



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**UTICAJ EKSTRAKTA
RTANJSKOG ČAJA (*SATUREJA
MONTANA, L. (LAMIACEAE)*) NA
HIPERGLIKEMIJU I
HIPERLIPIDEMIJU KOD PACOVA
SOJA *WISTAR***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Boris Milijašević

Kandidat:
Maja Steinbach

Novi Sad, 2023. godine.

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem:

- *svom mentoru prof. dr Borisu Milijaševiću na ukazanom poverenju, stručnoj pomoći, podršci i savetima tokom svih izazova na koje sam naišla tokom rada na doktorskoj disertaciji;*
- *prof. dr Momiru Mikovu na podršci, stručnom vođenju istraživanja, na pronalaženju rešenja za svaki izazov koji se našao na putu, materijalnoj pomoći;*
- *prof. dr Aleksandru Raškoviću, na savetima i pomoći i oko formulacije i izrade doktorske teze;*
- *prof. dr Ivanu Čapo za pomoć oko histoloških analiza;*
- *doc. dr. Ivani Borisev za podršku, savete i pomoć oko sprovođenja antioksidativnih testova;*
- *kolektivu Katedre za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju jer su mi omogućili rad u njihovim laboratorijama;*
- *kolegama, prijateljima i svima onima koji su na bilo koji način doprineli planiranju, realizaciji i kvalitetu ove doktorske disertacije.*
- *najveću zahvalnost dugujem porodici na pruženoj ljubavi, bezgraničnom strpljenju, podršci i ogromnom razumevanju.*

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojim dragim roditeljima, suprugu i deci.

Ova disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije broj 41012.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Маја Штајнбах
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. Др Борис Милијашевић, ванредни професор, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
Наслов рада:	УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА РТАЊСКОГ ЧАЈА (<i>SATUREJA MONTANA</i> , L. (<i>LAMIACEAE</i>)) НА ХИПЕРГЛИКЕМИЈУ И ХИПЕРЛИПИДЕМИЈУ КОД ПАЦОВА СОЈА WISTAR
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 123 Поглавља 9 Референци 109 Табела 49 Слика 11 Графикона 7 Прилога /
Научна област:	Медицинске науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Фармакологија са токсикологијом и клиничком фармакологијом
Кључне речи / предметна одредница:	<i>Satureja</i> ; биљни екстракти; експериментални дијабетес мелитус хипогликемијски агенси; антихиперлипидемијски агенси; оксидативни стрес; антиоксиданси; тестови функције јетре; тестови функције бубрега; парацетамол; анализа главних компонената; пацови соја Wistar Не MeSH: ртањски чај
Резиме на језику рада:	Ртањски чај, <i>Satureja montana</i> L. има широку употребу у многим деловима света, користи се као кулинарска биљка и у традиционалној медицини за лечење или ублажавање различитих здравствених симптома. Међутим, бројне студије су показале да биљка има фармаколошки потенцијал да се употребљава и као антибактеријски, антидијабетесни, анти- <i>HIV</i> и антипролиферативни лек. Фармаколошки ефекти ртањског чаја могу се приписати присуству фитохемикалија попут флавоноида, стерола, танина и етарских уља. Фенолна једињења су углавном одговорна за антиоксидативну активност биљке <i>Satureja</i>

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

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

5г – Изјава о коришћењу.

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

montana L.

У овом истраживању циљ је био утврђивање утицаја екстракта биљке *Satureja montana* L. на параметре као што су гликемија, статус липида и биохемијски параметри, затим на индикаторе који указују на функцију јетре и бубрега у серуму здравих, дијабетичних пацова и пацова који су били на исхрани обогаћеној мастима, као и де се испита утицај на показатеље оксидативног стреса код животиња изложених токсичној дози парацетамола.

За одређивање хипогликемијског и антихиперлипидемијског дејства биљке *Satureja montana* L., лабораторијски пацови соја W1STAR су подељени у 8 група, у групама које су коришћене за одређивање хипогликемијског потенцијала дијабетес је индукован стрептозотоцином након чега су животиње *per os* 28 дана, третиране физиолошким раствором, метформином 100 мг/кг, екстрактом ртањског чаја 500 мг/кг и њиховом комбинацијом. За испитивање антихиперлипидемијског ефекта животиње су биле на исхрани обогаћеној мастима и физиолошким раствором, симвастатином 10 мг/кг, екстрактом ртањског чаја 500 мг/кг и њиховом комбинацијом. За одређивање антиоксидативног потенцијала биљке *Satureja montana* L. животиње су подељене у четири групе и 7 дана су третиране екстрактом ртањског чаја и физиолошким раствором. Након тога, пацови су били изложени токсичној дози парацетамола. У животињском серуму одређивани су биохемијски параметри, концентрација липида и параметри функције бубрега и јетре. Одређивање активности липидне пероксидације и ензима антиоксидативне заштите у хомогенатима јетре експерименталних животиња, након примене токсичне дозе парацетамола, је испитивано *ex vivo*. *In vitro* испитивања су вршена са екстрактима добијеним растварањем у различитим растварачима. Испитивања антиоксидативне активности, као и укупни нивои фенола и флавоноида, одређени су спектрофотометријском методом.

Код животиња са индукованим дијабетесом 28-дневни третман екстрактом *Satureja montana* L. у поређењу са контролом групом дијабетичних животиња проузроковао је статистички значајно смањење глукозе. На крају студије, у групи која је примала екстракт *Satureja montana* L., уочене су статистички значајно ниже вредности триглицерида у односу на контролну дијабетичну групу. На друге параметре липидног статуса, испитивани екстракт није показао значајне ефекте.

Код животиња чију смо исхрану обогатили мастима применом екстракта *Satureja montana* L. дошло је до статистички значајног снижавања *LDL* холестерола у серуму, у односу на контролну групу која је била на исхрани обогаћеној мастима. Вредности параметара показатеља функције бубрега и јетре: АСТ, уреа, креатинин и мокраћна киселина биле су значајно ниже у групи третираној екстрактом *Satureja montana* L. у односу на контролну групу која је била на исхрани обогаћеној мастима.

Претретман животиња биљним екстрактом пре примене токсичне дозе парацетамола значајно је смањио активност алкалне фосфатазе, концентрацију директног билирубина и креатинина у серуму у односу на групу третирану физиолошким раствором и појединачном дозом парацетамола. Активност липидне пероксидазе била је значајно већа код животиња које су третиране физиолошким раствором у поређењу са третманом екстрактом *Satureja montana* L., пре токсичне доза парацетамола. Поред тога, смањен је број инфламаторних ћелија заједно са активношћу ензима ЦИП2Е1 код животиња које су претходно третиране екстрактом *Satureja montana* L.

	<p>Резултати ових истраживања показали су хипогликемијски потенцијал екстракта <i>Satureja montana</i> L. код животиња са индукованим дијабетесом. Претретман екстрактом <i>Satureja montana</i> L. пре примене токсичне дозе парацетамола, показао је потенцијал хепатопротективног, антиинфламаторног и антиоксидативног дејства. Такође, <i>РСА</i> анализа је показала да велики утицај на антиоксидативни ефекат имају медијуми коришћени за екстракцију.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	16.05.2018
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Maja Steinbach
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. dr Boris Milijašević, associate professor, Faculty of Medicine University of Novi Sad
Thesis title:	IMPACT OF WINTER SAVORY EXTRACT (<i>SATUREJA MONTANA L. (LAMIACEAE)</i>) ON HYPERGLYCEMIA AND HYPERLIPIDEMIA IN WISTAR RATS
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages 123 Chapters 9 References 109 Tables 49 Illustrations 11 Graphs 7 Appendices /
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Molecular medicine
Subject, Key words:	Satureja; Plant Extracts; Diabetes Mellitus, Experimental; Hypoglycemic Agents; Hypolipidemic Agents; Oxidative Stress; Antioxidants; Liver Function Tests; Kidney Function Tests; Acetaminophen; Principal Component Analysis; Rats, Wistar Non MeSH: <i>Satureja montana L.</i>
Abstract in English language:	<p><i>Satureja montana L.</i> is widely used as culinary herb and in traditional medicine for the treatment or relief of various common health symptoms in many parts of the world. However, numerous studies have shown that it has pharmacological potential to be used as antibacterial drug, antidiabetic, anti-HIV and antiproliferative drug. Its pharmacological effects can be attributed to the presence of phytochemicals like flavonoids, sterols, tannins and essential oils. Phenolic compounds are mostly responsible for the anti-oxidative activity of <i>Satureja montana L.</i></p> <p>In this research, the aim was to determine the influence of <i>Satureja montana L.</i> extract on glycemia, lipid status and biochemical</p>

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

56 – Statement on the authority,

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

5r – Statement on copyright licenses.

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

parameters, indicators of liver and kidney function in the serum of healthy and diabetic rats and rats fed with high fat diet, as well as to examine its influence on the parameters of oxidative stress in animals exposed to the toxic dose of paracetamol.

For determination of hypoglycemic and antihyperlipidemic effect of *Satureja montana* L., Wistar laboratory rats were divided into 8 groups, in groups used to determine hypoglycemic potential diabetes was induced by streptozotocin and after that, animals were treated for 28 days per os with saline solution, metformin 100 mg/kg, *Satureja montana* extract 500 mg/kg and their combination. For examination of hypolipidemic effect animals were treated with high fat diet and saline solution, simvastatin 10 mg/kg, *Satureja montana* L. extract 500 mg/kg and their combination. For determination of antioxidant potential of *Satureja montana* L. animals were divided into four groups and winter savory extract and saline solution were given them orally for 7 days. After that, rats were exposed to the toxic dose of paracetamol. Biochemical parameters, the lipids concentration and parameters of the kidney and liver function, were determined in animal serum. *Ex vivo* analyses included the determination of lipid peroxidation activity and the activity of antioxidant protection enzymes in liver homogenates of the test animals, after administration of a toxic dose of paracetamol. *In vitro* analyses were performed with extracts obtained with different solvents. Antioxidant activity tests as well as total phenolic and flavonoid content, were determined spectrophotometrically.

In diabetic animals, 28 days treatment with *Satureja montana* L. extract brought to statistically significant decrease of glucose comparing to the control. Statistically significantly lower TG values were observed in the group that received *Satureja montana* L. extract compared to the control diabetic group, at the end of the study. On the other parameter of lipid status, the examined extract did not show significance effects.

In animals fed with food enriched with fats, application of *Satureja montana* L. extract brought to statistically significant decrease of LDL cholesterol, relative to the control group fed with food enriched with fats. Concentration of parameters of the kidney and liver function: AST, urea, creatinine, and uric acid were significantly lower in the group treated with *Satureja montana* L. extract in comparison to the control group fed with food enriched with fats.

Pre-treatment of animals with herbal extracts before application of the toxic dose of paracetamol significantly decreased alkaline phosphatase activity, concentration of direct bilirubin and creatinine in the serum relative to the group treated with saline solution and single dose of paracetamol. The activity of lipid peroxidation was significantly higher in animals that were treated with saline solution compared with *Satureja montana* L. extract, before the toxic doses of paracetamol. In addition, in animals pretreated with *Satureja montana* L. extract, the number of inflammatory cells is decreased along with the activity of CYP2E1 enzymes.

The results of these studies showed hypoglycemic potential of

	<p><i>Satureja montana</i> L. extract in animals with induced diabetes. Pre-treatment with <i>Satureja montana</i> L. extract prior to the administration of the toxic dose of paracetamol has shown potential of hepatoprotective, anti-inflammatory and antioxidative effect. Also, PCA analyses showed that the extraction mediums had a large influence on the antioxidative effect.</p>
Accepted on Scientific Board on:	16.05.2018
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Značaj ispitivanja.....	3
2. OPŠTI DEO	5
2.1. Taksonomija	5
2.2. Opis biljke	5
2.3. Geografsko poreklo i rasprostranjenost	6
2.4. Upotreba.....	7
2.5. Hemijski sastav	7
2.5.1. Etarsko ulje	8
2.5.2. Fenolne kiseline	10
2.5.3. Flavonoidi	13
2.6. Pregled literature o farmakološkim svojstvima rtanjskog čaja i njegovih ekstrakata ..	14
2.6.1. Antimikrobna aktivnost	14
2.6.2. Antioksidativno dejstvo	15
2.6.3. Antidijabetesni efekat	15
2.6.4. Antikancerogeni efekat.....	16
2.6.5. Ostala farmakološka dejstva	16
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	18
4. RADNE HIPOTEZE	19
5. MATERIJAL I METODE	20
5.1. Eksperimentalne životinje	20
5.2. Ekstrakt rtanjskog čaja.....	20
5.3. Supstance korišćene u eksperimentima	21
5.4. Tretman i podela eksperimentalnih životinja	22
5.4.1. <i>In vivo</i> ispitivanje hipoglikemijskog efekta ekstrakta rtanjskog čaja.....	22
5.4.2. <i>In vivo</i> ispitivanje hipolipidemijskog efekta ekstrakta rtanjskog čaja.....	23

5.4.3. Biohemijska ispitivanja	25
5.4.4. Histološka analiza	25
5.4.5. <i>Ex vivo</i> ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta rtanjskog čaja nakon primene toksične doze paracetamola	26
5.5. Statistička obrada podataka	32
5.6. <i>In vitro</i> određivanje antioksidativne aktivnosti	33
5.6.1. Priprema ekstrakata rtanjskog čaja	33
5.6.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC- <i>Total Phenolic Content</i>)	33
5.6.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	34
5.6.4. Određivanje neutralizacije DPPH• radikala (<i>Radical Scavenger Capacity- RSC</i>)	35
5.6.5. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO• radikala	36
5.6.6. Određivanje redukcionne sposobnosti ekstrakta FRAP testom (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	37
5.6.7. Određivanje sposobnosti neutralizacije •OH radikala	39
5.6.8. Analiza glavnih komponenata (<i>PCA- Principal component analysis</i>)	40
5.6.9. Statistička obrada podataka	40
6. REZULTATI	42
6.1. Ispitivanje hemijskog sastava rtanjskog čaja	42
6.2. <i>In vivo</i> ispitivanja dijabetičnih i životinja sa normalnim vrednostima glikemije	43
6.2.1. Vrednost telesne mase	43
6.2.2. Masa jetre	45
6.2.3. Vrednost glukoze u krvi	46
6.2.4. Lipidni status	47
6.2.5. Parametri funkcije jetre	53
6.2.6. Parametri bubrežne funkcije	59
6.3. <i>In vivo</i> ispitivanja životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima	63
6.3.1. Vrednost telesne mase	63

6.3.2. Masa jetre.....	65
6.3.3. Vrednost glukoze u krvi	66
6.3.4. Lipidni status.....	67
6.3.5. Parametri funkcije jetre	74
6.3.6. Parametri bubrežne funkcije	80
6.4. Histološka analiza tkiva aorte, pankreasa i jetre kod životinja sa indukovanim dijabetesom i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima	84
6.4.1. Histološke karakteristike isečaka aorte kod životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima	84
6.4.2. Histološke karakteristike isečaka jetrenog tkiva kod životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima	84
6.4.3. Histološke karakteristike isečaka iz pankreasa kod životinja sa indukovanim dijabetesom.....	86
6.4.4. Histološke karakteristike isečaka jetrenog tkiva kod životinja sa indukovanim dijabetesom.....	86
6.5. <i>Ex vivo</i> antioksidativna aktivnost dejstva ekstrakta rtanjskog čaja posle primene toksične doze paracetamola	88
6.5.1. Rezultati biohemijskih ispitivanja.....	88
6.5.2. Rezultati određivanja pokazatelja oksidativnog stresa u homogenatima tkiva	91
6.6. <i>In vitro</i> ispitivanja antioksidativne aktivnosti	96
6.6.1. Sadržaj ukupnih fenola	96
6.6.2. Sadržaj ukupnih flavonoida	97
6.6.3. Neutralizacija DPPH• radikala (<i>Radical scavenger capacity- RSC</i>)	98
6.6.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO• radikala.....	99
6.6.5. Određivanje redukcione sposobnosti ekstrakta rtanjskog čaja FRAP testom (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	100
6.6.6. Određivanje sposobnosti neutralizacije •OH radikala.....	101
6.6.7. Analiza glavnih komponenata (PCA- <i>Principal Component Analysis</i>)	102
7. DISKUSIJA	104
8. ZAKLJUČCI.....	114

9. LITERATURA	116
---------------------	-----

1. UVOD

Upotreba lekovitog bilja u svrhu lečenja prožima se još od postojanja drevnih civilizacija, kada su ljudima glavni izvor lekova i otrova bile biljke. U 20. veku, sa ekspanzijom nauke i tehnologije dolazi do naglog porasta broja sintetskih lekova, što u značajnoj meri dovodi do zapostavljanja tradicionalne medicine. Mnoge biljne droge koje su korištene od vremena drevnih naroda i danas se koriste u terapijske svrhe i predstavljaju važne sirovine za izolovanje aktivnih principa (1).

Poslednjih decenija biljni preparati se sve više koriste za prevenciju i lečenje različitih bolesti. Podaci Svetske zdravstvene organizacije (SZO) ukazuju na to da preparate na bazi lekovitog bilja upotrebljava oko 80% stanovništva zemalja u razvoju, kao primarni oblik zdravstvene zaštite, a kao razlog se navodi siromaštvo i ograničen pristup savremenoj medicini.

Proizvodi biljnog porekla koji se koriste za humanu upotrebu, u svrhu lečenja, se prema važećoj regulativi svrstavaju u grupu lekova (biljni lekovi i tradicionalni biljni lekovi) ili u grupu dijetetskih suplemenata.

Biljni lekovi i tradicionalni biljni lekovi su definisani Zakonom o lekovima i medicinskim sredstvima (Službeni glasnik RS br. 30/2010, 107/2012, 113/2017, 105/2017). Aktivne sastojke ovih lekova čine isključivo jedna ili više supstanci biljnog porekla ili jedan ili više biljnih preparata ili jedna ili više supstanci biljnog porekla u kombinaciji s jednim ili više biljnih preparata (2). Biljni lekovi moraju da sadrže standardizovane ekstrakte, hemijska priroda njihovih aktivnih sastojaka mora biti poznata, imaju definisan i standardan farmaceutski kvalitet. Delotvornost je potvrđena eksperimentalnim i kliničkim testovima, a njihova efikasnost je dozno zavisna. Za potvrdu kvaliteta, neškodljivosti i efikasnosti biljnog preparata koriste se naučno priznate metode i to analitičke, farmakološke i kliničke studije koje dokazuju njihovu terapijsku efikasnost (engl. *evidence-based medicines*), jednako kao i za sintetske lekove.

Tradicionalni biljni lek je lek koji može biti zasnovan na naučnim principima i izraz je tradicije ili drugih tradicionalnih terapijskih pristupa (2). Upotreba tradicionalnih biljnih lekova zasnovana je na dugogodišnjem iskustvu (engl. *experience-based medicines*), a da bi lek bio upisan u Registar „tradicionalnih biljnih lekova” potrebno je dokazati da se nalazi na tržištu i u upotrebi najmanje 30 godina, od čega najmanje 15 godina na tržištu Evropske unije

(EU) (2). Takođe, ovi biljni lekovi imaju indikacije koje su karakteristične samo za tradicionalne lekove koji su po svom sastavu i nameni predviđeni da se primenjuju bez nadzora lekara (2). Primenuju se isključivo u skladu s propisanom jačinom i doziranjem, a namenjeni su za oralnu upotrebu, spoljnu upotrebu, odnosno inhalaciju (2).

