

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**



Branislava Teofilović

**BIOHEMIJSKA I HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
EKSTRAKATA BOSILJKA I UTICAJ FARMACEUTSKO-
TEHNOLOŠKE FORMULACIJE NA GLIKEMIJSKI, LIPIDNI I
OKSIDO-REDUKCIONI STATUS KOD OGLEDNIH ŽIVOTINJA**

Doktorska disertacija

Mentori:

Doc. dr Nevena Grujić-Letić

Doc. dr Svetlana Goločorbin-Kon

Novi Sad, 2016.

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem:

- ✿ svojim mentoricama doc. dr Neveni Grujić-Letić i doc. dr Svetlani Goločorbin-Kon na nesebičnom trudu i ljubavi, na korisnim savetima, velikoj pomoći, poverenju i svemu što su me naučile prilikom izrade i pisanja doktorske disertacije. Neću zaboraviti brojne razgovore i reči podrške koje su bile više nego značajne u teškim trenucima,
- ✿ prof. dr Aleksandru Raškoviću na svim lepim rečima i motivaciji, na pomoći oko formulacije i izrade doktorske teze. Na strpljenju, kao i na pronalaženju rešenja za svaki izazov koji se našao na putu. Takođe, na neiscrpnom i nesebičnom prenošenju kako stručnog, tako i životnog znanja tokom svih godina saradnje,
- ✿ prof. dr Momiru Mikovu na stručnom vođenju istraživanja, korisnim sugestijama i materijalnoj pomoći,
- ✿ prof. dr Slobodanu Gadžuriću na motivaciji, podršci i velikoj pomoći oko statističke obrade podataka,
- ✿ doc. dr Nebojši Stilinoviću na ogromnom poštovanosti, pomoći i podršci tokom izvođenja oglada, kao i tokom pisanja teze. Veliko hvala i na svim rečima ohrabrenja da lakše dođem do cilja,
- ✿ prof. dr Aleksandru Takāči koji mi je pomogao da dobijeni rezultati budu statistički obrađeni i tako u velikoj meri doprineo značajnosti doktorata,
- ✿ doc. dr Ivanu Čapo, dr Milanu Popoviću i dr Dejanu Miljkoviću za pomoć oko histoloških analiza,
- ✿ Slavenu Šuputu i Mari Katić za sve tehničke i manuelne procedure koje sam savladala tokom divne saradnje sa njima,
- ✿ Radmili Matić koja mi je nesebično pomogla u citiranju i sređivanju literature,
- ✿ suprugu, roditeljima, sestri i zetu na pruženoj ljubavi, bezgraničnom strpljenju i podršci, ogromnom razumevanju i verovanju u mene od prvog dana putovanja kroz doktorske studije,
- ✿ kolegama, prijateljima i svima koji su na bilo koji način doprineli realizaciji i kvalitetu ove doktorske disertacije,

Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj 41012) i projekata Sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj AP Vojvodine (broj 114-451-3551/2015-03 i 114-451-2458/2011-01).

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Branislava Teofilović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Nevena Grujić-Letić, docent Dr Svetlana Goločorbin-Kon, docent
Naslov rada: NR	Biohemijska i hemijska karakterizacija ekstrakata bosiljka i uticaj farmaceutsko-tehnološke formulacije na glikemijski, lipidni i oksido-redukcioni status kod oglednih životinja
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 7/ stranica 146/ slika 19/ grafikona 48/ tabela 30/ referenci 165)

Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Farmaceutska hemija, farmaceutska tehnologija, farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Ocimum basilicum; fenoli; oksidativni stres; biljni ekstrakti; flavonoidi; glukoza u krvi; lipidi; antioksidansi; dijabetes melitus; eksperimenti na životinjama
UDK	615.322.07:635.71 547.56:543.48
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i> L.) pripada familiji <i>Lamiaceae</i> i jedna je od najrasprostranjenijih i najčešće gajenih biljaka širom sveta. Njegova upotreba je široko rasprostranjena zbog bogatog sadržaja i skladnog odnosa vitamina, minerala kao i različitih fenolnih jedinjenja kao glavnih nosilaca antioksidativne aktivnosti. Poslednjih godina velika pažnja je usmerena ka fenolnim fitokomponentama kao potencijalnim promoterima zdravlja.</p> <p>Ciljevi ovog rada bili su ispitivanje kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika, kao i biohemijskih aktivnosti ekstrakata bosiljka dobijenih različitim rastvaračima, kao i ispitivanje uticaja farmaceutsko-tehnološke formulacije u obliku mikrovezikula ekstrakta bosiljka na glikemijski, lipidni i oksido-redukcioni status kod ogleđnih životinja, u odnosu na vodeni ekstrakt. <i>In vitro</i> ispitivanja su uključivala analizu 100 ekstrakata dobijenih različitim rastvaračima i stepenom usitnjenosti. Ukupni fenolni i flavonoidni sadržaj, kao i antioksidativna aktivnost određena je spektrofotometrijskom metodom. Takođe, kvantifikovane i kvalifikovane su fenolne komponente (fenolne kiseline i flavonoidi) primenom visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC). <i>In vivo</i> ispitivanje je rađeno na 84 albino laboratorijska pacova soja Wistar. <i>Per os</i> su primenjivani vodeni ekstrakt bosiljka, rastvor natrijumove soli monoketoholne kiseline, njihove kombinacije, kao i ekstrakt u obliku farmaceutsko-tehnološke formulacije, mikrovezikula.</p>

	<p>Posle sedmodnevnog tretmana, merene su koncentracije glukoze u krvi, a nakon žrtvovanja, u serumu su određeni parametri lipidnog statusa i antioksidativnog stresa. <i>Ex vivo</i> analizama procenjavani su efekti ekstrakta bosiljka na enzimske i neenzimske parametre antioksidativnog odbrambenog sistema i oksidativne modifikacije lipida. Praćen je i uticaj tretmana na akutno oštećenje jetre usled primene paracetamola.</p> <p>Svi analizirani ekstrakti bosiljka su pokazali prisustvo velikog broja fenolnih jedinjenja iz klase fenolnih kiselina i flavonoida. Detektovane i kvantifikovane aktivne komponente bile su fenolne kiseline: hlorogenska, <i>p</i>-hidroksibenzoeva, kafena, vanilinska, ferulna, rozmarinska i cimetna, kao i apigenin, kvercetin, naringenin i rutin kao predstavnici flavonoidnih jedinjenja. Primena ekstrakta bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline, same ili u kombinaciji, a takođe i u farmaceutsko-tehnološkoj formulaciji, pokazale su smanjenja oštećenja tokom oksidativnog stresa, značajno antidijabetesno delovanje, povoljan uticaj na lipidni status i protektivni efekat na funkcije jetre i bubrega.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ekstrakt bosiljka sadrži značajnu količinu fenolnih jedinjenja odgovornih za antioksidativnu aktivnost. Vodeni ekstrakt bosiljka, sam ili u kombinaciji sa monoketoholnom kiselinom, i u obliku farmaceutsko-tehnološke formulacije snižava nivo glukoze u krvi, ubrzava obnovu β ćelija, ima povoljan efekat na lipidni status i ne dovodi do toksičnih promena na jetri i bubrezima kod eksperimentalnih životinja.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	24.09.2015.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: dr Momir Mikov, redovni profesor, Medicinski fakultet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Nevena Grujić-Letić, docent, Medicinski fakultet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Svetlana Goločorbin-Kon, docent Medicinski fakultet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Aleksandar Rašković, vanredni profesor, Medicinski fakultet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Slobodan Gadžurić, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu</p>
---	---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Branislava Teofilović
Mentor: MN	PhD Nevena Grujić-Letić, assistant professor PhD Svetlana Goločorbin-Kon, assistant professor
Title: TI	Biochemical and chemical characterization of basil extracts and influence of pharmaceutical technological formulations on the glycemic, lipid and oxidative status in experimental animals
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters 7 / pages 146/ pictures 19 / graphics 48/ tables 30/ references 165/
Scientific field SF	Pharmacy

Scientific discipline SD	Pharmaceutical chemistry, pharmaceutical technology, pharmacology
Subject, Key words SKW	Ocimum basilicum; Phenols; Oxidative Stress; Plant Extracts; Flavonoids; Blood Glucose; Lipids; Antioxidants; Diabetes Mellitus; Animal Experimentation
UC	615.322.07:635.71 547.56:543.48
Holding data: HD	Library of Medical faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Basil (<i>Ocimum basilicum</i> L.) belongs to the family <i>Lamiaceae</i> and represents one of the most widespread and most commonly cultivated plant worldwide. Its use is widespread due to its rich content and harmonious relationship of vitamins, minerals and various phenolic compounds which are responsible for the antioxidant activity. In recent years, great attention is directed to phenolic phytochemicals as potential promoters of health.</p> <p>The objectives of this study were to test the qualitative and quantitative characteristics, as well as the biochemical activity of basil extracts obtained by various solvents and investigate the impact of pharmaceutical technological formulation of basil extract on glycemic, lipid and oxidation-reduction status of the aqueous extract in the experimental animals.</p> <p><i>In vitro</i> studies have included 100 extracts obtained by various solvents and degrees of fragmentation. Total phenolic and flavonoid content, as well as antioxidant activity was determined by spectrophotometric method. Also, phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) were qualified and quantified using high performance liquid chromatography (HPLC). <i>In vivo</i> testing was performed on 84 laboratory albino <i>Wistar</i> rats.</p> <p>The aqueous extract of basil, a solution of sodium salt of monoketocholic acid, their combinations, as well as an extract in the form of the pharmaceutical technological formulation were administered <i>per os</i>.</p>

	<p>After seven-day-treatment, the concentrations of glucose were measured in the blood and after sacrificing of animals, the lipid and antioxidative parameters were determined in serum. <i>Ex vivo</i> analysis assessed the effect of the extract of basil on the parameters of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system and the oxidative modification of lipids. The effect of paracetamol on acute liver injury was also monitored.</p> <p>All analyzed basil extracts showed the presence of the large number of phenolic compounds from the class of phenolic acids and flavonoids. Chlorogenic, p-hydroxybenzoic, caffeic, vanillic, ferulic, rosmarinic, and cinnamic acid, as well as apigenin, quercetin, naringenin and rutin were detected and quantified. The application of basil extracts and the sodium salt of monoketocholic acid, either alone or in combination, and also in pharmaceutical technological formulation of microvesicles has shown a reduction in damage during oxidative stress, then a significant antidiabetic activity, favorable effect on the lipid profile and protective effect on the liver and kidney function.</p> <p>Based on these results it can be concluded that basil extract contains significant amounts of phenolic compounds responsible for antioxidant activity. The aqueous extract of basil, alone or in combination with monoketocholic acid, and in the form of the pharmaceutical technological formulations lowers glucose levels in the blood, accelerates the restoration of β cells, has a favorable effect on the lipid status and does not lead to toxic changes in the liver and kidneys in experimental animals.</p>
Accepted on Senate on: AS	24.09.2015.
Defended: DE	

Thesis Defend Board: DB	<p>president: Momir Mikov, MD PhD, full professor, Medical Faculty, Novi Sad</p> <p>member: Nevena Grujić-Letić, PhD assistant professor, Medical Faculty, Novi Sad</p> <p>member: Svetlana Goločorbin-Kon, PhD assistant professor, Medical Faculty, Novi Sad</p> <p>member: Aleksandar Rašković, PhD associate professor, Medical Faculty, Novi Sad</p> <p>member: Slobodan Gadžurić, PhD associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad</p>
----------------------------	---

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. Lekovito bilje	4
2.2. Aromatične biljne vrste	4
2.3. Bosiljak (<i>Ocimum basilicum</i> , Lamiaceae)	5
2.3.1. Istorijski podaci vezani za bosiljak	5
2.3.2. Izgled droge	6
2.3.3. Uzgajanje i berba	6
2.4. Upotreba bosiljka	8
2.4.1. Antioksidativno delovanje	8
2.4.2. Hipoglikemijski efekat	14
2.4.3. Hipolipidemijski efekat	16
2.4.4. Ostale farmakološke uloge	17
2.5. Hemijski sastav	18
2.5.1. Fenolna jedinjenja	18
2.6. Žučne kiseline	24
2.6.1. Žučne kiseline kao glikoregulatorni agensi	27
2.6.2. 12-monoketoholna kiselina	27
2.7. Farmaceutsko-tehnološka formulacija	29
2.8. Budućnost primene novih formulacija	30
2.9. Ekstrakcija aktivnih principa iz biljnih droga	31
2.10. Tipovi ekstrakcije	37
3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE	40
3.1. Ciljevi	40
3.2. Radne hipoteze	40
4. MATERIJAL I METODE	41
4.1. Metoda određivanja hlorogenske kiseline	41
4.2. Tehnike ekstrakcije	42
4.2.1. Maceracija polarnim i nepolarnim rastvaračima	42
4.2.2. Dobijanje infuza	42
4.2.3. Mikrotalasna ekstrakcija	43
4.2.4. Ekstrakcija ultrazvukom	43
4.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	43

4.4.	Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	44
4.5.	<i>In vitro</i> određivanje antioksidativne aktivnosti.....	46
4.5.1.	DPPH metoda.....	46
4.5.2.	Određivanje peroksidnog jona	47
4.5.3.	Određivanje hidroksilnog jona.....	47
4.5.4.	Određivanje lipidne peroksidacije	48
4.5.5.	Visokoefikasna tečna hromatografija	48
4.6.	Farmaceutsko-tehnološka formulacija ekstrakta u mikrovezikule	52
4.7.	<i>In vivo</i> ispitivanje hipoglikemijskog i hipolipidemijskog uticaja	53
4.8.	<i>Ex vivo</i> ispitivanje antioksidativne aktivnosti.....	56
4.8.1.	Određivanje koncentracije proteina	57
4.8.2.	Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije.....	57
4.8.3.	Određivanje specifične aktivnosti katalaze.....	58
4.8.4.	Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze	58
4.8.5.	Određivanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze	59
4.8.6.	Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze	60
4.9.	Morfološka ispitivanja	60
4.9.1.	Histološka obrada tkiva.....	60
4.9.2.	Morfometrijska analiza tkiva	61
4.9.3.	Imunohistohemijsko bojenje	61
4.9.4.	Statistička obrada histoloških rezultata.....	62
4.10.	Statistička obrada podataka.....	62
4.10.1.	SPSS	62
4.10.2.	Hemometrijska analiza.....	63
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	67
5.1.	<i>In vitro</i> ispitivanja	67
5.1.1.	Validacija HPLC metode za određivanje hlorogenske kiseline.....	67
5.1.2.	Prinos ekstrakcije	71
5.1.3.	Sadržaj ukupnih fenola	73
5.1.4.	Sadržaj flavonoida	76
5.1.5.	Određivanje 50% inhibicije DPPH radikala	78
5.1.6.	Hemometrijska analiza antioksidativne aktivnosti	81
5.1.7.	Ispitivanja antioksidativne aktivnosti	89
5.1.8.	HPLC analiza	91

5.2.	<i>In vivo</i> ispitivanja.....	102
5.2.1.	Vrednosti telesne mase	102
5.2.2.	Vrednosti glikemije.....	105
5.2.3.	OGT test.....	108
5.2.4.	Lipidni status.....	109
5.3.	<i>Ex vivo</i> ispitivanja	114
5.3.1.	Uticaj na oksidativno oštećenje lipida	115
5.3.2.	Aktivnost enzima antioksidativne zaštite.....	115
5.3.3.	Uticaj na nivo enzima jetre	118
5.3.4.	Uticaj na nivo bubrežnih parametara	120
5.4.	Morfološka ispitivanja	123
5.4.1.	Histološka i morfometrijska analiza tkiva jetre	123
5.4.2.	Histološka i morfometrijska analiza tkiva bubrega	123
5.4.3.	Histološka i morfometrijska analiza tkiva pankreasa	128
6.	ZAKLJUČAK.....	132
7.	LITERATURA	134

1. UVOD

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) pripada porodici *Lamiaceae* i jedna je od najrasprostranjenijih i najčešće gajenih biljaka širom sveta, naročito u Aziji, Evropi i Severnoj Americi. Njegova upotreba je široko rasprostranjena zbog bogatog sadržaja i skladnog odnosa vitamina, minerala kao i različitih fenolnih jedinjenja. Pored toga što se koristi kao začim, obzirom da predstavlja izvor prirodnih antioksidanata i drugih aktivnih komponenti, veliku primenu ima u narodnoj medicini gde se upotrebljava u tretmanu inflamatornih procesa, nesаницe, u tretmanu i prevenciji glavobolje i otklanjanju bradavica, terapiji dijareje, kašlja i astme, respiratornih infekcija, pneumonije, a pokazuje i snažno antimikrobno dejstvo.

Poznato je da biljne vrste iz porodice *Lamiaceae* imaju snažnu antioksidativnu aktivnost. Bosiljak, koji pripada toj porodici, sadrži fenole i flavonoide, zaslužne za pomenuto dejstvo, i to cimetnu, kafenu, sinapinsku i ferulnu kiselinu koje predstavljaju potentne antioksidanse, hvatače slobodnih radikala i helatore metalnih jona.

Biljni polifenoli imaju veoma raznovrsne strukture i sisteme klasifikacije, ali svi imaju jednu istu osobinu da sadrže najmanje jedan aromatičan prsten i jednu ili više hidroksilnih grupa. Polifenolne komponente u biljkama su prirodni antioksidansi i upravo antioksidativna aktivnost fenola je povezana sa njihovom hemijskom strukturom koja poseduje redoks karakteristike. Igraju bitnu ulogu u apsorbovanju i neutralizaciji slobodnih radikala, što omogućava zaštitu od infekcija. Pored svega, fenolne komponente utiču na kvalitet i dugoročnu stabilnost hrane, delujući kao korigenski ukusa i boje i kao antioksidansi. Najviše proučavana i najvažnija fenolna jedinjenja su flavonoidi i fenolne kiseline. Flavonoidi su prepoznati kao komponente sa izuzetno snažnim biološkim delovanjem koje može biti iskorišćeno u prevenciji hroničnih oboljenja. Epidemiološke studije su potvrdile povezanost ishrane bogate flavonoidima i smanjenog rizika za razvitak kardiovaskularnih bolesti. Flavonoidi preveniraju oksidativni stres i oksidaciju LDL frakcija lipoproteina. Iz literature je poznato da fenolna jedinjenja inhibiraju enzime, pokazuju antiinflamatorno, antimikrobno, antialergijsko, hipoglikemijsko, hipolipidemijsko, kardioprotektivno i antikancerogeno delovanje, ali se njihova najvažnija uloga ogleda u antioksidativnoj aktivnosti koja prevenira nastanak pomenutih poremećaja.

Antioksidansi su danas od velike važnosti u prevenciji starenja i mnogih bolesti koje se dovode u vezu sa slobodnim radikalima, te su zbog toga supstance koje pokazuju ovu aktivnost

sve češći predmet istraživanja. Mnogo pažnje usmereno je na proučavanje antioksidativne aktivnosti prirodnih supstanci, a posebno kada je utvrđeno da su poznati, jaki sintetski antioksidansi, poput butil-hidroksianizola (BHA) i butil-hidroksitoluena (BHT), potencijalni promotori karcinogeneze.

Balans između slobodnih radikala i antioksidanata je neophodan za adekvatnu fiziološku funkciju u organizmu. Mnogi slobodni radikali su nestabilni i visoko reaktivni, i kao takvi predstavljaju donore ili akceptore elektrona od drugih molekula. Zahvaljujući zagađivačima okoline, hemikalijama, toksinima, kao i psihičkom stresu, slobodni radikali svode kapacitet prirodnih endogenih antioksidanata na minimum. Ako slobodnih radikala u organizmu nastane više nego što antioksidansi mogu da neutrališu, nastaje stanje koje se naziva oksidativni stres. Na taj način dolazi do promena u ekspresiji gena i indukcije sinteze nefunkcionalnih proteina. Takođe, slobodni radikali kiseonika vrše oksidaciju i degradaciju polinezasićenih masnih kiselina koje su sastavni deo lipidnih membrana i na taj način doprinose oksidativnom stresu. Oksidativni stres se dovodi u vezu sa mnogim poremećajima i oboljenjima kao što su ateroskleroza, pojedini karcinomi, inflamatorne reakcije (artritis, lupus eritematozis, vaskulitis), proces starenja, ishemija (srčana oboljenja, šlog), emfizem, čir želuca, hipertenzija, neurološki poremećaji i alkoholizam.

Prema literaturnim navodima, takođe korisna farmakodinamska delovanja ekstrakta bosiljka obuhvataju i sniženje nivoa glukoze u krvi i hipolipidemijsko delovanje, što se prema tumačenju mnogih autora javlja prvenstveno kao posledica izraženog antioksidativnog delovanja aktivnih supstanci ove biljke, fenola i flavonoida. Uticaj ekstrakta bosiljka na nivo glukoze u krvi obuhvata antihiperглиkemijsko delovanje koje se objašnjava inhibicijom aktivnosti enzima α -amilaze i α -glukozidaze, zbog čega se usporava resorpcija glukoze iz intestinalnog trakta i sprečava nastanak postprandijalne hiperглиkemije. Na ćelijama masnog tkiva, bosiljak ispoljava delovanje slično insulinu, tj. povećava preuzimanje glukoze iz krvi u adipocite. Na taj način preparati bosiljka pokazuju sličnost u mehanizmu antihiperглиkemijskog efekta kao i derivati bigvanida i tiazolidindiona.

Sa druge strane, sve je više ispitivanja farmakodinamskih efekata sintetskih derivata žučnih kiselina koji, delujući na enzime uključene u metabolizam ugljenih hidrata i lipida, predstavljaju nove, potencijalno korisne antidijabetesne supstance. Najviše podataka o korisnim efektima žučnih kiselina na metabolizam glukoze odnosi se na natrijumovu so monoketoholne kiseline, čije je

antidijabetesno delovanje potvrđeno kako na zdravim, normoglikemičnim, tako i na pacovima sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom.

Uzevši u obzir rezultate savremenih studija koji pokazuju pozitivne efekte bosiljka i sve veću zastupljenost bolesti koje se dovode u vezu sa oksidativnim stresom, uočen je značaj ispitivanja vodenog ekstrakta navedene biljke.

2. OPŠTI DEO

2.1. Lekovito bilje

Biljni resursi su za čoveka oduvek predstavljali izazov i bili raznovrstan izvor njegovih životnih potreba, što datira još od Vavilona, Egipta i stare Grčke. Lekovite biljke i lekoviti preparati biljnog porekla imaju značajnu ulogu u lečenju čoveka. Svaki treći lekoviti preparat ima jednu, više ili sve komponente biljnog porekla. Među mnogim biljnim vrstama koje rastu na planeti, samo je nekoliko stotina interesantno i značajno radi dobijanja sirovina za farmaceutske proizvode (u našoj zemlji ima oko 70 vrsta). Potrebe stanovništva oduvek podstiču razvoj pojedinih industrijskih grana, kao što su industrija hrane, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. U poslednje vreme prednost se daje gajenju pojedinih vrsta lekovitih i aromatičnih biljaka čiji su biološki aktivni sastojci osnovne sirovine za proizvodnju mnogih lekova, kozmetičkih proizvoda i aroma za prehrambene proizvode. To se može objasniti željom čoveka da se vrati prirodnim proizvodima, a takođe i modnim trendom. Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije, u lekovito bilje se ubrajaju biljne vrste čiji jedan ili više delova sadrže biološki aktivne materije koje se mogu iskoristiti u terapijske, profilaktičke ili hemijsko-farmaceutske svrhe. Kao lekovita sirovina mogu se upotrebiti koren, list, plod, seme, rizomi, lukovice i zeleni delovi. Lekovito svojstvo biljaka potiče od njihovog različitog hemijskog sastava, koji predstavljaju produkte sekundarnog metabolizma. U lečenju kardiovaskularnih oboljenja čak 77% čine biljni preparati, a u lečenju jetrenih insuficijencija 74%. Kontinuirana izloženost stresu i negativnom uticaju štetnih materija iz životne sredine i hrane uticala je na savremenog čoveka da se sve više okrene upotrebi materija i komponenata prirodnog porekla u svim oblastima, a najviše u oblasti ishrane i prevenciji bolesti (Keserović Z, 2008).

2.2. Aromatične biljne vrste

Aromatične biljke predstavljaju biljne vrste koje sadrže jednu ili više aktivnih materija posebnog mirisa ili ukusa, a koje se mogu iskoristiti za pravljenje mirisa, kozmetičkih proizvoda, napitaka i aroma za jestive namirnice. U novije vreme, svrstavaju se zajedno sa lekovitim biljem i definišu se kao biljne vrste sa aktivnim principima koje se koriste za izradu likera, konzervanasa, mirisa i insekticida (Jevtić S, 1986; Keserović Z, 2008).

2.3. Bosiljak (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae)

Sinonimi: *Ocimum album*, *Ocimum anisatum*, *Ocimum media*

Narodna imena: bosilek, bosilj, bosilje, bažilek, bažulek, basiljak, fasliđan, đen, vesligen, sarmaš, masliđan, bosioč.

Taksonomija biljke bosiljak (*O. basilicum* L.) prikazana je u **tabeli 1**.

Tabela 1. Taksonomija biljke *Ocimum basilicum* L.

Regnum (carstvo):	Plantae
Divisio (razdeo):	Magnoliophyta
Clasis (klasa):	Magnoliopsida
Ordo (red):	Lamiales
Familia (porodica):	Lamiaceae
Genus (rod):	<i>Ocimum</i>
Species (vrsta):	<i>O. basilicum</i>

2.3.1. Istorijski podaci vezani za bosiljak

Ime bosiljka potiče od latinske reči *basilicum* što znači carska trava, odnosno od grčke reči *basileus* što znači kralj. Smatran je kraljem svih lekovitih biljaka. Dioskorid je bosiljak znao kao okimon (što znači mirišljav), pa je po tome i rod dobio ime – *Ocimum*. Pradomovina ove biljke je Indija, gde su delovi biljke nađeni u grobnicama iz 3500 godine p.n.e. U Egipatskim grobnicama su takođe pronađeni listovi bosiljka, a i Grci su ga znali kao lekovitu biljku. Za vreme vladavine Cezara, predstavljao je veoma cenjenu lekovitu, začinsku i ukrasnu biljku. U XII veku monasi su ga doneli u Evropu. Kultivisan je u Francuskoj, a u Italiji su ga devojke postavljale ispod prozora kada su želele da nađu partnera. Takođe je predstavljao simbol plodnosti, što je Đovani Bokačo upotrebio u svojoj noveli o Lisbeti u Dekameronu. U srpskoj narodnoj religiji je zauzeo izuzetnu ulogu gde mu se pridaje mistična moć, pre svega zaštitna i plodotvorna. Bosiljkom se štitilo novorođenče, nosio se na venčanjima, služio je za kićenje obrednih hlebova uoči Nove godine, Božića i Đurđevdana, kroz njegov venac se gledalo kako bi se iskazala želja za porodom, a na

sahranama je pokojnikovo telo obavijano njegovim strukovima. Istovremeno, koristio se za isterivanje i odbranu od štetnih i nečistih sila, a takođe i u ljubavnoj magiji kao sredstvo za opčinjavanje (Tolstoj SM, 2001; Pantelić, 1998; Kišgeci J, 2002; Bremnes L, 1994).

2.3.2. Izgled droge

Bosiljak je zeljasta, aromatična, lekovita biljna vrsta prijatnog mirisa i predstavlja najznačajniju jednogodišnju biljku iz roda *Ocimum* (*slika 1*). Gajeni taksoni bosiljka *O. basilicum* svrstavaju se u tri kategorije:

- maximum (krupni listovi, visok sarmaš),
- minimum (sitnolisni, razgranat),
- bullatum (kasno-cvetajući sa nabranim listovima).



Slika 1. Izgled biljke bosiljak

Ima vretenast koren, koji je snažno razgranat, zadebljao u gornjem delu. Stabljike su uspravne, 20-50 cm visoke, u donjem delu busenasto razgranate, najčešće gole, prijatnog mirisa na balzam. Listovi su na lisnim drškama jajasti do rombični, na vrhu zašiljeni i grubo nazubljeni. Površina lista je gola, zelena ili sa antocijanima. Na naličju lista nalaze se žlezde koje luče etarsko ulje. Cvast je terminalna, cimozna, dihajizijum koji se sastoji od 17 do 18 pršljenova. Cvetovi su sitni, beli ili ružičasti, sa kratkom cvetnom drškom, po 6 složeni u pršljenove i nalaze se na vrhu stabljika. Plod je merikarpizijum - jajasta, crna ili mrka orašica. Cveti od juna do oktobra (Kišgeci J, 2002; Tasić S, 2009; Jančić R, 2011).

2.3.3. Uzgajanje i berba

Bosiljak je biljka koja voli toplotu, a to dokazuje činjenica da mlade biljčice promrzavaju već na 0°C. U fazi nicanja neophodna im je visoka temperatura vazduha (preko 25°C) i velika

vlažnost zemljišta. Pri ovim uslovima seme klija za 5-6 dana. Ne podnosi kišovito i hladno vreme, strada od prvih jesenjih mrazeva, a za gajenje su pogodna samo zemljišta koja se brzo zagrevaju, imaju dobar vodni kapacitet i koja su plodna. Predstavnicima takvih zemljišta su uglavnom černozemi, gajnjače i aluvijalna zemljišta. Na peskovitom zemljištu bosiljak može da se gaji samo ako se obezbede redovno zalivanje i đubrenje mineralnim đubrivima. Kao jednogodišnja vrsta gaji se u plodoredu. Vršiti se rotacija useva, što predstavlja smenjivanje biljnih vrsta u vremenu i prostoru. Biljna vrsta sa kojom se "rotira" je majoran, s tim da je bosiljak osetljiv na herbicide. Na istom mestu može da se gaji tek nakon 2-3 godine. Zemljište se u jesen ore (na dubinu 30-40 cm) i tako ostavlja da prezimi, a u proleće čim se prosuši, priprema se za setvu. Bosiljak dobro iskorišćava produženo dejstvo organskih đubriva, pa neposredno đubrenje stajnjakom nije neophodno. U jesen se u zemljište unosi mineralno đubrivo u najpogodnijem obliku. Azot u obliku amonijum jona (NH_4^+) i nitratnog jona (NO_3^-), fosfor u obliku dihidrogenfosfata (H_2PO_4^-) i kalijum u obliku katjona (K^+). Bosiljak se razmnožava semenom - direktnom setvom ili preko rasada. Ranije se proizvodio jedino pomoću rasada. Seme se sejalo u drugoj polovini marta u nezagrejane leje pokrivene folijom ili staklom. Rasad se proizvodio za 5-6 nedelja, a na stalno mesto se mogao presaditi tek kada bi prošle opasnosti od kasnih prolećnih mrazeva, sredinom maja. Poslednjih godina bosiljak se proizvodi direktnom setvom semena, početkom maja. Kod ovakvog načina uzgoja potrebno je navodnjavanje da bi se dobile dve žetve. Mere nege koje se moraju primenjivati obuhvataju okopavanje, redovno zalivanje i prihranjivanje (dodavanje azotnog đubriva). Nadzemni deo bosiljka u cvetu može da se koristi dva puta u toku vegetacije - na početku masovnog cvetanja (sredinom jula) i pre jesenjih mrazeva kada se biljke regenerišu nakon prve kosidbe (krajem septembra). Kosi se po suvom i lepom vremenu. Ako se zakasni sa prvom kosidbom, biljka bi mogla biti nešto slabijeg kvaliteta. Bosiljak se kosi ručno ili kosilicom, na 10-12 cm iznad zemlje, da se ne bi zahvatali donji odrveneli delovi. Prinos je oko 7000-10000 kg/ha zelene mase, iz koga se izdestiliše 8-12 kg etarskog ulja. Droga se suši na promaji, u hladovini ili sušarama, na oko 40°C, u tankom sloju. Zelene je boje, prijatnog, aromatičnog mirisa i gorkog ukusa. Nakon sušenja se pakuje u vreće i čuva na suvom i tamnom mestu. Etarska ulja se čuvaju u aluminijumskim posudama, na suvom i hladnom mestu (Kišgeci J, 2002; Jevtić S, 1986).

2.4. Upotreba bosiljka

2.4.1. Antioksidativno delovanje

Antioksidansi igraju važnu ulogu u prevenciji starenja i raznih bolesti koje se dovode u vezu sa aktivnim kiseonikom i lipidnom peroksidazom, i zbog toga sve više raste interesovanje za izučavanje supstanci koje pokazuju ovu osobinu. Kao poznati i jaki sintetski antioksidansi koristili su se butil-hidroksianizol (BHA) i butil-hidroksitoluen (BHT) za koje se utvrdilo da su potencijalni promoteri karcinogeneze. To je uslovalo da se proučava antioksidativna aktivnost prirodnih supstanci. Upotreba prirodnih antioksidanata u prehrambenoj, kozmetičkoj i terapijskoj industriji predstavlja obećavajuću alternativu u odnosu na sintetske antioksidanse u pogledu ekonomičnosti, visoke kompatibilnosti sa dijetetskim unosom i neškodljivosti po organizme. Poznato je da biljne vrste iz porodice *Lamiaceae* imaju snažnu antioksidativnu aktivnost (Jayasinghe C, 2003). Bosiljak, koji pripada toj familiji, sadrži flavonoide i fenolne kiseline (Grayer RJ, 1996; Loughrin JH, 2001), kao što su cimetna, kafena, sinapinska i ferulična (Loughrin JH, 2001) koje predstavljaju potentne antioksidanse, "hvatače" slobodnih radikala i helatore metala (Cook NC, 1996).

Poslednjih godina, velika pažnja je usmerena ka polju slobodnih radikala i antioksidanata. Oksidacija predstavlja transport elektrona sa jednog atoma na drugi i čini esencijalan deo u našem metabolizmu, pošto je kiseonik krajnji elektron akceptor koji proizvodi energiju u obliku adenozin-trifosfata (ATP). Balans između slobodnih radikala i antioksidanata je neophodan za adekvatnu fiziološku funkciju u organizmu. Poremećaji mogu nastati kada protok elektrona postane raspadnut (transfer nesparenih slobodnih elektrona) generišući slobodne radikale. Slobodni radikali se mogu definisati kao nezavisne molekulske vrste koje sadrže slobodan elektronski par u atomskoj orbitali. Mnogi slobodni radikali su nestabilni i visoko reaktivni. Mogu biti donori ili akceptori elektrona od drugih molekula, odnosno mogu biti oksidaciona ili redukciona sredstva. Najčešće pomenuti radikali su hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), vodonik-peroksid (H_2O_2), singlet kiseonik ($^1\text{O}_2$), hipohloritni anjon (ClO^-), azot-oksidi radikal (NO^{\bullet}) i peroksinitrat radikal (ONOO^{\bullet}). Slobodni radikali napadaju važne makromolekule (lipide, proteine i nukleinske kiseline), što dovodi do oštećenja ćelije i poremećaja homeostaze. Ako u organizmu nastane više slobodnih radikala nego što antioksidansi mogu da neutralizuju, nastaje stanje koje se naziva oksidativni stres. Slobodni radikali mogu nastati endogenim (inflamacija, vežbanje, ishemične

povrede) ili egzogenim putem (dim cigareta, zagađivači iz vazduha, radijacija, pesticidi, industrijski agensi). Oksidativni stres se dovodi u vezu sa mnogim poremećajima i oboljenjima kao što su ateroskleroza, pojedini karcinomi, inflamatorne reakcije (artritis, lupus eritematozis, vaskulitis), proces starenja, ishemija (srčana oboljenja, šlog), emfizem, čir želuca, hipertenzija, neurološki poremećaji i alkoholizam (Lobo V, 2010).

Antioksidansi predstavljaju molekule velike stabilnosti koji mogu da doniraju elektron i neutralizuju slobodne radikale. Oni odlažu ili inhibišu ćelijska oštećenja, smanjuju oksidativni stres, tako što interaguju sa slobodnim radikalima i prekidaju lančanu reakciju pre oštećenja vitalnih molekula. Aktivnost antioksidativne odbrane može da se подели u nekoliko nivoa:

- prva linija odbrane obuhvata preventivne antioksidanse koji suprimuju nastanak slobodnih radikala,
- u drugoj fazi antioksidansi suprimiraju inicijaciju ili uništavaju propagaciju lančane reakcije,
- treća faza predstavlja oporavak i nastanak “de novo” antioksidanata. Oni prepoznaju, uništavaju i uklanjaju oksidativno modifikovane proteine i preveniraju akumulaciju oksidovanih proteina,
- četvrta faza predstavlja adaptaciju, gde signal za produkciju slobodnih radikala indukuje formiranje i transport antioksidanata na adekvatno mesto (Lobo V, 2010).

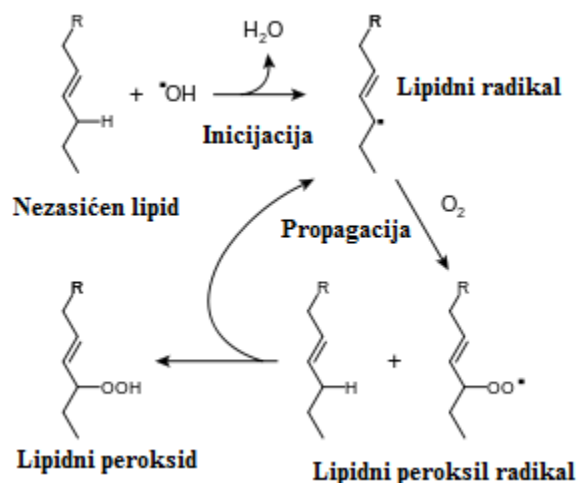
2.4.1.1. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite

Lipidna peroksidacija predstavlja najizraženiji negativan fenomen u delovanju kiseoničnih slobodnih radikala, tokom kojeg dolazi do oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina sadržanih u ćelijskim membranama, i posledično do oštećenja ćelijske membrane. Krajnji proizvod lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), biohemijski marker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana (Ayala A, 2014).

Polinezasićene masne kiseline fosfolipidnog dvosloja ćelijskih membrana predstavljaju glavne ciljne molekule za reaktivne kiseonične vrste. Najreaktivniji slobodni radikal kiseonika, hidroksilni radikal (OH^\cdot), započinje proces lipidne peroksidacije koji se zatim nastavlja nizom lančanih reakcija do formiranja lipidnih hidroperoksida i aldehida. Akumulacija hidroperoksida u ćelijskoj membrani i membrani organela dovodi do promene fluidnosti membrane i tako utiče na

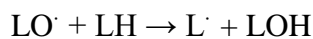
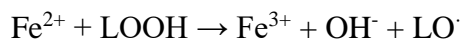
aktivnost transmembranskih enzima, transportera, receptora i drugih membranskih proteina. Krajnji rezultat je promena propustljivosti membrane, što dovodi do narušavanja ćelijskog metabolizma, poremećaja homeostaze, odnosno do ćelijske smrti (Kruidener L, 2002).

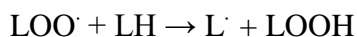
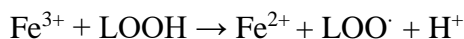
U procesu oksidacije lipida, nezasićene masne kiseline podležu oksidativnom oštećenju, pri čemu su slobodni radikali inicijatori i terminatori procesa lipidne peroksidacije (*slika 2*). Proces lipidne peroksidacije započinje preuzimanjem vodonikovog atoma nezasićene masne kiseline lipida od strane inicijatornog radikala (OH^\cdot), što dovodi do nastanka lipidnog radikala. On u reakciji sa O_2 prelazi u izrazito reaktivan lipidni peroksil radikal, koji zatim preuzima vodonikov atom sa susednog lipida i formira lipidni hidroperoksid. Novonastali lipidni radikal interaguje sa drugim susednim lipidom u lančanoj reakciji, koja naposljetku dovodi do akumulacije oštećenih lipida (Catala A, 2006).



Slika 2. Mehanizam lipidne peroksidacije

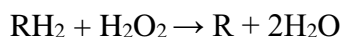
Produkt lipidne peroksidacije, lipidni hidroperoksid, u reakciji sa redukovanim metalima (Fe^{2+}) dovodi do nastanka lipidnog alkoksil radikala (LO^\cdot). On može da stupi u reakciju sa drugim lipidom (LH), pri čemu se formiraju lipidni radikal (L^\cdot) i lipidni aldehyd (LOH). Takođe, lipidni hidroperoksid (LOOH) može da reaguje sa oksidovanim metalima (Fe^{3+}) formirajući lipidni peroksil radikal (LOO^\cdot). Novonastali lipidni radikali iniciraju dodatne lančane reakcije (Fagali N, 2009):



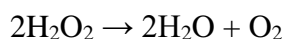


Lipidni hidroperoksidi su nestabilni, razlažu se i formiraju veoma reaktivna jedinjenja, koja su znatno stabilnija od reaktivnih kiseoničnih vrsta i lako difunduju u ćelijski medijum. Najpoznatiji toksični aldehidni produkti lipidne peroksidacije su 4-hidroksi-2-noneal (HNE) i malondialdehid (MDA), koji se koriste kao biomarkeri lipidne peroksidacije (Valko M, 2007; Buonocore G, 2010).

Katalaza (CAT) je jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu. Osnovna uloga ovog antioksidativnog enzima je razlaganje neradikalskog vodonik-peroksida do vode, čime se sprečava njegova difuzija u druge delove ćelije. Zbog svoje široke distribucije, evolutivne očuvanosti i brze aktivnosti, katalaza ima važnu ulogu u sistemima koji su se razvili u aerobnoj sredini. Katalaza je homotetramer i svaka subjedinica sadrži hem grupu u aktivnom centru (Fe^{3+} vezano za porfirin) enzima (Scandalios JG, 2005). Takođe, svaka subjedinica ima za sebe vezan jedan molekul NADPH (Halliwell B, 1999). Pri niskim koncentracijama vodonik-peroksida ($<1\mu\text{m}$), katalaza pokazuje "peroksidaznu" reakciju i redukuje ga koristeći različite donore vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina):



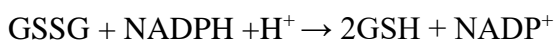
Pri visokim koncentracijama supstrata ($>1\mu\text{m}$), katalaza brzo uklanja vodonik-peroksid kroz "katalaznu" reakciju, gde je on i donor i akceptor vodonika:



Ovaj proces je energetski veoma efikasan, jer se u "katalaznoj" reakciji ne koriste redukujući ekvivalenti. To je značajno kada je povećana energetska potreba ćelije, odnosno kada je povećan intenzitet kataboličkih procesa i respiracije. Na taj način formira se veća količina vodonik-peroksida, koji uspešno uklanja katalaza na energetski povoljan način (Scandalios JG, 2005). Katalaza ne može da bude saturisana svojim supstratom vodonik-peroksida bez obzira na njegovu koncentraciju, tako da njena enzimaska aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije H_2O_2 (Kruidener L, 2002).

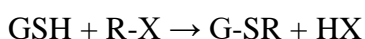
U eukariotskim ćelijama katalaza se predominantno nalazi u peroksizomima, a prisutna je i u citosolu i u mitohondrijama (Scandalios JG, 2005). Mnogi peroksizomalni enzimi, uključujući i enzimski sistem za β -oksidaciju masnih kiselina, dovode do stvaranja velike količine vodonik-peroksida. Zbog toga je uloga katalaze u ovim organelama od presudnog značaja za zaštitu ćelije od oksidativnih oštećenja (Fidaleo M, 2010). Humani gen za katalazu se nalazi na hromozomu 11, a najveći nivo katalazne aktivnosti kod sisara je prisutan u jetri (Ilyukha VA, 2001). Neki od inhibitora katalaze su azid, cijanid, peroksinitrit i aminotriazol (Halliwell B, 1999).

Glutation reduktaza (GR) je detektovana kod svih organizama. Prisutna je u prokariotskim ćelijama i u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija (Ondarza RN, 1983). Ovaj antioksidativni enzim katalizuje reakciju koja je esencijalna za stabilnost i integritet ćelije, jer prevodi oksidovani glutation (GSSG) u redukovani glutation (GSH), pri čemu se kao redukujući ekvivalent koristi NADPH, poreklom iz pentozofosfatnog ciklusa:



Enzim GR je homodimerni flavoprotein koji u aktivnom centru ima redoks aktivnu disulfidnu vezu. Svaka subjedinica ima molekulsku masu od oko 55 kDa i sadrži prostetičnu grupu FAD. Dimerna priroda enzima je neophodna za njegovu funkciju, jer obe subjedinice učestvuju u formiranju aktivnog centra enzima. Kod nekih organizama pronađeni su i tetrameri, pa i veće forme enzima. Katalitički ciklus glutation reduktaze ima dve faze, prvo NADPH redukuje FAD, pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivnu disulfidnu vezu, a zatim dolazi do redukcije GSSG u aktivnom centru enzima (Ulus NN, 2007).

Glutation-S-transferaza (GST) predstavlja multigensku familiju proteina čija je osnovna uloga detoksifikacija velikog broja jedinjenja: ksenobiotika, toksina, kancerogena i dr. GST su prisutne u svim živim organizmima. Eukarioti imaju veći broj citosolnih i membranski vezanih (mitohondrije i endoplazmatični retikulum) GST izoenzima sa različitim specifičnostima za supstrat (Hayes JD, 1995). Osnovna reakcija koju GST katalizuje je konjugacija GSH sa elektrofilnim supstratima:

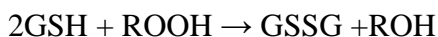
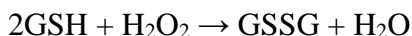


Citosolni enzimi GST su dimeri čije subjedinice kodiraju članovi neke od genskih familija. Subjedinice mogu biti iste (homodimeri) ili različite (heterodimeri) pri čemu su uvek kodirane

genima iz iste genske familije. Identifikovano je 14 klasa izoenzima GST: alfa, kapa, mi, pi, omega, sigma, teta i zeta, koje su pronađene kod sisara i beta, delta, epsilon, lambda, fi i tau, koje su pronađene kod biljaka, bakterija, invertebrata, riba, vodozemaca i ptica (Hayes JD, 1995; Konishi T, 2005).

Mehanizam detoksifikacije uključuje reakciju konjugacije GSH sa hidrofobnim elektrofilnim ksenobioticima, ali i endogenim elektrofilima (produkti nastali dejstvom reaktivne vrste kiseonika na biomolekule u uslovima oksidativnog stresa) koju katalizuje GST. Konjugati GSH se acetiluju do odgovarajuće merkapturne kiseline, koja se ekskretuje ili podleže daljem metabolizmu (Wang W, 1998). Osim detoksifikacije, GST ima još i transportnu i sintetičku funkciju. Nekovalentnim vezivanjem jedinjenja, kao što su steroidi, hormoni i lekovi, omogućen je transport i olakšana eliminacija ovih supstanci iz organizma. GST učestvuje i u sintezi leukotriene i prostaglandina. Pojedine forme GST pokazuju peroksidaznu aktivnost jer katališu redukciju organskih hidroperoksida do odgovarajućih alkohola, a poznata je i izomerazna aktivnost (Hayes JD, 1995).

Glutation peroksidaza (GPx) predstavlja bitan enzim sistema zaštite od oksidativnih oštećenja. Kod eukariotskih organizama nalazi se u različitim ćelijskim kompartmanima, kao što su citosol, mitohondrije, peroksizomi, a prisutna je u gotovo svim ćelijama. Katalizuje redukciju vodonik-peroksida do vode i organskih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH), kuplovanjem ovih reakcija sa oksidacijom glutaciona (GSH):



Glutation peroksidaza ima veći afinitet za vodonik-peroksid u odnosu na katalazu, tako da ima važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama vodonik-peroksida, dok je katalaza značajniji enzim u uslovima izrazitog oksidativnog stresa (Kruidener L, 2002).

Opisane su tri forme ovog enzima:

- selen-zavisna glutacion peroksidaza (Se GPx) – je homotetramer i sadrži selen u obliku selenocisteina u svakoj subjedinici,
- selen-nezavisna glutacion peroksidaza (non-Se GPx) – je monomer i ima manji afinitet za vodonik-peroksid, a efikasno redukuje organske perokside i zahteva visoku koncentraciju glutaciona,

- fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza (PH GPx) – je monomer, selenoenzim, koji redukuje vodonik-peroksid, fosfolipidne hidroperoksidge i peroksidge holesterola. To je jedini enzim koji redukuje membranske fosfolipidne hidroperoksidge, prekida proces lipidne peroksidacije i tako ima ključnu ulogu u sistemu zaštite od reaktivne vrste kiseonika (Andreyev AY, 2005),
Identifikovano je pet izoformi GPx kod sisara, koje imaju različitu tkivnu distribuciju:
- klasična GPx (cGPx, GPx 1) – je prvi identifikovani selenoprotein i nalazi se na hromozomu 3 kod čoveka. Ova izoforma je homotetramer i prisutna je u citosolu svih ćelija. Redukuje vodonik-peroksid i lipidne hidroperoksidge, a ima ulogu i u skladištenju i transportu selena,
- gastrointestinalna GPx (GPx 2) – obezbeđuje zaštitu od toksičnosti lipidnih hidroperoksidge koji su uneti hranom. Ova izoforma je najvažniji selenoproteinski antioksidans u debelom crevu i omogućava rani odbrambeni odgovor u borbi protiv kancera debelog creva,
- ekstracelularna GPx (GPx 3) – je selenoprotein detektovan u plazmi i bubrezima i ima ulogu u antioksidativnom odbrambenom sistemu ekstracelularnog kompartmana (Brown KM, 2001),
- fosfolipid hidroperoksid GPx (PH GPx, GPx 4) – je monomer koji ima bitnu funkciju u reduktivnoj destrukciji lipidnih hidroperoksidge, malih rastvorljivih hidroperoksidge, hidroperoksidge holesterola i holesterolskih estara. Nivo enzima GPx 4 je nizak u jetri, plućima i bubrezima, a visok u testisima gde učestvuje u sazrevanju spermatozoida. Za razliku od ostalih formi GPx, ova izoforma pokazuje nizak nivo reakcije sa glutationom (Maiorino M, 1998),
- GPx 5 – je selen nezavisna GPx i detektovana je u epididimisu kod velikog broja sisara (Chabory E, 2009).

2.4.2. Hipoglikemijski efekat

Dijabetes melitus predstavlja stanje hronične hiperglikemije (ali i poremećaj metabolizma lipida i proteina), koje nastaje kao posledica apsolutnog ili relativnog nedostatka insulina (Stošić, 2012), a koje karakteriše povećan nivo glukoze u krvi (u gladovanju > 7 mmol/l ili >11,1 mmol/l dva sata nakon obroka). Ovo oboljenje zahteva kontinuiranu medicinsku negu, edukaciju pacijenta i podršku za prevenciju komplikacija. Hiperglikemija nastaje zbog nekontrolisanog oslobađanja

glukoze iz jetre i smanjenog ulaska glukoze u ćelije, što prouzrokuje smanjenu sintezu glikogena. Zbog velike količine glukoze u krvi, prevazilazi se kapacitet tubula za resorpciju glukoze, dolazi do pojave glikozurije i poliurije, a time i do dehidracije, žeđi i povećanog unosa tečnosti. U praksi se razlikuju četiri vrste dijabetesa:

- dijabetes tip I (uzrokovan destrukcijom β -ćelija i obično potpunim deficitom insulina),
- dijabetes tip II (uzrokovan smanjenom sekrecijom insulina i udružen sa rezistencijom na insulin),
- gestacijski dijabetes (javlja se u trudnoći, najčešće se sam i povlači),
- sekundarni dijabetes (može biti uzrokovan dugotrajnom upotrebom lekova ili oštećenjem funkcije β -ćelija).

Ovo oboljenje spada u najčešće endokrinološke bolesti, čija je prevalenca u stalnom porastu. Ukupan broj obolelih od dijabetesa u 2000. godini je iznosio 171 milion ljudi (2,8% populacije), a procenjuje se da će prevalenca ove bolesti na globalnom nivou u 2030. iznositi 4,4% (Wild S, 2004). Poslednjih godina se uočava novi problem koji je u uzročno-posledičnoj vezi sa nastankom dijabetesa - gojaznost. Tip II dijabetes melitusa čini preko 90% od ukupnog broja obolelih od dijabetesa, a udružen je sa prekomernom telesnom masom, abdominalnim tipom gojaznosti i fizičkom neaktivnošću. Do skora, ovaj tip dijabetesa se viđao samo kod odraslih osoba, a danas je prisutan i kod dece i kod adolescenata (Federation of European Nurses in Diabetes; American Diabetes Association). Idealni antidijabetik bi bila supstanca koja bi pored regulacije nivoa glukoze u krvi sprečila razvoj ateroskleroze, dislipidemije, dijabetesne neuropatije i drugih komplikacija dijabetesa (Trivedi NA, 2004). Savremena terapija ove bolesti postiže zadovoljavajuću kontrolu glikemije, ali njena efikasnost posle određenog vremenskog perioda postaje sve manja (Wagman AS, 2001). Promene u načinu života, a prevashodno u ishrani – koja bi mogla da sadrži više funkcionalne hrane, odnosno pomoćnih lekovitih supstanci – mogu značajno da smanje rizik od nastanka dijabetesa, da ga odlože ili da umanje težinu komplikacija (Perera PK, 2011). Zbog toga alternativni načini za kontrolu glikemije i prevenciju komplikacija dijabetesa predstavljaju predmet najnovijih ispitivanja vezanih za unapređenje farmakoterapije dijabetesa. Bosiljak se u indijskoj tradicionalnoj medicini koristi kao dodatna terapija kod stresa, astme i dijabetesa. Brojna istraživanja su pokazala da uticaj ekstrakta bosiljka na nivo glukoze u krvi obuhvata hipoglikemijsko i antihiperглиkemijsko delovanje (El-Beshbishy HA, 2012; Zeggwagh NA, 2007). Vodeni ekstrakt bosiljka, svoje antihiperглиkemijsko delovanje ispoljava

inhibicijom aktivnosti α -amilaze i α -glukozidaze, zbog čega se usporava resorpcija glukoze iz intestinalnog trakta i sprečava nastanak postprandijalne hiperglikemije. Ovi enzimi su zaslužni za finalni korak metabolizma ugljenih hidrata u kome se oligosaharidi prevode do monosaharida pre apsorpcije (El-Beshbishy HA, 2012). Na ćelijama masnog tkiva bosiljak ispoljava delovanje slično insulinu, tj. povećava preuzimanje glukoze iz krvi u adipocite. Na taj način, preparati bosiljka pokazuju sličnost u mehanizmu antihiperglikemijskog efekta kao i derivati bigvanida i tiazolidindiona (Broadhurst CL, 2000). Hipoglikemijsko i antihiperglikemijsko dejstvo vodenih ekstrakata bosiljka može se pripisati visokom sadržaju ukupnih fenola i flavonoida. Poznato je da fenolna jedinjenja interaguju sa proteinima i mogu inhibirati aktivnost enzima uključujući i dejstvo α -amilaze i α -glukozidaze. Poznato je da flavonoidi, kao jaki antioksidansi, mogu prevenirati progresivno oštećenje funkcije pankreasnih β -ćelija, nastalo u oksidativnom stresu i na taj način redukovati pojavu dijabetesa tipa II, kao i omogućiti zaštitu od razvoja komplikacija (El-Beshbishy HA, 2012).

