Б), HDL-холестерола (В), Аро-А1 (Г), Аро-В (Д) и укупних триглицерида (Ђ) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey test* су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ****p* < 0,0001; ** *p* < 0,001.

4.3.9. Биохемијски параметри инфламације

Након запажања да инфламација има кључну улогу у патогенези атеросклерозе, Америчко удружење кардиолога (енг. *American Heart Association*) и Центар за контролу болести (енг. *Center for Disease Control*) дали су 2003. године препоруку да би за процену кардиоваскуларног ризика, поред традиционалних фактора ризика, требало испитати параметре инфламације (251). У циљу процене могућег протективног утицаја хетерополиволфрамата на кардиоваскуларни ризик, испитиван је утицај одабраног хетерополиволфрамата {NaP₅W₃₀} на серумску концентрацију CRP и феритина дијабетичких пацова (Графикон 14).

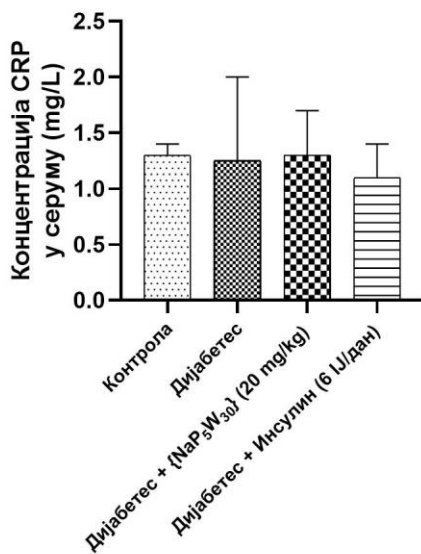
C-реактивни протеин

Серумска концентрација CRP (mg/L) износила је [1,30 (1,00–1,40)] код контролних нормогликемичких животиња, [1,25 (1,10–2,00)] код (контролних) дијабетичких животиња, [1,30 (0,90–1,70)] код дијабетичких животиња третираних {NaP₅W₃₀} и [1,10 (0,80–1,40)] код дијабетичких животиња третираних инсулином (**Графикон 14А**). Статистичком анализом утврђено је да се вредности серумске концентрације CRP статистички значајно не разликују између испитиваних група животиња.

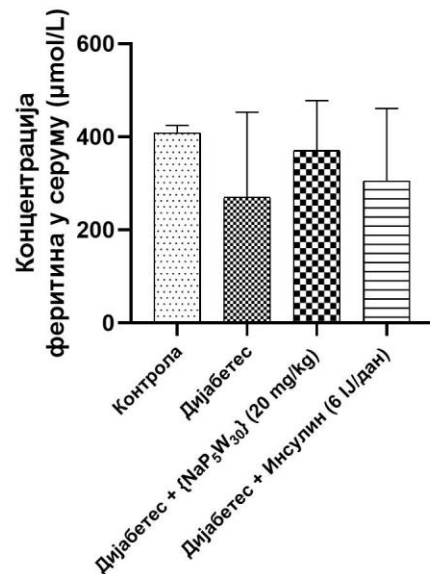
Феритин

Анализом измерених вредности серумске концентрације феритина (μmol/L) (**Графикон 14Б**) утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [408,30 (391,80–424,80)] и (контролне) дијабетичке групе [270,60 (178,20–453,20)]. Такође, вредности серумске концентрације феритина нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираних {NaP₅W₃₀} [370,60 (270,60–478,20)] и инсулином [305,10 (214,30–461,40)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [270,60 (178,20–453,20)].

А



Б



Графикон 14. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на вредности концентрације CRP (А) и феритина (Б) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група.

4.3.10. Биохемијски параметри функције јетре

Будући да метаболички поремећаји код оболелих од ДМ, највероватније ефектима хроничне системске инфламације узроковане повећаним стварањем слободних радикала, доводе до дисфункције и оштећења јетре, анализиран је протективни утицај хетерополиволфрамата $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ на дисфункцију јетре код дијабетичких животиња. Мерењем серумске активности АСТ и АЛТ процењен је степен хепатоцелуларног оштећење јетре. Поред тога, на основу вредности серумске активности АЛП одређиван је степен оштећења јетре холестазног типа, док је поремећај синтетске функције јетре процењен на основу серумске концентрације укупних протеина и албумина. Добијене вредности приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 15**.

Аспартат аминотрансфераза

Упоредном анализом добијених резултата може се уочити тренд повећања вредности серумске активности АСТ (IU/L) у (контролној) дијабетичкој групи [548,00 (375,00–578,00)], али без статистичке значајне разлике у поређењу са контролном нормогликемичком групом [465,00 (392,00–575,00)] (**Графикон 15А**). Такође, не запажа се статистички значајна разлика у серумској активности АСТ између (контролне) дијабетичке групе [548,00 (375,00–578,00)] и дијабетичких група које су добијале испитивани хетерополиволфрамаат, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ [386,00 (321,00–528,00)], односно егзогени инсулин [387,00 (248,00–497,00)] током три недеље. Коначно, не уочава се статистички значајна разлика у вредностима серумске активности АСТ између дијабетичке група третиране испитиваним хетерополиволфрамаатом и дијабетичке групе третиране инсулином.

Аланин аминотрансфераза

Анализом добијених вредности серумске активности АЛТ (IU/L), уочава се статистички значајно повећање вредности у (контролној) дијабетичкој групи [151,90 (76,50–164,00)], у поређењу са контролном нормогликемичком групом [86,00 (63,60–95,60)] ($p < 0,05$) (**Графикон 15Б**). Такође, испитивани хетерополиволфрамаат, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ статистички значајно снижава активност АЛТ у серуму дијабетичких животиња [92,80 (81,70–110,50)] у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [151,90 (76,50–164,00)] ($p < 0,05$). Сличан статистички значајан пад вредности серумске активности АЛТ забележен је и у дијабетичкој групи третираној инсулином [94,30 (67,90–123,70)], у односу на (контролну) дијабетичку групу [151,90 (76,50–164,00)] ($p < 0,05$). Са друге стране, дијабетичка група третирана $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и дијабетичка група третирана инсулином имале су сличне вредности серумске активности АЛТ, које се нису статистички значајно разликовале, у односу на контролну нормогликемичку групу.

Алкална фосфатаза

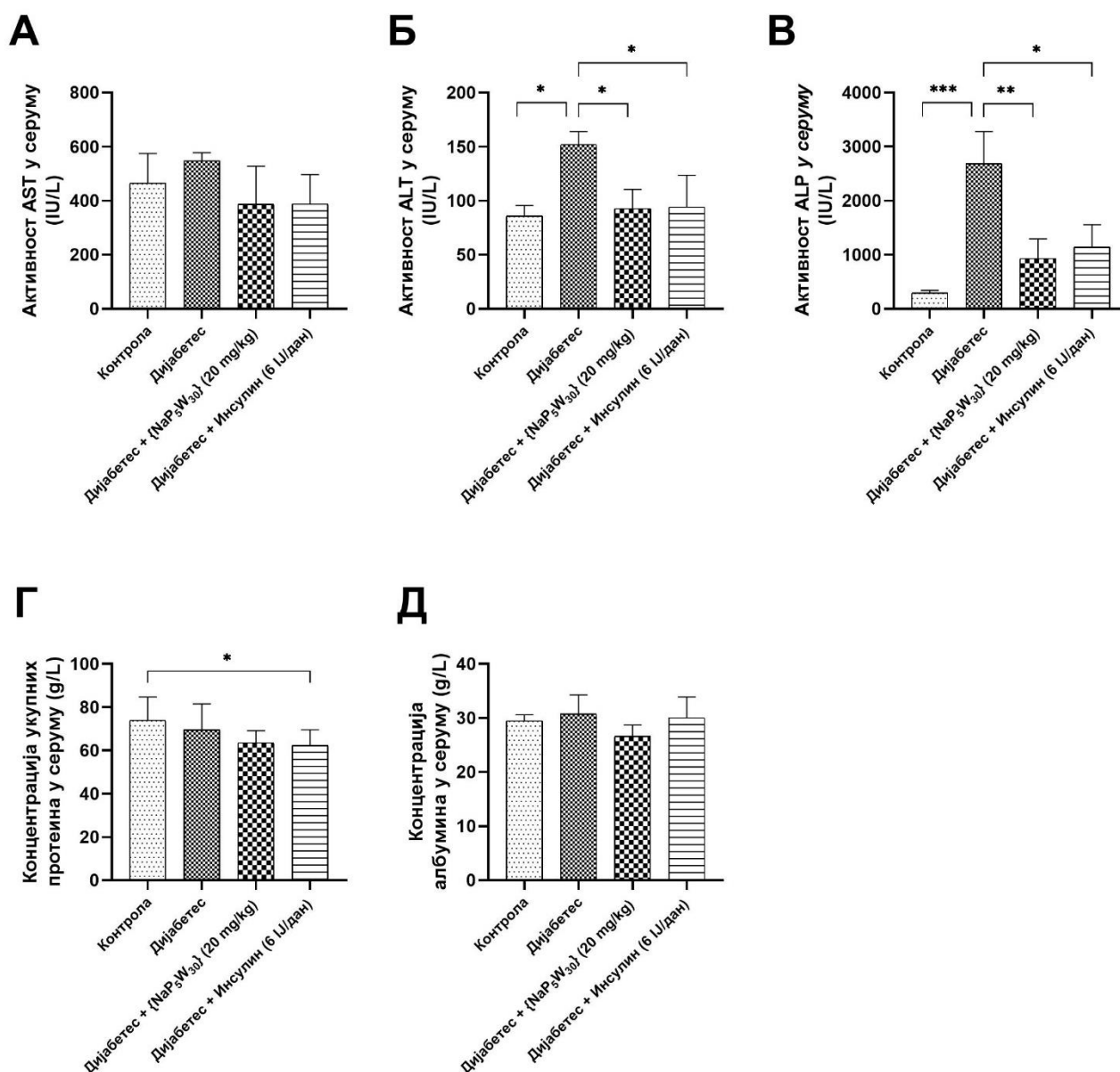
Добијени резултати серумске активности ALP (IU/L) приказани су на **Графикону 15В**. У (контролној) дијабетичкој групи запажа се изразито, статистички значајно повећање серумске активности ALP [2688,00 (965,00–3281,00)], у поређењу са контролном нормогликемичком групом [295,00 (284,00–344,00)] ($p < 0,0001$). Затим, тронедељна примена {NaP₅W₃₀}, у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, довела је до статистички значајног пада вредности активности ALP у серуму дијабетичких животиња [934,00 (419,00–1295,00)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [2688,00 (965,00–3281,00)] ($p < 0,001$). Сличан статистички значајан пад вредности серумске активности ALP забележен је и у дијабетичкој групи након тронедељне примене хуманог дугоделујућег инсулина [1143,00 (710,00–1555,00)], у односу на (контролну) дијабетичку групу [2688,00 (965,00–3281,00)] ($p < 0,05$). Са друге стране, дијабетичка група третирана испитиваним хетерополиволфрамоматом и дијабетичка група третирана инсулином имале су сличне вредности серумске активности ALP, које се нису статистички значајно разликовале, у односу на контролну нормогликемичку групу.

Укупни протеини

Анализом вредности серумске концентрације укупних протеина (g/L), утврђено је да није дошло до статистичке значајне промене у овим вредностима између контролне нормогликемичке [74,00 (71,60–84,70)] и (контролне) дијабетичке групе [69,90 (54,10–81,60)] (**Графикон 15Г**). Такође, тронедељна примена 20 mg/kg/дан {NaP₅W₃₀} и 6 IJ/дан хуманог дугоделујућег инсулина није довела до статистички значајних промена у вредностима серумске концентрације укупних протеина дијабетичких пацова, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Насупрот овим резултатима, запажа се статистички значајан пад вредности серумске концентрације укупних протеина у дијабетичкој групи третираној инсулином [62,20 (52,60–69,60)], у односу на контролну нормогликемичку групу [74,00 (71,60–84,70)] ($p < 0,05$). Међутим, не уочава се статистички значајна разлика у вредностима серумске концентрације укупних протеина између дијабетичке групе третиране {NaP₅W₃₀} и контролне нормогликемичке групе.

Албумини

Добијене вредности серумске концентрације албумина (g/L) приказане су на **Графикону 15Д**. Не запажа се статистички значајна разлика у вредностима серумске концентрације албумина између (контролне) дијабетичке [30,75 (22,60–34,30)] и контролне нормогликемичке групе [29,50 (28,50–30,60)]. Такође, не запажа се статистички значајна разлика у серумској концентрацији албумина између (контролне) дијабетичке групе [30,75 (22,60–34,30)] и дијабетичких група које су добијале испитивани хетерополиволфрамомат, {NaP₅W₃₀} [26,60 (24,70–28,70)], односно инсулин [30,00 (26,80–33,90)] током три недеље. Коначно, не уочава се статистички значајна разлика у вредностима серумске концентрације албумина између дијабетичке групе третиране испитиваним хетерополиволфрамоматом и дијабетичке групе третиране инсулином.



Графикон 15. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на биохемијске параметре функције јетре — серумске активности AST (А), ALT (Б) и ALP (В), и серумске концентрације укупних протеина (Г) и албумина (Д) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ****p* < 0,0001; ** *p* < 0,001; * *p* < 0,05.

4.3.11. Биохемијски параметри функције бубрега

Имајући у виду да дијабетичка нефропатија представља један од водећих узрока терминалне бубрежне слабости у већини развијених земаља, у студији је испитиван протективан утицај {NaP₅W₃₀} на ову честу микроваскуларну компликацију DM. Најпре је анализиран ефекат примене одабраног хетерополиволфрамата на бубрежну функцију дијабетичких животиња одређивањем стандардних (концентрације урее, креатинина и

мокраћне киселине), али и новијих биомаркера бубрежног оштећења (концентрације KIM-1 и NGAL) у серуму. Добијене вредности наведених концентрација приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 16**.

Уреа

Серумска концентрација урее (mmol/L) у групи (контролних) дијабетичких животиња [12,95 (9,70–16,90)] је статистички значајно виша у односу на контролну нормогликемичку групу [8,75 (7,90–9,10)] (**Графикон 16А**) ($p < 0,001$). Тронеделна примена одабраног хетерополиволфрамата, {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, довела је до статистички значајног пада вредности концентрације урее у серуму дијабетичких животиња [8,90 (7,90–10,90)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [12,95 (9,70–16,90)] ($p < 0,05$). Насупрот овим резултатима, запажа се пад вредности концентрације урее у дијабетичкој групи третираној инсулином, али без статистичке значајне разлике у односу на (контролну) дијабетичку групу. Додатно, дијабетичка група третирана испитиваним хетерополиволфраматом [8,90 (7,90–10,90)] и дијабетичка група третирана инсулином [10,80 (8,60–11,70)] имале су сличне вредности серумске концентрације урее, које се нису статистички значајно разликовале, у односу на контролну нормогликемичку групу [8,75 (7,90–9,10)].

Креатинин

Анализом вредности серумске концентрације креатинина ($\mu\text{mol/L}$), утврђено је да није дошло до статистичке значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке [70,90 (63,50–73,60)] и (контролне) дијабетичке групе [65,90 (61,50–75,60)] (**Графикон 16Б**). Поред тога, не уочава се статистички значајна разлика у вредностима серумске концентрације креатинина између (контролне) дијабетичке групе и дијабетичких група третираних {NaP₅W₃₀}/инсулином. Насупрот овим резултатима, запажа се статистички значајан пад вредности серумске концентрације креатинина у дијабетичкој групи третираној {NaP₅W₃₀} [59,85 (56,90–64,90)], у односу на контролну нормогликемичку групу [70,90 (63,50–73,60)] ($p < 0,05$). Међутим, не уочава се статистички значајна разлика у вредностима серумске концентрације креатинина између дијабетичке групе третиране инсулином и контролне нормогликемичке групе.

Мокраћна киселина

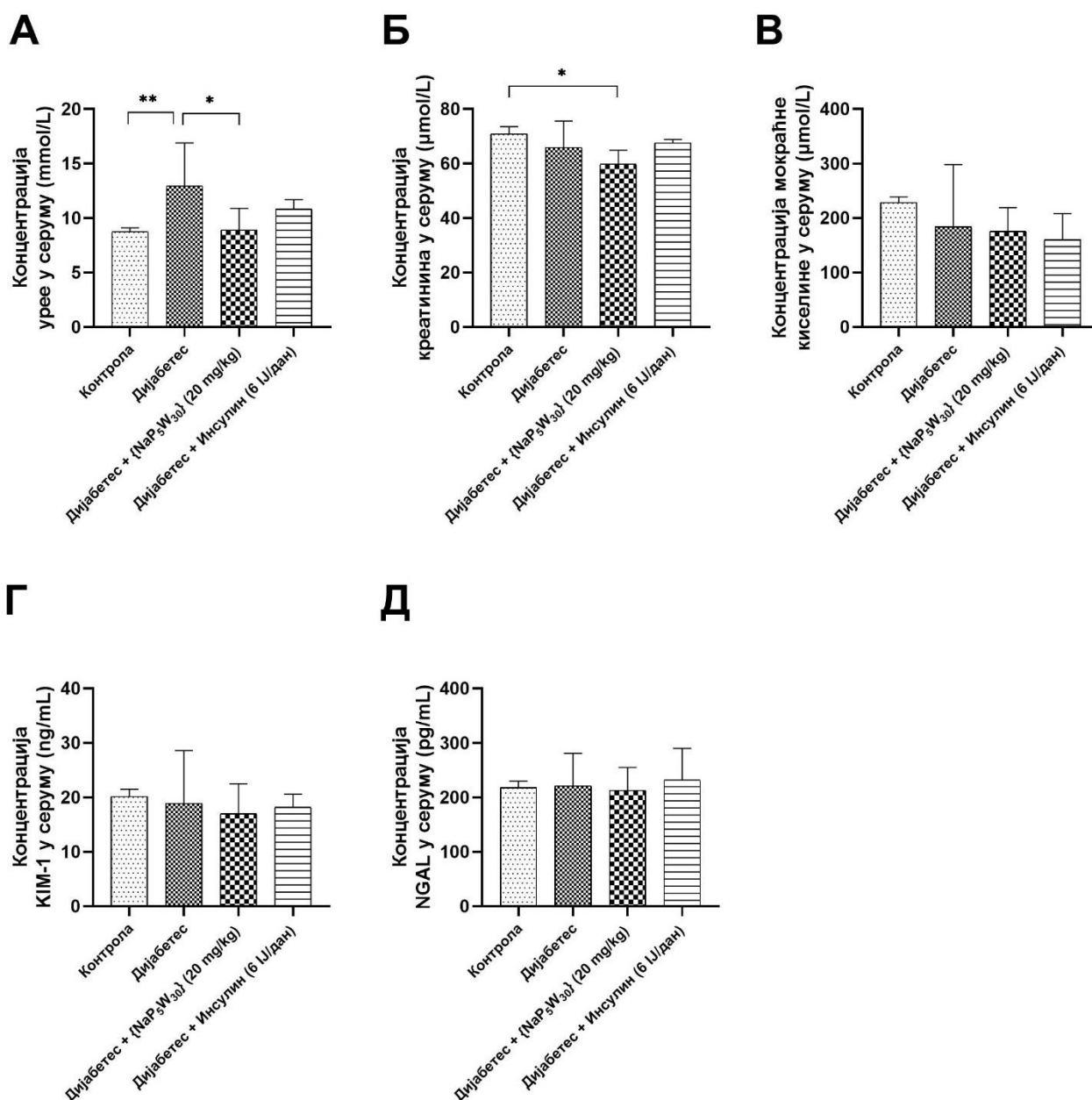
Серумска концентрација мокраћне киселине ($\mu\text{mol/L}$) износила је [228,50 (151,00–239,00)] код контролних нормогликемичких животиња, [184,00 (109,00–298,00)] код (контролних) дијабетичких животиња, [175,00 (60,00–219,00)] код дијабетичких животиња третираних {NaP₅W₃₀} и [160,00 (116,00–208,00)] код дијабетичких животиња третираних инсулином (**Графикон 16В**). Статистичком анализом утврђено је да се вредности серумске концентрације мокраћне киселине статистички значајно не разликују између испитиваних група животиња.

Молекул оштећења бубрега-1

У циљу раног откривања поремећаја бубрежне функције у серуму експерименталних животиња одређиван је ниво КИМ-1. Добијене вредности концентрације (ng/mL) приказане су на **Графикону 16Г**. Резултати статистичке анализе показују да у (контролној) дијабетичкој групи [18,90 (17,40–28,60)] не долази до пораста вредности серумске концентрације КИМ-1, у поређењу са контролном нормогликемичком групом [20,15 (18,00–21,50)]. Такође, не запажа се статистички значајна разлика између (контролне) дијабетичке групе [18,90 (17,40–28,60)] и дијабетичких група третираних испитиваним хетерополиволфрамом, {NaP₅W₃₀} [17,00 (15,60–22,50)], односно инсулином [18,20 (12,50–20,60)]. Додатно, не уочава се статистички значајна разлика у вредностима серумске концентрације КИМ-1 између дијабетичке групе третиране инсулином и контролне нормогликемичке групе.

Липокалин повезан са неутрофилном желатиназом

Поред КИМ-1, одређиван је и ниво NGAL у циљу раног откривања поремећаја бубрежне функције у серуму експерименталних животиња. Добијене вредности концентрације (pg/mL) приказане су на **Графикону 16Д**. Анализом вредности концентрације NGAL утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [218,0 (180,00–230,00)] и (контролне) дијабетичке групе [221,00 (196,00–281,00)]. Такође, вредности концентрације NGAL нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираних {NaP₅W₃₀} [213,00 (184,00–255,00)] и инсулином [232,00 (224,00–290,00)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [218,0 (180,00–230,00)].



Графикон 16. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на серумске вредности концентрације урее (А), креатинина (Б), мокраћне киселине (В), *KIM-1* (Г) и *NGAL* (Д) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

4.3.12. Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите

Литературни подаци указују да поремећени метаболички путеви у DM изазивају већи степен оксидативног стреса у ткивима и органима, што последично нарушава њихову структуру и функцију, односно доводи до развоја хроничних дијабетичких компликација(252). Имајући у виду овај податак, испитиван је утицај тронедељне примене

одабраног хетерополиволфрамата, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg на степен оксидативног стреса у срцу, јетри, бубрезима и мозгу дијабетичких пацова одређивањем концентрације SOD-1, GPx-1 и MDA. Добијени резултати приказани су као медијана (опсег).

Супероксид дизмутаза-1

На **Графикону 17** приказане су вредности концентрације SOD-1 (ng/ml) измерене у хомогенату срца, јетре и бубрега, као и у синаптозомама испитиваних група експерименталних животиња.

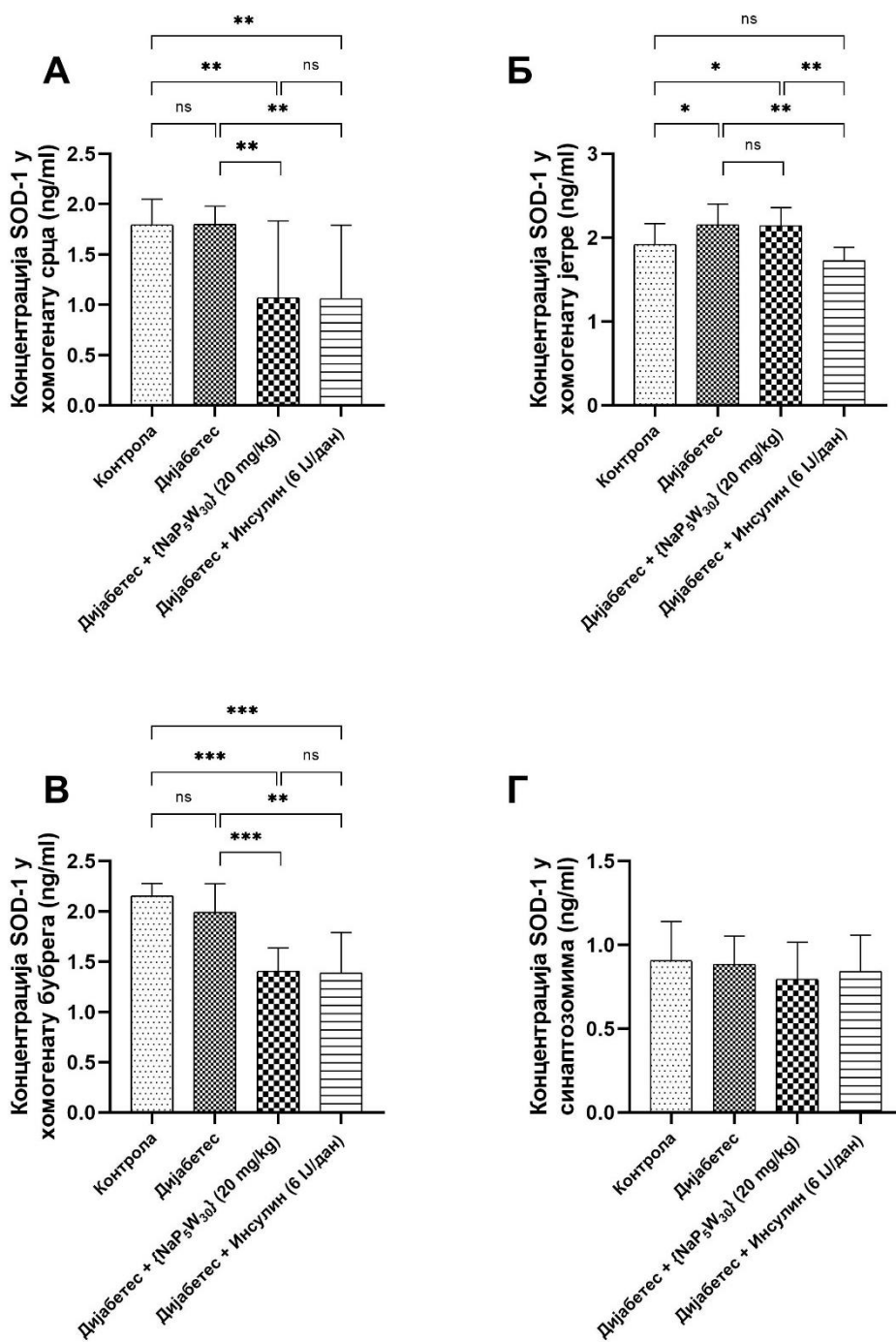
Добијени резултати показују да није дошло до статистичке значајне промене у вредностима концентрације SOD-1 у хомогенату срца између контролне нормогликемичке [1,79 (1,50–2,04)] и (контролне) дијабетичке групе [1,80 (1,67–1,93)] (**Графикон 17А**). Насупрот овим резултатима, примена одабраног хетерополиволфрамата, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, довела је до статистички значајног пада вредности концентрације SOD-1 у хомогенату срца дијабетичких животиња [1,06 (0,87–1,83)], у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [1,79 (1,50–2,04)] и дијабетичка [1,80 (1,67–1,93)] ($p < 0,001$ и $p < 0,001$, редом). Сличан статистички значајан пад вредности концентрације SOD-1 у хомогенату срца забележен је и у дијабетичкој групи третираној инсулином [1,05 (0,87–1,79)] у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [1,79 (1,50–2,04)] и дијабетичка [1,80 (1,67–1,93)] ($p < 0,001$ и $p < 0,001$, редом). Са друге стране, дијабетичка група третирана испитиваним хетерополиволфрамом и дијабетичка група третирана инсулином имале су сличне вредности SOD-1 у хомогенату срца.

У хомогенату јетре (контролне) дијабетичке групе [2,15 (2,01–2,40)] и дијабетичке групе третиране испитиваним хетерополиволфрамом [2,13 (1,99–2,35)] запажају се статистички значајно више вредности концентрације SOD-1, у поређењу са контролном нормогликемичком групом [1,91 (1,44–2,16)] ($p < 0,05$ и $p < 0,05$, редом) (**Графикон 17Б**). Тронедељна примена хуманог дугоделујућег инсулина, у појединачној дневној дози од 6 IJ, довела је до статистички значајног пада вредности концентрације SOD-1 у хомогенату јетре дијабетичких животиња [1,72 (1,64–1,88)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [2,15 (2,01–2,40)] и дијабетичком групом која је добијала $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ [2,13 (1,99–2,35)] током три недеље ($p < 0,001$ и $p < 0,001$, редом). Додатно, не уочава се статистичка значајна разлика у концентрацији SOD-1 у хомогенату јетре између контролне нормогликемичке [1,91 (1,44–2,16)] и дијабетичке групе третиране инсулином [1,72 (1,64–1,88)].

Добијене вредности концентрације SOD-1 у хомогенату бубрега приказане су на **Графикону 17В**. Запажа се да није дошло до статистичке значајне промене у вредностима концентрације SOD-1 у хомогенату бубрега између контролне нормогликемичке [2,15 (1,65–2,28)] и (контролне) дијабетичке групе [1,99 (1,71–2,27)]. Насупрот овим резултатима, запажа се да је примена одабраног хетерополиволфрамата, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, довела до статистички значајног пада вредности концентрације SOD-1 у хомогенату бубрега дијабетичких животиња [1,40 (1,24–1,63)], у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [2,15 (1,65–2,28)] и дијабетичка [1,99 (1,71–2,27)] ($p < 0,0001$ и p

< 0,0001, редом). Сличан статистички значајан пад вредности концентрације SOD-1 у хомогенату бубрега забележен је и у дијабетичкој групи третираној инсулином [1,38 (1,21–1,78)], у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [2,15 (1,65–2,28)] и дијабетичка [1,99 (1,71–2,27)] ($p < 0,0001$ и $p < 0,001$, редом). Са друге стране, дијабетичка група третирана {NaP₅W₃₀} и дијабетичка група третирана инсулином имале су сличне вредности SOD-1 у хомогенату бубрега.