Biljni suplementi prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda (Sl. Glasnik RS 45/2010, 27/11, 50/12, 21/15, 75/15, 7/17) koji je usaglašen sa EU regulativom i standardima *Codex alimentarius-a* predstavljaju dodatke ishrani koji kao aktivni sastojak mogu da sadrže biljke, biljne sirovine, preparate biljnih sirovina, ili sastojke izolovane iz biljnog materijala, pojedinačno ili kao mešavinu, a njihova količina u dnevnoj dozi proizvoda ne treba da bude manja od 15% i veća od 65% u odnosu na poznatu terapijsku dnevnu dozu te biljne sirovine ili preparata (3). Za procenu njihove terapijske doze koriste se monografije Evropske agencije za lekove (*European Medicines Agency-EMA*), Svetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization-WHO*), Evropskog naučnog udruženja za fitoterapiju (*European Scientific Cooperative on Phytotherapy-ESCOP*), nemačke Komisije E i *Physicians Desk Reference for Herbal Medicines*. Za razliku od biljnih lekova, suplementi nemaju specifične zahteve po pitanju kvaliteta i bezbednosti. Na tržištu se nalaze u vidu doziranih farmaceutskih oblika, dizajnirani da se uzimaju u pojedinačnim dozama u obliku tablete, kapsule, praška u kesici, ampule, bočice i drugih oblika. Zbog toga što su lako dostupni i kupuju se bez lekarskog recepta i nadzora veoma je bitno da na deklaraciji ovih proizvoda ne sme biti navedeno da se koriste za prevenciju i/ili lečenje bolesti već da služe samo kao dodatak ishrani.

U današnje vreme, naučnici širom sveta, postaju sve zainteresovaniji za ispitivanje kompleksnog hemijskog sastava biljaka i njihovih bioloških i farmakoloških efekata. Sastav aktivnih principa unutar jedne biljne vrste može biti različit. Faktori koji utiču na to su mnogobrojni i obuhvataju genetske varijacije, klimatske uslove, geografsko podneblje, način kultivacije, vreme branja i slično. S toga se razlikuju i njihove farmakološke i toksikološke osobine. Ispitivanja terapijske efikasnosti i bezbednosti preparata biljnog porekla, a koje se u današnje vreme mnogobrojna, su veoma značajna jer daju uvid u nova naučna saznanja o njihovom dejstvu, ali i potencijalnim neželjenim efektima ispitivanih biljaka. Istraživanja farmakoloških efekata biljaka nisu značajna samo iz razloga otkrivanja aktivnih principa koji se koriste u terapijske svrhe, već i zbog što mogu predstavljati polazni materijal za sintezu lekova, a koriste se i kao modeli za dobijanje novih, farmakološki aktivnih supstanci.

1.1. Značaj ispitivanja

Zahvaljujući prisustvu sekundarnih metabolita kao što su flavonoidi, steroli, etarska ulja i tanini, pripadnici vrste *Satureja* poseduju lekovita svojstva i zbog svoje dugogodišnje upotrebe se svrstavaju u grupu tradicionalnih biljnih preparata za ublažavanje poremećaja izazvanih infekcijama, kao i za otklanjanje grčeva, bolova u mišićima, mučnine, probavnih smetnji i dijareje (4).

Dok je za neke vrste roda *Satureja* dokazan antidijabetički i hipolipidemijski efekat, podaci o uticaju rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.) su oskudni, a još uvek ne postoje publikovani podaci koji bi pokazali efekat ove biljke na hiperlipidemiju.

S obzirom da su dosadašnja ispitivanja potencijalno korisnih farmakodinamskih delovanja biljaka koje pripadaju rodu *Satureja* bila pojedinačna (ispitivano je samo hipoglikemijsko ili samo antioksidantno delovanje), da bi se u potpunosti sagledao antidijabetični potencijal ekstrakata ove biljke, neophodno je da se ispitivanjem obuhvati kako delovanje na homeostazu glukoze, tako i hipolipidemijsko delovanje. Imajući u vidu da je najverovatniji mehanizam kojim se ovi efekti postižu sprečavanje efekata oksidativnog stresa (5,6), pored antidijabetičnog i hipolipidemijskog delovanja, neophodno je utvrditi i uticaj ekstrakta rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.) na parametre oksidativnog stresa *ex vivo* i *in vitro* metodama. Ispitivanjem uticaja ekstrakta rtanjskog čaja na parametre u serumu koji su pokazatelji funkcije jetre i bubrega dobili bi se podaci koji bi pomogli sveobuhvatnom sagledavanju bezbednosnog profila korišćenog ekstrakta. U planiranom istraživanju će biti izazvani eksperimentalni modeli tipa 2 dijabetesa izazvanog streptozotocinom i hiperlipidemije izazvane ishranom bogatom mastima, kod pacova soja *Wistar*. Na taj način bi se u jednom istraživanju utvrdilo potencijalno antidijabetično i hipolipidemijsko delovanje ekstrakta rtanjskog čaja, tj. ona farmakodinamska svojstva koja su najznačajnija za tip 2 dijabetesa i dislipidemiju kao najčešću i jednu od najtežih komplikacija ove bolesti. Patohistološkim ispitivanjima pankreasa, jetre i trbušne aorte bi se utvrdile strukturne promene ovih organa koje se razvijaju kao posledica neregulisanog dijabetesa tipa 2 i hiperlipoproteinemije.

Dobijeni rezultati ovog prekliničkog ispitivanja efikasnosti ekstrakta rtanjskog čaja, kao potencijalnog antidijabetičnog i hipolipidemijskog preparata će predstavljati osnovu za klinička ispitivanja ovih značajnih farmakodinamskih efekata u cilju razvoja novih biljnih

lekova i suplemenata, značajnih za sprečavanje i otklanjanje poremećaja prisutnih kod pacijenata obolelih od tipa 2 dijabetesa i hiperlipidemije.

2. OPŠTI DEO

Satureja montana L.

2.1. Taksonomija

Rtanjski čaj (*Satureja montana* L.) pripada porodici *Lamiaceae*, podporodici *Nepetoideae* i rodu *Satureja*. Glavna karakteristika podporodice *Nepetoideae*, kojoj pripada i rtanjski čaj, je visok sadržaj etarskog ulja koji kod jedinki koje pripadaju ovoj subfamiliji iznosi više od 0.5% (7). Familiju *Lamiaceae* (Usnatice) čini oko 240 rodova i preko 7.200 vrsta (8). U flori Srbije je zastupljeno 30 rodova usnatice sa 147 vrsta (9).

Taksonomija biljke Rtanjski čaj (*Satureja montana* L.), prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Taksonomija biljke Rtanjski čaj (*Satureja montana*)

Regnum (carstvo)	<i>Plantae</i>
Divisio (razdeo)	<i>Magnoliophyta</i>
Clasis (klasa)	<i>Magnoliopsida</i>
Ordo (red)	<i>Lamiales</i>
Familia (porodica)	<i>Lamiaceae</i>
Subfamilia (podporodica)	<i>Nepetoideae</i>
Genus (rod)	<i>Satureja</i>
Species (vrsta)	<i>Satureja montana</i>

2.2. Opis biljke

Rtanjski čaj je višegodišnja biljka, koja izrasta kao polužbun, visine 20-30 cm (*slika 1*). Koren biljke je snažan, vretenast, iz njega izbija nekoliko stabljika formirajući patuljasti žbun. Stabljike su uspravne, u donjem delu odrvenele, bledozelene, na preseku skoro okrugle,

u gornjem delu često ljubičaste i pokrivene proređenim dlačicama, na preseku skoro okrugle, do 50 cm visoke. Listovi su uzdužno linearno lancetasti, svetlo istačkani. Površina lista je prekrivena žljezdanim dlakama koje proizvode i luče eterična ulja slično kao i kod drugih aromatičnih vrsta ove porodice. List je prekriven i zaštitnim epikutikularnim voskom koji je dio kutikule i služi kao prepreka za vodu, a sastoji se od n-alkana, alkil estara n-alkanoinskih kiselina, alkohola, aldehida, kao što su mono- i diketoni i pod jakom je genetskom kontrolom (10). Cvetovi su sa drškom, po 3-5 skupljeni u cvasti, sve zajedno grade dugačke metlice. Krunica je bela, ružičasta ili ljubičasta, gornja usna krunice zaobljena ravna, donja je nešto duža, trorežnjevita, purpurno istačkana. Plod je merikarpium koji se raspada na četiri orašice, svetlo mrke boje. Cveta od jula do oktobra.

Zahvaljujući jakom fenolnom karakteru etarskog ulja, poseduje karakterističnu aromu (8). Ime roda *Satureja* potiče od latinske reči “saturare” što znači nahraniti, zasititi, jer se biljka nekada koristila u ishrani. Rtanjski čaj je u narodu poznat i kao bresina ili vrijesak (9).



Slika 1. Rtanjski čaj

2.3. Geografsko poreklo i rasprostranjenost

Rtanjski čaj raste u južnoj Evropi i severnoj Africi, na sušnim i toplim krečnjačkim kamenjarima i pašnjacima mediteranskog i submediteranskog tipa. Dobro podnosi sušu i siromašno zemljište i zahteva malo vlage. Na teritoriji Srbije ova biljka se može naći u

okolini Niša i Pirota, na Ozrenu, Rtnju, Jelašnici, u dolini Belog Rzava. Takođe, raste i u Crnoj Gori, Bosni i Hercegovini kao i na Jadranskom primorju.

2.4. Upotreba

Upotrebljava se kao aromatična biljka, začim i prirodni konzervans hrane, a svoju upotrebu biljka *Satureja montana* L. je našla i u tradicionalnoj medicini. Kao lekoviti deo biljke koristi se osušen nadzemni deo (*Saturejae montanae herba*), list, ređe etarsko ulje (9). U tradicionalnoj medicini se koristi kao antiseptik, sredstvo za olakšanje varenja i ublažavanje tegoba kod nadutosti, za ublažavanje upale mokraćnih kanala, organa za disanje i varenje. Spolja se koristi kod upala kože i sluzokože.

2.5. Hemijski sastav

Biljne droge imaju veoma kompleksan hemijski sastav, koji kod mnoštva jedinki još uvek nije dovoljno istražen.

Biljne ćelije sintetišu i luče veliki broj različitih jedinjenja koja se nazivaju biljni metaboliti. Biljni metaboliti se klasifikuju na primarne i sekundarne. Primarni metaboliti se nalaze u svim ćelijama i imaju ulogu u metabolizmu i reprodukciji ćelije, krucijalni su za rast i razvoj. U primarne metabolite se ubrajaju ugljeni hidrati, proteini masti, i nukleinske kiseline. Sekundarni metaboliti nastaju sekundarnim metabolizmom koji predstavlja nastavak primarnih metaboličkih procesa (11). Sekundarni metaboliti su se ranije smatrali sporednim produktima metabolizma, bez značajnih uloga za biljku, međutim istraživanja su potvrdila ulogu sekundarnih metabolita za oprašivanje i rasejavanje, preživljavanje, odbranu od predatora, patogena kao i ulogu alelopatskih agenasa, regulišu odnose biljke u kojoj nastaju sa drugim biljkama (12). Farmakološki aktivna jedinjenja biljaka pripadaju grupi sekundarnih metabolita (11). Sekundarni metaboliti porodice *Lamiaceae* obuhvataju razne terpenoide, i to mono-, seskvi- i triterpene, fenolna jedinjenja, naročito fenolne kiseline (kao sto je rozmarinska) i flavonoide (13).

Rtanjski čaj sadrži veliki broj različitih klasa biološki aktivnih jedinjenja u koje spadaju terpeni, flavonoidi, fenolne kiseline, minerali i ostala jedinjenja. Postoji velika varijabilnost sastava između jedinki rtanjskog čaja usled razlika u geografskom staništu,

nadmorskoj visini, atmosferskim uslovima, načinu branja kao i fazi ontogenetskog razvoja biljke (14, 15).

U istraživanju koje su sproveli Četković i saradnici u etilacetatnom i butanolnom ekstraktu biljke rtański čaj koja je sakupljana na području planine Zlatibor, Srbija, HPLC metodom su detektovana i kvantifikovana sledeća jedinjenja: protokatehinska, siriginska, vanilinska, kafena, p-kumarinska i ferulinska kiselina kao i flavanoli katehin i 2-epikatehin (16).

2.5.1. Etarsko ulje

Etarska, eterična ili esencijalna ulja predstavljaju isparljive, aromatične, uljane tečnosti, koje se dobijaju iz biljnog materijala (cvetova, listova, semena, nadzemnog dela biljke, kore, plodova, korena...). Proizvode se i izlučuju u žlezdama koje se nalaze na površini listova i cvetova što predstavlja specifičnu anatomsku karakteristiku svih aromatičnih vrsta iz porodice *Lamiaceae*. Predstavnici roda *Satureja* obično na listovima nose žlezdane dlake koje izlučuju etarska ulja (4). U sastav etarskih ulja, članova subporodice *Nepetoideae* ulaze isparljivi monoterpeni koji se proizvode u disk ćelijama u kojima tokom sekretorne faze dolazi do leukoplastnih i ultrastrukturnih promena (4). Anatomija žlezdanog aparata (žlezdane ćelije i priključene epidermalne ćelije), kao i sadržaj etarskog ulja predstavljaju predložene elemente za priznavanje odvojenog *Satureja* roda i na taj način pomažu u rešavanju vrlo složene sistematizacijske probleme roda *Satureja* (4).

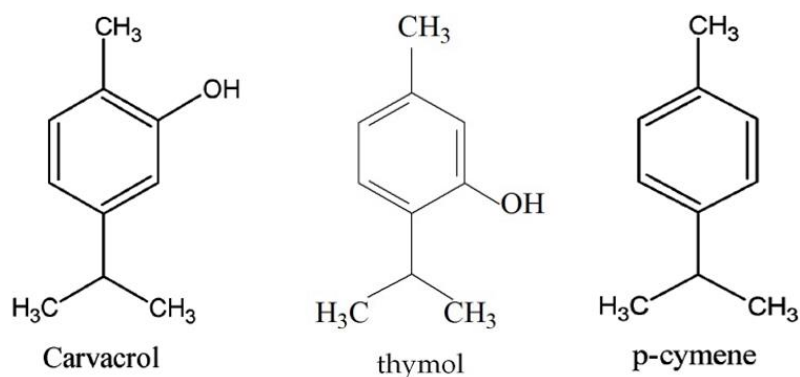
Etarska ulja zahvaljujući svojoj hidrofobnoj prirodi dejstvo ispoljavaju na ćelijskoj membrani. Ugradnjom u lipidni dvosloj, a u skladu sa njihovim specifičnim parcijalnim koeficijentima, dovode do remećenja membranske strukture i funkcije (17). Opsežna istraživanja su dokazala da etarska ulja i njihovi konstituenti poseduju širok spektar bioloških aktivnosti.

Upoređivanjem hemijskog sastava etarskog ulja, kod jedinki koje su sakupljane na različitim lokalitetima, uočene su razlike u hemijskom sastavu (7, 15). Pored razlika u sastavu, uočene su i razlike u količini karvakrola i timola kao i njihovih prekursora p-cimena i γ -terpinena. U literaturi postoji podatak i o prinosu etarskog ulja koji se kreće u opsegu između 0,22 i 2,8%, a broj konstituenasa etarskog ulja može zavistiti i od nadmorske visine na kojoj su rasli ispitivani uzorci biljaka, pa je tako sa porastom nadmorske visine zabeležen

veći sadržaj linalola, terpinen-4-ola i cis-sabinen hidrata, dok se sadržaj monoterpena timola i karvakrola smanjivao (14).

Studijama koje su ispitivale sastav etarskog ulja kod uzoraka koji su bili sakupljeni na tri različita lokaliteta u Crnoj Gori kao dominantna klasa komponenti koja je pronađena u ulju sva tri uzorka bila je klasa monoterpenkih ugljovodonika (oksigenisani monoterpeni) (14). *Satureja montana* L. sakupljena u Albaniji je imala visok sadržaj karvakrola (2,21 -55,95%) koji je opadao sa porastom nadmorske visine, a od ostalih komponenti bili su prisutni timol (0,38 -27,29%), p-cimen (1,13 -17,40%), borneol (1,35- 9,64%), γ -terpinen (0,31 -8,86%), i trans- β - cariofilen (0,11 – 10,79%) (18). Takođe i kod jedinki koje su bile sakupljene sa dve različite lokacije u Bosni i Hercegovini, sa porastom nadmorske visine u hemijskom sastavu ulja, zabeleženo je opadanje monoterpenkih komponenti sa porastom alkohola (karvakrol 23,3-10,6%; timol 31,7-3,8%; geraniol 0,1-22,3%, terpinen-4-ol 0,8-10,3%, borneol 2,9-4,8%) (15). Određivanje sastava etarskog ulja biljke *Satureja montana* L., koje je bila sakupljena na području hrvatske (planina Biokovo) je pokazalo da ona poseduje visok sadržaj monoterpena karvakrola (45,7%). Ostale važne komponente su monoterpenki ugljovodonici p-cimen (12,6%), terpinen (8,1%) kao i strukture koje sadrže kiseonik karvakrol metil etar (11,0%), borneol (4,8%), timol (3,9%) i timol metil etar (2,3%). Etarsko ulje takođe sadrži i male količine α -tujena, α -terpinena, α -pinena i mircen (19).

Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) i **timol** (2-izopropil-5-metilfenol) su monoterpenki fenoli, derivati cimena (hidroksilovani p-cimen) i pri tom su i izomeri. Javljaju u etarskim uljima izolovanim iz biljaka koje pripadaju porodici *Lamiaceae* (*Thymus*, *Origanum*, *Satureja*...).



Slika 2. Strukturne formule cimena, karvakrola i timola

Timol postoji u obliku bezbojnih kristala, aromatičnog mirisa na timjan. Teško se rastvara u vodi, a dobro se rastvara u etanolu, etil-etru i sirćetnoj kiselini (20). Upotrebljava

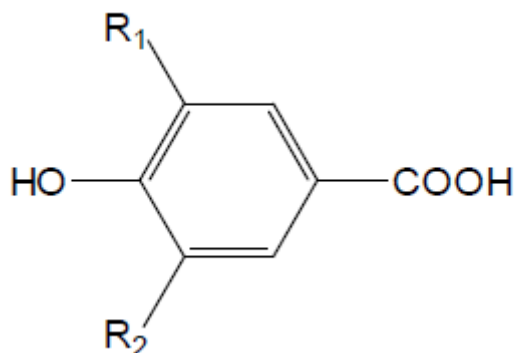
se kao antiseptik u medicini, kozmetici i prehrambenoj industriji. Dokazani su brojni efekti timola kao što su antioksidansni, antinflatorni, lokalno anestetski, antinocicpetivni, antiseptički, antibakterijski, antifungalni, antimutageni, antikancerogeni, anksiolitički (21-27).

Karvakrol je bezbojna do žućkasta viskozna tečnost. Slabo je rastvoran u vodi, a dobro u etanolu, etil-etru, bazama i acetonu (28). Ispoljava antibakterijsku, antifungicidnu, anksiolitičku, antioksidantnu i antikancerogenu aktivnost (29-31). Pored navedenih dejstava deluje hepatoprotektivno i antiinflamatorno (32).