Ispitivanjem uticaja ekstrakata bosiljka na glikoregulaciju upotpunila bi se saznanja o korisnim osobinama ove biljke i mogućoj primeni bosiljka kao pomoćnog lekovitog preparata kod pacijenata obolelih od dijabetesa.

2.4.3. Hipolipidemijski efekat

U današnje vreme hiperlipidemije predstavljaju glavni faktor rizika za nastanak ateroskleroza, a samim tim i niz kardiovaskularnih oboljenja (KVO), koje predstavljaju veoma čest uzrok mortaliteta. Dokazano je da postoji povezanost između visokog nivoa lipidnih čestica male gustine (low density lipoprotein – LDL) i povećane incidence za nastanak KVO i da njihovo povećanje implicira razvoj i progresiju ateroskleroze, dok visok nivo lipidnih čestica velike gustine (high density lipoprotein – HDL) predstavlja anti-aterogeni faktor. Takođe treba istaći da visok nivo triglicerida predstavlja značajan faktor rizika za nastanak KVO, pogotovo kod osoba sa dijabetesom. Medikamentozna terapija dislipidemije obuhvata sniženje ukupnog nivoa holesterola (Rang HP, 2005). U mnogim radovima (Harnafi H, 2013; Bravo E, 2008; Amrani S, 2006) dokazana je hipolipidemična aktivnost ekstrakta bosiljka bogatog fenolnim kiselinama. Metaboličke aktivnosti koje su do sada ispitane, ogledaju se u sniženju nivoa glukoze u krvi i sniženju LDL holesterola i triglicerida, kao i u značajnoj antioksidativnoj aktivnosti (Bravo E, 2008; Vidović SS, 2012; Arfa MM, 2008). Redukcija ukupnog holesterola je povezana sa

snižanjem LDL frakcije, što predstavlja cilj mnogih strategija u lečenju hiperlipidemije. Ovo saznanje dovodi do mogućnosti da ekstrakt ove biljne vrste redukuje aktivnost hepatičnih LDL receptora. Ova hipoteza je potvrđena biohemijskom analizom lipidnog statusa jetre. Fenolne komponente poseduju holesterol-supresivnu aktivnost, koja je udružena sa sniženjem hepatičkog nivoa holesterola, što dovodi do ublažavanja uznapredovalog razvoja ateroskleroze hiperholesterolemijske etiologije. Primena ekstrakta bogatog fenolnim kiselinama, uz hipolipidemijski režim ishrane, dovodi do značajne redukcije povišenog nivoa triglicerida. Ovo ukazuje da ekstrakt bosiljka dovodi do katabolizma lipidne frakcije (Harnafi H, 2013). Polarne frakcije ovog ekstrakta značajno snižavaju povišen nivo triglicerida u krvi. Pored toga, pojedini ekstrakti pokazuju protektivnu aktivnost, povećavajući nivo HDL čestica (Harnafi H, 2008). Potencijalni mehanizmi koji stoje iza hipolipidemijskog delovanja i odnose se na fenolne komponente su:

- sniženje aktivnosti hepatičkog LDL receptora (Bursill CA, 2007),
- redukcija sinteze holesterola preko supresije hidrosimetil glutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze (Jung UJ, 2006),
- inhibicija glavnog enzima koji je uključen u metabolizam holesterola: acetil CoA holesterol acil transferaza (ACAT) (Lee JH, 2006),
- povećanje lecitin holesteril aciltransferaze (LCAT),
- inhibicija hepatičke lipaze triglicerida (HTL) na HDL, što vodi ubrzanju katabolizma lipida kroz ekstrahepatička tkiva (Anila L, 2002).

2.4.4. Ostale farmakološke uloge

Antiseptičko delovanje. Etarska ulja kao što su estragol, linalol, lineol i kamfor imaju antiseptičku moć i služe kao konzervansi jer sprečavaju razvoj mikroorganizama.

Antibakterijsko delovanje. U laboratorijskoj studiji ustanovljena je potencijalna antibakterijska aktivnost bosiljka protiv oblika *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* i *Clostridium perferingens*. Esencijalno ulje bosiljka takođe pokazuje antimikrobnu aktivnost prema sojevima *Staphylococcus*, *Enterococcus* i *Pseudomonas*. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je 0,003-0,007% (v/v).

Antivirusno delovanje. Nekoliko studija je rađeno radi utvrđivanja potencijalnog antivirusnog dejstva. Jedna *in vitro* studija je pokazala da bosiljak pokazuje značajnu inhibitornu

aktivnost protiv HIV-1 virusa. Dokazano je da su supstance koje poseduju ovu aktivnost hidrofilne polarne supstance, a ne nepolarne kao što je esencijalno ulje. U drugoj studiji nađeno je da apigenin inhibira dejstvo protiv herpes virusa, adenovirusa i hepatitisa B.

Citoprotektivno delovanje. Rozmarinska kiselina, prirodna fenolna kiselina koja je prisutna u bosiljku, inhibiše inflamatorne procese. Zasnvano na *in vitro* studiji, dokazano je da rozmarinska kiselina može da redukuje produkciju slobodnih radikala, inhibiciju DNK i protein sintetaze i apoptozu uzrokovanu mikotoksinima.

Dermatološko delovanje. Utvrđeno je i potencijalno delovanje protiv akni (*acne vulgaris*), mada mehanizam delovanja nije potpuno razjašnjen.

Insekticidno delovanje. Komarac (*Culex pipiens*) je najčešći insekt gradskih i prigradskih naselja. Dokazano je da bosiljak predstavlja sredstvo za zaštitu od ovih štetočina (Ismail M, 2006).

2.5. Hemijski sastav

2.5.1. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja predstavljaju grupu najznačajnijih fitokomponentata koja poseduju antioksidativnu aktivnost. Obuhvataju preko 8000 jedinjenja, široko su rasprostranjena u biljnom svetu i karakteriše ih posedovanje najmanje jednog aromatičnog prstena sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Nastaju kao sekundarni metaboliti preko šikimske kiseline (Cartea M, 2011). Fenoli obuhvataju proste molekule, molekule male molekulske mase, prosta aromatična jedinjenja, velike molekule, komplekse (tanine) i derivate polifenola (*tabela 2*) (Balasundram N, 2006).

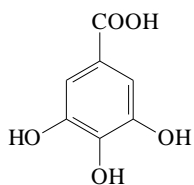
Tabela 2. Klase i strukture fenolnih jedinjenja

Klasa fenolnih jedinjenja	Struktura
Derivati prostih fenola, benzohinoni	C ₆
Derivati hidroksibenzoeve kiseline	C ₆ -C ₁
Acetofenoni, derivati fenilsirćetne kiseline	C ₆ -C ₂
Derivati cimetine kiseline, fenilpropanoidi	C ₆ -C ₃
Naptohinoni	C ₆ -C ₄
Ksantoni	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stilbeni, antrahinoni	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoidi, izoflavonoidi	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignani, neolignani	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoidi	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Lignini	(C ₆ -C ₃) _n
Tanini	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

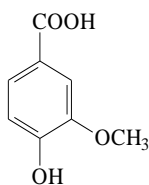
Fenolna jedinjenja imaju višestruku ulogu u biljkama: oprašivanje, zaštita od insekata, gljiva, virusa i bakterija, a takođe učestvuju u regulaciji biljnih hormona. Poslednjih godina velika pažnja je usmerena ka fenolnim fitokomponentama kao potencijalnim promoterima zdravlja. Dokazano je da fenolna jedinjenja inhibiraju enzime, pokazuju antiinflamatorno, antimikrobno, antialergijsko, kardioprotektivno i antikancerogeno delovanje, ali je njihova najvažnija uloga antioksidativno delovanje. Antioksidativna aktivnost fenola je povezana sa njihovom hemijskom strukturom koja poseduje redoks karakteristike. Igraju bitnu ulogu u apsorbovanju i neutralizaciji slobodnih radikala, što omogućava zaštitu od infekcija (Cartea M, 2011). Najviše proučavana i najvažnija fenolna jedinjenja su fenolne kiseline i flavonoidi.

Fenolne kiseline. Pojam fenolne kiseline obuhvata sva jedinjenja koja sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu grupu (Kovačević N, 2002). Antioksidativna uloga je povezana sa brojem i pozicijom hidroksilnih grupa u molekulima: sa povećanjem broja hidroksilnih grupa povećava se i antioksidativna aktivnost. Jedinjenja sa tri hidroksilne grupe na benzenovom prstenu predstavljaju najjače antioksidanse. Gubitak jedne hidroksilne grupe umereno smanjuje antioksidativnu aktivnost, dok je gubitak dve hidroksilne grupe značajno smanjuje (Cartea M, 2011). Derivati cimetine kiseline pokazuju jače antioksidativno delovanje u

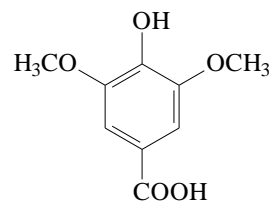
poređenju sa derivatima hidroksibenzoeve kiseline. To se može objasniti $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ grupom, koja omogućava bolju donaciju vodonikovog atoma, zbog stabilizacije karboksilne grupe rezonancom (Balasundram N, 2006). Najvažnija jedinjenja fenolnih kiselina su derivati hidroksibenzoeve i cimetne kiseline (*slike 3 i 4*).



galna kiselina

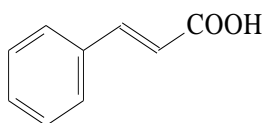


vanilinska kiselina

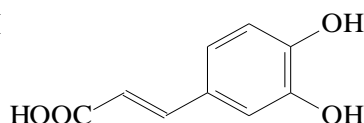


siringinska kiselina

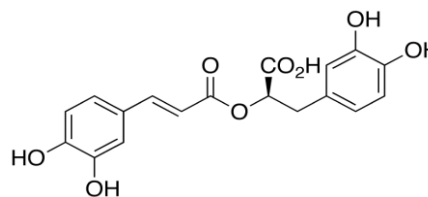
Slika 3. Predstavnici derivata hidroksibenzoeve kiseline



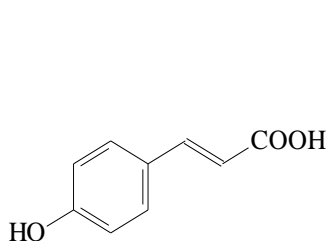
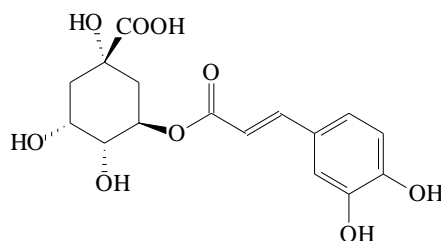
cimetna kiselina



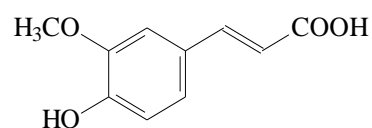
kafena kiselina



rozmarinska kiselina

*p*-kumarinska kiselina

hlorogenska kiselina



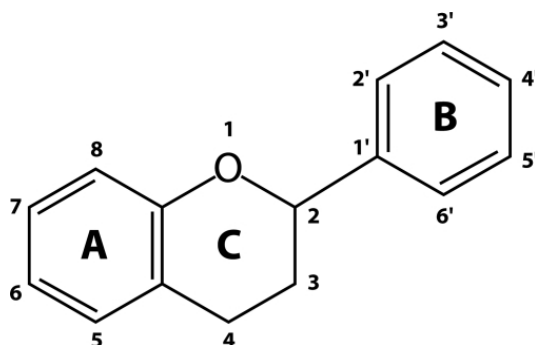
ferulična kiselina

Slika 4. Predstavnici derivata cimetne kiseline

Hlorogenska kiselina. Hlorogenska kiselina je poznata kao snažna antioksidativna supstanca, koja igra važnu protektivnu ulogu u patofiziološkim promenama u organizmu, a koje uključuju kardiovaskularna, neurološka i maligna oboljenja. Takođe može da poboljša toleranciju glukoze, kao i da smanji telesnu težinu. S obzirom na sve veću težnju za pronalaženje prirodnih preparata za lečenje različitih oboljenja, ova kiselina se nalazi u žiži interesovanja mnogih istraživača (Forino M, 2015). Predstavlja fenolno jedinjenje, a glavne klase hlorogenske kiseline koje se nalaze u prirodi su kafeoilhina kiselina (CQA), dikafeoilhina kiselina (diCQA) i ređe,

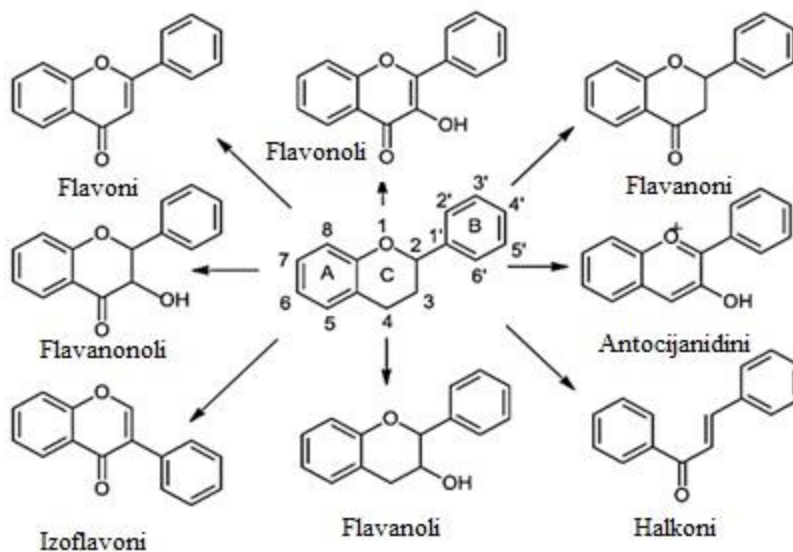
feruolhina kiselina (FQA). Svaka klasa ima najmanje tri izomera (Marques V, 2009). Strukturno, CQA je estar kafene i hine kiseline (Clifford MN, 2003), a ima tri izomera (3-CQA, 4-CQA i 5-CQA) koji nastaju izomerizacijom u hinoj kiselini na položajima 3, 4 i 5 (Clifford MN, 1999). Dikafeoilhina kiselina je diestar kafene i hine kiseline. U poslednjih nekoliko godina nizom studija dokazana je veza između hlorogenske kiseline i smanjenja rizika od kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa tipa II i Alchajmerove bolesti (Farah A, 2008).

Flavonoidi. Flavonoidi predstavljaju veliku grupu sekundarnih metabolita male molekulske mase koja obuhvata preko 10000 struktura (Agati, 2012). Flavonoidi se u biljkama formiraju iz malonata i aromatičnih aminokiseline fenilalanina i tirozina. Osnovna struktura čini flavansko jezgro koje se sastoji od 15 ugljenikovih atoma povezanih u tri prstena ($C_6-C_3-C_6$), koji su označeni sa A, B i C (*slika 5*).

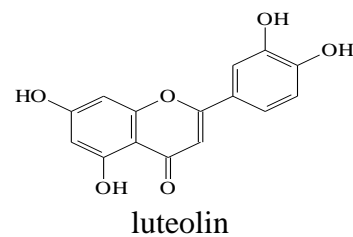
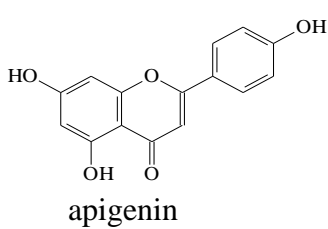
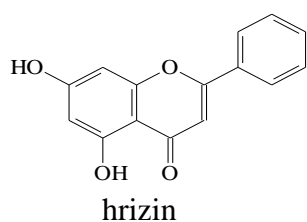


Slika 5. Osnovna struktura flavonoida

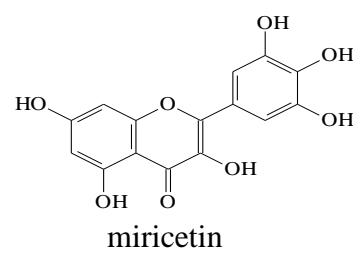
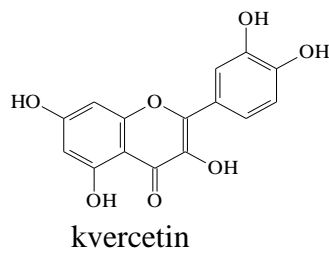
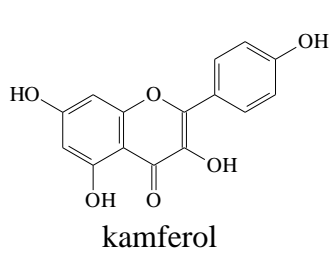
U zavisnosti od supstituenata na prstenu A, B i C razlikuje se nekoliko klasa flavonoida, od kojih su najinteresantniji i najznačajniji flavoni, flavonoli, flavanoni, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanonoli i antocijani. Ostale klase flavonoida uključuju biflavone, halkone, aurone i kumarine (Pietta PG, 2000) (*slike 6 i 7*).



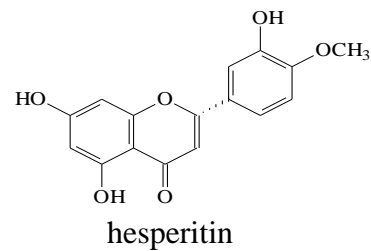
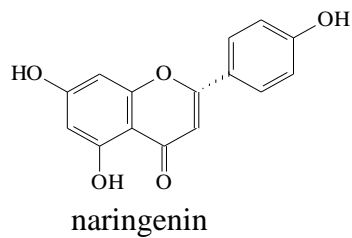
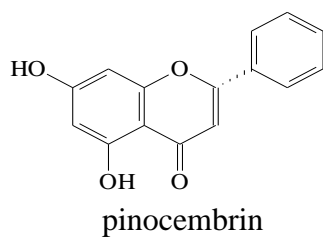
Slika 6. Vrste flavonoida



a)



b)



c)

Slika 7. Najznačajniji predstavnici: a) flavona; b) flavonola i c) flavanona

Reč flavonoidi potiče od latinske reči “flavus” što znači žuto, pa su oni “odgovorni” za nijanse narandžaste, plave i ljubičasto-crvene boje lišća, cvetova i plodova. Pored voća i povrća flavonoidi su prisutni i u semenima, kori, lišću, cvetovima orašica, žitaricama, začinima, a takođe i u napicima kao što su crno vino i čajevi. Flavonoidi imaju različitu ulogu u ekologiji biljaka. Zbog svojih atraktivnih boja, omogućavaju oprašivanje i štite od ultravioletnog (UV) zračenja, a zbog svog adstrigentnog delovanja imaju odbrambenu ulogu protiv patogena i herbivora. Flavonoidi deluju kao katalizatori u fotosintezi i regulišu prolaz gvožđa uključenog u fosforilaciju (Prochazkova D, 2011). Takođe predstavljaju zaštitu od stresa jer “hvataju” slobodne radikale nastale u elektron-transportnom sistemu (Agati G, 2012).

Pored velike važnosti za biljke flavonoidi igraju značajnu ulogu i u ishrani čoveka, pogotovo jer se ne smatraju nutritijentima (Pietta PG, 2000). Epidemiološke studije su pokazale da je povećan unos flavonoida povezan sa smanjenjem rizika od hroničnih bolesti, uključujući karcinome i kardiovaskularne bolesti. Takođe, unos flavonoida deluje antioksidativno, antiinflamatorno, antiviralno, antibakterijsko, vazodilatatorno, antikancerogeno i antiishemično (Prochazkova D, 2011).

Antioksidativno dejstvo mnogih flavonoida jače je nego dejstvo vitamina C i E. Flavonoidi mogu da preveniraju oštećenja na sledeće načine:

- direktnim “hvatanjem” slobodnih radikala,
- aktivacijom antioksidativnih enzima,
- heliranjem metala,
- redukovanjem α -tokoferil radikala,
- inhibicijom oksidaza,
- ublažavanjem oksidativnog stresa uzrokovanog azot(II)-oksidom,
- povećanjem nivoa mokraćne kiseline.

Flavonoidi imaju sposobnost direktnog “hvatanja” slobodnih radikala kao donori atoma vodonika. *In vitro* antioksidativna aktivnost flavonoida zavisi od rasporeda funkcionalnih grupa. Hidroksilne grupe u prstenu B su odgovorne za “hvatanje” slobodnih radikala, dok supstituenti na A i C prstenu utiču na “hvatanje” superoksid anjon radikala. Antioksidativna aktivnost može se povećati polimerizacijom monomernih flavonoida. Glavne strukturne karakteristike flavonoida koje su zaslužne za “hvatanje” slobodnih radikala, mogu se sumirati u nekoliko stavki:

- orto-dihidroksi struktura u prstenu B,

- dvostruka veza u položaju 2,3 koja je konjugovana sa 4-okso funkcionalnom grupom u prstenu C, što omogućava delokalizaciju elektrona u B prstenu,
- hidroksilna grupa u položaju 3 i 5 koja omogućava stvaranje vodoničnih veza sa okso grupom.

Flavonoidi mogu da indukuju fazu II detoksikacije enzima, koja predstavlja glavnu odbranu protiv elektrofilnih toksikanata i oksidativnog stresa.

Određeni flavonoidi mogu da heliraju gvožđe i bakar, otklanjajući na taj način kauzalni faktor za razvoj slobodnih radikala. Kvercetin poseduje sposobnost da prevenira oksidativno oštećenje uzrokovano različitim oksidujućim agensima (akrolein, fenilhidrazin), u membranama eritrocita, što omogućava oslobađanje gvožđa u njegovoj slobodnoj redoks formi.

α -tokoferol predstavlja jedan od glavnih antioksidanata u ćelijskim membranama i lipoproteinima male gustine (LDL) koje štite lipoproteinske partikule od oksidativnog stresa. Grupa naučnika je dokazala da flavonoidi mogu biti donori vodonika α -tokoferil radikalima i da na taj način deluju kao prooksidanti. Tako se obezbeđuje odlaganje oksidacije LDL čestica.

Flavonoidi mogu inaktivisati enzime odgovorne za produkciju superoksida, kao što su ksantin oksidaza i protein kinaza. Kvercetin i silibin inhibišu aktivnost ksantin oksidaze što rezultira smanjenjem oksidativnog stresa.

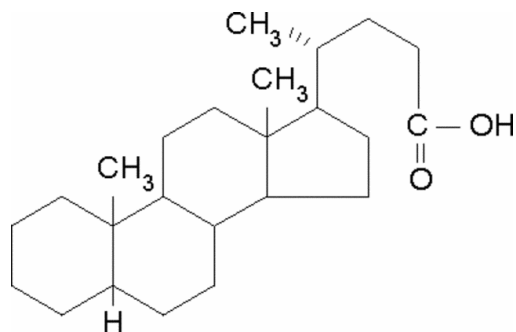
Azot(II)-oksid (NO) nastaje posredstvom azot(II)-oksid sintetaze (NOS) i igra važnu ulogu u održavanju dilatacije krvnih sudova, ali njegove visoke koncentracije mogu uzrokovati oksidativno oštećenje. Flavonoidi mogu da inhibišu NOS i na taj način spreče oštećenja.

Postoji povezanost da nakon konzumacije nutritivno bogatih flavonoidima dolazi do povećanja koncentracije mokraćne kiseline koja predstavlja glavni pokazatelj totalnog antioksidativnog kapaciteta u plazmi. Time je utvrđeno da flavonoidi i na ovaj način učestvuju u antioksidativnim procesima (Prochazkova D, 2011).

2.6. Žučne kiseline

Žučne kiseline čine veliku familiju steroidnih jedinjenja. Nastaju u jetri iz holesterola i pored njihove dobro poznate funkcije u varenju masti, igraju važnu ulogu i u nekoliko drugih procesa, kao što su olakšavanje apsorpcije kalcijuma, kontrolisanje sekrecije pankreasnog enzima, oslobađanje holecistokinina i antimikrobna prevencija u tankom crevu. U jetri se najpre sintetišu

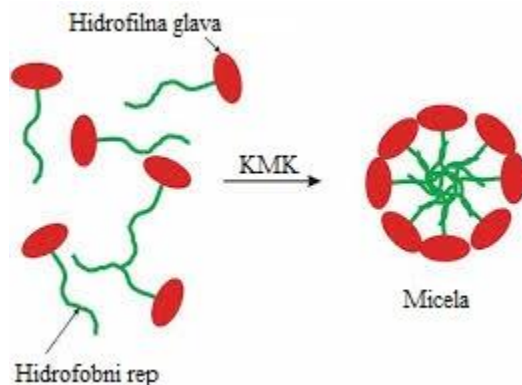
primarne žučne kiseline, holna i henodeoksiholna, a potom delovanjem crevnih bakterija nastaju deoksiholna i litholna kiselina. Nastale žučne kiseline se najčešće vezuju sa glicinom i taurinom, i kao takve učestvuju u metabolizmu masti. Žučne kiseline imaju steroidnu strukturu sa 24 ugljenikova atoma (“primitivne” žučne kiseline su imale 25-27 C atoma), raspoređena u 4 prstena (ciklopentanoperhidrofenatren) i bočni niz. Sa nekoliko hidroksilnih grupa na A, B i C prstenovima obično u položajima C₃, C₆, C₇, C₁₂ i C₂₃, češće α nego β orijentisane, predstavljaju derivate holanske kiseline. A i B prstenovi češće predstavljaju *cis* izomere (5 β -serija), nego *trans* izomere (5 α -serija). Odnos prstenova B i C, kao i C i D nalazi se u *trans* orijentaciji. Cikloheksanski prstenovi se češće javljaju u svojoj stabilnijoj konformaciji stolice, nego u manje stabilnoj konformaciji kade (Kuhajda K, 2006; Monte MJ, 2009). Primer strukture žučne kiseline prikazan je na *slici 8*.



Slika 8. Struktura 5 β -holanske kiseline

Tokom poslednje decenije interesovanje za žučne kiseline je značajno poraslo, a razlog tome je široka uloga u mnogim fiziološkim procesima (Monte MJ, 2009). Njihova jedinstvena struktura, kao i fizičko-hemijske osobine omogućavaju da se primenjuju kao nosači aktivnih principa čime bi se moglo poboljšati, kontrolisati i lokalizovati dejstvo leka (Stojančević M, 2013). Žučne kiseline imaju specifičnu hemijsku strukturu koja se razlikuje od običnih alifatičnih surfaktanata, jer poseduju veliko, rigidno i hidrofobno steroidno jezgro sa 2-4 hidroksilne grupe. Zbog ovakve strukture, ova jedinjenja su hidrofilna sa konkavne α strane, a hidrofobna sa konveksne β strane, te se mogu udruživati i obrazovati micelle (*slika 9*) (Mikov M, 2007). Ovakvo udruživanje je moguće ukoliko koncentracija žučnih kiselina dostigne odgovarajuću vrednost, koja se naziva kritična micelarna koncentracija (KMK). KMK za žučne kiseline se teško može precizno odrediti, što predstavlja jedan od razloga zašto se u literaturi nalaze različite vrednosti (Poša M,

2009a). Svaka micela sadrži 4-50 molekula, u zavisnosti od tipa i strukture žučnih kiselina (Darkoh C, 2010).



Slika 9. Obrazovanje micela

Zbog svog ambifilnog karaktera, žučne kiseline mogu da interaguju sa biološkim membranama, te da narušavaju njihovu funkciju. Već u malim koncentracijama mogu da povećavaju permeabilnost membrane, zbog membranoličkog delovanja i samim tim poboljšavaju apsorpciju (Garidel P, 2007). Ovi molekuli predstavljaju najdetaljnije istraženu klasu jedinjenja koja poboljšava apsorpciju (Stojančević M, 2013). Uticaj žučnih kiselina na apsorpciju lekova je kompleksan i zavisi od fizičko-hemijskih osobina leka, kao i od interakcija micela sa fiziološkim okruženjem (Meaney CM, 2000). Potencijalni mehanizam promotornog delovanja žučnih kiselina na paracelularnu i transcelularnu apsorpciju hidrofilnih lekova može se opisati inkorporacijom žučnih kiselina u ćelijske membrane, gde se formiraju obrnute micide koje sadrže molekule vode i na taj način obrazuju hidrofilne pore u membranama (Poša M, 2007). Takođe, žučne soli smanjenjem površinskog napona biomembrana potenciraju prolaz lekova. (Mikov M, 2007). Osnovni mehanizam za poboljšanje transcelularne apsorpcije uključuje povećanje rastvorljivosti. Rastvaranje lipofilnih lekova u mešovitim micelama žučnih soli može olakšati difuziju kroz vodeni sloj i tako poboljšati apsorpciju. Micide povećavaju propustljivost mukozne membrane prevazilazeći otpor u vodenom difuzionom sloju (Mikov M, 2007). Solubilizacija pomoću žučnih kiselina smanjuje veličinu čestica leka i omogućava lakši prolaz kroz ćelije (Darkoh C, 2010).

2.6.1. Žučne kiseline kao glikoregulatorni agensi

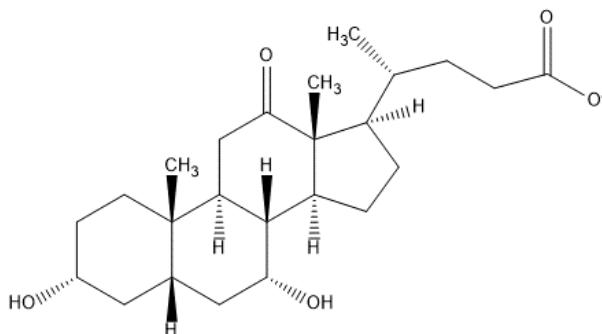
Problemi povezani sa kontrolisanjem i terapijom nivoa glukoze u krvi u današnje vreme su veoma česta pojava, ali ne toliko zbog nedostatka glukoregulatornih lekova, nego zbog njihove primene. Žučne kiseline, surfaktanti, helatorni agensi i derivati masnih kiselina su poznate supstance koje povećavaju *trans*-mukoznu apsorpciju lekova. Soli žučnih kiselina su poznati agensi koji poboljšavaju *trans*-membransko preuzimanje endogenih i egzogenih lipida u gastrointestinalnom traktu, kao i *trans*-membransku i paracelularnu pasažu malih polarnih endogenih i egzogenih molekula (Miljković D, 2000).

Studija kojom se ispitalo sniženje nivoa glukoze u krvi obuhvatila je poređenje nazalne primene insulina, nazalne primene natrijumove soli $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-okso-5 β -holne kiseline (12-monoketoholne kiseline) u fiziološkom rastvoru, nazalnu aplikaciju kombinacije insulina i 12-monoketoholne kiseline, kao i subkutanu primenu insulina. Kao što je i očekivano, najveće sniženje glukoze u krvi je postignuto nakon subkutane primene insulina, dok je najmanje sniženje postignuto nakon nazalne aplikacije samog insulina. Nazalna primena kombinacije insulina i žučne soli postigla je 54% sniženje u odnosu na subkutanu primenu insulina, dok je aplikacija same žučne soli u fiziološkom rastvoru dostigla 36%. Može se reći da transmukozna aplikacija žučnih kiselina, njenih prirodnih ili sintetskih derivata, analoga ili homologa, pokazuje glukoregulatorni efekat, zbog posedovanja specifičnih membranskih receptora. Žučne kiseline ispoljavaju ovaj efekat čak i bez dodatka insulina ili drugih glukoregulatornih agenasa kod mnogih životinja, uključujući i sisare (Miljković D, 2000).

2.6.2. 12-monoketoholna kiselina

Od sredine devedesetih godina, velika pažnja je usmerena ka farmakološkim karakteristikama $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-okso-5 β -holne kiseline (12-monoketoholne kiseline, MKH) (*slika 10*) (Mikov M, 2004), koja je sa 7-monoketoholnom kiselinom pokazala najbolje promotorno delovanje među žučnim kiselinama. Otkriveno je da je ta uloga povezana sa kritičnom micelarnom koncentracijom – zamenom hidroksilne grupe sa keto grupom, u molekulu žučne kiseline, smanjuje se hidrofobnost, a povećava se KMK. Povećanje KMK dovodi do sniženja hidrofobnosti i smanjene tendencije za obrazovanje micela. Poznavanje vrednosti za KMK je veoma važno za razumevanje delovanja žučnih kiselina jer monomeri i micidele imaju različite

fizičko-hemijske i biološke osobine. Mehanizam pozitivnog promotornog delovanja se ogleda u interakciji žučnih kiselina sa fosfolipidima membrane. U isto vreme, žučne kiseline pokazuju membranolitičko delovanje, razarajući membranu, čiji se mehanizam može objasniti u dva koraka: ulazak žučnih kiselina u membranu (distribucija između membrane i vode) i rastvaranje membrane. Pozitivna korelacija između pozitivnog i negativnog delovanja ukazuje na važnost poznavanja KMK vrednosti kako bi se predvidelo pozitivno promotorno ili negativno membranolitičko delovanje (Poša M, 2007; Posa M, 2009a; Poša M, 2009b; Mikov M, 2004).



Slika 10. *Struktura 3α,7α-dihidroksi-12-okso-5β-holne kiseline*

Poredeći aktivnost prirodnih žučnih kiselina (holne (H), deoksiholne (DH), tauroholne (TC) kiseline) i polusintetske monoketoholne kiseline, autori su ustanovili da najhidrofobnija kiselina, deoksiholna, pokazuje najveći hemolitički efekat, a za njom slede holna i tauroholna kiselina. MKH kiselina nije pokazala hemolitički efekat u analiziranom opsegu. Takođe, pokazano je da više hidrofobne žučne kiseline dovode do hemolize ispod vrednosti KMK, dok više hidrofilne kiseline izazivaju hemolizu iznad vrednosti KMK. MKH kiselina, kao novo sintetisana žučna kiselina pokazala je drugačije fizičko-hemijske i biološke karakteristike u odnosu na prirodne. Ona ne pokazuje snažnu membransku solubilizaciju, ali ipak utiče na fosfolipidni sloj, kao i na eritrocite. Analizirajući dostupne informacije, može se reći da monoketoholna kiselina predstavlja najmanje toksičnu kiselinu (Yang L, 2009).

Keto derivati holne kiseline pokazali su odličnu promotornu aktivnost u transportu insulina. Pored toga, istraživanja su pokazala značajnu hipoglikemijsku aktivnost 12-monoketoholne kiseline (Yang L, 2009). 12-MKH kiselina predstavlja dobar primer u poboljšanju prolaza kroz krvno-moždanu barijeru, čime se povećava koncentracija morfina, hinidina, salicilata i fenobarbitala (Mikov M, 2004). Takođe, 12-keto derivat holne kiseline pozitivno utiče na *per os* apsorpciju ampicilina, što sugeriše da bi kombinovana upotreba ovog leka sa MKH kiselinom

mogla da proširi spektar delovanja antibiotika, kao i da poboljša njegovu terapijsku efikasnost (Mikov M, 2005).

2.7. Farmaceutsko-tehnološka formulacija

Novi sistemi nosača lekova, kao i njihove formulacije, omogućavaju transport leka tačno na mesto delovanja, te imaju značajne efekte na njihovu efikasnost. Većina preparata ima optimalnu koncentraciju u kojoj ispoljava maksimalno dejstvo, a ispod i iznad te koncentracije nemaju dejstvo ili ispoljavaju toksičan efekat. To predstavlja razlog potrebe za kontrolisanje transporta leka. Nove formulacije kontrolišu farmakokinetiku, farmakodinamiku, imunogenost, nespecifičnu toksičnost i efikasnost leka, a predstavljaju interdisciplinarni pristup koji kombinuje nauku polimera, farmaceutike, hemiju biokonjugata i molekularnu biologiju (Devi VK, 2010; Charman WN, 1999).

Moderna medicina, uz pomoć nosača, zasniva se na transportu leka do mesta oštećenja i ciljanju zahvaćene zone unutar tela pacijenta. Ovaj princip funkcioniše tako što se optimalna koncentracija leka doprema na mesto delovanja i omogućava da se dejstvo ispolji na tom mestu u određeno vreme. Takođe, ideja je da se ovom metodom izbegnu sve mane tradicionalnog transporta leka u organizmu (Musthaba SM, 2009).

Mnogi sistemi za transport i targetiranje leka se razvijaju da bi se minimizirala degradacija i gubitak leka, prevenirala neželjena delovanja i povećala bioraspoloživost leka. Neki od polimera mogu biti mikročestice napravljene od nerastvorljivih, biodegradabilnih prirodnih ili sintetskih polimera. Kontrola oslobađanja leka, kao i biodegradacija, su veoma važni u razvoju uspešnih formulacija. Poboljšavanjem kretanja leka smanjuje se toksičnost i povećava efikasnost leka, a samim tim se nudi benefit pacijentima (Sahoo SK, 2003).

U slučaju biljnih lekova, postoji velika mogućnost da mnoge komponente budu uništene zbog niske *pH* vrednosti u želucu. Ostale komponente mogu biti metabolisane u jetri pre nego što stignu do mesta delovanja. Kao rezultat toga, u slučaju da aktivna komponenta ne dođe do krvi u minimalnoj terapijskoj koncentraciji, terapijski efekat će izostati. Prirodne komponente mnogo brže i lakše podležu metabolisanju u organizmu, stoga izazivaju manje neželjenih reakcija u odnosu na sintetske komponente (Devi VK, 2010), te se industrija sve više okreće biljnim preparatima.

Biljni lekovi su često nerastvorljivi pa se inkorporiranjem u mikro ili nano vezikule povećava njihova bioraspoloživost. Rastvorljivi biljni materijali takođe mogu biti inkorporirani u mikro ili nano čestice radi povećanja distribucije u organizmu (Patel JS, 2013).

Mikroinkapsulacija je proces koji omogućava produžavanje oslobađanja leka i smanjenje neželjenih efekata (Pal D, 2011). Formiranje mikročestica koje kontrolišu distribuciju leka je ograničeno kratkim zadržavanjem leka na mestu apsorpcije, te bi bilo veoma povoljno da se obezbedi jači kontakt nosača leka sa mukoznom apsorptivnom membranom (Crowdary, 2005). Ovo se najčešće postiže upotrebom mukoadhezivnih polimera. Mukoadhezivni polimeri u nosačima leka imaju sposobnost da produže kontakt leka na mestu apsorpcije i povećaju bioraspoloživost leka (Carvalho FC, 2010; Chowdary KP, 2004).

U poslednjih nekoliko godina, naučnici su pokazali povećano interesovanje ka upotrebi alginata kao biopolimera koji se koriste u formulaciji nosača lekova, zbog svoje osobine da formiraju hidrogel. Alginat, monomer alginske kiseline, pripada familiji linearnih kopolimera koji se sastoje od monomera β -D-manuronske kiseline i kiselinskih ostataka L-guluronske kiseline koje se smenjuju. Alginati prolaze kroz jonotropno geliranje u vodenom rastvoru u prisustvu jona Ca^{2+} , Ba^{2+} i Al^{3+} zbog jakih jonskih interakcija između karboksilne kiseline i ovih katjona. Alginati imaju mukoadhezivno svojstvo, ali ukršteni alginati su često krhki. Dakle, umrežavanje različitih alginata leka i mešanje sa mukoadhezivnim polimerima predstavlja najpopularniji pristup za formulaciju nosača za kontrolisanje oslobađanja leka. Takođe, mešanje sa odgovarajućim polimerima može poboljšati inkapsulaciju i stabilnost leka (Pal D, 2011).

2.8. Budućnost primene novih formulacija

Formulacija leka u sitnije čestice – mikro i nano dimenzija ima snažan uticaj na zdravstveni sistem jer omogućava strogo kontrolisano oslobađanje lekovite supstance i smanjenje neželjenih dejstava. Sistemi distribucije lekova se fokusiraju na dopremanje leka do tačno određenog mesta i na podešavanje njegovih apsorpcionih karakteristika.

Mikroenkapsulacija je našla primenu u imunomodularnim i imunosupresivnim procesima. Inkorporiranje ćelija u mikrokapsule može biti primenjeno u raznim vrstama tretmana, kao što su lečenje renalne disfunkcije, lečenje dijabetesa i hemofilije (Oriva G, 2004). Naučnici smatraju da ćelijska mikroinkapsulacija ima ogroman potencijal da doprinese unapređenju savremene medicine u narednoj deceniji.

Nanotehnologija olakšava napredak u oblasti dijagnostike, tako što omogućava osetljivije, specifičnije i pouzdanije metode koje su često brže i jeftinije. To doprinosi mogućnosti otkrivanja bolesti u ranim stadijumima. Većina bolesti, kao što su krvarenja čira i karcinomi, mogu se izlečiti ako se kontrolišu i ako se otkriju u ranim fazama. Postoje inovacije gde je moguće inkapsulirati malu kameru koja bi lako i jednostavno izvršila snimanje unutar gastrointestinalnog trakta (Pan G, 2010).

Primena nanotehnologije već je zaživela u praksi, pa je tako transplantacija dušnika urađena u Švedskoj kod pacijenta sa karcinomom dušnika. Veštački dušnik je kreiran od nanokompozitnog materijala i potpoljen u rastvor matičnih ćelija. Zbog velike površine nano materijala, transplantat se primio u tkivo domaćina, a zbog korišćenja matičnih ćelija pacijenta, nije postojao rizik za odbacivanje. Ovakav metod bi se mogao primeniti za kreiranje i mnogih drugih organa, što bi značajno uticalo na razvoj medicine. Takođe, veštačke proteze bi se mogle kreirati tako da budu jače, a lakše, zbog upotrebe nanotehnologije, što omogućava konformniji život pacijenata.

2.9. Ekstrakcija aktivnih principa iz biljnih droga

Ekstrakcija se definiše kao odvajanje farmakološki i biološki aktivnih sastojaka biljnih i životinjskih tkiva od pomoćnih komponenata, u prisustvu selektivnih rastvarača i primenom standardnih metoda (Vuleta G, 2012). Da bi postupak ekstrakcije bio prihvaćen za analitičke svrhe, treba da ispunjava sledeće uslove:

- ekstrakcija mora biti potpuna (svi aktivni principi moraju biti izolovani),
- prilikom ekstrakcije ne sme doći do hemijske transformacije aktivnih principa,
- tehnika rada treba da bude što jednostavnija i kraća (Pekić B, 1980).

Tečno-čvrsta ekstrakcija se ogleda u nekoliko karakteristika:

- između supstance koja se ekstrahuje iz čvrste materije i rastvarača nema definisanih zakonitosti u smislu koeficijenata,
- deo rastvarača, odnosno ekstrakta se na kraju ekstrakcije zadržava na površini i u kapilarima čvrste materije,
- ravnotežno stanje se postiže kada se koncentracija ekstrakta u kapilarama čvrste materije izjednači sa koncentracijom ekstrakta u slobodnom rastvoru,

- vreme potrebno za postizanje ravnoteže u svakom ekstrakcionom nivou određuje se eksperimentalno u zavisnosti od vrste materijala koji se ekstrahuje (Pekić B, 1980).

Ekstrakcija se zasniva na tome da tokom samog procesa sastojci droge prelaze u rastvarač, kroz dve faze (Vuleta G, 2012). Najpre se odvija faza kvašenja i bubrenja sirovine, a potom faza ekstrakcije u užem smislu. Do kvašenja sirovine dolazi usled prodiranja rastvarača u osušeni biljni materijal pod uticajem kapilarnih sila. Ćelijski zidovi droge imaju difilni karakter, pri čemu je hidrofilnost značajno izraženija u odnosu na hidrofobnost. Biljno tkivo sadrži velik broj pora kapilarnog tipa, koji omogućava prodor rastvarača, pri čemu se ispunjavaju ćelije i drugi prazni prostori biljnog materijala. Ukoliko je vazduh prisutan u kapilarama, vreme koje je potrebno za njihovo ispunjavanje može biti veoma dugo, jer ometa prodiranje rastvarača. Za povećanje brzine prodiranja može se primeniti vakuumiranje suvog biljnog materijala, povećanje pritiska rastvarača ili zamena vazduha lako rastvornim gasom (CO_2). Takođe, materije koje snižavaju površinski napon između tečnosti i gasa olakšavaju proces kvašenja. Prodiranjem rastvarača u biljni materijal započinje i proces rastvaranja aktivnih principa. Unutar biljnog materijala rastvarač se gotovo ne kreće. Brzina rastvaranja materije unutar čestica droge biće određena brzinom prenosa mase kroz poroznu sredinu, a na površini čestica brzinom prelaza masa od površine tela. S obzirom da proces prelaza mase može biti veoma ubrzan podešavanjem hidrodinamičkih uslova, brzina rastvaranja materija na površini tela značajno se povećava, tako da se u toku procesa ekstrakcije pojavljuje period brže ekstrakcije. Ovaj period je posebno značajan za operaciju ekstrakcije. Prodiranje rastvarača u čestice biljne droge, kvašenje i rastvaranje određenih komponenata, dovodi do povećanja zapremine, odnosno dolazi do bubrenja. U mnogim slučajevima, drogu najpre treba podvrgnuti bubrenju, kako bi se izbeglo naknadno nabijanje sirovine, kao rezultat povećanja zapremine čestica. Prilikom izvođenja ekstrakcije, velik značaj ima količina rastvarača, kao i dinamika apsorpcije rastvarača koja je u neposrednoj vezi sa bubrenjem sirovine. Rastvarač apsorbovan sirovinom obrazuje unutrašnji sok čija količina predstavlja konstantu za sirovine različitog stepena usitnjenosti i čije je poznavanje neophodno za sprovođenje proračuna ekstrakcije.

Pri ekstrakciji aktivnih principa iz lekovitog bilja, uočavaju se koeficijenti prenosa mase:

- koeficijent unutrašnje difuzije (D_u), koji definiše brzinu prenosa mase unutar čestica biljnog materijala,

- koeficijent slobodne difuzije (D_s), koji karakteriše brzinu prenosa mase u ćelijskom soku i u difuzionom podsloju,
- koeficijent turbulentne difuzije (E_d), koji opisuje brzinu prenosa mase u pokretnom sloju rastvarača.

U toku ekstrakcije prisutna su sva tri procesa, pa je zbirni koeficijent prenosa mase (K) jednak:

$$K = \frac{1}{\frac{l}{E_d} + \frac{l+s}{D_s}}$$

gde je l - prečnik čestica, a s - debljina graničnog sloja.

Koeficijent slobodne difuzije zavisi od temperature i koncentracije. U praksi se često određuje ova vrednost kao pokazatelj srednje vrednosti za određeni interval temperature i koncentracije. Koeficijent unutrašnje difuzije ima znatno manju vrednost od koeficijenta slobodne difuzije zbog smanjenja površine prenosa mase (uticaj poroznosti i kapilarne strukture biljnog materijala). Koeficijent konvektivne difuzije po svojoj vrednosti je veći od koeficijenta slobodne difuzije. Sa povećanjem brzine kretanja rastvarača koeficijent turbulentne difuzije raste i dobija maksimalnu vrednost pri turbulentnom kretanju. Zato se prilikom mešanja ova konstanta, kada postane dovoljno velika, može zanemariti u proračunu. U takvim slučajevima određuje se koeficijent unutrašnje difuzije, jer slobodna difuzija materije u difuzionom podsloju ima neznatan uticaj na vrednost konstante usled male debljine podsloja (Pekić B, 1980).

Izbor metode zavisi od droge i hemijske prirode njenih sastojaka. Prelaz aktivnih komponenata iz droge u rastvarač je direktno proporcionalan:

- difuzionom koeficijentu,
- dodirnoj površini droge i rastvarača,
- koncentracionom gradijentu,
- vremenu ekstrakcije,

a obrnuto proporcionalan:

- debljini difuzionog sloja.

Bolji prinos se ostvaruje mućkanjem, mešanjem i dodavanjem novih količina rastvarača (Vuleta G, 2012).

Stepen usitnjenosti droge znatno utiče na proces ekstrakcije i omogućava efikasnu izolaciju aktivnih principa. Stepenn usitnjenosti biljnog materijala, čvrstih supstanci, označava se u farmakopeji arapskim brojem u zagradi iza naziva droge ili preparata. Brojevi se odnose na broj sita, a označavaju dužinu stranice otvora, izraženu zaokruženom vrednošću u milimetrima, kroz koji usitnjene čestice još mogu da prođu. Pri usitnjavanju ne sme da se odbaci ni jedan deo droge i treba nastojati da su usitnjene čestice droge podjednake veličine. Sita koja se najčešće upotrebljavaju su data u *tabeli 3*.

Tabela 3. Sita i stepen usitnjenosti droga prema Ph. Jug. IV

Broj sita	Veličina otvora (dužina stranica otvora), mm	Stepen usitnjenosti
6	6,0	grubo sečene droge (<i>drogae ruditer consisae</i>)
3	3,0	polusitno sečene droge (<i>drogae concisae</i>)
2	2,0	sitno sečene droge (<i>drogae minutim concisae</i>)
0,75	0,75	grubi prašak (<i>pulvis grossus</i>)
0,30	0,30	sitan prašak (<i>pulvis subtilis</i>)
0,15	0,15	vrlo sitan prašak (<i>pulvis subtilissimus</i>)

Osnovni zadatak usitnjavanja biljne droge je mehaničko razaranje biljnog materijala do željene veličine čestica, odnosno narušavanje njegove strukture, skraćenje puta difuzije aktivnih materija i povećanje površine kontakta za razmenu mase (doprinos intenzifikaciji ekstrakcije). Za dobijanje određenog stepena usitnjenosti mogu se primenjivati mlinovi čekićari, mlinovi koji rade na principu smicanja, a u laboratorijskim uslovima mogu se uspešno primeniti i mlinovi za kafu (kada se kao droga koriste list i cvet). Pri narušavanju strukture biljnog materijala deo ćelija se otvara i supstance koje ona sadrži postaju lako dostupne rastvaraču. Prilikom ekstrakcije dolazi do rastvaranja i brzog prenosa mase supstance iz razorenih ćelija i spore difuzije rastvorenih supstanci iz neoštećenih ćelija. Prvi proces ekstrakcije se odvija nekoliko puta brže od drugog i zavisi od hidromehaničkih uslova. Drugi proces je znatno sporiji i zavisi od koeficijenta prenosa mase unutar biljnog materijala. Time se može zaključiti da proces ekstrakcije ima dva perioda - brzu i sporu ekstrakciju. Može se smatrati da je relativna količina ekstrahovanih materija u periodu brze ekstrakcije orijentaciono merilo količine razorenih supstanci, pod uslovom da se pretpostavi da su ekstrahovane materije ravnomerno raspoređene po celoj zapremini biljne droge. Količina materije dobijena tokom brze ekstrakcije (koeficijent brze ekstrakcije) je parametar koji određuje operaciju

ekstrakcije. Ako je u usitnjenom materijalu količina razorenih ćelija mala, operacija ekstrakcije se veoma usporava i određuje se brzinom difuzije materija iz biljne sirovine. Suprotno, koeficijent brze ekstrakcije se povećava kao posledica povećavanja količine razorenih ćelija (Lepojević Ž, 2000; Vuleta G, 2012; Pekić B, 1980).

U toku bubrenja, biljni materijal koji se ekstrahuje apsorbira određenu količinu rastvarača, odnosno obrazuje unutrašnji sok. U toku ekstrakcije, ravnotežno stanje na jednom stupnju ostvaruje se kada se izjednače koncentracije ekstrakata u slobodnom rastvaraču i unutrašnjem soku (vezani rastvarač). Značajno je da se uzme u obzir učešće i količina ekstrakta koji se nalaze u kapilarima droge. Pošto se prečnik kapilara ne može povećati, akcenat se stavlja na skraćivanje njihove dužine, kako bi se smanjilo vreme uspostavljanja ravnoteže. Iz toga proizilazi da mlevenje biljnog materijala predstavlja najpogodniji postupak njegove pripreme za ekstrakciju. Nasuprot tome, fino mleveni materijal teško propušta rastvarač, jer ne poseduje odgovarajuću poroznost, odnosno znatno usporava proces ekstrakcije. Iz ovog sledi da odgovarajuća priprema treba da obezbedi:

- nesmetano odvijanje ekstrakcije,
- što kraći kapilarni put u biljnom materijalu,
- da udeo sitnijih čestica (čiji je prečnik manji od 0,5 mm) ne bude veći od 10% u pripremljenom materijalu.