Анализом вредности концентрације SOD-1 у синаптозомама (**Графикон 17Г**) запажа се да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [0,90 (0,68–1,13)] и (контролне) дијабетичке групе [0,88 (0,73–1,05)]. Такође, вредности концентрације SOD-1 у синаптозомама нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираним {NaP₅W₃₀} [0,79 (0,64–1,01)] и инсулином [0,84 (0,76–1,05)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [0,88 (0,73–1,05)].



Графикон 17. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на концентрацију SOD-1 у хомогенату срца (A), јетре (Б) и бубрега (В), као и у синаптозомима (Г) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ****p* < 0,0001; ** *p* < 0,001; * *p* < 0,05; ns — без статистичке значајности.

Глутатион пероксидаза-1

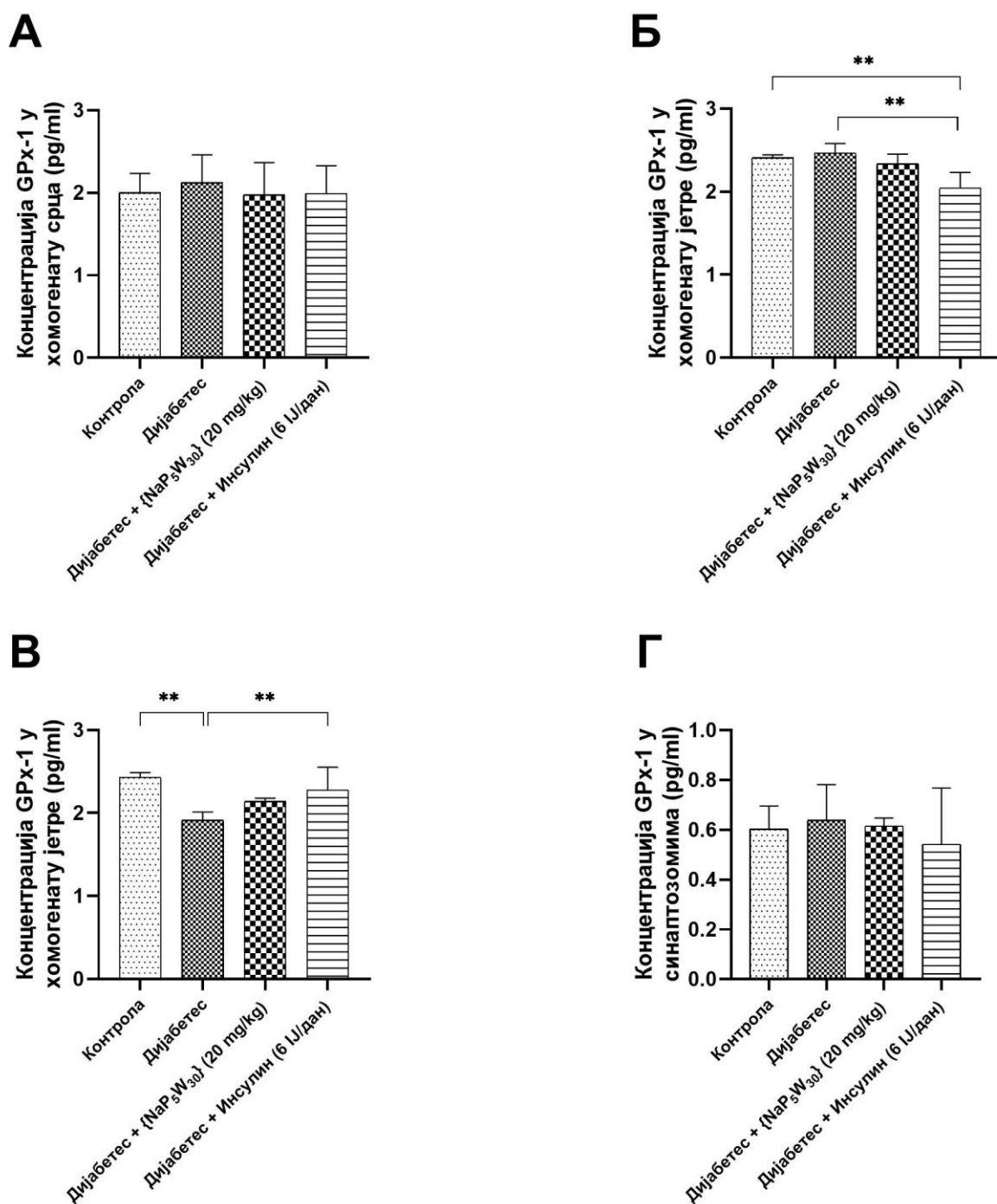
На **Графикону 18** приказане су вредности концентрације GPx-1 (pg/mL) измерене у хомогенату срца, јетре и бубрега, као и у синаптозомама испитиваних група експерименталних животиња.

Упоредном анализом вредности концентрације GPx-1 у хомогенату срца (**Графикон 18А**), утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [2,00 (1,89–2,23)] и (контролне) дијабетичке групе [2,12 (1,99–2,46)]. Такође, вредности концентрације GPx-1 у хомогенату срца нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираним {NaP₅W₃₀} [1,97 (1,72–2,36)] и инсулином [1,99 (1,79–2,32)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [2,12 (1,99–2,46)].

Добијене вредности концентрације GPx-1 у хомогенату јетре приказане су на **Графикону 18Б**. Запажа се да није дошло до статистички значајне промене у вредностима концентрације GPx-1 у хомогенату јетре између контролне нормогликемичке [2,41 (2,29–2,44)] и (контролне) дијабетичке групе [2,46 (2,38–2,58)]. Примена одабраног хетерополиволфрамата, {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, није довела до статистички значајне промене вредности концентрације GPx-1 у хомогенату јетре дијабетичких животиња [2,33 (1,98–2,45)], у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [2,41 (2,29–2,44)] и дијабетичка [2,46 (2,38–2,58)]. Насупрот овим резултатима, добијен је статистички значајан пад вредности концентрације GPx-1 у хомогенату јетре у дијабетичкој групи третираној инсулином [2,04 (1,65–2,23)], у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [2,41 (2,29–2,44)] и дијабетичка [2,46 (2,38–2,58)] ($p < 0,001$ и $p < 0,001$, редом).

У хомогенату бубрега (контролне) дијабетичке групе запажају се статистички значајно ниже вредности концентрације GPx-1 у поређењу са контролном нормогликемичком групом (**Графикон 18В**) ($p < 0,001$). Поред тога, уочава се да је тронедељна примена хуманог дугоделујућег инсулина, у појединачној дневној дози од 6 IU, довела до статистички значајног раста вредности концентрације GPx-1 у хомогенату бубрега дијабетичких животиња [2,27 (2,05–2,55)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [1,91 (1,77–2,01)] ($p < 0,001$). Насупрот овим резултатима, запажа се да примена одабраног хетерополиволфрамата, {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, није довела до статистички значајне промене вредности концентрације GPx-1 у хомогенату бубрега дијабетичких животиња [2,14 (1,97–2,17)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [1,91 (1,77–2,01)].

Анализом вредности концентрације GPx-1 у синаптозомама (**Графикон 18Г**), запажа се да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [0,60 (0,47–0,69)] и (контролне) дијабетичке групе [0,63 (0,60–0,78)]. Такође, вредности концентрације GPx-1 у синаптозомама нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираним {NaP₅W₃₀} [0,61 (0,50–0,64)] и инсулином [0,54 (0,40–0,76)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [0,63 (0,60–0,78)].



Графикон 18. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IJ/дан, *sc*) на концентрацију GPx-1 у хомогенату срца (А), јетре (Б) и бубрега (В), као и у синаптозомима (Г) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ** $p < 0,001$.

Малондиалдехид

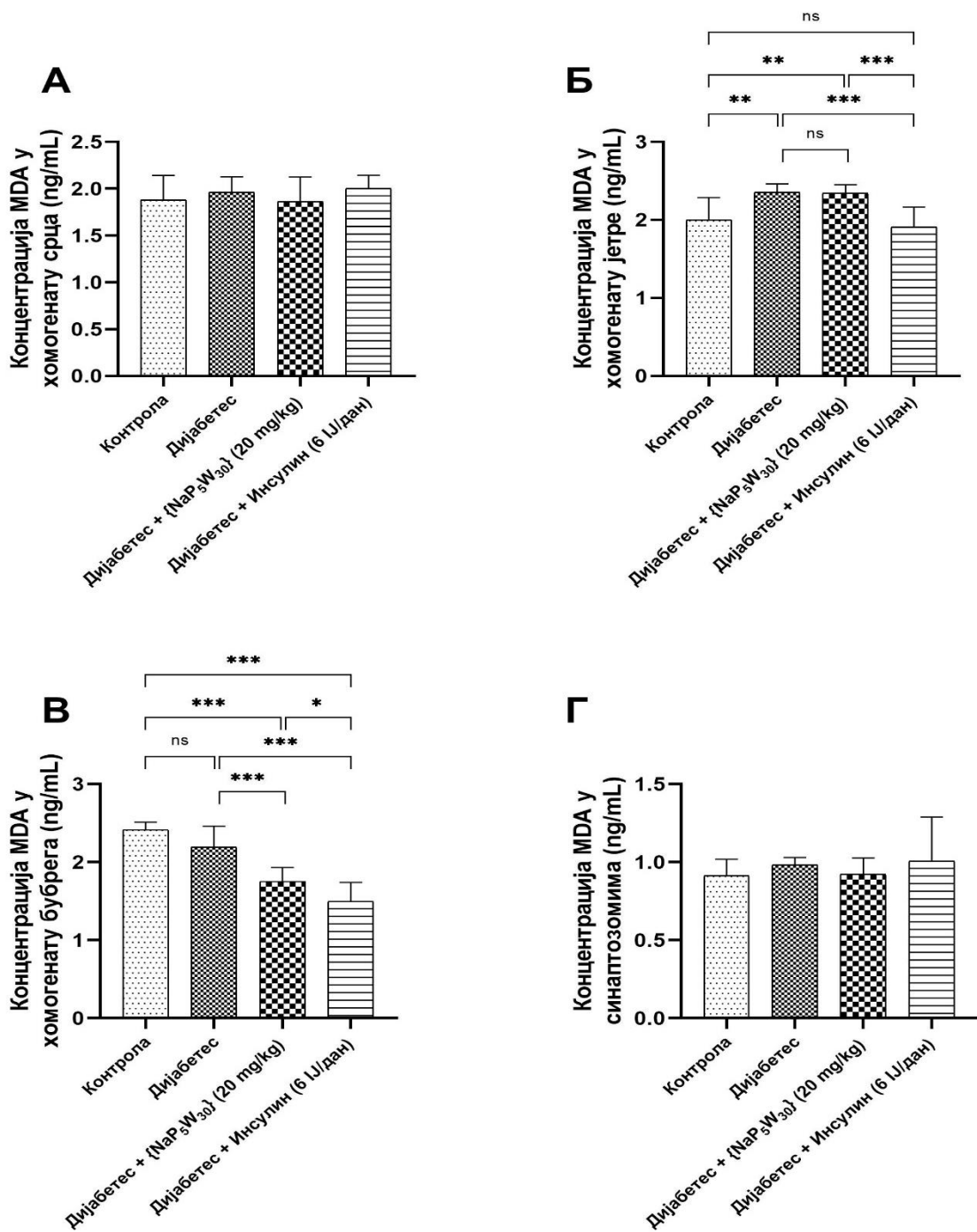
На **Графикону 19** приказане су вредности концентрације MDA (ng/mL) измерене у хомогенату срца, јетре и бубрега, као и у синаптозомама испитиваних група експерименталних животиња.

Анализом вредности концентрације MDA у хомогенату срца (**Графикон 19А**) утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [1,88 (1,60–2,14)] и (контролне) дијабетичке групе [1,96 (1,78–2,12)]. Такође, вредности концентрације MDA у хомогенату срца нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираним {NaP₅W₃₀} [1,86 (1,41–2,14)] и инсулином [2,00 (1,78–2,15)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [1,96 (1,78–2,12)].

У хомогенату јетре контролне дијабетичке групе запажају се статистички значајно више вредности концентрације MDA, у поређењу са контролном нормогликемичком групом (**Графикон 19Б**) ($p < 0,001$). Такође, може се уочити да је тронедељна примена хуманог дугоделујућег инсулина, у појединачној дневној дози од 6 IJ, довела до статистички значајног пада вредности концентрације MDA у хомогенату јетре дијабетичких животиња [1,90 (2,20–2,45)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [2,35 (2,28–2,46)] ($p < 0,0001$). Насупрот овим резултатима, запажа се да примена одабраног хетерополиволфрамата, {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, није довела до статистички значајне промене вредности концентрације MDA у хомогенату јетре дијабетичких животиња [2,34 (2,20–2,45)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [2,35 (2,28–2,46)].

Упоредном анализом вредности концентрације MDA у хомогенатима бубрега (**Графикон 19В**), утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [2,41 (2,12–2,51)] и (контролне) дијабетичке групе [2,19 (2,06–2,46)]. Насупрот овим резултатима, запажа се да примена одабраног хетерополиволфрамата, {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, довела до статистички значајног пада вредности концентрације MDA у хомогенату бубрега дијабетичких животиња [1,75 (1,62–1,93)], у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [2,41 (2,12–2,51)] и дијабетичка [2,19 (2,06–2,46)] ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$, редом). Сличан статистички значајан пад вредности концентрације MDA у хомогенату бубрега забележен је и у дијабетичкој групи третираној инсулином [1,49 (1,23–1,74)], у поређењу са контролним групама — нормогликемичка [2,41 (2,12–2,51)] и дијабетичка [2,19 (2,06–2,46)] ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$, редом). Запажа се и статистички значајно нижа вредност концентрације MDA у хомогенату бубрега дијабетичке групе третиране инсулином, у поређењу са дијабетичком групом која је добијала испитивани хетерополиволфрамат ($p < 0,05$)

Анализом вредности концентрације MDA у синаптозомама (**Графикон 19Г**), утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [0,91 (0,84–1,01)] и (контролне) дијабетичке групе [0,98 (0,87–1,03)]. Такође, вредности концентрације MDA у синаптозомама нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираним {NaP₅W₃₀} [0,92 (0,88–1,02)] и инсулином [1,00 (0,86–1,28)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [0,98 (0,87–1,03)].



Графикон 19. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IJ/дан, *sc*) на концентрацију MDA у хомогенату срца (А), јетре (Б) и бубрега (В), као и у синаптозомима (Г) дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. ****p* < 0,0001; ** *p* < 0,001; * *p* < 0,05; ns — без статистичке значајности.

4.3.13. Активности ацетилхолинестеразе, Na^+/K^+ -АТРаза и *ecto*-АТРаза у синаптозомима

Студије утицаја ДМ на централни нервни система (ЦНС) показале су да неконтролисана хипергликемија доводи до развоја низа штетних промена у мозгу, које се могу означити термином дијабетичка енцефалопатија, али молекулски механизми су сложени и нису још увек у потпуности разјашњени (253). Поједине студије су показале могућност учествовања АСhЕ, Na^+/K^+ -АТРаза и *ecto*-АТРаза у патогенези дијабетичке енцефалопатије (254), тако да би промена њихове активности могла да спречи настанак и погоршање дијабетичке енцефалопатије. У том смислу, анализиран је утицај тронедељне примене одабраног хетерополиволфрамата, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, на синаптозомалну активност АСhЕ, Na^+/K^+ -АТРаза и *ecto*-АТРаза дијабетичких пацова. Добијене вредности приказане су као медијана (опсег) на **Графикону 20**.

Ацетилхолинестераза

Анализом вредности активности АСhЕ ($\Delta\text{A}/\text{min}$) у синаптозомима (**Графикон 20А**) утврђено је да није дошло до статистички значајне промене у вредностима између контролне нормогликемичке групе [0,26 (0,25–0,27)] и (контролне) дијабетичке групе [0,24 (0,18–0,26)]. Вредности активности АСhЕ у синаптозомима нису се статистички значајно мењале у дијабетичким групама третираним $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ [0,25 (0,24–0,27)] и инсулином [0,26 (0,25–0,28)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [0,24 (0,18–0,26)].

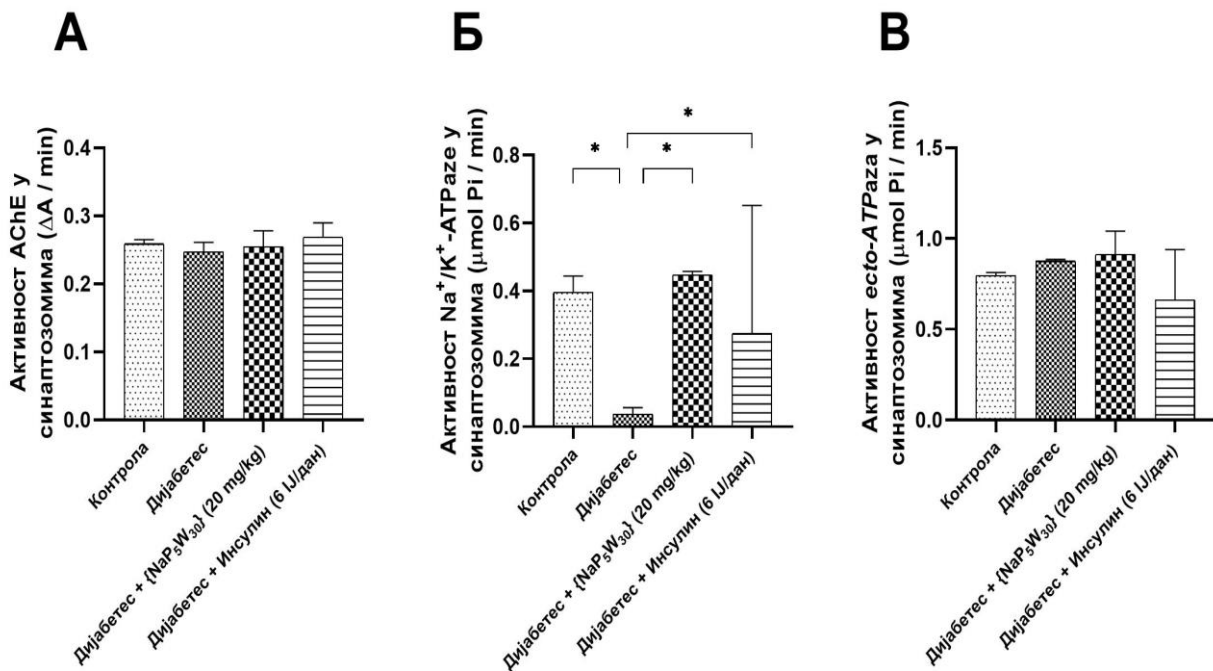
Na^+/K^+ -АТРаза

Статистичком анализом добијених резултата, утврђена је статистички значајна нижа активност Na^+/K^+ -АТРаза ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}$) у синаптозомима (контролне) дијабетичке групе [0,03 (0,02–0,05)], у поређењу са контролном нормогликемичком групом [0,39 (0,33–0,44)] ($p < 0,05$). (**Графикон 20Б**). Запажа се да је примена одабраног хетерополиволфрамата, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, довела до статистички значајног раста активности Na^+/K^+ -АТРаза у синаптозомима дијабетичких животиња [0,44 (0,37–0,45)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [0,03 (0,02–0,05)] ($p < 0,05$). Сличан статистички значајан раст активности Na^+/K^+ -АТРаза у синаптозомима забележен је и у дијабетичкој групи третираној инсулином [0,27 (0,19–0,65)], у поређењу са (контролном) дијабетичком групом [0,03 (0,02–0,05)] ($p < 0,05$).

Ecto-АТРаза

Активност *ecto*-АТРаза ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}$) у синаптозомима износила је [0,79 (0,77–0,81)] код контролних нормогликемичких животиња, [0,87 (0,87–0,88)] код (контролних) дијабетичких животиња, [0,91 (0,88–1,04)] код дијабетичких животиња третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и [0,66 (0,46–0,93)] код дијабетичких животиња третираних инсулином (**Графикон 20В**).

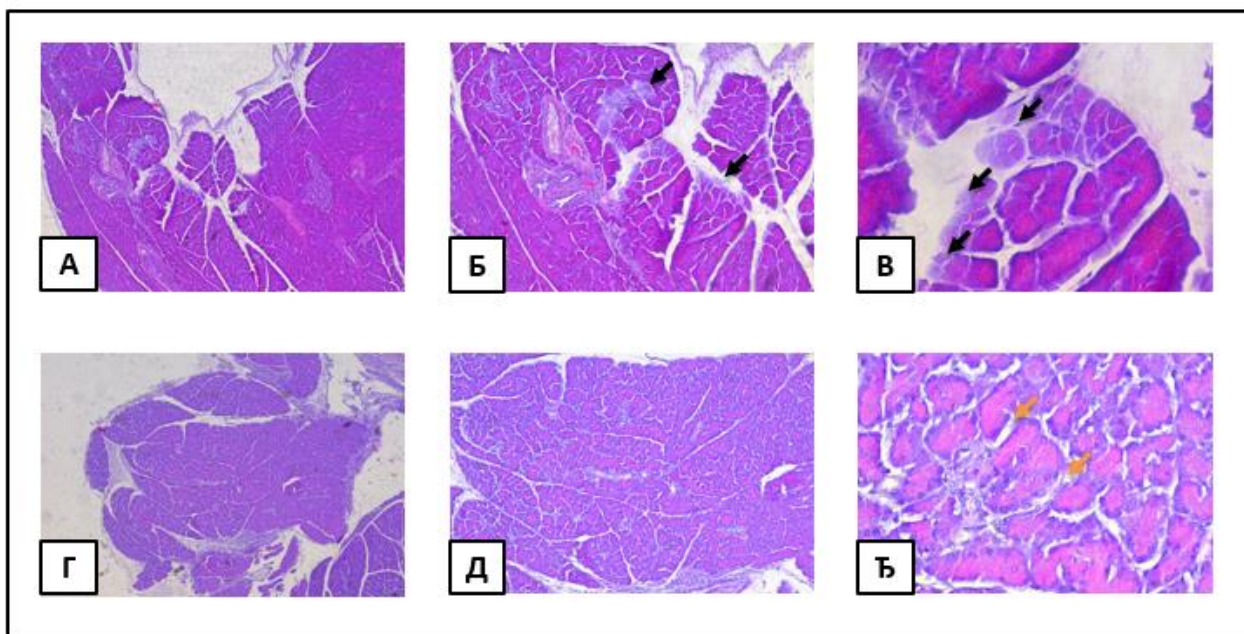
Статистичком анализом утврђено је да се вредности активности *ecto*-АТРаза у синаптозомима статистички значајно не разликују између испитиваних група животиња.



Графикон 20. Утицај {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан, *per os*) и хуманог дугodelујућег инсулина (6 IU/дан, *sc*) на активност АСhЕ (А), Na⁺/K⁺-АТРаза (Б) и *ecto*-АТРаза (В) у синаптозомима дијабетичких пацова. У контролној групи, животиње су третиране 0,9% раствором NaCl (*per os*) током три недеље. Резултати су приказани као медијана (опсег). Једнофакторска ANOVA анализа и *post hoc Tukey* тест су коришћени за израчунавање статистичке значајности између група. * $p < 0,05$.

4.3.14. Патохистолошка анализа панкреаса

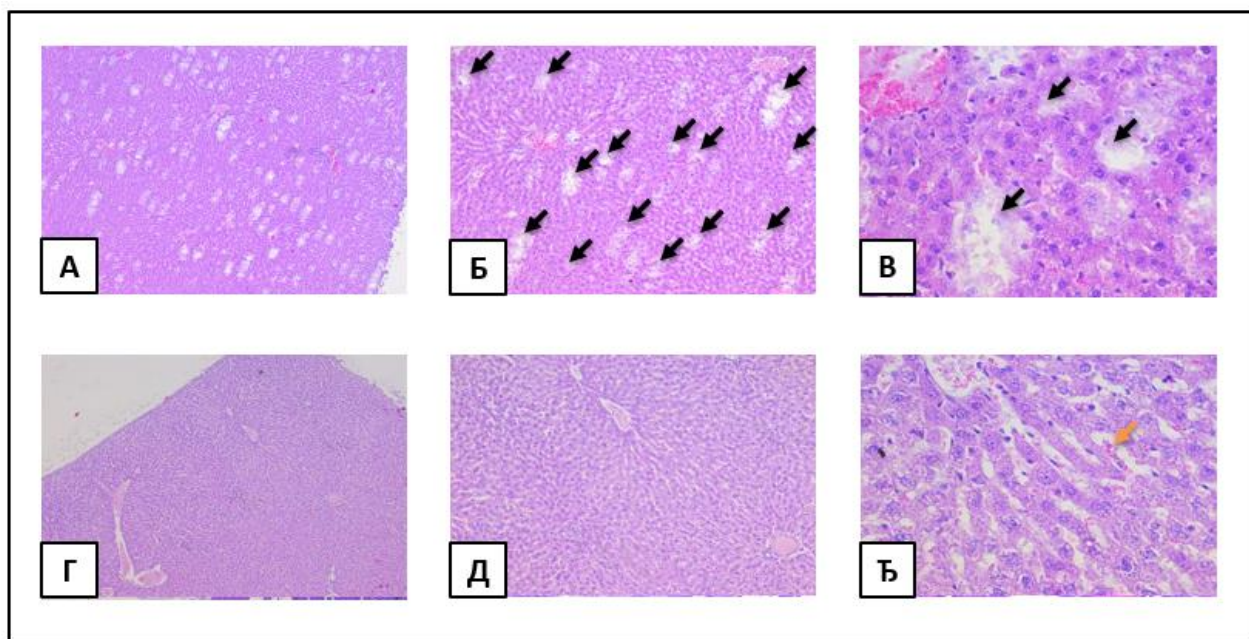
На препаратима панкреаса, обојеним хематоксилином и еозином, (контролне) дијабетичке групе пацова уочавају се опсежна поља фокалне некрозе панкреасних ацинуса (Слика 20, А, Б и В). У панкреасу пацова третираних {NaP₅W₃₀} може се видети измењена структура интралобуларног везивног ткива, док се само у појединим лобулусима уочавају дискретна мала поља некрозе серозних ацинуса (Слика 20, Г, Д и Ђ). Налази трансмисионе електронске микроскопије су потврдили налазе конвенционалне светлосне микроскопије.



Слика 20. Фотографије ткива панкреаса бојене хематоксилином и еозином (А, Г увеличање $\times 5$; Б увеличање $\times 20$; Д увеличање $\times 10$; В и Ђ увеличање $\times 40$). Црне стрелице — поља некрозе; наранџасте стрелице — растресито интралобуларно везивно ткиво. (А, Б и В) — контролна (дијабетичка) група животиња; (Г, Д и Ђ) — група животиња третирана $\{NaP_5W_{30}\}$ (20 mg/kg, per os).

4.3.15. Патохистолошка анализа јетре

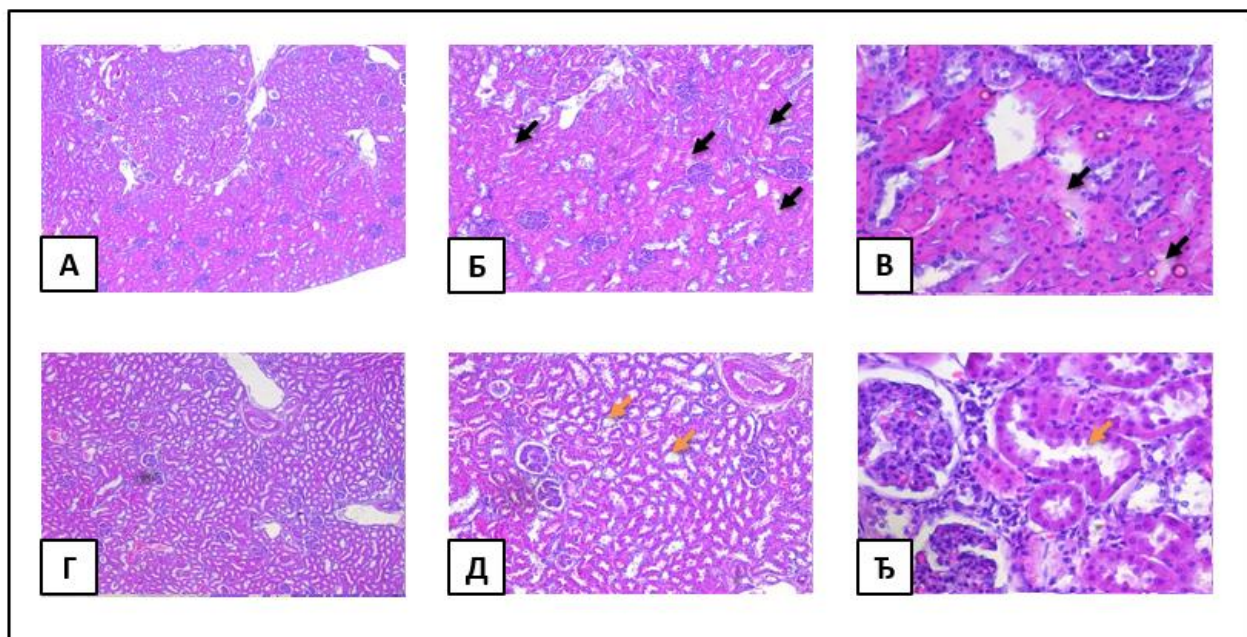
На препаратима јетре, обојеним хематоксилином и еозином, (контролне) дијабетичке групе пацова уочавају се дифузна, бројна и опсежна поља фокалне некрозе, у оквиру којих се виде поља „брисаних хепатоцита“. Архитектоника ламина хепатис и промер синусоидних капила не су нарушени (Слика 21, А, Б и В). У јетри пацова третираних $\{NaP_5W_{30}\}$ не виде се опсежна поља фокалне некрозе, али постоји нехомогеност цитоплазме хепатоцита, као и дискретна дилатација синусоидних капила. Архитектоника лобулуса је очувана (Слика 21, Г, Д и Ђ). Налази трансмисионе електронске микроскопије су потврдили налазе конвенционалне светлосне микроскопије.