2.5.2. Fenolne kiseline

Fenolne ili fenolkarbonske kiseline predstavljaju aromatične sekundarne metabolite biljaka. U ovu grupu spadaju sva jedinjenja koja sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu grupu. Nastaju biosintetskim putem iz acetata, preko šikiminske kiseline. Dele se na dve vrste metabolita i to derivate benzojeve kiseline (C6-C1) i derivate cimetine kiseline (C6-C3).

a) Derivati benzojeve kiseline



R=R'=H: p-hidroksibenzoeva kiselina

R=R'=OH: galna kiselina

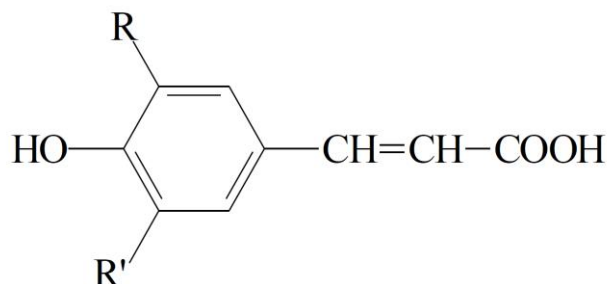
R=R'=OCH₃: siriginska kiselina

R=OH, R'=H: protokatehinska kiselina

R=OCH₃, R'=H: vanilinska kiselina

Slika 3. Hemijske formule osnovnih derivata benzojeve kiseline

b) Derivati cimetine kiseline



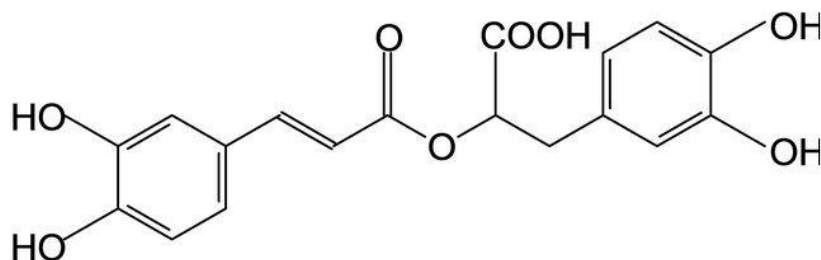
R=R'=H: p-kumarinska kiselina

R=R'=OCH₃: sinapinska kiselina

R=OH, R'=H: kafena kiselina

R=OCH₃, R'=H: ferulna kiselina

Rozmarinska kiselina:



Slika 4. Hemijske formule osnovnih derivata cimetine kiseline

Fenolne kiseline se u veoma malom broju nalaze u slobodnom obliku. Većina je vezana estarskim, etarskim ili acetatnim vezama za strukturne komponente biljke (celuloza, lignin), veće polifenole (flavonoidi i tanini), manje organske molekule (glukoza i vinska kiselina) ili druge prirodne spojeve (terpeni).

Potvrđeno je da mnoge droge koje se tradicionalno upotrebljavaju, kao aktivne sastojke sadrže fenolne kiseline i njihove heterozide (11). Najznačajnije dejstvo fenolnih kiselina je inhibicija lipidne peroksidaze, zbog inhibicije ovog enzima mogu se koristiti kao konzervansi, antiinflamatorni agensi, antioksidansi (11).

Antioksidativna aktivnost polifenola prvenstveno zavisi od njihove sposobnosti doniranja vodonika, što rezultira nastajanjem manje reaktivnih fenoksil radikala, koji su stabilni zahvaljujući delokalizaciji elektrona, uz postojanje više rezonantnih formi.

Antioksidantna aktivnost derivata benzojeve i cimetine kiseline je značajno uslovljena brojem i položajem hidroksilnih (-OH) i metoksi (-OCH₃) grupa u aromatičnom prstenu. Povećanje broja hidroksilnih grupa dovodi do povećavanja antioksidativne aktivnosti, kao i prisustvo hidroksilnih grupa u *orto-* ili *para-* položaju u odnosu jedna na drugu, znatno povećava antioksidantnu aktivnost fenolnih kiselina (32). Antioksidantni potencijal fenolnih kiselina se povećava i uvođenjem jedne ili dve metoksi grupe u *ortho-* položaj, u odnosu na hidroksilnu grupu. Prisustvo metoksi grupe u strukturi hidroksibenzoevih kiselina može povećati antiradikalnu sposobnost i sposobnost doniranja vodonika, tako da siringinska kiselina (4-OH, 3,5-OCH₃) pokazuje veću aktivnost od monohidroksibenzoata bez metoksi grupa (33). Metoksi grupe, značajno pojačavaju i antiradikalnu sposobnost hidroksicimernih kiselina, pa tako ferulna kiselina ispoljava najjaču antioksidativnu aktivnost (34).

Na povećanje antioksidativne aktivnosti utiče i udaljenost karboksilne grupe, tj. uvođenje metilenske grupe između benzenovog prstena i karboksilne grupe, što se objašnjava nastankom stabilnijih intermedijera, pa iz ovog razloga derivati cimetine kiseline poseduju jače antioksidantno delovanje u odnosu na derivate benzojeve kiseline. Takođe CH=CH-COOH grupa, koja je vezana za fenil prsten hidroksicimernih kiselina zbog prisustva dvostruke veze ima veću sposobnost doniranja vodonika i stabilizacije radikala rezonancijom, u odnosu na -COOH grupu hidroksibenzoevih kiselina (35-37).

Prema literaturnim podacima u rtaškom čaju sa različitih lokaliteta su zastupljene različite fenolne komponente u različitim koncentracijama. U metanolnom ekstraktu biljke *Satureja montana* L. koja je sakupljena na području Hrvatske identifikovane su i kvantifikovane sledeće fenolne komponente: rutin, eleginska, rozmarinska i siringinska kiselina, dok su u etanolnom ekstraktu kvantifikovani rutin, kvercetin, p-kumarinska i rozmarinska kiselina (40).

Kafena (3,4 dihidroksi cinaminska kiselina) je jedna od najrasprostranjenijih derivata cimetine kiseline u biljnom svetu. Različitim *in vitro* ispitivanjima je potvrđena jaka antioksidativna aktivnost kafene kiseline (41). Rezultati studije sa kafenom kiselinom sprovedene na pacovima sa cirozom jetre izazvanom ugljen tetrahloridom su ukazali na to da je kafena kiselina značajno uticala na prevenciju oštećenja jetre, a hepatoprotektivno dejstvo

se može pripisati sposobnosti da kafene kiseline da inhibiše 5-lipooksigenazu i produkciju leukotriena (42).

Rozmarinska kiselina je ester 3,4-dihidroksifenil mlečne kiseline i kafene kiseline, pored hlorogenske kiseline smatra se najzastupljenijim estrom kafene kiseline u biljnom svetu. Zastupljena je kod sledećih biljaka iz porodice *Lamiaceae*: ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), nana (*Mentha spp.*) i matičnjak (*Melissa officinalis* L.). Farmakološki efekti rozmarinske kiseline su potvrđeni kroz mnoge sprovedene studije. Dokazana antioksidativna aktivnost se zasniva na stabilizaciji ćelijske membrane i ometanju proizvodnje slobodnih radikala (43-45).

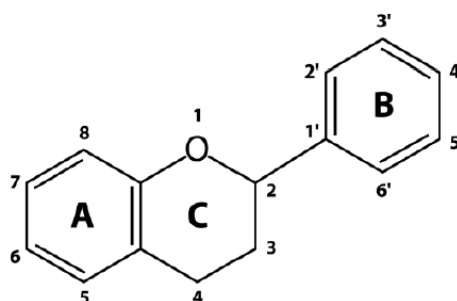
Takođe, rozmarinska kiselina poseduje i izrazito antimikrobno, antiinflamatorno i antimutageno dejstvo (45).

Brojni autori su potvrdili i antiinflamatorno, antiviralno, antileukemijsko kao i neuroprotektivno dejstvo rozmarinske kiseline (46-50).

2.5.3. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju grupi sekundarnih biljnih metabolita male molekulske mase, i obuhvataju preko 10000 struktura (51). Flavonoidi su odgovorni za narandžaste, plave i ljubičasto-crvene boje lišća, cvetova i plodova.

Osnovnu strukturu flavonoida čini flavansko jezgro koje se sastoji od 15 ugljenikovih atoma povezanih u tri prstena (C6-C3-C6), benzopiranski prsten (označen kao A), piranski prsten (označen kao C) i benzenski prsten (označen kao B) (*slika 5*). U zavisnosti od funkcionalne grupe koja je vezana za centralni piranov prsten, svrstavaju se u sledeće grupe: flavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli izoflavoni, i antocijani (52).



Slika 5. Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi poseduju jako antioksidativno dejstvo, koje se ostvaruje direktnim “hvatanjem” slobodnih radikala. Za antioksidativnu aktivnost su odgovorne njihove strukturne karakteristike i položaj funkcionalnih grupa i to:

- *orto*-dihidroksilna (kateholna) grupa u B prstenu daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona;
- prisustvo 4-keto grupe u C prstenu i dvostruke veze u položaju 2,3 omogućuju delokalizaciju elektrona iz B prstena;
- hidroksilna grupa na položajima 3 i 5 osigurava stvaranje vodoničnih veza sa 4-keto grupom, obezbeđujući maksimalni efekat “hvatanja” slobodnih radikala (37, 53, 54, 55).

Kao najzastupljeniji flavonoidi u rtajskom čaju, u literaturi se pominju rutin, kvercetin, katehin i 2-epikatehin (16, 40).

2.6. Pregled literature o farmakološkim svojstvima rtajskog čaja i njegovih ekstrakata

2.6.1. Antimikrobna aktivnost

U studiji koju su sproveli Serrano i saradnici dokazana je antimikrobna aktivnost etanolnog ekstrakta i etarskog ulja rtajskog čaja protiv tri Gram pozitivne (*B. thermosphacta*, *L. innocua* i *L. monocytogenes*) i četiri Gram negativne bakterije (*P. putida*, *S. Typhimurium*, *S. Putrefaciens*, *E. coli*), sa minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIC) koje su se kretale u rasponu od 0.4-30.30 mg/ml za etanolni ekstrakt i 0.8-2.10 µg/ml za etarsko ulje (56). Takođe, antimikrobna aktivnost etarskog ulja je dokazana i na sledećim sojevima bakterija *Acinetobacter* sp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus pyogenes* i *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* i *Listeria monocytogenes* (14, 57, 58).

Pepeljnjak i saradnici su mikrodilucionom mehomom potvrdili antimikrobnu aktivnost etanolnog ekstrakta rtajskog čaja (*Satureja montana*) protiv sojeva *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus morgani*, *Candida tropicalisi* i *Trichophyton mentagrophytes*, sa MMC vrednostima koje su se nalazile u opsegu 4.1-6.3% i MIC vrednostima u opsegu 3.1-4.1%, dok je metodom difuzije dokazana jača aktivnost etanolnog ekstrakta protiv sojeva *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava*, *Candida tropicalis* i *Candida krusei* (59).

Antifungalno dejstvo

Antifungalno dejstvo etarskog ulja *Satureja montana* L., pre i posle inkapsulacije je potvrđeno ispitivanjem dejstva na 8 različitih gljiva (dermatofita) i dva fitopatogena. Maksimalna antifungalna aktivnost etarskog ulja je zabeležena na *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Pyricularia oryzae* (zona inhibicije > 70%), pri čemu inkapsulacija nije imala uticaja na antifungalnu aktivnost (60).

Antiviralno dejstvo

Vodeni ekstrakt *Satureja montana* L. ispoljava jako antiviralno dejstvo na HIV virus, što je potvrđeno u *in vitro* studiji, skrining testom inhibicije replikacije HIV-1 virusa u MT-4 ćelijama, a zabeleženo je i inhibitorno dejstvo na aktivnost HIV-1 reverzne transkriptaze (61).

2.6.2. Antioksidativno dejstvo

Antioksidativna aktivnost ove biljne vrste je dokazana kroz brojne sprovedene studije, u kojima je ispitivana antioksidativna aktivnost etarskog ulja i različitih ekstrakata *Satureja montana* L. (14, 56, 62).

Rezultati ovih studija su pokazali da *Satureja montana* L. ispoljava izrazito antioksidativno dejstvo. Četojević-Simin i saradnici su u *in vitro* studiji ustanovili da ekstrakti rtanjskog čaja sa teritorije Zlatibora, ispoljavaju jako antioksidativno delovanje. Njihova aktivnost protiv hidroksilnih i peroksi radikala se dovodi u vezu sa sadržajem ukupnih fenola koji imaju sposobnost doniranja vodonika i direktnim hvatanjem slobodnih radikala (63). Antioksidativno dejstvo je dozno zavisno, a najjače dejstvo su pokazali n-butanolni, metanolni i vodeni ekstrakt. Takođe, ekstrakti biljke *Satureja montana* L. kao jaki antioksidansi mogu imati uticaja na redoks stanje ćelije i na taj način dovesti do smanjenja ćelijske proliferacije (63).

2.6.3. Antidijabetesni efekat

Zahvaljujući prisustvu fenolnih komponenti koje pokazuju jak antioksidansni i antiinflamatorni efekat *Satureja montana* L. ispoljava antidijabetesni efekat, dovodeći do redukcije oksidativnog stresa koji nastaje kod dijabetesa (64). Hiperglikemija izazvana

dijabetesom izaziva povećanje indikatora oksidativnog stresa kao što je lipidna peroksidacija, za koga se smatra da je esencijalan za patogenezu ove bolesti. Primećeno je da antioksidansna aktivnost raste sa porastom koncentracije ekstrakta. Rezultati sprovedenih studija su ukazali na to da stepen sekrecije insulina kod dijabetičnih životinja koje su tretirane ekstraktom lista biljke *Satureja montana* L. značajno raste u odnosu na dijabetičnu grupu životinja koja nije primala ovaj ekstrakt (64). S obzirom na to da je destrukcija β ćelija pankreasa i ćelijske DNK nastala nakon administracije streptozotocina, smatra se da je ekstrakt *Satureja montana* L. doprineo zaštiti i popravci oštećenog tkiva pankreasa, koje je nastalo od upale i nekroze koje je izazvao streptozotocin preko povećanja aktivnosti superoksid dismutaze i glutation peroksidaze, što je dovelo do dalje ćelijske stimulacije i obnavljanja tkiva pankreasa (64).

2.6.4. Antikancerogeni efekat

Četojević-Simin i saradnici su *in vitro* dokazali inhibicionu aktivnost ekstrakta *Satureja montana* L. (n-butanolni, metanolni, vodeni, etil acetatni, petroletarski) protiv humanog epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa) i humanog adenokarcinoma debelog crijeva HT-29, dok je na humanom adenokarcinomu grudi MCF-7 pokazan efekat stimulacije rasta (63). U studiji je dokazano da su HeLa ćelije osjetljivije na dejstvo isptivanih ekstrakata *Satureja montana* L. od ćelija adenokarcinoma HT-29. S obzirom na to da su MCF-7 ćelijske linije estrogen-receptor pozitivne (ER-R), kao objašnjenje za stimulaciju njihovog rasta se navodi mogućnost da neki ekstrakti sadrže fitoestrogene ili faktore koji stimulišu rast ćelija (63).

Takođe, rezultati studije koju su sproveli Lampronti i saradnici, dokazuju antiproliferativnu aktivnost etarskog ulja biljke *Satureja montana* L. kao i uticaj na inhibiciju ćelijskog rasta i indukovanje diferencijacije eritroidnih humanih leukemijskih K562 ćelija (65).

2.6.5. Ostala farmakološka dejstva

Pozitivan uticaj na prevremenu ejakulaciju, vodeno-alkoholnog ekstrakta *Satureja montana* L., dokazan je u eksperimentalnoj studiji, a takođe je zabeleženo i povećanje nivoa testosterona, što potvrđuje pozitivan efekat na seksualnu funkciju muškrca. Rezultati studije

ukazuju na to da se biljka *S. montana* L., može uzeti u razmatranje kao prirodni lek za lečenje prerane ejakulacije, bez ispoljavanja negativnih efekata na druge parametre seksualne funkcije, kao i bez ispoljavanja sedativnog efekta (66).

U jednoj od studija je dokazano je i histološki potvrđeno, protektivno dejstvo vodeno-etanolnog ekstrakta *Satureja montana* L. na testikularno oštećenje pacova izazvano ciklofosamidom. Mehanizam delovanja ekstrakta *Satureja montana* L. odgovoran za ovaj efekat, uključuje antiapoptotičke i antioksidativne aktivnosti, posredovane regulacijom peroksizom proliferator-aktiviranog receptora (PPAR- γ) i Akt1 (67).

Etarsko ulje i ekstrakt *Satureja montana* L., ispoljavaju diuretsko dejstvo potvrđeno u *in vivo* studiji, na pacovima. Kao mogući mehanizam preko koga se ovo dejstvo ispoljava navodi se inicijalna vazodilatacija koja doprinosi povećanju izlučivanja urina (68).

Neuroprotektivno dejstvo ekstrakta *Satureja montana* L. je ispitano u studiji sprovedenoj 2009. godine. Rezultati studije su potvrdili inhibični efekat ekstrakta *Satureja montana* L. na aktivnost enzima acetilholinesteraze i butirilholinesteraze, koji su ključni u nastanku i patogenezi Alchajmerove bolesti (69).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi kvalitativni i kvantitativni sastav hemijskih jedinjenja prisutnih u suvom ekstraktu rtanjskog čaja
2. Ispitati uticaj ekstrakta rtanjskog čaja na glikemiju, lipidni status i biohemijske parametre pokazatelje funkcije jetre i bubrega u serumu zdravih i dijabetičnih pacova kao i potencijal ekstrakta rtanjskog čaja u sprečavanju nastanka promena pankreasa i jetre
3. Ispitati uticaj ekstrakta rtanjskog čaja na glikemiju, lipidni status i biohemijske parametre pokazatelje funkcije jetre i bubrega u serumu zdravih i hiperlipidemičnih pacova kao i potencijal ekstrakta rtanjskog čaja u sprečavanju nastanka promena jetre i trbušne aorte
4. Ispitati uticaj ekstrakta rtanjskog čaja na biohemijske parametre, pokazatelje funkcije jetre i bubrega u serumu i antioksidativni potencijal na modelu belih, laboratorijskih pacova izloženih oksidativnom stresu primenom toksičnih doza paracetamola.

4. RADNE HIPOTEZE

Na osnovu prethodno definisanih ciljeva istraživanja postavljene su sledeće hipoteze:

1. Fenolne komponente i flavonoidi su najzastupljenija hemijska jedinjenja u ekstraktu rtanjskog čaja
2. Primena ekstrakta rtanjskog čaja statistički značajno smanjuje poremećaj homeostaze glukoze i lipida, kao i poremećaj biohemijskih parametara pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu životinja sa hemijski izazvanim dijabetes melitusom i ima protektivan uticaj na tkivo pankreasa i jetre.
3. Primena ekstrakta rtanjskog čaja statistički značajno smanjuje poremećaj homeostaze glukoze i lipida, kao i poremećaj biohemijskih parametara pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima i ima protektivan uticaj na tkivo jetre i trbušne aorte.
4. Primena ekstrakta rtanjskog čaja kod eksperimentalnih životinja sprečava oštećenje jetre oksidativnim stresom izazvanim primenom toksične doze paracetamola.

5. MATERIJAL I METODE

5.1. Eksperimentalne životinje

Farmakodinamska i biohemijska ispitivanja su sprovedena na belim laboratorijskim pacovima muškog pola, soja *Wistar*, telesne mase 200-300 gr, odabranih metodom slučajnog uzorka iz okota sa Vojno-tehničkog instituta u Beogradu. Laboratorijske životinje su boravile u Uni-Protect (Ehret, Emendingen, Nemačka) ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja sa filterskim sistemom za protok vazduha, na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima, temperatura vazduha je održavana između 20°C i 25°C, uz kontrolu vlažnosti vazduha i održavanje cirkadijalnog ritma (smena dana i noći u trajanju od 12h). Životinjama je bio omogućen slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje.

Što se tiče brige o životinjama, neophodne eksperimentalne procedure sprovedene su uz poštovanje etičkih načela rada sa laboratorijskim životinjama. *In vivo* ispitivanja sprovedena su u skladu sa protokolom odobrenim od strane Etičke komisije Univerziteta u Novom Sadu (broj rešenja: 01-78/29, datum 20.12.2016).

5.2. Ekstrakt rtanjskog čaja

Tokom ogleada je korišćen etanolni ekstrakt rtanjskog čaja proizveden u Institutu za lekovite biljke "Dr Josif Pančić". Ekstrakt je dobijen od nadzemnog dela biljke rtanjski čaj *Satureja montana* L. (*Lamiaceae*).

Ekstrakt je izrađen metodom dvostruke perkolacije 70% etanolom nakon čega je vršeno uparavanje pod vakumom na maksimalno 50°C. Za ekstrakciju je korišćeno 3 kg rtanjskog čaja a dobijeno 270 g ekstrakta koji ima suvi ostatak 87,94%.