Osnovni postupci za pripremu biljnog materijala sastoje se od nekoliko postupaka, koji se primenjuju posebno ili u kombinaciji:

- mlevenje na odgovarajućim mlinovima,
- granuliranje fino usitnjenog materijala,
- propuštanje između sistema valjaka tako da nastaju pahuljice prečnika oko 0,3 mm, koje poseduju dobre mehaničke osobine i kratke kapilarne puteve,
- istiskivanje na povišenoj temperaturi i vlažnosti (Pekić B, 1980).

Vrsta rastvarača koji se primenjuje za ekstrakciju određenih aktivnih komponenti igra veoma važnu ulogu (Pekić B, 1980). Na osnovu toga, rastvarači se biraju na osnovu rastvorljivosti supstance, koja zavisi od prirode same supstance, rastvarača i temperaturnih uslova. Idealan rastvarač bi trebao da ispunjava sledeće kriterijume:

- selektivnost,
- fiziološku indiferentnost,

- hemijsku inertnost,
- podnošljivost i netoksičnost,
- nezapaljivost i nisku tačku ključanja,
- ekonomičnost (Vuleta G, 2012).

Selektivnost rastvarača predstavlja sposobnost razdvajanja komponenti polazne smeše, odnosno, može da se definiše kao sposobnost izdvajanja samo određene komponente ili komponenti iz početnog rastvora (Tolić A, 1996).

Prilikom ekstrakcije droga različitim rastvaračima menja se kvalitativni i kvantitativni sastav dobijenih ekstrakata. Ova pojava uglavnom zavisi od njihove polarnosti (polarni ili nepolarni rastvarači), odnosno od stepena hidrofilitnosti supstance koja se želi izdvojiti. Polarne supstance, koje imaju visoke vrednosti dielektrične konstante, dobro su rastvorne u polarnim rastvaračima. Nepolarne supstance, malih dielektričnih konstanti, rastvorne su u nepolarnim rastvaračima. Rastvarač utiče na ekstrakciju određene grupe principa, a količina ekstrahovanih materija zavisi od polarnosti rastvarača. Poznato je da je velik broj supstanci bolje rastvorljiv u polarnim rastvaračima. Za izradu biljnih ekstrakata potrebno je pažljivo odabrati drogu dobrog kvaliteta, pogodan rastvarač, metod ekstrakcije, kao i opremu potrebnu za pripremu ekstrakta. Dobro odabrani rastvarač treba da omogući što potpunije iscrpljenje droge, odnosno dobijanje visokih prinosa ekstrakcije. Najčešće korišćeni rastvarači su:

- voda,
- etanol,
- metanol,
- aceton,
- glicerol,
- propilenglikol,
- etar,
- masna ulja,
- hloroform,
- heksan (Vuleta G, 2012).

Za ekstrakciju lekovitog bilja u farmaceutske svrhe najčešće se primenjuje smeša alkohola i vode. Mešanjem alkohola i vode u različitim odnosima, menja se dielektrična konstanta u širokim granicama, čime se omogućava ekstrakcija velikog broja supstanci iz biljnih materijala. Voda kao

rastvarač u najmanjoj meri rastvara obojene i druge prateće materije (Pekić B, 1980; Lepojević Ž, 2000). Izbor rastvarača može da se vrši na različite načine. Najčešće se vrši ekstrakcija uzorka različitim rastvaračima i upoređuju se dobijeni rezultati. Najbolji rastvarač treba da ekstrahuje, pri jednakim uslovima, najveću količinu aktivnog principa. Pored dielektrične konstante rastvarača, velik uticaj na brzinu difuzije i rastvorljivost imaju viskozitet i površinski napon rastvarača. Smanjenje viskoziteta i površinskog napona rastvarača povoljno utiče na ekstrakciju (Pekić B, 1980).

2.10. Tipovi ekstrakcije

Postoji više tipova i načina ekstrakcije, a odabir zavisi od potreba daljih analiza ekstrakata. Prema Ph. Jug. IV, metode ekstrakcije su:

- *Maceracija* - jednokratna ekstrakcija propisano usitnjene droge pogodnim rastvaračem na sobnoj temperaturi,
- *Bimaceracija* - dvokratna ekstrakcija propisano usitnjene droge sa pogodnim rastvaračem na sobnoj temperaturi,
- *Digestija* - jednokratna ekstrakcija na povišenoj temperaturi (jer sa povećanjem temperature, proces ekstrakcije je brži i efikasniji),
- *Perkolacija* - kontinuirana metoda, na sobnoj temperaturi sa kontinuiranim i jednolikim proticanjem rastvarača kroz stub droge tj. kroz perkolator odozgo prema dole.

Pored klasičnih metoda postoje i druge, čija je primena uslovljena vrstom materijala za ekstrakciju, odgovarajućim rastvaračem i osobinama aktivnih komponenti, a to su: superkrična, ultrazvučna, mikrotalasna, protivstrujna ekstrakcija, cirkulatorna ekstrakcija (Jovanović M, 2003).

Mikrotalasna ekstrakcija. Mikrotalasi su elektromagnetni talasi talasne dužine između radio i infracrvenih talasa, od 1 cm do 1 m. Njihova upotreba je počela 1975. godine, a osamdesetih godina XX veka počelo je korišćenje posebno dizajniranih peći sa kontrolom pritiska i temperature (Mijin DŽ, 2005). Postoje dve podvrste ove ekstrakcije:

- ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontrolisanom pritisku i temperaturi,
- ekstrakcija pri atmosferskom pritisku u mikrotalasnim pećima.

Mehanizam ove vrste ekstrakcije se zasniva na upotrebi energije mikrotalasa za zagrevanje rastvarača koji je u kontaktu sa čvrstom materijom, sa ciljem izolovanja željenih sastojaka u rastvor. Zagrevanje pomoću mikrotalasa temelji se na sposobnosti nekih tečnosti i čvrstih supstanci da prevedu energiju talasa u toplotnu energiju. Reakciona smeša mora da sadrži dipolne molekule ili jone. Elektromagnetni talasi stvaraju električno polje, pod čijim uticajem se dipoli kreću i prilikom trenja gube svoju energiju koja se pretvara u toplotu. Ukoliko reakciona smeša ima jone, zagrevanje je mnogo veće. Rastvarači koji se upotrebljavaju moraju imati sposobnost apsorpcije mikrotalasa. Ova metoda se može koristiti za ekstrakciju prirodnih proizvoda, lekova, aditiva, ugljovodoničnih zagađivača i pesticida. Veoma je pogodna za ekstrakciju etarskog ulja. Mnogo je efikasnija u poređenju sa *Soxhlet*-ovom i klasičnom ekstrakcijom u balonu, manji su ekonomski troškovi, manja je potrošnja materijala i rastvarača. Zbog uštede u vremenu trajanja procesa i manjoj potrošnji energije, primenjuje se za brze ekstrakcije velike serije uzoraka. Velike je preciznosti i rezultati su kvalitativno i kvantitativno slični onima koji se dobijaju klasičnom ekstrakcijom (Blekić M, 2011).

Ultrazvučna ekstrakcija. Ultrazvuk je mehanički talas frekvencije preko 20 kHz, iznad gornje granice ljudske čujnosti. Ovo široko područje se deli na dva potpodručja koja određuju njegovu potencijalnu primenu. Dijagnostički ultrazvuk je visoke frekvencije (1-10 MHz) i niske energije, ne izaziva promene na upotrebljenom materijalu i koristi se u medicini, laboratorijama i kontroli kvaliteta proizvoda, i ultrazvuk visoke energije koji dovodi do kavitacija koje mogu prouzrokovati oštećenja materijala i određene hemijske reakcije, te ima široku primenu u industriji za čišćenje, bušenje, lemljenje, ekstrakciju. Ranije korišćenje ultrazvuka baziralo se na procesima sušenja, kristalizacije, degradacije, a danas se koristi za ekstrakciju, jer se teži povećanju bioraspoloživosti aktivnih principa sa zadržavanjem njihovih osnovnih svojstava i smanjenju njihove degradacije (Brnčić M, 2009; Drmnić H, 2010). Mehanizam ultrazvučne ekstrakcije se ogleda u prenošenju talasa kroz neku elastičnu sredinu, kao npr. vodu ili vlakna. Prolaskom kroz vodu, stvaraju se longitudinalni talasi koji dovode do naizmeničnog skupljanja i širenja molekula vode. Pri tome nastaju kondenzati koji sudaranjem obrazuju šok talase. Oni, nailazeći na čvrst materijal, dovode do bubrenja ćelije i probijanja ćelijskih opni. To omogućava velike brzine difundovanja rastvarača i ispiranje aktivnih principa iz ćelije. Ova vrsta ekstrakcione metode se može vršiti kako u ultrazvučnom kupatilu, tako i u ultrazvučnoj kadi. Pored toga što se moraju

obezbediti odgovarajući rastvarači, podesiti pogodna temperatura i pritisak, neophodno je podesiti frekvenciju, snagu i distribuciju talasa da ne bi došlo do denaturacije proteina, deaktivacije enzima i oksidacije masti u upotrebljenim uzorcima. Ova metoda omogućava bolji prinos aktivnih komponenti, veću stopu ekstrakcije i smanjeno vreme tretiranja uzorka. Ultrazvuk velike snage je našao primenu i u uništavanju mikroorganizama, poboljšanju funkcionalnih i tehnološki značajnih proteina u mleku, u emulgovanju i homogenizaciji (Jambrak AR, 2009).

3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE

3.1. Ciljevi

1. Ispitati kvalitativne i kvantitativne karakteristike ekstrakata bosiljka dobijenih različitim rastvaračima, polarnim-voda, etanol, metanol i nepolarnim-heksan, dihlormetan i trihlormetan.
2. Ispitati biohemijsku aktivnost ekstrakata bosiljka dobijenih različitim rastvaračima, polarnim-voda, etanol, metanol i nepolarnim-heksan, dihlormetan i trihlormetan.
3. Ispitati uticaj farmaceutsko-tehnološke formulacije ekstrakta bosiljka na glikemijski, lipidni i oksido-redukциони status u odnosu na vodeni ekstrakt kod oglednih životinja.

3.2. Radne hipoteze

1. Kvalitativne i kvantitativne karakteristike ekstrakata bosiljka dobijenih polarnim rastvaračima pokazuju raznovrsniji sadržaj u odnosu na primenu nepolarnih rastvarača.
2. Ekstrakti bosiljka dobijeni polarnim rastvaračima pokazuju značajniju biohemijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte dobijene nepolarnim rastvaračima.
3. Farmaceutsko-tehnološka formulacija ekstrakta bosiljka pokazuje pozitivan uticaj na glikemijski, lipidni i oksido-redukциони status u odnosu na vodeni ekstrakt kod oglednih životinja.

4. MATERIJAL I METODE

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

Nadzemni delovi bosiljka (*Ocimum basilicum*) pribavljeni su iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ iz Beograda, 2013. godine (*Basilici herba*, serijski broj: 14910513).

4.1. Metoda određivanja hlorogenske kiseline

Određivanje hlorogenske kiseline (5-kafeoilhinske kiseline, 5-CQA) u ekstraktima bosiljka vršeno je primenom validovane visokoeфикаsne tečne hromatografija (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) (Grujić-Letić N, 2015). Korišćen je uređaj HPLC-DAD model Agilent HP 1100 sistema sa autosempler injektorom, Waldbron, Nemačka.

Uslovi HPLC analize

Kolona: Zorbax SB-C18 (4,6 mm x 250 mm, i.d., 5 µm veličina čestica)

Mobilna faza: 1,5% sirćetna kiselina : metanol = 85:15

Protok: 0,8 ml/min

Detekcija: UV-325 nm

Temperatura: 25°C

Ukupno vreme analize: 15 minuta

Standardni rastvor hlorogenske kiseline

Hlorogenska kiselina (Hlorogenska kiselina (≥95%), Sigma Aldrich (St. Louis, SAD), 100,1 mg) preneti je u odmerni sud od 10 ml, rastvorena u malo metanola (95% metanol, p. a., POCH (Gliwice, Poljska)) i odmerni sud je dopunjen do crte metanolom. Ovako dobijeni rastvor imao je koncentraciju 10,1 mg/ml.

Izrada kalibracione krive

Uzimali su se alikvoti standardnog rastvora od 0,1; 0,3; 0,6; 0,8 i 1 ml i dopunjavali u normalnom sudu do 10 ml metanolom. Ovi rastvori odgovarali su koncentracijama hlorogenske

kiseline od 0,101; 0,303; 0,606; 0,808 i 1,01 mg/ml. Na osnovu dobijenih podataka konstruisana je kalibraciona kriva i data regresiona jednačina (koeficijent pravca).

4.2. Tehnike ekstrakcije

Ukupno je pripremljeno i analizirano 100 uzoraka. Biljna vrsta je najpre usitnjena do propisanog stepena usitnjenosti (sito 0,3 i sito 2), a potom podvrgnuta ekstrakciji na jedan od sledećih načina:

- maceracija polarnim i nepolarnim rastvaračima,
- infuz,
- mikrotalasna ekstrakcija,
- ekstrakcija ultrazvukom.

4.2.1. Maceracija polarnim i nepolarnim rastvaračima

Ekstrakcija droge vršena je destilovanom vodom (na svetlosti i na mestu zaštićenom od svetlosti), smešom etanola i destilovane vode (30%, 40%, 50%, 60%, 96% etanol, apsolutni etanol, J. T. Baker (Holandija)), metanolom (95%), hloroformom, dihlormetanom i heksanom (v/v). Maceracija se vršila prelivanjem 1 g usitnjene droge sa 5 ml rastvarača. Čaše sa drogom su prekrivene parafinskim filmom i ostavljene na suvom i tamnom mestu da stoje tokom 10 min, 30 min, 24h, 48h i 72h (polarni rastvarači), odnosno 10 min, 30 min (nepolarni rastvarači), kako bi se ekstrahovali aktivni principi, nakon čega je izvršena filtracija u nove, prethodno izmerene, čaše. Zatim je celokupan sadržaj uparen do suva na magnetnoj mešalici (Labor Muszeripani Muvek, Hungary). Upareni filtrati su se nakon toga ostavljali u eksikatoru pod kontrolisanim uslovima tokom 24 časa, a potom je izmerena masa suvih ekstrakata i izračunat ukupan prinos ekstrakcije. Merenje je vršeno na analitičkoj vagi (Scaltec, Nemačka).

4.2.2. Dobijanje infuza

Dobijanje infuza podrazumevalo je prelivanje 1 g droge sa 200 ml vrele vode (prema preporukama i uputstvima). Potom su ekstrakti filtrirani i upareni do suva na magnetnoj mešalici. Nakon 24 časa sušenja u eksikatoru, izmerena je masa suvih ekstrakata i izračunat ukupan prinos ekstrakcije.

4.2.3. Mikrotalasna ekstrakcija

0,4 g usitnjene droge preliveno je sa 100 ml destilovane vode. Ekstrakcija je vršena u mikrotalasnoj peći (Midea) u toku 2 i 4 minuta, nakon čega su ekstrakti filtrirani i upareni do suva. Nakon 24 časa sušenja u eksikatoru, merena je masa suvih ekstrakata i izračunat ukupan prinos ekstrakcije.

4.2.4. Ekstrakcija ultrazvukom

0,4 g usitnjene droge preliveno je sa 100 ml destilovane vode. Ekstrakcija je izvedena primenom ultrazvučnog kupatila (Clifton, Velika Britanija) tokom 10 minuta, nakon čega su ekstrakti filtrirani i upareni do suva. Nakon 24 časa sušenja u eksikatoru, merena je masa suvih ekstrakata i izračunat ukupan prinos ekstrakcije.

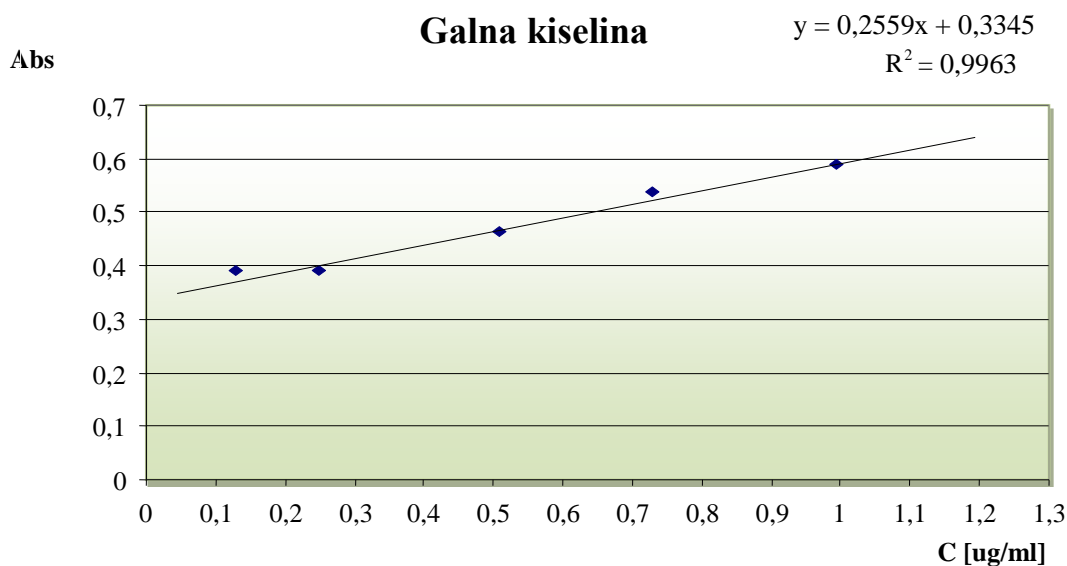
Od pripremljenih suvih ekstrakata, dobijenih prethodno navedenim tehnikama ekstrakcije, pripremljeni su metanolni ekstrakti rastvaranjem suvog ekstrakta u 95% metanolu (v/v), do dobijanja odgovarajuće koncentracije. Pripremljeni metanolni ekstrakti su se dalje koristili za određivanje antioksidativne aktivnosti, sadržaja ukupnih fenola i sadržaja ukupnih flavonoida.

4.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola korišćena je metoda po *Folin-Ciocalteu* (FC) (Božin B, 2008). Kod *Folin-Ciocalteu* određivanja stvara se kompleksan polimeran jon sa fosfomolibdatskom ($H_3PMo_{12}O_{40}$) i fosfovolframatovom ($H_3PW_{12}O_{40}$) kiselinom. Ovaj reagens oksiduje fenolne materije, a sam se redukuje u smešu volfram-oksida (W_8O_{23}) i molibden-oksida (Mo_8O_{23}). Rastvor postaje intenzivno plave boje, a intenzitet obojenja je srazmeran koncentraciji fenolnih jedinjenja.

Postupak rada. U 0,1% metanolni ispitivani ekstrakt (0,1 ml) dodato je 0,2 M FC reagensa (deset puta razblažen komercijalni FC reagens; 0,5 ml, Merck (Darmstadt, Nemačka)). Nakon 5 minuta mućkanja u epruveti na Vortex mešalici (Clifton, Velika Britanija) dodat je pripremljen rastvor natrijum-karbonata (0,4 ml, POCH (Gliwice, Poljska)). Smeše su inkubirane na sobnoj temperaturi 30 minuta, a zatim je očitana apsorbanca na $\lambda=760$ nm, na spektrofotometru (Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System, Nemačka). Kao slepa proba korišćen je metanol. Sve

analize rađene su u tri ponavljanja. Izračunavanje sadržaja ukupnih fenola preračunatih na galnu kiselinu vršilo se na osnovu vrednosti apsorbance i jednačine dobijene za masu galne kiseline, a računski se određivao sadržaj ukupnih fenola preračunatih na galnu kiselinu ($\mu\text{g/ml}$). Rezultat je izražavan kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg GAE/g SE) (*grafikon 1*).



Grafikon 1. Kalibraciona kriva izrađena pomoću standardnog rastvora galne kiseline različitih koncentracija

4.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Metoda za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u uzorcima zasniva se na osobinama flavonoida i flavon-glikozida da sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse (Božin B, 2008). Naročito je značajan aluminijumov kompleks, jer se on vezuje za sve tipove flavonoida, pa se sumarni apsorpcioni maksimum ukupnih flavonoida lako određuje.

Postupak rada. Za svaki od ispitivanih ekstrakata rastvor se pripremao na sledeći način: u normalni sud od 10 ml preneto je 500 μl 10% ekstrakta i dopunjeno sa rastvorom za ekstrakciju. Zatim je po 2,5 ml ovog rastvora preneto u normalni sud od 50 ml i dopunjeno do crte destilovanom vodom. Sadržaj flavonoida se određivao spektrofotometrijski na $\lambda=430$ nm. Merene su apsorbance radne i kontrolne probe (*tabela 4*). Radne probe su rađene u tri ponavljanja, dok su kontrolne probe rađene u dva ponavljanja.

Tabela 4. Sastav radne i kontrolne probe

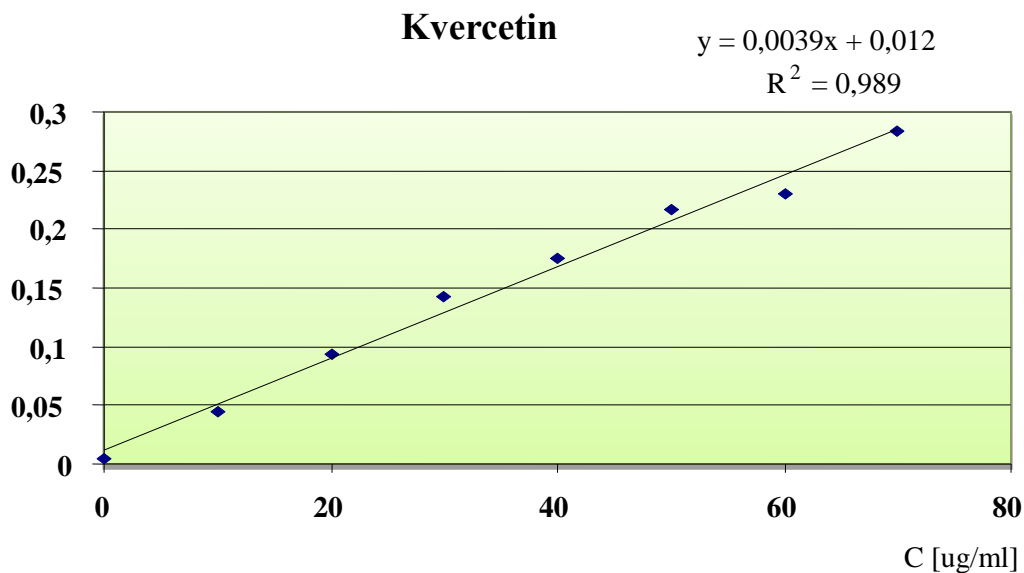
RADNA PROBA	KONTROLNA PROBA
5ml ekstrakta	5ml ekstrakta
1ml destilovane vode	3,5ml destilovane vode
2,5ml AlCl ₃ reagensa (Sigma Co. (St. Louis, USA))	-

Kao slepa proba upotrebljena je destilovana voda. Iz razlike apsorbanci radne i kontrolne probe izračunate su apsorbance za svaki ispitivani ekstrakt prema sledećoj formuli:

$$A_E = A_{RP} - A_K$$

Rezultat je izražavan kao mg ekvivalenata kvercetina/g suvog ekstrakta (mg KE/g SE) (*grafikon 2*).

Abs



Grafikon 2. Kalibraciona kriva izrađena pomoću standardnog rastvora kvercetina različite koncentracije

4.5. *In vitro* određivanje antioksidativne aktivnosti

4.5.1. DPPH metoda

Antioksidativna aktivnost svih ekstrakata određivana je spektrofotometrijskom metodom (Grujić N, 2012). Sposobnost “hvatanja” slobodnih radikala, odnosno “skevindžer” aktivnost (RSC, Radical Scavenging Capacity) ispitivanih ekstrakata detektovana je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikale (DPPH radikale), a zatim je određena IC₅₀ vrednost (koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se neutrališe 50% radikala). Radikal DPPH, predstavlja stabilan slobodni radikal koji stupa u reakciju sa antioksidativnom komponentom, koja je donor vodonikovih atoma, pri čemu dolazi do redukcije (nastaje DPPH-H oblik), odnosno ljubičasto obojeni stabilni DPPH radikal se transformiše u žuto obojeni neutralni oblik DPPH-H. Promena intenziteta boje je srazmerna broju “uhvaćenih” radikala. DPPH metoda je široko rasprostranjena za određivanje sposobnosti vezivanja slobodnih radikala različitih antioksidanata (Özcelik B, 2003; Elmastas M, 2006). Neutralizacija DPPH radikala fenolnim jedinjenjima može se objasniti pomoću dva mehanizma:

1. fenolno jedinjenje predaje H atom DPPH radikal, pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan,
2. ariloksi radikal može da reaguje sa još jednim DPPH radikalom pri čemu se kondenzuju i prelaze u neutralan molekul.

Postupak rada. Za svaki metanolni ekstrakt pravljena je serija od pet različitih koncentracija datih ekstrakata koje su dalje korišćene za određivanje RSC vrednosti. Sam postupak se zasnivao na tome da se u kiveti pomeša određena zapremina prethodno pripremljenih metanolnih rastvora ekstrakata (10-100 µl) sa 1ml rastvora DPPH (90 µmol/dm³, Alfa Aesar (Karlsruhe, Nemačka)) i dopuni sa metanolom (95% v/v) do 4ml. Nakon 30 minuta, apsorbance kontrole, uzorka i slepe probe su određivane spektrofotometrijskim merenjem na talasnoj dužini od λ=515nm. Metanol (95% v/v) se koristio kao slepa proba (referentni rastvor), a kao kontrola smeša 95% metanola (3 ml) i DPPH reagensa (1 ml). Apsorbance uzorka i kontrole su merene u tri ponavljanja.

RSC vrednost predstavlja procenat slobodnih DPPH radikala koji je izreagovao sa antioksidansima ispitivanog ekstrakta i izračunava se na osnovu jednačine:

$$\%RSC=100x((A_{kontrola}- A_{uzorka})/A_{kontrola})$$

Iz vrednosti RSC je određena IC_{50%} vrednost na osnovu linearne zavisnosti RSC vrednosti od ispitivanih vrednosti različitih koncentracija ekstrakata.

IC_{50%} vrednost predstavlja onu vrednost koncentracije ekstrakta koja ima sposobnost neutralizacije 50% slobodnih DPPH radikala.

4.5.2. Određivanje peroksidnog jona

Aktivnost peroksidnog jona se određivala po metodu *Ruch et al* (Ruch RJ, 1989), na izabranim uzorcima i određivana je spektrofotometrijskom metodom. Rastvor vodonik-peroksida (40 mM) je sveže pripremljen u fosfatnom puferu; kalijum-dihidrogenfosfat – kalijum-hidrogenfosfat (0,05 M, *pH* 7,4). U metanolne uzorke različitih koncentracija se dodavao fosfatni pufer (*pH* 7,4; 3,4 ml) i prethodno pripremljen vodonik-peroksid (0,6 ml). Apsorbanca je merena na $\lambda=230$ nm. Slepa proba je bila metanol.

RSC vrednost predstavlja procenat slobodnih peroksidnih radikala koji je izreagovao sa antioksidansima ispitivanog ekstrakta i izračunava se na osnovu jednačine:

$$\%RSC=100x((A_{kontrola}- A_{uzorka})/A_{kontrola})$$

Kontrola je predstavljala smešu fosfatnog pufera (*pH* 7,4; 3,4 ml) i vodonik-peroksida (0,6 ml).

4.5.3. Određivanje hidroksilnog jona

Za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti hidroksilnih jona koristila se reakciona smeša koja se sastojala od metanolnog uzorka različite koncentracije (razblažen do 1 ml), gvožđe-sulfata (1,5 mM; 1 ml), vodonik-peroksida (6 mM; 0,7 ml) i natrijum-salicilata (20 mM; 0,3 ml). Smeša se inkubirala jedan sat u vodenom kupatilu na temperaturi od 37°C, nakon čega se merila apsorbanca na $\lambda=562$ nm. Procenat slobodnih hidroksilnih radikala se izračunavao na osnovu jednačine:

$$\%RSC=100 \times (1 - (A_1 - A_2) / A_0)$$

A_0 predstavlja apsorbancu kontrole, koju čine metanol (95%, v/v; 1 ml), gvožđe-sulfat (1,5 mM; 1 ml), vodonik-peroksid (6 mM; 0,7 ml) i natrijum-salicilat (20 mM; 0,3 ml), A_1 apsorbancu sa uzorkom, a A_2 apsorbancu bez natrijum-salicilata (smeša metanola (95%, v/v; 1 ml), gvožđe-sulfata (1,5 mM; 1 ml) i vodonik-peroksida (6 mM; 0,7 ml)).

4.5.4. Određivanje lipidne peroksidacije

Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije vršeno je primenom modifikovane metode po Ohkowi (Ohkowa N, 1979). Homogenizovano žumance jajeta (250 μ l, 10% u destilovanoj vodi, v/v) i 50 μ l ekstrakta su pomešani u epruveti i zapremina je dopunjena destilovanom vodom do 500 μ l. U smešu je dodato 25 μ l rastvora gvožđe-sulfata (0,07 M) i inkubirano 30 minuta na temperaturi od 37°C, da bi se indukovala lipidna peroksidacija. Zatim je dodato 750 μ l 20% sirćetne kiseline (*pH* 3,5), 750 μ l 0,8% tiobarbiturne kiseline (TBA) (w/v) (pripremljen u 1,1% natrijum-dodecilsulfata) i 25 μ l 20% trihlorsirćetne kiseline (TCA), promešano na Vorteksu i ostavljeno da stoji 60 min na temperaturi od 95°C. Nakon hlađenja, dodato je 3 ml *n*-butanola u svaku epruvetu i centrifugirano 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti. Merena je apsorbanca gornjeg organskog sloja u poređenju sa 3 ml butanola na talasnoj dužini od 532 nm. Za kontrolu je uzeto 50 μ l destilovane vode. Izračunavanje je vršeno prema sledećoj jednačini:

$$RSC(\%) = 100 \times (A_{kontrola} - A_{uzorka} / A_{kontrola})$$

Iz dobijenih RSC vrednosti je određena IC_{50} vrednost koja predstavlja koncentraciju ispitanog ekstrakta odgovornog za 50% inhibicije lipidne peroksidacije.

4.5.5. Visokoefikasna tečna hromatografija

Za hemijsku karakterizaciju ekstrakata bosiljka primenjena je odgovarajuća HPLC metoda (Grujić-Letić N, 2015).

Uslovi HPLC

- Kolona: Zorbax C-18 (4,6mm x 150mm, i.d., 5 μ m veličina čestica)
- Mobilna faza: A: 0,1% sirćetna kiselina u dejonizovanoj vodi

B: 0,1% sirćetna kiselina u acetonitrilu

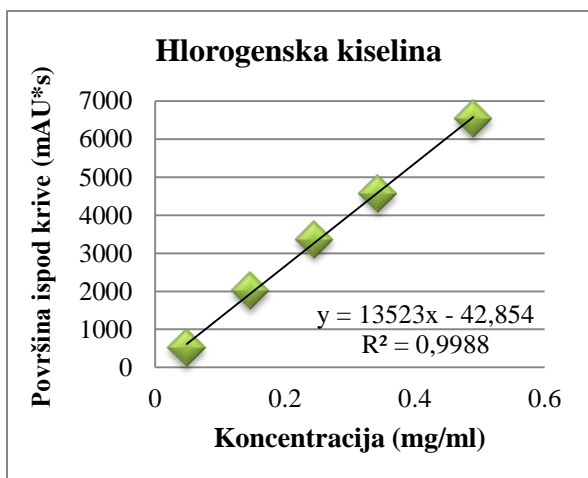
- Gradijentna elucija: 3,25 min – 10% B; 8 min – 12% B, 15 min – 25% B, 15,8 min – 30% B, 25 min – 90% B, 25,4 min – 100% B
- Injektovanje: 5µl
- Protok: 1 ml/min
- Temperatura: 25°C
- Pritisak: 134 bar
- Detekcija: 280 nm
- Ukupno trajanje analize: 30min

Priprema rastvora za kalibraciju

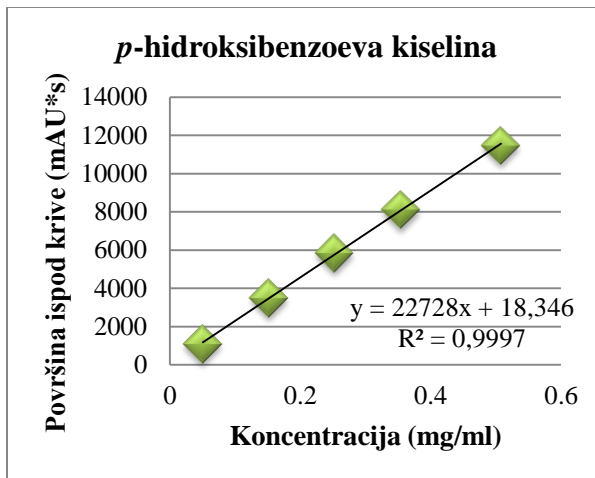
- Osnovni standardni rastvor A: 0,1 mg/ml kumarinske i cimetine kiseline. Pripremljen je tačnim odmeravanjem 2,5 mg standardnih supstanci koje su kvantitativno prenesene u normalni sud od 25 ml. Kao rastvarač se koristio metanol (95%, v/v).
- Osnovni standardni rastvor B: 0,5 mg/ml 4-hidroksibenzoeve, galne, vanilinske, ferulne, hlorogenske kiseline, naringenina, epikatehina, kvercetina, rutina. Pripremljen je tačnim odmeravanjem 12,5 mg datih standardnih supstanci koje su kvantitativno prenesene u normalne sudove od 25 ml. Kao rastvarač se koristio metanol (95%, v/v).
- Radni standardni rastvori C: dobijeni su uzimanjem 1, 3, 5, 7 ml osnovnog standardnog rastvora A, prenošenjem u normalni sud od 10 ml i dopunjavanjem istim rastvaračem do crte u cilju dobijanja rastvora koncentracija od 0,01-0,1 mg/ml.
- Radni standardni rastvori D: dobijeni su uzimanjem 1, 3, 5, 7 ml osnovnog standardnog rastvora B, prenošenjem u normalni sud od 10 ml i dopunjavanjem istim rastvaračem do crte u svrhu dobijanja rastvora koncentracije od 0,05-0,5 mg/ml.

10 µl je injektovano u HPLC sisitem i na osnovu dobijenih podataka konstruisane su kalibracione krive i date su regresione jednačine (koeficijenti pravca) (*grafikoni 3 a-j*).

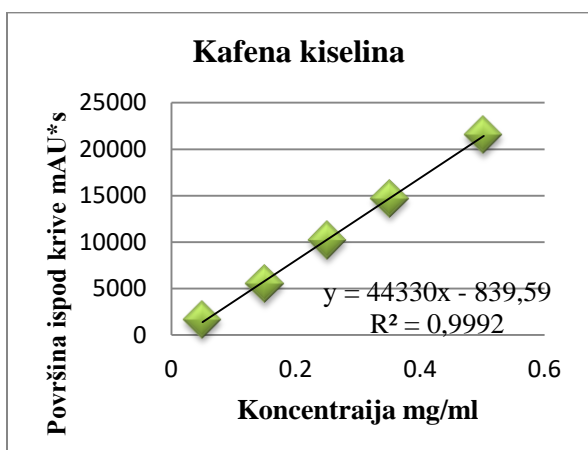
Hromatogram smeše standarda je prikazan na *slici 11*.



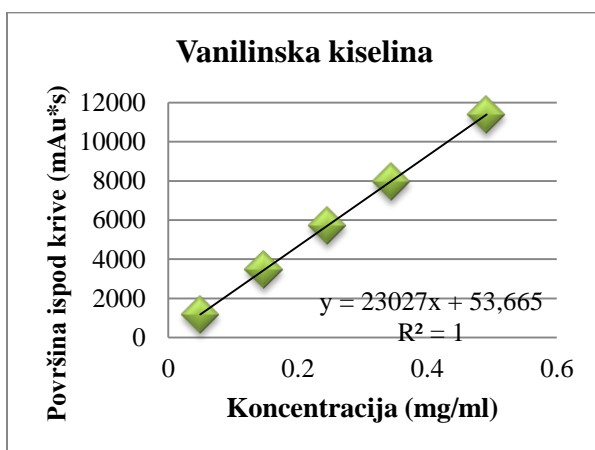
Grafikon 3a.



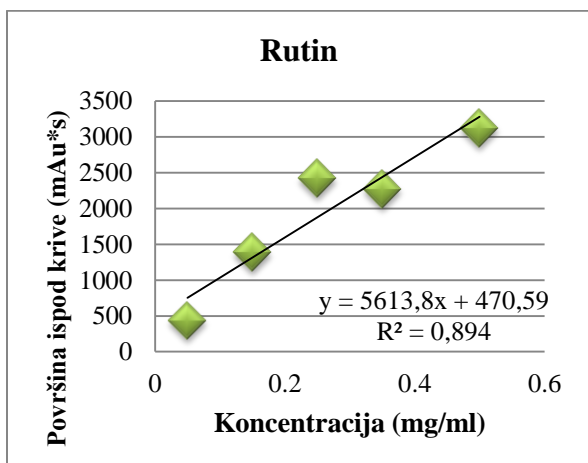
Grafikon 3b.



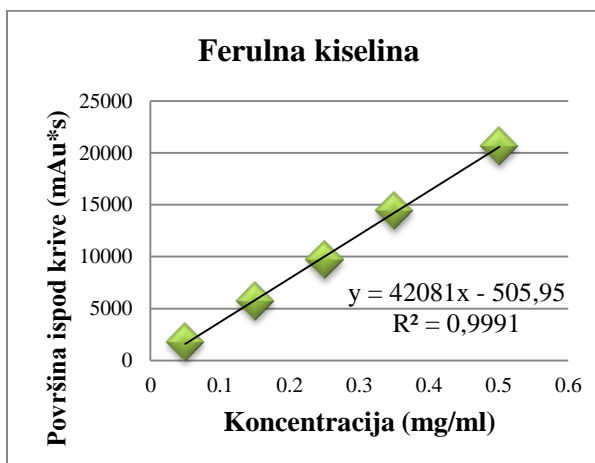
Grafikon 3c.



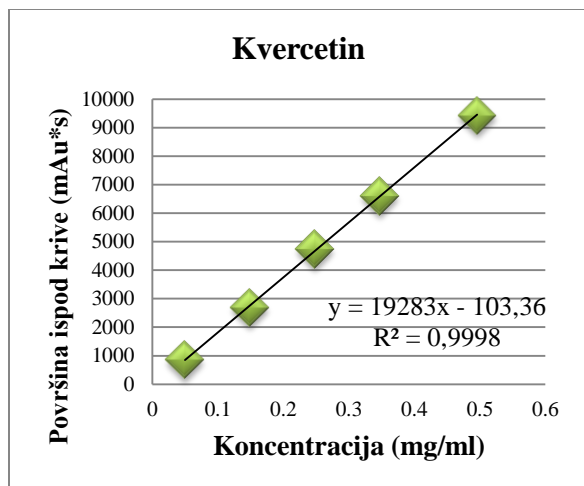
Grafikon 3d.



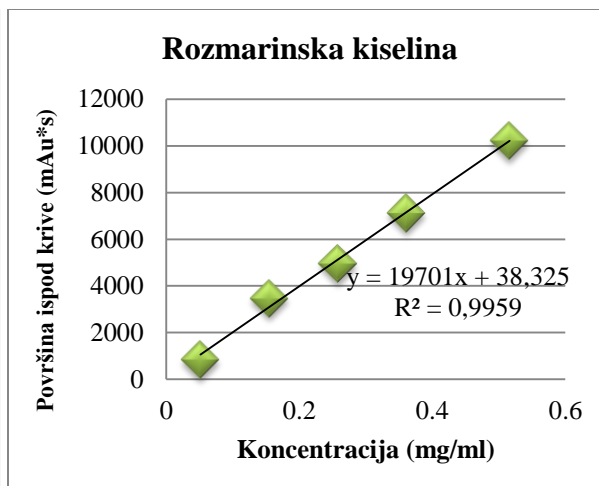
Grafikon 3e.



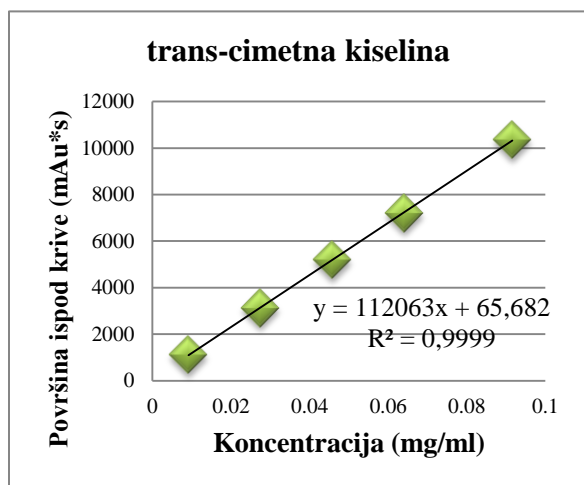
Grafikon 3f.



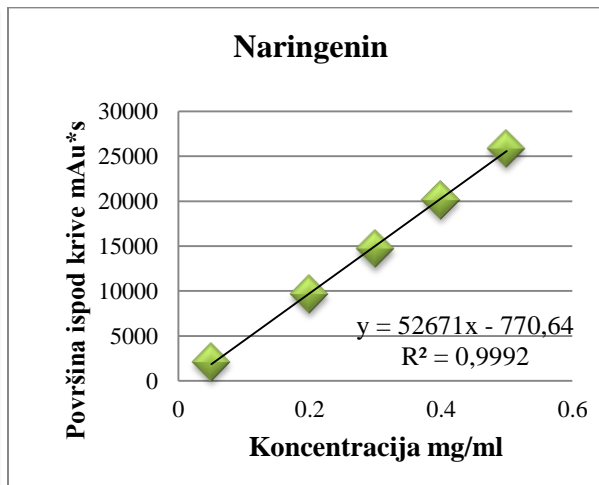
Grafikon 3g.



Grafikon 3h.



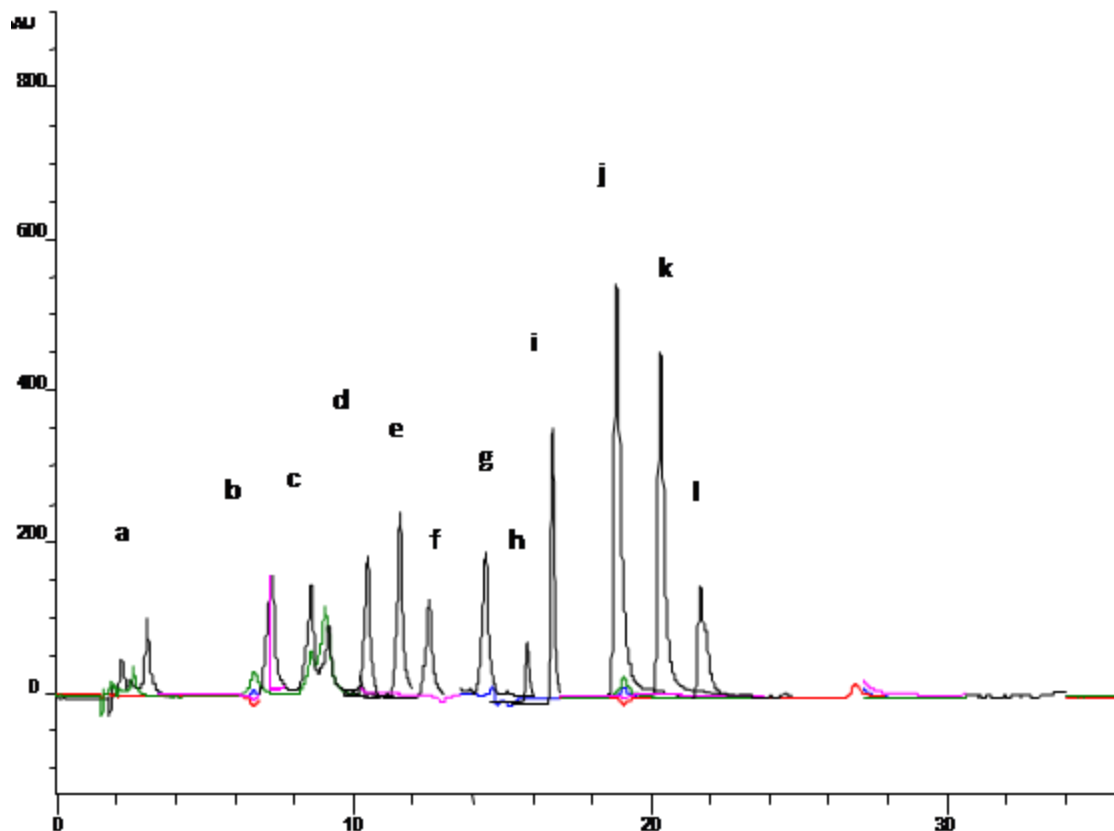
Grafikon 3i.



Grafikon 3j.

Grafikon 3. Dijagram zavisnosti površina ispod krivih od različitih koncentracija

- a) hlorogenske kiseline, b) p-hidroksibenzojeve kiseline, c) kafene kiseline, d) vanilinske kiseline,
e) rutina, f) ferulne kiseline, g) kvercetina, h) rozmarinske kiseline, i) trans-cimetne kiseline,
j) naringenina



Slika 11. HPLC hromatogram smeše standarda: a) galna kiselina, b) hlorogenska kiselina, c) p-hidroksibenzoeva kiselina, d) kafena kiselina, e) epikatehin, f) vanilinska kiselina, g) p-kumarinska kiselina, h) rutin, i) ferulna kiselina, j) kvercetin, k) trans-cimetna kiselina, l) naringenin

4.6. Farmaceutsko-tehnološka formulacija ekstrakta u mikrovezikule

1. Osnovni rastvor suvog ekstrakta bosiljka spp 200mg/ml napravljen je u vodi HPLC čistoće.
2. Osnovni rastvor kalcijum-hlorida dihidrata (Merck (Darmstadt, Germany)) napravljen je dodavanjem $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u vodi HPLC čistoće.
3. Osnovni rastvor natrijum-alginata (Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA)) napravljen je u vodi HPLC čistoće.

Osnovni rastvori su mešani svaki posebno u magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi oko 4h, a potom čuvani u frižideru na $+4-8^\circ\text{C}$ do daljeg korišćenja. Korišćeni su u okviru 48h od

pravljena. Mikrovezikule su pripremljene metodom mikroenkapsulacije mlazom zasnovane na Büchi sistemu. Parametri su postavljeni na 1500 Hz i konstantni protok od 4 ml/min. Jedan deo osnovnog rastvora ekstrakta bosiljka dodat je u 10 delova 1,5% rastvora natrijum-alginata, koji je potom u obliku mlaza u Büchi sistemu ubrizgavan u osnovni rastvor 2% kalcijum hlorida. Mikrovezikule su skupljane iz mikroenkapsulirajućeg sistema. Pripremljene su 3 serije koje su objedinjene i korišćene u eksperimentima na životinjama. Sve 3 serije mikrovezikula su pripremljene i tretirane na isti način. Efikasnost mikroenkapsulacije je izračunata kao procenat enkapsuliranog ekstrakta podeljenog sa količinom ukupno dodatog ekstrakta bosiljka i iznosio je 90%. Doza ekstrakta bosiljka koja je peroralno primenjena kod pacova u obliku mikrovezikula bila je 200 mg/kg (Goločorbin-Kon S, 2009; Mooranian A, 2014). Svi rastvarači i reagensi za izradu mikrokapsula su nabavljeni od Merck (Darmstadt, Germany) i korišćeni su bez dodatnog prečišćavanja.

4.7. *In vivo* ispitivanje hipoglikemijskog i hipolipidemijskog uticaja

U eksperimentu su korišćeni zdravi beli laboratorijski pacovi, muškog pola, soja Wistar, telesne mase 250-300 grama, odabrani metodom slučajnog izbora iz okota sa Vojno-tehničkog instituta u Beogradu. Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa "Vodičem za negu i upotrebu laboratorijskih životinja" (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Commission of Life Sciences, National Research Council, USA). Tokom eksperimenta životinje su boravile u standardnim laboratorijskim uslovima na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Sobna temperatura je bila 20-25°C, vlažnost vazduha 55% ± 1,5% sa ciklusom svetlost-tama po 12 sati. Životinjama je bio omogućen slobodan pristup hrani i vodi.

U ogledu je bilo ukupno 84 životinja, koje su se nakon završetka oglada prvo uvodile u uretansku anesteziju, a zatim su žrtvovane kardijalnom punkcijom u skladu sa etičkim principima postupanja sa laboratorijskim životinjama.

In vivo ispitivanja su se sprovodila po protokolu koji je odobrila Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu (broj rešenja: 01-90/4-4, od 06.04.2015.).

Životinje su bile podeljene u 14 grupa, u svakoj grupi je bilo 6 životinja. Prvih 6 grupa su bile zdrave eksperimentalne životinje, a drugih 8 grupa životinje kod kojih je izazvan dijabetes aloksanom ili oštećenje jetre paracetamolom.

- Prvoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davao fiziološki rastvor u dozi od 1 ml/kg (kontrola).
- Drugoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davalo 200 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta bosiljka.
- Trećoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davalo 4 mg/kg natrijumove soli monoketoholne kiseline.
- Četvrtoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davalo 200 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta bosiljka i 4 mg/kg natrijumove soli monoketoholne kiseline.
- Petoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davao ekstrakt bosiljka tipa mikrovezikula (200 mg/kg).
- Šestoj grupi zdravih životinja se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davao ekstrakt bosiljka tipa mikrovezikula (200 mg/kg) i 4 mg/kg natrijumove soli monoketoholne kiseline.
- Sedmoj grupi dijabetičnih životinja, kojoj je na početku oglada indukovana hiperglikemija rastvorom aloksana u dozi od 130 mg/kg, se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davao fiziološki rastvor u dozi od 1 ml/kg (kontrola).
- Osmoj grupi dijabetičnih životinja, kojoj je na početku oglada indukovana hiperglikemija rastvorom aloksana u dozi od 130 mg/kg, se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davalo 200 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta bosiljka.
- Devetoj grupi dijabetičnih životinja, kojoj je na početku oglada indukovana hiperglikemija rastvorom aloksana u dozi od 130 mg/kg, se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davalo 4 mg/kg natrijumove soli monoketoholne kiseline.
- Desetoj grupi dijabetičnih životinja, kojoj je na početku oglada indukovana hiperglikemija rastvorom aloksana u dozi od 130 mg/kg, se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davalo 200 mg/kg vodenog rastvora ekstrakta bosiljka i 4 mg/kg natrijumove soli monoketoholne kiseline.
- Jedanaestoj grupi dijabetičnih životinja, kojoj je na početku oglada indukovana hiperglikemija rastvorom aloksana u dozi od 130 mg/kg, se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davao ekstrakt bosiljka tipa mikrovezikula (200 mg/kg).

- Dvanaestoj grupi dijabetičnih životinja, kojoj je na početku oglada indukovana hiperglikemija rastvorom aloksana u dozi od 130 mg/kg, se peroralno tokom 7 dana, preko gastrične sonde, davao ekstrakt bosiljka tipa mikrovezikula (200mg/kg) i 4 mg/kg natrijumove soli monoketoholne kiseline.
- Trinaestoj grupi životinja se peroralno, preko gastrične sonde tokom 7 dana, davao fiziološki rastvor u dozi od 1ml/kg, a poslednjeg dana tretmana je indukovani oksidativni stres rastvorom paracetamola u dozi od 300 mg/kg.
- Četrnaestoj grupi životinja se peroralno, preko gastrične sonde, tokom 7 dana, davalo 200mg/kg vodenog rastvora ekstrakta bosiljka, a poslednjeg dana tretmana je indukovani oksidativni stres rastvorom paracetamola u dozi od 300 mg/kg.

Za indukciju hiperglikemije kod eksperimentalnih životinja je upotrebljen rastvor aloksana (alloxan monohydrate, Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA). Zbog velike nestabilnosti aloksana, rastvor je pripreman neposredno pre primene. Rastvor aloksana je dat intraperitonealno u jednokratnoj dozi od 130 mg/kg. Nakon 48 sati od primene aloksana uzeta je krv iz repne vene i izmerena je koncentracija glukoze u krvi. Životinje koje su imale koncentracije glukoze u krvi veće od 15 mmol/l su bile uključene u dalji tok ispitivanja.

Hipoglikemijska aktivnost vodenog ekstrakta bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline je procenjivana i testom oralnog podnošenja glukoze (OGTT test) u pojedinim grupama normoglikemičnih pacova. U cilju izvođenja ovog testa životinje su primile vodeni rastvor glukoze u dozi od 3 g/kg *per os*. Pre primene vodenog rastvora glukoze određivana je startna glikemija, a zatim nakon 30 minuta od primene istog ponovo je merena vrednost glikemije (Rašković A, 2008; Jakovljević V, 2006; Mikov M, 2008).

Koncentracija glukoze u kapilarnoj krvi, uzeta iz repne vene pacova, određivana je komercijalnim kitovima na aparatu Accu-check Active (Roche Bazel, Švajcarska). Koncentracija glukoze u krvi eksperimentalnih životinja merena je neposredno pre početka tretmana, 48h nakon primene aloksana (da bi se utvrdilo da li je indukovani dijabetes) kao i na kraju oglada.