Слика 21. Фотографије ткива јетре бојене хематоксилином и еозином (А, Г увеличање $\times 5$; Б и Д увеличање $\times 10$; В и Ђ увеличање $\times 40$). Црне стрелице — поља некрозе; наранџасте стрелице — дилатација синусоидних капила. (А, Б и В) — контролна (дијабетичка) група животиња; (Г, Д и Ђ) — група животиња третирана $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg , *per os*).

4.3.16. Патохистолошка анализа бубрега

На препаратима бубрега, обојеним хематоксилином и еозином, (контролне) дијабетичке групе пацова уочавају се поља фокалне некрозе епителних ћелија проксималних тубула и некротичне зоне нефроцита у дисталним тубулима (Слика 22, А, Б и В). У бубрегу пацова третираних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ не виде се опсежна поља фокалне некрозе, али постоји дискретна дилатација поједних тубуларних сегмената нефрона (Слика 22, Г, Д и Ђ). Налази трансмисионе електронске микроскопије су потврдили налазе конвенционалне светлосне микроскопије.



Слика 22. Фотографије ткива бубрега бојене хематоксилином и еозином (А, Г увеличање $\times 5$; Б и Д увеличање $\times 10$; В и Ђ увеличање $\times 40$). Црне стрелице — поља некрозе; наранџасте стрелице — дилатација поједних тубуларних сегмената нефрона. (А, Б и В) — контролна (дијабетичка) група животиња; (Г, Д и Ђ) — група животиња третирана $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg, per os).

5. ДИСКУСИЈА

Према најновијим препорукама Европске асоцијације за студије дијабетеса и Америчке дијабетесне асоцијације, терапијски алгоритам ДМ базиран је на остварењу индивидуално одређених циљних вредности HbA_{1c} , спречавању хроничних компликација (пре свега кардио-рениалних) и обезбеђивању да физичка активност и животни стил болесника буду што ближи нормалном (177, 255). Примена инсулина представља и даље кључну фармаколошку опцију у постизању ових циљева. Инсулинском терапијом постижу се изузетни резултати, али овај вид терапије има и одређена ограничења, као што је парентерални пут примене. Овај недостатак инсулинске терапије, као и огромно потенцијално тржиште, подстицали су развој нових лекова, посебно оних намењених за болеснике са тип 2 ДМ код којих, у одређеној мери, постоји очувана способност секреције инсулина (171). Успешност у проналаску нових антихипергликемијских лекова илуструје податак да су до краја 20. века као не-инсулинска терапија ДМ постојале само две класе лекова (бигваниди и деривати сулфонилуреје), а данас се на располагању налазе осам класа лекова који могу бити делотворни код оболелих од тип 2 ДМ. Међутим, упркос развоју бројних нових терапијских агенаса у протеклих 20-так година, опсервацијске студије показују да је 2015. године од компликација ДМ умрло око 6,7 милиона људи, што указује да велики број оболелих и даље не постиже задовољавајућу регулацију гликемије, а ни осталих метаболичких параметара кључних у постизању добре контроле болести и смањивању компликација (256). Стога, неопходна су даља истраживања у будућности са идејом проналаска нових антидијабетика, јефтиних и лаких за примену, који би имали снажан ефекат на хипергликемију, али уз минималне нежељене ефекте.

Захваљујући бројним истраживањима на анималним моделима која су имала за циљ да истраже биолошка својства ПОМ, дошло се до запажања да ова комплексна неорганска једињења, поред антимикуробног и антитуморског дејства, могу бити делотворна у снижавању хипергликемије код дијабетичких животиња (202, 205). Из тог разлога, експерименти овог истраживања управо су усмерени ка испитивању утицаја примене синтетисаних хетерополиволфрамата $\{NaP_5W_{30}\}$ и $\{AgP_5W_{30}\}$, као представника ПОМ, на снижавање хипергликемије и ублажавање биохемијских и морфолошких промена у ткивима и органима пацова изазваних једнократном применом раствора стрептозотоцина. Имајући у виду чињеницу да нежељени и штетни ефекти лека, који некада могу бити врло озбиљни и по живот угрожавајући, представљају веома значајан проблем у лечењу, анализирани су и хепато- и нефротоксични ефекти примене синтетисаних хетерополиволфрамата код здравих пацова.

Резултати првог експерименталног протокола ове докторске дисертације, односно *screening* студије која је имала за циљ да потврди антихипергликемијску активност одабраних синтетисаних хетерополиволфрамата, показују да једнократна интраперитонеална примена $\{NaP_5W_{30}\}$ и $\{AgP_5W_{30}\}$ (5, 10 и 20 mg/kg) дозно и временски зависно снижава вредности хипергликемије код пацова са експерименталним дијабетесом изазваним једнократним убризгавањем раствора стрептозотоцина. Резултати токсиколошког истраживања базираног на биохемијским параметрима функције и патохистолошкој анализи јетре и бубрега показују да перорална примена испитиваних синтетисаних хетерополиволфрамата у појединачној

дневној дози од 20 mg/kg током две недеље изазива благи до умерени степен хепато- и нефротоксичности код здравих пацова. У последњем експерименталном протоколу, који је имао за циљ да детаљније истражи фармаколошки профил синтетисаних хетерополиволфрамата као потенцијалних антидијабетика, показано је да перорална примена $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/дан) током три недеље значајно стимулише секрецију инсулина из β -ћелија Лангерхансових острваца панкреаса код дијабетичких пацова, што може бити један од механизма добијеног антихипергликемијског дејства испитиваних једињења. Поред антихипергликемијског дејства, показано је да испитивани хетерополиволфрамат испољава и хепатопротективно, нефропротективно, кардиопротективно и неуропротективно дејство код дијабетичких пацова, што је процењено на основу анализе: (1) релативне масе органа, (2) биохемијских параметара функције јетре (серумске концентрације укупних протеина и албумина и серумске активности AST, ALT и ALP) и бубрега (серумске концентрације урее, креатинина, мокраћне киселине, KIM-1 и NGAL), (3) параметара оксидативног стреса (SOD-1, GPx-1 и MDA) у хомогенату ткива (4) активности AChE, Na^+/K^+ -ATPaze и *ecto*-ATPaza у синаптозомима изолованим из целих мозгава и (5) патохистолошка анализа ткива јетре и бубрега.

У наставку дискусије, у складу са досадашњим научним сазнањима из доступне литературе, детаљније су објашњени и образложени добијени резултати овог токсиколошког и фармаколошког претклиничког испитивања синтетисаних хетерополиволфрамата, као потенцијалних нових оралних антидијабетика.

Последњих неколико година, у *in vivo* испитивањима антидијабетичке активности ПОМ учествовао је знатан број истраживача, о чему сведочи и не мали број публикација са овом тематиком, те се у будућности очекује и да фармацеутски произвођачи нађу свој интерес у пољу истраживања ових комплексних неорганских једињења као потенцијалних лекова-кандидата у терапији DM (202, 204-206, 241). До сада је испитана антидијабетичка активност знатног броја структурно различитих ПОМ и хетерополиволфрамата, али је ово прва студија која је истраживала антихипергликемијску активност синтетисаних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$.

Сходно томе, пре детаљног испитивања фармаколошког и токсиколошког профила, најпре је у прелиминарној *screening* студији (одељак 3.4.1) процењено да ли одабрана синтетисана једињења уопште имају својство да снижавају хипергликемију код дијабетичких пацова након једнократне интраперитонеалне примене. Добијени резултати прелиминарне студије показују да једнократна интраперитонеална примена $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, како дозно, тако и временски зависно, снижава хипергликемију код дијабетичких пацова. $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ примењен једнократно у дозама од 5, 10 и 20 mg/kg статистички значајно снижава хипергликемију код дијабетичких пацова након 2, 4 и 6 h од његове интраперитонеалне примене, у поређењу са почетним вредностима хипергликемије ($t = 0$ h) (Графикон 1). Такође, може се уочити да тренд пада вредности хипергликемије корелира са повећањем примењене дозе $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, односно највиша испитивана доза од 20 mg/kg се показала као најефикаснија доза у снижавању повишених вредности глукозе у крви код дијабетичких животиња. Показано је и да испитивани хетерополиволфрамат временски зависно снижава хипергликемију код дијабетичких пацова (Графикон 1А), односно да је 6 h након примене 20 mg/kg $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ добијен највећи пад вредности хипергликемије, у поређењу са вредностима

хипергликемије након 2 и 4 h. Са друге стране, резултати ове *screening* студије показују да $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ статистички значајно снижава хипергликемију код дијабетичких пацова само када се примени у највишој испитиваној дози од 20 mg/kg, а не и у дозама од 5 и 10 mg/kg (**Графикон 2**). На основу наведених резултата, може се закључити следеће:

1. оба испитивана хетерополиволфрамата су ефикасна у снижавању повишених вредности глукозе у крви код дијабетичких животиња, с тим што се $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ показао као моћнији антихипергликемијски агенс у односу на $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$;
2. највиша примењена доза испитиваних хетерополиволфрамата од 20 mg/kg је најефикаснија доза у снижавању хипергликемије код дијабетичких пацова;
3. антихипергликемијски ефекат одабраних хетерополиволфрамата је најмањи након 2 h, а највећи након 6 h од примене, што указује да њихово дејство има постепен наступ и дуже трајање.

Након ових закључака, стекли су се услови за даља *in vivo* истраживања безбедности и ефикасности одабраних синтетисаних хетерополиволфрамата као потенцијалних нових лекова-кандидата у терапији DM. Сходно томе, најпре је испитивана акутна перорална токсичност $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg, која се показала као најефикаснија у снижавању хипергликемије код дијабетичких пацова.

Законска регулатива, али и стручна јавност, налажу да сваки потенцијални лек мора да испуни три основна и најважнија захтева: квалитет, безбедност и ефикасност, што се процењује на основу резултата добијених током претклиничких и клиничких истраживања (257). Безбедност и ефикасност су релативни појмови који зависе од многобројних чинилаца, али кључан услов за примену неког лека је непроменљив — „ризичи које лек носи морају да буду мањи од очекиване користи“. Имајући у виду наведену чињеницу, као и релативно мало података у литератури о безбедносном профилу хетерополиволфрамата, у овом истраживању, након доказивања антихипергликемијске активности (**Графикони 1 и 2**), процењивани су токсични ефекти синтетисаних $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ код здравих јединки пацова (**одељак 3.4.2**), а након тога су испитивани могући механизми антидијабетичког деловања који доводе до снижавања хипергликемије и ублажавања дијабетичких компликација (**одељак 3.4.3**).

Током експерименталног периода акутне токсиколошке студије процењивана је општа подношљивост пероралне примене $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/дан). Добијени резултати показују да примена испитиваних хетерополиволфрамата током 14 дана није имала штетне ефекте на дневни унос хране и воде, опште здравствено стање и понашање пацова. Поред тога, резултати показују да примена испитиваних хетерополиволфрамата није значајно утицала на телесну масу пацова (**Табела 9**). Зато што се не уочава статистички значајна разлика у телесној маси између контролне групе и група које су добијале $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ током 14 дана. Добијени резултати су у сагласности са претходним студијама (204, 206, 258), које показују да примена структурно различитих ПОМ не доводи до промене телесне масе код експерименталних мишева и пацова. Имајући у виду да телесна маса представља изузетно осетљив биомаркер општег здравственог стања (259), на основу добијених резултата може се индиректно претпоставити да перорална примена $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и

{AgP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg не изазива озбиљне токсичне ефекте код здравих пацова. Ову хипотезу додатно потврђује и податак да током експерименталног периода праћења није дошло до смртног исхода код животињама које су добијале испитиване хетерополиволфрамате у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током две недеље.

Имајући у виду резултате *screening* студије који показују да испитивани хетерополиволфрамате снижавају хипергликемију код дијабетичких пацова (**Графикони 1 и 2**), у токсиколошкој студији испитиван је њихов утицај на нормалне вредности глукозе у крви код здравих пацова. Добијени резултати показују да перорална примена синтетисаних једињења (20 mg/kg/дан) током 14 дана не утиче на концентрацију глукозе у серуму здравих пацова (**Графикон 3**), што је у сагласности са подацима из литературе (202, 204–206, 258). На основу наведених резултата, може се закључити да испитивани хетерополиволфрамате, иако снижавају хипергликемију код дијабетичких пацова, не изазивају хипогликемију код нормогликемичких пацова. Добијени резултати указују да испитивана једињења снижавају хипергликемију код дијабетичких животиња вероватно тако што делују на патолошки измењене метаболичке путеве, који нису присутни у физиолошким условима када постоји нормогликемија, што посебно треба узети у обзир приликом разматрања потенцијалних механизма антихипергликемијског дејства ПОМ.

У циљу процене хепатотоксичног потенцијала испитиваних хетерополиволфрамата код здравих пацова, одређивани су биохемијски параметри функције јетре и анализирана је морфологија јетре коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије. Добијени резултати показују да примена {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан) током 14 дана није утицала на серумске активности AST (**Графикон 4А**), ALT (**Графикон 4Б**) и ALP (**Графикон 4В**) код здравих пацова, у поређењу са контролном групом. Насупрот овоме, уочава се статистички значајан пад серумске концентрације укупних протеина (**Графикон 4Г**) и албумина (**Графикон 4Д**) у групама животиња које су добијале испитиване хетерополиволфрамате током 14 дана, у поређењу са контролним пацовима. Имајући у виду чињенице да активности AST и ALT представљају маркере хепатоцелуларног оштећења, а да активност ALP служи за процену холестазног облика оштећења јетре, док концентрације укупних протеина и албумина указују на синтетску функцију јетре (260), може се закључити да примена {NaP₅W₃₀} и {AgP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан) током 14 дана благо нарушава синтетску функцију јетре, али не изазива масивну некрозу хепатоцита, као и застој жучи у жучним путевима. Како поремећај концентрације укупних протеина и албумина може бити узрокован и другим факторима, а не само поремећајем синтетске функције јетре, надаље су анализирани патохистиолошке промене у јетри. Коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије уочавају се само дискретна поља фокалне перилобуларне некрозе хепатоцита, удружена са екстравазацијом еритроцита код пацова третираних испитиваним хетерополиволфраматима (**Слике 2 и 3**). Све ово указује да перорална примена испитиваних хетерополиволфрамата у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током две недеље изазива благи хепатитисни облик оштећења јетре, без масивне деструкције паренхиме, уз нормалне вредности активности серумских трансминаза и смањену синтетску функцију јетре, што све заједно указује на благи степен оштећења јетре.

Треба напоменути да је анализом патохистолошких слика установљено да $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ изазива већи степен хепатоцелуларне некрозе у односу на $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$.

Будући да бубрези представљају главни екскреторни орган за већину унетих агенаса, неопходно је испитати нефротоксичне ефекте лека-кандидата у претклиничким испитивањима на анималним моделима (257). Сходно томе, у овом истраживању анализирано је нефротоксично својство $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/дан) код здравих јединки, одређивањем биохемијских параметара бубрежне функције, али и праћењем патохистолошких промена у бубрезима коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије. Резултати биохемијских параметара бубрежне функције (**Графикон 5**) показују да примена испитиваних хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) током две недеље статистички значајно повећава концентрацију урее (**Графикон 5А**) и креатинина (**Графикон 5Б**) код здравих животиња. Насупрот овој, не уочава се статистички значајна разлика у серумској концентрацији мокраћне киселине између контролне групе и група које су добијале испитиване хетерополиволфрамате (**Графикон 5В**). Коришћењем конвенционалне светлосне микроскопије не уочавају се патохистолошке промене у бубрезима код пацова третираних испитиваним хетерополиволфраматима (**Слика 4**). Са друге стране, коришћењем трансмисионе електронске микроскопије уочавају се оштећења митохондрија тубуларних епителних ћелија код третираних пацова (**Слика 5**), што може објаснити претходне резултате који показују поремећај бубрежне функције код ових животиња. Свеукупно, добијени резултати указују да перорална примена испитиваних хетерополиволфрамата у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током две недеље изазива благи до умерени степен нефротоксичности код здравих пацова, што условљава увођење мере опреза у облику редовног праћења функционалних тестова бубрега. Наведени резултати су у складу са претходно објављеном студијом Wang и сарадника (261), која показује да се ПОМ са антивирусним дејством након пероралне примене акумулира у високом проценту у бубрегу животиња, али тачан механизам његовог нефротоксичног дејства није познат. Имајући у виду оштећење митохондрија тубуларних епителних ћелија код третираних пацова, може се претпоставити да испитивани хетерополиволфраматни оштећују бубрег тако што нарушавају динамичку равнотежу између прооксиданата и антиоксиданата, и тиме доводе до акутне тубуларне некрозе, која надаље узрокује акутно оштећење бубрега, односно нагли пад јачине гломерулске филтрације, што се лабораторијски манифестује порастом концентрације азотних једињења (уреа и креатинина) у крви (262). Међутим, за потврду ове хипотезе потребна су даља испитивања у будућности.

Свеукупно, добијени резултати ове акутне пероралне токсиколошке студије (**Графикони 4 и 5; Сlike 2, 3, 4 и 5**), која се првенствено заснива на биохемијским и патохистолошким анализама, показују да перорална примена испитиваних хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) током две недеље изазива благи до умерени степен хепато- и нефротоксичности код здравих пацова. Треба нагласити и да је $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, у поређењу са $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, испољио израженији нефро- и хепатоксични потенцијал код здравих пацова.

Имајући у виду (1) закључак студије *Notiua* и сарадника (206) да антидијабетичка активност ПОМ пре свега зависи од геометријског облика, а не од врсте (не)метала у

комплексу, али и (2) закључак претходно тумачене *screening* студије да је $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, у односу на $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, моћнији антихипергликемијски агенс (одељак 5.1), као и (3) закључак акутне пероралне токсиколошке студије да $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, у односу на $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, испољава блажи степен хепато- и нефротоксичности код здравих пацова (одељак 5.2), у последњем експерименталном протоколу овог истраживања (одељак 3.4.3), који је испитивао могуће механизме антидијабетичког деловања хетерополиволфрамата, коришћен је само $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и то у појединачној дневној дози од 20 mg/kg. С тим у вези, најпре је испитиван утицај тронедељне примене $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/дан) на вредности хипергликемије, као и на ниво HbA_{1c} дијабетичких пацова, који је затим упоређиван са утицајем примене хуманог дугоделујућег инсулина (6 IJ/дан), како би се тумачила антихипергликемијска активност испитиваног хетерополиволфрамата. Добијени резултати показују да тронедељна перорална примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) статистички значајно редукује хипергликемију (Графикон 8) и ниво HbA_{1c} (Графикон 10Б) дијабетичких пацова, али треба нагласити да се његовом применом не постиже нормогликемија.

У складу са подацима из литературе (202, 204-206), добијени резултати показују да примена испитиваног хетерополиволфрамата и егзогеног инсулина статистички значајно снижава хипергликемију код дијабетичких пацова, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом (Графикон 8). Седмог дана третмана уочава се да егзогени инсулин код дијабетичких животиња снижава хипергликемију за око 50%, у односу на (контролну) дијабетичку групу. Истог дана, у односу на (контролну) дијабетичку групу, перорална примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) снизила је хипергликемију за око 23% код дијабетичких пацова, што није било статистички значајно. Затим, 14. дана третмана уочавају се редуковане вредности хипергликемије у групама које су добијале испитивани хетерополиволфрамаат или егзогени инсулин, али вредности нису статистички значајне у односу на (контролну) дијабетичку групу. Са друге стране, на крају експерименталног периода (21. дана) уочава се статистички значајна редукација хипергликемије за око 27% у групи која је добијала испитивани хетерополиволфрамаат, као и у групи која је третирана егзогеним инсулином (-34%), у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Сличне резултате добили су *Nomiya* и сарадници (206), који су показали да перорална примена раствора хетерополиволфрамата: $\text{K}_6[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (3,3 mmol/L), $\text{K}_8\text{H}[\alpha\text{-1,2,3-P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3\text{O}_{62}] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,1 mmol/L) или $\text{K}_7[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{VO}_{62}] \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ (3,19 mmol/L), 4. и 10. дана третмана, статистички значајно редукује вредности хипергликемије код мишева са експерименталним дијабетесом изазваним једнократном применом стрептозотоцина. Поред тога, студија *Ilyas* и сарадника (241), у којој је *in vitro* и *in vivo* испитивана антидијабетичка активност структурно различитих полиоксоволфрамата, указује да примена $\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ код мишева са експерименталним дијабетесом изазваним једнократном применом алоксана статистички значајно снижава хипергликемију за око 62% 8 h након његове примене, у поређењу са почетном вредношћу хипергликемије ($t = 0$ h). У истој студији је приказано да је $\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ снажан инхибитор активности α -глукозидазе ($\text{IC}_{50} = 3,24 \pm 0,76 \mu\text{mol/L}$), као и изоензима 1 ($\text{IC}_{50} = 0,5 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$) и 2 ($\text{IC}_{50} = 1,89 \pm 0,34 \mu\text{mol/L}$) алдозо-редуктазе, што је протумачено као могући механизам његовог антихипергликемијског дејства. Истраживање *Bâlici* и сарадника (204) указало је да перорална примена полианјона $[(\text{VO})_3(\text{SbW}_9\text{O}_{33})_2]^{12-}$ и $[\text{Na}(n\text{-BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^{9-}$ у кумулативној дози од 4 mg/kg статистички значајно редукује хипергликемију код

дијабетичких пацова 21. дана, али не и 14. дана третмана, у односу на контролну нормогликемичку групу.

Будући да су досадашње *in vivo* студије на анималним моделима, у циљу анализе антихиперглемичке активности структурно различитих ПОМ, испитивале само њихов утицај на хипергликемију, а не и на друге параметре гликорегулације, у овом истраживању, по први пут, испитиван је утицај {NaP₅W₃₀} на ниво HbA_{1c} дијабетичких животиња (**Графикон 10Б**). Добијени резултати показују да тронедељна перорална примена {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg/дан статистички значајно редукује ниво HbA_{1c} дијабетичких животиња за 1,8%, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 10Б**), што указује да испитивани хетерополиволфрамат не утиче само на краткотрајну, већ на дуготрајну гликорегулацију, чиме значајно може да спречи развој и прогресију макро- и микроваскуларних дијабетичких компликација, које су у директној корелацији са нивоом HbA_{1c} (263). Треба посебно истаћи да добијени ефекат испитиваног хетерополиволфрамата на ниво HbA_{1c} не само да постоји, већ је и изузетно сличан са ефектом примене егзогеног инсулина (6 IJ/дан), који је након три недеље редуковао ниво HbA_{1c} дијабетичких животиња за 2,1%, у односу на контролну дијабетичку групу (**Графикон 10Б**).

На основу наведених резултата (**Графикони 8 и 10Б**) може се закључити да перорална примена испитиваног хетерополиволфрамата током три недеље значајно побољшава гликорегулацију (процењено на основу гликемије и нивоа HbA_{1c}) код дијабетичких животиња и стога може представљати нови могући лек-кандидат у терапији ДМ. Добијени подаци показују да {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg и хумани дугоделујући инсулин у појединачној дневној дози од 6 IJ имају релативно сличан антихипергликемијски утицај, што посебно наглашава терапијску ефикасност испитиваног хетерополиволфрамата.

Имајући у виду да механизми добијеног антихипергликемијског дејства испитиваног хетерополиволфрамата нису познати, у даљем току овог истраживања анализиран је утицај тронедељне пероралне примене {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/дан) на серумску концентрацију инсулина, инсулинску осетљивост одређивану коришћењем НОМА-IR индекса, концентрацију електролита и липидни статус у крви дијабетичких животиња. Поред тога, процењиван је и хепато-, нефро-, кардио- и неуропротективни утицај испитиваног хетерополиволфрамата код дијабетичких животиња, коришћењем биохемијских и патохистолошких анализа.

У циљу расветљавања могућих механизма дејства хетерополиволфрамата који учествују у снижавању хипергликемије, испитиван је перорални утицај {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg на концентрацију инсулина у серуму дијабетичких животиња. Добијени резултати показују да примена испитиваног хетерополиволфрамата током три недеље повећава концентрацију инсулина у серуму дијабетичких животиња (**Графикон 9**), односно стимулише његово ослобађање из β-ћелија панкреаса, што може бити један од механизма његовог антихипергликемијског дејства.

Познато је да повишена концентрација глукозе у крви, изазвана уносом угљенохидратног оброка, стимулише секрецију инсулина из β-ћелија Лангерхансових острваца панкреаса. Инсулин затим доспева до циљних ткива (јетра, мишићи и масно ткиво) путем крвотока, везује се за инсулински рецептор и активира различите интрацелуларне

системе трансдукције сигнала, који даље доводе до пораста броја и степена осетљивости глукозних транспортера присутних на површини циљних ћелија. Овај ефекат појачава процес преузимање глукозе у циљним ћелијама, што на крају доводи до нормализације вредности глукозе у крви (1, 2).

Према широком прихваћеном моделу, смањена осетљивост периферних ткива на дејство инсулина и постојање опадајуће секреције инсулина из β -ћелија панкреаса представљају основне патогенетске механизме укључене у настанак хипергликемије код болесника са тип 2 DM (48). Такође, показано је да доминантну улогу у напредовању болести од стања компензоване инсулинске резистенције, преко преддијабетеса до манифестног дијабетеса има превасходно постепена и прогресивна опадајућа секреција инсулина. Дуго се разматрало да ли се у патогенези прогресивног опадања секреторне способности панкреаса, поред афункционалности β -ћелија, налази и смањена укупна маса β -ћелија. Стога, спроведене су студије у којима су рађене обдукционе анализе ткива панкреаса особа оболелих од DM, које су потврдиле да болесници са тип 2 DM имају за око 30-40% (према неким студијама за око 60%) мању масу β -ћелија у односу на недијабетичаре (264, 265). Након овог запажања, бројна истраживања патогенезе тип 2 DM усмерена су на разумевање цитотоксичних механизма у процесу одумирања β -ћелија.

Подаци из бројних студија показују да амилоидни полипептид Лангерхансових острваца (амилин) има кључну улогу у процесу одумирања β -ћелија панкреаса код оболелих од тип 2 DM (266, 267). Овај неуроендокрини хормон, састављен од 37 аминокиселина, излучује се заједно са инсулином из β -ћелија, и његова физиолошка улога у организму, након многобројних истраживања, није у потпуности разјашњена. Претпоставља се да овај полипептидни хормон превасходно делује као инхибитор секреције инсулина, тако што директно блокира преузимање глукозе од стране β -ћелија панкреаса (268). Уочено је и да амилоидни полипептид острваца спречава аргинином стимулирано ослобађање глутагона из α -ћелија панкреаса (269). Поред тога, недавно је показано и да учествује у регулацији телесне тежине, тако што смањује апетит механизмом одложеног пражњења желуца (270). Међутим, поред физиолошких улога, најновија истраживања показују да амилоидни полипептид острваца значајно учествује и у развоју и прогресији тип 2 DM (271). Претпоставља се да заједничко деловање глукозне токсичности (хипергликемија), липотоксичности (повишен ниво NEFA), хипоксије и стреса на нивоу ендоплазматског ретикулума мења секундарну и терцијарну структуру амилоидног полипептидног острвца, што последично доводи до његовог погрешног увијања и формирања нерастворљивих амилоидних влакана (272). Таложење ових влакана у екстрацелуларном простору панкреаса узрокује оштећење морфологије и функције β -ћелија панкреаса, превасходно активацијом сигналних путева који смањују капацитет митохондрија за синтезу АТФ, чиме се нарушава мембрански потенцијал и повећава степен оксидативног стреса (273). Истовремено, нерастворљива амилоидна влакна физички спречавају ослобађање инсулина у крвоток, што такође додатно доприноси смањеном лучењу овог важног хормона (274). Стога, неопходна су опсежна истраживања у циљу проналаaska агенаса који би штитила од погрешног увијања амилоидног полипептидног острвца и његове последичне агрегације у екстрацелуларном простору панкреаса, како би се постигао огроман напредак у лечењу болесника са DM.

ПОМ поседују релативно стабилну молекулску конфигурацију која им омогућава да реагују са бројним протеинима и ензимима у организму и да тиме остварују различите биолошке ефекте. Показано је да ова сложена неорганска једињења првенствено реагују са позитивно наелектрисаним протеинима због свог негативног наелектрисувања, при чему у тој интеракцији, под дејством електростатичке потенцијалне енергије, долази до промена у секундарној и терцијарној структури протеина (275-277). На тај начин, ПОМ мењају физичко-хемијска својства биолошких протеина, што последично може да спречи и њихову агрегацију и таложење.