Identifikacija i kvantitativna analiza glavnih komponenti rtanjskog čaja je izvršena pomoću primene visokoefikasne tečne hromatografije (*High performance liquid chromatography* - HPLC). Za HPLC analizu ispitivani ekstrakti rastvoreni su u 70% etanolu, a zatim profiltrirani kroz membranski filter (0,45 m). HPLC analiza je urađena na

hromatografu Agilent 1200 RR sa DAD detektorom, na koloni Lichrospher 100 RP dimenzija 250×4 mm, veličine čestica 5 μm .

Nakon razvoja metode definisani su sledeći uslovi analize:

- Kao mobilna faza korišćena je 0.17%-na mravlja kiselina u vodi (faza A) i acetonitril (faza B).
- Injekciona zapremina uzorka je iznosila 10 μl
- Eluiranje je vršeno gradijentom po šemi: 0-100% B, 0-53 min, uz ukupno trajanje analize od 55 min.
- Brzina protoka iznosila je 0.8 ml/min
- UV apsorbcija je merena na 280 i 330 nm.

5.3. Supstance korišćene u eksperimentima

Za eksperimente su upotrebljene navedene supstance:

- fiziološki rastvor (Natrii chloridi infundibile 0,9% 500 ml, Hemofarm, Vršac, Srbija)
- streptozotocin (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA)
- sirćetna kiselina (Acidum Aceticum 99%, J.T. Baker, USA)
- simvastatin, 98% (Acros Organics, New Jersey, USA)
- metformin (Hemofarm, Vršac, Srbija)
- maslinovo ulje (Textron, Barselona, Španija)
- holesterol (Sigma Chemicals Co, St Louis SAD)
- paracetamol (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- uretan (Sigma Chemicals Co, St Louis, SAD)
- voda koja se koristila u HPLC prečišćena upotrebom Millipore, Eli UV and Simplicity Water Purification System (Milford, MA, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- protokatehinska kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- kafena kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- vanilinska kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- hlorogenska kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- ferulna kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- *p*-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)

- rutin (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- hiperozid (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- katehin (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- epikatehin (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- rozmarinska kiselina (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka)
- metanol (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, SAD)
- etanol (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, SAD)
- mravlja kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, SAD)
- 2,2-difenil-1-pikrazil (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, SAD)
- trihlorsirćetna kiselina (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka)
- etil-acetat (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka)
- EDTA (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka)
- Acetatni pufer (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka)

5.4. Tretman i podela eksperimentalnih životinja

5.4.1. *In vivo* ispitivanje hipoglikemijskog efekta ekstrakta rtanjskog čaja

Za izazivanje hiperglikemije kod eksperimentalnih životinja upotrebljen je rastvor streptozotocina u natrijum-citratnom puferu. Zbog velike nestabilnosti streptozotocina, rastvor je pripreman neposredno pre primene. Rastvor streptozotocina je aplikovan intraperitonealno u jednokratnoj dozi od 50 mg/kg. Nakon 72h sata od primene streptozotocina 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.

Glikemija u krvi eksperimentalnih životinja merena je neposredno pre početka tretmana, 48h nakon primene streptozotocina (u cilju potvrde dijabetesa) i jednom nedeljno do kraja ogleada. Koncentracija glukoze u kapilarnoj krvi, uzeta iz repne vene pacova, određivana je komercijalnim kitovima na aparatu *FreeStyle Optium Neo* (Abbott Laboratories Limited, Berkshire, Engleska). Na početku ogleada, četrnaestog i dvadeset osmog dana ogleada, u serumu ogleadnih životinja određivan je lipidni status (koncentracija ukupnog holesterola, triglicerida, lipoproteina niske gustine („*Low-density lipoprotein* -

LDL“), lipoproteina visoke gustine („*High-density lipoprotein*-HDL“), non HDL, indeks ateroskleroze), parametri pokazatelji funkcije jetre (direktni (konjugovani) bilirubin, ukupni bilirubin, enzimska aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP)), i pokazatelji funkcije bubrega (urea, kreatinin i mokraćna kiselina).

Poslednjeg dana eksperimenta, 2 sata nakon sprovedenog tretmana, životinje su anestetizirane 25% rastvorom uretana (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA), u dozi od 4 ml/kg, intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane kardijalnom punkcijom, u cilju uzimanja dovoljne količine krvi i unutrašnjih organa neophodnih za dalja ispitivanja.

Za ispitivanje hipoglikemijskog efekta etanolnog ekstrakta rtanjskog čaja pacovi su metodom slučajnog izbora podeljeni u sledeće grupe:

1. Kontrolna grupa zdravih životinja tretirana fiziološkim rastvorom, u dozi od 1 ml/kg, peroralno tokom 28 dana (**ConS**).
2. Kontrolna grupa dijabetesnih životinja tretirana streptozotocinom, jednokratno u dozi od 50 mg/kg, a zatim nakon indukcije dijabetesa, tretirana fiziološkim rastvorom, u dozi od 1 ml/kg, peroralno tokom 28 dana (**ConDiab**).
3. Kontrolna grupa dijabetenih životinja tretirana streptozotocinom, jednokratno u dozi od 50 mg/kg, a zatim nakon indukcije dijabetesa, tretirana metforminom, u dozi od 100 mg/kg, peroralno tokom 28 dana (**MetDiab**).
4. Eksperimentalna grupa dijabetesnih životinja tretirana streptozotocinom, jednokratno u dozi od 50mg/kg, a zatim nakon indukcije dijabetesa, tretirana ekstraktom rtanjskog čaja, u dozi od 500 mg/kg, peroralno tokom 28 dana (**RtčDiab**).
5. Eksperimentalna grupa dijabetesnih životinja tretirana streptozotocinom, jednokratno u dozi od 50 mg/kg, a zatim nakon indukcije dijabetesa, tretirana metforminom u dozi od 100 mg/kg i ekstraktom rtanjskog čaja, u dozi od 500 mg/kg, peroralno tokom 28 dana (**MetRtčDiab**).

5.4.2. *In vivo* ispitivanje hipolipidemijskog efekta ekstrakta rtanjskog čaja

U cilju ispitivanja hipolipidemijskog uticaja etanolnog ekstrakta rtanjskog čaja,

eksperimentalne životinje su bile na ishrani obogaćenju lipidima, 4% mikronizovanim holesterolom rastvorenim u maslinovom ulju, koji su dobijale peroralno, preko gastrične sonde, u trajanju od 28 dana.

U krvi eksperimentalnih životinja merena je koncentracija glukoze neposredno pre početka tretmana i jednom nedeljno do kraja ogleada. Koncentracija glukoze u kapilarnoj krvi, uzeta iz repne vene pacova, određivana je komercijalnim kitovima na aparatu *FreeStyle Optium Neo* (Abbott Laboratories Limited, Berkshire, Engleska). Na početku ogleada, četrnaestog i dvadeset osmog dana ogleada, u serumu oglednih životinja određivan je lipidni status (koncentracija ukupnog holesterola, triglicerida, lipoproteina niske gustine („*Low-density lipoprotein* -LDL“), lipoproteina visoke gustine („*High-density lipoprotein*-HDL“), non HDL, indeks ateroskleroze), parametri pokazatelji funkcije jetre (direktni (konjugovani) bilirubin, ukupni bilirubin, aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP)), i pokazatelji funkcije bubrega (urea, kreatinin i mokraćna kiselina).

Poslednjeg dana eksperimenta, 2 sata nakon sprovedenog tretmana, životinje su anestetizirane 25% rastvorom uretana (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA), u dozi od 4 ml/kg, intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane kardijalnom punkcijom, u cilju uzimanja dovoljne količine krvi i unutrašnjih organa neophodnih za dalja ispitivanja.

Za ispitivanje hipolipidemijskog efekta ekstrakta rtanjskog čaja životinje (pacovi) su metodom slučajnog izbora podeljene u sledeće grupe:

1. Kontrolna grupa zdravih životinja tretirana fiziološkim rastvorom, u dozi od 1 ml/kg peroralno tokom 28 dana (**ConS**).
2. Kontrolna grupa hiperlipidemičnih životinja na ishrani bogatoj mastima, tretirana fiziološkim rastvorom, u dozi od 1 ml/kg, peroralno tokom 28 dana (**ConChol**).
3. Kontrolna grupa hiperlipidemičnih životinja na ishrani bogatoj mastima, tretirana simvastatinom, u dozi od 10 mg/kg, peroralno tokom 28 dana (**SimChol**).
4. Eksperimentalna grupa hiperlipidemičnih životinja na ishrani bogatoj mastima, tretirana ekstraktom rtanjskog čaja, u dozi od 500 mg/kg, peroralno tokom 28 dana. (**RtčChol**).

5. Eksperimentalna grupa hiperlipidemičnih životinja na ishrani bogatoj mastima, tretirana simvastatinom u dozi od 10 mg/kg i ekstraktom rtajskog čaja, u dozi od 500 mg/kg, peroralno tokom 28 dana (**SimRtčChol**).

U svakoj grupi je bilo po 6 životinja.

5.4.3. Biohemijska ispitivanja

U serumu laboratorijskih životinja kod kojih je indukovana dijabetes i hiperlipidemija određivana je koncentracija ukupnog holesterola, triglicerida, LDL, HDL, indeks ateroskleroze, koncentracija jetrenih enzima - aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), gama-glutamil transferaze (GGT), direktnog (konjugovanog) i ukupnog bilirubina u cilju praćenja funkcije jetre, a određivana je i koncentracija pokazatelja bubrežne funkcije i to uree, kreatinina i mokraćne kiseline.

Sve analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka).

5.4.4. Histološka analiza

Nakon žrtvovanja jedinki, detaljne obdukcije i makroskopske opservacije uzeti su sledeći organi za histološku analizu: aorta, jetra i pankreas. Uzorci tkiva su fiksirani u Bouin-ovom fiksativu na 4°C tokom 24h. Poslefiksacije 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 bojeni 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).

5.4.5. *Ex vivo* ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta rtanjskog čaja nakon primene toksične doze paracetamola

Za ispitivanje uticaja ekstrakta rtanjskog čaja na enzime oksidativnog stresa, biohemijske parametre u serumu pacova, kao i patohistološke promene u jetri pacova izazvane primenom toksične doze paracetamola, životinje su metodom slučajnog izbora podeljene u sledeće grupe:

1. Kontrola (**K**), koja je tokom 6 dana *per os*, pomoću gastrične sonde, pretretirana fiziološkim rastvorom, 1 ml/kg.
2. Eksperimentalna (**P**), pretretirana tokom 6 dana fiziološkim rastvorom, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, tretirana gastričnom sondom paracetamolom, *per os*, u dozi od 600 mg/kg telesne mase (toksična doza).
3. Eksperimentalna (**R**), pretretirana tokom 6 dana ekstraktom rtanjskog čaja, 500 mg/kg telesne mase, *per os*.
4. Eksperimentalna (**P+R**), pretretirana tokom 6 dana ekstraktom rtanjskog čaja, 500 mg/kg, *per os*, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, tretirana gastričnom sondom paracetamolom, *per os*, u dozi od 600 mg/kg telesne mase (toksična doza).

U serumu laboratorijskih životinja je određivana koncentracija jetrenih enzima: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), gamaglutamil transferaze (GGT), direktnog (konjugovanog) bilirubina i ukupnog bilirubina u cilju praćenja funkcije jetre, a određivana je i koncentracija uree, kreatinina i mokraćne kiseline kao pokazatelja bubrežne funkcije. Sve analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka). Iz krvi eksperimentalnih životinja određen je redukovani glutation, parameter oksidativnog stresa.

Uzorci tkiva jetre životinja su homogenizovani na ledu pomoću *Potter-Elvehjem* homogenizatora (*Braun*), tri puta po deset sekundi, uz prethodno usitnjavanje tkiva hirurškim makazama u cilju olakšane homogenizacije. Homogenat jetre je pripreman u TRIS-KCl puferu, pH=7,4 (0,05 M TRIS : 1,15 M KCl = 1:1) u odnosu 1:4 (jedan deo jetre : četiri dela pufera). Dobijeni homogenat je držan u ultrazvučnom kupatilu 2 min, potom centrifugiran tokom 20 min na 3600 obrtaja/min na 4 °C, nakon čega su se izdvojile dve frakcije:

1. Grubi homogenat
2. Supernatant

Do momenta ispitivanja, homogenati su čuvani na temperaturi od -20 °C.

Određivanje parametara oksidativnog stresa u homogenatu tkiva vršeno je spektrofotometrom, Agilent 8453 UV/Vis (Santa Klara, SAD). U homogenatu tkiva jetre merena je aktivnost sledećih enzima:

- lipidne peroksidacije,
- katalaze (CAT),
- glutation reduktaze (GR),
- superoksid dismutaze (SOD),

Pre ispitivanja navedenih parametara bilo je neophodno odrediti koncentraciju proteina u uzorcima.

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.

5.4.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina u grubom homogenatu tkiva i citosolu

Princip: 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.

Izvođenje analize: 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 standard NaN₃ (6g/dl). Reakciona smeša je dobro pomešana i nakon 15 min merila se apsorbance standarda (AS) i uzorka (AU), normalizovana u odnosu na slepu probu.

Reakciona smeša:

	Slepa proba	Uzorak	Standard
Destilovana voda	0,01 mL	/	/
Uzorak	/	0,01 mL	/
Standard	/	/	0,01 mL
Reagens 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Promešati. Nakon 15 minuta meriti apsorbancije uzorka (A_s) i standarda (A_{st}) prema slepoj probi. Boja je stabilna 60 minuta.

Izračunavanje:

$$(A_s/A_{st}) \times 6 = \text{g ukupnih proteina/dL uzorka}$$

Pri čemu je:

A_s – srednja vrednost apsorbancije uzorka

A_{st} – srednja vrednost apsorbancije standarda

5.4.5.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Princip: Metoda se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malondialdehidom (MDA) koji nastaje tokom peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u sastavu bioloških membrana, pod dejstvom reaktivnih kiseoničnih vrsta. Pokazatelj lipidne peroksidacije je koncentracija MDA, te se koristi u evaluaciji oksidativnog stresa. U uslovima visoke temperature i u kiseljoj 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 (70).

Izvođenje analize: 300 μ L uzorka grubog homogenata jetre je dodato u 1 mL smeše TBA (0,375% w/v) i trihlorsirćetne kiseline (TCA) (15% w/v) u 0,25M HCl, izmeša na vorteksu i zagrevano na vodenom kupatilu 15 minuta na 90 °C. Nakon hlađenja na ledu 5 min, epruvete su centrifugirane na 10.000 rpm u toku 10 minuta. Koncentracija MDA je određena iz supernatanta spektrofotometrijski na 535 nm uz TCA-TBA-HCl reagens sa destilovanom vodom kao slepom probom.

Izračunavanje rezultata:

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

Pri čemu je:

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbanace uzorka u minuti

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbanace slepe probe

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL]

V_{uz} - zapremina uzorka [mL]

C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

Molarni apsorpcioni koeficijent za konjugat MDA-TBA iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Koncentracija MDA je izražena u nmol/mg proteina.

5.4.5.3. Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT)

Princip: Vodonik peroksid pokazuje maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost katalaze se određuje praćenjem razlaganja H_2O_2 na datoj talasnoj dužini, pri čemu je pad apsorbanacije proporcionalan aktivnosti katalaze (71).

Reagensi:

- ❖ 0.05M fosfatni pufer pH=7.0
- ❖ 30% H_2O_2

Pufer se podesi sa H_2O_2 tako da apsorbanacija slepe probe na 240 nm bude 0.525-0.550.

Reakciona smeša:

U 1.5 mL podešenog rastvora H_2O_2 u fosfatnom puferu doda se uzorak (10-20 μL). Reakcija započinje dodavanjem uzorka. Pad apsorbanacije se prati na 240 nm, u toku tri minuta na temperaturi od 25°C.

Izračunavanje:

Aktivnost CAT se izražava u jedinicama aktivnosti na mg proteina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) * 1000 * V_{rs}}{43.6 * C_{pr} * V_{uz}}$$

pri čemu je:

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL]

V_{uz} - zapremina uzorka [mL]

C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL].

Specifična aktivnost CAT je izražena u jedinicama aktivnosti enzima na mg proteina u uzorku.

5.4.5.4. Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Princip: Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovane forme glutationa (GSSG) u redukovanu formu (GSH) (72).

Izvođenje analize: U kvarcnu spektrofotometrijsku kivetu pipetirano je 0.2 mL fosfatnog pufera (0,5 M, pH=7,4), 0,3 mL GSSG (2 mM), 0,3 mL uzorka i vode do 1 mL. Reakcija je počela dodavanjem 0,03 mL NADPH (0,1 mM). Promena apsorbance na 340 nm je praćena tokom 3 minuta na optimalnoj temperaturi reakcije (37 °C).

Izračunavanje rezultata:

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) * 1000 * V_{rs}}{6.22 * C_{pr} * V_{uz}} \text{ (nmol NADPH/min/mg proteina)}$$

pri čemu je:

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [mL]

V_{uz} - zapremina uzorka [mL]

C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/mL].

Molarni apsorpcioni koeficijent za NADP na 340 nm iznosi $6,22 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Specifična jedinica aktivnosti je definisana kao broj nmol NADPH oksidovanih u minuti po mg proteina.

5.4.5.5. Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Princip: U reakciji ksantina sa ksantin oksidazom stvara se superoksid anjon radikal, koji redukuje oksidovani citohrom c. Brzina redukcije se prati spektrofotometrijski na 550 nm. SOD, katališući reakciju dismutacije superoksid anjon radikala smanjuje brzinu redukcije citohroma c. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD. Aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije citohroma c za 50% (pri promeni apsorbance od 0,025/min) je definisana kao jedinica aktivnosti ovog enzima (73).

Izvođenje analize: Za izvođenje analize pripremljeni su rastvor I (50 μ L 100 mmol EDTA, 50 μ L 30 mmol NaN₃, 500 μ L 5mM ksantina, 200 μ L 5 mmol citohroma C, dopunjeno do 50 mL 0,1 M fosfatnim puferom pH=7,8) i rastvor II (400 μ L 1 mmol EDTA, 3595 μ L 0,1 M fosfatni pufer pH=7,8, 20 μ L ksantin oksidaze (50U/ 2mL). U spektrofotometrijsku kivetu je pipetirano 650 μ L rastvora I, 200 μ L uzorka (suspenzije ćelija) i 50 μ L rastvora II. Dodatkom rastvora II počela je reakcija, a apsorbance se pratila tokom 3 min na talasnoj dužini 550 nm.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{specifična aktivnost SOD} = \frac{\Delta A_{sp} * 50 * 1000}{\Delta A_{uz} * 100 * C_{pr}}$$

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]

Specifična aktivnost SOD je izražena u jedinicama aktivnosti enzima na mg proteina u uzorku.