Poslednjeg dana eksperimenta, 2 sata nakon sprovedenog tretmana, životinje su anestetizirane 25% rastvorom uretana (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA), u dozi od 0,75 g/kg, intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane kardiopunkcijom, u cilju uzimanja dovoljne količine krvi i unutrašnjih organa neophodnih za dalja ispitivanja.

Pored praćenja koncentracija šećera u krvi tokom tretmana, nakon tretmana životinja ekstraktom bosiljka i/ili monoketoholnom kiselinom urađena su biohemijska i toksikološka ispitivanja nakon žrtvovanja i uzimanja potrebnih uzoraka.

Biohemijska i toksikološka ispitivanja su uključivala merenje aktivnosti enzima u homogenatu unutrašnjih organa:

- lipidna peroksidacija,
- katalaza,
- glutation reduktaza,
- glutation-S-transferaza,
- glutation peroksidaza.

U serumu su bili određivani:

- aktivnost aspartat aminotransferaze,
- aktivnost alanin aminotransferaze,
- koncentracija uree,
- koncentracija kreatinina,
- koncentracija mokraćne kiseline,
- lipidni status.

4.8. *Ex vivo* ispitivanje antioksidativne aktivnosti

Uzorci organa su, u cilju dobijanja grubog homogenata, pomešani sa fiziološkim rastvorom u odnosu 1:4 (jedan deo jetre : četiri dela fiziološkog rastvora) i homogenizovani na temperaturi između 0 i 4° C koristeći električni homogenizator tipa B, Braun, Potter S (Melsungen, Nemačka). Nakon toga, uzorak je držan u ultrazvučnom kupatilu 2 min, potom centrifugiran 15 min na 3500 obrtaja/min, nakon čega se izdvajao supernatant i dobila denukleirana frakcija (citosol). Određivanje parametara oksidativnog stresa u homogenatu tkiva vršeno je spektrofotometrom, Agilent 8453 UV/Vis (Santa Klara, SAD).

Morfološka ispitivanja su uključivala histološku obradu uzetih organa, koristeći standardne metode bojenja preparata, kao i imunohemijske analize sa posebnim akcentom na beta ćelije pankreasa i insulin.

4.8.1. Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina u grubom homogenatu i citosolnim frakcijama jetre vršeno je biuretskom metodom koja se zasniva na reakciji peptidske veze sa jonima bakra u alkalnoj sredini, pri čemu se stvara ljubičasto obojeni kompleks. Intenzitet obojenja je srazmeran koncentraciji proteina i meri se na 540 nm. Određivanje koncentracije proteina je izvedeno pomoću komercijalnog kit-a firme Sentinel Diagnostic (Milan, Italy), prema uputstvima proizvođača.

Postupak rada. U 1 ml reagensa (6 mmol CuSO₄, 6 mmol KJ, 0,75 mmol NaOH, pH ≥ 10) dodato je 0,01 ml uzorka. U slepu probu je umesto uzorka dodato 0,01 ml destilovane vode, a u standard 0,01 ml rastvora standarda (6g/dl). Reakciona smeša je dobro pomešana i nakon 15 min merila se apsorbanca standarda (AS) i uzorka (AU), normalizovana u odnosu na slepu probu.

Izračunavanje:

$$(AS/AU) \times 6 = \text{g ukupnih proteina/ dl uzorka}$$

4.8.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Metoda je zasnovana na reakciji tiobarbiturine kiseline sa malondialdehidom iz uzoraka, koji nastaje u procesu lipidne peroksidacije, odnosno kada reaktivne kiseonične vrste razgrađuju polinezasićene masne kiseline iz ćelijskih membrana. MDA je prihvaćeni pokazatelj lipidne peroksidacije pa se koristi u evaluaciji oksidativnog stresa. U uslovima visoke temperature i u kiseloj sredini MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat crvene boje koji ima maksimum apsorpcije monohromatske svetlosti na talasnoj dužini od 535 nm (Guéraud F, 2010).

Postupak rada. x μl uzorka (100-500) grubog homogenata jetre pomešano je sa 1 ml rastvora smeše tiobarbiturine kiseline (0,375% w/v) i trihlorsirćetne kiseline (15% w/v) u 0,25 M hlorovodoničnoj kiselini, izmešano vorteksovanjem i zagrevano u vodenom kupatilu 15 minuta na 90°C. Nakon zagrevanja, epruvete su bile na ledu 5 min i potom centrifugirane 10 minuta na 10000 obrtaja/minuti. Koncentracija MDA je određivana iz supernatanta spektrofotometrijski na 535 nm uz TCA-TBA-HCl reagens kao slepa proba, prema sledećoj formuli:

$$C_{\text{MDA}} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 10}{1,56 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

Pri čemu je: ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml], V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml], V_{uz} - zapremina uzorka [ml].

Molarni apsorpcioni koeficijent za konjugat MDA-TBA iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Koncentracija MDA je izražena u nmol/mg proteina (Gueraud, 2010).

4.8.3. Određivanje specifične aktivnosti katalaze

Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik-peroksida u prisustvu katalaze na 240 nm.

Postupak rada. 0,05 M fosfatni pufer ($pH=7,0$) podešen je sa 30 % vodonik-peroksidom tako da apsorbance slepe probe na 240 nm bude 0,525-0,550. U 1,5 ml podešenog rastvora H_2O_2 u fosfatnom puferu dodato je 10 μl uzorka nakon čega odmah započinje reakcija. Pad apsorbance je praćen na 240 nm tokom tri minuta na temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje:

$$\text{spec aktivnost CAT} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{43,6 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

Pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml], V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml], V_{uz} - zapremina uzorka [ml].

Specifična aktivnost CAT se izražava u jedinicama aktivnosti na mg proteina (Aebi H, 1974).

4.8.4. Određivanje specifične aktivnosti glutacione reduktaze

Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog (GSSG) u redukovani glutation (GSH).

Postupak rada. U spektrofotometrijsku kivetu sipano je 0,2 ml fosfatnog pufera (0,5 M, $pH=7,4$), 0,035 ml oksidovanog glutationa GSSG (2 mM), 0,035 ml uzorka i vode do 1 ml. Reakcija otpočinje dodatkom 0,035 ml NADPH (0,1 mM). Optimalna temperatura reakcije je $37^{\circ}C$. Pratila se promena apsorbance u toku 3 minuta, a aktivnost se izračunavala pomoću jednačine:

$$\text{spec aktivnost GR} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 1000}{6,22 \times V_{uz} \times C_{pr}}$$

Pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml], V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml], V_{uz} - zapremina uzorka [ml].

Aktivnost GR se izražava u specifičnim jedinicama aktivnosti na mg proteina. Specifična jedinica aktivnosti je definisana kao broj nmol NADPH oksidovanih u minuti po mg proteina (Glatzle D, 1974).

4.8.5. Određivanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze

Glutation-S-transferaza katalizuje reakciju 1-hloro-2,4-dinitro benzena (CDNB) sa -SH grupom glutationa. Nastali CDNB-S-glutation ima maksimum apsorpcije na 340 nm. Meranjem promene apsorpcije na toj talasnoj dužini određuje se aktivnost enzima.

Postupak rada. U kvarcnu spektrofotometrijsku kivetu sipano je 200 μ l fosfatnog pufera (0,5 M, $pH=6,5$), 20 μ l CDNB (25 mM u 95% etanolu) i 680 μ l destilovane vode. Nakon inkubacije smeše u trajanju od 10 min na $37^{\circ}C$ dodato je 50 μ l redukovano glutationa (20 mM) i 50 μ l uzorka homogenata tkiva, odnosno ćelija. U slepu probu je umesto uzorka dodato 50 μ l destilovane vode. Promena apsorbance je praćena tokom 3 min na 340 nm.

Izračunavanje:

$$\text{spec aktivnost GST} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 1000}{9,6 \times V_{uz} \times C_{pr}}$$

Pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe, C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml], V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml], V_{uz} - zapremina uzorka [ml].

Aktivnost GST se izražava u specifičnim jedinicama aktivnosti na mg proteina [nmol GSH/min/mg proteina (Beutler E, 1984).

4.8.6. Određivanje specifične aktivnosti glutacione peroksidaze

Glutacione peroksidaze kataliziraju redukciju organskog peroksida uz nastajanje oksidovanog glutationa, GSSG. GSSG se ponovo redukuje do GSH uz NADPH (kao donora redukcionih ekvivalenata), a reakciju katalizira enzim glutacione reduktaze. Aktivnost GPx se prati spektrofotometrijski, indirektno, praćenjem pada apsorbanca na 340 nm koja potiče od NADPH.

Postupak rada. U spektrofotometrijsku epruvetu sipano je 0,5 ml destilovane vode, 0,1 ml rastvora redukovano glutationa (10^{-3} M), 0,2 ml rastvora NADPH (0,2 mM u 1% NaHCO_3), 0,035 ml EDTA (1 mM), 0,1 ml fosfatnog pufera (0,5 M, $\text{pH}=7,0$), 0,035 ml *t*-butilhidroperoksida (0,03 M) i 50 μl uzorka. Smeša je inkubirana 10 min na 37°C , nakon čega reakcija počinje dodavanjem 20 μl GR (10 U/mg proteina). Apsorbanca je očitavana na 340 nm u toku 3 min. U slepu probu je umesto GR dodato 1,7 μl destilovane vode.

Izračunavanje:

$$\text{spec aktivnost GPx} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{6,22 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

Pri čemu je: ΔA_{uz} - srednja promena apsorbanca uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja promena apsorbanca slepe probe, C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml], V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml], V_{uz} - zapremina uzorka [ml].

Specifična aktivnost GPx se izražava kao broj nmol NADPH oksidovanih po minuti po mg proteina (Paglia DE, 1967).

4.9. Morfološka ispitivanja

4.9.1. Histološka obrada tkiva

Nakon žrtvovanja jedinki, detaljne obdukcije i makroskopske opservacije uzeti su sledeći organi za histološku analizu: bubreg, jetra i pankreas. Uzorci tkiva su fiksirani u *Bouin*-ovom fiksativu na 4°C tokom 24h. Nakon fiksacije iseći tkiva su dehidrirani u rastućim koncentracijama izopropil alkohola (70%, 80%, 96% i 100%), ukalupljeni u parafin i sečeni na rotacionom

mikrotomu (Leica, Nemačka) na debljinu od 5 μm . Svi iseći tkiva bojani su standardnom histološkom metodom hematoksilin i eozin, a materijal pankreasa je dodatno podvrgnut imunohistohemijskom bojenju na insulin i glukagon. Histološke pločice su analizirane pod profesionalnim svetlosnim biološkim mikroskopom marke Leica DMLB 100T (Leica, Nemačka), a histološki detalji su fotografisani pod specijalnom mikroskopskom kamerom marke Leica MC190HD (Leica, Nemačka).

4.9.2. Morfometrijska analiza tkiva

Nakon kvalitativne, usledila je kvantitativna/morfometrijska analiza tkiva jetre i pankreasa u cilju utvrđivanja stepena oštećenja pomenutih organa.

Analiza tkiva jetre. Na presecima jetre, korišćenjem digitalne kamere na uvećanju od 100 puta za svaku eksperimentalnu grupu, fotografisano je po 20 nasumično odabranih vidnih polja. Na tako dobijenim mikrofotografijama, pomoću kompjuterskog programa *Image J* izvršena je procena oštećenja parenhima. Metodom brojanja tačaka koje padaju na oštećeni parenhim utvrđen je procenat zastupljenosti oštećenja, odnosno površinska gustina.

Analiza tkiva pankreasa. Na presecima pankreasa, korišćenjem digitalne kamere na uvećanju od 50 puta za svaku eksperimentalnu grupu, fotografisano je po 10 nasumično odabranih vidnih polja. Na tako dobijenim mikrofotografijama određen je procenat endokrinog pankreasa (*ili odnos endokrinog : egzokrinom parenhimu pankreasa*). U programu *Image J* je metodom brojanja tačaka koje padaju na endokrini deo parenhima utvrđen procenat, odnosno površinska gustina.

4.9.3. Imunohistohemijsko bojenje

Za bojenje tkiva su korišćena primarna antitela insulin Ab-6 (Lab Vision – Thermo scientific) i glukagon Ab-1 (Lab Vision – Thermo scientific) i sistem za vizuelizaciju - UltraVision LP Detection System HRP Polymer & AEC Chromogen (Lab Vision – Thermo scientific) istog proizvođača, tako da je metoda bojenja, osim dela aplikacije primarnog antitela, bila istovetna za oba antitela po protokolu propisanom od strane proizvođača. Po rehidraciji isečaka ("dovođenja do vode") isti su podvrgnuti retrieval reakciji koja je podrazumevala zagrevanje isečaka u citratnom puferu (pH 6,0) na 850W u mikrotalasnoj peći tokom 20 minuta, nakon čega je usledilo hlađenje preparata u trajanju od 30 minuta. Po završetku hlađenja iseći su isprani četiri puta u puferu (TBS,

pH 7,4) i potom u cilju otklanjanja nespecifičnog pozadinskog bojenja inkubirani 10-15 minuta u Hydrogen Peroxide Block (Lab Vision, TA-015-HP), zatim ispirani četiri puta u puferu i inkubirani 5 minuta u Ultra V Block (Lab Vision TA-015-UB). Po ispiranju u puferu aplikovano je odgovarajuće primarno antitelo insulin – ready to use, glukagon – (u razblaženju 1:100) u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Isečci su potom podvrgnuti tretmanu Primary Antibody Enhancer (Lab Vision, TL-015-PB) u trajanju od 20 minuta. Nakon ispiranja puferom isečci su 30 minuta podvrgnuti HRP Polymer-u (Lab Vision, TL-015-PH). Vizuelizacija je izvršena primenom AEC Chromogen-a (Lab Vision, TA-015-SA). Bojenje i kontrastiranje bazofilnih struktura je izvršeno primenom *Majer*-ovog hematoksilina, a preparati su montirani upotrebom adheziva na vodenoj bazi (Bio-Optica). Preparati su analizirani i fotografisani na mikroskopu marke Leica DMLB 100T pri uveličanju 200x i 630x i fotografisani kamerom marke Leica MC 190.

4.9.4. Statistička obrada histoloških rezultata

Statistička obrada dobijenih rezultata histologije je vršena primenom programa IBM SPSS Statistics 20.0. Procena značajnosti razlika u procentu oštećenja jetre i vrednosti procenta površinske gustine endokrinog pankreasa je vršena jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc analizom. Statistički značajnim razlikama smatrane su vrednosti $p < 0,05$.

4.10. Statistička obrada podataka

4.10.1. SPSS

Statistička obrada dobijenih *in vivo* rezultata ispitivanja je rađena statističkim programom IBM SPSS Statistics, verzija 21. Kao mera centralne tendencije neke grupe korišćena je aritmetička sredina (\bar{x}), a mera varijacije među podacima je izražena standardnom devijacijom (σ). Statistička značajnost razlika određenih grupa je ispitivana Student-ovim T-testom za nezavisne uzorke. Vrednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnim. Rezultati su predstavljeni tabelarno.

4.10.2. Hemometrijska analiza

Statistička obrada dobijenih *in vitro* rezultata ispitivanja je rađena primenom hemometrijskih analiza. Hemometrija predstavlja multidisciplinarnu naučnu oblast, koja primenom multivarijantne statistike, primenjene matematike i informatike, uspešno rešava kako deskriptivne tako i prediktivne eksperimentalne probleme u prirodnim naukama (hemiji, biohemiji, medicini, biologiji i hemijskom inženjerstvu). Ona ima mogućnost da jednostavno i efikasno na osnovu saznanja o fizičko-hemijskim osobinama nekog jedinjenja, strukturi molekula, i dr. predvidi njegovo ponašanje i klasifikuje ga u određenu kategoriju. U opisnim aplikacijama ona se primenjuje za modelovanje hemijskih sistema u cilju upoznavanja osnovnih odnosa i strukture, dok se u prediktivnim aplikacijama osobine hemijskih sistema modeluju u cilju predviđanja osobina novih. U oba slučaja skupovi podataka mogu biti različite voluminoznosti i složenosti.

Iako bi se moglo reći da je čak i u najstarijim analitičkim eksperimentima uključen neki vid hemometrije, ona je priznata tek sedamdesetih godina prošlog veka (Wold S, 1995), a na popularnosti dobija masovnijom primenom računara u prirodnim naukama.

Multivarijantna analiza spada u najznačajniju oblast hemometrije već od njene najranije primene u hemiji. Velik broj hemijskih merenja, kao npr. rezultati IC, UV, VIS i masene spektroskopije kao i NMR i hromatografske analize, po prirodi su multivarijantne. Analiza eksperimentalnih podataka ovakvih struktura se vrlo uspešno rešava primenom multivarijacionih analiza kao što su klaster analiza (Cluster Analysis-CA) ili analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis-PCA).

Klaster analiza (Cluster Analysis, CA) je statistička tehnika u okviru multivarijacione analize koja se primenjuje u cilju smanjenja voluminoznosti analiziranih podataka (npr. eksperimentalnih rezultata), a čija je primarna svrha grupisanje podataka u klastere na osnovu karakteristika koje poseduju. Klaster analiza sve veću primenu nalazi u različitim granama nauke i privrede za kategorizaciju odnosno klasifikaciju velikog broja podataka, s obzirom na njihovu sličnost, odnosno različitost.

Termin klaster potiče od engl. reči **cluster** (grupa "istorodnih stvari", grupisanje). Klaster analiza se naziva i Q analiza, tipologija gradnje, klasifikacijska analiza i numerička taksonomija.

Ova raznovrsnost u nazivima potiče usled primene Klaster analize u različitim naučnim disciplinama.

Klaster analiza ima mogućnost klasifikacije objekata (eksperimentalnih podataka, ili drugih objekata) na osnovu sličnosti sa drugim objektima u klasteru, uz poštovanje nekog unapred određenog kriterijuma selekcije. Nastale grupe objekata imaju visok interni homogenitet (sličnost) unutar klastera i visoku eksternu različitost između klastera. Grupisanje podataka u klaster analizi se može vršiti na osnovu različitih mera sličnosti odnosno različitosti analiziranih podataka. Odabir pravog načina određivanja sličnosti odnosno različitosti između podataka koji formiraju jedan klaster je veoma važan, pošto u velikoj meri utiče na dobijene rezultate, odnosno na oblik i formu dobijenih klastera.

Bazna podela klaster analize se obično vrši na osnovu primenjenih algoritama i to na hijerarhijsku ili nehijerarhijsku klaster analizu. Hijerarhijska klaster analiza nove klasterne formira u odnosu na već postojeće, dok se kod nehijerarhijske klaster analize svi klasteri formiraju istovremeno. Hijerarhijski postupci podrazumevaju izgradnju jedne hijerarhijske strukture nalik drvetu (dendrogram), pri čemu vertikalna skala dendrograma opisuje sličnost između analiziranih podataka. U prirodnim naukama je mnogo više zastupljena hijerarhijska klaster analiza, dok se nehijerarhijska više primenjuje pri analizi veoma velikog broja podataka (>200).

Hijerarhijska klaster analiza može biti tzv. aglomerativna (*spajajuća*) i divizionna (*deleća*). Aglomerativna hijerarhijska klaster analiza polazi od pojedinačnih podataka koje povezuje u sve veće klasterne, dok divizionna klaster analiza kao polazni objekat ima jedan klaster u kome se nalaze svi podaci, koje zatim deli do pojedinačnih podataka. Dominantno se u naučnim istraživanjima koristi hijerarhijska "aglomerativna" metoda.

Najveću prednost klaster analize predstavlja mogućnost uspešne klasifikacije i kategorizacije velikog broja eksperimentalnih podataka različitog porekla. Kao nedostatak klaster analize uglavnom se navodi činjenica da ona nema statističku osnovu kojom se mogu formirati statistički zaključci iz uzorka i da rešenja nisu jedinstvena, pošto rezultat klaster analize u potpunosti zavisi od varijabli koje su korišćene kao osnova za meru sličnosti. Dodavanja ili brisanja relevantnih varijabli mogu imati značajan uticaj na rezultat.

Analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA) predstavlja jednu od najjednostavnijih multivarijantnih tehnika baziranih na svojstvenom vektoru matrice (*eigenvector*). Uspešno se primenjuje za analizu velikog broja eksperimentalnih podataka u slučaju

kada oni sadrže redundantne podatke, odnosno kada se veći broj podataka odnosi na istu dimenziju i kada one ne pružaju nikakvu dodatnu informaciju koja već nije obuhvaćena nekim drugim podatkom (varijablom). Ovu tehniku je prvi put opisao Karl Pearson 1901. godine (Pearson K, 1901). Iako je vršio izračunavanja sa samo dve ili tri varijable, Pearson je verovao da se Analiza glavnih komponenti može upotrebiti i za rešavanje problema sa mnogo više promenljivih. Opis izračunavanja je dat mnogo kasnije od strane Hotelling-a, 1933. godine (Hotelling H, 1933). U većini slučajeva izračunavanja su bila previše komplikovana i zamorna kada je trebalo napraviti analizu sa većim brojem varijabli i iz tog razloga široka upotreba Analize glavnih komponenti je usledila zapravo tek sa pojavom računara.

Analiza glavnih komponenti zauzima sve veći značaj u prirodnim naukama, pošto ima sposobnost da prepozna i eliminiše suvišne podatke iz eksperimentalnih rezultata i tako ostvari značajno smanjenje njihovog broja uz minimalan gubitak informacija. Primenom Analize glavnih komponenti se redukuje broj raspoloživih podataka, a kao rezultat dobijaju se nove promenljive tzv. glavne komponente (principal components, PC). Glavna komponenta, PC, u stvari predstavlja linearnu kombinaciju originalnih promenljivih (X_1, X_2, \dots, X_n). Na primer, prva glavna komponenta se može izračunati:

$$PC_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n$$

pod uslovom da je:

$$a_{11}^2 + a_{12}^2 + \dots + a_{1n}^2 = 1$$

Pri čemu a_{11} - a_{1n} predstavljaju koeficijente glavnih komponenti odnosno svojstvene vektore matrice (*eigenvectors*). Varijansa izvedene promenljive PC1, $\text{Var}(PC_1)$, je zbog postavljenog uslova maksimalna. Navedeni uslov je postavljen, jer bez njega $\text{Var}(Z_1)$ bi mogla da se povećava jednostavnim povećavanjem bilo koje od vrednosti a_{1n} .

U toku analize se dobija onoliko glavnih komponenti koliko je promenljivih (n) bilo u sistemu. Prva glavna komponenta, PC1, predstavlja maksimalni udeo ukupnih promenljivih. Druga glavna komponenta, PC2 obuhvata maksimalni udeo rezidualne promenljive, a da pri tome ne korelira sa PC1. Na istom principu se formiraju i ostale glavne komponente, sve dok se ukupna varijansa ne izračuna. U praktičnom radu obično je dovoljno zadržati samo nekoliko glavnih komponenti, čiji zbir obuhvata velik procenat ukupne promenljive (obično >90%) (Vandeginste BMG, 1998; Otto M, 2007).

Analiza glavnih komponenti se u suštini svodi na pronalaženje svojstvene vrednosti (*eigenvalues*), λ , matrice kovarijansi uzorka. Formira se takva matrica, da dijagonalni elementi matrice predstavljaju varijanse originalnih promenljivih X_i , dok elementi van dijagonale predstavljaju kovarijanse originalnih promenljivih X_i .

Svojstvena vrednost matrice, λ_i , u suštini predstavlja varijansu glavne komponente PC_i , odnosno $\lambda_i = \text{Var}(PC_i)$. Postoji onoliko svojstvenih vrednosti matrice koliko ima glavnih komponenti. Važna osobina λ_i je da je njihov zbir jednak zbiru elemenata na dijagonali matrice. Iz ovoga proizilazi da je suma varijansi originalnih varijabli jednaka sumi varijansi izvedenih varijabli. To znači da glavne komponente obuhvataju sve varijacije originalnih podataka. Svaka glavna komponenta predstavlja u suštini svojstveni vektor (*eigenvector*) matrice koji je opisan svojstvenom vrednošću matrice (*eigenvalues*). Svojstvena vrednost matrice je važna pri Analizi glavnih komponenti pošto ukazuje na udeo ukupne varijanse koja je opisana datom glavnim komponentom (PC) (Miller JN, 2004).

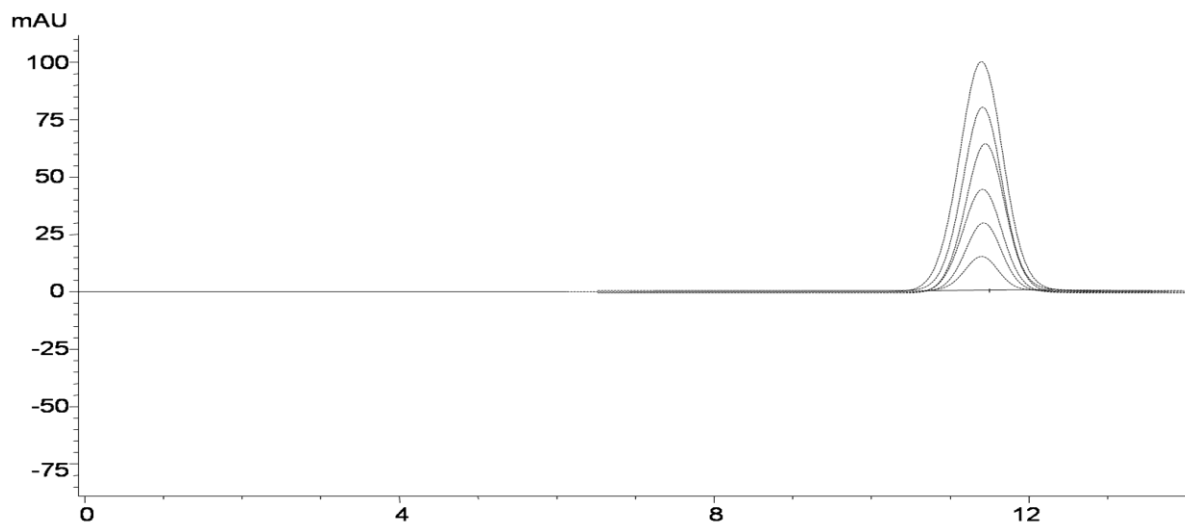
Da ne bi došlo do prejakog uticaja neke od originalnih varijabli na glavne komponente i da se ne bi stvarala pristrasnost rezultata, pre Analize glavnih komponenti potrebno je izvršiti standardizaciju originalnih varijabli. U toku procesa standardizacije originalne varijable se kodiraju tako što se svedu na nultu aritmetičku sredinu i varijansu jednaku jedinici. Na ovaj način se svim varijablama daje isti značaj u analizi. Kada se ne bi uradila standardizacija, one varijable koje imaju velike numeričke vrednosti imale bi veći uticaj kod izračunavanja glavnih komponenti.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. *In vitro* ispitivanja

5.1.1. Validacija HPLC metode za određivanje hlorogenske kiseline

Validacija HPLC metode za određivanje hlorogenske kiseline vršena je na osnovu postupaka opisanih u USP 24 (United States Pharmacopoeia), ICH smernicama (International Conference on Harmonization 1995; International Conference on Harmonization 1997) i drugoj literaturi (Heyden YV, 2001). Radni standardni rastvori hlorogenske kiseline se injektuju i propuštaju kroz kolonu pod odabranim hromatografskim uslovima (*slika 12*).

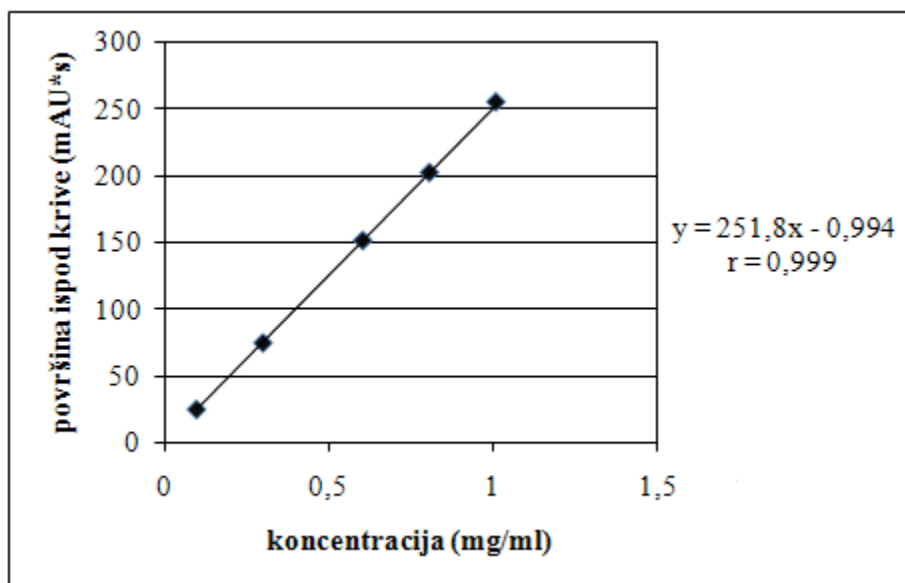


Slika 12. Hromatogram standardnih rastvora hlorogenske kiseline

Zatim se konstruiše dijagram zavisnosti površine ispod krive (mAU*s) i koncentracije (mg/ml) hlorogenske kiseline na osnovu dobijenih površina ispod krivih na hromatogramu. Dobijeni rezultati su prikazani u *tabeli 5* i na *grafikonu 4*.

Tabela 5. Retenciono vreme i površine ispod krivih različitih masa hlorogenske kiseline pri HPLC analizi

Redni broj standarda	Rt [min]	Površina ispod krive [mAU*s]	Koncentracija [mg/ml]
1	13,324	25,1911	0,101
2	13,428	74,8446	0,303
3	13,378	151,1112	0,606
4	13,511	201,6691	0,808
5	13,355	254,3282	1,01



Grafikon 4. Dijagram zavisnosti površina ispod krivih od različitih masa hlorogenske kiseline

Statističkom obradom podataka metodom najmanjih kvadrata izračunati su limit detekcije (LD), limit kvantifikacije (LQ), kao i parametri jednačine prave $y=ax+b$ (x je koncentracija, a y površina ispod krive $y=mAU*s$) (**tabela 6**). Dobijen koeficijent korelacije ($r=0,999$) ukazuje da postoji visoka korelacija između x i y, tj. između koncentracije i površine ispod krive.

Tabela 6. Rezultati statističke obrade podataka dobijenih analizom hlorogenske kiseline primenom HPLC metode

	Hlorogenska kiselina
Odsečak a	251,8
Nagib b	0,994
Koeficijent korelacije r	0,999
Koeficijent determinacije R ²	0,999
Koncentracioni opseg u kom je rađeno (mg/ml)	0,1 – 1,00
LD (mg/ml)	0,0026
LQ (mg/ml)	0,0087

Upoređivanjem teorijskih vrednosti (tačnih vrednosti) koncentracija hlorogenske kiseline sa eksperimentalno dobijenim vrednostima dobijeni su sledeći rezultati (**tabela 7**):

Tabela 7. Rezultati tačnosti određivanja hlorogenske kiseline

Teorijske koncentracije hlorogenske kiseline (mg/ml)	Eksperimentalno određene koncentracije hlorogenske kiseline (mg/ml)	Recovery R (%)
0,101	0,0991 ± 0,0009	98,12
0,303	0,2889 ± 0,0014	95,35
0,606	0,6001 ± 0,0016	99,03
0,808	0,8151 ± 0,0022	100,88
1,01	0,9655 ± 0,0009	95,59
	R ± 2SD (%)	97,79 ± 4,68

Na osnovu podataka dobijenih za recovery (97,79± 4,68 %) možemo zaključiti da ovaj postupak određivanja hlorogenske kiseline ima dobru *tačnost*.

Preciznost i *ponovljivost* određivanja ispitana je analizom tri različite koncentracije standarda u šest ponavljanja. Dobijeni rezultati su prikazani u **tabeli 8**.

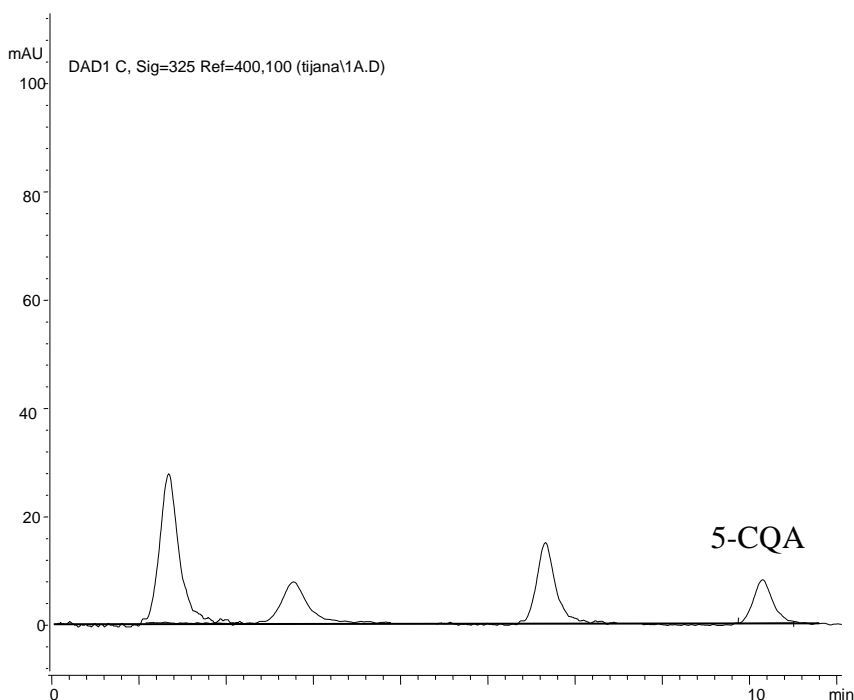
Tabela 8. Rezultati ispitivanja ponovljivosti i preciznosti određivanja hlorogenske kiseline

Teorijske koncentracije (mg/ml)	Retenciono vreme (min)	Površina ispod pika (mAu*s)
0,101	13,323 ± 0,009	25,222 ± 0,154
0,606	13,382 ± 0,006	151,188 ± 0,228
1,01	13,359 ± 0,004	254,389 ± 0,435
RSD(%)	0,029-0,067	0,15-0,61

Rezultati iz **tabele 8** pokazuju da relativne standardne devijacije (RSD) za površine ispod krivih i retenciona vremena iznose manje od 1,2% što znači da izabrani metod određivanja ima zadovoljavajuću ponovljivost.

Ispitivanjem uticaja neznatno izmenjenih uslova hromatografije određena je *robustnost* metode. Posmatrani su uticaji različite temperature kolone ($\pm 1^\circ\text{C}$), protoka ($\pm 0,05$ mL/min) i talasne dužine na kojoj se vrši detekcija (± 3 nm). Nije primećeno značajno odstupanje dobijenih rezultata, što ukazuje na to da izabrani metod ima zadovoljavajuću robustnost.

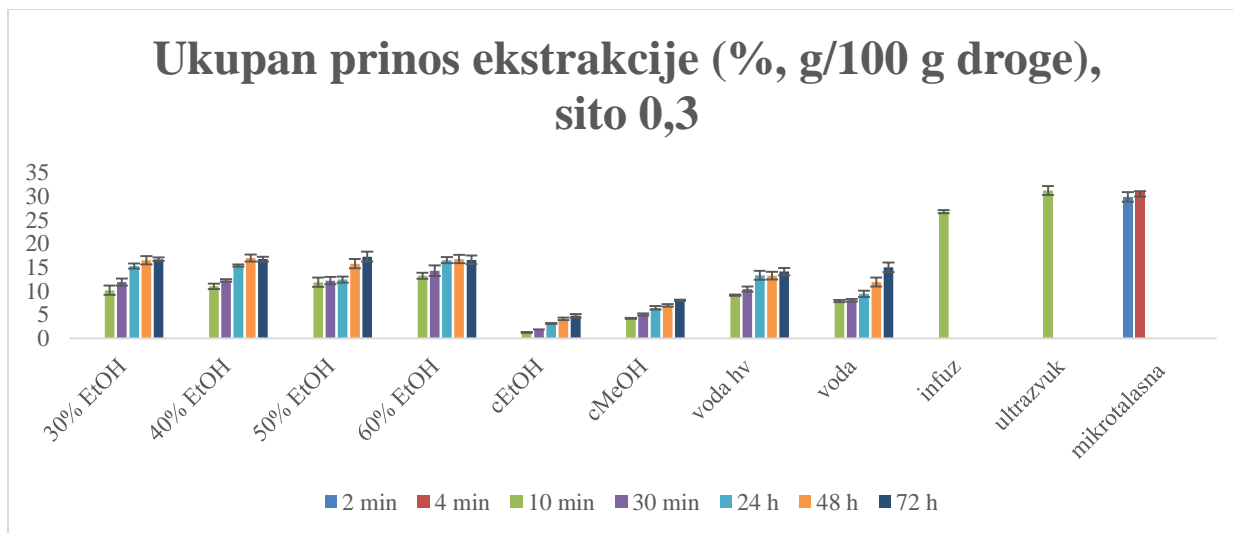
Selektivnost i *specifičnost* izabranog metoda utvrđene su poređenjem hromatograma standardnog rastvora hlorogenske kiseline i hromatograma uzorka, kao i poređenjem spektara dobijenih signala. Utvrđeno je da u uzorcima nema drugih pikova čija retenciona vremena odgovaraju retencionom vremenu standarda hlorogenske kiseline, što znači da izabrani metod ima zadovoljavajuću *selektivnost* i *specifičnost* (**slika 13**).



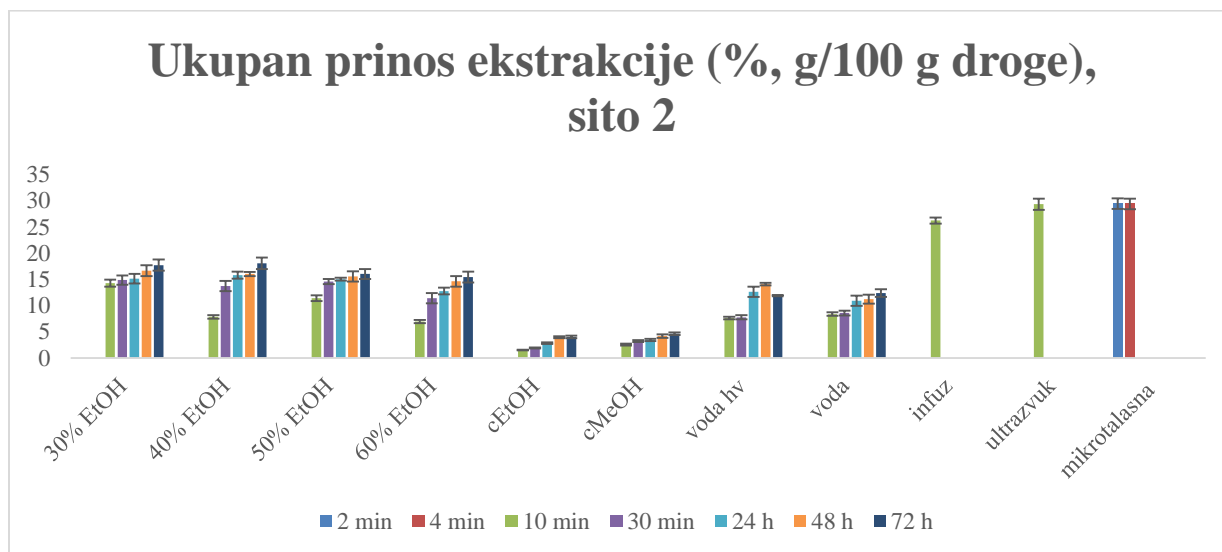
Slika 13. Primer hromatograma

5.1.2. Prinos ekstrakcije

Rezultati prikazani u *grafikonima 5 i 6* pokazuju značajan uticaj polarnih rastvarača, uslova i tehnika ekstrakcije bosiljka na ukupan prinos ekstrakcije. Nakon ekstrakcije sa različitim stepenima usitnjenosti (sito 0,3 i 2 mm) dobijeni su odgovarajući rezultati.



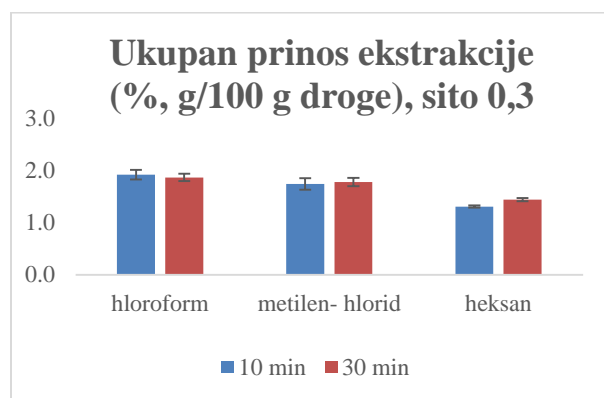
Grafikon 5. Ukupan prinos ekstrakcije, sito 0,3 (polarni rastvarači)



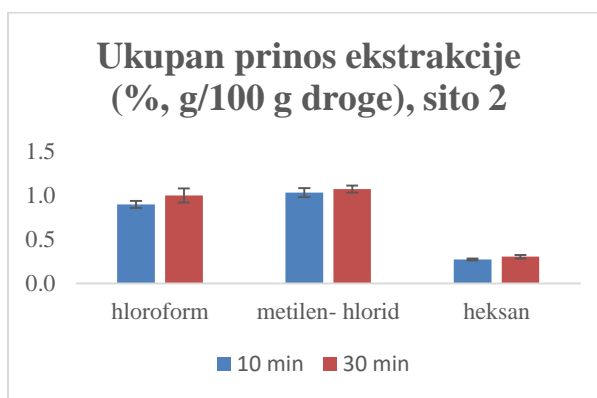
Grafikon 6. Ukupan prinos ekstrakcije, sito 2 (polarni rastvarači)

Ukupan prinos ekstrakcije droge za sito 0,3 se kretao u opsegu 1,25-31,22 g/100 g droge (*grafikon 5*), dok su prinosi ekstrakcije za sito 2 bili nešto niži, 1,50-29,30 g/100 g droge (*grafikon 6*). Posle ekstrakcije droge različitog stepena usitnjenosti (sito 0,3 i sito 2), nešto veći prinosi su

dobijeni kod droge većeg stepena usitnjenosti, što je i razumljivo, jer se sa povećanjem stepena usitnjenja povećava specifična površina biljnog materijala, što omogućava intenzivniji kontakt sa rastvaračem. Vreme ekstrakcije predstavlja značajan kriterijum u pogledu optimizacije energetske rashoda, kao i dobijanja najboljih rezultata. Kod svih tipova ekstrakcije, sa porastom vremena rastao je i ukupan prinos ekstrakcije što je u saglasnosti sa literaturom (Grujić N, 2012). Najveći prinosi ekstrakcije ostvareni su primenom najpolarnijeg rastvarača (voda), koji su pripremani kao infuz i nakon mikrotalasne ekstrakcije. Poredeći vrednosti prinosa dobijenih kod maceracije vodom u prisustvu i odsustvu svetlosti, može se primetiti da ne postoji statistički značajna razlika u dobijenim vrednostima, što je u skladu sa sličnim ispitivanjima (Cunha I, 2004). Maceracija razblaženim etanolom dala je veće prinose u odnosu na maceraciju apsolutnim etanolom. Različiti udeo vode u etanolnim rastvaračima može značajno da poboljša efikasnost ekstrakcije (Yu L, 2002, Wang J, 2008).



Grafikon 7. Ukupan prinos ekstrakcije, sito 0,3 (nepolarni rastvarači)



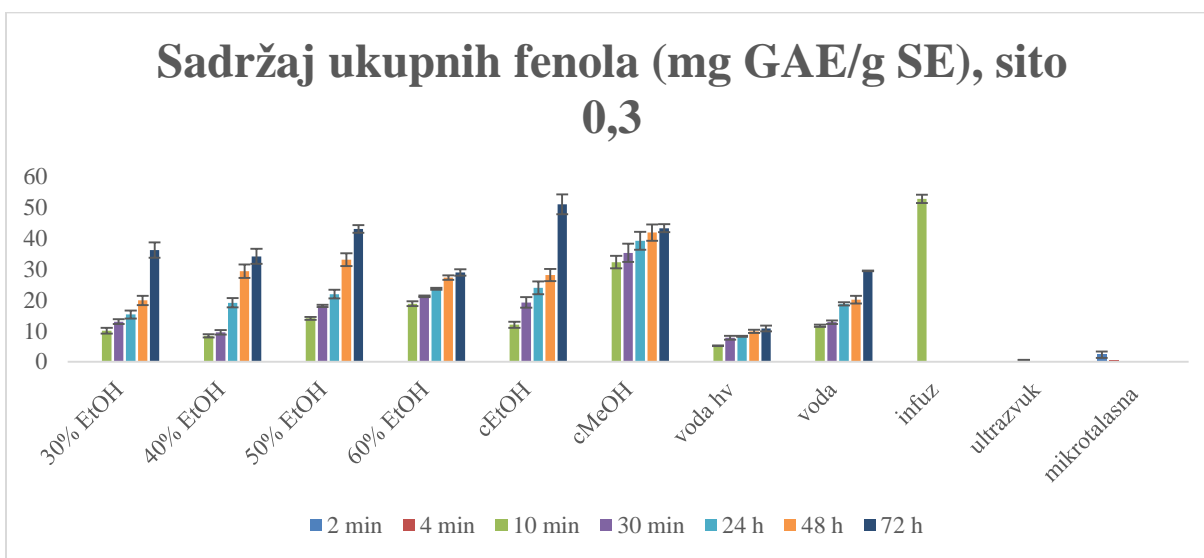
Grafikon 8. Ukupan prinos ekstrakcije, sito 2 (nepolarni rastvarači)

Na **grafikonima 7 i 8** su prikazani rezultati koji pokazuju kako nepolarni rastvarači, stepen usitnjenosti droge i vreme ekstrakcije utiču na prinos. Prinos ekstrakcije nepolarnih rastvarača kretao se u opsegu 0,27-1,92 g u 100 g droge. Ekstrakcijom droge većeg stepena usitnjenosti (sito 0,3) dobijen je veći prinos nego ekstrakcijom droge manjeg stepena usitnjenosti (sito 2), što je u skladu sa činjenicom da se sa povećanjem stepena usitnjenosti povećava specifična površina droge, a samim tim se ostvaruje i bolji kontakt sa rastvaračem (Grujić N, 2012). Sa smanjenjem veličine čestica biljnog materijala, superkrična površina može biti povećana i dostupna za transport mase, što omogućava porast prinosa ekstrakcije (Spigno G, 2007).

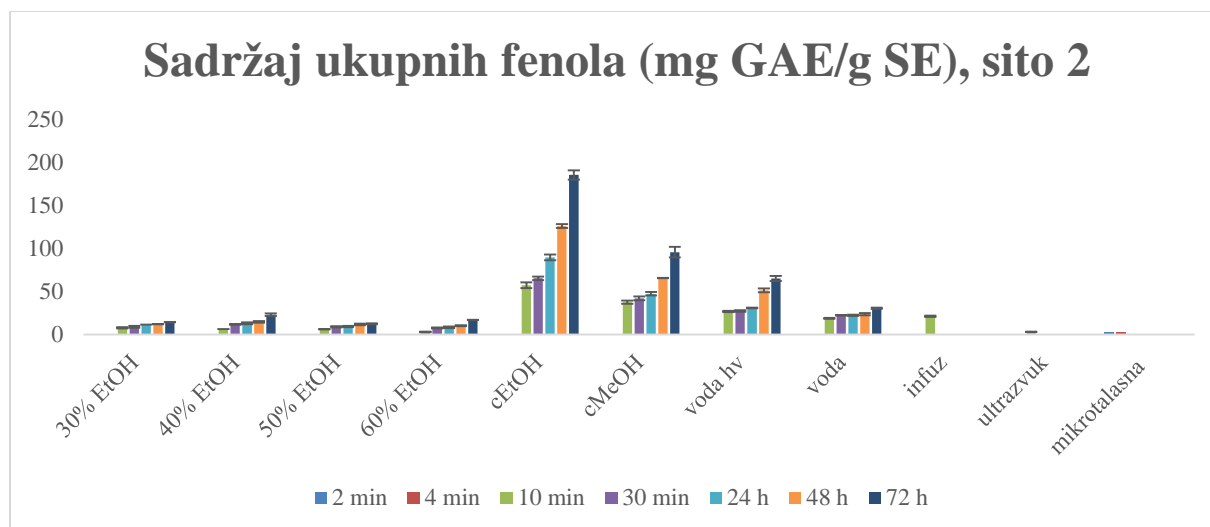
Sa produženjem trajanja ekstrakcije produžava se kontakt rastvarača i biljnog materijala što obezbeđuje veći prinos ekstrakcije. Najveći prinos je dobijen nakon ekstrakcije sa hloroformom, a najmanji nakon ekstrakcije heksanom, što znači da se sa povećanjem polarnosti rastvarača povećava i efikasnost ekstrakcije, što potvrđuju i slične studije (Kaurinovic B, 2011). Značajno veći prinosi dobijeni su nakon ekstrakcije polarnim rastvaračima, u poređenju sa nepolarnim rastvaračima, što odgovara pomenutoj činjenici.

Uzimajući u obzir rezultate dobijene tokom različitog perioda maceracije, može se reći da vreme predstavlja značajan faktor. Produžavanjem vremena ekstrakcije omogućava se duži kontakt između biljnog materijala i rastvarača. Drugi autori takođe potvrđuju da prinos ekstrakcije raste sa porastom dužine ekstrakcije (Spigno G, 2007).

5.1.3. Sadržaj ukupnih fenola



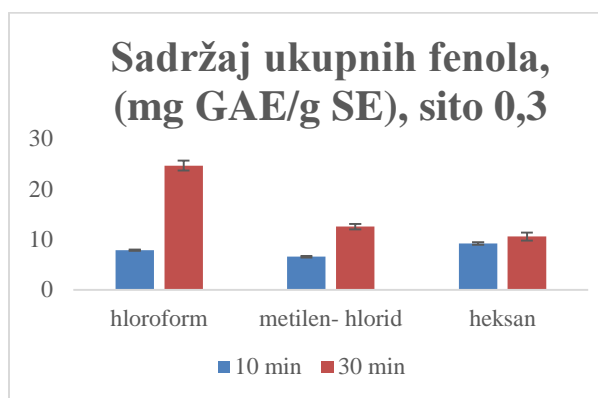
Grafikon 9. Sadržaj ukupnih fenola, sito 0,3 (polarni rastvarači)



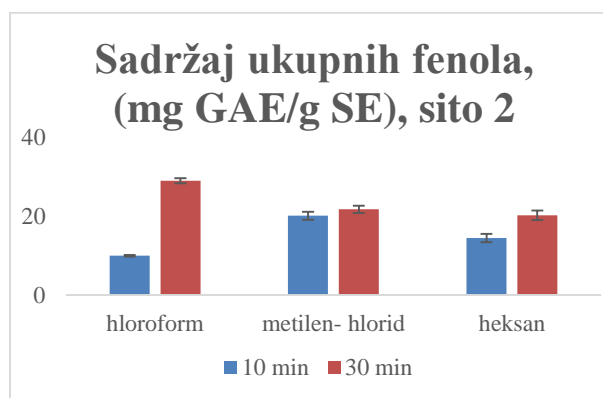
Grafikon 10. Sadržaj ukupnih fenola, sito 2 (polarni rastvarači)

Grafikoni 9 i 10 prikazuju rezultate ukupnih fenolnih komponenata u ekstraktima bosiljka. U ovom istraživanju količina fenolnih jedinjenja kretala se u opsegu od 0,53 do 52,61 mg GAE/g suvog ekstrakta, što je dosta više u odnosu na sličnu studiju koja se sprovodila sa etrom, hloroformom, etil-acetatom, *n*-butanolom i vodom, gde su dobijene vrednosti bile u opsegu od 4,21 do 19,28 mg GAE/g suvog ekstrakta (Kaurinovic B, 2011). To može biti objašnjeno upotrebom rastvarača različite polarnosti, kao i primenom drugačije metode preparacije uzoraka. Najveća vrednost za ukupne fenole je dobijena nakon maceracije apsolutnim etanolom. Ipak, upotrebom apsolutnog etanola potencijalno mogu biti ekstrahovane i druge supstance, s obzirom na njegovu koncentraciju (96%) (Wang J, 2008). Alkoholni rastvarači se veoma često koriste za ekstrakciju prirodnih proizvoda i pokazuju vrlo dobre rezultate. Etanol se više preferira u odnosu na metanol, s obzirom na njegovu potencijalnu upotrebu u ishrani (Spigno G, 2007). Uzorci dobijeni nakon ekstrakcije alkoholnim rastvaračima su pokazali skoro dva puta veće vrednosti za ukupne fenolne komponente u odnosu na ekstrakte dobijene nakon maceracije vodom, što je u saglasnosti sa drugim radovima (Lapornik B, 2005). Voda, kao veoma polaran rastvarač i etanol, kao manje polaran rastvarač mogu se kombinovati u bilo kojoj proporciji. Dodatkom vode etanolu, polarost rastvarača raste, pa se i fenolne komponente bolje rastvaraju po principu “slično se u sličnom rastvara” (Zhang ZS, 2007). Sa porastom koncentracije etanola od 30 do 60%, količina ukupnih fenola se takođe povećava. Poznato je da promene u polarnosti rastvarača modifikuju njihovu sposobnost da rastvaraju određenu grupu antiradikalnih komponenata (Grujić N, 2012). Poredeći vrednosti za ukupne fenole dobijene maceracijom vodom, u prisustvu i odsustvu

svetlosti, rezultati pokazuju da se skoro tri puta veći prinos dobija maceracijom bez svetlosti. To objašnjava podatak da su fenoli nestabilna jedinjenja, podložna degradaciji. Glavni faktori degradacije su temperatura i svetlost, koji su obično prisutni tokom tradicionalnih metoda ekstrakcije (Maróstica MR, 2010). Step en usitnjenosti je značajan parametar kod određivanja ukupnih fenola. Smanjenjem veličine čestica povećava se dostupnost površine za transfer mase što direktno povećava prinos ukupnih fenola (Spigno G, 2007). Vreme ekstrakcije takođe ima snažan uticaj na količinu ukupnih fenola. Prinos se povećava sa porastom dužine ekstrakcije, što potvrđuju i drugi autori koji ističu značaj uticaja dužine ekstrakcije na prinos fenolnih jedinjenja (Spigno G, 2007; Thoo YY, 2010).