Захваљујући овој чињеници, пажња истраживача је у последњих неколико година усмерена ка испитивању интеракција између структурно различитих ПОМ и амилоидних протеина. Спроведени су *in vitro* експерименти који показују да ПОМ реагују са амилоидним протеинима и при томе мењају њихову секундарну и терцијарну структуру, чиме спречавају њихово погрешно савијање и формирање несолубилних влакана (278). У том смислу, *in vitro* студија Zhou и сарадника (279) испитивала је могућност синтетисаног $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у спречавању агрегације β -амилоида, коришћењем метода спектроскопије, флуороскопије, калориметрије и микроскопије атомских сила. На основу добијених резултата аутори су дошли до закључка да испитивани хетерополиволфрамат може да спречи формирање олигомера β -амилоида, који надаље се спајају и стварају нерастворљива амилоидна влакна. Имајући ово у виду, као и претходно описан штетан утицај амилоидног полипептидног острвца на функцију β -ћелија панкреаса, може се индиректно закључити да $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ стимулише секрецију инсулина код дијабетичких животиња тако што спречава погрешно увијање амилоидног полипептидног острвца и његове агрегације у екстрацелуларном простору панкреаса. Индиректну потврду овог закључка дају следећи подаци. 1. Резултати токсиколошке студије (**Графикон 3**) показују да синтетисани хетерополиволфрамат не изазива хипогликемију код здравих пацова, што указује да овај потенцијални лек-кандидат повећава ниво инсулина у крви дијабетичких животиња деловањем на патолошки измењене метаболичке сигналне путеве, као што је појачана агрегација β -амилоида у екстрацелуларном простору панкреаса. 2. Испитивани хетерополиволфрамат због своје величине и негативног наелектрисувања отежано пролази кроз фосфолипидни двослој семипермеабилних ћелијских мембрана, и стога ефекат стимулације ослабавања инсулина остварује или дејством на процесе који се одигравају у ванћелијском простору панкреаса или на површинске рецепторе β -ћелија (212). 3. Резултати патохистолошке анализе панкреаса (**Слика 20**) и студија Balici и сарадника (204), у којој је коришћен исти експериментални модел DM као у овом истраживању, за који се иначе сматра да је модел DM тип 1, показали су да не долази до потпуног одумирања β -ћелија панкреаса након интраперитонеалне једнократне примене стрептозотоцина у дози од 50 mg/kg. Такође, у поменутој студији је показано да се у цитоплазми преосталих β -ћелија налази смањен број секреторних гранула, као и повећан број незрелих секреторних „програнула“ инсулина, што указује на могућност да хипергликемија и пратеће компликације DM могу додатно да оштете секрецију инсулина током времена. Све ово наводи на претпоставку да је и код пацова са експерименталним дијабетесом изазваним једнократном применом стрептозотоцина (50 mg/kg) могуће таложење нерастворљивих влакана амилоидног полипептидног острвца у екстрацелуларном простору панкреаса. 4. У истој студији, али и у другим претходним истраживањима (280, 281), показано је да примена ПОМ значајно смањује апоптозу β -ћелија панкреаса, али и повећава

број и величину секреторних гранула инсулина у њиховој цитоплазми код дијабетичких животиња. Насупрот овим подацима, резултати *screening* студије (**Графикони 1 и 2**) показују да се антихипергликемијски ефекат испитиваних хетерополиволфрамата постиже релативно брзо, већ након 2 h од њихове примене, што није у корелацији са претходно наведеним закључком, јер је потребан дужи временски период да би испитивани хетерополиволфрамат спречио дисфункционалност β -ћелија насталу услед повећаног таложења нерастворљивих амилоидних влакана у панкреасу. Стога, све наведено може да укаже на могућност учествовања више различитих механизма који доприносе смањењу хипергликемије након примене испитиваних једињења, те су у будућности потребна даља истраживања механизма дејства испитиваних хетерополиволфрамата.

Недавно објављене *in vitro* студије показују да одређени ПОМ, пре свега они који садрже ванадијум, могу да смање резистенцију ткива на инсулин, односно да повећају преузимање и искоришћавање глукозе у периферним ткивима (скелетно-мишићно и масно ткиво). У студији *Pereira* и сарадника (237) показано је да $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ (1 mmol/L) статистички значајно повећава инсулином стимулирано преузимање глукозе у изолованим адипоцитима за око 50%, у поређењу са самосталном применом инсулина. Такође, истраживање *Yraola* и сарадника (240) показује да бензил-амонијумова со $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ значајно повећава преузимање глукозе у изолованим адипоцитима, што су објаснили тиме да услед оксидације испитиваног једињења под дејством ензима примарне-амин оксидазе настаје пероксованадат, који инхибирајући протеинску тирозин-фосфатазу стимулише транслокацију глукозних транспортера цитоплазме у ћелијску мембрану и на тај начин повећава преузимање глукозе. С тим у вези, у овом истраживању испитиван је *in vivo* утицај тронедељне и пероралне примене $\{NaP_5W_{30}\}$ (20 mg/kg/дан) на степен инсулинске осетљивости код дијабетичких животиња уз коришћење хомеостазног модела инсулинске резистенције који се израчунава помоћу формуле $HOMA-IR = [(инсулинемија (mIU/L) \times гликемија (mmol/L)) / 22,5]$. Добијени резултати (**Графикон 11**) показују да примена $\{NaP_5W_{30}\}$ током три недеље није утицала на вредност $HOMA-IR$ индекса код дијабетичких животиња, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Резултати показују и да не постоји статистичка значајност у $HOMA-IR$ индексу између контролне нормогликемијске и (контролне) дијабетичке групе (**Графикон 11**). Поред тога, тронедељна субкутана примена егзогеног инсулина у појединачној дневној дози од 6 IJ није мењала $HOMA-IR$ индекс код дијабетичких животиња, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 11**). На основу наведених резултата, може се закључити да добијени антихипергликемијски утицај испитиваног хетерополиволфрамата код дијабетичких животиња није узрокован променом инсулинске осетљивости. За потврду овог закључка потребно је испитати ефекат одабраног хетерополиволфрамата на степен инсулинске осетљивости код животиња са експерименталним дијабетесом типа 2, у коме постоји смањена осетљивост периферних ткива на дејство инсулина, односно повећан степен инсулинске резистенције.

DM представља изузетно важан фактор ризика за настанак различитих и по живот опасних поремећаја равнотеже електролита у организму (282, 283). Ови поремећаји превасходно настају код лоше регулисаних облика DM услед хипергликемије, хипоинсулинемије, поремећаја ацидобазне равнотеже, малапсорпционих синдрома и поремећаја бубрежне функције, али понекад су условљени и примењеном терапијом. Из тих

разлога, у овом истраживању процењиван је утицај тронедељне и пероралне примене $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg на концентрације електролита у крви дијабетичких животиња. Добијени резултати показују да се серумске концентрације натријума (**Графикон 12А**), калијума (**Графикон 12Б**), хлорида (**Графикон 12В**), неорганског фосфата (**Графикон 12Г**), укупног калцијума (**Графикон 12Д**) и укупног магнезијума (**Графикон 12Ђ**), као и концентрације јонизованог калцијума (**Графикон 12Е**) и јонизованог магнезијума (**Графикон 12Ж**) у некоагулисаној пуној крви, нису значајно мењале код дијабетичких животиња третираних испитиваним хетерополиволфраматом у односу на (контролну) дијабетичку групу, што повољне утиче на безбедносни профил ове супстанце.

Велике опсервационе студије показују да је снижена концентрација натријума у крви, односно хипонатријемија, најчешћи електролитни поремећај који се јавља код болесника са DM (284). Кључни патофизиолошки механизми који доприносе развоју и одржавању хипонатријемије услед повећане концентрације глукозе у крви су прелазак течности из ћелија у ванћелијски простор (тзв. дилуциона хипонатријемија) и осмотска диуреза, која доводи до прекомерног губитка натријума путем урина (285). Поред тога, познато је да одређени антихипергликемијски агенси (хлорпропамид, толбутамид, SGLT-2 инхибитори и инсулин), као и други лекови који се користе у лечењу DM и његових компликација (нпр. амитриптилин за лечење дијабетичке неуропатије) могу бити узрок снижене концентрације јона натријума у крви (286). Показано је да DM сам по себи, независно од хипергликемије и лекова, може изазвати дисбаланс натријума у организму (287). У недавно објављеној студији (288) у којој је учествовало 5179 болесника са DM старости преко 55 година, приказано је да се хипонатријемија може јавити у условима благо повишене или чак нормалне концентрације глукозе у крви. Ово се може објаснити чињеницом да је код експерименталних животиња и болесника са DM доказана повећана секреција хормона неурохипофизе — вазопресина, који преко V_2 рецептора значајно повећава степен реапсорпције воде у сабирним каналићима бубрега и то независно од натријума, чиме се изазива дилуција ванћелијске течности и хипонатријемија (289). Уз то, постоји и повезаност DM и успореног пражњења желуца, што додатно може допринети развоју хипонатријемије у условима нормогликемије услед повећане апсорпције хипотоне течности (290). Треба напоменути да се код болесника са DM може јавити и лажна хипонатријемија (или псеудохипонатријемија), која је последица лабораторијског артефакта узрокованог хиперлипидемијом, а добро је познато да овај метаболички поремећај скоро увек прати хроничну хипергликемију (291). За разлику од хипонатријемије, повишена концентрација натријума у крви се изразито ретко јавља код болесника са DM и преваходно настаје уколико се уноси премало воде упркос осмотској диурези, односно прекомерном губитку течности путем урина (292).

Други по учесталости поремећај равнотеже електролита код болесника са DM је снижена концентрација калијума у крви, односно хипокалијемија. Редистрибуција калијума из ванћелијског у унутарћелијски простор узрокована применом егзогеног инсулина, ГИТ губитак јона калијума услед развоја малапсорпционих синдрома и прекомерни губитак калијума путем урина услед осмотске диурезе, хипомагнезије и примене диуретика који не штеде калијум представљају главне разлоге који могу довести до развоја и одржавања хипокалијемије у условима хипергликемије (293). Независно од узрока, показано је да овај

електролитни поремећај додатно смањује секрецију инсулина и повећава степен инсулинске резистенције, чиме се ствара „зачарани круг“, који може довести до аритмије, срчаног застоја и слабости респираторних мишића код болесника са DM (294). Поред хипокалијемije, код болесника са DM може се јавити и повишена концентрација калијума у крви, али у значајно мањем проценту. Сматра се да смањена тубулска секреција калијума у дисталном делу нефрона изазвана синдромом „хипоренински хипоалдостеронизам“, односно дефицитом минералокортикоида, који примарно настаје услед оштећења јукстагломерулског апарата, представља најзначајнији фактор у развоју хиперкалијемije код болесника са DM, посебно асимптоматских (295). Други патофизиолошки механизми који могу изазвати овај електролитни поремећај су смањена јачина гломерулске филтрације и редистрибуција калијума из унутарћелијског у ванћелијски простор услед кетоацидозе, дефицита инсулина, ћелијске лизе и интрацелуларног хипертоницитета (296).

Хипофосфатемија је такође још један електролитни поремећај који се може јавити код DM (297). Настаје као последица осмотске диурезе, малапсорпционих синдрома, употребе лекова (тиазиди, диуретици Хенлеове петље и инсулин), примарног хипертиреозидизма и дефицита витамина Д. Треба нагласити да се рутинска надокнада фосфата не препоручује у корекцији хипофосфатемије, јер може довести до тешке и по живот опасне хипокалцемије и хипомагнеземеје. Стога, надокнада мора бити пажљива и оправдана, односно треба је применити само код тешке хипофосфатемије (фосфатемија < 0,32 mmol/L) или код болесника који развијају дисфункцију срца, хемолитичку анемију и депресију респирације (298).

Поремећаји метаболизма калцијума код болесника са DM углавном су повезани са поремећајем бубрежне функције. Познато је да се хиповолемија, инфекције (укључујући и септична стања) и рабдомиолиза значајно чешће јављају код ових болесника, те они имају повећан ризик за развој акутног бубрежног оштећења у односу на општу популацију (296). Такође, лечење DM и његових компликација подразумева и чешћу употребу нефротоксичних хемијских агенаса, као што су: радиоконтрастна средства, нефротоксични антибиотици, инхибитори ангиотензин конвертазе, блокатори ангиотензин II рецептора и нестероидни антиинфламаторни лекови, што додатно олакшава настанак акутног бубрежног оштећења (299). Уколико код болесника са DM настане нагли пад јачине гломерулске филтрације, последично долази до хиперфосфатемије и следствене хипокалцемије. Поред тога, снижена концентрација калцијума у крви може настати и у хроничној бубрежној болести дијабетесне етиологије услед хиперфосфатемије и дефицита активног облика витамина Д (300). Хипокалцемија може настати и без развоја бубрежне слабости, уколико се дијабетичка нефропатија манифестује нефротским синдромом, који доводи до губитка 25-хидроксихолекалциферола и његовог протеинског носача путем урина, што последично изазива дефицит активног облика витамина Д. Поред поремећаја бубрежне функције, и хипомагнеземеја може изазвати настанак хипокалцемије код болесника са DM, јер доводи до смањене секреције паратиреоидног хормона, као и до смањене осетљивости коштаног ткива и бубрежних каналића на његово дејство (301).

Хипомагнеземеја представља релативно чест поремећај електролита код болесника са DM, који се превасходно јавља услед осмотске диурезе, односно прекомерног губитка магнезијума путем урина. Примена инсулина и диуретика, смањен унос магнезијума, дијареја

због аутономне неуропатије и метаболичка ацидоза — такође, додатно могу учествовати у настанку и одржавању овог електролитног поремећаја (302). Да хипомагнеземија није тако редак поремећај код болесника са ДМ потврђује и недавна проспективна студија, која је показала да чак 40% испитаника са овим електролитним поремећајем болује од ДМ (288). С друге стране, хипомагнеземија се ретко дијагностикује код болесника са ДМ, вероватно зато што се концентрација укупног магнезијума у крви, а посебно јонизованог, често не одређује у рутинској клиничкој пракси. Међутим, бројне студије сведоче о важности препознавања и кориговања поремећаја метаболизма магнезијума, посебно код болесника са ДМ. Показано је да хипомагнеземија, поред тога што може довести до поремећаја ексцитабилности ткива и других електролитних поремећаја (хипокалемија, хипокалцемија и хипофосфатемија), учествује у патогенези хроничних, како макроваскуларних, тако и микроваскуларних компликација ДМ (303). Хипомагнеземија додатно смањује осетљивост периферних ткива на дејство инсулина, што додатно погоршава хипергликемију и друге метаболичке поремећаје код ДМ (303). Додатно, показано је да повећани унос магнезијума може смањити ризик за настанак тип 2 ДМ код особа са инсулинском резистенцијом (304). Стога је од круцијалног значаја одређивање концентрације, како укупног, тако и јонизованог магнезијума у крви код свих болесника са ДМ, укључујући и оне са добром гликорегулацијом.

Насупрот очекивањима, добијени резултати у овом истраживању показују да код (контролних) дијабетичких животиња није дошло до промена у серумским концентрацијама натријума (**Графикон 12А**), калијума (**Графикон 12Б**), хлорида (**Графикон 12В**), неорганског фосфата (**Графикон 12Г**), укупног калцијума (**Графикон 12Д**) и укупног магнезијума (**Графикон 12Ђ**), као и у концентрацији јонизованог калцијума у некоагулисаној пуној крви (**Графикон 12Е**), у односу на контролну нормогликемичку групу. Са друге стране, резултати ове студије показују да код (контролних) дијабетичких животиња, упркос нормалној серумској концентрацији укупног магнезијума, постоји снижена концентрација јонизованог магнезијума, у односу на контролну нормогликемичку групу (**Графикон 12Ж**), што је у претходним студијама већ и показано (305). Поред тога, у литератури се могу наћи контрадикторни подаци о утицају ДМ на концентрације електролита у крви код експерименталних животиња (306, 307). Може се претпоставити да се у основи ових контрадикторних резултата вероватно налази коришћење различитих експерименталних животиња у смислу врсте, соја, старости, пола и тежине, али и различитих експерименталних протокола за изазивање ДМ.

Као што је претходно наведено, тронедељна перорална примена одабраног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) није утицала на концентрације свих испитиваних електролита у крви дијабетичких животиња у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Сличан ефекат је идентификован и након примене егзогеног инсулина током три недеље, изузев ефекта на концентрацију јонизованог калцијума. Код дијабетичких животиња које су током три недеље субкутано добијале хумани дугоделујући инсулин у појединачној дневној дози од 6 IJ била је снижена концентрација јонизованог калцијума у поређењу са (контролном) дијабетичком групом (**Графикон 12Е**). Овај ефекат примене инсулина, који је показан и у претходним студијама, не зависи од постигнуте гликорегулације код болесника, а објашњава се појачаним везивањем калцијума за анјоне у плазми (308).

Свеукупно, добијени резултати указују да је у циљу адекватне процене електролитног статуса код болесника са ДМ неопходно одређивати и концентрације јонизованих фракција калцијума и магнезијума у крви, поред концентрација њихових укупних фракција. Показано је да нормалне концентрације укупних фракција ових електролита у крви не искључују могућност поремећаја њихових јонизованих фракција, односно слободних фракција које испољавају биолошке ефекте у ткивима и органима. Поред тога, добро постигнута гликорегулација, како инсулинским, тако и не-инсулинским антихипергликемијским агенсима не искључује могућност електролитних поремећаја код болесника са ДМ, који могу учествовати у етиопатогенези хроничних макро- и микроваскуларних компликација, уколико остану препознати и нелечени. Имајући у виду да одређени антихипергликемијски агенси сами по себи могу довести до електролитних поремећаја, што је и показано у овом истраживању у случају примене инсулина, чини се да изостанак деловања одабраног хетерополиволфрамата на концентрације електролита у крви потврђује безбедносни профил овог потенцијалног лека-кандидата.

Будући да поремећаји метаболизма липида имају значајну улогу у атерогенези, као и у настанку кардиоваскуларних догађаја код болесника са ДМ (309), у овом истраживању испитиван је утицај тронедељне пероралне примене $\{NaP_5W_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg на липидне конституенте крви код дијабетичких животиња. Добијени резултати показују да испитивани хетерополиволфрамат статистички значајно снижава концентрације укупног (**Графикон 13А**) и HDL-холестерола (**Графикон 13В**) у серуму дијабетичких животиња у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Насупрот овим резултатима, не уочава се статистички значајна разлика у серумским концентрацијама LDL-холестерола (**Графикон 13Б**), Аро-А1 (**Графикон 13Г**), Аро-В (**Графикон 13Д**) и укупних триглицерида (**Графикон 13Ђ**) између дијабетичких животиња третираних испитиваним хетерополиволфраматом и (контролне) дијабетичке групе.

Липопротеини представљају сферне партикуле састављене од централног језгра састављеног од неполарних липида (естри холестерола и триглицериди) и површинског једнослојног омотача фосфолипида (310). Њихова главна улога је транспорт хидросолубилних молекула холестерола и триглицерида у крвној плазми. Основна класификација липопротеина заснива се на њиховој густини, и стога разликујемо: хиломикорне, VLDL, липопротеине средње густине (IDL), LDL и HDL.

Хиломикрони представљају највеће липопротеинске честице које транспортују молекуле триглицерида и холестерола из хране богате мастима (310). Састоје се од: триглицерида (85-90%), холестеролских естара, фосфолипида и аполипопротеина (Аро-В48 и, у мањој мери, Аро-А1 и Аро-А4). Њихово формирање дешава се у ентероцитима, а сам процес повезивања липидних компоненти одвија се под дејством микрозомалног трансфер протеина. Након формирања, прелазе у лимфну циркулацију, а одатле у крвоток. У крвотоку, под каталитичким дејством липопротеинске липазе долази до хидролизе триглицерида у хиломикронским честицама, при чему се ослобађају NEFA и алкохол глицерол, и тако настају хиломикронски остаци, који се надаље разграђују у јетри под каталитичким дејством хепатичке триглицеридне липазе.

VLDL честице састоје се од: ендогених триглицерида (55-65%), холестеролских естара, фосфолипида и аполипопротеина (Аро-В100, Аро-Сs и Аро-Е), а у зависности од садржаја триглицерида у њима разликујемо VLDL1 партикуле (честице које су богате триглицеридима) и VLDL2 партикуле (честице које су мање и садрже мање триглицерида) (311). Формирање VLDL честица одваја се у јетри и корелише са количином триглицерида у њој. Најпре се у лумену грубог ендоплазматског ретикулума хепатоцита под дејством микрозомалног трансфер протеина спајају липиди и АроВ, при чему се формира партикула пре-VLDL, а затим ADP риболизација-1 активацијом фосфолипазе D конвертује пре-VLDL у VLDL. Након тога, у плазми липопротеинска липаза хидролизује триглицериде у партикулама VLDL, при чему се NEFA и алкохол глицерол, а један део преосталих фосфолипида, као и Аро-Сs и Аро-Е, преносе се на HDL. На овај начин формирају се партикуле LDL, које се надаље под каталитичким дејством хепатичке триглицеридне липазе претварају у партикуле LDL. Ове настале честице имају основни задатак да транспортују молекуле холестерола до периферних ћелија. Познато је да свака LDL честица садржи само један молекул Аро-В100, што има дијагностички и терапијски значај у процени дислипидемија. Клиренс ових честица се одвија посредством LDL В/Е рецептора, који је превасходно смештен на хепатоцитима (70%), али и на другим периферним ћелијама.

Нативне HDL партикуле формирају се у јетри или танком цреву, и то у виду малих липопротеинских честица које се углавном састоје од Аро-А1 (310). У циркулацији ове честице сазревају тако што од хиломикрона и VLDL преузимају фосфолипиде, као и Аро-Сs и Аро-Е, а од периферних ћелија преко АТФ-везујућег касетног транспортера преузимају слободни холестерол и фосфолипиде. Након тога, унутар овако настале зреле HDL честице долази до естерификације слободног холестерола помоћу лецитин холестерол ацилтрансферазе (енг. *Lecithin-Cholesterol Acyl Transferase*; LCAT), при чему настаје HDL3 честица. Затим, под дејством протеина за трансфер фосфолипида (енг. *PhosphoLipid Transfer Protein*; PLTP) долази до спајања две HDL3 честице и последичног стварања веће HDL2 честице. Овако настала већа партикула се даље разграђује под дејством хепатичке триглицеридне липазе и липопротеинске липазе до HDL остатака, које затим преузима јетра преко SR-В1 рецептора. Треба истаћи да се заједно са HDL партикулама у јетри синтетише и холестерол естар трансферни протеин (енг. *Cholesteryl Ester Transfer Protein*; CETP) који посредује у измени холестеролских естара из HDL са триглицеридима из хиломикрона или VLDL, што објашњава постојање инверзног односа између нивоа триглицерида и HDL у плазми.

Инсулин својим вишеструким ефектима игра кључну улогу у регулацији метаболизма липида. У масном ткиву инсулин инхибира хормон-осетљиву липазу, стимулише складиштење триглицерида и смањује секрецију NEFA (312, 313). На тај начин инсулин смањује супstrate за синтезу VLDL коју додатно спречава директним инхибиторним дејством на хепатоците. Инсулин је снажан активатор липопротеинске липазе, тако да подстиче разградњу триглицеридима богате партикуле. Показано је да овај хормон не повећава само активност липопротеинске липазе, већ позитивно утиче и на транскрипцију гена липопротеинске липазе (314). Поред тога, инсулин подстиче клиренс LDL тако што повећава експресију и активност LDL В/Е рецептора (315). Такође, инсулин повећава активност LCAT и хепатичке липазе, а смањује активност PLTP и тако остварује утицај и на

метаболизам HDL (316-318). Имајући у виду ове бројне ефекте инсулина на метаболичке путеве липопротеина, јасно је да нема поремећаја метаболизма инсулина без дислипидемије.

DM је готово увек удружен, како са квантитативним, тако и са и квалитативним, поремећајима метаболизма липида. Основни квантитативни поремећаји су хипертриглицеридемија и низак ниво HDL-холестерола, док су квалитативни поремећаји присутни у свим липопротеинским партикулама, али се посебно издваја повећање субфракције малих и густих LDL честица богатих триглицеридима (318). Будући да обе врсте поремећаја метаболизма липида подстичу атерогенезу и тиме повећавају ризик за настанак кардиоваскуларног догађаја, данас се са аспекта превенције DM посматра као еквивалент кардиоваскуларног догађаја, те приликом лечења болесника треба да се примене све мере секундарне превенције (319).

Велике опсервацијске студије показују да је најчешћа дијабетичка дислипидемија — хипертриглицеридемија, која се може јавити наташте, али и постпрандијално након уноса хране богате мастима (320). Овај квантитативни поремећај липида у DM превасходно настаје услед повећане продукције и смањене разградње VLDL честица (321). Недостатак инсулина и/или инсулинска резистенција доводе до: (1) повећаног прилива слободних масних киселина из масног ткива у јетру, (2) повећане *de novo* липогенезе у јетри и (3) смањеног инхибиторног ефекта инсулина на јетру, што доводи до повећаног формирања крупних и триглицеридима богатих VLDL1 честица, које макрофаги лако препознају и фагоцитишу, при чему долази до формирања добро познатих пенастих ћелија и последичног развоја атеросклеротских плакова. Упоредо са повећаном продукцијом, долази и до смањене разградње VLDL честица у DM, која је примарно резултат смањене активности липопротеинске липазе, што додатно учествује у развоју стања хипертриглицеридемије код DM (322).

Поред хипертриглицеридемије, настанку атеросклерозе и последичних кардиоваскуларних догађаја код болесника са DM доприносе и поремећаји метаболизма LDL и HDL (323). Наиме, услед повећаног формирања VLDL1 честица долази до пораста активности CETP, при чему настају честице LDL и HDL богате триглицеридима, које се затим под дејством хепатичке и липопротеинске липазе трансформишу у мале и густе партикуле (324). Овако настале партикуле HDL брже подлежу катаболизму, и на тај начин долази до њиховог сниженог броја у циркулацији, што се индиректно дијагностикује сниженом концентрацијом HDL холестерола (325). Будући да је познато да HDL честице испољавају антиатерогено, антиоксидативно и антитромбоцитно дејство, њихов снижен број у циркулацији поспешује развој и прогресију атеросклерозе (326). Аналогно са HDL честицама, мале и густе LDL партикуле отежано се везују за своје рецепторе на периферним ћелијама, услед чега је њихово задржавање у крви продужено (327). Ове партикуле подлежу процесима оксидативне модификације, чиме је омогућен њихов лакши пролазак кроз ендотел до медије зида крвног суда, где бивају фагоцитиване од стране макрофага, што опет доводи до настанка пенастих ћелија и развоја атеросклеротског плака (328). Бројна истраживања показују да оксидоване LDL партикуле у зиду крвног суда делују проинфламаторно, имуногено, апоптотично и цитотоксично, чиме додатно оштећују зид крвног суда и доводе до дијабетичке васкулопатије (325, 329, 330). Стога, лечење дислипидемија код DM представља изузетно важан корак у превенцији кардиоваскуларних догађаја и прераног морталитета.

Имајући у виду ову чињеницу, у овом истраживању испитиван је утицај синтетисаног хетерополиволфрамата на липидне параметре крви код дијабетичких животиња.

Насупрот очекивањима, добијени резултати показују да код (контролних) дијабетичких животиња није дошло до промена у серумским концентрацијама укупног холестерола (**Графикон 13А**), LDL-холестерола (**Графикон 13Б**), HDL-холестерола (**Графикон 13В**), Аро-А1 (**Графикон 13Г**), Аро-В100 (**Графикон 13Д**) и укупних триглицерида (**Графикон 13Ђ**) у поређењу са контролном нормогликемичком групом, што је донекле и у сагласности са литературним подацима, јер је у претходним студијама показано да DM изазван стрептозотоцином може имати различите ефекте на параметре липидног статуса код експерименталних животиња. У студији *Maiti* и сарадника (331) показан је статистички значајан пораст серумских концентрација укупног холестерола, укупних триглицерида и LDL-холестерола, као и редукција серумске концентрације HDL-холестерола код дијабетичких животиња након 14 дана од примене стрептозотоцина, у поређењу са контролном групом. С друге стране, у својој студији на пацовима, *Haidara* и сарадници (332) уочили су само статистички значајан пад серумске концентрације HDL-холестерола након 8 недеље од примене интраперитонеалне инјекције раствора стрептозотоцина у једнократној дози од 65 mg/kg у односу на контролну групу. Насупрот томе, *Miguez* и сарадници (333) показали су, у односу на контролну групу, само статистички значајан пад серумских концентрација LDL-холестерола и укупних триглицерида код дијабетичких пацова након 4 недеље од примене стрептозотоцина, док су у својој студији на пацовима *Zhu* и сарадници (334) показали да не постоји статистички значајна разлика у серумским концентрацијама LDL-холестерола, HDL-холестерола и укупних триглицерида између контролне и дијабетичке групе животиња, што је у сагласности са резултатима добијеним у овом истраживању (**Графикон 13**). Може се претпоставити да се у основи ових контрадикторних резултата и закључака вероватно налази коришћење различитих експерименталних животиња у смислу врсте, соја, старости, пола и тежине, али и различитих експерименталних протокола за изазивање DM. Ову наведену претпоставку могла би да поткрепи и студија *Yoshino* и сарадника (335) где је анализирана повезаност између трајања DM и нивоа триглицеридемије код пацова. Аутори су одређивали ниво триглицеридемије пре и (14, 60 и 120 дана) након примене интраперитонеалне инјекције стрептозотоцина у једнократној дози од 40 mg/kg код пацова. Добијени резултати су показали да краткотрајни недостатак инсулина (14 дана) не изазива хипертриглицеридемију код дијабетичких пацова. Насупрот овоме, уочене су повишене вредности триглицерида у крви дијабетичких пацова након 120 дана експеримента. У циљу разјашњавања добијене разлике, у даљем току истраживања одређиване су стопа продукције и брзина разградње триглицерида из плазме код дијабетичких пацова. Уочено је да трајање дијабетеса има значајан ефекат на брзину разградње триглицерида из плазме. Резултати су показали да краткотрајни недостатак инсулина доводи до повећане стопе продукције, али не и до смањеног степена разградње триглицерида из плазме, чиме су објаснили појаву нормалног нивоа триглицеридемије код дијабетичких пацова након 14. дана од примене стрептозотоцина. На основу овога, може се закључити да трајање DM код експерименталних животиња у различитим експерименталним протоколима може имати значајан утицај на биохемијске параметре липидног статуса у крви.