5.4.5.6. Histološka obrada tkiva nakon toksične doza paracetamola

Isečki tkiva jetre dimenzija 5x5cm desnog medijalnog lobusa fiksirani su u 10% neutralnom puferisanom formalinu tokom 24h pri temperaturi od 4°C. Posle fiksacije, tkivo je dehidrirano u rastućim koncentracijama izopropanola i ukalupljeno u parafin (Histowax, Belgija). Uz pomoć tkivnog bioptera iz ukalupljenog tkiva jetre od svake jedinice uzeta su po 2 cilindrična uzorka, prečnika 2mm koji su preneti u specijalno pripremljeni parafinski blok sa 30 rupa. Na taj način je formiran *tissue microarray* blok (TMA) koji je sadržao uzorke od ukupno 15 jedinica (po dva uzorka od svake). Svaki od TMA blokova sečen je na rotacionom mikroskopu (Leica, Nemačka) pri debljini od 5 µm. Kod svakog TMA bloka, prvi presek je bojen PAS (engl. Periodic acid–Schiff) metodom, a sledeća dva preseka su imunohistohemijski bojena. Imunohistohemijsko bojenje uključilo je primarna antitela: zečije anti-Iba1 (Abcam, UK) u razblaženju od 1:500 i zečije anti-cytochrome P450 2E1 protein (CYP2E1) u razblaženju 1:100 (Cusabio, College Park, MD, USA). Vizualizacija je izvršena UltraVision LP detekcionim sistemom korišćenjem HRP Polymer & DAB hromogena (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Kod svih antetela izvršena je *retrival* reakcija koja je obuhvatala pretretman citratnim puferom (na pH 6.0) u mikrostalasnoj peći na 850W tokom 20 minuta. Dužina aplikacije antitela iznosila je 30 minuta na sobnoj temperaturi. Kontrastiranje je izvršeno Majerovim hematoksilinom i potom su pločice montirane odgovarajućim medijumom (Bio-Optica, Italija). Pripremljeni slajdovi analizirani su na profesionalnom biološkom mikroskopu Leica DMLB, (Leica, Nemačka) pri uveličanju od 200 i 400x i vidna polja su fotografisana mikroskopskom kamerom visoke rezolucije Leica MC 190 HD (Leica, Nemačka). Fotografije su obrađene i kompozicije su formirane u CS6 verziji programa AdobePhotoShop (Adobe, SAD).

5.5. Statistička obrada podataka

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 predstavljena standardnom devijacijom (SD). Studentovim t-testom za male nezavisne uzorke analizirana je statistička značajnost razlika između ispitivanih grupa, odnosno analizom varijanse sa jednim promenljivim faktorom (ANOVA). Post hoc testiranje nakon ANOVA-e urađeno je

Tukey-evim metodom.

Sve statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05, odnosno statistički značajne su smatrane vrednosti $p < 0,05$.

Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

5.6. *In vitro* određivanje antioksidativne aktivnosti

5.6.1. Priprema ekstrakata rtanjskog čaja

Suvi ekstrakt rtanjskog čaja razblažen je 20 puta, tj odmereno je 0,2 g u 4 ml i ostavljeno da stoji 12 h na klackalici u cilju mešanja i rastvaranja (tzv. balerini). Nakon toga je izvršeno centrifugiranje na 3000 o/min, tokom 5 minuta. Supernatant je uzet kao ekstrakt razblažen 20 puta koji se koristio u svim testovima. Rezultati su procenjeni u odnosu na suvi ekstrakt rtanjaskog čaja.

5.6.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC- *Total Phenolic Content*)

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola korišćena je metoda po Folin-Ciocalteu (FC) (74). Metod je zasnovan na oksidaciji molekula koji sadrže fenolne funkcionalne grupe. Tanini, flavonoidi i druge klase fenolnih jedinjenja koji sadrže fenolne grupe i imaju sposobnost da redukuju alkalni rastvor fosfomolibdenske kiseline iz Folin-Ciocalteu reagensa učestvuju u ovoj reakciji.

Reagensi:

0,1 mol/l Folin-Ciocalteu reagens

7,5 % rastvor Na_2CO_3

1mg/ml galne kiseline rastvorene u destilovanoj vodi

Radne probe:

25 μl ekstrakta (za standard se doda 25 μl standardnih rastvora galne kiseline u rasponu koncentracija od 50 do 500 mg/ml)

125 μl FC reagensa

3 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi

zatim se doda 25 μl rastvora 7,5% Na_2CO_3 , inkubira 2h na sobnoj temperaturi i čita apsorbanca na $\lambda=760$ nm.

Slepa proba sadrži sve osim uzorka, a korekcija destilovanu vodu umesto FC reagensa i rastvora Na_2CO_3 .

Sadržaj fenola je izračunat na osnovu kalibracione krive dobijene merenjem apsorbaneci standardnih rastvora galne kiseline. Sadržaj ukupnih fenola izražava se u broju mg ekvivalenta galne kiseline po gramu ekstrakta rtanjskog čaja.

5.6.3. 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 (75). Naročito je značajan aluminijumov kompleks, jer se on vezuje za sve tipove flavonoida, pa se sumarni apsorpcioni maksimum ukupnih flavonoida lako određuje.

Reagensi:

1 mol/l NaCH_3COO

0,75 mol/l (AlCl_3)

MeOH- metanol

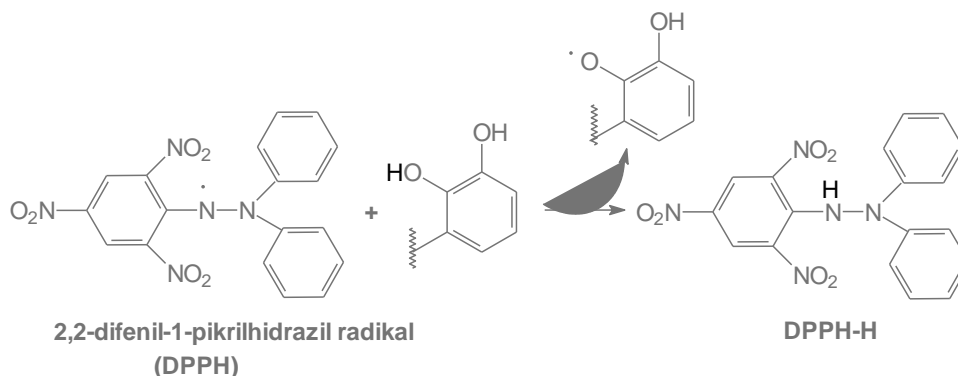
Radna proba	Korekcija	Slepa proba
30 μl ekstrakta	30 μl ekstrakta	0 μl ekstrakta
90 μl MeOH	90 μl MeOH	90 μl MeOH
6 μl NaCH_3COO	6 μl NaCH_3COO	6 μl NaCH_3COO
6 μl AlCl_3	0 μl AlCl_3	6 μl AlCl_3
150 μl dest. vode	156 μl dest. vode	180 μl dest. vode

Rastvori su se inkubirali 30 minuta. Apsorbanca je merena na 415 nm. Standardna kriva je konstruisana kao zavisnost apsorbance i serije standardnih rastvora kvercetina.

5.6.4. Određivanje neutralizacije DPPH• radikala (*Radical Scavenger Capacity- RSC*)

Antioksidativna aktivnost svih ekstrakata određivana je spektrofotometrijskom metodom (76). Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azot centriranog DPPH• radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazila) u redukovanu, žuto obojenu formu DPPH-H.

DPPH• radikal je relativno stabilan radikal čiji je rastvor u metanolu ljubičaste boje sa maksimumom apsorpcije na $\lambda_{\max} = 515\text{nm}$. U prisustvu potencijalnih donora elektrona ili H atoma dolazi do neutralizacije radikala i prelaska u neutralni oblik, što je praćeno promenom apsorbance i iščezavanjem ljubičaste boje rastvora.



Slika 6. Neutralizacija DPPH radikala fenolnim jedinjenjima

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.

Radne probe:

-190 μl DPPH radikala (rastvor 0,4 M u 96% etanolu, koji se zatim razblaži četiri puta u metanolu kako bi se dobila apsorbanca na 515 nm od 0,9)

- 100 µl metanola
- 10 µl ekstrakta čaja

Korekcija:

- 290 µl metanola
- 10 µl ekstrakta čaja

Svi uzorci su posle snažnog mešanja u trajanju od 10 sekundi, ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi. Od očitanih apsorbanci oduzeta je korekcija za svaki ekstrakt rtanjskog čaja.

Procenat inhibicije DPPH radikala ekstrakata rtanjskog čaja određen je po formuli:

$$(1 - ((A_{rp} - A_{kor}) / A_{kontrola})) * 100$$

A_{rp} – apsorbancia radne proba

A_{kor} - apsorbancia korekcije

$A_{kontrola}$ – apsorbancia kontrole koja sadrži samo DPPH (200 µl) i metanol (100 µl)

5.6.5. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO• radikala

Određivanje kapaciteta ekstrakta da neutrališu NO• radikal, zasniva se na spektrofotometrijskom merenju koncentracije generisanih nitritnih jona (77). U ovu svrhu korišćen je vodeni rastvor natrijum-nitroprusida (eng. sodium-nitroprusite, SNP) koji predstavlja izvor NO• radikala pri fiziološkom pH. Nastali NO• reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone, čija koncentracija se određuje na bazi Griess-Illosvory-jeve reakcije.

Princip spektrofotometrijskog određivanja koncentracije nitritnih jona se zasniva na praćenju nastajanja purpurno-ružičastog diazo kompleksa koji je produkt reakcije NO₂ - i Griees-ovog reagensa na sobnoj temperaturi.

Reagensi:

- 5 mM rastvor natrijum -nitroprusida (SNP): rastvara se 1.49 g SNP u 100 ml 0.1M fosfatnog pufera (pH=4).

- Griess-ov reagens nastaje mešanjem 0.77 mM N-(1-naftil)-etilendiamina dihlorida (NEDA) rastvorenog u destilovanoj vodi sa 1% sulfanilamidom (SA) rastvorenog u 5% fosfatnoj kiselini.

Radne probe:

- 10 µl odgovarajućeg ekstrakta čaja
- 60 µl 5 mM SNP (natrijum-nitro prusida)
- 50 µl 0.1 M fosfornog pufera pH=4.

Korekcije:

- 10 µl odgovarajućeg ekstrakta čaja
- 230 µl pufera

Tako postavljene radne probe se inkubiraju na sobnoj temperaturi 100 min na svetlosti, zatim im se posle mešanja od 10 sekundi doda:

- 120 µl Griessovog reagensa

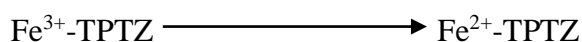
Apsorbance formirane hromofore se čitaju na 577 nm. Od izmerenih vrednosti uzoraka se oduzmu korekcije koje predstavljaju auto apsorpciju ekstrakta na datoj talasnoj dužini. Procenat inhibicije azot(II)-oksida (RSCNO•) ispitanih ekstrakta računat je na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{RSCNO}\bullet (\%) = (1 - A/A_{\text{kon}}) \times 100\%,$$

gde je A_{kon} apsorbanca kontrolne probe koja za razliku od radnih proba nema dodat ekstrakt.

5.6.6. Određivanje redukcionе sposobnosti ekstrakta FRAP testom (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

FRAP test je zasnovan na nespecifičnoj reakciji da svaki sistem koji ima manje pozitivan redoks potencijal od sistema Fe^{3+} -TPTZ/ Fe^{2+} -TPTZ će voditi ka redukciji Fe^{3+} -TPTZ (78).



Tripyridyltriazine

blue (593nm)

Redukcijom koordinaciono jedinjenje Fe(III) daje tamno plavo intenzivno obojenje sa apsorpcionim maksimumom na 593 nm.

Reagensi:

FRAP reagens: Acetatni pufer : TPTZ : FeCl₃ x H₂O=10 : 1 :1

- Acetatni pufer, pH=3.6, 0.31g CH₃COONa i 1.6 ml cc CH₃COOH rastvoreno je u 100ml destilovane vode
- FeCl₃ x 6H₂O, 20mM dobijen rastvaranjem 0.0541g FeCl₃ x 6H₂O u 10.0ml destilovane vode
- TPTZ rastvor, 10mM u 40mM HCl dobijen rastvaranjem 0.0312g TPTZ u 10ml 40mM HCl
- HCl, 40 mM dobijena razblaživanjem 0.086 ml ccHCl u 25ml destilovane vode
- 1mM FeSO₄ x 7 H₂O dobija se razblazivanjem 0.0278 g u 100 ml destilovane vode.

Od njega se razblaživanjem pravi 100 µM koji služi kao standard za određivanje FRAP jedinica.

Za svaki uzorak pripremljene su radne probe na prema navedenom redosledu (u tri ponavljanja) i slepa proba.

Radne probe:

- 290 µl FRAP reagensa
- 10 µl ekstrakta koncentrovanog ekstrakta (100 µl duplo razblazenog ekstrakta)

Slepa proba:

- 290 µl FRAP reagensa
- 10 µl odgovarajućeg rastvarača

Standard:

- 290 µl FRAP reagensa
- 10 µl 0,1 mM FeSO₄ x 7H₂O

Nakon 6 minuta inkubacije izmerene su apsorbance na $\lambda=593$ nm. Frap jedinica odgovara onom redukcionom kapacitetu ekstrakta koji je sposoban da redukuje 0,1 mM Fe^{3+} .

n (FRAP jedinica) = Arp/AstxR

Arp – apsorbance radne probe

Ast- apsorbance standarda

R – razblaženje

5.6.7. Određivanje sposobnosti neutralizacije $\bullet\text{OH}$ radikala

Kapacitet antioksidanasa da vrše neutralizaciju hidroksilnog radikala određuje se praćenjem reakcije degradacije 2-dezoksi-D-riboze u prisustvu slobodnih OH radikala generisanih u sistemu $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (79).



U navedenoj reakciji (Fenton-ova reakcija) nastaje OH^\bullet radikal koji oduzima H atom molekulu 2-dezoksi-D-riboze i pokreće razgradnju ovog molekula do krajnjih produkata. Jedan od krajnjih produkata ja malondialdehid (MDA) čija se koncentracija određuje spektrofotometrijski uz pomoć tiobarbiturnog testa (TBA test) na 532 nm.

Reagensi:

0,015% rastvor H_2O_2

10 mM rastvor FeSO_4

0.05 M rastvor 2-dezoksi-D-riboze

TBA reagens (5,2 ml HClO_4 , 1,5 g tiobarbiturne kiseline i 60 g trihlorsirćetne kiseline rastvoreno u 400 ml vode, pravi se na ledu, a zasićen rastvor se profiltrira)

0,1 M EDTA

fosfatni pufer pH=7,4

Radne probe	Kontrola
100 µl 2-dezoksi-D-riboze	100 µl 2-dezoksi-D-riboze
10 µl ekstrakta	10 µl rastvarača
100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂
100 µl FeSO ₄	100 µl FeSO ₄

Radne probe su inkubirane 60 minuta na 37°C. Zatim je dodato po 0,2 ml EDTA i 2 ml TBA reagensa. Uzorci su promućkani 10 sekundi, a zatim su inkubirani 10 minuta na 100°C. Nakon hlađenja apsorbancija je merena na $\lambda=532$ nm. Intenzitet neutralizacije OH radikala izračunat je po formuli:

$$\%RSC = (A_{kon} - A_{rp}) / A_{kon} * 100$$

A_{kon}- apsorbancija kontrole

A_{rp} – apsorbancija radne probe

5.6.8. Analiza glavnih komponenta (PCA- *Principal component analysis*)

Analiza glavnih komponenta je izvršena korišćenjem R softverskog paketa (verzija 4.1.1, R Core Team, 2021), i RStudio (version 2021.09.1 Build 372), sa ciljem da se izvrši karakterizacija i vizualizacija obrazaca, izmerenog antioksidativnog kapaciteta u različitim rastvaračima (destilovana voda, metanol 50%, metanol 90%, etanol 50% i etanol 90%) pomoću prva dva vektora glavne komponente (PC). Pre analize varijable su centrirane i skalirane na srednju vrednost 0 i standardnu devijaciju od 1.

5.6.9. Statistička obrada podataka

Podaci dobijeni *in vitro* ispitivanjem antioksidativne aktivnosti su izraženi kao srednja vrednost tri nezavisna merenja ($n=3$) \pm standardna devijacija (SD). Statistička značajnost razlika određenih grupa je ispitivana korišćenjem jednosmerne ANOVA analize varijanse na nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Višestruka poređenja između posmatranih parametara su izvedena

korišćenjem Fisher LSD post hoc testa. Različita slova na grafikonu ukazuju na značajne razlike pri $p \leq 0,05$.

6. REZULTATI

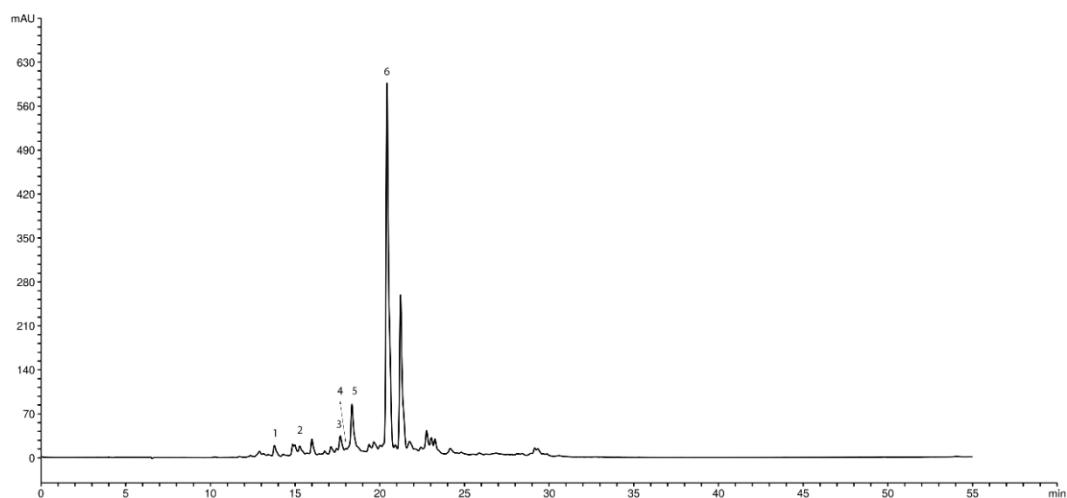
6.1. Ispitivanje hemijskog sastava rtanjskog čaja

Ispitivani ekstrakt rtanjskog čaja karakteriše visok sadržaj fenolnih jedinjenja i to rozmarinske kiseline, hlorogene kiseline, p-kumarinske i kofeinske kiseline. Takođe su prisutni hiperosid i rutin. Epikatehin je pronađen u tragovima. Rezultati su ispitivnja kvalitativnog i kvantitativnog sastava rtanjskog čaja HPLC metodom prikazani su u tabeli 2 i izraženi kao µg/mg suve mase. Statistička obrada podataka rađena je u programu *Origin*.

Tabela 2. Kvalitativni i kvantitativni sastav ekstrakta rtanjskog čaja.

Jedinjenje	Sadržaj (µg/mg dw)	Retenciona vremena
Rozmarinska kiselina	52.1 ± 1.04	20,427
Hiperozid	7.35 ± 0.16	18,356
Rutin	4.97 ± 0.09	17,767
Hlorogenska kiselina	2.13 ± 0.03	13,781
p-kumarinska kiselina	1.12 ± 0.01	17,986
Kafena kiselina	0.49 ± 0.01	15,278
Epikatehin	tr.	15,80
Katehin	n.d.	-
Ferulna kiselina	n.d.	-
Vanilinska kiselina	n.d.	-
protokatehinska kiselina	n.d.	-
p-hidroksibenzojeva kiselina	n.d.	-

tr. – u tragovima; n.d – nije detektovan



Slika 7. Hromatogram ekstrakta rtanjskog čaja (1) hlorogenska kiselina, (2) kafena kiselina, (3) rutin, (4) p-kumarinska kiselina, (5) hiperozid, (6) rozmarinska kiselina.

6.2. *In vivo* ispitivanja dijabetičnih i životinja sa normalnim vrednostima glikemije

6.2.1. Vrednost telesne mase

Vrednosti telesne mase životinja su prikazane u **tabeli 3**, na početku oglada, 72 sata nakon primene streptozotocina, 7., 14., 21. i 28. dana oglada, kod kontrolne grupe životinja, i dijabetičnih životinja kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 3. Vrednosti telesne mase (g, $\bar{x} \pm SD$) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Telesna masa g, $\bar{x} \pm SD$	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	244,00±10,24	233,17±7,70 [*] x	233,33±13,59 x	235,83±11,09 [*] x	222,33±9,69 [*]
T7	229,33±13,11	248,83±9,09 [*] x	241,33±19,13	248,83±11,51 [*] x	232,00±11,95
T14	261,17±18,37	261,00±11,93	259,50±28,37	274,33±19,24 ^x	250,83±19,47
T21	272,83±19,21	264,50±12,00	264,83±33,13	279,50±17,55 ^x	254,67±20,81
T28	282,67±18,67 x	266,00±13,86	267,50±34,48	281,00±16,61 ^x	254,00±20,48

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

^{*}p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na MetRtčDiab.