Grafikon 11. Sadržaj ukupnih fenola, sito 0,3 (nepolarni rastvarači)

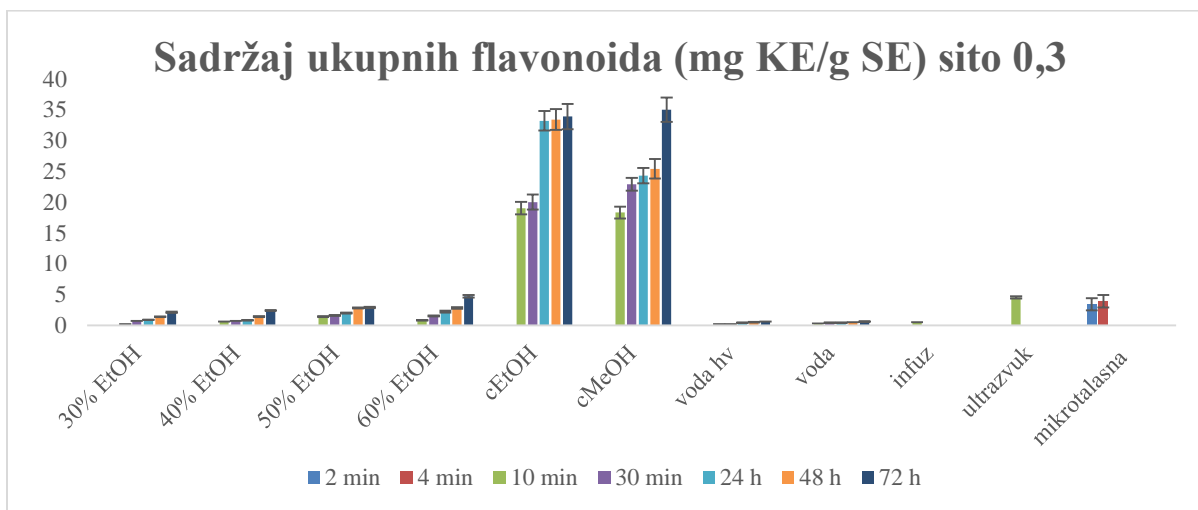


Grafikon 12. Sadržaj ukupnih fenola, sito 2 (nepolarni rastvarači)

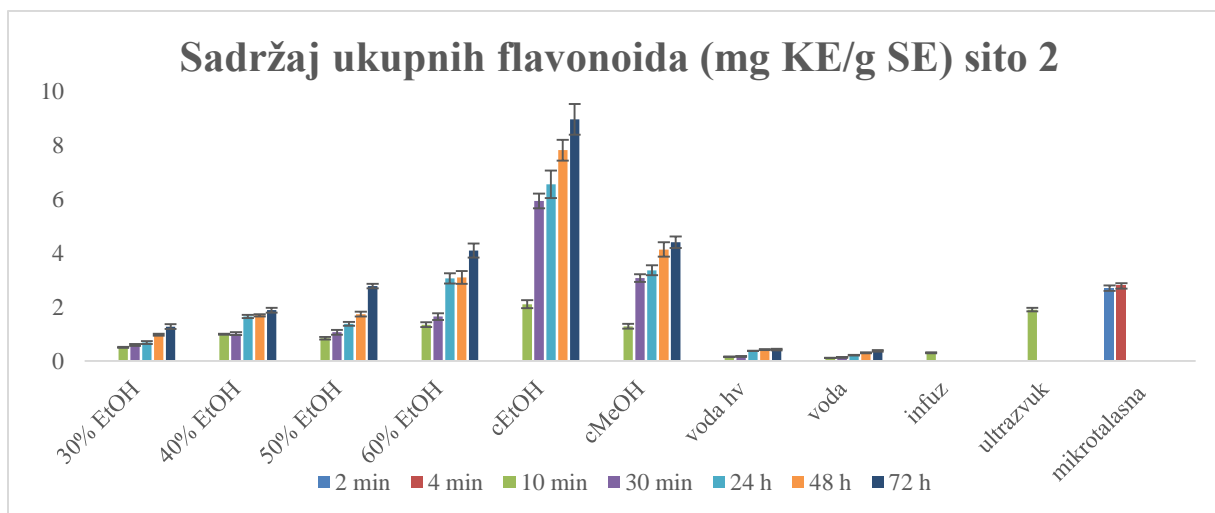
Grafikoni 11 i 12 prikazuju sadržaj ukupnih fenola nakon ekstrakcije nepolarnim rastvaračima, koji se kretao u opsegu od 6,56 do 28,91 mg GAE/g SE. Ove vrednosti su u saglasnosti sa sličnom studijom (Kaurinovic B, 2011) gde je ekstrakcija vršena rastvaračima slične polarnosti. Poredeći nepolarne rastvarače koji su korišćeni, njihova polarnost opada u nizu: heksan, dihlormetan, hloroform, te se mogu potvrditi navodi drugih autora da se veće vrednosti za ukupne fenole dobijaju korišćenjem polarnijih rastvarača. Najveći sadržaj ukupnih fenola dobijen je ekstrakcijom pomoću hloroforma u trajanju od 30 minuta, stepena usitnjenosti 2 mm. Najmanja količina ukupnih fenola ekstrahovana je dihlormetanom, ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta iz droge stepena usitnjenosti 0,3 mm, što je očekivano, s obzirom da fenolne komponente poseduju hidroksilne grupe i imaju polarne karakteristike. Izučavajući uticaj stepena usitnjenosti na sadržaj ukupnih fenola, zaključeno je da povećanje stepena usitnjenosti dovodi do bolje ekstrakcije a time

i povećanja prinosa, što je u skladu sa sličnim radovima (Kaurinovic B, 2011). Takođe, vreme je izuzetno važan parametar u istraživanju različitih uticaja na količinu fenolnih komponenata. Sadržaj ukupnih fenola raste sa produžetkom vremena ekstrakcije, što potvrđuju i drugi literaturni navodi (Lapornik B, 2005). Sumirano se može reći da se sa povećanjem stepena usitnjenosti, vremena trajanja ekstrakcije i polarnosti rastvarača povećava količina ekstrahovanih fenolnih jedinjenja, što je u saglasnosti sa literaturom (Kaurinovic B, 2011).

5.1.4. Sadržaj flavonoida

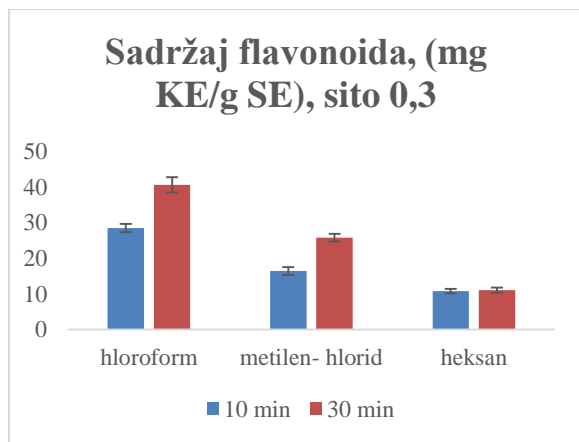


Grafikon 13. Sadržaj flavonoida, sito 0,3 (polarni rastvarači)

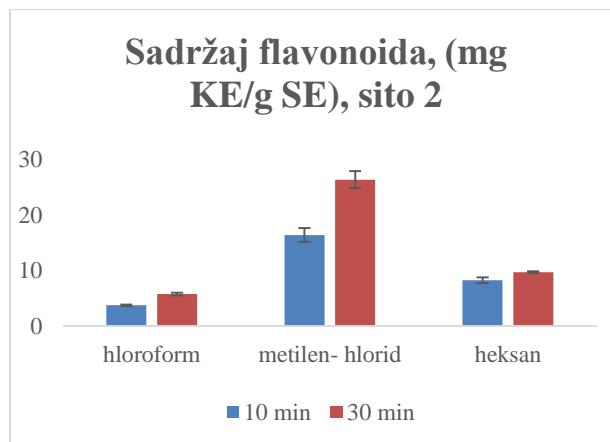


Grafikon 14. Sadržaj flavonoida, sito 2 (polarni rastvarači)

Grafikoni 13 i 14 prikazuju sadržaj flavonoida, koji se kretao u opsegu od 0,11 do 35 mg KE/g suvog ekstrakta, što je u skladu sa sličnom studijom (Kaurinovic B, 2011), gde je sadržaj flavonoida iznosio od 9,37 do 27,12 mg KE/g suvog ekstrakta. Očigledno je da način i uslovi ekstrakcije imaju značajan uticaj na sadržaj flavonoida u analiziranim preparacijama. Tokom ekstrakcije etanolom različitih procentualnih udela, značajno više vrednosti su dobijene korišćenjem koncentrovanijih rastvarača. U sličnim studijama, ekstrakcija flavonoida je bila najbolja nakon maceracije apsolutnim etanolom (100%), što predstavlja mono-komponentni sistem, ali to nije omogućilo i najbolju antioksidativnu aktivnost. Taj iskaz može biti objašnjen nemogućnošću apsolutnog etanola da ekstrahuje sve komponente odgovorne za antioksidativno delovanje (Thoo YY, 2010). U našoj studiji, sa porastom koncentracije etanola, rastao je sadržaj ekstrahovanih flavonoida. Najveći sadržaj dobijen je nakon maceracije 95% metanolom (v/v) i 96% etanolom (v/v), nakon 72h, što predstavlja najpogodniji rastvarač za ekstrakciju flavonoida. Evidentno, vreme ima značajan impakt na ekstrakciju aktivnih principa iz bosiljka, ali u ovom istraživanju nije pokazalo značajan uticaj, što je u saglasnosti sa ostalim studijama (Thoo YY, 2010).



Grafikon 15. Sadržaj flavonoida, sito 0,3 (nepolarni rastvarači)

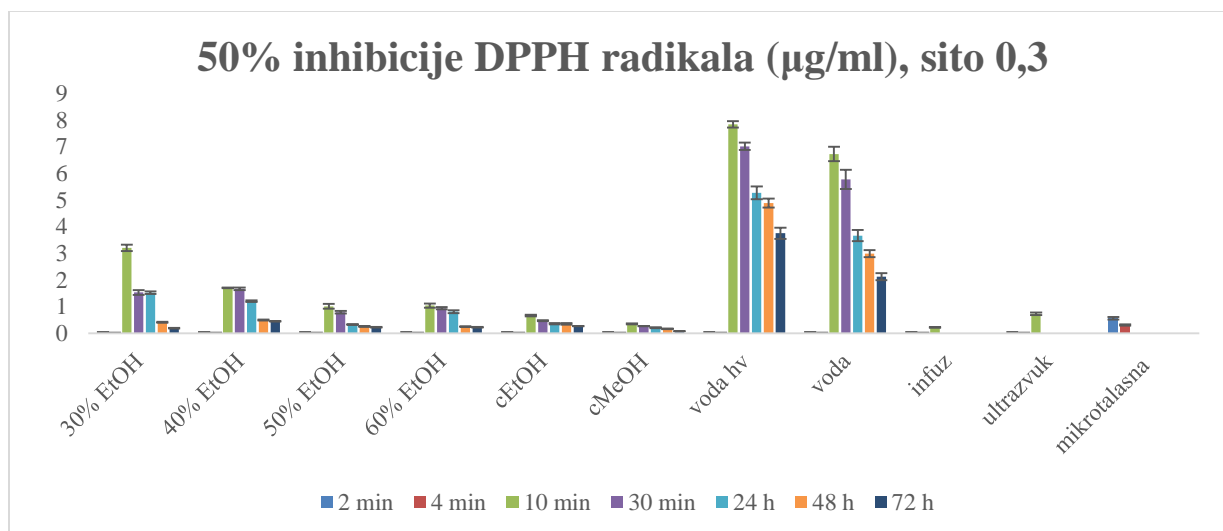


Grafikon 16. Sadržaj flavonoida, sito 2 (nepolarni rastvarači)

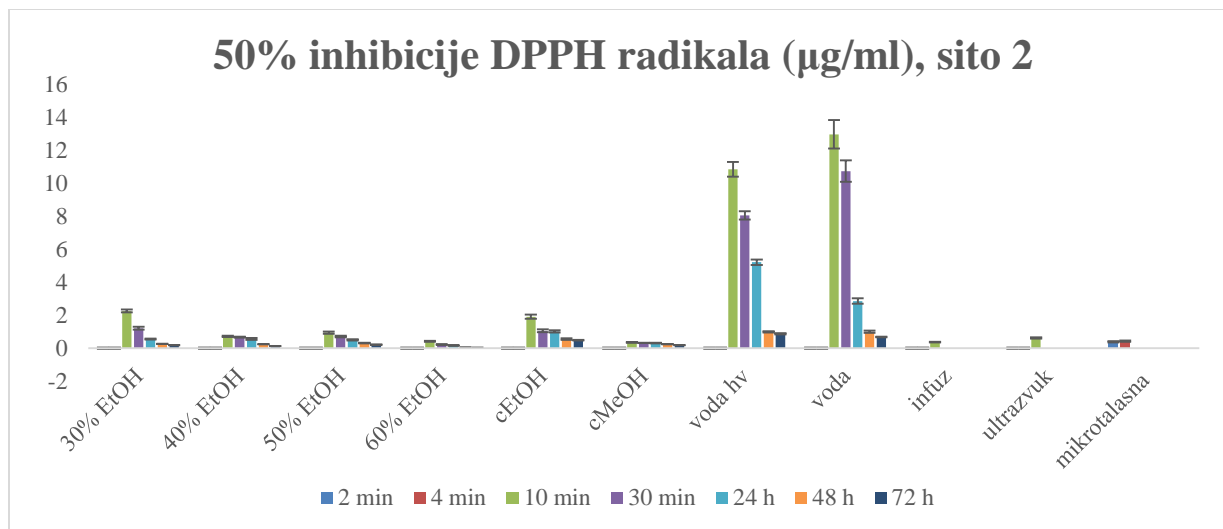
Sadržaj flavonoida u uzorcima dobijenim maceracijom nepolarnih rastvarača (**grafikoni 15 i 16**) kretao se u opsegu od 3,73 do 40,63 mg KE/g suvog ekstrakta. Rezultati su malo drugačiji u odnosu na sličnu studiju (Kaurinovic B, 2011) u kojoj su vrednosti za sadržaj flavonoida bile u opsegu od 12,98 do 23,12 mg KE/g suvog ekstrakta, ali autori nisu koristili potpuno iste rastvarače.

Takođe, razlike su se mogle javiti i zbog drugačije pripreme uzoraka i maceracije tokom različitih vremenskih perioda. Umereno veće vrednosti za veći sadržaj flavonoida kod uzoraka dobijenih maceracijom nepolarnim rastvaračima u odnosu na polarne se može objasniti mogućnošću flavonoida da obrazuju glikozide sa aglikonima koji su manje polarne supstance. Najmanji sadržaj flavonoida dobijen je ekstrakcijom droge stepena usitnjenosti 2 mm, u trajanju od 10 minuta, pomoću hloroforma, a najveći sadržaj dobijen je ekstrakcijom hloroformom, tokom dužeg vremena ekstrakcije (30 minuta) droge većeg stepena usitnjenosti (sito 0,3 mm). Stepen usitnjenosti biljnog materijala je imao umeren impakt, te su dobijene malo veće vrednosti za sadržaj flavonoida kod uzoraka većeg stepena usitnjenosti. Vreme ekstrakcije nije predstavljalo krucijalan parametar kod određivanja sadržaja flavonoida, te su tokom različitih vremenskih intervala dobijene slične vrednosti. Druge studije su pokazale da vreme ekstrakcije ima značajan impakt na sadržaj ukupnih fenola i aktivnost DPPH radikala, ali ne i na sadržaj flavonoida (Thoo YY, 2010).

5.1.5. Određivanje 50% inhibicije DPPH radikala

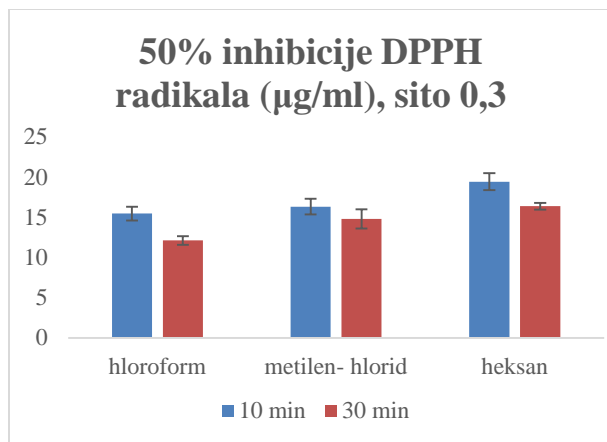


Grafikon 17. 50% inhibicije DPPH radikala ($\mu\text{g/ml}$), sito 0,3 (polarni rastvarači)

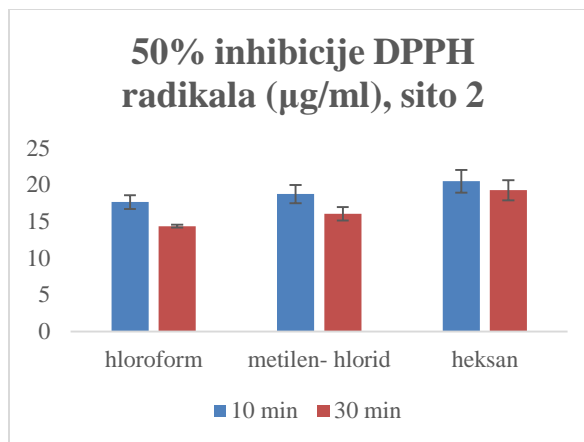


Grafikon 18. 50% inhibicije DPPH radikala ($\mu\text{g/ml}$), sito 2 (polarni rastvarači)

Grafikoni 17 i 18 prikazuju koncentraciju ekstrakata dobijenih maceracijom polarnim rastvaračima, koja je potrebna za inhibiciju 50% DPPH radikala, te bolju antioksidativnu aktivnost poseduju uzorci sa manjom vrednosti. Mehanizam ove aktivnosti uključuje terminaciju radikalskih lančanih reakcija i stimulaciju aktivnosti enzima koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani. Svi ekstrakti su pokazali značajnu antiradikalisku aktivnost sa IC_{50} vrednosti u opsegu od 0,04 do 12,99 $\mu\text{g/ml}$. Dobijeni rezultati ukazuju na sličnu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa prethodno objavljenom studijom gde je IC_{50} vrednost bila u opsegu od 0,18 do 2,85 $\mu\text{g/ml}$ (Zakaria Z, 2008). Najveću antiradikalisku aktivnost pokazao je ekstrakt dobijen nakon maceracije 60% etanolom (v/v) u trajanju od 72 sata. Polarnost rastvarača ima signifikantan uticaj na antioksidativnu aktivnost, a sposobnost inhibicije DPPH radikala se povećava sa porastom koncentracije etanola. Ovo može biti objašnjeno činjenicom da etanolni rastvarači lakše razaraju ćelijski zid usitnjene droge, u poređenju sa vodom. Ekstrakti dobijeni maceracijom dvokomponentnim rastvaračima trebalo bi da poseduju bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na monokomponentne rastvarače, ali manja odstupanja su moguća zbog razlike u mehanizmu reakcije radikal – antioksidans (Yu L, 2002). Vreme ekstrakcije ima velik uticaj na antioksidativnu aktivnost, te se povećava sa povećanjem dužine trajanja maceracije, što su potvrdile i druge referentne publikacije (Thoo YY, 2010). Mnogi autori su pri ekstrakciji aktivnih principa koristili droge većeg stepena usitjenosti, što se takođe pokazalo kao bitan parametar (Silva EM, 2007). Slično tome, i naši ekstrakti su pokazali bolju antioksidativnu aktivnost nakon veće usitjenosti.



Grafikon 19. 50% inhibicije DPPH radikala (µg/ml), sito 0,3 (nepolarni rastvarači)

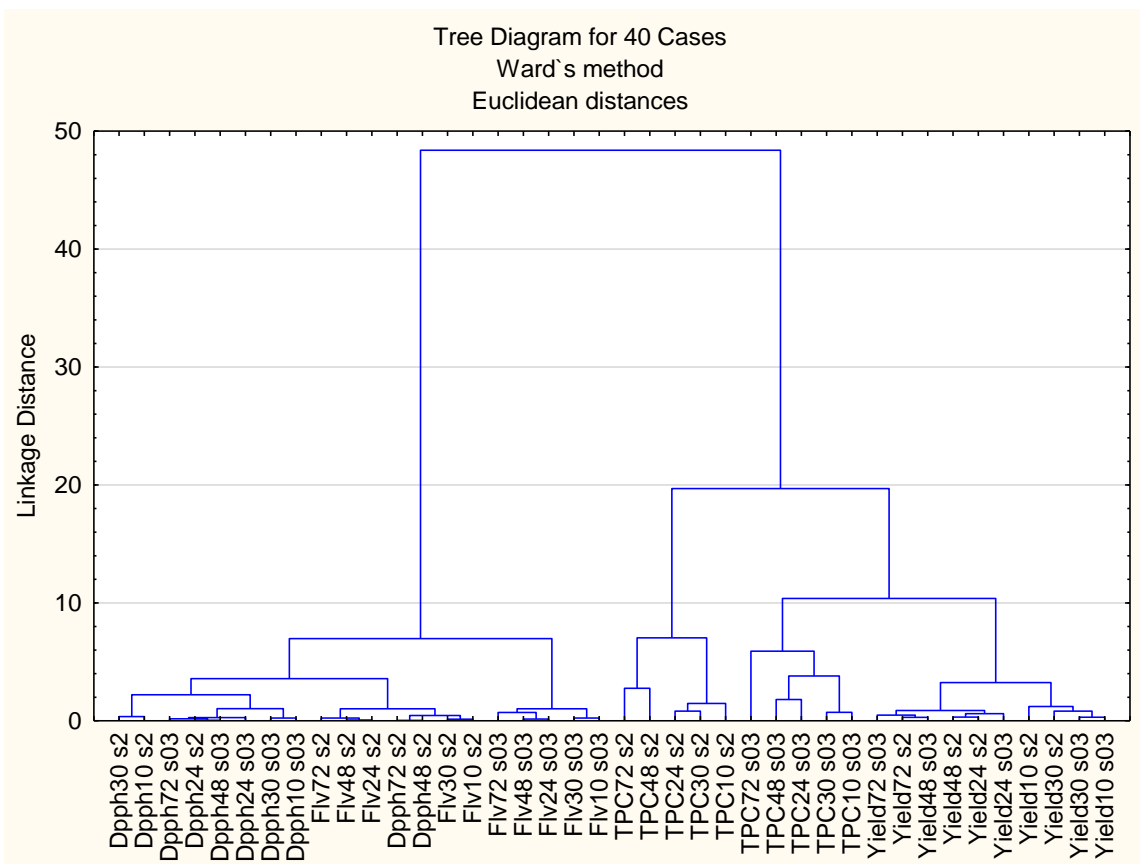


Grafikon 20. 50% inhibicije DPPH radikala (µg/ml), sito 2 (nepolarni rastvarači)

Rezultati na **grafikonima 19 i 20** pokazuju da svi ekstrakti bosiljka dobijeni maceracijom nepolarnim rastvaračima imaju antioksidativnu aktivnost sa vrednosti IC_{50} od 12,12 do 20,49 µg/ml. Rezultati odgovaraju sličnoj studiji sprovedenoj na hlороformskim, etil-acetatnim, vodenim i *n*-butanolnim ekstraktima, gde se IC_{50} kretala u opsegu od 8,17 do 24,91 µg/ml (Kaurinovic B, 2011). Najslabiju antioksidativnu aktivnost su pokazali ekstrakti dobijeni maceracijom heksanom, a najjaču aktivnost su imali hlороformski ekstrakti, što ukazuje da više polarni rastvarači imaju snažniju sposobnost inhibicije DPPH radikala, po principu “slično se u sličnom rastvara” (Zhang ZS, 2007). Period ekstrakcije ima uticaj na antiradikalnu aktivnost (Thoo YY, 2010), ali razlike koje se dobijaju nakon 10 i 30 minuta nisu velike. Inhibicija 50% količine DPPH radikala je bolja nakon dužeg perioda ekstrakcije, a variranje tokom vremenskog perioda ekstrakcije ukazuje na to da antioksidativna aktivnost ne zavisi od jedne grupe, nego od više grupa antioksidativnih supstanci prisutnih u ekstraktima (Prior RL, 2005). Razlika u veličini čestica takođe ima uticaj na sposobnost inhibicije radikalnih lančanih reakcija, te su snažniji antioksidansi ekstrakti većeg stepena usitnjenosti.

5.1.6. Hemometrijska analiza antioksidativne aktivnosti

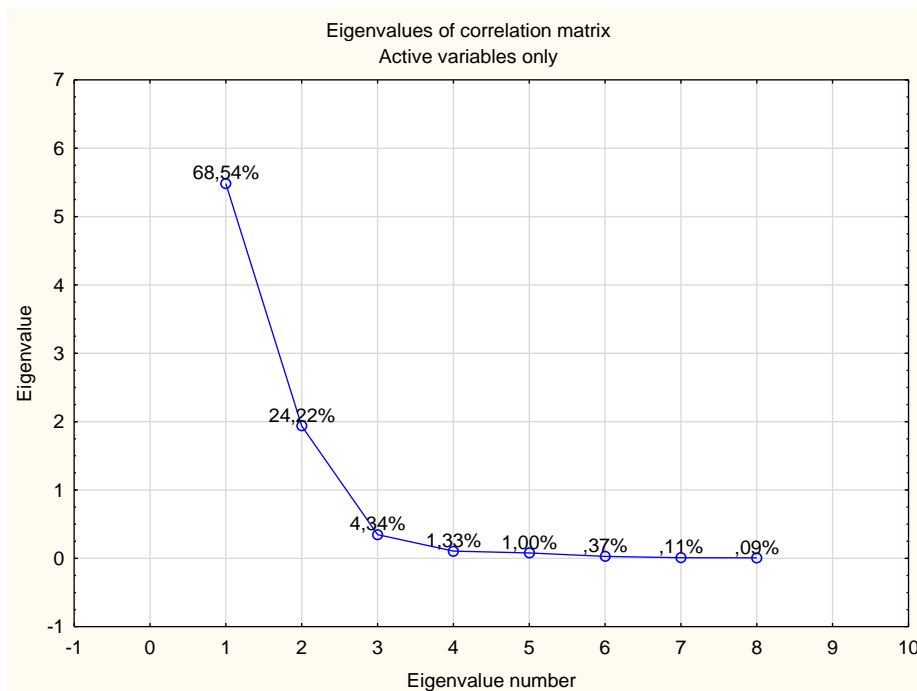
5.1.6.1. Poređenje aktivnosti polarnih rastvarača



Grafikon 21. Dendrogram analiziranih parametara polarnih rastvarača

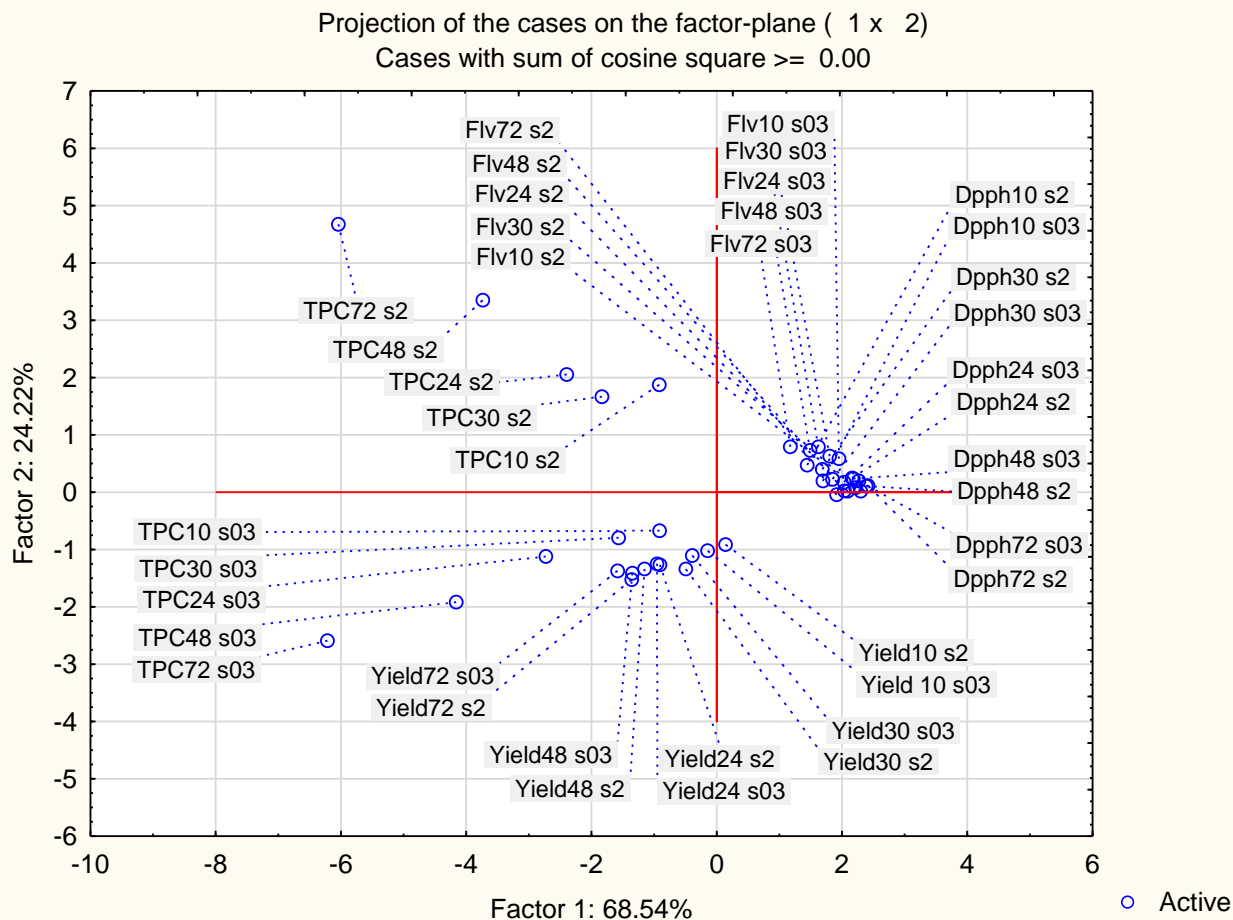
U **grafikonu 21** se može videti da klaster analiza odvajaju polarne uzorke u dva jasno definisana klastera. Prvi klaster opisuje sadržaj DPPH i flavonoida, ukazujući da veći sadržaj flavonoida doprinosi boljoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata bosiljka. Drugi klaster uključuje prinos ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola, što je opravdano s obzirom da sadržaj ukupnih fenola zavisi od prinosa ekstrakcije. Takođe, u okviru drugog klastera se može uočiti separacija na dva subklastera - sadržaj ukupnih fenola i prinos ekstrakcije uzoraka dobijenih različitim metodama maceracije. Važno je naglasiti da je sadržaj ukupnih fenola istog stepena usitnjenosti grupisan u jedan subklaster, što ističe signifikantan uticaj stepena usitnjenosti na sadržaj ukupnih fenola. Bazirano na klasternoj podeli, uticaj stepena usitnjenosti i vremena ekstrakcije nije se pokazao kao značajan parametar kod ostalih komponentata.

Dekompozicijom originalnih parametara u vektorske veličine, koristeći PCA, dobijaju se nove varijable nazvane glavne komponente (*grafikon 22*).



Grafikon 22. Vrednosti korelacije matriksa

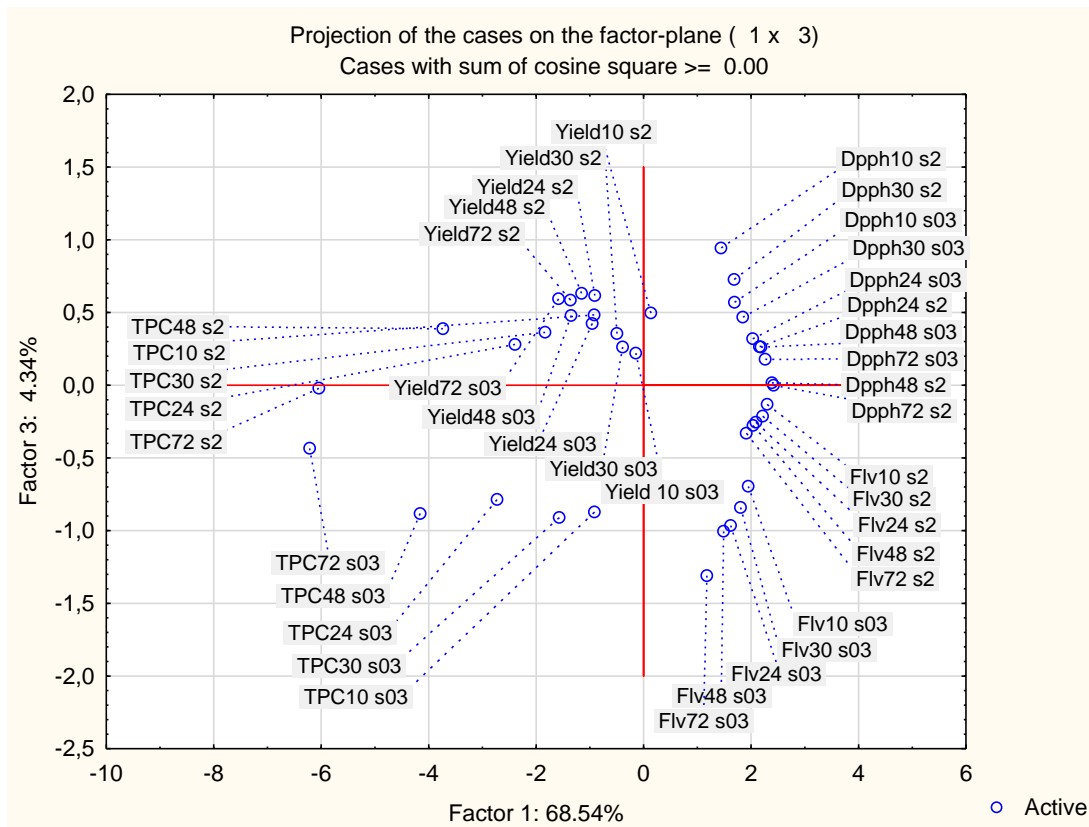
Kako se može uočiti iz *grafikona 22*, tri glavne komponente čine 97,1% (PC1 68,54%, PC2 24,22% i PC3 4,34%) u odnosu na ukupne varijable. Zavisnost između prve dve glavne komponente prikazana je na *grafikonu 23*.



Grafikon 23. Odnos PC1 i PC2 komponentata

Analiza glavnih komponentata jasno grupiše analizirane parametre u dve grupe, u odnosu na PC1. Prva grupa obuhvata sadržaj ukupnih fenola i prinos ekstrakcije, a druga vrednosti potrebne za inhibiciju 50% DPPH radikala i sadržaj flavonoida. Takođe se uočava da vrednosti PC1 rastu linearno sa povećanjem dužine trajanja ekstrakcije, bez obzira na stepen usitnjenosti. Sa druge strane vrednosti PC2 pokazuju dodatnu separaciju baziranu na stepenu usitnjenosti biljnog materijala. Sadržaj ukupnih fenola većeg stepena usitnjenosti (bez obzira na dužinu trajanja ekstrakcije) je opisan negativnim PC2 vrednostima, dok je manji stepen usitnjenosti pokazao pozitivne vrednosti za PC2, što se može objasniti mogućnošću da PCA razlikuje uticaj stepena usitnjenosti biljnog materijala u okviru analiziranih uzoraka. Slična pojava nije uočena posmatrajući druge parametre PC2, ali je uočena kod PC3 varijabli. Senzitivnija raspodela se može registrovati kada se porede PC1 i PC3. Iako doprinos PC3 čini samo 4,34% svih glavnih

komponentata, i u odnosu na PC1 i PC2 je minorno, ipak se pokazala mogućnost za bolju separaciju analiziranih uzoraka (**grafikon 24**).



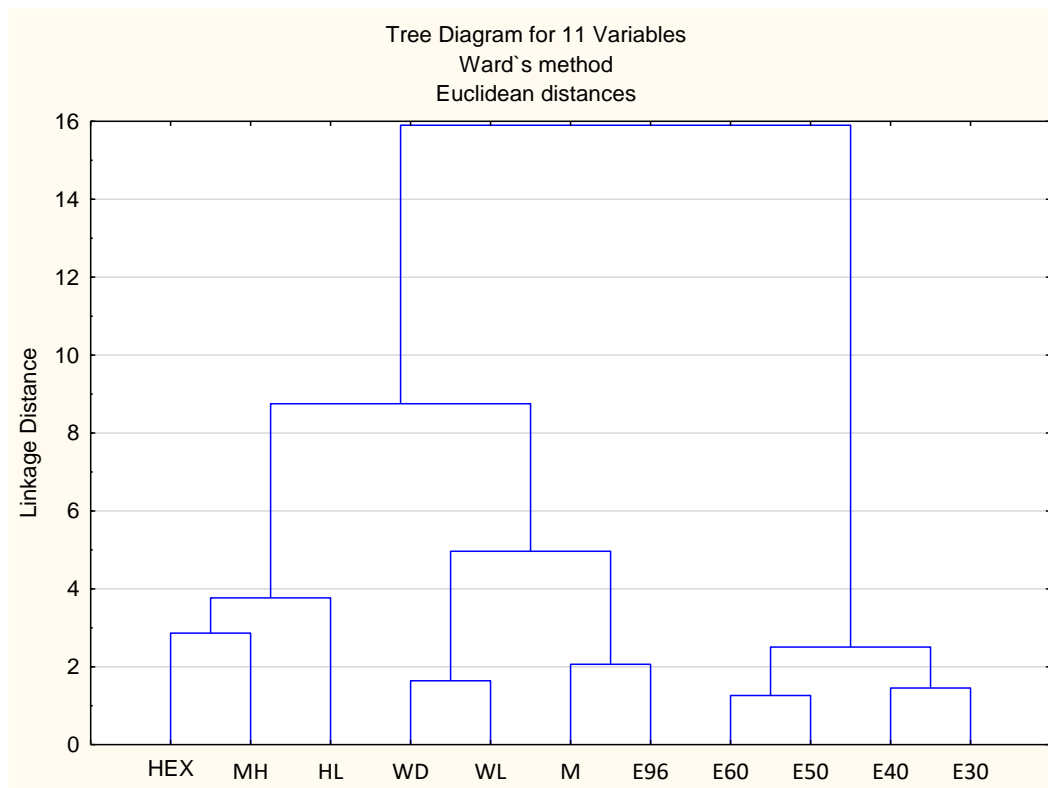
Grafikon 24. Odnos PC1 i PC3

PC3 razdvaja rezultate dobijene za flavonoide na osnovu stepena usitnjenosti koji je korišćen pri ekstrakciji. Može se uočiti grupisanje vrednosti dobijenih sa većim stepenom usitnjenosti (sito 0,3) u odnosu na vrednosti dobijene sa manjim usitnjenjem (sito 2). U oba slučaja uočava se linearna zavisnost PC3 od dužine trajanja ekstrakcije. Sličan trend se zapaža i u slučaju inhibicije DPPH radikala. Iako PC3 ne pokazuje mogućnost separacije DPPH vrednosti u posebne grupe na osnovu stepena usitnjenosti (kao što je slučaj sa flavonoidima), može se uočiti linearna zavisnost DPPH od PC3.

Na **grafikonu 25** se uočava separacija polarnih i nepolarnih rastvarača u dva klastera. Jedan klaster objedinjuje etanol različitih razblaženja (osim koncentrovanog), dok drugi klaster, koji se može podeliti u dva subklastera, obuhvata ostale (nerazblažene) rastvarače. Bitno je istaći da jedan subklaster obuhvata nepolarne rastvarače (hloroform, dihlormetan i heksan), dok drugi sadrži

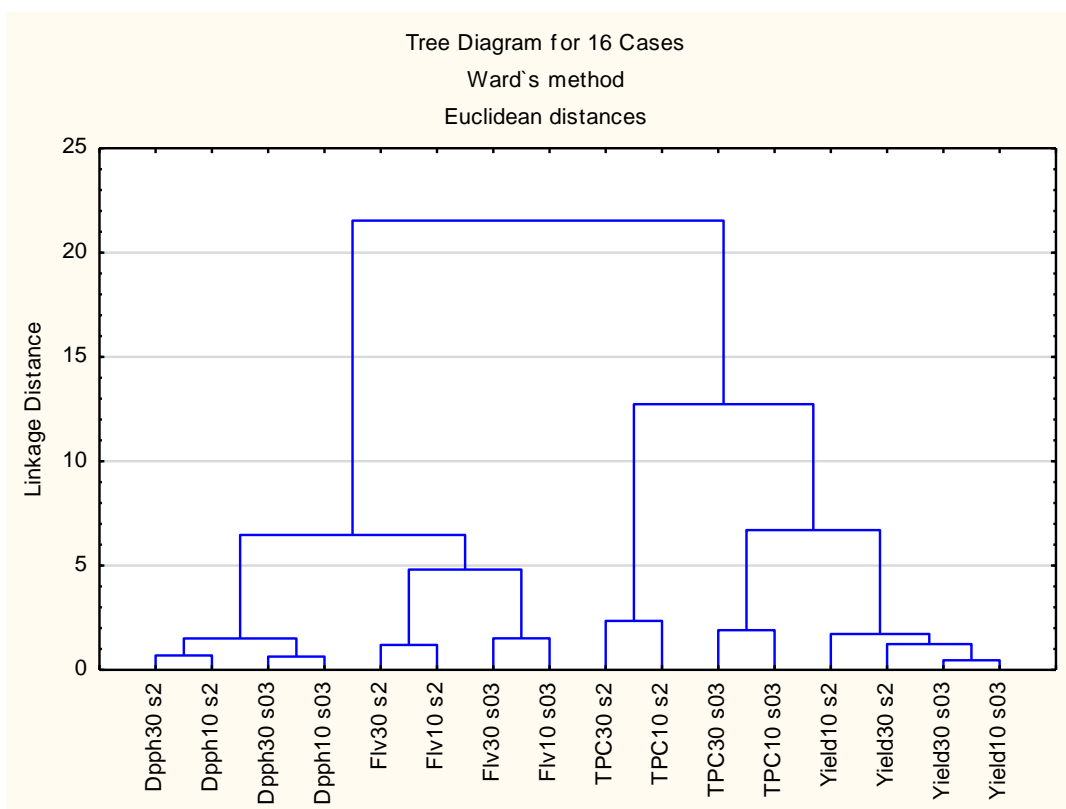
polarne (vodu, metanol i koncentrovani etanol). To ukazuje da razblaženi rastvarači pokazuju različit uticaj na proces ekstrakcije.

5.1.6.2. Poređenje aktivnosti polarnih i nepolarnih rastvarača



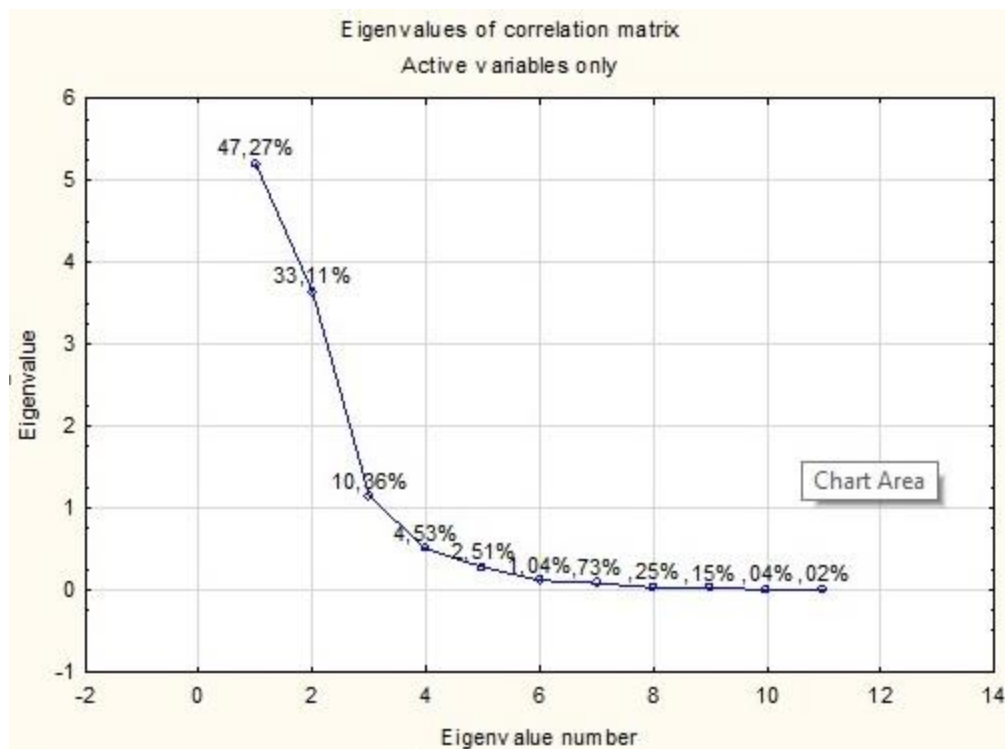
Grafikon 25. Dendrogram za različite rastvarače

Primenom klaster analize na uzorke dobijene rastvaračima različite polarnosti i različitog stepena usitnjenosti dendrogram (**grafikon 26**) ih jasno razdvaja u dva klastera. Prvi klaster obuhvata sadržaj flavonoida i aktivnost DPPH radikala, dok drugi objedinjuje prinos i ukupan sadržaj fenola bez obzira na stepen usitnjenosti. Ovakva podela je očekivana, s obzirom da je sposobnost neutralizacije DPPH radikala usko povezana sa sadržajem flavonoida, kao što je i ukupan sadržaj fenola povezan sa prinosom ekstrakcije, kao što je i ranije diskutovano. Oba klastera su dodatno podeljena u dva subklastera. Svaki od njih sadrži po jednu vrstu analiziranih parametara, a u okviru subklastera postoji dodatno grupisanje na osnovu stepena usitnjenosti. Ovo ukazuje na značajan uticaj stepena usitnjenosti na ukupnu ekstrakciju.

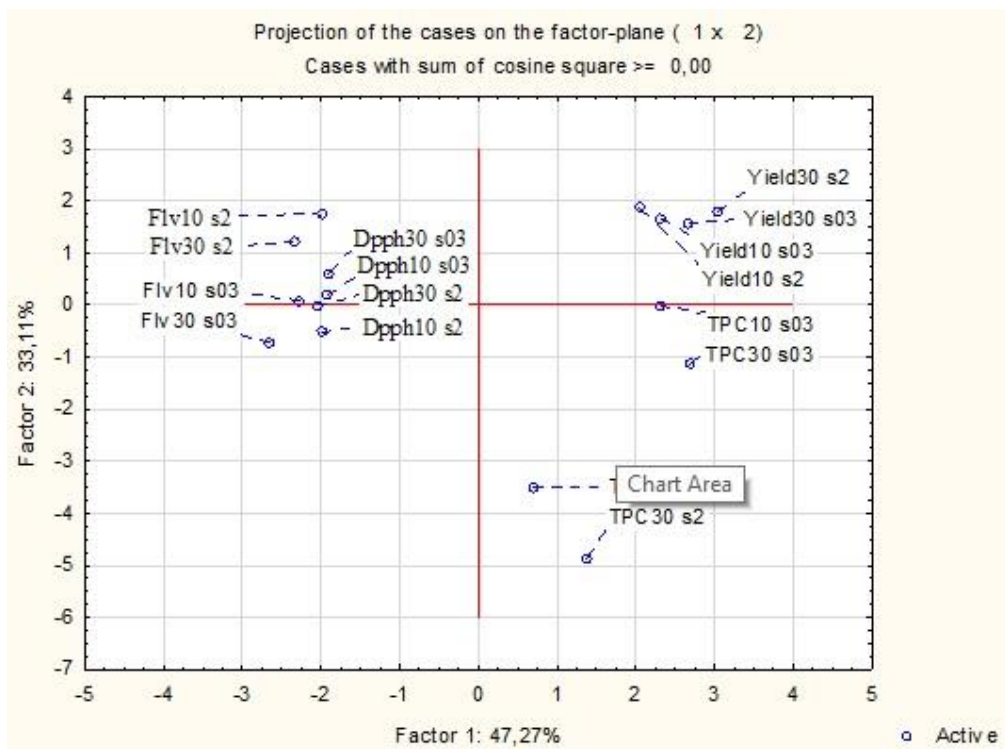


Grafikon 26. Dendrogram analiziranih parametara različitog stepena usitnjenosti

Dekompozicijom originalnih parametara u vektorske veličine, koristeći PCA, dobijaju se nove varijable nazvane glavne komponente. U našem istraživanju, četiri glavne komponente opisuju 95% svih varijabli (PC1 47,27%, PC2 33,11%, PC3 10,36 i PC4 4,53%) u odnosu na ukupne varijable, kako je prikazano na **grafikonu 27**.



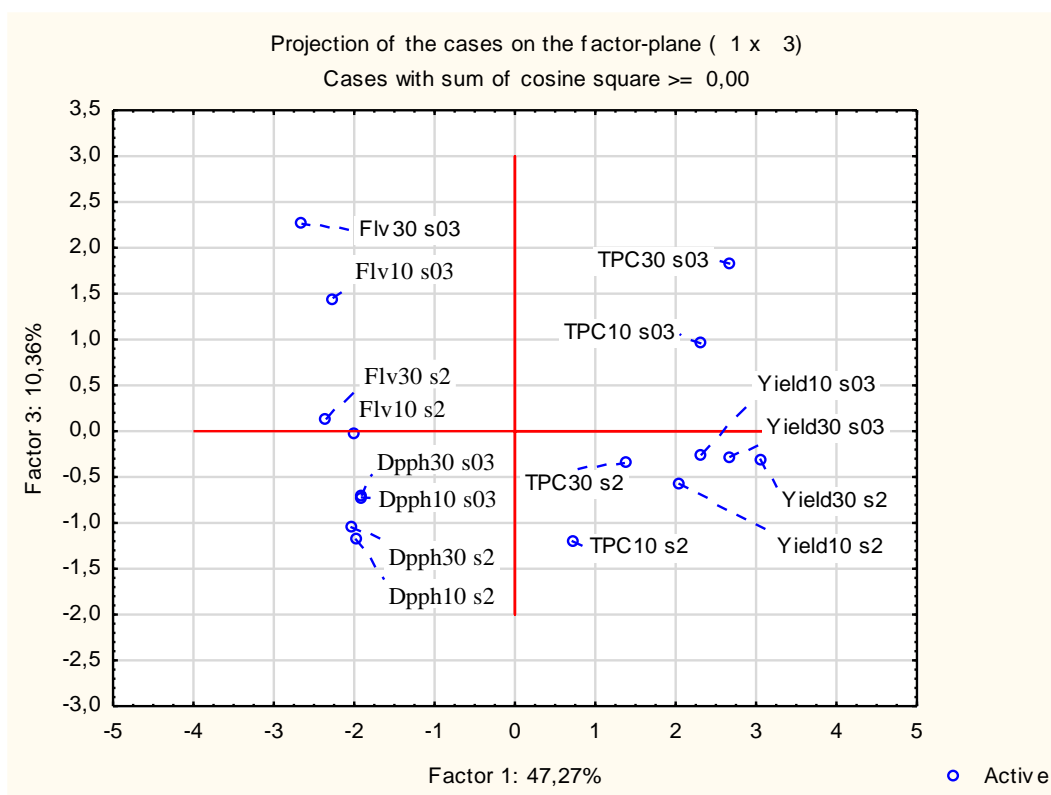
Grafikon 27. Vrednosti korelacije matriksa



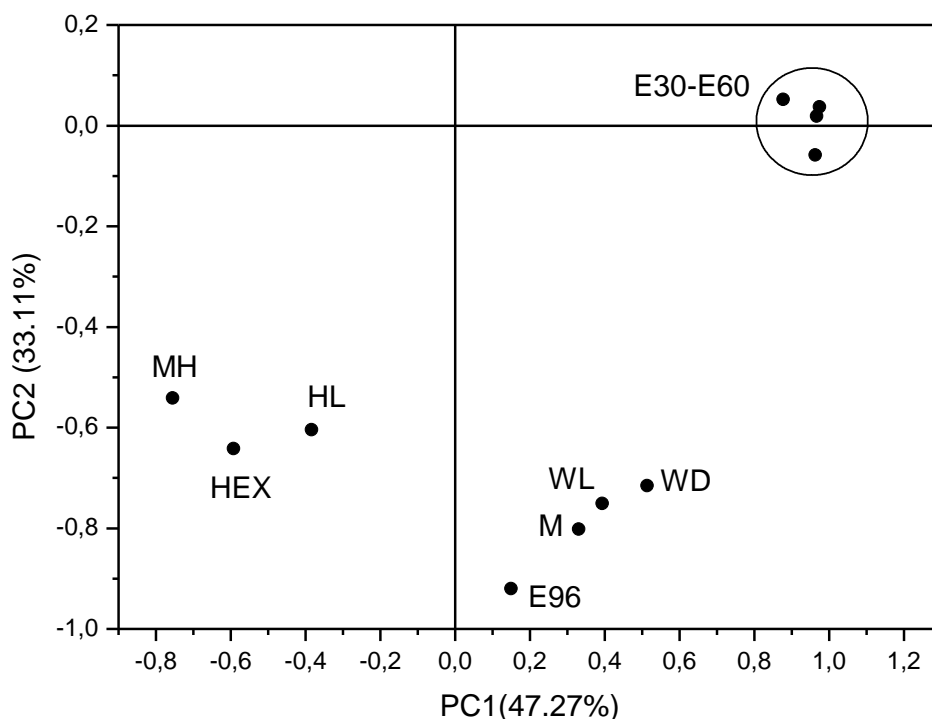
Grafikon 28. Odnos PC1 i PC2 komponenata

PC1 i PC2 komponente rezultuju sličnom klasifikacijom kao što je dobijena klaster analizom (**grafikon 28**). Sadržaj flavonoida i aktivnost neutralizacije DPPH radikala su opisani negativnim PC1 vrednostima, dok su ukupni fenoli i prinos ekstrakcije pokazali pozitivne PC1 vrednosti. Vrednosti PC2 pokazuju mogućnost za detaljniju separaciju analiziranih parametara (FLV i DPPH) na osnovu stepena usitnjenosti i mogu da razdvajaju vrednosti na osnovu sita 0,3 i sita 2. Bolja separacija ovih parametara na osnovu stepena usitnjenosti (osim kod prinosa), može biti uočena iz odnosa PC1 i PC3 (**grafikon 29**).