У складу са подацима из литературе, добијени резултати показују да тронедељна субкутана примена егзогеног инсулина у појединачној дневној дози од 6 IJ доводи до повећања серумске концентрације укупног холестерола за око 1,3 пута (**Графикон 13А**) и HDL-холестерола (**Графикон 13В**) за око 1,5 пута, у односу на (контролну) дијабетичку групу, што истиче позитиван терапијски ефекат инсулина на дислипидемију и наследичну атерогенезу код болесника са DM. Овај резултат може се објаснити тиме да примена егзогеног инсулина смањује ниво циркулишућих триглицерида, што смањује њихову размену са холестеролским естрима, која се одвија између партикула VLDL, са једне стране, и партикула LDL и HDL, са друге стране, посредством CETP. Ово доводи до нормализације нарушене структуре HDL, односно партикуле постају веће и богатије холестеролом, чиме је степен њихове разградње снижен, те стога долази до пораста концентрације HDL-холестерола у крви услед примене инсулина у терапији DM (336).

Насупрот егзогеном инсулину, добијени подаци показују да тронедељна перорална примена {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg статистички значајно снижава серумске концентрације укупног холестерола за око 1,3 пута (**Графикон 13А**) и HDL-холестерола за око 1,7 пута (**Графикон 13В**), док не утиче на серумске концентрације LDL-холестерола (**Графикон 13Б**), Аро-А1 (**Графикон 13Г**), Аро-В100 (**Графикон 13Д**) и укупних триглицерида (**Графикон 13Ђ**), у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Имајући у виду да је ово истраживање прва *in vivo* студија која је испитивала утицај хетерополиволфрамата, као представника ПОМ, на биохемијске параметре липидног статуса у крви дијабетичких пацова, у овом моменту није могуће протумачити добијене резултате услед недостатка литературних података, те је неопходно даље и детаљније истраживање липидних параметара које би разјаснило уочен феномен.

Као што је раније поменуто, неадекватно регулисана хипергликемија и метаболички поремећаји који је прате могу да изазову оштећење функције и структуре јетре, пре свега преко индукције метаболичког и оксидативног стреса, доводећи до хроничне инфламације ниског степена (337). Стога, у овом истраживању процењиван је хепатопротективни утицај тронедељне пероралне примене {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg код дијабетичких пацова одређивањем: (1) релативне масе јетре, (2) биохемијских параметара функције јетре (активности AST, ALT и ALP, као и концентрације укупних протеина и албумина), (3) параметара оксидативног стреса у хомогенату јетре (концентрације SOD-1, GPx-1 и MDA) и (4) патохистолошких промена у јетри коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе микроскопије. Сprovedено истраживање показује да испитивани хетерополиволфрамат значајно снижава активности ALT (**Графикон 15Б**) и ALP (**Графикон 15В**) у серуму дијабетичких животиња у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Истовремено, у јетри пацова третираних {NaP₅W₃₀} уочавају се само дискретна поља фокалне некрозе паренхима, док су у јетри (контролне) дијабетичке групе присутна дифузна, бројна и опсежна поља фокалне некрозе паренхима (**Слика 21**). Насупрот овим резултатима, релативна маса јетре (**Графикон 7Б**), серумска активност AST (**Графикон 15А**) и серумске концентрације укупних протеина (**Графикон 15Г**) и албумина (**Графикон 15Д**), као и концентрације SOD-1 (**Графикон 17Б**), GPx-1 (**Графикон 18Б**) и MDA (**Графикон 19Б**) у хомогенату јетре, нису се значајно мењале код дијабетичких животиња третираних испитиваним хетерополиволфраматом, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом.

Досадашње морфолошке студије показују да код животиња са експерименталним DM изазваним једнократним давањем стрептозотоцина долази до различитих структурних промена у паренхиму јетре, што као крајњи исход има повећање њене масе (250, 338, 339). Важно је поменути да су ове морфолошке промене превасходно последица метаболичких поремећаја насталих услед одумирања β -ћелија панкреаса, а не због директног хепатотоксичног дејства стрептозотоцина (339). Показано је да хепатотоксични ефекти стрептозотоцина трају релативно кратко (до 15 дана), као и да његова понављајућа примена код болесника са тумором панкреаса ретко доводи до дисфункције јетре и оштећења хепатоцита. У складу са тим, резултати ове студије показују да (контролни) дијабетички пацови који су једнократно интраперитонеално добили стрептозотин у дози од 50 mg/kg имају за око 1,35% већу релативну масу јетре на крају експеримента (21. дана), у односу на контролне нормогликемичке пацове (**Графикон 7Б**). Наведени резултат може се објаснити тиме да у условима хипоинсулинемије и хипергликемије долази како до повећаног прилива NEFA из периферног масног ткива у јетру, тако и до смањеног излучивања липопротеина из јетре услед смањене синтезе Аро-В, при чему настаје повећана акумулација триглицерида у хепатоцитима и последична хронична инфламација ниског степена и фиброза јетре, што надаље може прогредирати у хепатоцелуларни карцином и цирозу (340, 341). Такође, подаци из литературе говоре да су наведени патолошки процеси у јетри превасходно узроковани хипергликемијом, а у доста мањој мери хипоинсулинемијом (339), што објашњава добијени резултат да тронедељна примена испитиваног хетерополиволфрамата, као и хуманог дугоделујућег инсулина, није нормализовала релативну масу јетре (**Графикон 7Б**), јер њихова примена, иако је снизила хипергликемију, није довела до нормогликемије код дијабетичких пацова.

Добро је познато да лабораторијски тестови функције јетре, који се примарно базирају на испитивању ензимских система у крви, данас заузимају значајно место, како у дијагностици, тако и у процени степена оштећења јетре (260). У циљу једноставније интерпретације резултата и дијагностике, сва оштећења јетре деле се на хепатитисна, у којима доминира некроза хепатоцита, и холестазна, у којима доминира застој жучи у жучним путевима. Повишене серумске активности трансаминаза представљају водећи лабораторијски параметар за хепатитисни облик, док је за холестазни облик евидентан пораст серумске активности ALP, уз благо повишене или нормалне серумске активности трансаминаза. Имајући ово у виду, резултати овог истраживања показују да је код (контролних) дијабетичких пацова превасходно дошло до развоја холестазног типа оштећења јетре. Код (контролних) дијабетичких пацова уочен је изразити пораст серумске активности ALP за око 9 пута (**Графикон 15В**), уз благи пораст серумске активност ALT за око 1,8 пута (**Графикон 15Б**) у поређењу са контролном нормогликемичком групом. Насупрот овоме, није уочена статистички значајна разлика у серумској активности AST (**Графикон 15А**) између ове две експерименталне групе. Такође, резултати показују да код (контролних) дијабетичких пацова није дошло до поремећаја синтетске функције јетре, односно није уочена статистички значајна разлика у серумским концентрацијима укупних протеина (**Графикон 15Г**) и албумина (**Графикон 15Д**) у поређењу са контролном нормогликемичком групом. Наведени резултати су у складу са подацима из литературе који показују да лоше регулисани метаболички поремећаји код DM, поред стеатозе и неалкохолног стеатохепатитиса, могу да изазову и интрахепатички застој жучи у жучним

путевима, што се у литератури означава термином — дијабетичка хепатосклероза (342-344). Сматра се да ово оштећење јетре представља још једну хроничну микроангиопатску компликацију DM. Патогенеза дијабетичке хепатосклерозе није у потпуности разјашњена, али поједине патохистолошке студије показују да се у основи ове дијабетичке компликације налази таложење колагена типа 1, 3 и 4, ламинина и фибронектина у перисинусоидним просторима јетре (345). Уочено је да се дијабетичка хепатосклероза, као и друге микроангиопатске компликације (дијабетичка ретинопатија, нефропатија и неуропатија), јавља само код тешких и лоше регулисаних форми DM (346), те стога побољшана гликорегулација спречава њен настанак и прогресију, што је и доказано у овом истраживању. Тачније, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом, изостао је пораст активности ALP (**Графикон 15В**) и трансминаза (**Графикони 15А и Б**) у серуму дијабетичких животиња које су добијале током три недеље испитивани хетерополиволфрамаат у појединачној дневној дози од 20 mg/kg или хумани дугоделујући инсулин у појединачној дневној дози од 6 IU. Поред тога, иако је испитивани хетерополиволфрамаат изазвао благи поремећај синтетске функције код здравих пацова (**Графикони 4Г и Д**), његова примена код дијабетичких животиња није довела до поремећаја синтетске функције, односно не уочава се статистичка значајна разлика у серумским концентрацијама укупних протеина (**Графикон 15Г**) и албумина (**Графикон 15Д**) између (контролне) дијабетичке групе и дијабетичке групе која је добијала {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током три недеље. Свеукупно, резултати биохемијских параметара функције јетре указују да тронедељна перорална примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан), слично дејству егзогеног инсулина, може да спречи настанак холестазног типа оштећења јетре, без поремећаја њене синтетске функције, код животиња са експерименталним дијабетесом изазваним једнократним давањем стрептозотоцина у дози од 50 mg/kg.

Бројне експерименталне и клиничке студије указују да оксидативни стрес, односно нарушена динамичка равнотежа између прооксиданата и антиоксиданата, има значајну улогу у патогенези функционалног и морфолошког оштећења јетре код експерименталних животиња и болесника са DM (347-349). Заправо, хронична хипергликемија и повишен ниво NEFA, нарочито преко повећане продукције реактивних слободних радикала (супероксидни анјон радикал, водоник-пероксид, хидроксидни радикал и синглетни кисеоник), која се у највећој мери одиграва у активираним Купферовим ћелијама, изазивају неповратне и оксидативне модификације липида, протеина и угљених хидрата унутар хепатоцита, што следствено доводи до хепатичког оштећења. У тим смислу, у току овог истраживања анализиран је степен оксидативног стреса и антиоксидативне заштите у хомогенату јетре, како би се детаљније разјаснили могући молекуларни механизми добијене хепатопротективне активности испитиваног хетерополиволфрамата код дијабетичких животиња

У поређењу са контролном нормогликемијском групом, ткиво јетре (контролних) дијабетичких животиња се карактерише значајно вишим интензитетом липидне пероксидације, што се огледа у повећаној концентрацији MDA (**Графикон 19Б**). Овај резултат се у доброј мери слаже са резултатима других истраживачких група (350, 351), који наглашавају битну улогу повећане продукције прооксиданата и последичне липидне пероксидације у оштећењу јетре код експерименталног и хуманог DM. Под дејством

реактивних слободних радикала долази до пероксидације полинезасићених масних киселина и производње липидних радикала, који у реакцији са молекуларним кисеоником дају липидни пероксид и липидне хидропероксид радикале (352). Ови токсични молекули даље узрокују декомпоновање масних киселина и делипидацију биолошких мембрана, што ремети биолошку организацију хепатоцита, и на крају доводи до њихове смрти. Поред тога, високо реактивни секундарни производи липидне пероксидације реагују са аминокиселинима и нуклеотидима, и на тај начин доводе до поремећаја функције и структуре протеина и нуклеинских киселина, што додатно угрожава хепатоците. Стога, бројни аутори су анализирали заштитне ефекте различитих једињења (никотинамид, L-аргинин, натријум-нитропрусид, мелатонин, аспирин и ванадијум-сулфат) на повећан степен липидне пероксидације у јетри дијабетичких животиња, у циљу проналаска ефикасног хепатопротективног средства (353). По сличном принципу, и у овом истраживању анализиран је утицај одабраног хетерополиволфрамата (20 mg/kg) и егзогеног инсулина (6 IJ) на концентрацију MDA у хомогенату јетре дијабетичких животиња. На основу добијених резултата установљено је да перорална примена {NaP₅W₃₀} током три недеље није утицала на повишен ниво липидне пероксидације у хомогенату јетре дијабетичких животиња (**Графикон 19Б**), односно није постојала статистички значајна разлика у концентрацију MDA између (контролне) дијабетичке групе и дијабетичке групе која је добијала испитивано једињење. Насупрот овоме, субкутана примена хуманог дугоделујућег инсулина (6 IJ/дан) током три недеље знатно је снизила ниво липидне пероксидације у хомогенату јетре дијабетичких животиња, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 19Б**), што је показано у ранијим студијама (354, 355). Стога, може се закључити да примена испитиваног хетерополиволфрамата, супротно ефекту егзогеног инсулина, не смањује продукцију реактивних слободних радикала, односно ниво оксидативног стреса у јетри дијабетичких пацова.

Додатно, показано је да концентрација SOD-1 (**Графикон 17Б**), која показује антиоксидативни протективни систем у ткивима, повећана у хомогенату јетре (контролних) дијабетичких животиња, у односу на контролну нормогликемичку групу. Такође, и у хомогенату јетре дијабетичких пацова третираних одабраним хетерополиволфраматом може се уочити висока концентрација SOD-1. Стога, ови резултати могу се приписати већој ангажованости антиоксидативних механизма услед повећане продукције ROS. За разлику од ових резултата, субкутана примена егзогеног инсулина (6 IJ/дан) током три недеље довела је до значајног пада концентрације SOD-1 (**Графикон 17Б**), као и GPx-1 (**Графикон 18Б**), у хомогенату јетре дијабетичких животиња. Овај резултат, као и налаз смањеног нивоа липидне пероксидације, указују да терапија инсулином код дијабетичких животиња значајно мења оксидативни метаболизам у јетри, што може бити један од механизма његовог хепатопротективног дејства.

Биохемијски параметари функције и патохистолошка анализа јетре показују да перорална примена одабраног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) током три недеље може да спречи дисфункцију и структурно оштећење јетре код дијабетичких пацова. С друге стране, измерене концентрације MDA, SOD-1 и GPx-1 указују да његова примена не утиче, како на повећану продукцију прооксиданата, тако и на антиоксидативне процесе, у јетри дијабетичких животиња. Овакви налази говоре у прилог да одабрани хетерополиволфрамат

код дијабетичких животиња спречава развој и прогресију оштећења јетре независно од оксидативног метаболизма, те су неопходна даља, опсежна испитивања комплексних механизма хепатопротективног дејства испитиваног хетерополиволфрамата, показаног у овом истраживању.

Добро је познато да дуготрајно дејство DM и метаболичких поремећаја који га прате доводе до промена на гломерулима и бубрежним тубулима (356). Оштећења су у почетку функционална и реверзибилна, међутим уколико се не препознају и не лече касније прелазе у морфолошка и иреверзибилна. Наиме, долази до развоја хроничне бубрежне болести, која у свом терминалном стадијуму захтева лечење неком од метода замене бубрежне функције (хемодијализа, перитонеумска дијализа или трансплатација), што значајно смањује функционалност и ремети квалитет живота оболелих од DM (357). Најновије опсервацијске студије показују да је број оболелих од DM код којих се развија терминална бубрежна слабост у драматичном порасту (358). Сматра се да је овај тренд раста превасходно последица лоше метаболичке контроле, тачније, непостизања индивидуално одређених циљних вредности HbA_{1c} . Стога, савремени међународни водичи препоручују да се приликом одабира лека за снижавање концентрације глукозе у крви даје предност онима са доказаним нефропротективним дејством, како би се превенирао настанак, али и прогресија хроничне бубрежне болести (177).

У том смислу, у даљем току овог истраживања, након што је показана антихипергликемијска активност $\{NaP_5W_{30}\}$, процењиван је нефропротективни утицај тронедељне пероралне примене овог једињења у појединачној дневној дози од 20 mg/kg код дијабетичких пацова одређивањем: (1) релативне масе бубрега, (2) биохемијских параметара функције бубрега (концентрације урее, креатинина, мокраћне киселине, KIM-1 и NGAL), (3) параметара оксидативног стреса у хомогенату бубрега (концентрације SOD-1, GPx-1 и MDA) и (4) патохистолошких промена у јетри коришћењем конвенционалне светлосне и трансмисионе електронске микроскопије. Показано је да испитивани хетерополиволфрамаст статистички значајно снижава концентрацију урее у серуму дијабетичких животиња (**Графикон 16А**), у односу на (контролну) дијабетичку групу. Додатно, у серуму дијабетичких пацова третираних $\{NaP_5W_{30}\}$ измерен је пад концентрације креатинина (**Графикон 16Б**), у поређењу са контролном нормогликемијском групом. Истовремено, на препаратима бубрега пацова третираних $\{NaP_5W_{30}\}$ нису присутна опсежна поља фокалне некрозе епителних ћелија тубула, која су уочена у (контролној) дијабетичкој групи (**Слика 22**). Насупрот овим резултатима, концентрације мокраћне киселине (**Графикон 16В**), KIM-1 (**Графикон 16Г**) и NGAL (**Графикон 16Ђ**) нису се значајно мењале код дијабетичких животиња третираних испитиваним хетерополиволфрамастом, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Међутим, концентрације SOD-1 (**Графикон 17В**) и MDA (**Графикон 19В**) показују да испитивани хетерополиволфрамаст значајно снижава ниво оксидативног стреса у бубрезима дијабетичких животиња.

Механизам настанка и развоја дијабетичке нефропатије није у потпуности разјашњен, али постоје бројни подаци који указују да ренин-ангиотензин систем заузима значајно место у патогенези ове микроангиопатске компликације (359). Наиме, бројне клиничке и експерименталне студије сведоче да су инхибитори ангиотензин конвертазе и блокатори ангиотензин II рецептора корисна фармаколошка алатка у превенцији и лечењу дијабетичке

нефропатије (360, 361). Међутим, никако се не може искључити могућност учешћа и других штетних механизма и медијатора.

Познато је да хипергликемија повећава количину глукозе у примарној мокраћи. Ово затим доводи до повећане реасорпције глукозе у проксималним каналићима, која се одвија преко SGLT, у котранспорту са Na. Као последица тога, мања концентрација NaCl стиже до дисталних тубула и макуле денсе, чиме се активира ренин-ангиотензин систем (362). Ангиотензин II, изазивајући вазодилатацију аферентне артериоле гломерула, узрокује хиперперфузију гломерула и следствени пораст гломерулског капиларног притиска, што доводи до хиперфилтрације кроз гломерулску капиларну мембрану. Хиперфилтрација затим механички истезе ћелије гломерула, и на тај начин стимулише аутокрину и паракрину продукцију бројних цитокина и фактора раста (нпр. трансформирајући фактор раста β , инсулину сличан фактор раста, васкуларни ендотелни фактор раста, простаноиди и многи други), који мењају структуру и функцију ендотелних, епителних и мезангијумских ћелија гломерула, као и епителних ћелија проксималних каналића (359, 360, 363). Поред тога, хиперфилтрација повећава колоидни-осмотски притисак у постгломерулским капиларима, што такође повећава реасорпцију глукозе у тубуларним епителним ћелијама проксималних каналића, чиме се додатно појачава активност ренин-ангиотензин система у дијабетичком бубрегу (364). У овом, још увек реверзибилном, стадијуму дијабетичке нефропатије бубрег је увећан због хипертрофије гломерула и проксималних каналића, а јачина гломерулске филтрације је повећана услед гломерулске хипертензије (365). Међутим, уколико се не предузму одговарајуће мере лечења, у даљем току дијабетичке нефропатије, настају ирреверзибилна оштећења нефрона (гломерулосклероза, атрофија каналића и интерстицијумска фиброза) која узрокују атрофију бубрега и смањење јачине гломерулске филтрације, односно долази до развоја хроничне бубрежне слабости (357).

У складу са подацима из литературе (250), резултати ове студије показују да хронична хипергликемија у почетним фазама дијабетичке нефропатије доводи до хипертрофије бубрега код животиња. Заправо, (контролни) дијабетички пацови који су једнократно интраперитонеално добили стрептозотцин у дози од 50 mg/kg имају већу релативну масу бубрега на крају експеримента, у односу на контролне пацове са нормалним вредностима глукозе у крви (**Графикон 7В**). Са друге стране, тронедељна перорална примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан), као и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IJ/дан), није имала утицај на релативну масу бубрега код дијабетичких животиња (**Графикон 7В**). Добијени резултати су у складу са очекивањима, јер одабрани хетерополиволфрамат и егзогени инсулин, иако су снизили ниво хипергликемије, нису довели до нормализације вредности глукозе у крви код дијабетичких животиња, што је неопходан услов за смањење изразито појачане активности ренин-ангиотензин система у бубрегу, који у највећој мери доприноси развоју и одржавању хипертрофије бубрега код DM (359).

Дијагностиковање поремећаја бубрежне функције у рутинској клиничкој пракси примарно се базира на одређивању концентрације урее и креатинина у крви (366). Међутим, најновија истраживања указују да концентрација мокраћне киселине у крви може бити рани биомаркер оштећења бубрежне функције код дијабетичке нефропатије (367). Показано је да се хронична болест бубрега која је узрокована DM може манифестовати прво хиперурикемијом, а након тога порастом концентрације урее и креатинина у серуму. Сходно

томе, у циљу процене нефропротективне активности испитиваног хетерополиволфрамата, анализирана је бубрежна функција експерименталних животиња одређивањем концентрације урее, креатинина и мокраћне киселине у серуму. Добијени резултати показују да код (контролних) дијабетичких животиња долази до изразитог и статистички значајног пораста серумске концентрације урее, у поређењу са контролном нормогликемичком групом (**Графикон 16А**). Насупрот овоме, није постојала статистички значајна разлика у концентрацији креатинина (**Графикон 16Б**) и мокраћне киселине (**Графикон 16В**) између ове две експерименталне групе. Овакав налаз јасно указује да није дошло до развоја бубрежне слабости код дијабетичких животиња, и да је пораст серумске концентрације урее вероватно последица повећане разградње протеина, а не смањене јачине гломерулске филтрације, односно бубрежне слабости (368). Добијени резултати су у складу са претходно објављеним студијама, које показују да поремећај бубрежне функције код дијабетичке нефропатије настаје у каснијим стадијумима болести, односно са развојем атрофије бубрега (369, 370). У складу са овим, испитивани хетерополиволфрамат нормализацијом концентрације урее код дијабетичких животиња није побољшао бубрежну функцију, већ је значајно смањио степен катаболизма протеина, што је такође повољан ефекат у лечењу ДМ (371).

Као што је раније поменуто, хипергликемија и хиперфилтрација кроз гломерулску капиларну мембрану, поред ћелија гломерула, оштећују и тубуларне епителне ћелије проксималних каналића (364), што је и показано у овом истраживању патохистолошком анализом ткива бубрега (**Слика 22**). Повећан степен реапсорпције глукозе у проксималним каналићима изазива повећану потрошњу АТФ и кисеоника, што резултује хипоенергозом и хипоксијом у тубуларним епителним ћелијама. Ови поремећаји затим путем активације фактора транскрипције изазвани хипоксијом, АМР-зависне протеин киназе и mTOR сигналног пута доводе до хипертрофије и пролиферације тубуларних епителних ћелија проксималних каналића, како би се компензовала њихова повећана метаболичка активност. Међутим, у даљем току настаје дедиференцијација ових ћелија превасходно услед дефицита интрацелуларног АТФ и поремећене експресије гена укључених у митохондријалну биогенезу и оксидацију слободних масних киселина. Ово затим нарушава интегритет мембрана митохондрија и доводи до ослобађања митохондријалне ДНК унутар цитоплазме, што узрокује одумирање тубуларних епителних ћелија проксималних каналића, као и активацију бројних цитокина, хемокина и фактора раста, који снажно привлаче и стимулишу лимфоците и ћелије моноцитно/макрофагног система, као и (мио)фибробласте у интерстицијуму бубрега. Дакле, завршни стадијум дијабетичке нефропатије, као што је претходно наведено, поред гломерулосклерозе, карактерише се и атрофијом проксималних каналића и фиброзом интерстицијума (372). Имајући ово у виду, у овом истраживању одређиване су концентрације KIM-1 и NGAL у серуму експерименталних животиња, као биомаркери оштећења проксималних каналића. Упркос пољима некрозе епителних ћелија тубула која су уочена применом микроскопих метода (**Слика 22**), показано је да код (контролних) дијабетичких животиња не долази до пораста серумских концентрација KIM-1 (**Графикон 16Г**) и NGAL (**Графикон 16Д**) у поређењу са контролном нормогликемичком групом. Такође, тронедељна примена испитиваног хетерополиволфрамата и егзогеног инсулина није утицала на концентрацију ових биомаркера у серуму дијабетичких животиња, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Добијени резултати су у складу са подацима из литературе (373), који показују да се пораст концентрација KIM-1 и NGAL у

серуму/урину дешава тек у каснијим фазама дијабетичке нефропатије. На основу ових налаза, као и претходних резултата концентрација урее (**Графикон 16А**), креатинина (**Графикон 16Б**) и мокраћне киселине (**Графикон 16В**), може се закључити да је за испитивање утицаја хетерополиволфрамата на бубрежну функцију дијабетичких животиња неопходно дуже трајање експерименталног периода, како би код пацова дошло до развоја хроничне бубрежне слабости услед дијабетичке нефропатије.

Резултати бројних истраживања показују да у бубрегу дијабетичких животиња постоји повећана производња реактивних слободних радикала, која се превасходно дешава у респираторном ланцу митохондрија, али и под дејством NAD(P)H оксидазе (209, 374, 375). Стога, оксидативни стрес представља терапијску мету у развоју нових лекова за лечење дијабетичке нефропатије (376). У складу са тим, и у овом истраживању анализиран је утицај одабраног хетерополиволфрамата на параметере оксидативног стреса и антиоксидативне заштите у хомогенату бубрега дијабетичких животиња. Добијени резултати показују да тронедељна перорална примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) током три недеље статистички значајно смањује концентрацију MDA у хомогенату бубрега дијабетичких животиња, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом (**Графикон 19В**). Наиме, показано је да испитивани хетерополиволфрамат смањује степен липидне пероксидације, односно ниво оксидативног стреса у бубрегу дијабетичких животиња. Ову тврдњу додатно подржава резултат који показује нижу концентрацију SOD-1 у хомогенату бубрега дијабетичких пацова третираних испитиваним хетерополиволфраматом, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 17В**). Интересантно, тронедељна примена егзогеног инсулина (6 IJ/дан) довела је до сличних ефеката, односно снизила је концентрацију MDA (**Графикон 19В**) и SOD-1 (**Графикон 17В**) у хомогенату бубрега код дијабетичких животиња, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Међутим, за разлику од испитиваног хетерополиволфрамата, примена инсулина нормализовала је и концентрацију GPx-1 у хомогенату бубрега код дијабетичких пацова, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 18В**), што додатно потврђује нефропротективни ефекат примене инсулина код DM.

Свеукупно, биохемијски параметари функције бубрега, параметри оксидативног стреса и патохистолошка анализа бубрега показују да перорална примена одабраног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) током три недеље може да спречи дисфункцију и структурно оштећење бубрега код дијабетичких пацова. Овакав закључак заједно са добијеним антихипергликемијским и хепатопротективним ефектом потврђује ефикасност овог потенцијалног новог лека-кандидата у терапији DM.

Срчана слабост, која може бити како исхемијске, тако и не-исхемијске етиологије, представља водећи узрок морбидитета и морталитета код болесника са DM (377). Резултати чувене проспективне Фрамингамске студије (378) спроведене на 5000 испитаника показују да DM, независно од старости, гојазности, дислипидемије и коронарне артеријске болести, удвостручује ризик за настанак срчане слабости код мушкараца, док је код жена овај ризик пет пута већи. Стога, превенција срчане слабости представља изузетно важан терапијски циљ код болесника са DM, те данашњи савремени водичи предлажу употребу антихипергликемијских агенаса са доказаним кардиопротективним дејством (177).

У бројним експерименталним и клиничким истраживањима потврђено је да DM сам по себи, у одсуству патологије коронарних крвних судова, хипертензије и валвуларне болести срца, доводи до молекуларног, функционалног и структурног оштећења кардиомиоцита, које се у литератури означава термином дијабетичка кардиомиопатија (379, 380). Ова дијабетичка компликација примећена је пре више од четири деценије у малој кохортној студији *Rubler* и сарадника (381), али њена комплексна мултифакторијална етиопатогенеза није у потпуности разјашњена. Сматра се да је повишен ниво оксидативног стреса важан играч у развоју и прогресији дијабетичке кардиомиопатије (382). Стога, у овом истраживању процењиван је кардиопротективан утицај тронедељне и пероралне примене $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ у појединачној дневној дози од 20 mg/kg код дијабетичких пацова одређивањем: (1) релативне масе срца и (2) параметара оксидативног стреса у хомогенату срца. Добијени резултати показују да примена испитиваног хетерополиволфрамата смањује концентрацију SOD-1 (**Графикон 17А**) у хомогенату срца дијабетичких животиња, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Насупрот овоме, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ није утицао на релативну масу срца (**Графикон 7А**), као и на концентрације, GPx-1 (**Графикон 18А**) и MDA (**Графикон 19А**) у хомогенату срца дијабетичких животиња, у односу на (контролну) дијабетичку групу.