Na početku oglada telesna masa je bila značajno niža u grupi dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Grupe dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor i ekstrakt rtanjskog čaja, su imale statistički značajno više vrednosti telesne mase u odnosu na životinje koje su tretirane kombinacijom metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Sedmog dana oglada, vrednosti telesne mase su bile statistički značajno više kod grupa dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor i ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu i grupu dijabetičnih životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Četrnaestog i dvadeset prvog dana oglada, vrednosti telesne mase su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu

na grupu dijabetičnih životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Dvadesetomog dana ogleada, vrednosti telesne mase su bile statistički značajno više u kontrolnoj grupi životinja i grupi dijabetičnih životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

6.2.2. Masa jetre

Vrednosti mase jetre su prikazane u **tabeli 4**, na kraju ogleada, nakon žrtvovanja, kod kontrolne grupe životinja, i dijabetičnih životinja kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 4. Vrednosti mase jetre (g, $\bar{x} \pm SD$) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Masa jetre	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
g, $\bar{x} \pm SD$	9,84±1,23	11,20±0,44 *	11,58±1,09 *	11,72±0,18 *, x	11,42±0,70 *

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab.

U grupi dijabetičnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, metforminom, ekstraktom rtanjskog čaja, kombinacijom metformina i ekstrakta rtanjskog čaja masa jetre je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu.

Grupa tretirana ekstraktom rtanjskog čaja ima statistički značajno veću masu jetre u odnosu na grupu dijabetičnih životinja tretiranu fiziološkim rastvorom.

6.2.3. Vrednost glukoze u krvi

Vrednosti glikemije su prikazane u *tabeli 5*, na početku ogleada, 72 sata nakon primene streptozotocina, 7., 14., 21. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja, i dijabetičnih životinja kod kojih je dijabetes indukovan streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 5. Vrednosti glikemije u krvi ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Glikemija (mmol/L)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	5,22±0,51	23,13±1,97*	22,50±1,41*	22,27±2,88*	21,62±1,58*
T7	4,68±0,39	28,18±1,09*	19,17±2,03 ^{*,x}	19,07±1,35 ^{*,x}	18,62±1,05 ^{*,x}
T14	4,37±0,36	27,60±1,38 ^{*,y,z}	23,42±2,67*	23,52±2,84*	25,40±0,65*
T21	4,65±0,44	26,98±1,73 ^{*,y,z}	23,93±1,84*	23,42±2,02*	26,07±1,84 ^{*,y,z}
T28	4,37±0,36	27,83±1,42 ^{*,y,z}	22,22±3,39*	20,20±2,27*	25,48±1,11 ^{*,z}

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab,

^yp<0,05 u odnosu na MetDiab,

^zp<0,05 u odnosu na RtčDiab.

Na početku ogleada, 72. sata nakon primene streptozotocina, vrednosti glikemije su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju ekstrakta rtanjskog čaja i metformina, u odnosu na kontrolnu grupu.

Sedmog dana ogleada, vrednosti glikemije su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju ekstrakta rtanjskog čaja i metformina, u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa

životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor je pokazala statistički značajno više vrednosti glikemije u donosu na grupu koja je dobijala metformin, grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja i grupu koja je dobijala metformin i ekstrakt rtanjskog čaja u kombinaciji.

Nakon 14. dana, u grupama dijabetičnih životinja tretiranih metforminom, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom metformina i ekstrakta čaja, koncentracija glukoze je statistički značajno niža u odnosu na dijabetične životinje tretirane fiziološkim rastvorom. Grupa dijabetičnih životinja koja je primala fiziološki rastvor je pokazala statistički značajno više vrednosti glikemije u donosu na grupu koja je dobijala metformin i grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Dvadeset prvog dana ogleda, vrednosti glikemije su bile statistički značajno više u grupama dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja, kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa dijabetičnih životinja koja je primala fiziološki rastvor i grupa koja je dobijala kombinaciju ekstrakta rtanjskog čaja i metformina je pokazala statistički značajno više vrednosti glikemije u donosu na grupu koja je dobijala metformin i grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Na kraju ogleda, 28. dana, vrednosti glikemije su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja, kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja. U grupi životinja koja je dobijala fiziološki rastvor zabeležene su više vrednosti glukoze u odnosu na grupu koja je dobijala metformin i grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja. Vrednosti glikemije u grupi koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, su statistički značajno više u odnosu na grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

6.2.4. Lipidni status

Vrednosti ukupnog holesterola su prikazane u *tabeli 6*, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovano streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 6. Vrednosti ukupnog holesterola u serumu ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Ukupni holesterol (mmol/L)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	2,19±0,36	2,27±0,10	2,15±0,15	2,16±0,20	2,14±0,20
T14	2,19±0,13 ^x	1,86±0,07	2,05±0,28	2,06±0,18	2,19±0,12 ^x
T28	2,29±0,14	2,62±0,03 [*]	2,59±0,36	2,68±0,27	2,47±0,23

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab.

Na početku oglada, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima ukupnog holesterola, između ispitivanih grupa životinja.

Četrnaestog dana oglada vrednosti ukupnog holesterola u serumu su bile statistički značajno više u kontrolnoj grupi i grupi dijabetičnih životinja koja je dobijala kombinaciju ekstrakta rtanjskog čaja i metformina u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koja je dobijala fiziološki rastvor.

Nakon 28. dana oglada, vrednosti ukupnog holesterola su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Vrednosti triglicerida su prikazane u **tabeli 7**, na početku, 14. i 28. dana oglada, kod kontrolne grupe životinja, i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovano streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 7. Vrednosti triglicerida u serumu (mmol/L), $\bar{x} \pm SD$, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

TG (mmol/L)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	0,71±0,14	0,79±0,14	0,83±0,10	0,83±0,20	0,73±0,14
T14	0,58±0,24	0,70±0,22 ^x	0,59±0,30	0,30±0,11	0,41±0,15
T28	0,36±0,06	0,77±0,07 ^{*, x}	0,75±0,12 ^{*, x}	0,61±0,09 [*]	0,69±0,04 [*]

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na RtčDiab.

Na početku ogleada, 72 sata nakon indukcije dijabetesa, nije zabeležena statistički značajna razlika u vrednostima triglicerida između ispitivanih grupa životinja.

Četrnaestog dana ogleada, vrednosti triglicerida u dijabetičnoj grupi koja je dobijala fiziološki rastvor su bile više u odnosu na sve ispitivane grupe, ali je statistički značaj dokazan samo u odnosu na grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Dvadeset osmog dana ogleada, vrednosti triglicerida su bile statistički značajno više u grupama dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Takođe grupe dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor i metformin imale su više vrednosti triglicerida u odnosu na grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Vrednosti LDL holesterola u serumu su prikazane u **tabeli 8**, na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja, i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovano streptozotocinom, a koja je dobijala peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 8. Vrednosti LDL holesterola u serumu ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

LDL (mmol/l)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	0,60±0,17	0,58±0,07	0,52±0,11	0,40±0,18*	0,53±0,09
T14	0,53±0,08	0,31±0,10	0,41±0,17	0,71±0,30*	0,57±0,32
T28	0,67±0,09	0,66±0,02	0,60±0,10	0,61±0,15	0,55±0,15

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS.

Na početku ogleda, 72 sata nakon indukcije dijabetesa, vrednosti LDL holesterola su bile statistički više u kontrolnoj grupi životinja u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana ogleda, vrednosti LDL holesterola su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor.

Nakon 28. dana ogleda, nisu zabeležene statistički značajne razlike u vrednostima triglicerida između ispitivanih grupa životinja.

Vrednosti HDL holesterola u serumu, su prikazane u **tabeli 9**, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja, i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovano streptozotocinom, a koja je dobijala peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 9. Vrednosti HDL holesterola u serumu, ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

HDL (mmol/L)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	1,32±0,17	1,33±0,07	1,26±0,15	1,38±0,15	1,27±0,14
T14	1,36±0,06	1,23±0,06	1,60±0,31 ^x	1,22±0,34	1,44±0,31
T28	1,45±0,11	1,61±0,05	1,65±0,24	1,79±0,20 [*]	1,61±0,18

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

^{*}p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na RtčDiab.

Na početku ogleda, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, nije zabeležena razlika u vrednostima HDL holesterola između ispitivanih grupa.

Četrnaestog dana ogleda, vrednosti HDL holesterola su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koje su dobijale metformin u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja.

Na kraju ogleda, vrednosti HDL holesterola su bile statistički značajno više u grupi životinja koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Vrednosti non HDL holesterola u serumu su prikazane u **tabeli 10**, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja, i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koja je dobijala peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 10. Vrednosti non HDL holesterola u serumu ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

non HDL (mmol/L)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	0,88±0,24	0,94±0,04	0,89±0,09	0,78±0,13 ^x	0,87±0,15
T14	0,83±0,12	0,63±0,06	0,55±0,24	0,85±0,29	0,75±0,30
T28	0,84±0,07	1,01±0,02 [*]	0,94±0,12	0,89±0,14	0,86±0,14

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

^{*}p<0,05 u odnosu na ConS.

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab.

Na početku ogleda, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, vrednosti non HDL holesterola su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koja je dobijala fiziološki rastvor u odnosu sa grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana ogleda nisu zabeležene značajne razlike u vrednostima non HDL holesterola među ispitivanim grupama.

Vrednosti non HDL holesterola, 28. dana ogleda, su statistički značajno veće u grupi dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor u odnosu na kontrolnu grupu životinja čaja. Grupa dijabetičnih životinja, koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja ima niže vrednosti non HDL holesterola u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor, ali ova razlika nema statistički značaj.

Vrednosti indeksa ateroskleroze u serumu su prikazane u **tabeli 11**, na početku, 14. i 28 dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koja je dobijala peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 11. Vrednosti indeksa ateroskleroze u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Indeks ateroskleroze	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	0,46±0,13	0,43±0,05	0,42±0,13	0,30±0,13*	0,43±0,10
T14	0,39±0,06	0,25±0,09	0,26±0,11	0,46±0,12	0,46±0,42
T28	0,47±0,07	0,41±0,05	0,36±0,02	0,34±0,07*	0,35±0,10*

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS.

Na početku ogleda, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, vrednosti indeksa ateroskleroze su bile statistički značajno više u kontrolnoj grupi životinja u odnosu na grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana ogleda nisu zabeležene statistički značajne razlike u vrednostima indeksa ateroskleroze između ispitivanih grupa.

Dvadeset osmog dana ogleda indeks ateroskleroze je bio viši kod kontrolne grupe životinja u odnosu na dijabetične grupe koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

6.2.5. Parametri funkcije jetre

Vrednosti aspartat aminotransferaze (AST) u serumu su prikazane u *tabeli 12*, na početku, 14. i 28 dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 12. Vrednosti aspartat aminotransferaze (AST), ($U/I \pm SD$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

AST (U/I)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	112,20±2,40	238,00±10,20 ^{x, y, z} *	153,00±17,72 [*]	135,40±17,07	128,25±20,10
T14	109,00±13,24	150,50±20,92 [*]	171,50±24,20 [*]	146,17±17,59 [*]	141,20±17,12 [*]
T28	148,00±14,67	223,00±16,91 [*]	218,40±10,40 [*]	195,50±8,09 [*]	201,25±15,74 [*]

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

* $p < 0,05$ u odnosu na ConS,

^x $p < 0,05$ u odnosu na MetDiab,

^y $p < 0,05$ u odnosu na RtčDiab,

^z $p < 0,05$ u odnosu na MetRtčDiab.

Na početku ogleđa, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, grupa dijabetičnih životinja kojoj je davan fiziološki rastvor, imala je statistički značajno više vrednosti aspartat aminotransferaze (AST) u odnosu na kontrolnu grupu i grupe koje su dobijale metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja. Aktivnost AST je bila statistički značajno viša, u grupi dijabetičnih životinja koja je dobijala metformin, u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), 14. dana ogleđa, u serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Dvadeset osmog dana ogleđa, aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), je bila značajno viša u serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, je u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Vrednosti alanin aminotransferaze (ALT) u serumu, su prikazane u **tabeli 13**, na početku, 14. i 28 dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtajskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtajskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 13. Vrednosti alanin aminotransferaze (ALT), (U/I± SD), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtajskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

ALT (U/I)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	48,75±3,60	49,67±6,50	55,33±11,54	47,50±5,21	55,00±9,01
T14	47,00±5,90	63,25±11,55*	82,40±28,29*	59,17±12,75	79,20±16,40*
T28	44,40±2,06	61,83±4,36*	82,17±11,43 ^{*, x, y}	72,33±14,19*	62,80±5,04*

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab.

^yp<0,05 u odnosu na MetRtčDiab.

Na početku ogleda, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, nije zabeležena statistički značajna razlika u vrednostima ALT, u serumu ispitivanih grupa životinja.

Četrnaestog dana, u grupama dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja, alanin aminotransferaza (ALT) pokazuje statistički značajno višu aktivnost u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Dvadeset osmog dana ogleda, aktivnost alanin aminotransferaze (ALT), u serumu životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtajskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja, je bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Grupa dijabetičnih životinja koja je dobijala metformin, imala je značajno

više vrednosti ALT u serumu od ispitivanih grupa koje su dobijale fiziološki rastvor i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti alkalne fosfataze (ALP) u serumu, su prikazane u **tabeli 14**, na početku, 14. i 28 dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 14. Vrednosti alkalne fosfataze (ALP), (U/I± SD), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

ALP (U/I)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	380,40±41,74	968,00±91,13*	922,50±160,02 *	978,00±101,4*	1073,33±92,5*
T14	332,40±33,93	1432,50±275,8 2*, y	1238,25±194,2 6*	1111,00±128,53 *	1267,75±106,11 *
T28	263,44±15,79	471,40±96,43*	744,67±193,77 *, x	668,25±132,92*, x	908,25±38,75*, x, y

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab,

^yp<0,05 u odnosu na RtčDiab.

Na početku ogleda, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, aktivnost alkalne fosfataze (ALP), je bila značajno veća u serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, je u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

Četrnaestog dana, u serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, alkalna fosfataza (ALP) pokazuje aktivnost koja je statistički značajno viša u poređenju sa

kontrolnom grupom životinja. U serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, alkalna fosfataza (ALP) pokazuje statistički značajno višu aktivnost u odnosu na grupu dijabetičnih životinja koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja.

Na kraju ogleada, aktivnost alkalne fosfataze (ALP), u serumu je bila statistički značajno veća u grupama dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtajskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja, je u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Grupe dijabetičnih životinja koje su dobijale metformin, ekstrakt rtajskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja imale su više vrednosti ALP od dijabetične grupe koja je dobijala samo fiziološki rastvor. Pored toga grupa dijabetičnih životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja, imala je značajno više vrednosti ALP u serumu od grupe koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja.

Vrednosti ukupnog bilirubina u serumu, su prikazane u **tabeli 15**, na početku, 14. i 28 dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovan streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtajskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtajskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 15. Vrednosti ukupnog bilirubina ($\mu\text{mol/L}$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtajskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

Ukupni bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	2,08±0,13	2,33±0,07*	2,58±0,17*	2,53±0,16*	2,60±0,26*
T14	1,70±0,38	1,98±0,19	1,92±0,26	2,08±0,23*	1,98±0,24
T28	2,05±0,04	2,52±0,19 ^{*,y}	2,50±0,17 ^{*,y}	2,20±0,17	2,44±0,14*

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab,

^yp<0,05 u odnosu na RtčDiab.

Na početku ogleda, 72 sata nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, vrednosti ukupnog bilirubina su bile značajno više u serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, je u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Četrnaestog dana ogleda vrednosti ukupnog bilirubina su bile značajno više kod grupe koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Nakon 28. dana ogleda došlo je do statistički značajnog povećanja ukupnog bilirubina u serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

U grupama koje su dobijale fiziološki rastvor i metformin zabeležen je značajno viši nivo ukupnog bilirubina u odnosu na grupu životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Vrednosti direktnog bilirubina u serumu, su prikazane u **tabeli 16**, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 16. Vrednosti direktnog bilirubina ($\mu\text{mol/L}$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Direktni bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	0,38±0,15	0,32±0,04	0,38±0,04	0,37±0,05	0,50±0,11 x
T14	0,18±0,10	0,12±0,04	0,50±0,06 ^{*, x, y}	0,37±0,05 ^{*, x}	0,50±0,09 ^{*, x, y}
T28	0,37±0,15	0,60±0,06 [*]	0,46±0,14	0,50±0,13	0,44±0,12

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConDiab,

^yp<0,05 u odnosu na RtčDiab.

Na početku oglada, 72 sata nakon primene streptozotocina, vrednosti direktnog bilirubina su bile statistički značajno više u grupama dijabetičnih životinja koja je dobila kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na grupu dijabetičnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom.

Četrnaestog dana oglada vrednosti direktnog bilirubina su bile značajno više u grupama dijabetičnih životinja koje su dobile metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu. Pored toga grupe koje su dobijale metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor. Grupe koje su dobijale metformin i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja imale su značajno više vrednosti direktnog bilirubina u odnosu na grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Na kraju oglada, 28. dana, koncentracija direktnog bilirubina u serumu dijabetičnih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu.

6.2.6. Parametri bubrežne funkcije

Vrednosti uree u serumu, su prikazane u *tabeli 17*, na početku, 14. i 28. dana oglada, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 17. Vrednosti uree (mmol/L), u serum, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Urea (mmol/L)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	6,65±0,35	9,94±0,75 ^{*, q}	9,10±1,04 ^{*, q}	9,48±0,37 ^{*, q}	7,42±0,67
T14	7,18±0,35	12,68±1,39 [*]	16,27±1,29 ^{*, x, z}	13,02±1,65 [*]	15,03±0,67 ^{*, x, z}
T28	7,57±0,26	11,40±1,15 [*]	11,78±0,79 [*]	11,43±0,29 [*]	14,13±1,55 ^{*, x, y, z}

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

* p<0,05 u odnosu na ConS,

^x p<0,05 u odnosu na ConDiab,

^y p<0,05 u odnosu na MetDiab,

^z p<0,05 u odnosu na RtčDiab,

^q p<0,05 u odnosu na MetRtčDiab.

Na početku ogleada, 72 sata nakon primene streptozotocina, koncentracija uree u serumu, je bila statistički značajno viša u grupama dijabetičnih životinja koje su dobile fiziološki rastvor, metformin i ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Takođe, grupe koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin i ekstrakt rtanjskog čaja, imale su značajno više vrednosti uree u odnosu na grupu koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana ogleada, kod dijabetičnih grupa životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja, koncentracija uree je bila statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, koncentracija uree kod dijabetičnih grupa životinja koje su dobijale metformin i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja bila je značajno viša u odnosu na grupe koje su dobijale fiziološki rastvor i ekstrakt rtanjskog čaja.

Na kraju ogleada, vrednosti uree u serumu su bile statistički značajno više u grupama dijabetičnih grupa životinja koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog

čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja, u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Takođe, grupa dijabetičnih životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja, imala je statistički značajno više vrednosti uree u poređenju sa grupom koja je dobijala fiziološki rastvor, metformin i ekstrakt rtajskog čaja.

Vrednosti kreatinina, u serumu, su prikazane u **tabeli 18**, na početku, 14. i 28. dana ogleđa, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtajskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtajskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 18. Vrednosti kreatinina ($\mu\text{mol/L}$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtajskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	40,40 \pm 1,62	48,33 \pm 2,50*	46,50 \pm 4,04*	44,67 \pm 3,01	45,33 \pm 2,66*
T14	44,50 \pm 0,45	47,00 \pm 2,83	46,17 \pm 5,04	49,50 \pm 4,14	48,00 \pm 3,58
T28	37,20 \pm 1,47	45,17 \pm 2,32 ^{*, x, y}	44,00 \pm 1,90 ^{*, x, y}	34,00 \pm 1,10*	35,83 \pm 1,60

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na RtčDiab,

^yp<0,05 u odnosu na MetRtčDiab.