Varijacije PC1 i PC4 ne daju dodatne nove informacije. Takođe, primenom PCA nije registrovano grupisanje analiziranih parametara na osnovu vremena ekstrakcije.



Grafikon 29. Odnos PC1 i PC3 komponenata

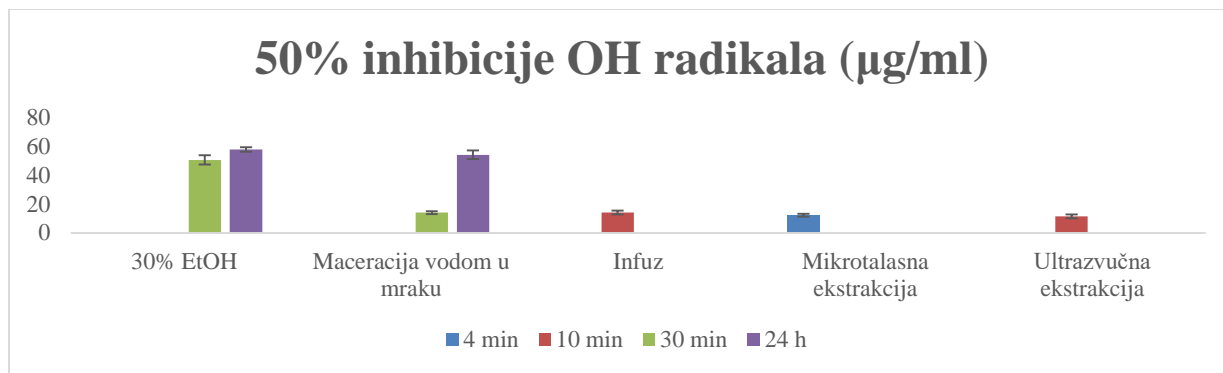


Grafikon 30. Odnos PC1 i PC2 komponenata

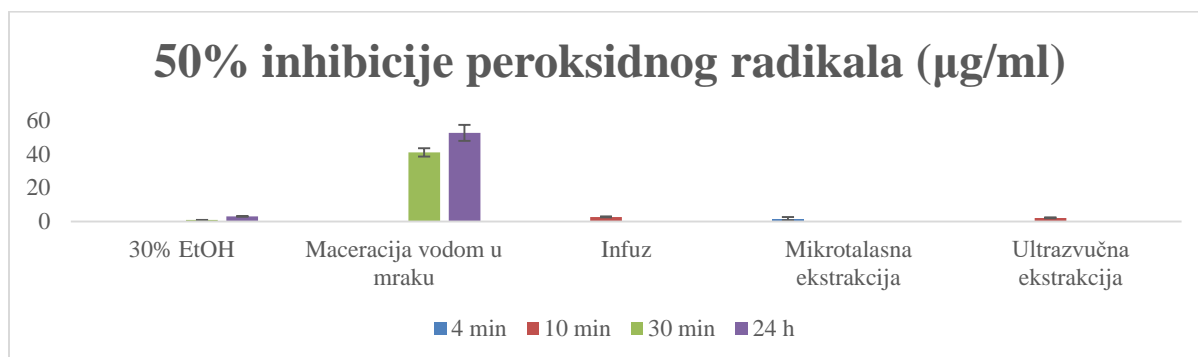
Grafikon 30 pokazuje sličnosti i razlike između analiziranih PC1 i PC2 parametara. Rastvarači mogu biti podjeljeni u tri specifične grupe. Prva grupa obuhvata nepolarne rastvarače (hloroform, dihlormetan i heksan) koji pokazuju negativne vrednosti za obe glavne komponente, druga grupa objedinjuje polarne rastvarače (osim razblaženih etanola) koji pokazuju pozitivne PC1 vrednosti i negativne PC2 vrednosti, dok treća grupa sadrži etanole različitog razblaženja koji imaju pozitivne vrednosti za obe glavne komponente. Ova klasifikacija je veoma slična podeli dobijenoj klaster analizom.

5.1.7. Ispitivanja antioksidativne aktivnosti

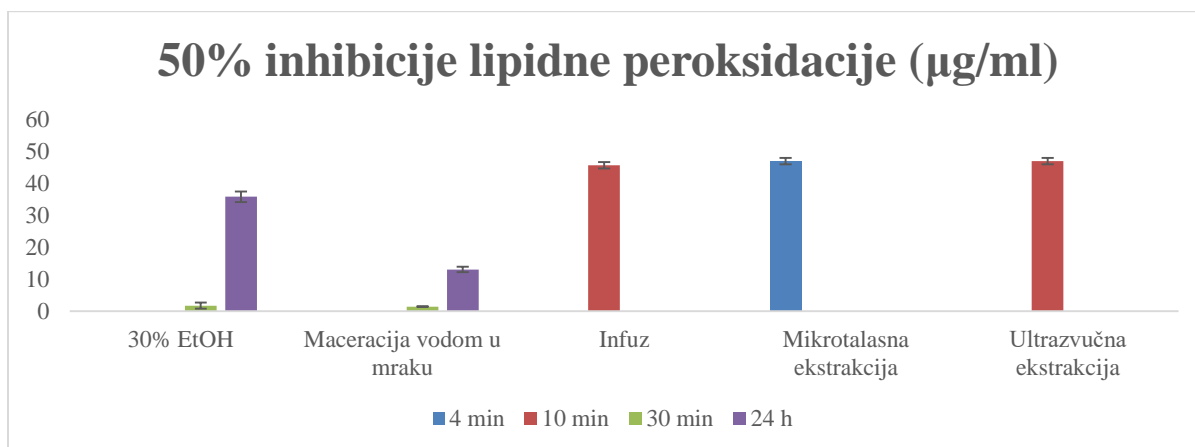
In vitro testovi ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata *Ocimum basilicum* (sito 0,3) prikazani su na **grafikonima 31-33**.



Grafikon 31. 50% inhibicije hidroksilnog radikala ($\mu\text{g/ml}$)



Grafikon 32. 50% inhibicije peroksidnog radikala ($\mu\text{g/ml}$)



Grafikon 33. 50% inhibicije lipidne peroksidacije ($\mu\text{g/ml}$)

Koncentracija ekstrakata koja je bila potrebna za neutralizaciju 50% hidroksilnog radikala kretala se u opsegu od 11,44 do 57,86 $\mu\text{g/ml}$. Najmanju IC_{50} vrednost je pokazao uzorak dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom tokom 10 minuta, što pokazuje i najjača antioksidativna aktivnost, a najveća vrednost pripadala je uzorku dobijenom ekstrakcijom 30% etanolom tokom 30 minuta.

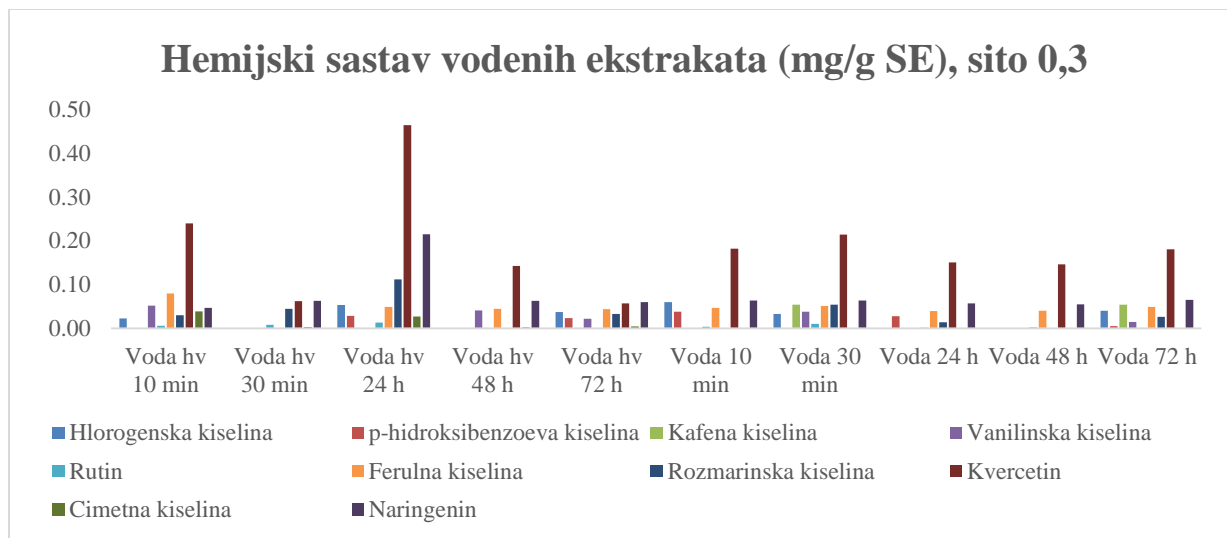
Ispitivanje antioksidativne aktivnosti neutralizacijom vodonik-peroksida pokazuje da su uzorci dobijeni različitim metodama ekstrakcije pokazali IC_{50} vrednosti u opsegu od 0,92 do 52,45 $\mu\text{g/ml}$. Najmanju vrednost, odnosno najveću antioksidativnu aktivnost, imao je uzorak dobijen ekstrakcijom 30% etanolom tokom 30 minuta, dok je najveću vrednost pokazao ekstrakt dobijen ekstrakcijom vodom tokom 24 h.

IC_{50} vrednosti, kojom se ispitala sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije kretale su se od 1,41 do 47,00 $\mu\text{g/ml}$. Najniža IC_{50} vrednost odgovarala je uzorku dobijenom ekstrakcijom vodom tokom 30 minuta, dok je najveća vrednost poticala od ekstrakta dobijenog ultrazvučnom ekstrakcijom.

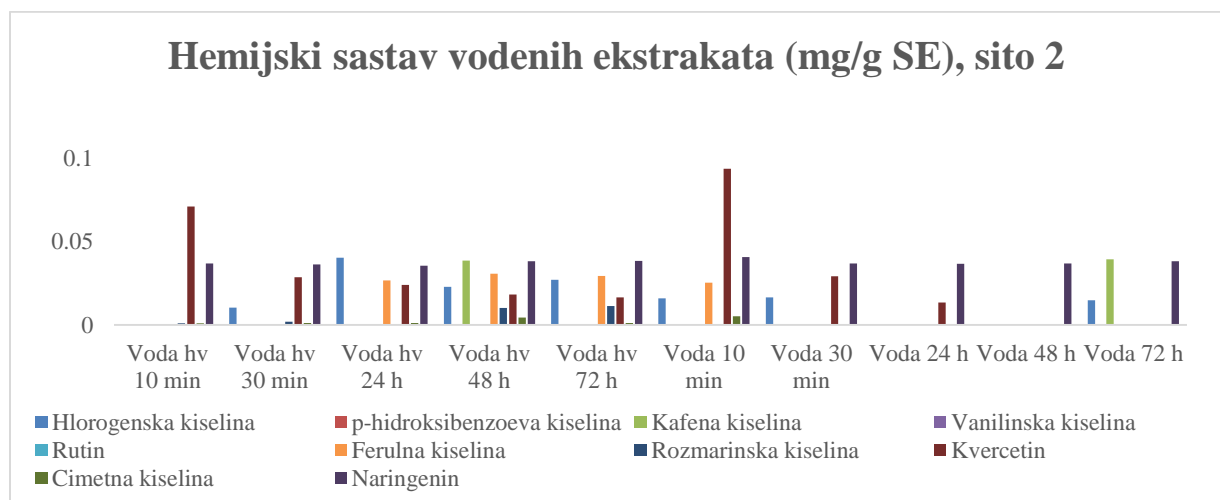
5.1.8. HPLC analiza

Rezultati HPLC analize ekstrakata *Ocimum basilicum* su prikazani na **grafikonima 34-45**. Analiza je vršena primenom HPLC metode za određivanje fenolnih komponenti u ekstraktima biljaka iz familije *Lamiaceae* (Ziakova A, 2003). Aktivne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Kvantitativno određivanje komponenata je izvršeno metodom spoljašnjeg standarda. Uvrštavanjem dobijenih vrednosti površine ispod krive u odgovarajuće regresione jednačine, dobijene su vrednosti koncentracija komponenata koje su prisutne u analiziranim ekstraktima.

Na **grafikonima 34 i 35** je prikazan hemijski sastav ekstrakata dobijenih ekstrakcijom vodom u prisustvu svetlosti, i bez prisustva svetlosti, u trajanju od 10 i 30 minuta, 24, 48 i 72 časa.

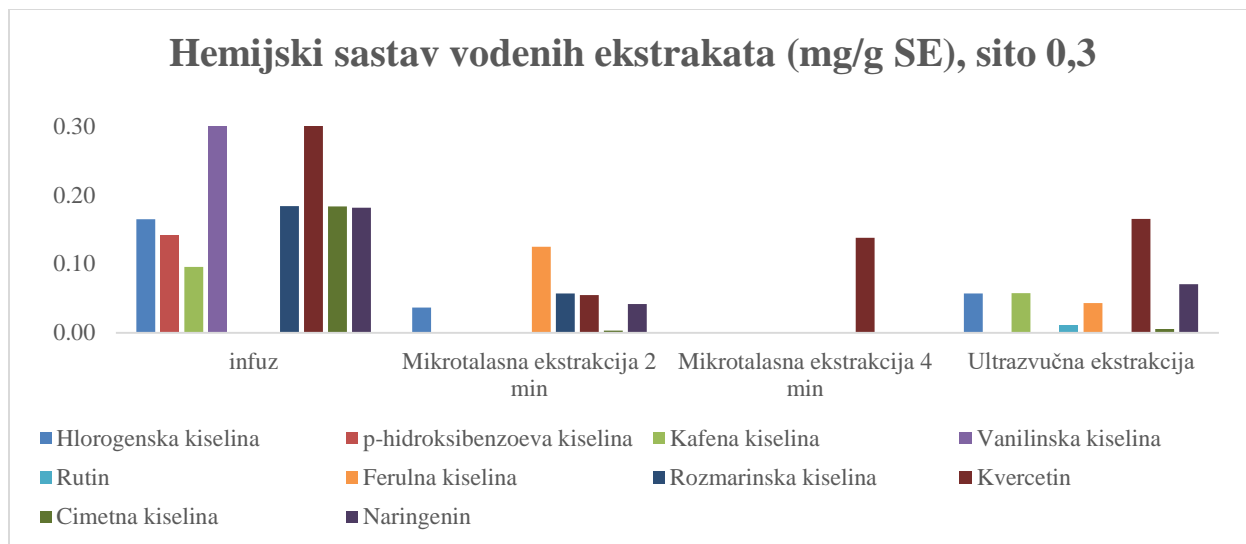


Grafikon 34. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom vodom u prisustvu i bez prisustva svetlosti, sito 0,3

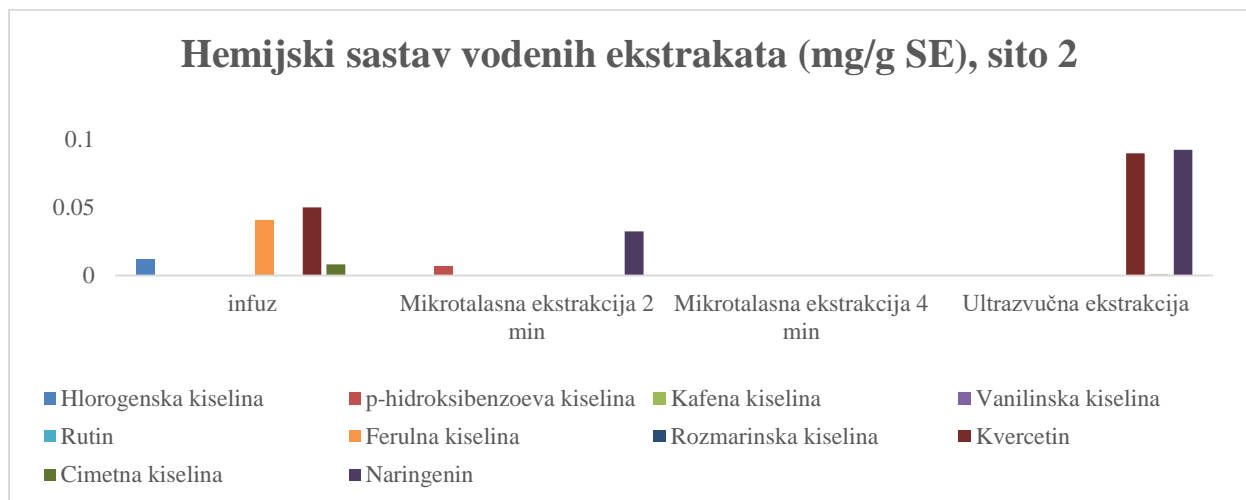


Grafikon 35. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom vodom u prisustvu i bez prisustva svetlosti, sito 2

Na **grafikonima 36 i 37** je prikazan hemijski sastav vodenih ekstrakata dobijenih pripremom droge kao infuz, mikrotalasnom (vreme trajanja ekstrakcije 2 i 4 minuta) i ultrazvučnom ekstrakcijom (vreme trajanja ekstrakcije 10 minuta).



Grafikon 36. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom i pripremom kao infuz, sito 0,3

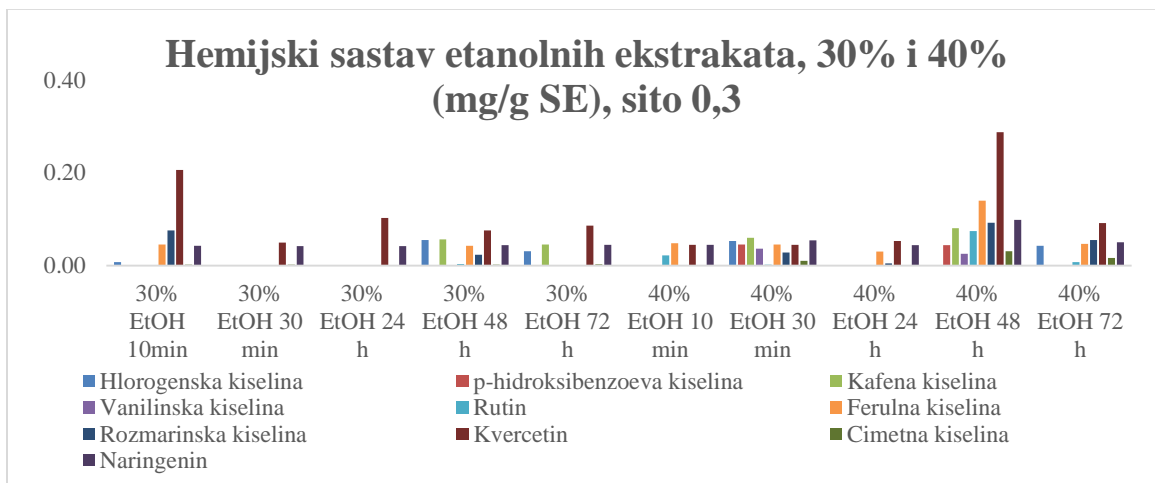


Grafikon 37. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ultrazvučnom i mikrotalasnom ekstrakcijom i pripremom kao infuz, sito 2

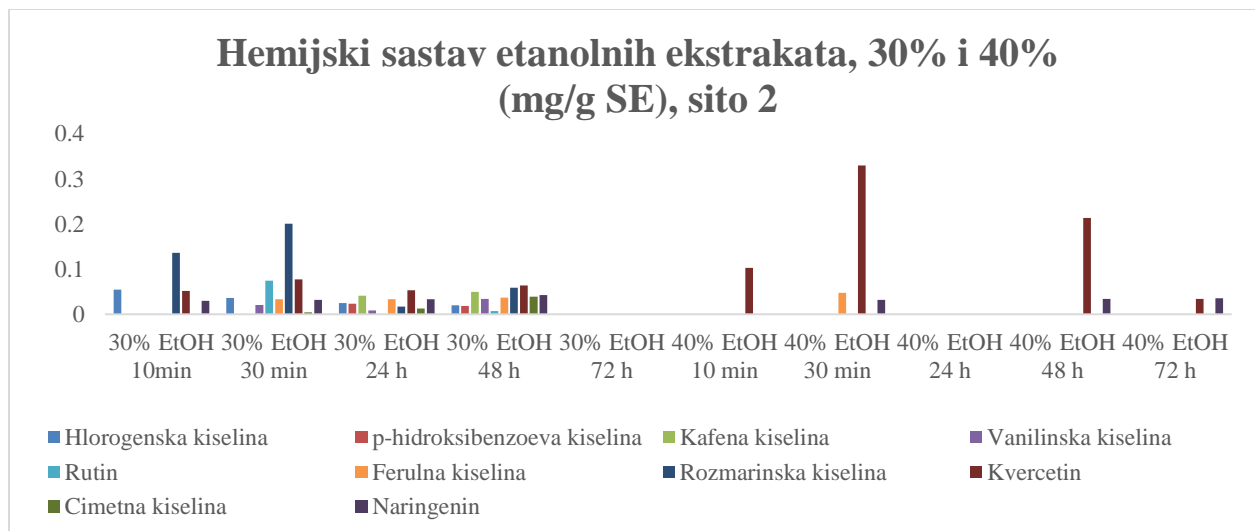
Fenolne kiseline koje su analizirane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu bile su: hlorogenska, *p*-hidroksi benzoeva, kafena, vanilinska, ferulna, rozmarinska i cimetna kiselina, a identifikovani su flavonoidi: rutin, kvercetin i naringenin. U vodenim ekstraktima su izolovane sve nabrojane fenolne kiseline i flavonoidne komponente, u manjoj ili većoj meri. Najdominantnije kiseline su bile rozmarinska i ferulna, dok su najzastupljeniji flavonoidi bili kvercetin i naringenin. Drugi

naučnici, baveći se sličnom tematikom, došli su do istih saznanja (Lee J, 2009; Mastaneh M, 2014; Loughrin JH, 2001; Hossain M, 2010). Jedinjenja iz grupe flavonoida nisu pokazala pad koncentracije u zavisnosti od prisustva svetlosti. Sa porastom vremena ekstrakcije, rasla je i koncentracija izolovanih fenolnih i flavonoidnih jedinjenja, što je i očekivano, jer je omogućen intenzivniji kontakt sa rastvaračem. Polusatna ili ekstrakcija u trajanju od 24 časa pokazale su se kao najefikasnije za ekstrakciju većine fenolnih i flavonoidnih komponenata. Razliku objašnjavamo različitim strukturama flavonoidnih jedinjenja, u odnosu na fenolne kiseline, koji zbog svoje složenosti zahtevaju duži kontakt sa odgovarajućim rastvaračem, kako bi se maksimalizovala njihova ekstrakcija iz biljnog materijala. Droge većeg stepena usitnjenosti pokazale su bolje rezultate u pogledu identifikacije većeg broja komponenata, što se objašnjava boljim transferom mase kod usitnjenijeg biljnog materijala u odnosu na krupniji. Poredeći vodene preparacije uz zagrevanje, ultrazvuk ili mikro talase, može se uočiti da je najviše komponenata identifikovano kod infuza stepena usitnjenosti 0,3 mm, što se može označiti kao jedna od najpogodnijih ekstrakcionih metoda za preparaciju ekstrakta. Infuz (priprema čaja), kao jedan od najkorišćenijih metoda pripreme u domaćinstvu može se savetovati stanovništvu, s obzirom da sadrži mnogo fenolnih komponenata koje doprinose očuvanju zdravlja.

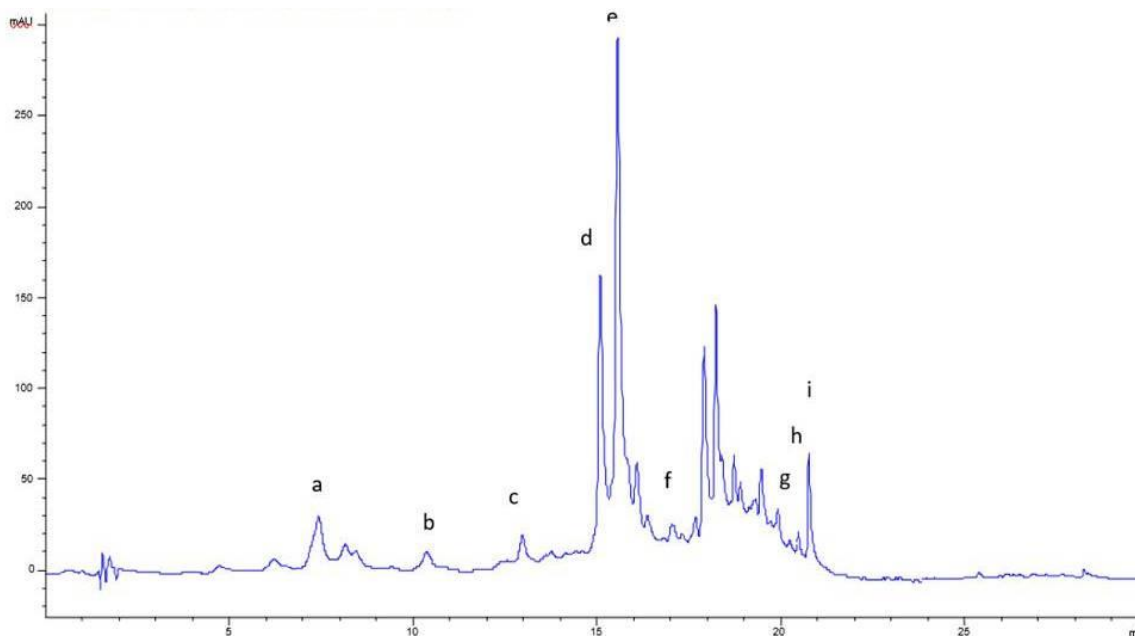
Na **grafikonima 38 i 39** prikazan je hemijski sastav ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa etanolom koncentracije 30% i 40% (v/v) u trajanju od 10 i 30 minuta, 24, 48 i 72 časa, a na **slici 14** je dat reprezentativni hromatogram ekstrakta bosiljka dobijenog maceracijom 40% etanolom tokom 48h.



Grafikon 38. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom etanolom koncentracije 30% i 40% (v/v), sito 0,3

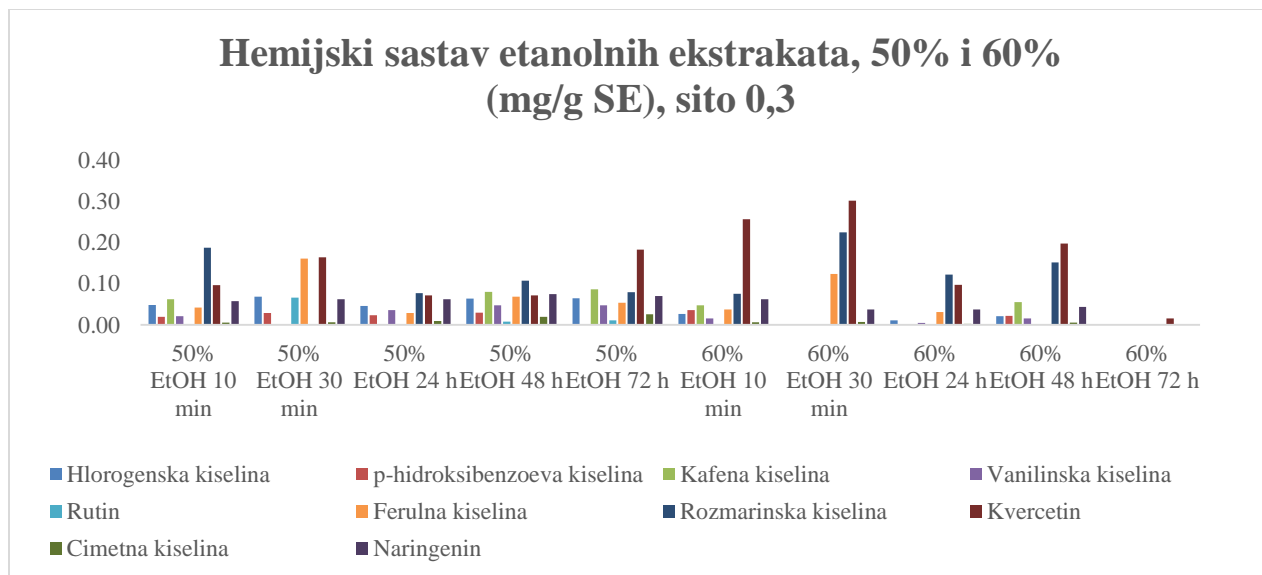


Grafikon 39. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom etanolom koncentracije 30% i 40% (v/v), sito 2

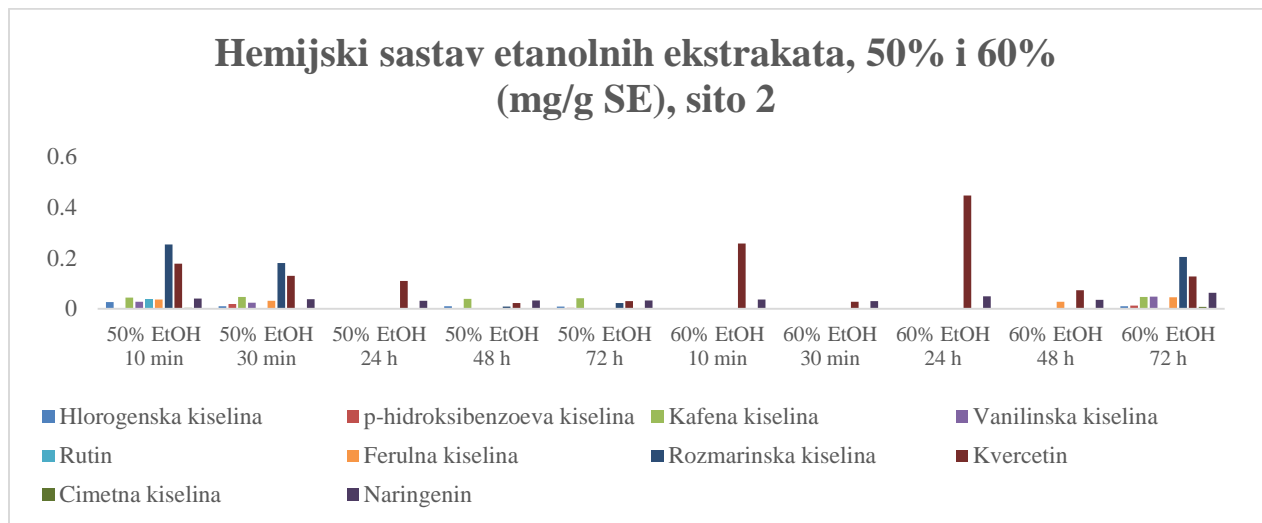


Slika 14. Hromatogram 40% etanolnog ekstrakta bosiljka (48 h): a) hlorogenska kiselina, b) kafena kiselina, c) epikatehin, d) kumarinska kiselina, e) rutin, f) rozmarinska kiselina, g) kvercetin, h) *trans*-cimetna kiselina, i) naringenin

Na **grafikonima 40 i 41** je prikazan hemijski sastav ekstrakata dobijenih ekstrakcijom etanolom koncentracije 50% i 60% (v/v) u trajanju od 10 i 30 minuta, 24, 48 i 72 časa.



Grafikon 40. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom etanolom koncentracije 50% i 60% (v/v), sito 0,3

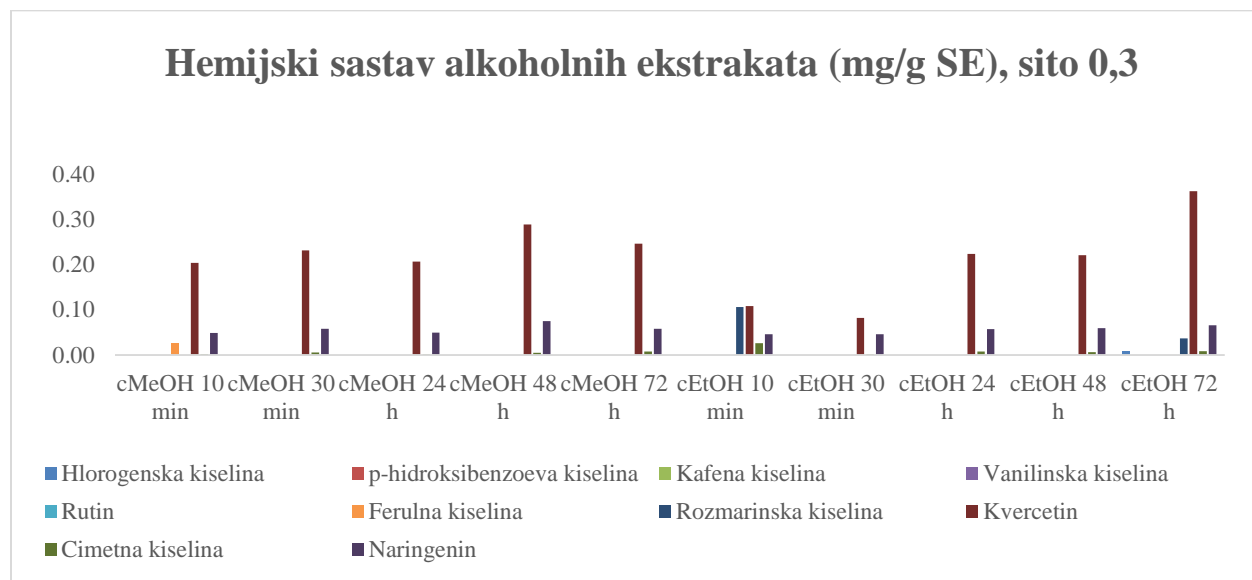


Grafikon 41. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom etanolom koncentracije 50% i 60% (v/v), sito 2

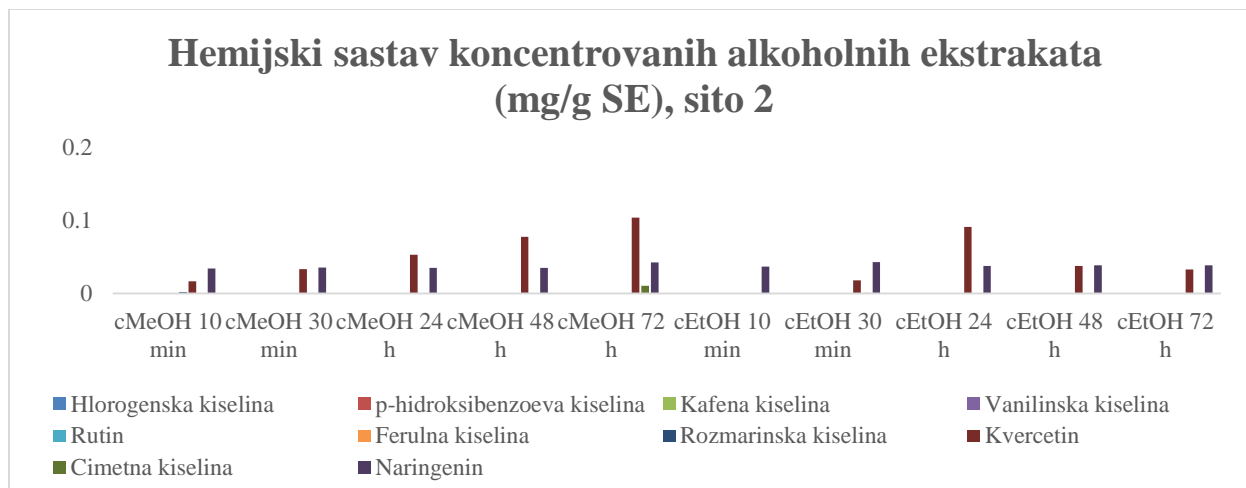
HPLC analiza razblaženih etanolnih ekstrakata pokazala je takođe dobru izolaciju fenolnih komponenata u različitim koncentracijama. Kod ekstrakata većeg stepena usitnjenosti identifikovano je više komponenata, što se objašnjava boljom ekstrakcijom zbog sitnijih čestica. Mešavine etanola i vode, u različitim proporcijama, pokazale su se kao dobar rastvarač za izdvajanje fenolnih kiselina i flavonoida. Dominantne fenolne kiseline kod stepena usitnjenosti 0,3

mm bile su rozmarinska, cimetna i ferulna, dok su naringenin i kvercetin bile dominantne flavonoidne komponente. Etanol koncentracija 50 i 60% se pokazao kao selektivniji rastvarač u smislu identifikacije više komponenata u odnosu na 30 i 40% etanol. Kod stepena usitnjenosti 2 mm, dominantne fenolne kiseline su bile rozmarinska i cimetna, a od flavonoida takođe naringenin i kvercetin. Poredeći vodene i etanolne ekstrakte, kod stepena usitnjenosti 0,3 mm, vodeni i etanolni rastvori (30-60%, v/v) su pokazali slične vrednosti za fenolne komponente, dok su kod stepena usitnjenosti 2 mm, dobijene nešto niže vrednosti kod vodenih preparacija. To se može objasniti većim afinitetom etanola prema fenolnim komponentama. Kod etanolnih preparacija se može uočiti trend povećanja koncentracije izolovanih supstanci sa povećanjem dužine trajanja ekstrakcije.

Na **grafikonima 42 i 43** prikazan je hemijski sastav ekstrakata dobijenih ekstrakcijom sa koncentrovanim etanolom i metanolom u trajanju od 10 i 30 minuta, 24, 48 i 72 časa.



Grafikon 42. Hemijski sastav koncentrovanih alkoholnih ekstrakata (mg/g SE), sito 0,3



Grafikon 43. Hemijski sastav koncentrovanih alkoholnih ekstrakata (mg/g SE), sito 2

Nakon ekstrakcije koncentrovanim alkoholima (etanolom i metanolom), identifikovano je samo nekoliko fenolnih komponenti. Od flavonoida, koji su bili generalno dominantniji, identifikovani su kvercetin i naringenin, dok su kiseline (cimetna i rozmarinska) bile izolovane u malim količinama. Slična studija je pokazala da je ekstrakcija flavonoida optimizovana sa 100% etanolom, ali to ukazuje da predstavlja i najbolju antioksidativnu aktivnost (Thoo YY, 2010). Koncentrovani rastvarači mogu da izoluju flavonoide, ali su mnogo manje selektivni prema fenolnim kiselinama koje su polarnije i bolje se ekstrahuju po principu “slično se u sličnom rastvara” (Zhang ZS, 2007). Generalno, više vrednosti su dobijene nakon ekstrakcije kod većeg stepena usitnjenosti (sito 0,3 mm), što je i razumljivo s obzirom na manju veličinu čestica. Drugi autori sličnih studija takođe ukazuju na značaj veličine čestica, te da se veći prinosi dobijaju upotrebom većeg usitnjenja (Spigno G, 2007). Sa porastom dužine trajanja ekstrakcije može se uočiti porast koncentracije identifikovanih supstanci, što je takođe u saglasnosti sa sličnim radovima (Lapornik B, 2005).

Kiseline, poput hlorogenske, *p*-hidroksibenzoeve, kafene, vanilinske, ferulne, rozmarinske i cimetne, kao i rutin, kvercetin i naringenin su identifikovani u različitim koncentracijama u pripremljenim ekstraktima bosiljka. U **tabeli 9** su prikazani detalji uslova ekstrakcije koji su dali ekstrakte sa najvećim sadržajem odgovarajuće komponente nakon izvršene analize ekstrakata visokofikasnom tečnom hromatografijom i obradom dobijenih vrednosti uz pomoć odgovarajućih standarda. Kako je prikazano u **tabeli 9**, sadržaj hlorogenske kiseline je bio najveći u ekstraktu bosiljka stepena usitnjenosti 0,3 mm dobijenog nakon 30 minuta ekstrakcijom 50% etanolom i

iznosio je 0,069 mg/g suvog ekstrakta. Sadržaj *p*-hidroksibenzojeve kiseline bio je najveći u ekstraktu dobijenom nakon 30 minuta ekstrakcijom 40% etanolom i iznosio je 0,046 mg/g SE (sito 0,3). Kafena kiselina je najveću koncentraciju imala u ekstraktu pripremljenom kao infuz u trajanju od 10 minuta (sito 0,3), a koncentracija joj je iznosila 0,096 mg/g SE. Vanilinska kiselina je izolovana u koncentraciji od 0,052 mg/g SE u maceratu dobijenom maceracijom vodom u prisustvu svetlosti u trajanju od 10 minuta, sito 0,3. Maksimalne koncentracije rutina (0,745 mg/g SE) su dobijene u ekstraktu pripremljenom maceracijom 48 časova 40% etanolom (sito 0,3). Ferulna kiselina je u najvećoj meri izolovana iz ekstrakta koji je pripremljen maceracijom bosiljka 50% etanolom 30 minuta (sito 0,3), a koncentracija je iznosila 0,162 mg/g SE. Koncentracija rozmarinske kiseline od 0,253 mg/g SE zabeležena je u ekstraktu dobijenom nakon 10 min uz upotrebu 50% etanola kao rastvarača, stepena usitnjenosti 2 mm. Maksimalna koncentracija cimetine kiseline (0,183 mg/g SE) dobijena je u uzorku pripremljenom kao infuz nakon 10 minuta (sito 0,3), dok su maksimalne koncentracije kvercetina (0,466 mg/g SE) i naringenina (0,215 mg/g SE) dobijene analizom ekstrakata pripremljenih nakon ekstrakcije vodom u prisustvu svetlosti u trajanju od 24h, stepena usitnjenosti 0,3 mm.

Tabela 9. Detalji ekstrakcionih uslova za ekstrakte sa maksimalnim koncentracijama fenolnih jedinjenja

Jedinjenje	Maksimalna koncentracija (mg/g SE)	Rastvarač	Dužina trajanja ekstrakcije	Sito
Hlorogenska kiselina	0,096	50% EtOH	30 minuta	0,3
<i>p</i> -hidroksi benzojeva kiselina	0,046	40% EtOH	30 minuta	0,3
Kafena kiselina	0,096	infuz	10 minuta	0,3
Vanilinska kiselina	0,052	Voda u prisustvu svetlosti	10 minuta	0,3
Rutin	0,745	40% EtOH	48 h	0,3
Ferulna kiselina	0,162	50% EtOH	30 minuta	0,3
Rozmarinska kiselina	0,253	50 % EtOH	10 minuta	2
Kvercetin	0,466	Voda u prisustvu svetlosti	24 h	0,3
Cimetna kiselina	0,183	infuz	10 minuta	0,3
Naringenin	0,215	Voda u prisustvu svetlosti	24 h	0,3

Dominantna fenolna kiselina koja je određena u ekstraktima dobijenim u ovom ogledu je rozmarinska kiselina, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim studijama. Rozmarinska kiselina je takođe glavna komponenta i kod drugih predstavnika porodice *Lamiaceae* kao što su origano, ruzmarin, menta, žalfija i majoran (Lee J, 2009).

Od fenolnih kiselina, u drugim radovima, su izolovane još cimetna, ferulna, kafena, hidroksi benzoeva i vanilinska, što se podudara sa našim rezultatima. Rozmarinsku kiselinu karakteriše snažno antioksidativno delovanje, a ferulnu potencijalno preventivno delovanje protiv tumora debelog creva (Javanmardi J, 2002; Lee J, 2009; Loughrin JH, 2001; Mastaneh M, 2014).

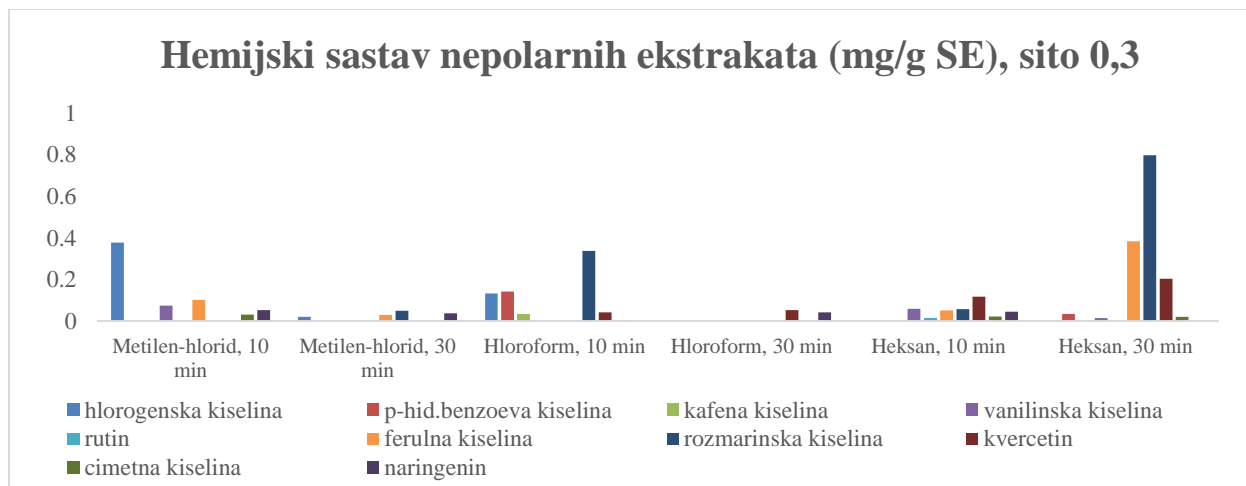
Studija sprovedena na hemijskoj karakterizaciji ekstrakta bosiljka pokazala je pored fenolnih komponenti određenih u ovom radu i prisustvo protokatehinske, litospermične, siringinske, *p*-kumarinske kiseline, katehina, eugenola, epirosmanola, karvakrola i drugih fenolnih i flavonoidnih jedinjenja (Nijeveldt RJ, 2001). Ovo se može objasniti osetljivošću korišćenog uređaja za detekciju i kvantifikaciju pomenutih jedinjenja (GC/MS).

Koncentracije flavonoidnih komponenata u dobijenim ekstraktima ovog istraživanja su pokazivale više vrednosti u odnosu na studiju sprovedenu u SAD (Loughrin JH, 2001). Ovakvi rezultati se objašnjavaju činjenicom da su autori zbog načina sušenja samog biljnog materijala izgubili mnogo kompleksnih fenola pa za naredna istraživanja preporučuju korišćenje liofilizovanog ili svežeg biljnog materijala.

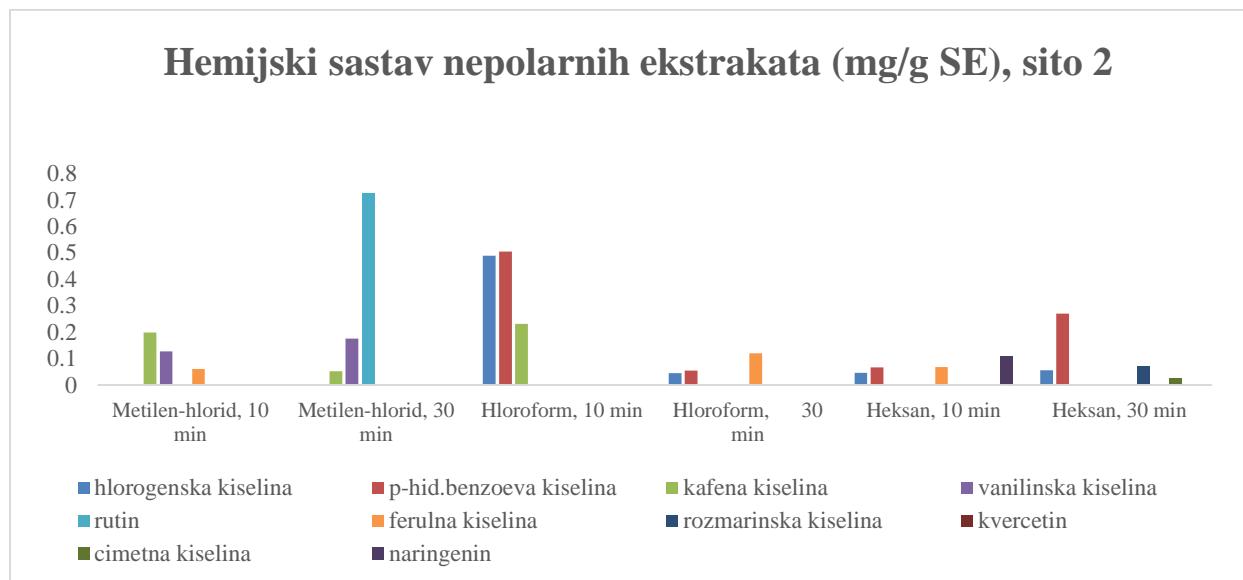
Uzimajući u obzir strukturu fenolnih jedinjenja, njihovu polarnost, kao i vrednosti iz **tabele 9** može se konstatovati da priprema infuza, odnosno upotreba vode kao rastvarača i upotreba razblaženih etanolnih rastvora predstavlja najbolji rastvarač za njihovu ekstrakciju.

Studija sprovedena na hemijskoj karakterizaciji ekstrakta bosiljka pokazala je pored fenolnih komponenti određenih u ovom radu, i prisustvo protokatehinske kiseline, katehina, eugenola, epirosmanola, karvakrola i drugih fenolnih i flavonoidnih jedinjenja (Nijeveldt RJ, 2001). Ovo se može objasniti osetljivošću korišćenog uređaja za detekciju i kvantifikaciju pomenutih jedinjenja (GC/MS).

Na **grafikonima 44 i 45** prikazan je hemijski sastav ekstrakata dobijenih ekstrakcijom nepolarnim rastvaračima u trajanju od 10 i 30 minuta.



Grafikon 44. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom nepolarnim rastvaračima (mg/g SE), sito 0,3



Grafikon 45. Hemijski sastav ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom nepolarnim rastvaračima (mg/g SE), sito 2

Hemijskom karakterizacijom ekstrakata bosiljka dobijenih ekstrakcijom nepolarnim rastvaračima je utvrđeno da se u uzorcima stepena usitnjenosti 0,3 mm ekstrahovanim 10 minuta dihlormetanom nalaze hlorogenska, vanilinska, ferulna, cimeta kiselina i naringenin, a u uzorcima ekstrahovanim 30 minuta hlorogenska, ferulna, rozmarinska kiselina i naringenin. U hloroformskim uzorcima, stepena usitnjenosti 0,3 mm ekstrahovanim 10 minuta nalaze se hlorogenska, *p*-hidroksibenzoeva, kafena, cimeta, rozmarinska kiselina i kvercetin, a u

ekstraktima dobijenim ekstrakcijom 30 minuta detektovani su kvercetin i naringenin. U ekstraktima heksana, stepena usitnjenosti 0,3 mm, ekstrahovanim 10 minuta detektovane su vanilinska, ferulna, rozmarinska, cimetna kiselina, rutin, kvercetin i naringenin, a ekstrahovanim 30 minuta *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, ferulna, rozmarinska, cimetna kiselina i kvercetin.

U ekstraktima stepena usitnjenosti 2 mm su dobijeni drugačiji rezultati. Nakon ekstrakcije dihlormetanom u trajanju od 10 minuta detektovane su kafena, vanilinska i ferulna kiselina, a nakon 30 minuta kafena, vanilinska kiselina i rutin. U hloroformskim ekstraktima od 10 minuta detektovane su hlorogenska, *p*-hidroksibenzoeva i kafena kiselina, a od 30 minuta hlorogenska, *p*-hidroksi benzoeva i ferulna kiselina. Ekstrakcijom pomoću heksana nakon 10 minuta dobijen je ekstrakt koji je sadržao hlorogensku, *p*-hidroksibenzoevu, ferulnu kiselinu i naringenin, a ekstrakcijom u trajanju od 30 minuta ekstrakt koji je sadržao hlorogensku, *p*-hidroksibenzoevu, rozmarinsku kiselinu i naringenin.

Određene fenolne komponente (fenolne kiseline i flavonoidi) u ispitivanim ekstraktima bosiljka u našem istraživanju u skladu su sa literaturom (Jayasinghe C, 2003). Takođe, dominantna fenolna kiselina kvantifikovana u ekstraktima je rozmarinska što je u saglasnosti sa sličnim istraživanjem (Lee J, 2009).