Подаци из литературе говоре о више различитих механизма укључених у патофизиологији дијабетичке кардиомиопатије (382). Сматра се да хипергликемија, инсулинска резистенција, хипертриглицеридемија, повећан ниво NEFA и поремећено искоришћавање глукозе у кардиомицитима, као и нарушена регулација неурохуморалних механизма (симпатички нервни систем, ренин-ангиотензин-алдостерон систем и систем ендотелина-1) представљају најважније факторе који доприносе развоју и прогресији оштећења миокарда код болесника са DM. Показано је да ови фактори првенствено доводе до стимулације NADP(H) оксидаза и оштећења митохондрија, што последично изазива повећану продукцију прооксиданата, чиме се повећава ниво оксидативног стреса, који затим повећава степен апоптозе (програмиране ћелијске смрти) кардиомиоцита (383, 384). Поред индукованог оксидативног стреса, студије су показале да и хипергликемија сама по себи, путем активације каспазе-3, може довести до повећаног степена апоптозе кардиомиоцита (385). У даљем току дијабетичке кардиомиопатије долази до хипертрофије преосталих функционалних кардиомиоцита, као компензаторни одговор на њихово појачано одумирање, како би се смањио хемодинамски стрес на зиду комора (386). Истовремено, долази и до прекомерног накупљања екстрацелуларног матрикса, пре свега колагена, у интерстицијуму миокарда (387). Хипертрофија и фиброза миокарда затим повећавају крутост зида комора и на тај начин доводе до поремећене њихове релаксације, односно настаје дијастолна дисфункција леве коморе, која се према најновијим водичима означава као срчана слабост са очуваном ејекционом фракцијом (енг. *heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF*) (388, 389). Уколико се овај облик срчане слабости не препозна и не лечи, касније прелази у срчану слабост са смањеном ејекционом фракцијом (енг. *heart failure with reduced ejection fraction; HFrEF*), која представља важан узрок смртог исхода код болесника са DM.

У складу са подацима из литературе (390), резултати овог истраживању показују да DM снижава релативну масу срца за око 18% код пацова, у односу на контролну нормогликемијску групу (**Графикон 7А**). Наиме, (контролни) дијабетички пацови који су

једнократно интраперитонеално добили стрептозотоцин у дози од 50 mg/kg су имали мању релативну масу срца на крају експеримента, у односу на контролне пацове са нормалним вредностима глукозе у крви. Овакав налаз је у складу са резултатима претходних истраживања и објашњава се повећаним степеном апоптозе кардиомиоцита, која је заступљенији патолошки образац у почетним стадијумима дијабетичке кардиомиопатије, у односу на хипертрофију и фиброзу миокарда. Студија *Fiordaliso* и сарадника (390) је показала да дијабетички пацови након 4. недеље од апликовања стрептозотоцина имају за око 30% мању укупну масу кардиомиоцита, а за око 14% повећану запремину преосталих кардиомиоцита. Аутори су уочили да је највећи степен апоптозе кардиомиоцита био 3. дана од изазивања DM, а најмањи на крају експерименталног периода, односно 28. дана, чиме се додатно потврђује редослед патолошких промена у дијабетичкој кардиомиопатији. Резултати овог истраживања додатно показују да тронедељна субкутана примена егзогеног инсулина (6 IJ/дан) статистички значајно повећава релативну масу срца за око 18,5% код дијабетичких животиња, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 7А**), што је такође у сагласности са претходним истраживањима (391). У литератури се могу наћи подаци о протективном утицају примене инсулина на апоптозу кардиомиоцита код дијабетичке кардиомиопатије, али тачан механизам његовог антиапоптотског деловања није у потпуности разјашњен. За разлику од инсулина, тронедељна перорална примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg) није утицала на релативну масу срца код дијабетичких животиња, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. На основу наведеног резултата може се индиректно закључити да примена испитиваног хетерополиволфрамата, за разлику од инсулина, не спречава повећан степен апоптозе кардиомиоцита код дијабетичке кардиомиопатије.

Насупрот очекивањима, добијени резултати показују да код контролних дијабетичких животиња није дошло до раста концентрације SOD-1 (**Графикон 17А**), GPx-1 (**Графикон 18А**) и MDA (**Графикон 19А**) у хомогенату срца, у поређењу са контролном нормогликемичким групом. Имајући ово у виду, као и претходне резултате о релативној маси срца, може се индиректно претпоставити да оксидативни стрес вероватно учествује у каснијим фазама патогенезе дијабетичке кардиомиопатије, односно у процесима настанка и прогресије хипертрофије и фиброзе миокарда, а да су неки други фактори и механизми одговорни за појачано одумирање кардиомиоцита. У поређењу са (контролном) дијабетичком групом, тронедељна примена одабраног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) и егзогеног инсулина (6 IJ/дан) није имала утицај на концентрацију GPx-1 (**Графикон 18А**) и MDA (**Графикон 19А**) у хомогенату срца дијабетичких пацова. Са друге стране, њихова примена довела је до статистички значајног пада концентрације SOD-1 у хомогенату срца дијабетичких животиња, у односу на контролну дијабетичку групу (**Графикон 17А**). Овакав налаз указује да испитивани хетерополиволфрамат и егзогени инсулин смањују капацитет антиоксидативне заштите у срцу дијабетичких животиња, те се добијени резултати о концентрацији SOD-1 морају узети са резервом.

Поред директног оштећења миокарда, DM и метаболички поремећаји који га прате доводе до оштећења и зида крвног суда, са последичним формирањем атероматозних плакова, који преко интралуминалне стенозе, тромбозе, емболизације, формирања анеуризми и руптуре зида крвног суда, узрокују макроваскуларне компликације дијабетеса —

исхемијска болест срца, цереброваскуларна болест и периферна артеријска болести (392). Показано је да хронична инфламација ниског степена игра значајну улогу у свим стадијумима настанка и прогресије атероматозних плакова, те се данас атеросклероза сматра хроничном инфламаторном болешћу (393). Стога, као што је претходно поменуто, Америчко удружење кардиолога и Центар за контролу болести дали су 2003. године препоруку да би за процену кардиоваскуларног ризика, поред традиционалних фактора ризика, требало испитати и биохемијске параметре инфламације (251). Имајући то у виду, у овом истраживању одређиване су концентрације CRP и феритина у серуму експерименталних животиња, у циљу процене протективног ефекта испитиваног хетерополиволфрамата на развој васкуларне инфламације. У односу на контролну нормогликемијску групу, серумске концентрације испитиваних биохемијских параметара инфламације нису се статистички значајано мењале код (контролних) дијабетичких животиња (**Графикон 14**). Узимајући у обзир овај налаз, као и резултате претходних студија који јасно показују улогу маркера инфламације у процени ендотелне дисфункције и атеросклерозе (394, 395), може се индиректно закључити да код (контролних) дијабетичких животиња није дошло до развоја инфламаторних атеросклеротских плакова и дијабетичке васкулопатије, што може бити последица кратког експерименталног периода овог истраживања. Стога, добијени резултати који показују да примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) и егзогеног инсулина (6 IJ/дан) током три недеље није значајно утицала на серумске концентрације CRP и феритина код дијабетичких пацова у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 14**) треба тумачити са резервом. Процену протективног ефекта испитиваног хетерополиволфрамата на развој дијабетичке васкулопатије треба сагледати у наредним истраживањима, пре свега применом патохистолошких метода у испитивању атеросклерозе.

Многобројна истраживања су показала да DM свој штетни утицај остварује и на ЦНС доводећи до низа различитих неурохемијских, неуропсихолошких и структурних поремећаја, што се у литератури означава заједничким термином дијабетичка енцефалопатија (396). У последњих неколико година, пажња бројних истраживача је посебно усмерена ка испитивању повезаности између DM и когнитивних функција (397). Велике опсервацијске студије су показале да оболели од DM имају за око два пута већи ризик за настанак когнитивног оштећења, у поређењу са особама без DM (398, 399). Овај податак познат је пре више од две деценије, али до данас тачна патофизиологија когнитивног оштећења код DM није у потпуности разјашњена. Сматра се да повећан ниво оксидативног стреса у различитим регионима мозга, али и промена активности ензима укључених у процесе неуротрансмисије, имају круцијалну улогу у настанку и развоју дијабетичке енцефалопатије (254, 400-402). Сходно томе, у овом истраживању процењиван је неуропротективни утицај тронедељне пероралне примене {NaP₅W₃₀} у појединачној дневној дози од 20 mg/kg код дијабетичких пацова одређивањем: (1) активности АChE, Na⁺/K⁺-АТРаза и *ecto*-АТРаза и (2) параметара оксидативног стреса, у синаптозомама изолованим из целих мозгова пацова. Добијени резултати показују да примена испитиваног хетерополиволфрамата повећава синаптозомалну активност Na⁺/K⁺-АТРаза код дијабетичких животиња (**Графикон 20Б**), у поређењу са (контролном) дијабетичком групом. Насупрот овоме, није добијена значајна разлика у синаптозомалној активности АChE (**Графикон 20А**) и *ecto*-АТРаза (**Графикон 20В**), као и у синаптозомалној концентрацији SOD-1 (**Графикон 17Г**), GPx-1 (**Графикон 18Г**)

и MDA (**Графикон 19Г**), између (контролне) дијабетичке групе и дијабетичке групе која је добијала испитивани хетерополиволфрамат током три недеље.

Познато је да холинергичке синапсе, које су широко распрострањене у мозгу, учествују у бројним виталним функцијама, као што су учење, памћење, временска и просторна организација вољних моторних покрета и контрола можданог крвотока (403, 404). Недвосмислено је показано да је за нормално функционисање холинергичке трансмисије одговорна AChE, која брзом хидролизом ACh до ацетата и холина у синаптичкој пукотини прекида пренос импулса у холинергичким спојницима. Поред тога, показано је да овај ензим има и неке не-холинергичке функције, односно учествује у пролиферацији ћелија, расту неурита и хематопоези (405). Добро је познато да промена активности AChE у различитим можданим регионима представља значајан фактор који доприноси настанку и прогресији когнитивне дисфункције, деменције и неуродегенерације (406). Стога, у циљу разјашњавања патогенезе дијабетичке енцефалопатије, која се превасходно клинички манифестује поремећајем когнитивних функција и деменцијом, неколико истраживачких група испитивале су утицај DM и хипергликемије на активност AChE. *Schmatz* и сарадници су у својој *in vivo* студији (407), која је трајала 30 дана, показали да код дијабетичких пацова постоји поремећај памћења, који је био удружен са нижом активношћу AChE у можданом кортексу, хипокампусу, стриатуму, церебелуму и хипоталамусу, у поређењу са контролном нормогликемичком групом. Слично, студија *Wang* и сарадника (401), у којој је испитиван протективни утицај аспирина на поремећај памћења и учења код дијабетичких мишева, показала је да у хипокампусу дијабетичких животиња постоји снижена активност AChE, у односу на контролну групу. Насупрот овоме, у истраживању *Leong* и *Leung* (408) показано је да не постоји статистичка значајна разлика у активности AChE у различитим регионима мозга (мождани кортекс, хипокампус, стриатум, церебелум, таламус и хипоталамус) између контролне и дијабетичке групе животиња. Са друге стране, *Kamboj* и сарадници (409) су показали снижену активност AChE у церебралном кортексу, церебелуму и можданом стаблу код дијабетичких животиња, у односу на контролну нормогликемичку групу. У овом истраживању показано да не постоји статистички значајна разлика у синаптозомалној активности AChE између контролне нормогликемичке и (контролне) дијабетичке групе (**Графикон 20А**). Овако контрадикторни резултати могу се делимично објаснити чињеницом да су у наведеним студијама коришћене различите експерименталне животиње, протоколи и процедуре. Поред тога, у овом истраживању је показано да примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) и хуманог дугodelујућег инсулина (6 IJ/дан) током три недеље не утиче на синаптозомалну активност AChE код дијабетичких пацова, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 20А**), што указује на њихов повољан фармаколошки и безбедоносни профил, јер због наведених контрадикторних резултата о утицају DM на активност AChE у мозгу тешко је проценити повољан ефекат неке супстанце на активност овог ензима.

Na⁺/K⁺-АТРаза представља интегралну мембранску аденозинтрифосфатазу, која има есенцијалну улогу да одржава мировни мембрански потенцијал ћелија тако што у присуству јона магнезијума транспортује јоне натријума ван ћелије, а јоне калијума унутар ћелије, насупрот њиховом концентрационом градијенту, користећи енергију која се добија хидролизом АТР (410). Активност овог ензима може бити измењена у многим стањима и

болестима, као што су старење, епилепсија, Алцхајмерова болест и депресија (411-413). Неколико истраживачких група је показало промену активности Na^+/K^+ -АТРаза у различитим можданим структурама код дијабетичких животиња, што указује на могућност учешћа овог ензима у патогенези дијабетичке енцефалопатије. Претходно поменута студија *Leong* и *Leung* (408) је показала значајно смањење активности Na^+/K^+ -АТРаза у хипокампусу (-30%), можданом кортексу (-26%), таламусу (-13%), хипоталамусу (-11%) и можданом стаблу (-10%) код дијабетичких животиња, у поређењу са контролном нормогликемичком групом. У истраживању *Franzon* и сарадника (414), у коме је анализиран неуропротективни утицај дијеталне соје код дијабетичких животиња, показано је да ДМ смањује активност Na^+/K^+ -АТРаза у свим испитиваним можданим структурама за око 40% у поређењу са групом која је имала нормалне вредности гликемије. У складу са наведеним подацима из литературе, резултати овог истраживања показују статистички значајно снижење синаптозомалне активности Na^+/K^+ -АТРаза код дијабетичких пацова у односу на контролну нормогликемичку групу (**Графикон 20Б**), што додатно указује на могућност учествовања овог ензима у настанку дијабетичке енцефалопатије. Овај резултат делимично се може објаснити чињеницом да ДМ преко митохондријалне дисфункције и измењеног пуринергичког сигналног система смањује ниво АТР у неуронима, чиме се смањује енергија која је неопходна за нормално функционисање Na^+/K^+ -АТРаза (415). У овом истраживању је показано да примена испитиваног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) и хуманог дугоделујућег инсулина (6 IJ/дан) током три недеље значајно повећава синоптозомалну активност Na^+/K^+ -АТРаза код дијабетичких пацова, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом (**Графикон 20Б**), што указује на њихову неуропротективну активност. Наиме, овај резултат индиректно говори у прилог да испитивани хетерополиволфрамаат, поред претходно показаног антихипергликемијског, хепато- и нефропротективног дејства, има потенцијал да спречи и настанак дијабетичке енцефалопатије.

Ecto-АТРаза представљају фамилију од осам различитих изоензима и њихова основна улога је хидролиза екстрацелуларног АТР и АДР у АМР, у присуству јона калцијума и магнезијума (236). Сматра се да ова фамилија ензима учествује у канцерогенези и патогенези епилепсије, исхемије и демјалинизације (416, 417). У литератури се могу наћи и студије које су истраживале повезаност између дијабетичке енцефалопатије, можданог нивоа АТР и мождане активности *ecto*-АТРаза (418). Студија *Zarros* и сарадника (254), у којој је анализиран неуропротективни утицај L-цистеина, показује да код дијабетичких пацова није дошло до промене мождане активности *ecto*-АТРаза, у односу на контролне нормогликемичке животиње. У складу са тим, резултати ове студије говоре да ДМ не утиче на синоптозомалну активност *ecto*-АТРаза код животиња, у поређењу са контролном нормогликемичком групом (**Графикон 20В**). Имајући у виду овај резултат, као и налазе и закључак претходне студије, може се закључити да ДМ не узрокује значајну промену активности *ecto*-АТРаза у мозгу експерименталних животиња. С тим у вези, резултат који показује да испитивани хетерополиволфрамаат не мења синоптозомалну активност *ecto*-АТРаза код дијабетичких пацова, у односу на (контролну) дијабетичку групу (**Графикон 20В**), додатно потврђује безбедност примене испитиваног синтетисаног једињења, односно искључује његову неуротоксичност.

Насупрот очекивањима, добијени резултати показују да код контролних дијабетичких животиња није дошло до раста концентрације SOD-1 (**Графикон 17Г**), GPx-1 (**Графикон 18Г**) и MDA (**Графикон 19Г**) у синаптозомима, у поређењу са контролном нормогликемичком групом. Наведени налаз није у складу са литературним подацима (396), али указује да промена активности Na⁺/K⁺-АТРаза у мозгу дијабетичких пацова не мора увек бити повезана са повишеним степеном оксидативног стреса. Такође, у поређењу са (контролном) дијабетичком групом, тронедељна примена одабраног хетерополиволфрамата (20 mg/kg/дан) и егзогеног инсулина (6 IJ/дан) није имала утицај на концентрацију SOD-1 (**Графикон 17Г**), GPx-1 (**Графикон 18Г**) и MDA (**Графикон 19Г**) у синаптозомима дијабетичких пацова. Овакав налаз говори у прилог да примена испитиваног хетерополиволфрамата не мења редукциони метаболизам у мозгу дијабетичких пацова, односно не испољава неуротоксични потенцијал код дијабетичких животиња, што може бити озбиљно нежељено дејство лека.

6. ЗАКЉУЧЦИ

- I На основу резултата првог експерименталног протокола ове докторске дисертације, односно *screening* студије која је имала за циљ да потврди антихипергликемијску активност одабраних синтетисаних хетерополиволфрамата, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ и $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, могу се извести следећи закључци:
1. оба испитивана хетерополиволфрамата су ефикасна у снижавању повишених вредности глукозе у крви код дијабетичких животиња, с тим што се $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ показао као моћнији антихипергликемијски агенс у односу на $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$;
 2. највиша примењена доза испитиваних хетерополиволфрамата од 20 mg/kg је најефикаснија доза у снижавању хипергликемије код дијабетичких пацова;
 3. антихипергликемијски ефекат одабраних хетерополиволфрамата је најмањи након 2 h, а највећи након 6 h од примене, што указује да њихово дејство има постепен наступ и дуже трајање.
- II Резултати токсиколошког истраживања су показали да перорална примена испитиваних синтетисаних хетерополиволфрамата у појединачној дневној дози од 20 mg/kg током две недеље изазива благи до умерени степен хепато- и нефротоксичности код здравих пацова, односно:
1. благо снижава серумске концентрације укупних протеина и албумина, али не утиче на серумске активности AST, ALT и ALP, што указује на смањену синтетску функцију јетре;
 2. благо повећава серумске концентрације урее и креатинина, док нема утицаја на серумску концентрацију мокраћне киселине,
 3. изазива дискретна поља фокалне перилобуларне некрозе у јетри, која су удружена са екстравазацијом еритроцита;
 4. оштећује митохондрије епителних ћелија каналића нефрона уз нормалну архитектонику ткива бубрега на конвенционалној светлосној микроскопији, што указује да испитивани хетерополиволфрамати доводе до сублеталног оштећења тубулоцита (не доводе до акутне тубулске некрозе) и тиме погоршавају бубрежну функцију.
 5. Резултати токсиколошког истраживања показују да $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, у односу на $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, поседује израженији хепатотоксични и нефротоксични потенцијал.
- III Резултати последњег експерименталног протокола ове докторске дисертације, који је имао за циљ да детаљније истражи фармаколошки профил синтетисаних хетерополиволфрамата као потенцијалних лекова-кандидата у терапији DM, показали су да тронедељна перорална примена $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/дан), у односу на (контролну) дијабетичку групу:
1. побољшава гликорегулацију, односно снижава хипергликемију, као и ниво HbA_{1c} дијабетичких животиња;

2. стимулише секрецију инсулина из β -ћелија Лангерхансових острваца панкреаса код дијабетичких пацова, што може бити један од механизма добијеног антихипергликемијског дејства испитиваних једињења;
3. не утиче на инсулинску осетљивост код дијабетичких животиња, која је одређена на основу НОМА-IR индекса;
4. не утиче на концентрацију електролита у крви дијабетичких животиња (натријума, калијума, хлорида, неорганских фосфата, укупног и јонизованог калцијума и магнезијума);
5. снижава укупни холестерол и HDL-холестерол, док нема утицаја на LDL-холестерол, укупне триглицериде, Аро-А1и Аро-В у серуму дијабетичких животиња;
6. не утиче на концентрацију С-реактивног протеина и феритина у серуму дијабетичких пацова;
7. снижава серумске активности ALT и ALP, али не утиче на релативну масу јетре, серумску активност AST, серумске концентрације укупних протеина и албумина, као и на концентрације SOD-1, GPx-1 и MDA у хомогенату јетре дијабетичких животиња;
8. снижава серумску концентрацију урее и концентрацију SOD-1 и MDA у хомогенату бубрега, док нема утицаја на GPx у хомогенату бубрега, као и на релативну масу бубрега и серумске концентрације мокраћне киселине, KIM-1 и NGAL дијабетичких животиња;
9. снижава концентрацију SOD-1 у хомогенату срца, али без ефекта на GPx-1 и MDA у хомогенату срца, као и на релативну масу срца дијабетичких животиња;
10. повећава синптозомалну активност Na^+/K^+ -ATPaze, док нема утицаја на синоптозомалне активности AChE и *ecto*-ATPaze, као и на синаптозомалне концентрације SOD-1, GPx-1 и MDA дијабетичких пацова;
11. спречава опсежна патоморфолошка оштећења панкреаса, јетре и бубрега дијабетичких пацова.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Chen L, Chen XW, Huang X, Song BL, Wang Y, Wang Y. Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease. *Sci China Life Sci.* 2019;62(11):1420-58.
2. Rizza RA. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes.* 2010;59(11):2697-707.
3. Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr.* 1992;55(1 Suppl):299s-308s.
4. Boehlke C, Zierau O, Hannig C. Salivary amylase - The enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Arch Oral Biol.* 2015;60(8):1162-76.
5. Wright EM, Martín MG, Turk E. Intestinal absorption in health and disease--sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003;17(6):943-56.
6. Rorsman P, Braun M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:155-79.
7. Marty N, Dallaporta M, Thorens B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 2007;22:241-51.
8. Crane RK. Intestinal absorption of sugars. *Physiol Rev.* 1960;40:789-825.
9. Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:35-54.
10. Solberg DH, Diamond JM. Comparison of different dietary sugars as inducers of intestinal sugar transporters. *Am J Physiol.* 1987;252(4 Pt 1):G574-84.
11. Shirazi-Beechey SP, Hirayama BA, Wang Y, Scott D, Smith MW, Wright EM. Ontogenic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet. *J Physiol.* 1991;437:699-708.
12. Dyer J, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. Nutrient regulation of human intestinal sugar transporter (SGLT1) expression. *Gut.* 1997;41(1):56-9.
13. Moran AW, Al-Rammahi MA, Arora DK, Batchelor DJ, Coulter EA, Ionescu C, et al. Expression of Na⁺/glucose co-transporter 1 (SGLT1) in the intestine of piglets weaned to different concentrations of dietary carbohydrate. *Br J Nutr.* 2010;104(5):647-55.
14. Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, Bado A. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes.* 2005;54(2):348-54.
15. Miyamoto K, Hase K, Taketani Y, Minami H, Oka T, Nakabou Y, et al. Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181(3):1110-7.
16. Fujita Y, Kojima H, Hidaka H, Fujimiya M, Kashiwagi A, Kikkawa R. Increased intestinal glucose absorption and postprandial hyperglycaemia at the early step of glucose intolerance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diabetologia.* 1998;41(12):1459-66.
17. Nguyen NQ, Debreceni TL, Bambrick JE, Chia B, Wishart J, Deane AM, et al. Accelerated intestinal glucose absorption in morbidly obese humans: relationship to glucose transporters, incretin hormones, and glycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(3):968-76.
18. Dyer J, Wood IS, Palejwala A, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282(2):G241-8.

19. Moore MC, Coate KC, Winnick JJ, An Z, Cherrington AD. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Adv Nutr.* 2012;3(3):286-94.
20. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(10):572-87.
21. Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(2):G194-8.
22. Charron MJ, Brosius FC, 3rd, Alper SL, Lodish HF. A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2535-9.
23. Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol.* 2007;45(1):51-62.
24. Lin HV, Accili D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab.* 2011;14(1):9-19.
25. Petersen KF, Laurent D, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J Clin Invest.* 1998;101(6):1203-9.
26. Cherrington AD, Edgerton D, Sindelar DK. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia.* 1998;41(9):987-96.
27. Rothman DL, Magnusson I, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science.* 1991;254(5031):573-6.
28. Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1323-7.
29. Levine R, Fritz IB. The relation of insulin to liver metabolism. *Diabetes.* 1956;5(3):209-19; discussion, 19-22.
30. Boden G. Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. *J Investig Med.* 2004;52(6):375-8.
31. Chen X, Iqbal N, Boden G. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest.* 1999;103(3):365-72.
32. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2000;49(12):2063-9.
33. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1167-74.
34. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature.* 2003;423(6939):550-5.
35. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest.* 2001;108(9):1359-67.
36. Exton JH, Park CR. Control of gluconeogenesis in liver. II. Effects of glucagon, catecholamines, and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver. *J Biol Chem.* 1968;243(16):4189-96.
37. Blair JB, Cimbala MA, Foster JL, Morgan RA. Hepatic pyruvate kinase. Regulation by glucagon, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate, and insulin in the perfused rat liver. *J Biol Chem.* 1976;251(12):3756-62.

38. Cullen KS, Al-Oanzi ZH, O'Harte FP, Agius L, Arden C. Glucagon induces translocation of glucokinase from the cytoplasm to the nucleus of hepatocytes by transfer between 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-2 and the glucokinase regulatory protein. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(6):1123-34.
39. Shulman GI, Landau BR. Pathways of glycogen repletion. *Physiol Rev*. 1992;72(4):1019-35.
40. Gomis RR, Ferrer JC, Guinovart JJ. Shared control of hepatic glycogen synthesis by glycogen synthase and glucokinase. *Biochem J*. 2000;351 Pt 3(Pt 3):811-6.
41. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J*. 2008;414(1):1-18.
42. Carabaza A, Ciudad CJ, Baqué S, Guinovart JJ. Glucose has to be phosphorylated to activate glycogen synthase, but not to inactivate glycogen phosphorylase in hepatocytes. *FEBS Lett*. 1992;296(2):211-4.
43. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):121-38.
44. Han L, Qu Q, Aydin D, Panova O, Robertson MJ, Xu Y, et al. Structure and mechanism of the SGLT family of glucose transporters. *Nature*. 2022;601(7892):274-9.
45. Grill V. A comparison of brain glucose metabolism in diabetes as measured by positron emission tomography or by arteriovenous techniques. *Ann Med*. 1990;22(3):171-6.
46. Mari A, Wahren J, DeFronzo RA, Ferrannini E. Glucose absorption and production following oral glucose: comparison of compartmental and arteriovenous-difference methods. *Metabolism*. 1994;43(11):1419-25.
47. Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J. Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am J Physiol*. 1999;276(1):E78-84.
48. DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1988;37(6):667-87.
49. Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H, et al. Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*. 1999;48(2):292-8.
50. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018;217(7):2273-89.
51. Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*. 1967;157(3789):697-700.
52. Slieker LJ, Brooke GS, DiMarchi RD, Flora DB, Green LK, Hoffmann JA, et al. Modifications in the B10 and B26-30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor. *Diabetologia*. 1997;40 Suppl 2:S54-61.
53. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature*. 1980;284(5751):26-32.
54. Lemaire K, Ravier MA, Schraenen A, Creemers JW, Van de Plas R, Granvik M, et al. Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(35):14872-7.
55. Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46(8):1029-45.
56. McDonald A, Fogarty S, Leclerc I, Hill EV, Hardie DG, Rutter GA. Control of insulin granule dynamics by AMPK dependent KLC1 phosphorylation. *Islets*. 2009;1(3):198-209.

57. Li G, Rungger-Brändle E, Just I, Jonas JC, Aktories K, Wollheim CB. Effect of disruption of actin filaments by *Clostridium botulinum* C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Mol Biol Cell*. 1994;5(11):1199-213.
58. Gandasi NR, Yin P, Riz M, Chibalina MV, Cortese G, Lund PE, et al. Ca²⁺ channel clustering with insulin-containing granules is disturbed in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2017;127(6):2353-64.
59. Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 7):893-903.
60. McCulloch LJ, van de Bunt M, Braun M, Frayn KN, Clark A, Gloyn AL. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):648-53.
61. Gloyn AL, Noordam K, Willemsen MA, Ellard S, Lam WW, Campbell IW, et al. Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes*. 2003;52(9):2433-40.
62. Patterson JN, Cousteils K, Lou JW, Manning Fox JE, MacDonald PE, Joseph JW. Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*. 2014;289(19):13335-46.
63. Tarasov AI, Semplici F, Li D, Rizzuto R, Ravier MA, Gilon P, et al. Frequency-dependent mitochondrial Ca(2+) accumulation regulates ATP synthesis in pancreatic β cells. *Pflugers Arch*. 2013;465(4):543-54.
64. Rorsman P, Braun M, Zhang Q. Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. *Cell calcium*. 2012;51(3-4):300-8.
65. Drucker DJ, Habener JF, Holst JJ. Discovery, characterization, and clinical development of the glucagon-like peptides. *J Clin Invest*. 2017;127(12):4217-27.
66. Rajan S, Torres J, Thompson MS, Philipson LH. SUMO downregulates GLP-1-stimulated cAMP generation and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(6):E714-23.
67. Fridlyand LE, Philipson LH. Coupling of metabolic, second messenger pathways and insulin granule dynamics in pancreatic beta-cells: a computational analysis. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011;107(2):293-303.
68. Persaud SJ, Jones PM, Howell SL. Effects of Bordetella pertussis toxin on catecholamine inhibition of insulin release from intact and electrically permeabilized rat islets. *Biochem J*. 1989;258(3):669-75.
69. Song SH, McIntyre SS, Shah H, Veldhuis JD, Hayes PC, Butler PC. Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(12):4491-9.
70. Pørksen N, Munn S, Steers J, Vore S, Veldhuis J, Butler P. Pulsatile insulin secretion accounts for 70% of total insulin secretion during fasting. *Am J Physiol*. 1995;269(3 Pt 1):E478-88.
71. Stevenson RW, Cherrington AD, Steiner KE. The relationship between plasma concentration and disappearance rate of immunoreactive insulin in the conscious dog. *Horm Metab Res*. 1985;17(11):551-3.
72. Horwitz DL, Starr JI, Mako ME, Blackard WG, Rubenstein AH. Proinsulin, insulin, and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J Clin Invest*. 1975;55(6):1278-83.
73. Meier JJ, Veldhuis JD, Butler PC. Pulsatile insulin secretion dictates systemic insulin delivery by regulating hepatic insulin extraction in humans. *Diabetes*. 2005;54(6):1649-56.

74. Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res.* 1970;31(1):125-50.
75. Carpentier JL, Fehlmann M, Van Obberghen E, Gorden P, Orci L. Redistribution of 125I-insulin on the surface of rat hepatocytes as a function of dissociation time. *Diabetes.* 1985;34(10):1002-7.
76. Najjar SM. Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(6):240-5.
77. Duckworth WC. Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr Rev.* 1988;9(3):319-45.
78. Barrett EJ, Eggleston EM, Inyard AC, Wang H, Li G, Chai W, et al. The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. *Diabetologia.* 2009;52(5):752-64.
79. Jansson PA, Fowelin JP, von Schenck HP, Smith UP, Lönnroth PN. Measurement by microdialysis of the insulin concentration in subcutaneous interstitial fluid. Importance of the endothelial barrier for insulin. *Diabetes.* 1993;42(10):1469-73.
80. Lee WL, Klip A. Endothelial Transcytosis of Insulin: Does It Contribute to Insulin Resistance? *Physiology (Bethesda).* 2016;31(5):336-45.
81. Konishi M, Sakaguchi M, Lockhart SM, Cai W, Li ME, Homan EP, et al. Endothelial insulin receptors differentially control insulin signaling kinetics in peripheral tissues and brain of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(40):E8478-e87.
82. Meezan E, Pillion DJ, Elgavish A. Binding and degradation of 125I-insulin by isolated rat renal brush border membranes: evidence for low affinity, high capacity insulin recognition sites. *J Membr Biol.* 1988;105(2):113-29.
83. Kolman P, Pica A, Carvou N, Boyde A, Cockcroft S, Loesch A, et al. Insulin uptake across the luminal membrane of the rat proximal tubule in vivo and in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(5):F1227-37.
84. Rabkin R, Ryan MP, Duckworth WC. The renal metabolism of insulin. *Diabetologia.* 1984;27(3):351-7.
85. Rubenstein AH, Spitz I. Role of the kidney in insulin metabolism and excretion. *Diabetes.* 1968;17(3):161-9.
86. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(1):31-44.
87. De Meyts P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays.* 2004;26(12):1351-62.
88. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. *Gac Med Mex.* 2017;153(2):214-28.
89. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, et al. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev.* 2017;38(5):379-431.
90. Smith BJ, Huang K, Kong G, Chan SJ, Nakagawa S, Menting JG, et al. Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(15):6771-6.
91. Maruyama IN. Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells.* 2014;3(2):304-30.

92. Jensen M, De Meyts P. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm.* 2009;80:51-75.
93. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science.* 2003;302(5651):1710-1.
94. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799-806.
95. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
96. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017;169(3):381-405.
97. Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, Mastick CC, Waters SB, Yamauchi K, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20801-7.
98. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):85-96.
99. Könnner AC, Brüning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* 2012;16(2):144-52.
100. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 2012;55(10):2565-82.
101. Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2019;127(S 01):S1-s7.
102. Saedi 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, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843.
103. Rakočević I, Miljuš D, Božić Z. Incidencija i mortalitet od dijabetesa u R. Srbiji. *Registar za dijabetes u R Srbiji.* 2016;11.
104. Herder C, Roden M. A novel diabetes typology: towards precision diabetology from pathogenesis to treatment. *Diabetologia.* 2022;65(11):1770-81.
105. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity.* 2010;32(4):457-67.
106. Lorenzen T, Pociot F, Hougaard P, Nerup J. Long-term risk of IDDM in first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia.* 1994;37(3):321-7.
107. Triolo TM, Armstrong TK, McFann K, Yu L, Rewers MJ, Klingensmith GJ, et al. Additional autoimmune disease found in 33% of patients at type 1 diabetes onset. *Diabetes Care.* 2011;34(5):1211-3.
108. Baker PR, Baschal EE, Fain PR, Nanduri P, Triolo TM, Siebert JC, et al. Dominant suppression of Addison's disease associated with HLA-B15. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):2154-62.
109. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Cmaj.* 2006;175(2):165-70.
110. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1986;314(21):1360-8.
111. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(10):702-9.
112. Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC. Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 2001;2(6):501-7.

113. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14074-9.
114. Burren OS, Adlem EC, Achuthan P, Christensen M, Coulson RM, Todd JA. T1DBase: update 2011, organization and presentation of large-scale data sets for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D997-1001.
115. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S, Dobersen MJ, Taub F, Fedun B, et al. Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia*. 1984;27 Suppl:87-9.
116. Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999;42(12):1395-403.
117. Lönnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, et al. Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes*. 2000;49(8):1314-8.
118. Martin JM, Trink B, Daneman D, Dosch HM, Robinson B. Milk proteins in the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Ann Med*. 1991;23(4):447-52.
119. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002;347(12):911-20.
120. Feillet H, Bach JF. On the mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*. 2004;11(3-4):191-4.
121. Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92(3):404-11.
122. Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Yu L, Hoffman M, Chase HP, et al. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)*. *Jama*. 1996;276(8):609-14.
123. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *Jama*. 2003;290(13):1721-8.
124. Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay TW, Lee-Chan E, et al. International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes*. 2001;50(11):2451-8.
125. Bonifacio E, Scirpoli M, Kredel K, Fuchtenbusch M, Ziegler AG. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol*. 1999;163(1):525-32.
126. Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, et al. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care*. 1988;11(9):736-9.
127. Clark CM, Jr. How should we respond to the worldwide diabetes epidemic? *Diabetes Care*. 1998;21(4):475-6.
128. Gazda LS, Charlton B, Lafferty KJ. Diabetes results from a late change in the autoimmune response of NOD mice. *J Autoimmun*. 1997;10(3):261-70.

129. Rosenbauer J, Herzig P, von Kries R, Neu A, Giani G. Temporal, seasonal, and geographical incidence patterns of type 1 diabetes mellitus in children under 5 years of age in Germany. *Diabetologia*. 1999;42(9):1055-9.
130. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA, Hilton DA. A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia*. 1997;40(1):53-61.
131. Chase HP, Cuthbertson DD, Dolan LM, Kaufman F, Krischer JP, Schatz DA, et al. First-phase insulin release during the intravenous glucose tolerance test as a risk factor for type 1 diabetes. *J Pediatr*. 2001;138(2):244-9.
132. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Botha JL, Burden AC, Waugh NR, et al. The British Diabetic Association Cohort Study, II: cause-specific mortality in patients with insulin-treated diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999;16(6):466-71.
133. Herskowitz RD, Wolfsdorf JL, Ricker AT, Vardi P, Dib S, Soeldner JS, et al. Transient hyperglycemia in childhood: identification of a subgroup with imminent diabetes mellitus. *Diabetes Res*. 1988;9(4):161-7.
134. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1692-8.
135. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*. 2009;361(22):2143-52.
136. Wherrett DK, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R, et al. Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9788):319-27.
137. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S5-s10.
138. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(5):301-7.
139. Ikle JM, Gloyn AL. 100 YEARS OF INSULIN: A brief history of diabetes genetics: insights for pancreatic beta-cell development and function. *J Endocrinol*. 2021;250(3):R23-r35.
140. Petruzzelli LM, Ganguly S, Smith CJ, Cobb MH, Rubin CS, Rosen OM. Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(22):6792-6.
141. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237(3):E214-23.
142. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
143. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15019.
144. DeFronzo RA, Ferrannini E. Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetes/metabolism reviews*. 1987;3(2):415-59.

145. Firth R, Bell P, Rizza R. Insulin action in non-insulin-dependent diabetes mellitus: the relationship between hepatic and extrahepatic insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 1987;36(11):1091-5.
146. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1989;84(1):205-13.
147. Campbell PJ, Mandarino LJ, Gerich JE. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1988;37(1):15-21.
148. Bogardus C, Lillioja S, Howard BV, Reaven G, Mott D. Relationships between insulin secretion, insulin action, and fasting plasma glucose concentration in nondiabetic and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1984;74(4):1238-46.
149. Tayek JA, Katz J. Glucose production, recycling, and gluconeogenesis in normals and diabetics: a mass isotopomer [U-13C]glucose study. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 1):E709-17.
150. Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J. Regulation of splanchnic and renal substrate supply by insulin in humans. *Metabolism*. 2000;49(5):676-83.
151. Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V, Dostou J, Mitrakou A, Gerich J. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1998;102(3):619-24.
152. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1985;76(1):149-55.
153. Solini A, Rossi C, Mazzanti CM, Proietti A, Koepsell H, Ferrannini E. Sodium-glucose co-transporter (SGLT)2 and SGLT1 renal expression in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(9):1289-94.
154. Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, et al. Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes*. 1990;39(11):1381-90.
155. Barrett EJ, Eringa EC. The vascular contribution to insulin resistance: promise, proof, and pitfalls. *Diabetes*. 2012;61(12):3063-5.
156. Clark MG, Barrett EJ, Wallis MG, Vincent MA, Rattigan S. The microvasculature in insulin resistance and type 2 diabetes. *Semin Vasc Med*. 2002;2(1):21-31.
157. Jansson PA, Larsson A, Smith U, Lönnroth P. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. *J Clin Invest*. 1994;93(1):240-6.
158. Shah A, Mehta N, Reilly MP. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008;32(6):638-44.
159. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*. 1963;1(7285):785-9.
160. Wititsuwannakul D, Kim KH. Mechanism of palmitoyl coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase. *J Biol Chem*. 1977;252(21):7812-7.
161. Bonadonna RC, Groop LC, Zych K, Shank M, DeFronzo RA. Dose-dependent effect of insulin on plasma free fatty acid turnover and oxidation in humans. *Am J Physiol*. 1990;259(5 Pt 1):E736-50.
162. Baron AD. Hemodynamic actions of insulin. *Am J Physiol*. 1994;267(2 Pt 1):E187-202.

163. Esser N, Utschneider KM, Kahn SE. Early beta cell dysfunction vs insulin hypersecretion as the primary event in the pathogenesis of dysglycaemia. *Diabetologia*. 2020;63(10):2007-21.
164. Pontiroli AE, Alberetto M, Capra F, Pozza G. The glucose clamp technique for the study of patients with hypoglycemia: insulin resistance as a feature of insulinoma. *J Endocrinol Invest*. 1990;13(3):241-5.
165. Del Prato S, Leonetti F, Simonson DC, Sheehan P, Matsuda M, DeFronzo RA. Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. *Diabetologia*. 1994;37(10):1025-35.
166. Marini MA, Frontoni S, Succurro E, Arturi F, Fiorentino TV, Sciacqua A, et al. Decreased insulin clearance in individuals with elevated 1-h post-load plasma glucose levels. *PLoS One*. 2013;8(10):e77440.
167. Association AD. 5. Lifestyle Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Suppl 1):S46-s60.
168. Association AD. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S98-s110.
169. Thulé PM, Umpierrez G. Sulfonylureas: a new look at old therapy. *Curr Diab Rep*. 2014;14(4):473.
170. Khunti K, Chatterjee S, Gerstein HC, Zoungas S, Davies MJ. Do sulphonylureas still have a place in clinical practice? *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(10):821-32.
171. Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(10):566-92.
172. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet (London, England)*. 1998;352(9131):837-53.
173. Guardado-Mendoza R, Prioletta A, Jiménez-Ceja LM, Sosale A, Folli F. The role of nateglinide and repaglinide, derivatives of meglitinide, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Sci*. 2013;9(5):936-43.
174. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013;17(6):819-37.
175. Gentilella R, Pechtner V, Corcos A, Consoli A. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes treatment: are they all the same? *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2019;35(1):e3070.
176. Kristensen SL, Rørth R, Jhund PS, Docherty KF, Sattar N, Preiss D, et al. Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(10):776-85.
177. Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, Rossing P, Mingrone G, Mathieu C, et al. 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2020;43(2):487-93.
178. Tuttle KR, Lakshmanan MC, Rayner B, Busch RS, Zimmermann AG, Woodward DB, et al. Dulaglutide versus insulin glargine in patients with type 2 diabetes and moderate-to-severe chronic kidney disease (AWARD-7): a multicentre, open-label, randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(8):605-17.

179. Gluud LL, Knop FK, Vilsbøll T. Effects of lixisenatide on elevated liver transaminases: systematic review with individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials on patients with type 2 diabetes. *BMJ open*. 2014;4(12):e005325.
180. Sesti G, Avogaro A, Belcastro S, Bonora BM, Croci M, Daniele G, et al. Ten years of experience with DPP-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2019;56(6):605-17.
181. Men P, Li XT, Tang HL, Zhai SD. Efficacy and safety of saxagliptin in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197321.
182. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-85.
183. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2014;20(6):953-66.
184. Pollak M. The effects of metformin on gut microbiota and the immune system as research frontiers. *Diabetologia*. 2017;60(9):1662-7.
185. Sanchez-Rangel E, Inzucchi SE. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(9):1586-93.
186. Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudhe VV, Ford LG. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *Diabetologia*. 2017;60(9):1639-47.
187. de Jager J, Kooy A, Lehert P, Wulffelé MG, van der Kolk J, Bets D, et al. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *Bmj*. 2010;340:c2181.
188. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351(11):1106-18.
189. Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:341-67.
190. Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care*. 2000;23(11):1605-11.
191. Ferrannini E, DeFronzo RA. Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Eur Heart J*. 2015;36(34):2288-96.
192. Mudaliar S, Chang AR, Henry RR. Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications. *Endocr Pract*. 2003;9(5):406-16.
193. Kahn SE, Zinman B, Lachin JM, Haffner SM, Herman WH, Holman RR, et al. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an Analysis from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). *Diabetes Care*. 2008;31(5):845-51.
194. Davidson MB. Pioglitazone (Actos) and bladder cancer: Legal system triumphs over the evidence. *J Diabetes Complications*. 2016;30(6):981-5.
195. Thomas MC, Cherney DZI. The actions of SGLT2 inhibitors on metabolism, renal function and blood pressure. *Diabetologia*. 2018;61(10):2098-107.
196. Monami M, Liistro F, Scatena A, Nreu B, Mannucci E. Short and medium-term efficacy of sodium glucose co-transporter-2 (SGLT-2) inhibitors: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(5):1213-22.

197. Salah HM, Al'Aref SJ, Khan MS, Al-Hawwas M, Vallurupalli S, Mehta JL, et al. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on cardiovascular and kidney outcomes-Systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Am Heart J*. 2021;232:10-22.
198. Voors AA, Angermann CE, Teerlink JR, Collins SP, Kosiborod M, Biegus J, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin in patients hospitalized for acute heart failure: a multinational randomized trial. *Nat Med*. 2022;28(3):568-74.
199. Lin DS, Lee JK, Chen WJ. Clinical Adverse Events Associated with Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors: A Meta-Analysis Involving 10 Randomized Clinical Trials and 71 553 Individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(7):2133-45.
200. Coniff R, Krol A. Acarbose: a review of US clinical experience. *Clin Ther*. 1997;19(1):16-26; discussion 2-3.
201. Tran L, Zielinski A, Roach AH, Jende JA, Householder AM, Cole EE, et al. Pharmacologic treatment of type 2 diabetes: oral medications. *Ann Pharmacother*. 2015;49(5):540-56.
202. Čolović MB, Lacković M, Lalatović J, Mougharbel AS, Kortz U, Krstić DZ. Polyoxometalates in Biomedicine: Update and Overview. *Curr Med Chem*. 2020;27(3):362-79.
203. Hasenknopf B. Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. *Front Biosci*. 2005;10:275-87.
204. Bâlici Ş, Wankeu-Nya M, Rusu D, Nicula GZ, Rusu M, Florea A, et al. Ultrastructural Analysis of In Vivo Hypoglycemic Effect of Two Polyoxometalates in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Microsc Microanal*. 2015;21(5):1236-48.
205. Aureliano M, Gumerova NI, Sciortino G, Garribba E, McLauchlan CC, Rompel A, et al. Polyoxidovanadates' interactions with proteins: An overview. *Coord Chem Rev*. 2022;454:214344.
206. Nomiya K, Torii H, Hasegawa T, Nemoto Y, Nomura K, Hashino K, et al. Insulin mimetic effect of a tungstate cluster. Effect of oral administration of homo-polyoxotungstates and vanadium-substituted polyoxotungstates on blood glucose level of STZ mice. *J Inorg Biochem*. 2001;86(4):657-67.
207. Bijelic A, Aureliano M, Rompel A. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2019;58(10):2980-99.
208. Inoue M, Segawa K, Matsunaga S, Matsumoto N, Oda M, Yamase T. Antibacterial activity of highly negative charged polyoxotungstates, $K_{27}[KAs_4W_{40}O_{140}]$ and $K_{18}[KSb_9W_{21}O_{86}]$, and Keggin-structural polyoxotungstates against *Helicobacter pylori*. *J Inorg Biochem*. 2005;99(5):1023-31.
209. Prudent R, Moucadel V, Laudet B, Barette C, Lafanechère L, Hasenknopf B, et al. Identification of polyoxometalates as nanomolar noncompetitive inhibitors of protein kinase CK2. *Chem Biol*. 2008;15(7):683-92.
210. Seko A, Yamase T, Yamashita K. Polyoxometalates as effective inhibitors for sialyl- and sulfotransferases. *J Inorg Biochem*. 2009;103(7):1061-6.
211. Müller CE, Iqbal J, Baqi Y, Zimmermann H, Röllich A, Stephan H. Polyoxometalates--a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(23):5943-7.
212. Yuan T, Weljie AM, Vogel HJ. Tryptophan fluorescence quenching by methionine and selenomethionine residues of calmodulin: orientation of peptide and protein binding. *Biochemistry*. 1998;37(9):3187-95.

213. Haapala DK, Jasmin C, Sinoussi F, Chermann JC, Raynaud M. Inhibition of tumour virus RNA-dependent DNA polymerase by the heteropolyan ion, silicotungstate. *Biomedicine*. 1973;19(1):7-11.
214. Rhule JT, Hill CL, Judd DA, Schinazi RF. Polyoxometalates in Medicine. *Chem Rev*. 1998;98(1):327-58.
215. Aureliano M. The future is bright for polyoxometalates. *BioChem*. 2022;2(1):8-26.
216. Inouye Y, Tokutake Y, Kuniyama J, Yoshida T, Yamase T, Nakata A, et al. Suppressible effect of polyoxometalates on the cytopathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in vitro and their inhibitory activity against HIV-1 reverse transcriptase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992;40(3):805-7.
217. Sarafianos SG, Kortz U, Pope MT, Modak MJ. Mechanism of polyoxometalate-mediated inactivation of DNA polymerases: an analysis with HIV-1 reverse transcriptase indicates specificity for the DNA-binding cleft. *Biochem J*. 1996;319 (Pt 2)(Pt 2):619-26.
218. Witvrouw M, Weigold H, Pannecouque C, Schols D, De Clercq E, Holan G. Potent anti-HIV (type 1 and type 2) activity of polyoxometalates: structure-activity relationship and mechanism of action. *J Med Chem*. 2000;43(5):778-83.
219. Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N, Yamamoto N. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(5):211-9.
220. Qi Y, Xiang Y, Wang J, Qi Y, Li J, Niu J, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by polyoxometalates. *Antiviral Res*. 2013;100(2):392-8.
221. Zhang H, Qi Y, Ding Y, Wang J, Li Q, Zhang J, et al. Synthesis, characterization and biological activity of a niobium-substituted-heteropolytungstate on hepatitis B virus. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(4):1664-9.
222. Shahabadi N, Mahdavi M, Zendehecheshm S. Can polyoxometalates (POMs) prevent of coronavirus 2019-nCoV cell entry? Interaction of POMs with TMPRSS2 and spike receptor domain complexed with ACE2 (ACE2-RBD): Virtual screening approaches. *Inform Med Unlocked*. 2022;29:100902.
223. Yamase T. Anti-tumor,-viral, and-bacterial activities of polyoxometalates for realizing an inorganic drug. *J Mater Chem*. 2005;15(45):4773-82.
224. Fishovitz J, Hermoso JA, Chang M, Mobashery S. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB life*. 2014;66(8):572-7.
225. Inoue M, Suzuki T, Fujita Y, Oda M, Matsumoto N, Iijima J, et al. Synergistic effect of polyoxometalates in combination with oxacillin against methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a high initial inoculum of 1×10^8 cfu/ml for in vivo test. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(5):220-6.
226. Inoue M, Segawa K, Matsunaga S, Matsumoto N, Oda M, Yamase T. Antibacterial activity of highly negative charged polyoxotungstates, K27 [KAs₄W₄₀O₁₄₀] and K18 [KSb₉W₂₁O₈₆], and Keggin-structural polyoxotungstates against *Helicobacter pylori*. *J Inorg Biochem*. 2005;99(5):1023-31.
227. Ayass WW, Fodor T, Lin Z, Smith RM, Xing X, Abdallah K, et al. Synthesis, Structure, and Antibacterial Activity of a Thallium(III)-Containing Polyoxometalate, [Tl₂{B-β-SiW₈O₃₀(OH)}₂]₁₂. *Inorg Chem*. 2016;55(20):10118-21.
228. Chen S, Wu G, Long D, Liu Y. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Ca₃V₁₀O₂₈ complex membrane. *Carbohydr Polym*. 2006;64(1):92-7.

229. Fukuda N, Yamase T. *In vitro* antibacterial activity of vanadate and vanadyl compounds against *Streptococcus pneumoniae*. Biol Pharm Bull. 1997;20(8):927-30.
230. Aureliano M, Fraqueza G, Ohlin CA. Ion pumps as biological targets for decavanadate. Dalton Trans. 2013;42(33):11770-7.
231. Fujita H, Fujita T, Sakurai T, Yamase T, Seto Y. Antitumor activity of new antitumor substance, polyoxomolybdate, against several human cancers in athymic nude mice. Tohoku J Exp Med. 1992;168(2):421-6.
232. Ogata A, Mitsui S, Yanagie H, Kasano H, Hisa T, Yamase T, et al. A novel anti-tumor agent, polyoxomolybdate induces apoptotic cell death in AsPC-1 human pancreatic cancer cells. Biomed Pharmacother. 2005;59(5):240-4.
233. Ogata A, Yanagie H, Ishikawa E, Morishita Y, Mitsui S, Yamashita A, et al. Antitumor effect of polyoxomolybdates: induction of apoptotic cell death and autophagy in *in vitro* and *in vivo* models. Br J Cancer. 2008;98(2):399-409.
234. León IE, Porro V, Astrada S, Egusquiza MG, Cabello CI, Bollati-Fogolin M, et al. Polyoxometalates as antitumor agents: Bioactivity of a new polyoxometalate with copper on a human osteosarcoma model. Chem Biol Interact. 2014;222:87-96.
235. Raza R, Matin A, Sarwar S, Barsukova-Stuckart M, Ibrahim M, Kortz U, et al. Polyoxometalates as potent and selective inhibitors of alkaline phosphatases with profound anticancer and amoebicidal activities. Dalton Trans. 2012;41(47):14329-36.
236. Lee SY, Fiene A, Li W, Hanck T, Brylev KA, Fedorov VE, et al. Polyoxometalates--potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. Biochem Pharmacol. 2015;93(2):171-81.
237. Pereira MJ, Carvalho E, Eriksson JW, Crans DC, Aureliano M. Effects of decavanadate and insulin enhancing vanadium compounds on glucose uptake in isolated rat adipocytes. J Inorg Biochem. 2009;103(12):1687-92.
238. Carpené C, Garcia-Vicente S, Serrano M, Marti L, Belles C, Royo M, et al. Insulin-mimetic compound hexakis (benzylammonium) decavanadate is antilipolytic in human fat cells. World J Diabetes. 2017;8(4):143-53.
239. Enrique-Tarancón G, Castan I, Morin N, Marti L, Abella A, Camps M, et al. Substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase co-operate with vanadate to stimulate tyrosine phosphorylation of insulin-receptor-substrate proteins, phosphoinositide 3-kinase activity and GLUT4 translocation in adipose cells. Biochem J. 2000;350 Pt 1(Pt 1):171-80.
240. Yraola F, García-Vicente S, Marti L, Albericio F, Zorzano A, Royo M. Understanding the mechanism of action of the novel SSAO substrate $(C_7NH_{10})_6(V_{10}O_{28}) \cdot 2H_2O$, a prodrug of peroxovanadate insulin mimetics. Chem Biol Drug Des. 2007;69(6):423-8.
241. Ilyas Z, Shah HS, Al-Oweini R, Kortz U, Iqbal J. Antidiabetic potential of polyoxotungstates: *in vitro* and *in vivo* studies. Metallomics : integrated biometal science. 2014;6(8):1521-6.
242. Haider A, Zarschler K, Joshi SA, Smith RM, Lin Z, Mougharbel AS, et al. Preyssler-Pope-Jeannin Polyanions $[NaP_5W_{30}O_{110}]^{14-}$ and $[AgP_5W_{30}O_{110}]^{14-}$: Microwave-Assisted Synthesis, Structure, and Biological Activity. Z Anorg Allg Chem. 2018;644(14):752-8.
243. Dinčić M, Čolović MB, Sarić Matutinović M, Četković M, Kravić Stevović T, Mougharbel AS, et al. *In vivo* toxicity evaluation of two polyoxotungstates with potential antidiabetic activity using *Wistar* rats as a model system. RSC advances. 2020;10(5):2846-55.

244. Tate M, Deo M, Cao AH, Hood SG, Huynh K, Kiriazis H, et al. Insulin replacement limits progression of diabetic cardiomyopathy in the low-dose streptozotocin-induced diabetic rat. *Diab Vasc Dis Res.* 2017;14(5):423-33.
245. Whittaker V. The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. *Method Neurochem.* 1972;2:1-52.
246. Dinčić M. Reliable measurement of oxidative stress parameters and enzyme activities in the brain: homogenate or synaptosomes? *Arch Physiol Biochem.* 2022;128(3):849.
247. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
248. Seals JR, McDonald JM, Bruns D, Jarett L. A sensitive and precise isotopic assay of ATPase activity. *Anal Biochem.* 1978;90(2):785-95.
249. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977-86.
250. Zafar M, Naqvi SN-u-H. Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study. *Int J Morphol.* 2010;28(1).
251. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003;107(3):499-511.
252. Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med.* 2021;171(2):179-89.
253. Dejgaard A, Gade A, Larsson H, Balle V, Parving A, Parving HH. Evidence for diabetic encephalopathy. *Diabet Med.* 1991;8(2):162-7.
254. Zarros A, Liapi C, Galanopoulou P, Marinou K, Mellios Z, Skandali N, et al. Effects of adult-onset streptozotocin-induced diabetes on the rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na(+),K (+))- and Mg(2+)-ATPase: modulation by L-cysteine. *Metab Brain Dis.* 2009;24(2):337-48.
255. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 2018;41(12):2669-701.
256. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(2):88-98.
257. Classen D. Medication safety: moving from illusion to reality. *Jama.* 2003;289(9):1154-6.
258. Čolović MB, Medić B, Četković M, Kravić Stevović T, Stojanović M, Ayass WW, et al. Toxicity evaluation of two polyoxotungstates with anti-acetylcholinesterase activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;333:68-75.
259. El Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 2004;91(1):43-50.
260. Wolf PL. Biochemical diagnosis of liver disease. *Indian J Clin Biochem.* 1999;14(1):59-90.
261. Wang J, Qu X, Qi Y, Li J, Song X, Li L, et al. Pharmacokinetics of anti-HBV polyoxometalate in rats. *PLoS One.* 2014;9(6):e98292.