5.2. *In vivo* ispitivanja

5.2.1. Vrednosti telesne mase

Tabela 10. Vrednosti telesne mase na početku tretmana ((g), $\bar{x} \pm SD$) u kontrolnim i eksperimentalnim grupama

grupa	kontrola	aloksan
fiziološki	258±20 ^a	263,33±15,87
bosiljak	253,33±16,61 ^a	248,83±20,09
MKH	228,5±28,89	232,5±15,72
bosiljak + MKH	229,33±17,15	253,83±15,39
bosiljak (mikro)	214±13,83	241±40,37
bosiljak + MKH (mikro)	233,33±17,47	229,5±33,96

^ap<0,01 u odnosu na grupu kontrola tretiranu bosiljkom (mikro)

Nakon raspoređivanja životinja u kontrolne i eksperimentalne grupe metodom slučajnog izbora, pre početka tretmana, nije postojala statistički značajna razlika telesne mase između grupa laboratorijskih životinja, osim između grupa kontrole tretirane fiziološkim rastvorom i ekstraktom bosiljka u odnosu na kontrolu tretiranu bosiljkom u obliku mikrovezikula (*tabela 10*). Ova razlika može biti objašnjena činjenicom da su životinje bile preuzimane u različitom periodu godine, kao i da su različito tretirane pre dolaska na Katedru za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju. Približno jednaka masa životinja pre tretmana je pogodovala optimalnom izvođenju oglada.

Tabela 11. Vrednosti telesne mase na kraju sedmodnevnog tretmana ((g), $\bar{x} \pm SD$) u kontrolnim i eksperimentalnim grupama

grupa	kontrola	aloksan
fiziološki	287,33±15,24 ^a	275,5±30,66
bosiljak	280,33±13,57 ^b	253,5±20,46
MKH	281,5±35,57	234,67±29,1
bosiljak + MKH	280,67±19,57	257,67±16,28
bosiljak (mikro)	266±16,15	210,6±38,28 ^c
bosiljak + MKH (mikro)	233,33±17,47	228,5±53,66

^ap < 0,05 – u odnosu na grupu aloksan tretiranu bosiljkom

^bp < 0,01 – u odnosu na grupu aloksan tretiranu bosiljkom

^cp < 0,05 u odnosu na grupu aloksan tretiranu fiziološkim

Na kraju tretmana, telesna masa životinja koje su nakon primene aloksana tretirane vodenim ekstraktom bosiljka bila je značajno manja u odnosu na telesnu masu kontrolne grupe životinja tretiranih fiziološkim rastvorom ($p < 0,05$) i životinja tretiranih samo vodenim ekstraktom bosiljka ($p < 0,01$) (*tabela 11*). Kod grupe životinja koje su nakon aloksana tretirane bosiljkom, došlo je do značajno manjeg porasta telesne mase u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) i grupu tretiranu samo ekstraktom bosiljka ($p < 0,01$). Kod životinja tretiranih aloksanom došlo je do razaranja pankreasa, te je izazvan aloksanski insulin zavisni dijabetes i smanjen nivo insulina. Insulin koji je zadužen da transportuje glukozu do ćelija to ne može da uradi, pa organizam koristi druge izvore energije. Pošto je insulin snažan anabolički hormon, u uslovima njegovog nedostatka dolazi do povećanog katabolizma proteina i masti (Saltiel AR, 2001). Pored toga glukagon i adrenalin dodatno povećavaju katabolizam proteina i masti i time se objašnjava gubitak telesne mase. Osim

kod grupe tretirane aloksanom i bosiljkom u obliku mikrovezikula, u svim drugim grupama ekstrakt bosiljka je sprečio statistički značajno sniženje telesne mase u odnosu na kontrolu.

Tabela 12. Vrednosti promene telesne mase pre i posle sedmodnevnog tretmana ($\bar{x} \pm SD$) u kontrolnim i eksperimentalnim grupama

grupa	kontrola	aloksan
fiziološki	29,33±13,66 ^{b,c}	19,17±8,18
bosiljak	26,95±6,1 ^{b,c}	9±8,02
MKH	53±8,22	2,17±28,36
bosiljak + MKH	51,33±5,24	3,83±7,41
bosiljak (mikro)	52±4,6	-30,8±7,98 ^a
bosiljak + MKH (mikro)	40±14,79	-1±33,66

^ap<0,05 u odnosu na sve ostale grupe

^bp<0,01 u odnosu na grupu kontrolu tretiranu MKH, bosiljak + MKH, bosiljak (mikro)

^cp<0,01 u odnosu na grupu aloksan tretiranu bosiljkom

Tretman eksperimentalnih životinja prooksidativnim supstancama, u koje spada i aloksan, dovodi do značajne promene njihove telesne mase (Stilinović N, 2013). U našem ispitivanju, ako se uporede početne i krajnje vrednosti telesnih masa, zapaža se njihov porast u skoro svim grupama životinja (**tabela 12**). Međutim, kod grupa životinja koje su primile aloksan, porast telesne mase je bio statistički značajno niži u odnosu na kontrolu tretiranu fiziološkim rastvorom i grupu tretiranu bosiljkom. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima u literaturi, po kojima ekstrakti bosiljka ispoljavajući antioksidativno delovanje, sprečavaju nastanak metaboličkih poremećaja, a time i promenu telesne mase, usled delovanja prooksidativnih agenasa (Vidović SS, 2012, Arfa MM, 2008).

Tabela 13. Odnos mase nakon sedmodnevnog ogleda i mase jetre u kontrolnim i eksperimentalnim grupama

grupa	kontrola	aloksan
fiziološki	26,78±2,72	29,2±3,27 ^a
bosiljak	26,95±1,54	25,18±3,1
MKH	26,68±1,38	24,66±1,71
bosiljak + MKH	27,69±2,35	24,16±1,35
bosiljak (mikro)	25,85±1,8	24,65±2,26
bosiljak + MKH (mikro)	26,55±1,14	26,66±5,22

^a p<0,01 u odnosu na grupu sve ostale grupe tretirane aloksanom

Kod životinja tretiranih prooksidativnim supstancama došlo je do promene odnosa mase jetre i telesne mase zbog toksičnog oštećenja jetre (**tabela 13**). U ovom istraživanju, kod grupa životinja praćen je odnos telesne mase i mase jetre na kraju tretmana, pri čemu je uočena značajna razlika odnosa pomenutih parametara kod grupe aloksan tretirane fiziološkim rastvorom u odnosu na sve ostale grupe aloksan. Ova razlika ukazuje na moguću hepatotoksičnost kod grupe koja nije dobijala ekstrakt bosiljka, čime se pokazuje protektivno delovanje ekstrakta bosiljka. Izostanak makroskopskih promena jetre kod ostalih grupa tj. promene njene mase u odnosu na ukupnu masu životinja se objašnjava selektivnim toksičnim efektom aloksana na beta ćelije endokrinog pankreasa, dok se toksično delovanje na ostalim tkivima ne ispoljava u značajnijem obimu (Lenzen S, 2008; Szkudelski T, 2001; Etuk EU, 2010).

5.2.2. Vrednosti glikemije

U **tabeli 14** su prikazane vrednosti glikemije (ŠUK) kod normoglikemičnih životinja, (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$), pre i nakon sedmodnevnog peroralnog tretmana fiziološkim rastvorom, 1 ml/kg, vodenim ekstraktom bosiljka, 200 mg/kg, natrijumove soli monoketoholne kiseline, 4 mg/kg, kombinacije bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline primenjenih u pomenutim dozama, vodenim ekstraktom bosiljka u formulaciji mikrovezikula i kombinacije bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline u formulaciji mikrovezikula.

Tabela 14. Vrednosti glikemije kod normoglikemičnih životinja, (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$), pre i nakon sedmodnevnog tretmana

grupa	ŠUK pre	ŠUK posle
fiziološki	4,8±0,38	5,37±0,72
bosiljak	5,42±0,5	4,9±0,48 ^a
MKH	6,18±0,29	5,92±0,21
bosiljak + MKH	6,72±0,79	6,02±0,31 ^a
bosiljak (mikro)	5,97±0,42	6,37±0,58
bosiljak + MKH (mikro)	6,93±0,99	6,48±0,28

^ap<0,05 u odnosu na vrednosti pre tretmana

Nakon sedmodnevnog tretmana normoglikemičnih životinja vodenim ekstraktom bosiljka i kombinacije ekstrakta bosiljka i monoketoholne kiseline, došlo je do statistički značajnog smanjenja nivoa glukoze u krvi u odnosu na glikemiju pre tretmana. Prema rezultatima drugih autora, vodeni ekstrakt bosiljka može brzo i trenutno da smanji glikemiju normoglikemičnih pacova, ali to ne ostavlja dugoročne posledice na glikemiju. Razlog ovome su očuvani regulatorni mehanizmi normoglikemičnih životinja, pre svega, smanjena potrošnja glukoze i stimulacija glukoneogeneze u jetri (Gerich JE, 1988). Ekstrakt bosiljka je ipak u kombinaciji sa žučnom kiselinom ispoljio antihyperglikemijski efekat čak i kod normoglikemičnih životinja.

U **tabeli 15** su prikazane vrednosti glikemije kod dijabetičnih životinja, (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$), pre i nakon sedmodnevnog peroralnog tretmana fiziološkim rastvorom, 1 ml/kg, vodenim ekstraktom bosiljka, 200 mg/kg, natrijumove soli monoketoholne kiseline, 4 mg/kg, kombinacije bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline primenjenih u pomenutim dozama, vodenim ekstraktom bosiljka u formulaciji mikrovezikula i kombinacije bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline u formulaciji mikrovezikula.

Tabela 15. Vrednosti glikemije kod dijabetičnih životinja, (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$), pre i nakon sedmodnevnog tretmana

grupa	ŠUK pre	ŠUK posle
fiziološki	25,07±6,67	17,93±11,19
bosiljak	26±5,55	15,43±4,65 ^a
MKH	30,68±0,67	19,50±8,55 ^a
bosiljak+MKH	30,68±3,7	5,50±1,04 ^{a,b}
bosiljak(mikro)	31,84±1,77	23,64±3,84 ^c
bosiljak+MKH(mikro)	33,45±7,45	14,23±12,87 ^a

^ap<0,01 u odnosu na vrednosti pre tretmana

^bp<0,01 u odnosu na kontrolu i grupe bosiljak, MKH, bosiljak (mikro)

^cp<0,05 u odnosu na vrednosti pre tretmana

U ovom istraživanju, za indukciju hiperglikemije kod laboratorijskih životinja je korišćen aloksan. Aloksan je veoma nestabilna hidrofilna supstanca, sa kratkim poluvremenom trajanja (1,5 minuta) i strukturno je veoma sličan glukozi. Vezuje se za GLUT2 glukozne transportere koji se nalaze na površini beta ćelija pankreasa i ulazi u iste, gde stvaranjem reaktivnih vrsta kiseonika dovodi do njihovih oštećenja. Ovo oštećenje je selektivno, jer aloksan oštećuje samo beta ćelije *Langerhans*-ovih ostrvaca, dok druge ostaju netaknute. Smrt beta ćelija koju izaziva aloksan je po tipu nekroze, za razliku od smrti beta ćelija koja nastaje kod obolelih od dijabetes melitusa tipa I, gde je ona po tipu apoptoze, tako da se ovaj tip dijabetesa naziva aloksanski dijabetes (Lenzen S, 2008; Szkodelski, 2001; Etuk EU, 2010).

Ne postoji statistički značajna razlika koncentracije glukoze u krvi životinja sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom pre i posle sedmodnevne primene fiziološkog rastvora. Sedmodnevni tretman vodenim ekstraktom bosiljka, natrijumovom soli monoketoholne kiseline, kombinacijom natrijumove soli monoketoholne kiseline i vodenog ekstrakta bosiljka, kao i kombinacije ekstrakta bosiljka i monoketoholne kiseline u farmaceutskoj formulaciji doveo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije glukoze u krvi životinja sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom u odnosu na vrednosti pre tretmana (p<0,01), što ukazuje da bosiljak poseduje hipoglikemijsko i antihiperglikemijsko dejstvo. Nakon sedmodnevne primene ekstrakta bosiljka u formulaciji mikrovezikula došlo je do statistički značajnog smanjenja glikemije u odnosu na vrednosti pre tretmana, sa statističkom značajnošću p<0,05.

Kod grupe hiperglikemičnih životinja tretiranih kombinacijom natrijumove soli monoketoholne kiseline i vodenog ekstrakta bosiljka, koncentracija glukoze u krvi je statistički značajno niža kako u odnosu na kontrolu, tako i u poređenju sa grupama hiperglikemičnih životinja koje su tretirane samo ekstraktom bosiljka ili samo monoketoholnom kiselinom ($p < 0,01$). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ekstrakt bosiljka i monoketoholna kiselina ispoljavaju sinergistički hipoglikemijski i antihiperglikemijski efekat.

Kod dijabetičnih životinja, nakon sedmodnevnog tretmana vodenim ekstraktom bosiljka, došlo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti glikemije. Dobijeni rezultati se podudaraju sa podacima drugih studija u kojima je bosiljak ispoljio hipoglikemijsko i antihiperglikemijsko delovanje (Zeggwagh NA, 2007). Prema literaturnim navodima, antihiperglikemijsko delovanje ekstrakta bosiljka je posledica inhibicije aktivnosti α -amilaze i α -glukozidaze, zbog čega se usporava resorpcija glukoze iz intestinalnog trakta i sprečava nastanak postprandijalne hiperglikemije (El-Beshbisy HA, 2012), kao i delovanja na ćelije ciljnih tkiva insulina, na kojima bosiljak potencira preuzimanje glukoze iz krvi, identično delovanju bigvanida i tiazolidindiona (Broadhurst CL, 2000).

Brojna ispitivanja ukazuju da i žučne kiseline imaju uticaj na metabolizam glukoze i da ostvaruju hipoglikemijsko i antihiperglikemijsko delovanje. Žučne kiseline inhibišu transkripciju gena neophodnih za sintezu enzima fosfoenolpiruvat karboksikinaze, ključnog u procesu hepatičke glukoneogeneze. Time se otvaraju nova područja istraživanja supstanci značajnih za regulisanje homeostaze glukoze kod obolelih od dijabetesa (De Fabiani E, 2004).

S obzirom da preparati bosiljka svoj uticaj na glikoregulaciju ispoljavaju prvenstveno povećanjem iskoristljivosti glukoze u perifernim tkivima i da pri tome ne opterećuju endokrini pankreas, potrebno je u daljim ispitivanjima utvrditi njihovu efikasnost, kao pomoćnih lekovitih preparata kod pacijenata obolelih od tipa II dijabetesa.

5.2.3. OGT test

U **tabeli 16** su prikazane vrednosti testa oralnog opterećenja glukozom (OGT test, mmol/l, $\bar{x} \pm SD$) kod normoglikemičnih životinja posle sedmodnevnog tretmana *per os*, fiziološkim rastvorom (1 ml/kg) i vodenim ekstraktom bosiljka, 200 mg/kg.

Tabela 16. Vrednosti testa oralnog opterećenja glukozom (OGT test, mmol/l, $\bar{x} \pm SD$)

grupa	glikemija pre OGT test	glikemija posle OGT test
fiziološki + glukoza	6,18 ± 0,29	7,65 ± 0,46
bosiljak + glukoza	6,72 ± 0,79	7,18 ± 0,39

Posle testa oralnog opterećenja glukozom, vrednosti glikemije kod grupe tretirane vodenim ekstraktom bosiljka su bile niže u odnosu na kontrolu, ali postignuta razlika nije bila statistički značajna. Predtretman vodenim ekstraktom bosiljka nije izazvao statistički značajne promene koncentracije glukoze u krvi nakon testa oralnog podnošenja glukoze u poređenju sa kontrolnom grupom.

5.2.4. Lipidni status

U *tabeli 17* su predstavljene koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$) i indeks ateroskleroze u serumu normoglikemičnih i životinja sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom, nakon sedmodnevnog *per os* tretmana fiziološkim rastvorom, 1 ml/kg i ekstraktom bosiljka 200 mg/kg.

Tabela 17. Lipidni status u serumu normoglikemičnih i dijebetičnih životinja, nakon sedmodnevnog *per os* tretmana fiziološkim rastvorom i ekstraktom bosiljka

grupa	TGC	ukupni holesterol	HDL	LDL	indeks ateroskleroze
fiziološki	0,56±0,14	1,17±0,2	0,7±0,14	0,2±0,09	0,28±0,07
bosiljak	0,5±0,09	1,04±0,3	0,6±0,19	0,2±0,11	0,35±0,05
aloksan+fiziološki	0,89±0,99	0,96±0,197	0,56±0,15	0,34±0,212	0,45±0,32
aloksan+bosiljak	0,56±0,173	1,07±0,553	0,585±0,319	0,25±0,234	0,367±0,163

Ne postoji značajna razlika koncentracije TGC, ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola i indeksa ateroskleroze između normoglikemičnih životinja i životinja sa aloksanom

izazvanom hiperglikemijom koje su bile tretirane samo fiziološkim rastvorom i samo ekstraktom bosiljka.

U **tabeli 18** su prikazane koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$) i indeks ateroskleroze u serumu normoglikemičnih životinja nakon sedmodnevnog *per os* tretmana fiziološkim rastvorom, 1 ml/kg, vodenim ekstraktom bosiljka, 200 mg/kg, natrijumove soli monoketoholne kiseline, 4 mg/kg, kombinacije bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline primenjenih u pomenutim dozama, vodenim ekstraktom bosiljka u formulaciji mikrovezikula i kombinacije bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline u formulaciji mikrovezikula.

Tabela 18. Koncentracija triglicerida, ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$) i indeks ateroskleroze u serumu normoglikemičnih životinja

grupa	TGC	ukupni holesterol	HDL	LDL	indeks ateroskl.
fiziološki	0,56±0,14	1,16±0,19	0,7±0,14	0,2±0,08	0,28±0,07
bosiljak	0,50±0,09	1,03±0,30	0,59±0,19	0,2±0,1	0,35±0,05
MKH	0,63±0,14	1,77±0,28 ^b	0,94±0,15 ^{c,d}	0,56±0,12 ^e	0,58±0,07 ^f
bosiljak + MKH	0,65±0,10	1,87±0,19 ^b	0,99±0,08 ^{c,d}	0,56±0,11 ^e	0,58±0,11 ^f
bosiljak (mikro)	0,6±0,175	1,63±0,371 ^b	0,89±0,213 ^d	0,43±0,151 ^e	0,48±0,075
bosiljak + MKH (mikro)	0,31±0,106 ^a	1,25±0,137	0,7±0,086	0,4±0,11 ^d	0,57±0,137

^ap<0,05 u odnosu na sve ostale grupe TGC

^bp<0,01 u odnosu na grupu fiziološki, bosiljak i bosiljak + MKH (mikro)

^cp<0,01 u odnosu na grupu fiziološki

^dp<0,01 u odnosu na grupu bosiljak i bosiljak + MKH (miko)

^ep<0,01 u odnosu na fiziološki i bosiljak

^fp<0,01 u odnosu na grupu fiziološki i bosiljak

Primena vodenog ekstrakta bosiljka kod normoglikemičnih životinja nije dovela do statistički značajnih promena lipidnog statusa u poređenju sa kontrolom (tretmanom fiziološkim rastvorom). Međutim, ekstrakt bosiljka primenjen u obliku mikrovezikula, doveo je do statistički značajnog porasta nivoa ukupnog i LDL holesterola normoglikemičnih životinja, dok se koncentracija HDL holesterola i indeks ateroskleroze nisu značajnije razlikovali u odnosu na normoglikemične životinje tretirane fiziološkim rastvorom.

Primena kombinacije ekstrakta bosiljka i monoketoholne kiseline u obliku mikrovezikula je dovela do statistički značajnog sniženja koncentracije triglicerida u odnosu na sve ostale grupe normoglikemičnih životinja ($p < 0,05$).

Kod grupe normoglikemičnih životinja tretiranih natrijumovom soli monoketoholne kiseline, koncentracije ukupnog, LDL i HDL holesterola, kao i indeks ateroskleroze, bili su značajno povećani u poređenju sa tretmanom fiziološkim rastvorom.

Koncentracija ukupnog holesterola je bila statistički značajno viša u grupama tretiranim monoketoholnom kiselinom, kombinacijom ekstrakta bosiljka i monoketoholne kiseline i bosiljkom u obliku mikrovezikula u odnosu na kontrolu i grupe tretirane ekstraktom bosiljka i ekstraktom bosiljka i monoketoholnom kiselinom u obliku mikrovezikula ($p < 0,01$).

U serumu normoglikemičnih životinja, koncentracija HDL holesterola je statistički značajno viša u grupama tretiranim monoketoholnom kiselinom, kombinacijom ekstrakta bosiljka i monoketoholne kiseline i bosiljkom u obliku mikrovezikula u odnosu na kontrolu i grupe tretirane ekstraktom bosiljka i ekstraktom bosiljka i monoketoholnom kiselinom u obliku mikrovezikula ($p < 0,01$). To ukazuje na protektivno dejstvo ekstrakta bosiljka i soli žučne kiseline, kao i njihove kombinacije.

Statistički značajno niža koncentracija LDL holesterola je postignuta nakon tretmana ekstraktom bosiljka ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolu i ostale eksperimentalne grupe, što ukazuje na hipolipidemijsko dejstvo bosiljka čak i kod normoglikemičnih životinja.

Indeks ateroskleroze je statistički značajno viši u grupama tretiranim monoketoholnom kiselinom i kombinacijom ekstrakta bosiljka i monoketoholne kiseline u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu ekstraktom bosiljka, $p < 0,01$.

Tabela 19. Koncentracija triglicerida, ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola (mmol/l, $\bar{x} \pm SD$) i indeks ateroskleroze u serumu dijabetičnih životinja

grupa	TGC	ukupni holesterol	HDL	LDL	indeks ateroskl.
fiziološki	0,89±0,99	0,96±0,197	0,56±0,15	0,34±0,212	0,45±0,32
bosiljak	0,55±0,17 ^a	1,07±0,55	0,58±0,31	0,25±0,23	0,36±0,16
MKH	1,06±0,35	2,01±0,3 ^b	1,11±0,15 ^b	0,41±0,27	0,36±0,19
bosiljak+MKH	0,54±0,10 ^b	2,20±0,29 ^b	1,18±0,18 ^b	0,75±0,13 ^{b,d}	0,65±0,05
bosiljak(mikro)	0,48±0,416	1,56±0,437	0,95±0,257 ^c	0,41±0,206	0,42±0,179
bosiljak+MKH(mikro)	0,55±0,345	1,65±0,646	0,94±0,366 ^c	0,48±0,127	0,5±0,115

^ap<0,05 u odnosu na grupu fiziološki

^bp<0,01 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i bosiljkom

^cp<0,01 u odnosu na grupu tretiranu bosiljkom

^dp<0,01 u odnosu na grupu tretiranu MKH

Kod životinja sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom koje su nakon toga tretirane 7 dana vodenim ekstraktom bosiljka i kombinacijom ekstrakta bosiljka i monoketoholne kiseline, koncentracija triglicerida je statistički značajno niža u odnosu na kontrolu, p<0,05 (*tabela 19*).

Koncentracija ukupnog holesterola je statistički značajno viša kod dijabetičnih životinja tretiranih monoketoholnom kiselinom i ekstraktom bosiljka u kombinaciji sa monoketoholnom kiselinom, kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na grupu tretiranu samo ekstraktom bosiljka, p<0,01.

Koncentracija HDL holesterola je statistički značajno viša kod dijabetičnih životinja tretiranih monoketoholnom kiselinom i ekstraktom bosiljka u kombinaciji sa monoketoholnom kiselinom, u odnosu na kontrolu i u odnosu na grupu tretiranu samo ekstraktom bosiljka, p<0,01. Takođe, uočena je statistički viša koncentracija HDL frakcije kod dijabetičnih životinja tretiranih bosiljkom u obliku mikrovezikula i bosiljkom u kombinaciji sa natrijumovom soli žučne kiseline u obliku mikrovezikula u odnosu na grupu tretiranu samo ekstraktom bosiljka, p<0,01.

Najniža vrednost LDL holesterola kod dijabetičnih životinja je izmerena u grupi tretiranoj vodenim ekstraktom bosiljka. Kod grupe tretirane kombinacijom monoketoholne kiseline i ekstrakta bosiljka, koncentracija LDL holesterola je statistički značajno viša u odnosu na kontrolu, kao i na grupe tretirane samim ekstraktom bosiljka i samom monoketoholnom kiselinom, p<0,01.

Ne postoji statistički značajna razlika indeksa ateroskleroze između kontrolne i eksperimentalnih grupa životinja sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom.

Tretman eksperimentalnih životinja prooksidativnim supstancama, u koje spada i aloksan, dovodi do značajne promene ne samo metabolizma glukoze, nego i do poremećaja koncentracije lipida u serumu (Stilinović N, 2013). I u našem istraživanju, primena aloksana je dovela do značajnog povećanja indeksa ateroskleroze kod dijabetičnih u odnosu na normoglikemične eksperimentalne životinje.

U ovoj studiji, pojedinačni tretman vodenim ekstraktom bosiljka, samog i u formulaciji mikrovezikula, i monoketoholnom kiselinom je smanjio indeks ateroskleroze u grupi životinja sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom, ali postignuta razlika nije bila statistički značajna. Tretman samim ekstraktom bosiljka i ekstraktom bosiljka u kombinaciji sa monoketoholnom kiselinom kod dijabetičnih životinja, izazvao je značajno sniženje koncentracije triglicerida i povećanje vrednosti HDL holesterola. Dok je primena monoketoholne kiseline same ili u kombinaciji sa bosiljkom, povećala vrednosti HDL, ali i ukupnog i LDL holesterola.

Vodeni ekstrakt bosiljka i ekstrakt bosiljka u kombinaciji sa monoketoholnom kiselinom u formulaciji mikrovezikula su snizili vrednost triglicerida u poređenju sa kontrolom i povisili vrednost HDL holesterola. Indeks ateroskleroze je snižen kod primene bosiljka u formulaciji mikrovezikula.

Povoljan efekat vodenog ekstrakta bosiljka na lipidni status dijabetičnih životinja se objašnjava činjenicom da fenolne komponente i flavonoidi bosiljka potenciraju klirens holesterola izazivajući ushodnu regulaciju LDL receptora kao i time da se primenom ekstrakta bosiljka inhibiše aktivnost hidroksi-metil-glutaril-CoA reduktaze, enzima od čije aktivnosti u najvećoj meri zavisi sinteza endogenog holesterola (Bursill CA, 2007; Jung UJ, 2006).

Iako su i u literaturi i u našoj studiji jasni rezultati povoljnog uticaja ekstrakta bosiljka i žučnih kiselina na metabolizam glukoze, kao i rezultati ekstrakta bosiljka na lipidni status životinja sa aloksanom izazvanim dijabetesom, dobijeni rezultati uticaja natrijumove soli monoketoholne kiseline na lipidni status ukazuju na neophodnost dodatnih ispitivanja i endogenih i sintetskih derivata žučnih kiselina koja bi u potpunosti razjasnila njihov uticaj na metabolizam lipida.

5.3. *Ex vivo* ispitivanja

U sprovedenom istraživanju, korišćen je model oksidativnog stresa indukovanog paracetamolom koji je posmatran *ex vivo* na uzorcima jetrenog tkiva eksperimentalnih životinja.

Paracetamol (acetaminofen) je širom sveta upotrebljavan kao antipiretik i analgetik. U prekomernim dozama dovodi do oštećenja jetre. Naime, paracetamol se metaboliše u jetri putem citohroma P450 sulfatacijom i glukuronidacijom, ali mali deo se metaboliše u reaktivni metabolit, N-acetil-p-benzokvinon imin (NAPQI), koji se kovalentno vezuje za proteine. Detoksikuje se glutacionom (GSH) u acetaminofen-GSH. Pri toksičnim dozama paracetamola, sadržaj GSH u jetri se značajno smanjuje (i do 90%). Paracetamol se vezuje za cisteinske molekule u proteinima, naročito mitohondrijalnim, pri čemu se stvaraju reaktivne kiseonične vrste unutar mitohondrija, dolazi do smanjenja adenozin trifosfata (ATP) i povećane propustljivosti membrane mitohondrija. Nastaje oštećenje membrane, otok i nekroza ćelije. Zahvaljujući prethodno objašnjenom mehanizmu toksičnosti i uključivanja glutaciona u proces detoksikacije, paracetamol se koristi za izazivanje oštećenja jetre, a to oštećenje se procenjuje na osnovu aktivnosti enzima bitnih za metabolizam jetrenog glutaciona (Jaeschke H, 2002; Larson AM, 2007).

Pored paracetamola za istraživanje hepatoprotektivnog i antioksidativnog potencijala ispitivanih supstanci, postoje i modeli sa drugim hepatotoksičnim agensima, kao što su ugljen-tetrahlorid, etil-alkohol, tioacetamid, dimetil i dietil nitrozoamin i drugi. Prednost modela paracetamola u odnosu na druge je to što su oštećenja jetre koja izaziva paracetamol u dobro odmerenoj dozi blaža, ali opet dovoljna da se eksperimentalno prate farmakološki efekti potencijalnih hepatoprotektiva. Kao što je ranije navedeno, detoksikacija u modelu sa paracetamolom primarno zavisi od metabolizma glutaciona, te praćenje aktivnosti svih enzima koji su povezani sa njegovim metabolizmom predstavlja veoma osetljiv pokazatelj antioksidativne funkcije (Bhakuni GS, 2016).

U cilju analize antioksidativnog potencijala vodenog ekstrakta bosiljka u prevenciji i zaštiti od biohemijskih promena u jetri ispitivanih životinja, indukovanih aloksanom i paracetamolom, merene su koncentracije malondialdehida, aktivnost katalaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze i glutation transferaze.

5.3.1. Uticaj na oksidativno oštećenje lipida

Intenzitet lipidne peroksidacije je procenjivan indirektno, preko koncentracije malondialdehida, koji je u ovom procesu sekundarni proizvod. MDA je glavni reaktivni aldehid koji nastaje kao posledica peroksidacije bioloških membrana koje sadrže polinezasićene masne kiseline (Ayala A, 2014; Buonocore G, 2010). Podaci o koncentracijama MDA se nalaze u **tabeli 20**.

Tabela 20. Intenzitet lipidne peroksidacije (nmol malondialdehida/mg proteina, $\bar{X} \pm SE$; n=6) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	0,082±0,010 ^a	0,099±0,011 ^a	0,383±0,030
bosiljak	0,090±0,005 ^b	0,106±0,011 ^b	0,277±0,031 ^a

^a p < 0,01 u odnosu na grupu paracetamol tretiranu fiziološkim

^b p < 0,01 u odnosu na grupu paracetamol tretiranu ekstraktom

Koncentracija malondialdehida je statistički značajno povećana kod grupe tretirane toksičnom dozom paracetamola u odnosu na grupe normoglikemičnih i dijabetičnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (p<0,01). Koncentracija MDA je statistički značajno niža kod grupe životinja koja je pre toksične doze paracetamola predtretirana vodenim ekstraktom bosiljka (p<0,01). Dobijeni rezultati ukazuju da je vodeni rastvor bosiljka smanjio intenzitet lipidne peroksidacije stimulisane paracetamolom, a to je i u skladu sa rezultatima drugih autora koji su *in vitro* ispitivanjima potvrdili antioksidativno delovanje ekstrakta bosiljka (Kaurinovic B, 2011).

5.3.2. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite

Uticaj ekstrakta bosiljka na antioksidativni status je praćen merenjem aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatu jetre životinja izloženih oksidativnom stresu, primenom toksične doze paracetamola. Dobijeni rezultati su upoređeni sa aktivnostima antioksidativnih enzima kontrolne grupe i grupe dijabetičnih životinja i prikazani su u **tabelama 21-24**.

Tabela 21. Aktivnost katalaze ($\text{nmol/mg proteina} \times \text{min}^{-1}$, $\bar{X} \pm \text{SE}$; $n=6$) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	32,08±2,65	21,39±3,21	33,30±4,53
bosiljak	28,84±3,35 ^a	32,49±0,76 ^a	52,66±3,39 ^b

^a $p < 0,01$ u odnosu na grupu paracetamol tretiranu ekstraktom

^b $p < 0,01$ u odnosu na grupu paracetamol tretiranu fiziološkim

Katalaza, kao jedan od najznačajnijih enzima u zaštiti od oksidativnog stresa, predominantno se nalazi u eritrocitima, zbog transporta kiseonika, i u jetri, zbog izrazitog aerobnog metabolizma. Katalaza je enzim koji se ističe neobično visokom *Michaelis*-ovom konstantom za supstrat i u stanju je da ukloni velike količine vodonik-peroksida (H_2O_2). Funkcija CAT je zaštita ćelijskih organela, pogotovo mitohondrija, koje su usled ćelijskog disanja najugroženije organele (Chelikani P, 2004; Scandalios JG, 2005).

Tretman ekstraktom bosiljka je doveo do statistički značajno veće aktivnosti katalaze kod grupe dijabetičnih životinja i grupe životinja koje su bile izložene prooksidativnom delovanju paracetamola u odnosu na tretman fiziološkim rastvorom, ($p < 0,01$). Dobijeni rezultati ukazuju na značajan potencijal vodenog ekstrakta bosiljka u zaštiti od reaktivnih kiseoničnih vrsta. I u ispitivanju Dasgupta i saradnika, primena alkoholno-vodenog ekstrakta bosiljka je povećala aktivnost katalaze i sprečila je kancerogeno i prooksidativno delovanje benzo(a)pirena i 7,12-dimetil benzo(a)antracena kod Swiss albino miševa (Dasgupta T, 2004).

Tabela 22. Aktivnost glutation reduktaze ($\text{nmol/mg proteina} \times \text{min}^{-1}$, $\bar{X} \pm \text{SE}$; $n=6$) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	0,190±0,038	0,299±0,132	0,241±0,074
bosiljak	0,630±0,098 ^a	0,631±0,120 ^b	0,564±0,085 ^c

^a $p < 0,05$ u odnosu na grupu kontrola tretiranu fiziološkim

^b $p < 0,05$ u odnosu na grupu aloksan tretiranu fiziološkim

^c $p < 0,05$ u odnosu na grupu paracetamol tretiranu fiziološkim

Glutation reduktaza predstavlja važan enzim u očuvanju integriteta i zaštite ćelije, prevodeći oksidovani glutation do redukovanog. Povećanje koncentracije ovog enzima ukazuje na protektivno delovanje supstance koja je aplikovana (Ulus NN, 2007).

Vrednosti enzima glutation reduktaze su date u **tabeli 22**. Zapaženo je povećanje aktivnosti enzima GR kod grupa tretiranih ekstraktom bosiljka u odnosu na poredbene grupe, tretirane fiziološkim rastvorom, sa statističkom značajnošću od $p < 0,05$. Ovo povećanje ukazuje na protektivni efekat ekstrakta bosiljka u slučaju oksidativnog stresa izazvanog paracetamolom.

Tabela 23. Aktivnost glutation transferaze ($\text{nmol/mg proteina} \times \text{min}^{-1}$, $\bar{X} \pm SE$; $n=6$) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	0,253±0,034	0,163±0,052	0,353±0,096
bosiljak	0,456±0,142	0,589±0,165 ^a	0,710±0,082 ^b

^a $p < 0,05$ u odnosu na grupu aloksan tretiranu fiziološkim

^b $p < 0,05$ u odnosu na grupu paracetamol tretiranu fiziološkim

Povećanje glutation transferaze, kao važnog enzima u procesima detoksikacije, omogućava opisivanje ekstrakta bosiljka kao dobrog neutralizatora slobodnih radikala. U **tabeli 23** se nalaze vrednosti glutation transferaze. Nakon sedmodnevnog tretmana ekstraktom bosiljka, uočene su povišene vrednosti enzima GST kod grupa aloksan i paracetamol u poređenju sa grupama tretiranim fiziološkim rastvorom ($p < 0,05$). Kod kontrole tretirane ekstraktom takođe je zabeležen porast aktivnosti enzima, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 24. Aktivnost glutation peroksidaze ($\text{nmol/mg proteina} \times \text{min}^{-1}$, $\bar{X} \pm SE$; $n=6$) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	0,067±0,016	0,112±0,038	0,143±0,031
bosiljak	0,185±0,055	0,119±0,027	0,188±0,036

Glutation peroksidaza učestvuje u odbrani organizma od oksidativnih oštećenja, te njena koncentracija može da opiše aktivnost antioksidativne zaštite. U **tabeli 24** su prikazane uporedne vrednosti aktivnosti enzima glutation peroksidaze. Zabeleženo je povećanje aktivnosti enzima kod grupa tretiranih ekstraktom u poređenju sa grupama tretiranih fiziološkim rastvorom, ali bez postojanja statističke značajnosti.

Kao što je i bilo očekivano, prema dostupnim podacima iz literature, primena ekstrakta *O.basilicum* je dovela do porasta aktivnosti i enzima GPx, GR i GST, tj. ispoljen je protektivan efekat bosiljka. Povišene aktivnosti ovih enzima se smatraju kompenzatornim odgovorom ćelije na oksidativno oštećenje (Dasgupta T, 2004). Vrednosti GR pokazuju statistički značajno povećanje kod svih grupa tretiranih ekstraktom u odnosu na poredbene grupe, tretirane fiziološkim rastvorom. Slično je i kod GST, gde su povišene vrednosti enzima nakon tretiranja bosiljkom, sa statističkom značajnošću od $p < 0,05$. Kod GPx, povišene vrednosti su uočene kod svih grupa nakon tretiranja ekstraktom bosiljka u poređenju sa grupama koje su primale fiziološki rastvor, ali taj porast nije statistički značajan.

5.3.3. Uticaj na nivo enzima jetre

Jetra je velik i kompleksan organ koji ima centralnu ulogu u metabolizmu proteina, ugljenih hidrata i lipida. Ona predstavlja mesto gde se produkti metabolizma detoksikuju i eliminišu iz organizma. Zadužena je za sintezu i sekreciju žuči, kao i za sintezu lipoproteina i proteina plazme. Jetra je uključena u proces održavanja homeostaze glukoze u krvi. Kada je nivo glukoze u krvi visok, jetra višak glukoze skladišti u glikogen (glikogenogeneza), a kada treba podići nivo glukoze, jetra razlaže glikogen (glikogenoliza) ili stvara glukozu iz neugljenohidratnih molekula (glukoneogeneza). Oštećenja jetre se najčešće manifestuju oslobađanjem enzima alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) u serum. ALT i AST su enzimi koji katališu transport α -amino grupe sa alanina odnosno aspartata do α -keto grupe ketoglutarne kiseline koja je zadužena za produkciju oksalosirćetne i pirogroždane kiseline koje učestvuju u *Krebs*-ovom ciklusu. Obe aminotransferaze su zastupljene u jetri u visokoj koncentraciji. Kako se AST nalazi u dovoljnoj količini i u kardiomiocitima, neuronima, nefronima, miocitima i crvenim krvnim zrnima, ALT predstavlja specifičniji pokazatelj oštećenja jetre. Obim oštećenja jetre se može podeliti na blaga (povećane vrednosti transferaza do 5 puta u odnosu na referentne vrednosti), srednja (5-10 puta povećane vrednosti) i ozbiljna (preko 10 puta povećane vrednosti) (Giannini EG, 2005).

Uporedne vrednosti serumske koncentracije enzima alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze grupa koje su tretirane ekstraktom bosiljka i grupa tretiranih fiziološkim rastvorom su prikazane u *tabelama 25 i 26*.

Tabela 25. Serumska aktivnost alanin aminotransferaze (U/L, $\bar{X} \pm SE$; n=6) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	24,50±1,15	15,50±2,43 ^a	41,20±2,82 ^{a,b}
bosiljak	12,00±2,73 ^a	14,83±3,88	38,33±2,25

^a p < 0,01 u odnosu na grupu kontrola tretiranu fiziološkim

^b p < 0,01 u odnosu na grupu aloksan tretiranu fiziološkim

Vrednosti ALT kontrole tretirane fiziološkim rastvorom pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na grupe sa aloksanom i paracetamolom, tretiranih fiziološkim rastvorom, kao i u odnosu na kontrolu tretiranu ekstraktom bosiljka (p<0,01). Grupa sa paracetamolom tretirana fiziološkim rastvorom ima veće vrednosti ALT nego grupa sa aloksanom tretirana fiziološkim rastvorom sa statističkom značajnošću od p<0,01. Vrednosti ALT grupa tretiranih ekstraktom su manje od vrednosti grupa tretiranih fiziološkim rastvorom, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 26. Serumska aktivnost aspartat aminotransferaze (U/L, $\bar{X} \pm SE$; n=6) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	158,00±5,00	136,83±8,36	109,40±5,78 ^{a,b}
bosiljak	170,67±12,78 ^c	148,33±11,83 ^c	91,17±3,38 ^d

^a p < 0,01 u odnosu na grupu kontrola tretiranu fiziološkim

^b p < 0,05 u odnosu na grupu aloksan tretiranu fiziološkim

^c p < 0,01 u odnosu na grupu paracetamol tretiranu ekstraktom

^d p < 0,01 u odnosu na grupu paracetamol tretiranu fiziološkim

Kod životinja, kod kojih je stres indukovao paracetamolom, a pre toga su sedam dana bili tretirani fiziološkim rastvorom, je uočeno statistički značajno smanjenje vrednosti AST u poređenju sa kontrolnom grupom tretiranom samo fiziološkim rastvorom (p<0,01) i sa grupom tretiranom aloksanom i fiziološkim rastvorom (p<0,05). Koncentracije AST kod grupe tretirane paracetamolom i ekstraktom su značajno manje u odnosu na grupu sa paracetamolom i fiziološkim rastvorom, kontrolu tretiranu ekstraktom i grupu sa aloksanom i ekstraktom (p<0,01).

Kako je prethodno navedeno, hepatoprotektivni efekti *O.basilicum* su procenjivani i na osnovu aktivnosti AST i ALT u serumu, kao enzima markera hepatocelularnog oštećenja. Ova dva enzima se nalaze u visokoj koncentraciji u hepatocitima, pa je zato njihova serumska koncentracija

najbolji pokazatelj oštećenja jetre (Meera R, 2009; Rašković A, 2014; Lahon K, 2011; Chaturvedi R, 2007). Poredeći serumsku koncentraciju AST grupa životinja koje su dobijale ekstrakt bosiljka sa vrednostima grupa koje su dobijale fiziološki rastvor, uočava se statistički značajno niža aktivnost AST kod životinja izloženih prooksidativnoj dozi paracetamola, što svedoči o hepatoprotektivnom efektu bosiljka. Kako ALT predstavlja specifičniji enzim, može se reći da je sedmodnevni tretman vodenim ekstraktom bosiljka ispoljio hepatoprotektivno dejstvo, jer su uočene niže vrednosti ALT kod svih grupa koje su dobijale ekstrakt bosiljka u odnosu na one grupe koje su dobijale fiziološki rastvor, sa statističkom značajnosti samo kod kontrolne grupe koja je tretirana ekstraktom u odnosu na grupu koja je primala fiziološki rastvor.

Tabela 27. Koncentracija direktnog bilirubina ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{X} \pm SE$; $n=6$) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	0,65±0,15	0,65±0,10	0,9±0,14 ^a
bosiljak	0,62±0,16	0,63±0,21	0,65±0,08

^a $p < 0,05$ u odnosu na grupu kontrola tretiranu ekstraktom

Koncentracije direktnog bilirubina su bile niže kod svih grupa tretiranih ekstraktom u odnosu na grupe tretirane fiziološkim rastvorom (**tabela 27**). Sedmodnevni predtretman vodenim ekstraktom bosiljka sprečio je povećanje koncentracije direktnog bilirubina.

5.3.4. Uticaj na nivo bubrežnih parametara

Biohemijski parametri u serumu, pokazatelji funkcije bubrega, su važni u dijagnostikovanju i procenjivanju rizika bolesti. U ovom istraživanju, kao pokazatelji bubrežne funkcije merene su koncentracije uree, kreatinina i mokraćne kiseline u serumu.

Kreatinin predstavlja proizvod razgradnje kreatin-fosfata u mišićima. On se najčešće koristi kao mera bubrežne funkcije. Klirens kreatinina se koristi za praćenje progresije bubrežne bolesti. Na dijagnozu renalne insuficijencije se obično sumnja ukoliko je nivo kreatinina u serumu viši od gornje granice referentnih vrednosti. Vrednosti kreatinina mogu da se menjaju jer one ne nastaju samo kao proizvod mišićne mase, već na njega mogu uticati mišićna funkcija, kompozicija,

aktivnost, ishrana i zdravstveno stanje. Povećana tubularna sekrecija kreatinina kod pacijenta sa bubrežnom insuficijencijom može dati lažne negativne rezultate.

Urea je glavni azotni krajnji proizvod katabolizma amino kiselina i proteina. Stvara se u jetri i distribuira po intracelularnoj i ekstracelularnoj tečnosti. U bubrezima se urea filtrira od krvi i parcijalno reabsorbira sa vodom. Koncentracija uree u serumu predstavlja najčešće određivan parametar za procenu bubrežne funkcije. Klirens uree je slab pokazatelj glomerularne filtracije jer njena hiperprodukcija zavisi i od ne renalnih parametara (Gowda S, 2010).

Tabela 28. Koncentracija uree (mmol/L, $\bar{X} \pm SE$; n=6) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	9,07±1,53	10,03±1,39	9,48±1,14
bosiljak	9,3±1,61	9,85±1,32	8,87±0,68

Sniženje koncentracije uree je zapaženo kod grupa aloksan i paracetamol nakon sedmodnevnog tretmana ekstraktom bosiljka u odnosu na fiziološki rastvor, ali bez statističke značajnosti (**tabela 28**).

Tabela 29. Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{X} \pm SE$; n=6) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	49,17±10,53	60,67±11,22	45±3,46
bosiljak	56,33±10,27	56,17±10,30	43,33±0,82

Niže vrednosti koncentracije kreatinina su zapažene kod grupa aloksan i paracetamol nakon sedmodnevnog tretmana ekstraktom bosiljka u odnosu na fiziološki rastvor, ali bez statističke značajnosti (**tabela 29**). Sedmodnevni tretman ekstraktom bosiljka, nakon čega je oksidativni stres izazvan paracetamolom, dao je niže vrednosti kreatinina u odnosu na kontrolu tretiranu ekstraktom, kao i u odnosu na grupu aloksan tretiranu ekstraktom bosiljka, ali bez statističke značajnosti. U ovom ispitivanju, primenjena prooksidativna doza paracetamola od

300 mg/kg telesne mase je ispoljila hepatotoksično delovanje, ali ne i značajniji poremećaj funkcije bubrega. Iako u literaturi postoje podaci o inhibiciji sinteze prostaglandina E2, koja nastaje nakon primene paracetamola, usled čega dolazi do renalne vazokonstrikcije i smanjenja jačine glomerularne filtracije, u našem istraživanju nisu potvrđeni slični rezultati (Colletti AE, 1999).

Tabela 30. Koncentracija mokraćne kiseline ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{X} \pm SE$; $n=6$) kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i vodenim ekstraktom *O.basilicum*

grupa	kontrola	aloksan	paracetamol
fiziološki	64,33±20,19	79,33±23,51	64,4±16,79
bosiljak	76,5±22,46	81,83±24,95	39,33±14,83 ^{a,b}

^a $p < 0,05$ u odnosu na grupu kontrola tretiranu ekstraktom

^b $p < 0,05$ u odnosu na grupu aloksan tretiranu ekstraktom

Nivo mokraćne kiseline bio je statistički značajno niži kod grupe paracetamol tretirane ekstraktom bosiljka u odnosu na grupu kontrola tretiranu ekstraktom, kao i u odnosu na grupu aloksan tretiranu ekstraktom, $p < 0,05$. Nivo mokraćne kiseline je takođe bio niži i u odnosu na grupu paracetamol tretiranu fiziološkim rastvorom, ali bez statističke značajnosti (**tabela 30**).

Bez obzira što se studije koje su izučavale antioksidativnu sposobnost bosiljka razlikuju metodološki, bilo da su *in vitro* ili *in vivo*, imaju jednu zajedničku osobinu, a to je da ukazuju na pozitivan farmakološki efekat ove biljke. Posmatrajući samo *in vivo* istraživanja, u literaturi se navode antimutagena, antiproliferativna, kardioprotektivna, neuroprotektivna i druga korisna farmakološka svojstva preparata dobijenih iz bosiljka. Mehanizam ovih dejstava se prevashodno objašnjava time da aktivni principi iz bosiljka sprečavaju razvoj svih štetnih posledica oksidativnog stresa, na različite načine i u različitim tkivima (Berić T, 2008; Khaki A, 2011; Danesi F, 2008; Fathiazad F, 2012). Tu se može pronaći i odgovor na pitanje hepatoprotektivnog mehanizma dejstva u ovom istraživanju, jer antioksidativna sposobnost bosiljka nije tkivno specifična, nego deluje na nivou čitavog organizma. Imajući u vidu rečeno u uvodnom delu, da je bosiljak bogat fenolnim jedinjenjima i flavonoidima, koji su visoko efikasni hvatači slobodnih radikala, možemo opštu antioksidativnu aktivnost pripisati upravo tome (Grayer RJ, 1996; Loughrin JH, 2001; Cook NC, 1996). Ipak, ta činjenica ne objašnjava u potpunosti rezultate našeg istraživanja, jer oni pokazuju da višednevno davanje ekstrakta bosiljka dovodi do povećane

aktivnosti antioksidativnih enzima, što predstavlja indukciju endogene sposobnosti organizma da se bori protiv slobodnih radikala.

5.4. Morfološka ispitivanja

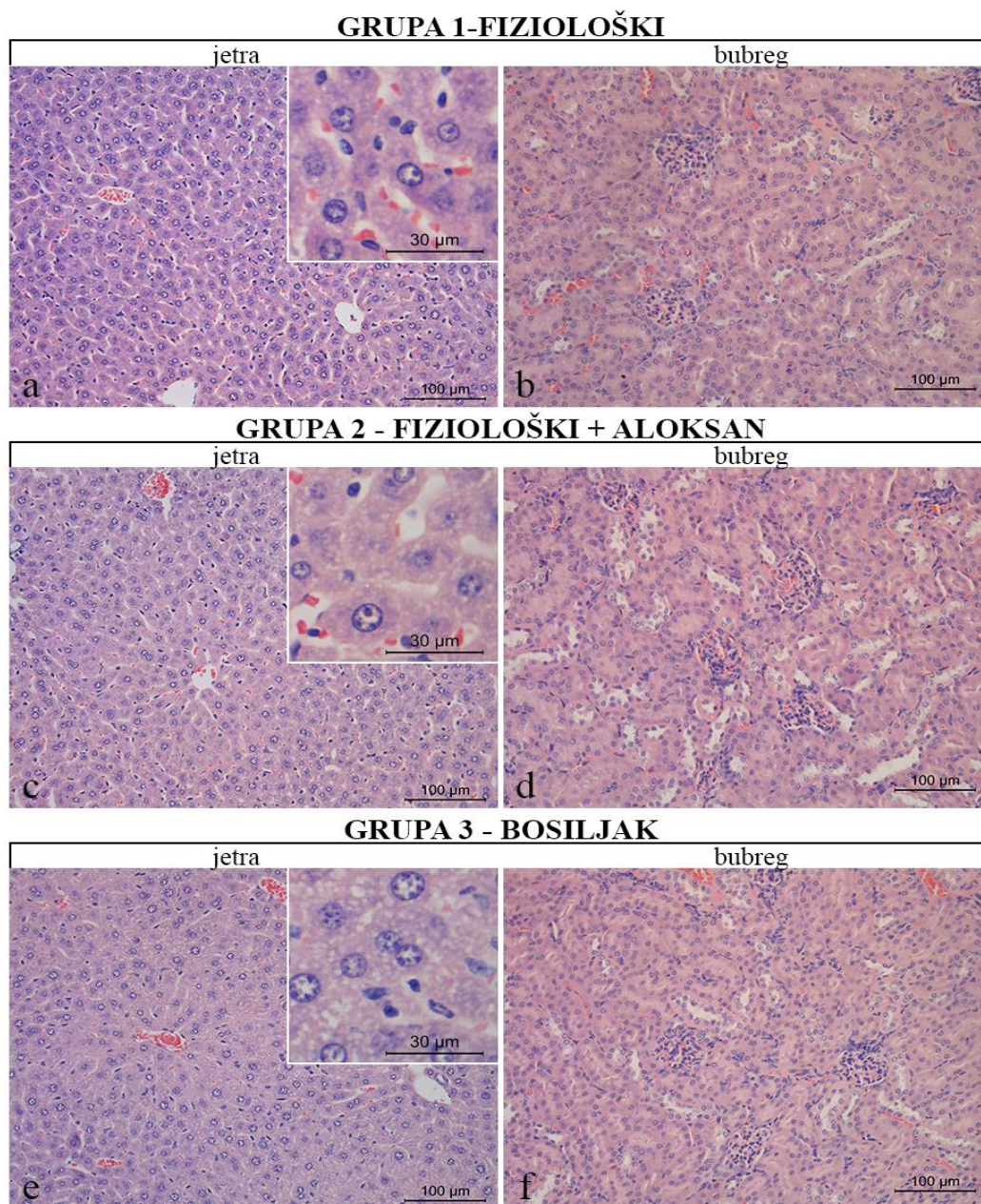
5.4.1. Histološka i morfometrijska analiza tkiva jetre

Histološka analiza tkiva jetre kod svih eksperimentalnih grupa je utvrdila u najvećoj meri očuvanost citoarhitektonske građe jetrenog lobulusa sa pravilnim radijalnim rasporedom *Remak*-ovih gredica. Izolovana primena aloksana nije dovela do mikroskopski vidljivih promena na nivou hepatocita, naime, njih je kao i u kontrolnoj grupi jedinki (*slika 15a*) karakterisala acidofilna homogena citoplazma i centralno pozicionirano pravilno jedro (*slika 15c*). Primena preparata samog bosiljka i u kombinaciji sa aloksanom nije uzrokovala mikroskopski vidljive promene na nivou hepatocita (*slike 15a,e*). Sa druge strane primena paracetamola u grupama 5 i 6 nije uzrokovala bitne citoarhitektonske poremećaje jetrenog tkiva, ali su se mogle uočiti promene na nivou citoplazme samih hepatocita. Naime, kod obe pomenute grupe je došlo do pojave balonirajuće degeneracije koju su karakterisale mikro i makrovezikule unutar citoplazme hepatocita. Jedro je bilo očuvanih karakteristika, a morfometrijska analiza nije pokazala statističku razliku između grupe 5 i 6, ali je pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu jedinki bez primene paracetamola. Preostale grupe jedinki, 7-14, nisu pokazale značajnije promene u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu jedinki.

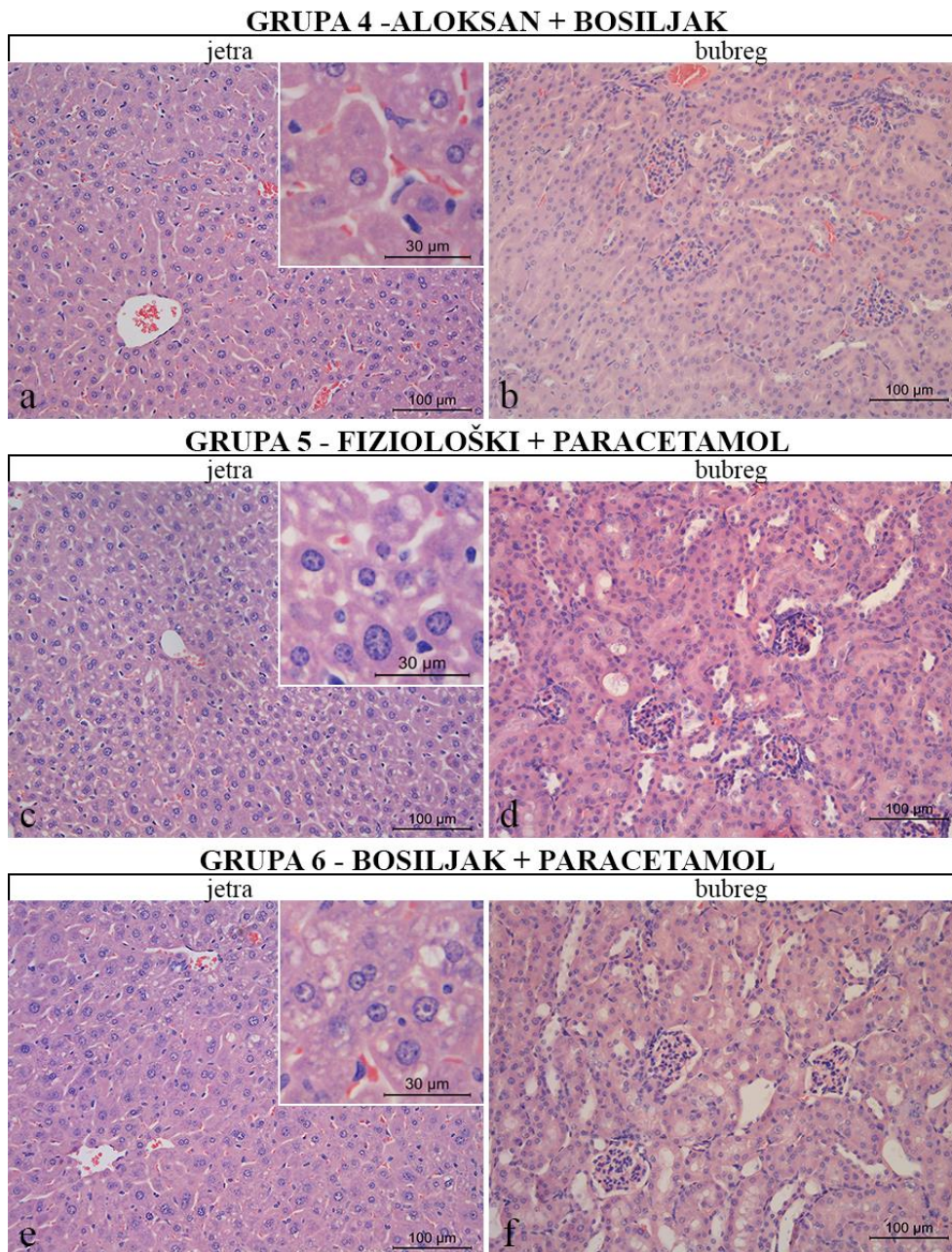
5.4.2. Histološka i morfometrijska analiza tkiva bubrega

Kod jedinki iz svih četrnaest analiziranih grupa nisu konstatovane mikroskopske promene bubrega uočljive na svetlosnoj mikroskopiji (*slike 16, 17, 18*). Unutar bubrega se jasno mogla uočiti pravilna kortikalna i medularna granica. Unutar korteksa je zabeleženo prisustvo velikog broja očuvanih glomerularnih klupka unutar *Bovman*-ove kapsule koje su bile okružene brojnim pravim i izvijuganim proksimalnim i distalnim kanalićima obloženim pravilnim kockastim epitelom. Fokalno u intersticijumu bubrežnog parenhima su se mogli uočiti manji limfocitni infiltrati koji su detektovani kako u kontrolnim, tako i u eksperimentalnim grupama te nisu

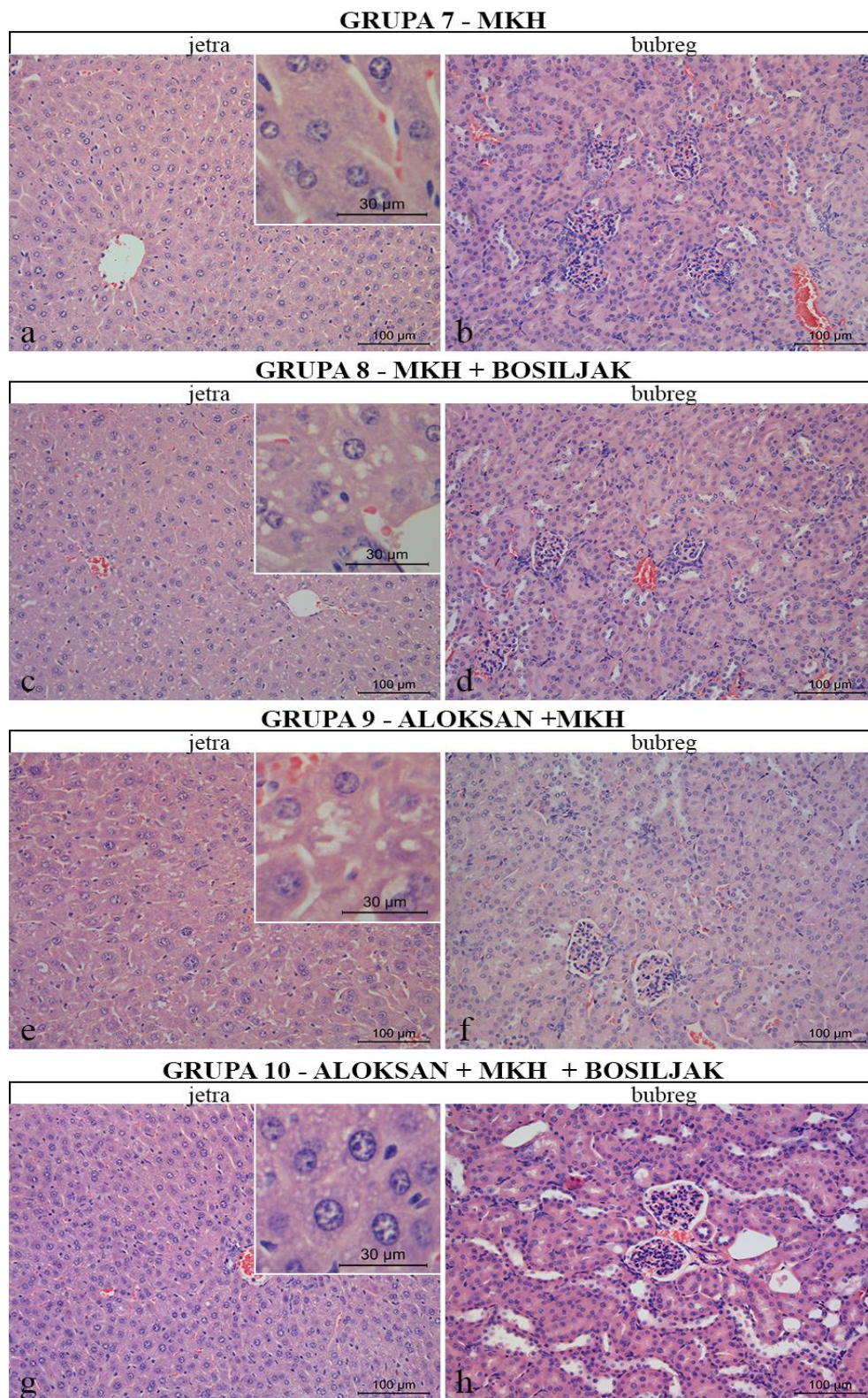
označeni kao patohistološki nalaz. Sabirni bubrežni sistemi izgrađeni su od pravilnog kockastog epitela bez vidljivih morfoloških promena.



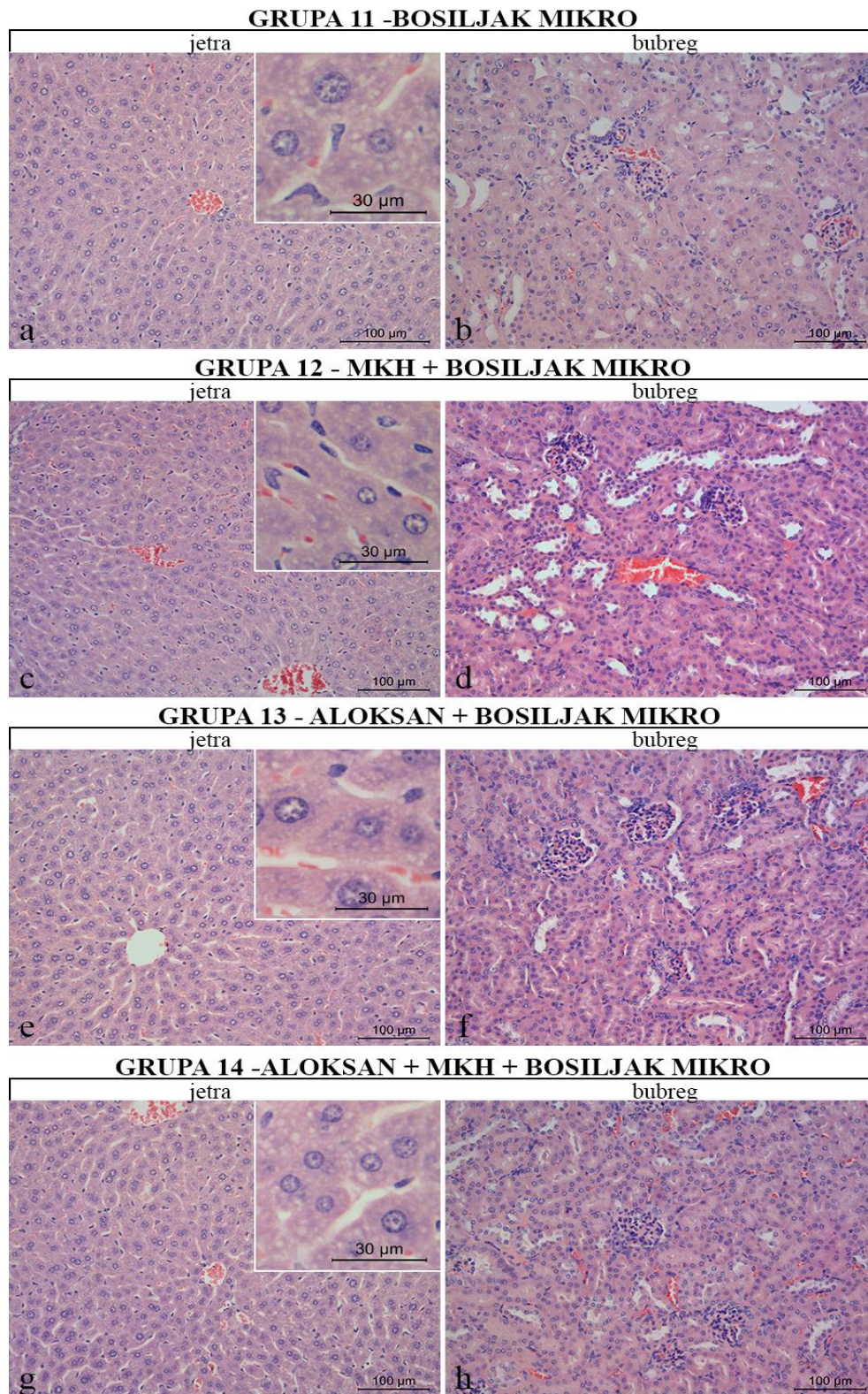
Slika 15. Histološke karakteristike tkiva jetre i bubrega, bojenje hematoksilin i eozin, skala=100µm



Slika 16. Histološke karakteristike tkiva jetre i bubrega, bojenje hematoksin i eozin, skala=100µm



Slika 17. Histološke karakteristike tkiva jetre i bubrega, bojenje hematoksilin i eozin, skala=100µm

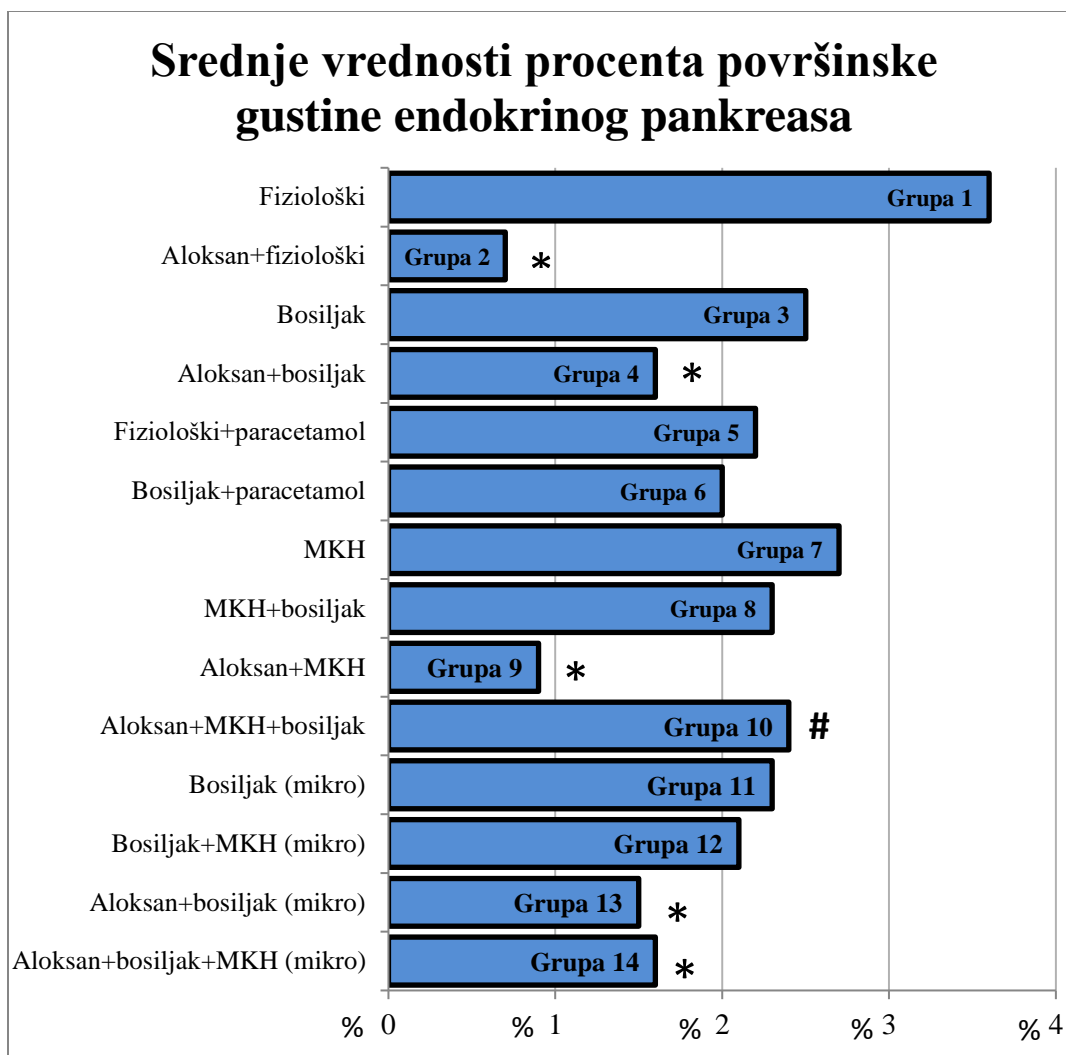


Slika 18. Histološke karakteristike tkiva jetre i bubrega, bojenje hematoksin i eozin, skala=100µm

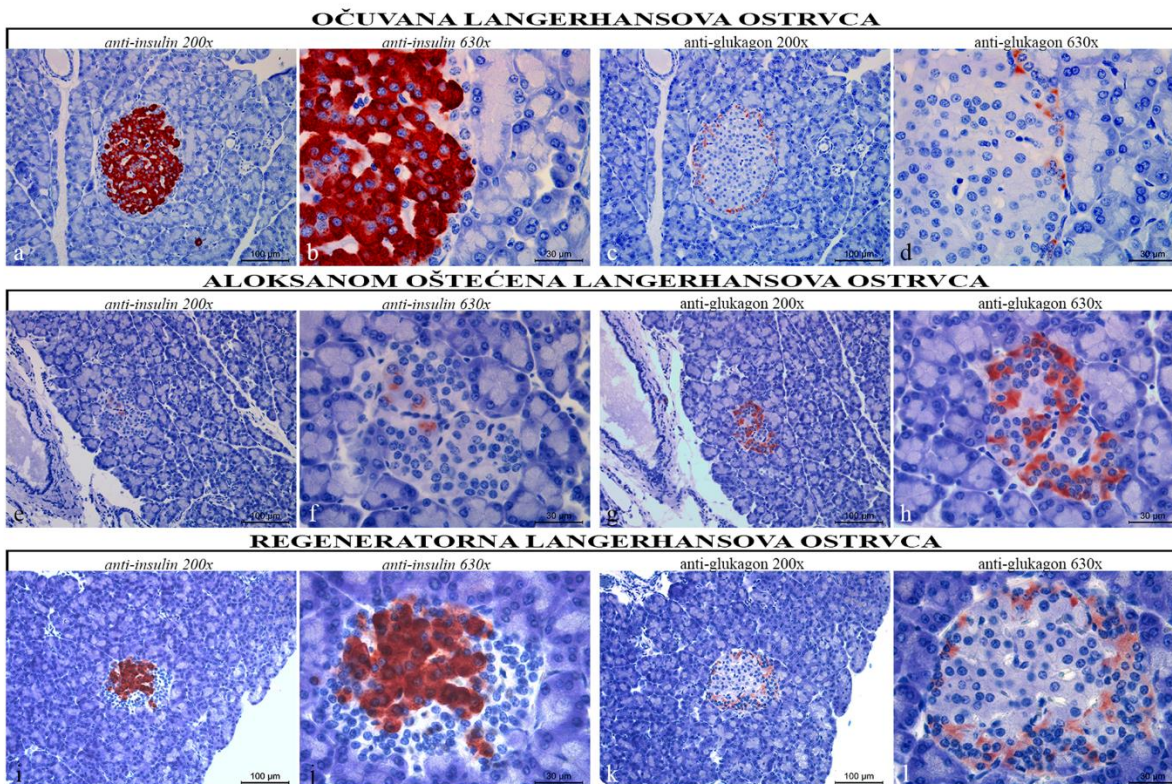
5.4.3. Histološka i morfometrijska analiza tkiva pankreasa

Imunohistohemijskom analizom pankreasnog tkiva jedinki iz grupa 1, 3, 5, 6, 7, 8, 11 i 12 je utvrđena pravilna citoarhitektonska građa endokrinog i egzokrinog kompartmana pankreasnog tkiva. Bojenjem na insulin jasno je prikazana centralna pozicioniranost beta ćelija unutar *Langerhans*-ovog ostrvceta (*slike 19a,b*), dok su glukagon produkujuće alfa ćelije zauzimale periferne delove ostrvceta (*slike 19c,d*). Ovakav prostorni raspored pomenutih ćelija unutar ostrvceta je uobičajen za glodare i predstavlja normalan histološki nalaz.

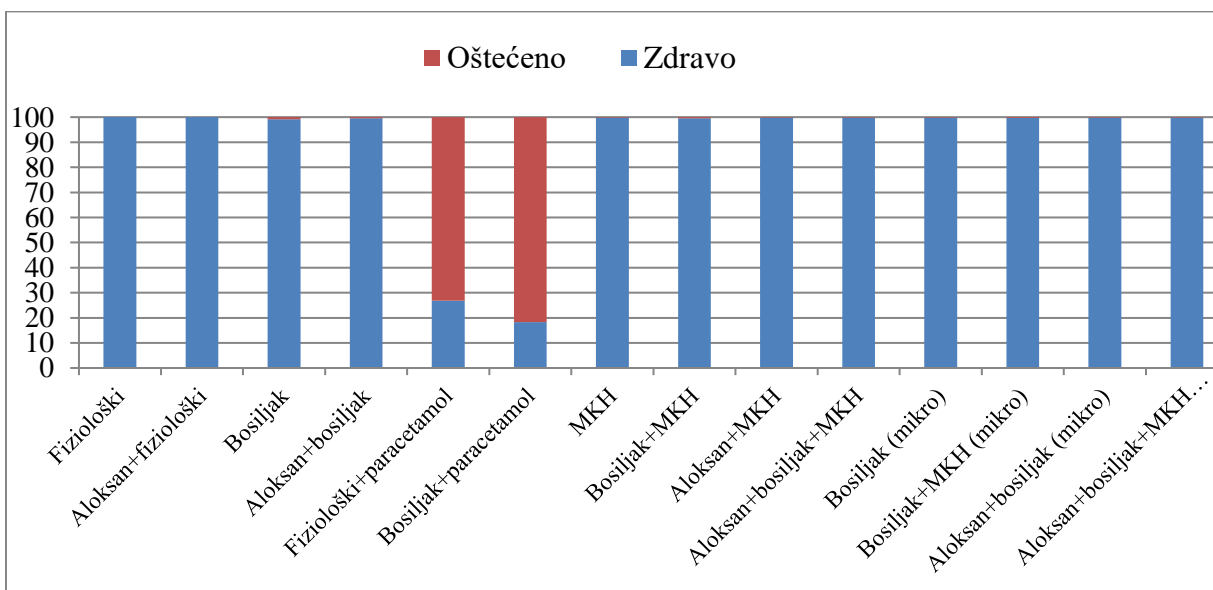
Analizom površinske gustine endokrinog i egzokrinog dela pankreasnog tkiva (*grafikoni 46, 47, 48*) je utvrđena bitna, statistički značajna, razlika pri poređenju kontrolne grupe 1 sa grupama 2, 4, 9, 13 i 14 gde je korišćen aloksan. U svim slučajevima došlo je do jasnog, selektivnog oštećenja beta ćelija *Langerhans*-ovog ostrvceta unutar pankreasa. U velikom broju ostrvaca beta ćelije su praktično zbrisane, svedene na veoma mali broj insulin pozitivnih ćelija (*slike 19e,f*). Preostale ćelije *Langerhans*-ovog ostrvca pokazivale su imunohistohemijsko bojenje na glukagon (*slike 19g,h*). Među grupama u kojima je korišćen aloksan posebno se ističe grupa 10. Kod nje, iako postoji smanjen broj površinske gustine endokrinog dela pankreasa, se bitno statistički ne razlikuje od kontrolne grupe, što ukazuje da primena bosiljka zajedno sa MKH dovodi do zaštite od aloksana. U grupama 4 i 14, a naročito u već pomenutoj grupi 10 utvrđen je veći broj regeneratornih ostrvaca u kojima se mogao uočiti veći broj beta ćelija koje su ispunjavale centralni deo ostrvceta (*slike 19i,j*). Jasan znak regeneratornih karakteristika ovih ostrvaca je postojanje većeg broja rubno postavljenih glukagon produkujućih alfa ćelija, što nam govori u prilog da primena bosiljka pozitivno deluje na aloksanom oštećeni endokrini deo pankreasa (*slike 19k,l*).



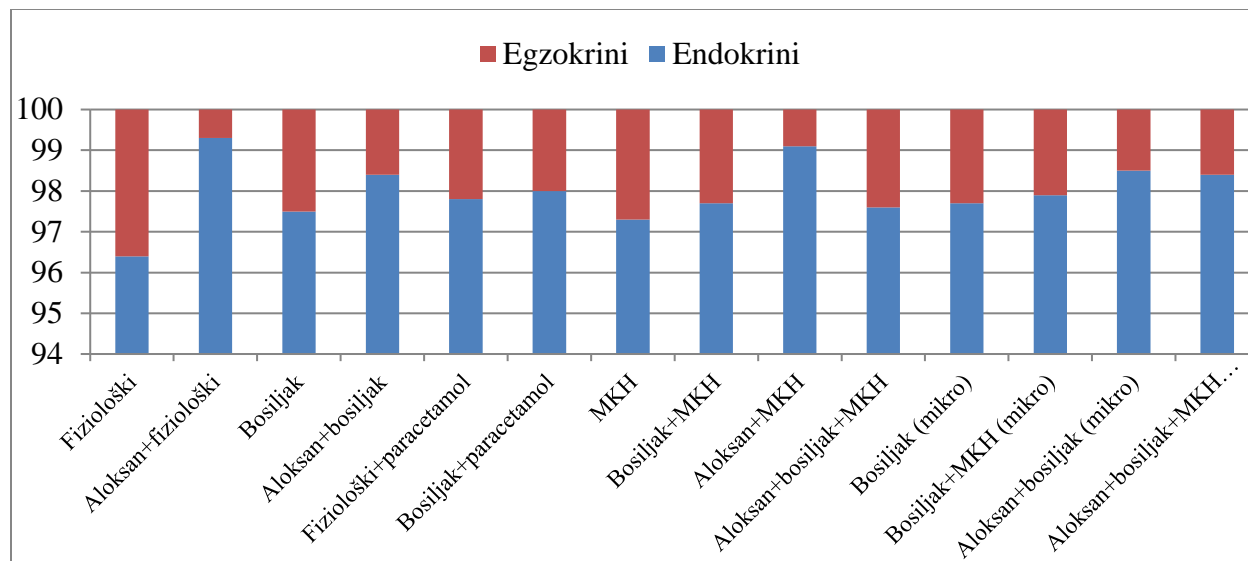
Grafikon 46. Srednje vrednosti procenta površinske gustine endokrinog pankreasa



Slika 19. Histološke karakteristike Langerhans-ovih ostrvaca tkiva pankreasa, imunohistohemijsko bojenje na insulin i glukagon



Grafikon 47. Morfometrijska analiza površinske gustine oštećenosti jetrenog tkiva



Grafikon 48. Morfometrijska analiza površinske gustine endokrinog i egzokrinog dela pankreasnog tkiva

6. ZAKLJUČAK

- Razvijena je pouzdana HPLC metoda za određivanje hlorogenske kiseline koja je pokazala zadovoljavajuću tačnost, ponovljivost, selektivnost i robustnost.
- Utvrđene su kvalitativne i kvantitativne karakteristike ekstrakata bosiljka, s tim da su polarni rastvarači pokazali raznovrsniji sadržaj u odnosu na nepolarne rastvarače.
- Ekstrakti bosiljka dobijeni polarnim rastvaračima pokazali su jaču biohemijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte dobijene nepolarnim rastvaračima.
- Uslovi (vreme, polarnost rastvarača i stepen usitnjenosti), kao i tehnika ekstrakcije pokazuju značajan uticaj na ukupan prinos ekstrakcije, antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih fenola/flavonoida u ekstraktima *Ocimum basilicum*.
- Hemometrijska analiza je pokazala povezanost između prinosa ekstrakcije i sadržaja ukupnih fenola, kao i između sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti.
- Hemometrijska analiza bi mogla biti veoma korisna metoda u izboru najboljih uslova ekstrakcije koji bi omogućili najveći prinos ispitivanih supstanci.
- Svi analizirani ekstrakti bosiljka su pokazali prisustvo velikog broja fenolnih jedinjenja iz klase fenolnih kiselina i flavonoida. Detektovane i kvantifikovane aktivne komponente su bile fenolne kiseline - hlorogenska, *p*-hidroksibenzoeva, kafena, vanilinska, ferulna, rozmarinska i cimetna, kao i apigenin, kvercetin, naringenin i rutin kao predstavnici flavonoidnih jedinjenja.
- Vodeni ekstrakt bosiljka je ispoljio statistički značajno hipoglikemijsko delovanje i kod normoglikemičnih i kod dijabetičnih životinja. U grupi dijabetičnih životinja, hipoglikemijski efekat bosiljka je značajno potenciran natrijumovom soli monoketoholne kiseline. U grupi dijabetičnih životinja, tretman kombinacijom fiksnih doza ekstrakta bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline je vratio nivo glikemije na vrednosti pre primene aloksana.
- Sama natrijumova so monoketoholne kiseline je ispoljila značajno hipoglikemijsko delovanje u grupi životinja sa aloksanom izazvanom hiperglikemijom.
- Mikrovezikule, kao farmaceutsko-tehnološka formulacija, značajno potenciraju hipolipidemijsko delovanje ekstrakta bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline.

- Kombinacija fiksnih doza ekstrakta bosiljka i natrijumove soli monoketoholne kiseline, primenjena u obliku mikrovezikula, ispoljila je najizraženije smanjenje koncentracije triglicerida u serumu i normoglikemičnih i dijabetičnih životinja.
- Vodeni ekstrakt bosiljka, primenjen u obliku rastvora, nije uticao na koncentraciju HDL holesterola u serumu normoglikemičnih i dijabetičnih životinja. Primenjen u formulaciji mikrovezikula, ekstrakt bosiljka je statistički značajno povećao koncentraciju HDL holesterola u serumu dijabetičnih životinja.
- S obzirom da i sama natrijumova so monoketoholne kiseline ima izražena hipoglikemijska i hipolipidemijska delovanja, ovaj sintetski derivat žučnih kiselina predstavlja supstancu čija primena sprečava poremećaje prisutne u okviru metaboličkog sindroma. Stoga, rezultati ovog istraživanja predstavljaju osnovu za buduća klinička ispitivanja kojima bi se utvrdio terapijski potencijal i bezbednost primene natrijumove soli monoketoholne kiseline u humanoj populaciji.
- Vodeni ekstrakt bosiljka statistički značajno smanjuje intenzitet lipidne peroksidacije izazvan toksičnom dozom paracetamola. Takođe, tretman bosiljkom značajno potencira aktivnost enzima antioksidativne zaštite, katalaze, glutation reduktaze, glutation transferaze i glutation peroksidaze kod životinja izloženih oksidativnom stresu.
- Primena vodenog ekstrakta bosiljka sprečava povećanje koncentracije direktnog bilirubina, aktivnost serumske alanin i aspartat aminotransferaze i poremećaj bubrežne funkcije kod životinja izloženih oksidativnom stresu.
- Morfometrijska analiza površinske gustine oštećenosti jetrenog tkiva ukazuje na hepatoprotektivni potencijal vodenog ekstrakta bosiljka kod životinja izloženih toksičnoj dozi paracetamola.
- Na osnovu imunohistohemijske i morfometrijske analize aloksanom oštećenog pankreasa, nakon tretmana ekstraktom bosiljka, uočavaju se regeneratorna *Langerhans*-ova ostrvca. Stoga proizilazi da su farmakodinamska svojstva bosiljka, hipoglikemijsko i hipolipidemijsko delovanje, posledica povećane regenerativne sposobnosti endokrinog dela pankreasa nastale nakon primene vodenog ekstrakta bosiljka.

7. LITERATURA

1. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press; 1974.
2. Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidant in plants: Location and functional significance. *Plant Sci*. 2012;196:67-76.
3. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes-2013*. *Diabetes Care*. 2013;36(1):11-66.
4. Amrani S, Harnafi H, Bouanani N, Aziz M, Caid HS, Manfredid S, et al. Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. *Phytother Res*. 2006;20(12):1040-5.
5. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2005;70(2):200-14.
6. Anila L, Vijayalakshmi NR. Flavonoids from *Embllica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(1):81-7.
7. Arfa MM, Rashed AM. The modulative biochemical effect of extract of *Ocimum gratissimum* as anti-oxidant on diabetic albino rats. *Egypt J Comp Path Clin Path*. 2008;21(3):69-87.
8. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;(2014):360438.
9. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006;99:191-203.
10. Berić T, Nikolić B, Stanojević J, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46:724-732.
11. Beutler E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune&Stratton; 1984.
12. Bhakuni GS, Bedi O, Bariwal J, Deshmukh R, Kumar P. Animal models of hepatotoxicity. *Inflammation Research*. 2016;65:13-24.

13. Blekić M, Jambrak AR, Chemat F. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol.* 2011;3(1):32-47.
14. Božin B, Mimica-Dukić N, Samojlik I, Anačkov G, Igić R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem.* 2008;111(4):925-9.
15. Bravo E, Amrani S, Aziz M, Harnafi H, Napolitano M. *Ocimum basilicum* ethanolic extract decreases cholesterol synthesis and lipid accumulation in human macrophages. *Fitoterapia.* 2008;79(7-8):515-23.
16. Bremnes L. *The complete book of herbs: a practical guide to growing and using herbs.* 5th ed. New York: Penguin Books; 1994.
17. Brnčić M, Tripalo B, Penava A, Karlović D, Ježak D, Vikić D, et al. Primena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 2009;4(1-2):32-7.
18. Broadhurst CL, Polansky MM, Anderson RA. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem.* 2000;48(3):849-52.
19. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 2001;4(2B):593-9.
20. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(4):186-90.
21. Bursill CA, Abbey M, Roach PD. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 2007;193(1):86-93.
22. Cartea M, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules.* 2011;16(1):251-80.
23. Carvalho FC, Bruschi ML, Evangelista RC, Gremiao MPD. Mucoadhesive drug delivery systems. *Braz J Pharm Sci.* 2010;46(1):1-17.
24. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(9):1482-95.
25. Chabory E, Damon C, Leinor A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(7):2074-85.

26. Charman WN, Chan HK, Finnin BC, Charman SA. Drug delivery: a key factor in realising the full therapeutic potential of drugs. *Drug Dev Res.* 1999;46(3-4):316-27.
27. Chaturvedi R, George S, John A. Preventive and protective effects of wild basil in ethanol-induced liver toxicity in rats. *Br J Biomed Sci.* 2007;64(1):10-2.
28. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(2):192-208.
29. Chowdary KP, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for oral controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(11):1717-24.
30. Clifford MN, Johnston KL, Knigh S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem.* 2003;51(10):2900-11.
31. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 1999;79(3):362-72.
32. Colletti AE, Vogl HW, Rahe T, Zambraski EJ. Effects of acetaminophen and ibuprofen on renal function in anesthetized normal and sodium-depleted dogs. *J Appl Physiol.* 1999;86(2):592-7.
33. Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem.* 1996;7(2):66-76.
34. Cunha I, Sawaya A, Caetano F, Shimizu M, Marcucci M, Drezza F, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc.* 2004;15(6):964-70.
35. Danesi F, Elementi S, Neri R, Maranesi M, D'Antuono LF, Bordoni A. Effect of cultivar on the protection of cardiomyocytes from oxidative stress by essential oils and aqueous extracts of basil (*Ocimum basilicum* L.). *J.Agric.Food Chem.*2008;56:9911- 9917.
36. Darkoh C, Lichtenberger LM, Ajami N, Dial EJ, Jiang ZD, DuPont HL. Bile acids improve the antimicrobial effect of rifaximin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3618-24.
37. Dasgupta T, Rao AR, Yadava PK. Chemomodulatory efficacy of basil leaf (*Ocimum basilicum*) on drug metabolizing and antioxidant enzymes, and on carcinogen-induced skin and forestomach papillomagenesis. *Phytomedicine.* 2004;11(2-3):139-51.
38. De Fabiani E, Mitro N, Godio C, Gilardi F, Caruso D, Crestani M. Bile acid signaling to the nucleus: finding new connections in the transcriptional regulation of metabolic pathways. *Biochimie.* 2004;86(11):771-8.

39. Devi VK, Jain N, Valli KS. Importance of novel drug delivery systems in herbal medicines. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(7):27-31.
40. Drmnić H, Jambrak AR. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol.* 2010;2(2):22-33.
41. El-Beshbishy HA, Bahashwan SA. Hipoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: An in vitro study. *Toxicol Ind Health.* 2012;28(1):42-50.
42. Elmastas M, Gülçin I, Beydemir P, Küfrevioğlu ÖI, Aboul-Enein HY. A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) seeds extracts. *Anal Lett.* 2006;17(39):47-65.
43. Etuk EU. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am.* 2010;1(2):130-4.
44. Fagali N, Catala A. Fe^{2+} and Fe^{3+} initiated peroxidation of sonicated and no-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Phys Lipids.* 2009;159(2):88-94.
45. Farah A, Monteiro M, Donangelo C M, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr.* 2008;138(12):2309-15.
46. Fathiazad F, Matlobi A, Khorrami A, Hamedeyazdan S, Soraya H, Hammami M et al. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012;20:87.
47. Federation of European Nurses in Diabetes. International Diabetes Federation Europe. Diabetes. The Policy Puzzle: Is Europe Making Progress? 3rd ed. 2011 [cited 2016 Sep 30]. Available from:
<http://www.idf.org/sites/default/files/idf-europe/ThePolicyPuzzleBook.pdf>
48. Fidaleo M. Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp Toxicol Pathol.* 2010;62(6):615-25.
49. Forino M, Tenore GC, Tartaglione L, Carmela D, Novellino E, Ciminiello P. (1S,3R,4S,5R)-5-O-Caffeoylquinic acid: Isolation, stereo-structure characterization and biological activity. *Food Chemistry.* 2015;178:306-10.
50. Garidel P, Hildebrand A, Knauf K, Blume A. Membranolytic activity of bile salts:

- influence of biological membrane properties and composition. *Molecules*. 2007;12(10):2292-326.
51. Gerich JE. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus. *Diabetes*. 1988;37(12):1608-17.
 52. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*. 2005;172(3):367-79.
 53. Glatzle D, Vnillenmier JP, Weber F, Decker U. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experienta*. 1974;30(6):665-7.
 54. Goločorbin-Kon S. Uticaj farmaceutsko-tehnološke formulacije cefotaksima sa žučnim kiselinama na farmakokinetiku [doktorska disertacija]. Novi Sad: Tehnološki fakultet; 2009.
 55. Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AAK, Vernekar SN. Markers of renal function tests. *North Am J Med Sci*. 2010;2(4):170-173.
 56. Grayer RJ, Brayan SE, Veitch NC, Goldstone FJ, Paton A, Wollenweber E. Extrernal flavones in sweet basil *Ocimum basilicum* and related taxa. *Phytochemistry*. 1996;43(5):1041-7.
 57. Grujić N, Lepojević Ž, Srđenović B, Vladić J, Sudi J. Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition on mate tea extracts. *Molecules*. 2012;17(3):2518-28.
 58. Grujić-Letić N, Rakić B, Šefer E, Rakić D, Nedeljković I, Kladar N, et al. Determination of 5-caffeoylquinic (5-CQA) as one of the major classes of chlorogenic acid in commercial tea and coffee samples. *Vojnosanit Pregl*. 2015;72(11):1018-23.
 59. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1098-124.
 60. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1999.
 61. Harnafi H, Caid HS, Bouanani NH, Aziz M, Amrani S. Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chem*. 2008;108(1):205-12.
 62. Harnafi H, Ramchoun M, Tits M, Wauters JN, Frederich M, Angenot L, et al. Phenolic

- acid-rich extract of sweet basil restores cholesterol and triglycerides metabolism in high fat diet-fed mice: a comparison with fenofibrate. *Biomed Prev Nutr.* 2013;3(4):393-7.
63. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445-600.
64. Heyden YV, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24(5-6):723-53.
65. Hossain M, Dilip K, Brunton N, Martin-Diana A, Barry-Ryan C. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 2010;58(19):10576-81.
66. Hotelling H. Analysis of a complex statistical variable into principal components. *J Educ Psychol.* 1933;24:417-41.
67. Ilyukha VA. Superoxide dismutase and catalase in the organs of mammals of different ecogenesis. *J Evol Biochem Physiol.* 2001;37(3):241-5.
68. International Conference on Harmonization, guideline Q2A. Text on validation of analytical procedures. Rockville, Maryland: Federal register; 1995.
69. International Conference on Harmonization, guideline Q2B. Validation of analytical procedures: methodology. Rockville, Maryland: Federal register; 1997.
70. Ismail M. Central properties and chemical composition of *Ocimum basilicum*. *Essential oil. Pharm Biol.* 2006;44(8):619-26.
71. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002;65(2):166-76.
72. Jakovljević V. Eksperimentalna farmakologija u naučnoistraživačkom radu. Novi Sad: Alfa graf; 2006.
73. Jambrak AR, Lelas V, Herceg Z, Badanjak M, Batu V, Muža M. Prednosti i nedostaci primene ultrazvuka visoke snage u mlekerskoj industriji. *Croat J Food Sci Technol.* 2009;59(4):267-81.
74. Jančić R. Botanika farmaceutika. 4 izd. Beograd: Službeni glasnik; 2011.

75. Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais HP, Vivanco JM. Chemical characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *J Agric Food Chem.* 2002;50(21):5878-83.
76. Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem.* 2003;51(15):4442-9.
77. Jevtić S. Posebno ratarstvo. Beograd: Naučna knjiga; 1986.
78. Jovanović M. Praktikum iz farmaceutske tehnologije sa biofarmacijom. Zemun: Nijansa; 2003.
79. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1134-45.
80. Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavljevic S, Trivic S. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules.* 2011;16(9):7401-14.
81. Keserović Z, Vračević B, Magazin N, Bijelić S, Korać N, Radanović D, et al. *Organska poljoprivreda. Tom 2.* Novi Sad: Institut za ratarstvo i povrtarstvo; 2008.
82. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki AA. Effect of *Ocimum basilicum* on apoptosis in testis of rats after exposure to electromagnetic field. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2011;5(12):1534-1537.
83. Kišgesi J. *Lekovito bilje.* Beograd: Partenon; 2002.
84. Konishi T, Kato K, Araki T, Shiraki K, Takagi M, Tamaru Y. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem J.* 2005;388(Pt 1):299-307.
85. Kovačević N. *Osnovi farmakognozije. 2. izd.* Beograd: Srpska školska knjiga; 2002.
86. Kruidener L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(12):1997-2015.
87. Kuhajda K, Kandrak J, Kevresan S, Mikov M, Fawcett JP. Structure and origin of bile acid: an overview. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;31(3):135-43.
88. Lahon K, Das S. Hepatoprotective activity of *Ocimum sanctum* alcoholic leaf extract against paracetamol-induced liver damage in Albino rats. *Pharmacognosy Res.* 2011;3(1):13-8.

89. Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng.* 2005;71(2):214-22.
90. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2007;11(3):525-48.
91. Lee J, Scagel CF. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chem.* 2009;115:650-6.
92. Lee JH, Seo WD, Jeong SH, Jeong TS, Lee WS, Park KH. Human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitory effect of flavonoids from roots of *Glycine max* (L) Merr. *Agric Chem Biotechnol.* 2006;49(2):57-61.
93. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(2):216-26.
94. Lepojević Ž. Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda. Novi Sad: Tehnološki fakultet; 2000.
95. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-26.
96. Loughrin JH, Kasperbauer MJ. Light reflected from colored mulches affects aroma and phenolic content of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *J Agric Food Chem.* 2001;49(3):1331-5.
97. Maiorino M, Wissing JB, Brigelius-Flohe R, Calabrese F, Roveri A, Steinert P, et al. Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J.* 1998;12(13):1359-70.
98. Maróstica MR, Leite AV, Dragano NRV. Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources-review (supercritical extraction and stabilization of phenolic compounds). *Open Chem Eng J.* 2010;4:51-60.
99. Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem.* 2009;113:1370-6.
100. Mastaneh M, Ahmad M, Taher N, Mehrdad H. Antioxidant effect of *Ocimum basilicum* cv. dark opal (Lamiaceae) phenolics. *Orient J Chem.* 2014;30(4):1965-9.
101. Meaney CM, O'Driscoll CM. A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed culture model. *Int J Pharm.* 2000;207(1-2):23-30.

102. Meera R, Devi P, Kameswari B, Madhumitha B, Merlin NJ. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Ocimum basilicum* Linn. and *Trigonella foenum-graecum* Linn. against H₂O₂ and CCl₄ induced hepatotoxicity in goat liver. *Ind J Exp Biol.* 2009;47(7):584-90.
103. Mijin DŽ, Petrović SD. Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i organskoj hemijskoj tehnologiji. *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta.* 2005;14:11-23.
104. Mikov M, Al-Salami H, Goločorbin-Kon S, Škrbić R, Rašković A, Fawcett P. The influence of 3 α , 7 α -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanate on glicrazide pharmacokinetics and glucose level in a rat model of diabetes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;33(3):137-42.
105. Mikov M, Fawcett JP. *Bile acids: chemistry, biosynthesis, analysis, chemical and metabolic transformations and pharmacology.* Geneva: Mediset Publisher; 2007.
106. Mikov M, Kevrešan S, Kuhajda K, Jakovljević V, Vasović V. 3 α ,7 α -dihydroxy-12-oxo-5 β -cholanate as blood-brain barrier permeator. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(3):367-71.
107. Mikov M, Rašković A, Jakovljević V, Dudvarski D, Fawcett JP. Influence of the bile salt sobium 3 α ,7 α -dihydroxy-12-oxo-5 β -cholanate on ampicillin pharmacokinetics in rats. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;5(3):197-200.
108. Miljkovic D, Kuhajda K, Mikov M, Kevresan S, Sabo A. Bile acids and their derivatives as glycoregulatory agents. US patent No 6,060,465. 2000 May 9.
109. Miller JN, Miller JC. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry.* 5th ed. Harlow: Pearson Education Limited; 2005.
110. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2009;15(7):804-16.
111. Mooranian A, Negrulj R, Chen-Tan N, Al-Sallami HS, Fang Z, Mukkur TK, Mikov M, Golocorbin-Kon S, Fakhoury M, Watts GF, Matthews V, Arfuso F, Al-Salami H. Microencapsulation as a novel delivery method for the potential antiabetic drug, Probuco. *Dug Des Devel Ther.* 2014;9(8):1221-30.
112. Musthaba SM, Baboota S, Ahmed S, Ahuja A, Ali J. Status of novel drug delivery technology for phytotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(6):625-37.
113. Nijeveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flanonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. *Am J Clin*

- Nutr. 2001;74(4):418-25.
114. Ohkawa N, Ohisi K, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animals tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
 115. Ondarza RN, Rendon JL, Ondarza M. Glutathione reductase in evolution. *J Mol Evol.* 1983;19(5):371-5.
 116. Oriva G, Hernandez RM, Rodrigues Gascon A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, et al. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol.* 2004;22(2):87-92.
 117. Otto M. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical Chemistry.* 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.
 118. Özcelik B, Lee JH, Min DB. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *J Food Sci.* 2003;68(2):487-90.
 119. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.
 120. Pal D, Kumar N. Development, optimization, and anti-diabetic activity of gliclazide-loaded alginate-methyl cellulose mucoadhesive microcapsules. *Pharm Sci Tech.* 2011;12(4):1431-41.
 121. Pan G, Wang L. Swallowable wireless capsule endoscopy: progress and technical challenges. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:841691.
 122. Patel JS, Bhatt MM, Patel FA, Dhoru MM, Patel MM. Nanotechnology: a new approach in herbal medicine. *Am J Pharm Res.* 2013;3(4):275-288.
 123. Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos Mag.* 1901;2:559-72.
 124. Pekić B, Miljković D. *Hemija i tehnologija kardiotoničnih glikozida.* Novi Sad: Tehnološki fakultet; 1980.
 125. Perera PK, Li Y. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes. *Funct Foods Health Dis.* 2011;4:161-71.
 126. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-42.
 127. Poša M, Guzdvaný V, Csanadi J. Determination of critical micellar concentrations of two monoketo derivatives of cholic acid. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;74(1):84-90.a.
 128. Posa M, Guzdvaný V, Csanadi, Borbas J, Gaal F. Study of association of 12-

- monoketocholic acid by ^1H NMR relaxation method. *Acta Chim Slov.* 2009;56(4):807-14.b.
129. Poša M, Keverešan S, Mikov M, Ćirin-Novta V, Kuhajda K. Effect of cholic acid and its keto derivatives on the analgesic action of lidocaine and associated biochemical parameters in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;32(2):109-17.
130. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290-302.
131. Prochazkova D, Boušova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011;82(4):513-23.
132. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija.* 5. izd. Beograd: Data status; 2005.
133. Rašković A, Mikov M, Škrbić R, Jakovljević V, Vasović V, Poša M, et al. Effect of stevioside and sodium salt of monoketocholic acid on glycemia in normoglycemic and diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;33(1):17-22.
134. Raskovic A, Milanovic I, Pavlovic N, Cebovic T, Vukmirovic S, Mikov M. Antioxidant activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14:225-33.
135. Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of citotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis.* 1989;10(6):1003-8.
136. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today.* 2003;8(24):1112-20.
137. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799-806.
138. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(7):995-1014.
139. Silva EM, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Sep Purif Technol.* 2007;55(3):381-7.

140. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effets of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng.* 2007;81(1):200-8.
141. Stilinović N. Farmakološke, toksikološke i biohemijske osobine preparata gljive *Coprinus comatus*. [doktorska disertacija]. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2013.
142. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life Sci.* 2013;7(3-4):112-22.
143. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.
144. Tasić S, Šavikin K, Menković N. Vodič kroz svet lekovitog bilja. 3. izd. Beograd: Alexandria; 2009.
145. Thoo YY, Ho SK, Liang JY, Ho CW, Tan CP. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chem.* 2010;120(1):290-5.
146. Tolić A. Operacija ekstrakcije tečno-tečno. Novi Sad: Tehnološki fakultet; 1996.
147. Tolstoj SM, Radenković Lj, Agapkina TA, Loma A, Tolstoj NI, Toporov VN. Slovenska mitologija: enciklopedijski rečnik. Beograd: Zepter book world; 2001.
148. Trivedi NA, Mazumdar B, Bhatt JD, Hemavathi KG. Effect of shilajit on blood glucose and lipid profile in alloxan-induced diabetic rats. *Indian J Pharmacol.* 2004;36(6):373-6.
149. Ulusu NN, Tandoğan B. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem.* 2007;303(1-2):45-51.
150. United States Pharmacopeia. 24th ed. Rockville, Maryland: Twinbrook Parkway; 2002.
151. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mayur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
152. Vandeginste BMG, Massart DL, Buydens LMC, de Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Handbook of chemometrics and qualimetrics. Part B. Amsterdam: Elsevier; 1998.
153. Vidović SS, Zeković ZP, Lepojević ŽD, Radojković MM, Jokić SD, Anačkov GT. Optimization of the *Octimum basilicum* L. Extraction process regarding the antioxidant activity. *APTEFF.* 2012;43:315-23.
154. Vuleta G, Milić J, Primorac M, Savić S. Farmaceutska tehnologija 1. Beograd:

- Farmaceutski fakultet; 2012.
155. Wagman AS, Nuss JM. Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Curr Pharm Des.* 2001;7(6):417-50.
 156. Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat brain. *Food Chem.* 2008;106:804-10.
 157. Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):335-56.
 158. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047-53.
 159. Wold S. Chemometrics and intelligent laboratory systems. *Chemometr Intell Lab Syst.* 1995;30(1):109-15.
 160. Yang L, Zhang H, Mikov M, Tucker I. Psysicochemical and biological characterization of monoketocholic acid, a novel permeability enhancer. *Mol Pharm.* 2009;6(2):448-56.
 161. Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. Free radicals scavenging properties of wheat extracts. *J Agric Food Chem.* 2002;50(6):1619-24.
 162. Zakaria Z, Aziz R, Lachimanan LY, Sreenivasan S, Rathinam X. Antioxidant activity of *Coleus Blumei*, *Orthosiphon Stamineus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from Lamiaceae Family. *Int J Nat Eng Sci.* 2008;2(1):93-5.
 163. Zeggwagh NA, Sulpice T, Eddouks M. Anti-hyperglycaemic and hypolipidemic effects of *Ocimum basilicum* aqueous extract in diabetic rats. *Am J Pharm Toxicol.* 2007;2(3):123-9.
 164. Zhang ZS, Li D, Wang LJ, Ozkan N, Chen XD, Mao ZH, et al. Optimisation of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Sep Purif Technol.* 2007;57(1):17-24.
 165. Ziakova A, Bransteterova E. Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2003;26(3):443-53.