262. Thomas ME, Blaine C, Dawnay A, Devonald MA, Ftouh S, Laing C, et al. The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney Int.* 2015;87(1):62-73.
263. Wang M, Hng TM. HbA1c: More than just a number. *Aust J Gen Pract.* 2021;50(9):628-32.
264. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10 Suppl 4:32-42.
265. Baumel-Alterzon S, Katz LS, Brill G, Garcia-Ocaña A, Scott DK. Nrf2: The Master and Captain of Beta Cell Fate. *Trends Endocrinol Metab.* 2021;32(1):7-19.
266. Mahboob A, Senevirathne DKL, Paul P, Nabi F, Khan RH, Chaari A. An investigation into the potential action of polyphenols against human Islet Amyloid Polypeptide aggregation in type 2 diabetes. *Int J Biol Macromol.* 2023;225:318-50.
267. Ahmad E, Ahmad A, Singh S, Arshad M, Khan AH, Khan RH. A mechanistic approach for islet amyloid polypeptide aggregation to develop anti-amyloidogenic agents for type-2 diabetes. *Biochimie.* 2011;93(5):793-805.
268. Leighton B, Cooper GJ. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. *Nature.* 1988;335(6191):632-5.
269. Marzban L, Park K, Verchere CB. Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp Gerontol.* 2003;38(4):347-51.
270. Ritzel RA, Meier JJ, Lin CY, Veldhuis JD, Butler PC. Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets. *Diabetes.* 2007;56(1):65-71.
271. Höppener JW, Lips CJ. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(5-6):726-36.
272. Munishkina LA, Fink AL. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(8):1862-85.
273. Jayasinghe SA, Langen R. Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling. *J Biol Chem.* 2004;279(46):48420-5.
274. Domanov YA, Kinnunen PK. Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers. *J Mol Biol.* 2008;376(1):42-54.
275. Lee IS, Long JR, Prusiner SB, Safar JG. Selective precipitation of prions by polyoxometalate complexes. *J Am Chem Soc.* 2005;127(40):13802-3.
276. Zhang G, Keita B, Brochon JC, de Oliveira P, Nadjo L, Craescu CT, et al. Molecular interaction and energy transfer between human serum albumin and polyoxometalates. *J Phys Chem B.* 2007;111(7):1809-14.
277. Zhang G, Keita B, Craescu CT, Miron S, de Oliveira P, Nadjo L. Molecular interactions between Wells-Dawson type polyoxometalates and human serum albumin. *Biomacromolecules.* 2008;9(3):812-7.
278. Gao N, Sun H, Dong K, Ren J, Duan T, Xu C, et al. Transition-metal-substituted polyoxometalate derivatives as functional anti-amyloid agents for Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2014;5:3422.
279. Zhou Y, Zheng L, Han F, Zhang G, Ma Y, Yao J, et al. Inhibition of amyloid- β protein fibrillization upon interaction with polyoxometalates nanoclusters. *Colloids Surf A.* 2011;375(1-3):97-101.

280. Heidari Z, Harati M, Mahmoudzadeh-Sagheb HR, Moudi B. Beta cell protective effects of sodium tungstate in streptozotocin-induced diabetic rats: glycemic control, blockage of oxidative stress and beta cell histochemistry. *Iran Biomed J.* 2008;12(3):143-52.
281. Pillai SI, Subramanian SP, Kandaswamy M. Evaluation of antioxidant efficacy of vanadium-3-hydroxyflavone complex in streptozotocin-diabetic rats. *Chem Biol Interact.* 2013;204(2):67-74.
282. Pipeleers L, Wissing KM, Hilbrands R. Acid-base and electrolyte disturbances in patients with diabetes mellitus. *Acta Clin Belg.* 2019;74(1):28-33.
283. Palmer BF, Clegg DJ. Electrolyte and Acid-Base Disturbances in Patients with Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 2015;373(6):548-59.
284. Elisaf MS, Tsatsoulis AA, Katopodis KP, Siamopoulos KC. Acid-base and electrolyte disturbances in patients with diabetic ketoacidosis. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996;34(1):23-7.
285. Hillier TA, Abbott RD, Barrett EJ. Hyponatremia: evaluating the correction factor for hyperglycemia. *Am J Med.* 1999;106(4):399-403.
286. Liamis G, Milionis H, Elisaf M. Blood pressure drug therapy and electrolyte disturbances. *Int J Clin Pract.* 2008;62(10):1572-80.
287. Beukhof CM, Hoorn EJ, Lindemans J, Zietse R. Novel risk factors for hospital-acquired hyponatraemia: a matched case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66(3):367-72.
288. Liamis G, Rodenburg EM, Hofman A, Zietse R, Stricker BH, Hoorn EJ. Electrolyte disorders in community subjects: prevalence and risk factors. *Am J Med.* 2013;126(3):256-63.
289. Bankir L, Bardoux P, Ahloulay M. Vasopressin and diabetes mellitus. *Nephron.* 2001;87(1):8-18.
290. Camilleri M, Chedid V, Ford AC, Haruma K, Horowitz M, Jones KL, et al. Gastroparesis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):41.
291. Liamis G, Liberopoulos E, Barkas F, Elisaf M. Spurious electrolyte disorders: a diagnostic challenge for clinicians. *Am J Nephrol.* 2013;38(1):50-7.
292. Bratusch-Marrain PR, DeFronzo RA. Impairment of insulin-mediated glucose metabolism by hyperosmolality in man. *Diabetes.* 1983;32(11):1028-34.
293. Yang L, Frindt G, Palmer LG. Magnesium modulates ROMK channel-mediated potassium secretion. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(12):2109-16.
294. Wilcox CS. Metabolic and adverse effects of diuretics. *Semin Nephrol.* 1999;19(6):557-68.
295. DeFronzo RA. Hyperkalemia and hyporeninemic hypoaldosteronism. *Kidney Int.* 1980;17(1):118-34.
296. Liamis G, Liberopoulos E, Barkas F, Elisaf M. Diabetes mellitus and electrolyte disorders. *World J Clin Cases.* 2014;2(10):488-96.
297. Fisher JN, Kitabchi AE. A randomized study of phosphate therapy in the treatment of diabetic ketoacidosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57(1):177-80.
298. Kebler R, McDonald FD, Cadnapaphornchai P. Dynamic changes in serum phosphorus levels in diabetic ketoacidosis. *Am J Med.* 1985;79(5):571-6.
299. Liamis G, Milionis HJ, Elisaf M. A review of drug-induced hypocalcemia. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(6):635-42.
300. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(2):419-46, table of contents.
301. McNair P, Christensen MS, Madsbad S, Christiansen C, Transbøl I. Hypoparathyroidism in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1981;96(1):81-6.

302. Pham PC, Pham PM, Pham SV, Miller JM, Pham PT. Hypomagnesemia in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(2):366-73.
303. Liamis G, Liberopoulos E, Alexandridis G, Elisaf M. Hypomagnesemia in a department of internal medicine. *Magnes Res*. 2012;25(4):149-58.
304. Dong JY, Xun P, He K, Qin LQ. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Care*. 2011;34(9):2116-22.
305. Barbagallo M, Di Bella G, Brucato V, D'Angelo D, Damiani P, Monteverde A, et al. Serum ionized magnesium in diabetic older persons. *Metabolism*. 2014;63(4):502-9.
306. Yanardag R, Ozsoy-Sacan O, Bolkent S, Orak H, Karabulut-Bulan O. Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. *Hum Exp Toxicol*. 2005;24(3):129-35.
307. Al-Malki AL, El Rabey HA. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. *Biomed Res Int*. 2015;2015:381040.
308. Fogh-Andersen N, McNair P, Møller-Petersen J, Madsbad S. Lowered serum ionized calcium in insulin treated diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1983;165:93-7.
309. Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes/metabolism reviews*. 1987;3(2):463-524.
310. Vergès B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2005;31(5):429-39.
311. Olofsson SO, Stillemark-Billton P, Asp L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(8):338-45.
312. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes*. 1993;42(6):833-42.
313. Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, et al. Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes*. 1998;47(5):779-87.
314. Brunzell JD, Schwartz RS, Eckel RH, Goldberg AP. Insulin and adipose tissue lipoprotein lipase activity in humans. *Int J Obes*. 1981;5(6):685-94.
315. Chait A, Bierman EL, Albers JJ. Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. *J Clin Invest*. 1979;64(5):1309-19.
316. Ruotolo G, Parlavecchia M, Taskinen MR, Galimberti G, Zoppo A, Le NA, et al. Normalization of lipoprotein composition by intraperitoneal insulin in IDDM. Role of increased hepatic lipase activity. *Diabetes Care*. 1994;17(1):6-12.
317. Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is lowered by 24-h insulin and acipimox administration: blunted response to insulin in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 1999;48(8):1631-7.
318. Arai K, Suehiro T, Yamamoto M, Ito H, Hashimoto K. Suppression of plasma cholesteryl ester transfer protein activity in acute hyperinsulinemia and effect of plasma nonesterified fatty acid. *Metabolism*. 1997;46(10):1166-70.
319. Strain WD, Paldanius PM. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):57.
320. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5(3):216-20.

321. Reaven GM, Greenfield MS. Diabetic hypertriglyceridemia: evidence for three clinical syndromes. *Diabetes*. 1981;30(Suppl 2):66-75.
322. Taskinen MR, Beltz WF, Harper I, Fields RM, Schonfeld G, Grundy SM, et al. Effects of NIDDM on very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B metabolism. Studies before and after sulfonylurea therapy. *Diabetes*. 1986;35(11):1268-77.
323. Feingold KR, Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Krauss RM. LDL subclass phenotypes and triglyceride metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Arterioscler Thromb*. 1992;12(12):1496-502.
324. De Man FH, Cabezas MC, Van Barlingen HH, Erkelens DW, de Bruin TW. Triglyceride-rich lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus: post-prandial metabolism and relation to premature atherosclerosis. *Eur J Clin Invest*. 1996;26(2):89-108.
325. Verges B, Brun JM, Vaillant G, Quantin C, Brunet-Lecomte P, Farnier M, et al. Influence of obesity and hypertriglyceridaemia on the low HDL2-cholesterol level and on its relationship with prevalence of atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabete Metab*. 1992;18(4):289-97.
326. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011;17(10):594-603.
327. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014;371(1):32-41.
328. Cominacini L, Garbin U, Pastorino AM, Fratta Pasini A, Campagnola M, De Santis A, et al. Increased susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res*. 1994;26(4):173-84.
329. Arca M, Pigna G, Favoccia C. Mechanisms of diabetic dyslipidemia: relevance for atherogenesis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(6):684-6.
330. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *Jama*. 1996;276(11):875-81.
331. Maiti R, Das UK, Ghosh D. Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(7):1172-6.
332. Haidara MA, Khloussy H, Ammar H, Aal Kassem LA. Impact of alpha-tocopherol and vitamin C on endothelial markers in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Med Sci Monit*. 2004;10(2):Br41-6.
333. Míguez I, Mariño G, Rodríguez B, Taboada C. Effects of dietary L-arginine supplementation on serum lipids and intestinal enzyme activities in diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2004;60(1):31-7.
334. Zhu B, Shen H, Zhou J, Lin F, Hu Y. Effects of simvastatin on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: a role for glomeruli protection. *Nephron Exp Nephrol*. 2005;101(1):e1-8.
335. Yoshino G, Matsushita M, Maeda E, Naka Y, Nagata K, Morita M, et al. Effect of long-term insulin deficiency and insulin treatment on the composition of triglyceride-rich lipoproteins and triglyceride turnover in rats. *Atherosclerosis*. 1992;92(2-3):243-50.
336. Aslan I, Kucuksayan E, Aslan M. Effect of insulin analog initiation therapy on LDL/HDL subfraction profile and HDL associated enzymes in type 2 diabetic patients. *Lipids Health Dis*. 2013;12:54.

337. Cotrozzi G, Casini Raggi V, Relli P, Buzzelli G. [Role of the liver in the regulation of glucose metabolism in diabetes and chronic liver disease]. *Ann Ital Med Int.* 1997;12(2):84-91.
338. Mir SH, Baqui A, Bhagat R, Darzi M, Shah AW. Biochemical and histomorphological study of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rabbits. *Pak J Nut.* 2008;7:359-64.
339. Zafar M, Naqvi SN-u-H, Ahmed M, Kaimkhani ZA. Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Int J Morphol.* 2009;27(3).
340. Ohno T, Horio F, Tanaka S, Terada M, Namikawa T, Kitoh J. Fatty liver and hyperlipidemia in IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) of streptozotocin-treated shrews. *Life Sci.* 2000;66(2):125-31.
341. Lagiou P, Kuper H, Stuver SO, Tzonou A, Trichopoulos D, Adami HO. Role of diabetes mellitus in the etiology of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(13):1096-9.
342. Marin JJ, Bravo P, Perez Barriocanal F, el-Mir MY, Villanueva GR. Hyperglycemia-induced cholestasis in the isolated perfused rat liver. *Hepatology.* 1991;14(1):184-91.
343. Nazzari E, Grillo F, Celiento T, Picciotto A, Ferone D, Murialdo G, et al. Diabetic hepatosclerosis presenting with severe cholestasis. *Diabetes Care.* 2013;36(12):e206.
344. Chen G, Brunt EM. Diabetic hepatosclerosis: a 10-year autopsy series. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2009;29(7):1044-50.
345. Harrison SA, Brunt EM, Goodman ZD, Di Bisceglie AM. Diabetic hepatosclerosis: diabetic microangiopathy of the liver. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(1):27-32.
346. King RJ, Harrison L, Gilbey SG, Santhakumar A, Wyatt J, Jones R, et al. Diabetic hepatosclerosis: another diabetes microvascular complication? *Diabet Med.* 2016;33(2):e5-7.
347. Mohamed J, Nazratun Nafizah AH, Zariyantey AH, Budin SB. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2016;16(2):e132-41.
348. Jovanović Stojanov S, Martinović V, Bogojević D, Poznanović G, Petrović A, Ivanović-Matić S, et al. Modulation of diabetes-related liver injury by the HMGB1/TLR4 inflammatory pathway. *J Physiol Biochem.* 2018;74(2):345-58.
349. Shams ME, Al-Gayyar MM, Barakat EA. Type 2 Diabetes Mellitus-Induced Hyperglycemia in Patients with NAFLD and Normal LFTs: Relationship to Lipid Profile, Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Cytokines. *Sci Pharm.* 2011;79(3):623-34.
350. Adeyemi DO, Ukwenya VO, Obuotor EM, Adewole SO. Anti-hepatotoxic activities of *Hibiscus sabdariffa* L. in animal model of streptozotocin diabetes-induced liver damage. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14:277.
351. Panneerselvam SR, Govindasamy S. Effect of sodium molybdate on the status of lipids, lipid peroxidation and antioxidant systems in alloxan-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 2004;345(1-2):93-8.
352. Puglia CD, Powell SR. Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environ Health Perspect.* 1984;57:307-11.
353. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(1):24-38.
354. Sanz A, Gredilla R, Pamplona R, Portero-Otín M, Vara E, Tresguerres JA, et al. Effect of insulin and growth hormone on rat heart and liver oxidative stress in control and caloric restricted animals. *Biogerontology.* 2005;6(1):15-26.

355. Wayhs CA, Tortato C, Mescka CP, Pasquali MA, Schnorr CE, Nin MS, et al. The association effect of insulin and clonazepam on oxidative stress in liver of an experimental animal model of diabetes and depression. *Pharm Biol.* 2013;51(5):533-8.
356. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2333-40.
357. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney Int Suppl* (2011). 2013;3(1):19-62.
358. Scheen AJ, Paquot N. [Management of hyperglycaemia of type 2 diabetes. Paradigm change according to the ADA-EASD consensus report 2018]. *Rev Med Liege.* 2018;73(12):629-33.
359. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 2006;70(11):1914-9.
360. So WY, Ma RC, Ozaki R, Tong PC, Ng MC, Ho CS, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in type 2, diabetic patients-- interaction with ACE insertion/deletion polymorphism. *Kidney Int.* 2006;69(8):1438-43.
361. Ruster C, Bondeva T, Franke S, Tanaka N, Yamamoto H, Wolf G. Angiotensin II upregulates RAGE expression on podocytes: role of AT2 receptors. *Am J Nephrol.* 2009;29(6):538-50.
362. Ruggenti P, Bettinaglio P, Pinares F, Remuzzi G. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and renoprotection in diabetic and nondiabetic nephropathies. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(5):1511-25.
363. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, et al. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest.* 1997;99(7):1585-95.
364. Tang SC, Lai KN. The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(8):3049-56.
365. Satriano J, Vallon V. Primary kidney growth and its consequences at the onset of diabetes mellitus. *Amino Acids.* 2006;31(1):1-9.
366. Molitoris BA. Rethinking CKD Evaluation: Should We Be Quantifying Basal or Stimulated GFR to Maximize Precision and Sensitivity? *Am J Kidney Dis.* 2017;69(5):675-83.
367. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Johnson RJ, Parving HH. Serum uric acid as a predictor for development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: an inception cohort study. *Diabetes.* 2009;58(7):1668-71.
368. McMahon GM, Waikar SS. Biomarkers in nephrology: Core Curriculum 2013. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(1):165-78.
369. Krolewski AS. Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38(6):954-62.
370. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Mauer M. Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int.* 1995;48(6):1929-35.
371. Charlton M, Nair KS. Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr.* 1998;128(2 Suppl):323s-7s.
372. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(4):556-63.

373. Seibert FS, Sitz M, Passfall J, Haesner M, Laschinski P, Buhl M, et al. Prognostic Value of Urinary Calprotectin, NGAL and KIM-1 in Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res.* 2018;43(4):1255-62.
374. Mohandes S, Doke T, Hu H, Mukhi D, Dhillon P, Susztak K. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease. *J Clin Invest.* 2023;133(4).
375. Wu T, Ding L, Andoh V, Zhang J, Chen L. The Mechanism of Hyperglycemia-Induced Renal Cell Injury in Diabetic Nephropathy Disease: An Update. *Life (Basel).* 2023;13(2).
376. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016;148:183-93.
377. Diabetes mellitus: a major risk factor for cardiovascular disease. A joint editorial statement by the American Diabetes Association; The National Heart, Lung, and Blood Institute; The Juvenile Diabetes Foundation International; The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; and The American Heart Association. *Circulation.* 1999;100(10):1132-3.
378. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation.* 1979;59(1):8-13.
379. Davidoff AJ, Davidson MB, Carmody MW, Davis ME, Ren J. Diabetic cardiomyocyte dysfunction and myocyte insulin resistance: role of glucose-induced PKC activity. *Mol Cell Biochem.* 2004;262(1-2):155-63.
380. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(9):585-607.
381. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972;30(6):595-602.
382. Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, Ritchie RH. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther.* 2014;142(3):375-415.
383. Li CJ, Lv L, Li H, Yu DM. Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:73.
384. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404(6779):787-90.
385. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes.* 2002;51(6):1938-48.
386. Ritchie RH, Delbridge LM. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(1-2):159-66.
387. Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;195(3):321-38.
388. Diamant M, Lamb HJ, Groeneveld Y, Endert EL, Smit JW, Bax JJ, et al. Diastolic dysfunction is associated with altered myocardial metabolism in asymptomatic normotensive patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003;42(2):328-35.

389. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42(36):3599-726.
390. Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II- dependent. *Lab Invest*. 2000;80(4):513-27.
391. Zhang HF, Fan Q, Qian XX, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL, et al. Role of insulin in the anti-apoptotic effect of glucose-insulin-potassium in rabbits with acute myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis*. 2004;9(6):777-83.
392. Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, Myasoedova VA, Alfieri V, Orekhov AN. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5).
393. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2019;124(2):315-27.
394. Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, et al. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front Immunol*. 2018;9:430.
395. Egorova MO. [Increased serum level of the acute inflammation phase parameter CRP and the high level of low density lipoprotein cholesterol--factors of increased risk of development of atherosclerosis and its complications (a literature review)]. *Klin Lab Diagn*. 2002(6):3-6.
396. Hamed SA. Brain injury with diabetes mellitus: evidence, mechanisms and treatment implications. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2017;10(4):409-28.
397. Strachan MW, Frier BM, Deary IJ. Type 2 diabetes and cognitive impairment. *Diabet Med*. 2003;20(1):1-2.
398. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*. 1999;53(9):1937-42.
399. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*. 2004;61(5):661-6.
400. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9613090.
401. Wang T, Fu FH, Han B, Zhang LM, Zhang XM. Long-term but not short-term aspirin treatment attenuates diabetes-associated learning and memory decline in mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011;119(1):36-40.
402. Liguri G, Taddei N, Nassi P, Latorraca S, Nediani C, Sorbi S. Changes in Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, Ca²⁺-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1990;112(2-3):338-42.
403. Dinčić M, Krstić DZ, Čolović MB, Nešović Ostojić J, Kovačević S, De Luka SR, et al. Modulation of rat synaptosomal ATPases and acetylcholinesterase activities induced by chronic exposure to the static magnetic field. *Int J Radiat Biol*. 2018;94(11):1062-71.
404. Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3):315-35.
405. Appleyard ME. Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase. *Biochem Soc Trans*. 1994;22(3):749-55.
406. Chacón MA, Reyes AE, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *J Neurochem*. 2003;87(1):195-204.

407. Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Corrêa M, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;610(1-3):42-8.
408. Leong SF, Leung TK. Diabetes induced by streptozotocin causes reduced Na-K ATPase in the brain. *Neurochem Res.* 1991;16(10):1161-5.
409. Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis.* 2008;23(4):427-43.
410. Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:817-49.
411. Reime Kinjo E, Arida RM, Mara de Oliveira D, da Silva Fernandes MJ. The Na⁺/K⁺ATPase activity is increased in the hippocampus after multiple status epilepticus induced by pilocarpine in developing rats. *Brain Res.* 2007;1138:203-7.
412. Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res.* 2003;28(9):1339-44.
413. Tian D, Dmitrieva RI, Doris PA, Crary JF, Sondhi R, Sacktor TC, et al. Protein kinase M zeta regulation of Na/K ATPase: a persistent neuroprotective mechanism of ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2008;1213:127-39.
414. Franzon R, Chiarani F, Mendes RH, Belló-Klein A, Wyse AT. Dietary soy prevents brain Na⁺, K⁺-ATPase reduction in streptozotocin diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69(2):107-12.
415. Duarte JM, Oses JP, Rodrigues RJ, Cunha RA. Modification of purinergic signaling in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience.* 2007;149(2):382-91.
416. Gendron FP, Benrezzak O, Krugh BW, Kong Q, Weisman GA, Beaudoin AR. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets.* 2002;3(3):229-45.
417. al-Rashida M, Iqbal J. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Med Res Rev.* 2014;34(4):703-43.
418. Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004;65(1):1-6.

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

4-ААР, 4-аминоантипирин

АКТ, протеин киназа В (енг. *protein kinase B*)

ALP, алкална фосфатаза

ALT, аланин аминотрансфераза

АМПК, 5`-активирана протеин киназа А

ANOVA, једнострука анализа варијансе

Апо, аполипопротеин

AST, аспартат аминотрансфераза

АТР, аденозин-трифосфат

АСЕ, ангиотензин-конвертујући ензим

AChE, ацетилхолинестераза

BCG, бром-крезол-зелено

cAMP, циклични аденозин-монофосфат

CEACAM1, карциноембрионски антиген везан са ћелијским адхезивним молекулом 1 (енг. *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*)

СЕТР, холестерол естар трансферни протеин (енг. *Cholesteryl Ester Transfer Protein*)

СНЕ, холестеролестераза

СНОD, холестеролоксидаза

СК, глукокиназа (енг. *glucokinase*)

СМV, цитомегаловирус

CRP, С-реактивни протеин

DM, шећерна болест (лат. *Diabetes mellitus*)

DPP-4, инхибитори дипептидил пептидазе-4 (енг. *dipeptidyl peptidase IV inhibitors*)

EDTA, етилен диамин тетра сирћетна киселина

FOXO1, *Forkhead box O1* транскрипциони фактор из једра

GAD65, 65 изоформа декарбоксилазе глутаминске киселине (енг. *glutamic acid decarboxylase 65*)

GEDTA, гликол-етар-диамин-*N,N,N',N'*-тетрасирћетна киселина

GIP, глюкоза-зависни инсулимотропни полипептид (енг. *glucose-dependent insulinotropic peptide*)

GK, глицерол киназа

GLDH, глутамат-дехидрогеназа

GLP-1, глугагону сличан пептид-1 (енг. *glucagon-like peptide-1*)

GLUT2, транспортер глюкозе 2 (енг. *glucose transporter 2*)

GPO, глицерол-3-фосфат оксидаза

GPx, глутатион пероксидаза

GRB2, рецептори фактора раста 2 (енг. *growth factor receptor bound protein 2*;))

GSK3, гликоген синтазна киназа 3 (енг. *glycogen synthase kinase 3*)

HbA_{1c}, гликозилирани хемоглобин A_{1c}

HBV, вирус хепатитиса Б

HCV, вирус хепатитиса Ц

HDL, липопротеини велике густине

HEDTA, хидроксил етилен диамин триацетилна киселина

HIV, вирус хумане имунодефицијенције

HLA, комплекс леукоцитних антигена (енг. *human leukocyte antigen*)

HSV, херпес симплекс вирус

IA-2 β , аутоантиген 2 β ћелије острвца (енг. *islet cell antigen 2 β*)

IAA, аутоантитела на инсулин (енг. *insulin autoantibodies*)

ICA512 или **IA-2**, аутоантиген 512 ћелије острвца (енг. *islet cell antigen 512*)

IGF, фактори раста слични инсулину (енг. *insulin-like growth factor*)

LDL, липопротеини средње густине

IRS, фамилија протеина супстрата рецептора за инсулин (енг. *insulin receptor substrate*)

K_{ATP}, АТР-зависна киназа за калијум

KIM-1, молекул оштећења бубрега-1 (енг. *Kidney Injury Molecule-1*)

LCAT, лецитин холестерол ацилтрансфераза (енг. *Lecithin-Cholesterol Acyl Transferase*)

LDL, липопротеини мале густине

MADB, динатријумова со *N,N*-бис(4-сулфобутил)-3,5-диметиланилин

MAPK, протеинска киназа активирана митогенима (енг. *Ras-mitogen-activated protein kinase*)

MDA, малондиалдехид

MHC, главног комплекса ткивне подударности (енг. *major histocompatibility complex*)

MRSA, метицилин-резистентни *S. Aureus*

mTOR, циљ рапамицина сисара (енг. *mammalian target of rapamycin*)

Na⁺/K⁺-ATPaza, натријум-калијум пумпа

NEFA, неестерификоване масне киселине (енг. *non-esterified fatty acids*)

NGAL, липокалин повезан са неутрофилном желатиназом (енг. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*)

NAD, никотинамид аденин динуклеотид

PI3K, фосфатидилинозитол 3-киназа

PIP2, фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (енг. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PIP3, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат (енг. *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*)

PKA, протеин киназа А (енг. *protein kinase A*)

PKC, протеин киназа С (енг. *protein kinase C*),

PLTP, протеини за трансфер фосфолипида (енг. *PhosphoLipid Transfer Protein*)

POD, пероксидаза

PPAR γ , нуклеарне рецепторе који активирају пролиферацију пероксизома класе γ (енг. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

PTP-1B, фосфотирозин фосфатаза 1 В (енг. *phosphotyrosine phosphatase 1 B*)

RAS, енг. *rat sarcoma*

RRP грануле, грануле усидрене на мембрани (енг. *readily releasable pool*)

SARS-CoV-2, тешки акутни респираторни синдром коронавирус 2 (енг. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SGLT, Na-глукозни котранспортер 1 (енг. *sodium-glucose cotransporter 1*)

SOD, супероксид дизмутаза

SOS, енг. *son of sevenless*

TMPRSS2, хумане трансмембранске серин протеазе 2 (енг. *human transmembrane protease serine 2*)

VLDL, липопротеини веома ниске густине

VRSA, ванкомицин-резистентни *S. Aureus*

ГИТ, гастроинтестинални тракт

ДНК, дезоксирибонуклеинска киселина

МИК, минимална инхибиторна концентрација

ПОМ, полиоксометалати

РНК, рибонуклеинска киселина

ЦНС, централни нервни систем

Публиковани радови из тезе

*Dinčić M, Čolović MB, Matutinović MS, Ćetković M, Stevović TK, Mougharbel AS, Todorović J, Ignjatović S, Radosavljević B, Milisavljević M, Kortz U, Krstić DZ. **In vivo toxicity evaluation of two polyoxotungstates with potential antidiabetic activity using Wistar rats as a model system.** RSC Advances (2020) 10(5):2846-55. M22 IF 3,361*

*Dinčić M, Čolović MB, Todorović J. **Jedinjenja vanadijuma — novi mogući lekovi u terapiji šećerne bolesti.** Medicinski podmladak. doi: 10.5937/mp75-43694.*

Биографија кандидата

Др Марко Динчић је рођен 27.09.1989. године у Београду. Основно и средње образовање (Гимназија „Светозар Марковић“) завршио је у Сурдулици. Уписао је Медицински факултет Универзитета у Београду 2008. године. Дипломирао је 2015. године са просечном оценом током студирања 9,57 (девет педесет и седам). Докторске академске студије (ДАС - програм „Физиолошке науке“) на Медицинском факултету Универзитета у Београду уписао је 2015/2016. године. Државни стручни испит за доктора медицине је положио 2016. године. Специјализацију из интерне медицине на Медицинском факултету Универзитета у Београду завршио је 2022. године. У звање сарадника у настави на Катедри за патолошку физиологију је изабран 23.11.2016. године, а реизабран у исто звање 30.11.2017. године. У звање асистента на Катедри за патолошку физиологију је изабран 26.12.2018. године, а реизабран у исто звање 15.12.2021. године. Др Марко Динчић је до сада објавио 21 научну публикацију од чега: 8 радова у часописима са JSR листе (3 рада из категорије M21a, 4 рада из категорије M21 и 1 рад из категорије M23, са укупним ИФ = 27,772 (у 4 рада је први аутор, а у 1 је кореспондирајући аутор)) и 13 саопштења на међународним и националним скуповима (8 извода у зборницима са међународних скупова и 5 извода у зборницима са националних скупова).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марко Динчић

Број индекса ФН 06/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хетерополиволфрамати као могући антидијабетици: утицај на хипергликемију и процена хепато- и нефротоксичности у експерименталном моделу дијабетеса изазваним стрептозотоцином код пацова

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 23. 06. 2023.године

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марко Динчић

Број индекса ФН 06/15

Студијски програм Ф и з и о л о ш к е н а у к е

Наслов рада Хетерополиволфраматни као могући антидијабетици: утицај на хипергликемију и процена хепато- и нефротоксичности у експерименталном моделу дијабетеса изазваног стрептозотоцином код пацова

Ментор проф. др Јасна Тодоровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 23.06.2023.године

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Хетерополиволфраммати као могући антидијабетици: утицај на хипергликемију и процена хепато-и нефротоксичности у експерименталном моделу дијабетеса изазваним стрептозотоцином код
пацова

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 23.06.2023.године

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.