Na početku ogleđa, 72 sata nakon primene streptozotocina, koncentracija kreatinina u serumu, je bila statistički značajno veća u grupi dijabetičnih životinja koja je dobila fiziološki rastvor, metformin i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Četrnaestog dana ogleđa, nije bilo razlika u koncentracijai kreatinina između ispitivanih grupa.

Na kraju ogleada, kontrolna grupa dijabetičnih životinja i grupa koja je dobijala metformin imale su statistički značajno više vrednosti kreatinina u odnosu na kontrolnu grupu, grupu dijabetičnih životinja koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja i grupu koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja. Takođe, grupa dijabetičnih životinja koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja imala je značajno niže vrednosti kreatinina u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednosti mokraćne kiseline u serumu, prikazane su u *tabeli 19*, na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja i dijabetičnih grupa kod kojih je dijabetes indukovao streptozotocinom, a koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, metformin 100 mg/kg, ekstrakt rtajskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju metformina 100 mg/kg i ekstrakta rtajskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 19. Vrednosti mokraćne kiseline ($\mu\text{mol/L}$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja sa indukovanim dijabetesom koje su dobijale fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtajskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConDiab	MetDiab	RtčDiab	MetRtčDiab
T0	66,00 \pm 1,10	138,50 \pm 11,53 ^{*, x, y, z}	80,25 \pm 8,49	79,50 \pm 5,98	95,83 \pm 28,69 [*]
T14	65,00 \pm 2,45	106,75 \pm 18,54 ^{*, z}	86,50 \pm 19,00	83,67 \pm 11,04	73,50 \pm 15,60
T28	72,00 \pm 15,49	98,80 \pm 8,38 [*]	94,25 \pm 6,46 [*]	91,00 \pm 8,60 [*]	103,17 \pm 13,76 [*]

ConS – kontrolna grupa, ConDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala fiziološki rastvor, MetDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala metformin, RtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala ekstrakt rtajskog čaja, MetRtčDiab – dijabetična grupa životinja koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja.

* $p < 0,05$ u odnosu na ConS,

^x $p < 0,05$ u odnosu na MetDiab,

^y $p < 0,05$ u odnosu na RtčDiab,

^z $p < 0,05$ u odnosu na MetRtčDiab.

Na početku ogleada, 72 sata nakon primene streptozotocina, vrednosti mokraćne kiseline u serumu, su bile statistički značajno više u grupi dijabetičnih životinja koje su dobile kombinaciju metformina i ekstrakta rtajskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu

životinja. Pored toga, grupa dijabetičnih životinja koja je dobijala fiziološki rastvor je imala značajno više vrednosti mokraćne kiseline u odnosu na kontrolnu grupu i grupe koje su dobijale metformin, ekstrakt rtanjskog čaja, kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana ogleada, grupa dijabetičnih grupa životinja koja je dobijale fiziološki rastvor, imala je statistički značajno višu koncentraciju mokraćne kiseline, u odnosu na kontrolnu grupu životinja i grupu koja je dobijala kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Na kraju ogleada, 28. dana, vrednosti mokraćne kiseline u serumu, su bile statistički značajno više u grupama dijabetičnih životinja koje su dobile fiziološki rastvor, metformin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju metformina i ekstrakta rtanjskog čaja u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

6.3. *In vivo* ispitivanja životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima

6.3.1. Vrednost telesne mase

Vrednosti telesnih masa životinja, su prikazane u **tabeli 20** i to na početku, 7., 14., 21. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja, i grupa koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, a koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 20. Vrednosti telesne mase (g, $\bar{x} \pm SD$) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Telesna masa g, $\bar{x} \pm SD$	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	211,00±10,24	216,83±7,39*	220,17±9,50*	243,67±9,65*, x, y	231,67±8,87*
T7	229,33±13,11	232,33±9,93	230,50±8,53	248,00±11,66	245,67±11,66
T14	261,17±18,37	277,33±11,54	271,50±6,63	302,83±15,21	289,83±20,30
T21	272,83±19,21	288,67±12,50	291,83±7,05	320,50±16,75 *, x	300,33±24,84
T28	282,67±18,67	311,17±14,13 *	309,17±7,68*	336,00±14,35 *, y	337,00±17,41*, x, y

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol,

^yp<0,05 u odnosu na SimChol.

Na početku ogleda, grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja su imale značajno veću telesnu masu u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja imale su značajno veću telesnu masu u odnosu na grupu koja je bila na ishrani obogaćenoj lipidima i dobijala fiziološki rastvor i simvastatin.

Dvadeset prvog dana, telesna masa u grupi životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja je bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu životinja i grupu koja je bila na ishrani obogaćenoj lipidima i dobijala fiziološki rastvor.

Na kraju oglada, 28. dana, grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja su imale značajno veću telesnu masu u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Grupa životinja koja je bila na ishrani obogaćenoj lipidima, a koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja imala je značajno veću telesnu masu u odnosu na grupu koja je dobijala simvastatin. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja imale su značajno veću telesnu masu u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor i grupu koja je dobijala simvastatin.

6.3.2. Masa jetre

U **tabeli 21** su prikazane mase jetre, na kraju oglada, nakon žrtvovanja, kod kontrolne grupe životinja i grupa koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, a koje su uz to peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 21. Vrednosti mase jetre (g, $\bar{x} \pm SD$) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Masa jetre	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
g, $\bar{x} \pm SD$	9,84±1,23	11,51±0,99*	12,02±0,82*	13,65±0,71*	13,00±2,10*

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS.

U grupi životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i uz to tretirane fiziološkim rastvorom, simvastatinom, ekstraktom rtanjskog čaja, kombinacijom simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja, masa jetre je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu.

6.3.3. Vrednost glukoze u krvi

Vrednosti glikemije su prikazane u *tabeli 22*, na početku, 7., 14., 21. i 28. dana ogleđa, kod kontrolne grupe životinja, i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, a koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rđanskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rđanskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 22. Vrednosti glikemije ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), u krvi, 7., 14., 21., i 28. dana, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rđanskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rđanskog čaja.

Glikemija (mmol/L)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	5,22±0,51	4,52±0,28	4,70±0,85	5,10±0,49	5,07±0,45
T7	4,68±0,39	4,88±0,35	4,77±0,50	5,43±0,36*	5,50±0,53 ^{*,y}
T14	4,37±0,36	5,27±0,27*	4,73±0,51	5,60±0,38 ^{*,y}	5,35±0,49*
T21	4,65±0,44	5,22±0,60	5,05±0,34	5,82±0,59*	6,03±0,49 ^{*,y}
T28	4,37±0,36	5,05±0,57	6,68±1,01 ^{*,x,z}	5,37±0,48*	6,10±0,13 ^{*,x}

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rđanskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rđanskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol,

^yp<0,05 u odnosu na SimChol,

^zp<0,05 u odnosu na RtčChol.

Na početku ogleđa, vrednosti glikemije su nisu statistički značajno razlikovale među ispitivanim grupama.

Vrednosti glikemije, merene 7. dana ogleđa, su statistički značajno više u grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale ekstrakt rđanskog čaja, kombinaciju simvastatina i ekstrakta rđanskog čaja, u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima i uz to dobijala kombinaciju

simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja imala je više vrednosti glikemije u odnosu na grupu koja je dobijala simvastatin.

Nakon 14. dana ogleada, grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, ekstrakt rtanjskog čaja, kombinaciju ekstrakta rtanjskog čaja i simvastatina imaju satistički značajno više vrednosti glikemije u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima i uz to dobijala ekstrakt rtanjskog čaja imala je veće vrednosti glikemije u odnosu na grupu koja je dobijala simvastatin.

Vrednosti glikemije merene 21. dana ogleada su statistički značajno više kod grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Takođe, vrednosti glikemije su statistički značajno više u grupi životinja koje su dobijale kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na grupu koja je dobijala simvastatin.

Nakon 28. dana ogleada, grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, a koja je simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja, kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja su imale statistički značajno više vrednosti glikemije u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Vrednosti glikemije su bile statistički značajno više u grupi životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale simvastatin u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor i grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja. Grupa koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja je takođe imala više vrednosti glikemije u odnosu na koja je dobijala samo ekstrakt rtanjskog čaja.

6.3.4. Lipidni status

Vrednosti ukupnog holesterola su prikazane u *tabeli 23* na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja, i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 23. Vrednosti ukupnog holesterola ((mmol/L), $\bar{x} \pm SD$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Ukupni holesterol (mmol/L)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	2,19±0,36	2,19±0,13	2,24±0,07	2,16±0,31	2,22±0,21
T14	2,19±0,13	2,23±0,09	2,06±0,10	1,91±0,10 ^{*,x}	1,98±0,13 ^{*,x}
T28	2,29±0,14	2,63±0,23 [*]	2,36±0,18	2,44±0,12	2,34±0,26

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na grupu ConChol.

Na početku ogleda, nisu zabeležene statistički značajne razlike u vrednostima ukupnog holesterola kod kontrolne grupe životinja i grupa koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, ekstrakt rtanjskog čaja, kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana ogleda, vrednosti ukupnog holesterola u serumu su bile statistički značajno niže u grupama koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja, u odnosu na kontrolnu grupu i grupu životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor.

Na kraju ogleda grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor su imale statistički značajno više vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Vrednosti triglicerida su prikazane u **tabeli 24**, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 24. Koncentracija triglicerida (mmol/L, $\bar{x}\pm SD$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Trigliceridi (mmol/L)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	0,71±0,14	0,84±0,12	0,82±0,22	0,78±0,15	0,82±0,29
T14	0,58±0,24	0,86±0,02 ^{*,z}	0,78±0,10	0,72±0,10	0,53±0,19
T28	0,36±0,06	0,62±0,11 ^{*,y}	0,45±0,08	0,81±0,09 ^{*,x,y,z}	0,55±0,15 [*]

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

^{*}p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol,

^yp<0,05 u odnosu na SimChol,

^zp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Na početku ogleada, vrednosti triglicerida se nisu statistički razlikovale među ispitivanim grupama.

Četrnaestog dana ogleada, vrednosti triglicerida u serumu su bili statistički značajno više u grupi koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala fiziološki rastvor, u odnosu na kontrolnu grupu i grupu životinja koje su bile na israni obogaćenoj lipidima, a koje su dobijale kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Koncentracija triglicerida u krvi kontrolne grupe životinja koje su tretirane fiziološkim rastvorom, nakon 28. dana, statistički je značajno niža u poređenju sa grupama koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala fiziološki rastvor, imala je statistički značajno veće vrednosti triglicerida od grupe koja je dobijala simvastatin. Takođe grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja imala je statistički značajno veće vrednosti triglicerida od grupa koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti LDL holesterola u serumu su prikazane u **tabeli 25**, na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja, i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 25. Koncentracija LDL holesterola (mmol/L, $\bar{x} \pm SD$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

LDL (mmol/L)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	0,60±0,17	0,59±0,06	0,61±0,12	0,58±0,18	0,63±0,08
T14	0,53±0,08	0,62±0,05	0,48±0,12	0,41±0,10 ^x	0,49±0,17
T28	0,67±0,09	1,04±0,15 [*]	0,83±0,14 ^x	0,70±0,07 ^x	0,75±0,12 ^x

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol.

Na početku ogleada, nisu zabeležene značajne razlike u vrednostima LDL holesterola između ispitivanih grupa životinja.

Četrnaestog dana ogleada, vrednosti LDL holesterola su bile statistički značajno niže u grupi životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na grupu životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, a koje su dobijale fiziološki rastvor.

Nakon 28. dana ogleada, grupa kontrolnih životinja pokazala je značajno nižu koncentraciju LDL frakcije holesterola u poređenju sa grupom koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je 28 dana tretirana fiziološkim rastvorom. Životinje koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su tretirane simvastatinom, ekstraktom rtanjskog čaja, kombinacijom simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja, imale su statistički značajno nižu

vrednost LDL holesterola u krvi u poređenju sa grupom koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je tretirana samo fiziološkim rastvorom.

Vrednosti HDL holesterola u serumu su prikazane u **tabeli 26**, na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja, i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 26. Koncentracija HDL holesterola (mmol/L, $\bar{x} \pm SD$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

HDL (mmol/L)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	1,32±0,17	1,21±0,03	1,29±0,10	1,22±0,11	1,23±0,13
T14	1,36±0,06	1,27±0,08	1,23±0,05*	1,17±0,05*, ^x	1,25±0,02*
T28	1,45±0,11	1,39±0,12	1,33±0,06	1,37±0,09	1,34±0,14

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol.

Na početku ogleada, nisu zabeležene značajne razlike u vrednostima HDL holesterola između ispitivanih grupa životinja.

Četrnaestog dana, vrednosti HDL holesterola kod životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja, su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Tretman ekstraktom rtanjskog čaja kod životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima doveo je do statistički značajno snižene koncentracije HDL holesterola u odnosu na životinje koje su dobijale fiziološki rastvor.

Vrednosti non HDL holesterola u serumu, su prikazane u **tabeli 27**, na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 27. Koncentracija non HDL holesterola (mmol/L, $\bar{x} \pm SD$), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Non HDL (mmol/L)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	0,88±0,24	0,98±0,10	0,95±0,08	0,94±0,23	1,00±0,11
T14	0,83±0,12	0,96±0,09 ^{x,y}	0,84±0,12	0,74±0,08	0,73±0,13
T28	0,84±0,07	1,24±0,21 ^{*y}	1,03±0,13	1,07±0,05 [*]	1,00±0,14

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na RtčChol,

^yp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Na početku ogleada, nisu zabeležene značajne razlike u vrednostima non HDL holesterola između ispitivanih grupa životinja.

Četrnaestog dana ogleada, vrednosti non HDL holesterola u serumu su statistički značajno više u grupi životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala fiziološki rastvor, u odnosu na grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja i grupu koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Na kraju ogleada, grupa životinje koja je bila na ishrani obogaćenoj lipidima i dobijala fiziološki rastvor imala je statistički značajno višu koncentraciju non HDL holesterola u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koje su dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja. Grupa životinje koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima i uz to dobijala

ekstrakt rtanjskog čaja imala je statistički značajno višu koncentraciju non HDL holesterola u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednosti indeksa ateroskleroze u serumu su prikazane u *tabeli 28*, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 28. Vrednosti indeksa ateroskleroze u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Indeks ateroskleroze	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	0,46±0,13	0,49±0,04	0,48±0,10	0,47±0,11	0,51±0,05
T14	0,39±0,06	0,49±0,07	0,40±0,11	0,35±0,09	0,39±0,14
T28	0,47±0,07	0,75±0,15*	0,62±0,08*	0,51±0,03 ^x	0,56±0,07 ^x

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol.

Na početku ogleda, nisu zabeležene značajne razlike u vrednostima indeksa ateroskleroze između ispitivanih grupa životinja.

Životinje koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima i koje su dobijale fiziološki rastvor i simvastatin, 28. dana ogleda imale su značajno više vrednosti indeksa ateroskleroze u odnosu na kontrolu. Grupe životinja sa koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su tretirane ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja pokazale su statistički značajno niže vrednosti indeksa ateroskleroze u odnosu na grupu životinja koja je bila na ishrani obogaćenoj lipidima, a koja je dobijala fiziološki rastvor.

6.3.5. Parametri funkcije jetre

Vrednosti aspartat aminotransferaze u serumu (AST), su prikazane u **tabeli 29**, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 29. Vrednosti aspartat aminotransferaze (AST), (U/I) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

AST (U/I)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	112,20±2,40	192,20±16,94 [*]	140,25±10,70 ^{*,x,q}	139,00±3,85 ^{*,x,q}	117,75±5,71 ^x
T14	109,00±13,24	112,00±14,44	118,75±10,24 ^z	104,25±5,84	95,50±4,27
T28	148,00±14,67	193,50±19,65 ^{*,y,z,q}	159,75±3,12 ^{z,q}	131,00±11,05	118,00±5,51 [*]

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

^{*}p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol,

^yp<0,05 u odnosu na SimChol,

^zp<0,05 u odnosu na RtčChol,

^qp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Na početku ogleda, životinje koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale fiziološki rastvor, simvastatin i ekstrakt rtanjskog čaja, imale su statistički značajno više vrednosti aspartat aminotransferaze (AST) u odnosu na kontrolnu grupu. Grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale simvastatin i ekstrakt rtanjskog čaja, imale su statistički značajno niže vrednosti AST u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor. Takođe, u grupama koje su dobijale simvastatin i ekstrakt

rtanjskog čaja, zabeležena je značajno veća aktivnost AST u odnosu na grupu životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana, aspartat aminotransferaza (AST) u serumu životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja pokazuje statistički značajno manju aktivnost u odnosu na simvastatin.

Životinje iz grupe koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su tretirane fiziološkim rastvorom, 28. dana su imale značajno više vrednosti aspartat aminotransferaze (AST) u odnosu na kontrolu i grupe koje su dobijale simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja. Grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su tretirane simvastatinom, pokazale su statistički značajno višu aktivnost aspartat aminotransferaze (AST) u odnosu na grupe životinja koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima i uz to tretirana kombinacijom simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja, 28. dana oglada imala je statistički značajno niže vrednosti AST u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednosti alanin aminotransferaze u serumu (ALT), prikazane su u *tabeli 30*, na početku, 14. i 28. dana oglada, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 30. Vrednosti alanin aminotransferaze (ALT), (U/I) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

ALT (U/I)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	48,75±3,60 ^y	46,75±0,97	53,50±3,00 ^{x, y, z}	42,00±1,10	46,50±4,22
T14	47,00±5,90 ^x	35,75±1,32	53,25±3,87 ^{x, y, z}	40,25±3,54	43,40±6,53
T28	44,40±2,06	45,50±4,58	56,40±2,06 ^{*, x, y, z}	49,40±2,87	47,40±4,50

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol,

^yp<0,05 u odnosu na RtčChol,

^zp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Na početku oglada, kontrolna grupa životinja je imala statistički značajno više vrednosti alanin aminotransferaze (ALT) u odnosu na grupu životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je tretirana ekstraktom rtanjskog čaja. Kontrolna grupa životinja i grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je tretirana sa simvastatinom imala je statistički značajno više vrednosti alanin aminotransferaze (ALT) u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana oglada, aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) u serumu kontrolnih životinja je bila statistički značajno veća u odnosu na grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su tretirane fiziološkim rastvorom. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala simvastatin, ima statistički značajno veću aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) serumu u odnosu na grupe koje su dobijale, fiziološki rastvor, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, a koja je tretirana simvastatinom, na kraju oglada, pokazala je statistički značajno višu aktivnost alanin

aminotransferaze (ALT) u odnosu na kontrolnu grupu i grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale fiziološki rastvor, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti alkalne fosfataze u serumu (ALP), su prikazane u **tabeli 31**, na početku, 14. i 28 dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 31. Vrednosti alkalne fosfataze (ALP), (U/I), u serumu, u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

ALP (U/I)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	380,40±41,74	399,40±47,51	388,50±20,65	466,00±55,70 ^{*,y,} q	361,25±17,92
T14	332,40±33,93	267,25±17,97	364,00±21,68 ^x	328,25±64,22	298,75±55,00
T28	263,40±15,79	355,25±48,75 [*]	350,75±10,24 [*]	410,25±40,63 ^{*,x,} y, q	316,25±27,64

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

^{*}p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na ConChol,

^yp<0,05 u odnosu na SimChol,

^zp<0,05 u odnosu na RtčChol,

^qp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Na početku ogleada, vrednosti alkalne fosfataze (ALP) su bile statistički značajno više u grupi životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima i koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu i grupe koje su dobijale simvastatin i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala simvastatin, 14. dana ogleada, ima statistički značajno veću aktivnost alkalne fosfataze (ALP) u serumu, u odnosu na grupu koja je dobijala fiziološki rastvor.

Grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su tretirane fiziološkim rastvorom, simvastatinom i ekstraktom rtanjskog čaja, nakon 28. dana tretmana imale su značajno više vrednosti ALP u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Grupa životinja sa indukovanom hiperlipidemijom koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, imala je statistički značajno više vrednosti ALP u poređenju sa životinjama koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti ukupnog bilirubina u serumu su prikazane u *tabeli 32*, na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 32. Vrednosti ukupnog bilirubina u serumu, ($\mu\text{mol/L}$), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Ukupni bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	2,08±0,13	2,17±0,12 ^z	2,28±0,15 ^z	1,78±0,52	1,55±0,42
T14	1,70±0,38	1,10±0,19 ^{*, x, y, z}	2,03±0,12	2,08±0,16	1,93±0,51
T28	2,05±0,04	2,10±0,30	1,82±0,26	2,12±0,18	2,26±0,05 ^x

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na SimChol,

^yp<0,05 u odnosu na RtčChol,

^zp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Na početku ogleda, vrednosti ukupnog bilirubina u serumu su bile statsitički značajno više u grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale simvastatin i ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na grupu koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti ukupnog bilirubina u serumu, nakon četrnaestodnevnog tretmana su bile statsitički značajno više u grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na grupu životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima i fiziološki rastvor.

Na kraju ogleda, grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja imala je značajno više vrednosti ukupnog bilirubina u odnosu na grupu životinja koja je dobijala simvastatin.

Vrednosti direktnog bilirubina u serumu su prikazane u **tabeli 33**, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 33. Vrednosti direktnog bilirubina u serumu, ($\mu\text{mol/L}$), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Direktni bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	0,38±0,15	0,35±0,05	0,33±0,05	0,35±0,05	0,38±0,08
T14	0,18±0,10	0,35±0,05*	0,30±0,06	0,28±0,08	0,35±0,08*
T28	0,37±0,15	0,40±0,06	0,38±0,07	0,30±0,06	0,40±0,13

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

* $p < 0,05$ u odnosu na ConS.

Na početku ogleda, nisu zabeležene značajne razlike u vrednostima direktnog bilirubina između ispitivanih grupa životinja.

Vrednosti direktnog bilirubina u serumu, nakon četrnaestodnevno tretmana su bile statistički značajno više u grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

Na kraju ogleda, nisu zabeležene značajne razlike u vrednostima direktnog bilirubina između ispitivanih grupa životinja.

6.3.6. Parametri bubrežne funkcije

Vrednosti uree u serumu su prikazane u **tabeli 34**, na početku, 14. i 28. dana ogleda, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 34. Vrednosti uree u serumu, (mmol/L), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Urea (mmol/L)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	6,65±0,35	9,02±0,54 ^{*, x, y, z}	8,02±0,49 ^{*, y}	6,73±0,24	7,36±0,48
T14	7,05±0,47	10,05±0,621 ^{*, y}	9,10±0,24 [*]	8,78±0,32 [*]	9,07±1,24 [*]
T28	7,57±0,26	9,18±0,25 ^{*, x, y, z}	8,26±0,20 [*]	8,10±0,57	8,03±0,29

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na SimChol,

^yp<0,05 u odnosu na RtčChol,

^zp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Na početku oglada, koncentracija uree u serumu, je bila statistički značajno veća u grupi životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima i dobijale fiziološki rastvor u odnosu na kontrolnu grupu i grupe koje su dobijale simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja. Grupa životinja sa koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala simvastatin imala je statistički značajno višu koncentraciju uree u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja.

Četrnaestog dana, koncentracija uree je bila statistički značajno veća u grupama životinja sa koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala fiziološki rastvor imala je statistički značajno više vrednosti uree u odnosu na grupu životinja koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja.

Na kraju oglada, koncentracija uree u serumu, je bila statistički značajno veća u grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, a koje su dobijale fiziološki rastvor i simvastatin u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala fiziološki rastvor zabeležena je statistički značajno viša koncentracija uree u odnosu na grupe koje su dobijale simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti kreatinina u serumu predstavljene su u *tabeli 35*, na početku, 14. i 28. dana oglada, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 35. Vrednosti kreatininina, ($\mu\text{mol/L}$), u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	40,40 \pm 1,62	42,50 \pm 1,48 ^z	40,33 \pm 2,07	41,20 \pm 1,47	39,50 \pm 2,07
T14	44,50 \pm 0,45	49,75 \pm 1,32*	49,50 \pm 2,24*	47,00 \pm 2,76	47,33 \pm 2,07
T28	37,20 \pm 1,47	47,80 \pm 0,98 ^{*,x,y,z}	42,17 \pm 0,98*	42,20 \pm 1,94*	44,33 \pm 1,21*

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

*p<0,05 u odnosu na ConS,

^xp<0,05 u odnosu na SimChol,

^yp<0,05 u odnosu na RtčChol,

^zp<0,05 u odnosu na SimRtčChol.

Koncentracija kreatinina u serumu, 14. dana ogleada, je bila statistički značajno veća u u grupama koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala fiziološki rastvor i simvastatin, u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Na kraju ogleada, koncentracija kreatinina u serumu, je bila statistički značajno veća u grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, a koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je dobijala fiziološki rastvor zabeležena je statistički značajno veća koncentracija uree u odnosu na grupe koje su dobijale simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti mokraćne kiseline u serumu su prikazane u **tabeli 36**, na početku, 14. i 28. dana ogleada, kod kontrolne grupe životinja i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale peroralno fiziološki rastvor 1 ml/kg, simvastatin 10 mg/kg, ekstrakt rtanjskog čaja 500 mg/kg i kombinaciju simvastatina 10 mg/kg i ekstrakta rtanjskog čaja 500 mg/kg.

Tabela 36. Vrednosti mokraćne kiseline ($\mu\text{mol/L}$) u grupi životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (kontrola) i grupama životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su dobijale fiziološki rastvor, simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	ConS	ConChol	SimChol	RtčChol	SimRtčChol
T0	66,00±1,10	128,50±23,17 ^{*, y, z}	117,40±7,68 ^{*, y, z}	94,50±2,86 ^{*, z}	71,75±6,58
T14	65,00±2,45	74,75±7,00 ^{*, y, z}	69,75±8,23 ^{y, z}	59,25±4,31	58,17±4,02
T28	72,00±15,49	126,25±7,33 ^{*, x, y, z}	72,67±1,97	66,00±5,55	64,80±5,42

ConS – kontrolna grupa, ConChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala fiziološki rastvor, SimChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala simvastatin, RtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, SimRtčChol – grupa životinja koja ja dobijala hranu obogaćenu lipidima i koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

* $p < 0,05$ u odnosu na ConS,

^x $p < 0,05$ u odnosu na SimChol,

^y $p < 0,05$ u odnosu na RtčChol,

^z $p < 0,05$ u odnosu na SimRtčChol.

Na početku ogleda, grupe životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima, i koje su uz to dobijale fiziološki rastvor i simvastatin imale su značajno više vrednosti mokraćne kiseline u odnosu na kontrolnu grupu i hiperlipidemične životinje koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, a koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, imala je značajno više vrednosti mokraćne kiseline u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Vrednosti mokraćne kiseline u serumu, 14. dana ogleda, su bile statistički značajno više u grupama koje su dobijale hranu obogaćenu mastima, i koje su dobijale fiziološki rastvor u odnosu na kontrolnu grupu i grupe koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja. Grupa životinja koja je dobijala hranu obogaćenu lipidima, a koja je dobijala simvastatin, imala je značajno više vrednosti mokraćne kiseline u odnosu na koje su dobijala ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

Na kraju oglada, vrednosti mokraćne kiseline u serumu, su bile značajno više u grupi životinja koja dobijala hranu obogaćenu lipidima, i koja je uz to dobijala fiziološki rastvor u odnosu na kontrolnu grupu i grupe koje su dobijale simvastatin, ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja.

6.4. Histološka analiza tkiva aorte, pankreasa i jetre kod životinja sa indukovanim dijabetesom i životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima

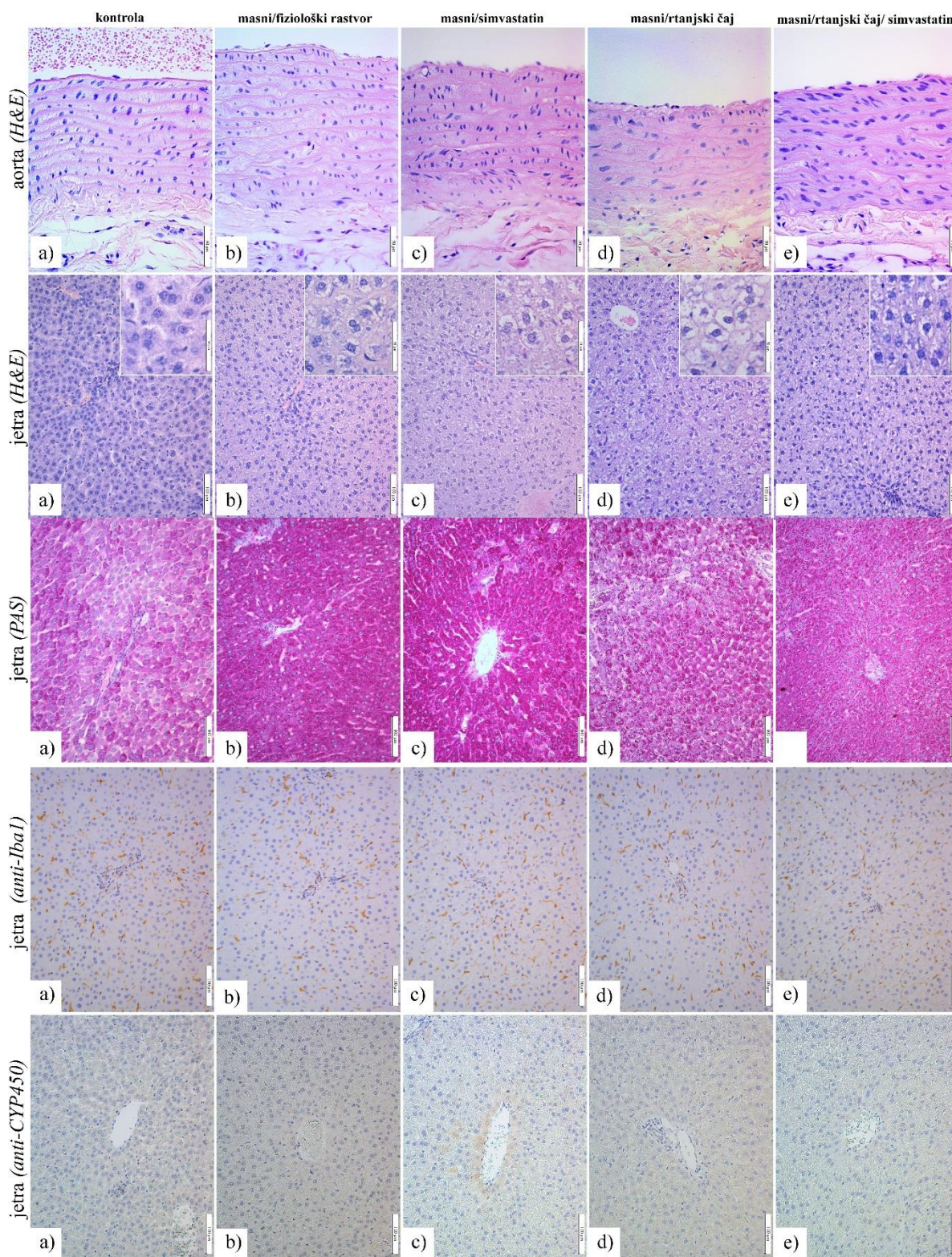
6.4.1. Histološke karakteristike isečaka aorte kod životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima

Histološka analiza isečaka ushodnog dela aorte uzorkovanog kod jedinki iz svih ispitivanih grupa nije ukazala na svetlosnom mikroskopijom vidljive promene. Prost pločast epitel koji je gradio *tunicu intimu* bio je pravilan bez vidljivih degenerativnih promena. Središnji deo zida aorte, *tunicu mediu* činilo je elastično vezivno tkivo, pravilnih lamela bez vidljivih penušavih makrofaga. Spoljašnja, *tunica adventitia* je bila uobičajenih karakteristika i sačinjena od rastresitog vezivnog tkiva. Na osnovu svega gore iznetog možemo reći da tretman životinja ishranom obogaćenom lipidima nije doprineo, u ovom vremenskom roku, do mikroskopskih promena vidljivih svetlosnom mikroskopijom (*slika 8 a-e*).

6.4.2. Histološke karakteristike isečaka jetrenog tkiva kod životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima

Histološkom analizom isečaka tkiva jetre kontrolne grupe jedinki potvrđena je očuvanost pravilne citoarhitektonske građe i rasporeda hepatocita kao i njihovih citoplazmatskih karakteristika. U svim eksperimentalnim grupama koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima uprkos očuvanosti citoarhitektonske građe ipak su uočene promene u citoplazmi hepatocita. One su se karakterisale balonizacijom citoplazme i pojavom naglašenog crteža bazofilnog karaktera koji odgovara depovima glikogena. Najveći intenzitet promena je uočen u grupi koja je bila na ishrani obogaćenoj lipidima i dobijala fiziološki rastvor ali promene sličnog intenziteta mogle su se uočiti i u grupama masni/simvastatin kao i u grupi koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja. Nešto manji stepen balonizacije sa većim akcentom na povećanje intracitoplazmatskih depoa glikogena mogao se uočiti u

eksperimentalnoj grupi koja je bila na ishrani obogaćenoj lipidima i dobijala kombinaciju simvastatina i ekstrakta rtanjskog čaja (*slika 8 a-e*)



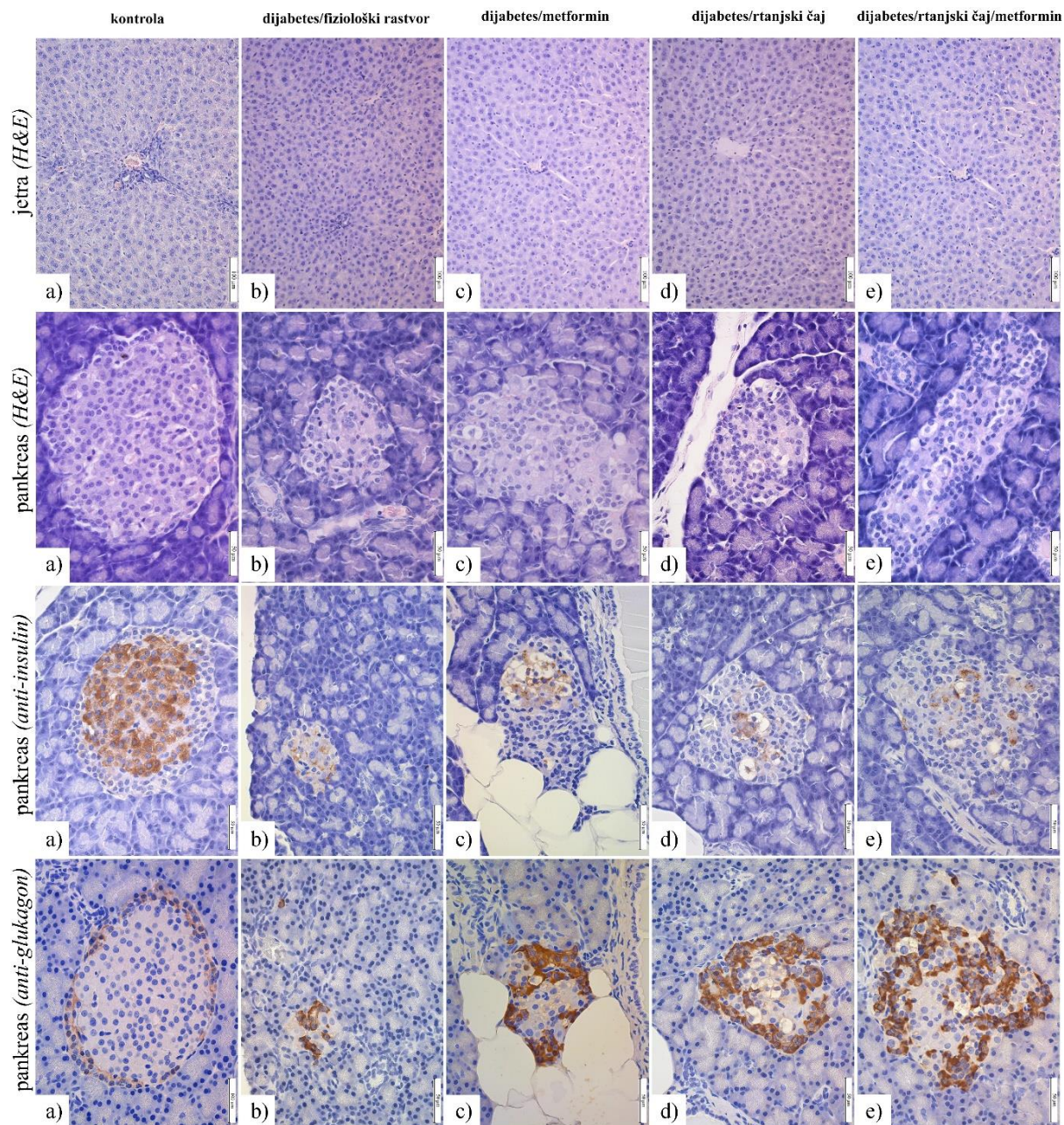
Slika 8. Histološke karakteristike isečaka aorte i jetre

6.4.3. Histološke karakteristike isečaka iz pankreasa kod životinja sa indukovanim dijabetesom

Histološkom analizom pankreatičnog tkiva kontrolne grupe potvrđena je pravilnost u građi i broju Langerhansovih ostrvaca. Kod svih ostrvaca, koja su u proseku bila prečnika oko 250 µm mogao se jasno uočiti venac periferno organizovanih alfa ćelija kao i centralno lokalizovane beta ćelije. Sa druge strane u grupi jedinki kojoj je indukovano samo dijabetes melitus bez ikakvog tretmana, ostrvca su bila vidno narušene strukture i građe. Naime, najveći broj ostrvaca je bio prečnika oko 100-150 µm sa ćelijskom strukturom koju su činile dominantno samo alfa ćelije. U eksperimentalnim grupama gde je dijabetes indukovano streptozotocinom, a primenjen metformin, ekstrakt rtanjskog čaja ili zajedno ekstrakt rtanjskog čaja i metformin uočavaju se regenerativne promene unutar Langerhansovog ostrvca. Naime, sama ostrvca su vidno većeg dijametra a pored rubno orijentisanih alfa ćelija centralno se uočavaju ćelije nešto svetlije citoplazme, velikog euhromatičnog jedra i prominentnog nukleolusa. Ove ćelije odgovaraju trendiferenciranim alfa ćelijama u pravcu beta ćelija sa naglašenom sintetskom aktivnošću (*slika 9 a-e*).

6.4.4. Histološke karakteristike isečaka jetrenog tkiva kod životinja sa indukovanim dijabetesom

Histološka analiza isečaka jetre kod kontrolnih i jedinki sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom ukazala je na odsustvo promena unutar jetrenog parenhima. Kod svih jedinki uočena je očuvanost pravilne citoarhitektonske građe i rasporeda hepatocita. Citoplazmatske karakteristike hepatocita su bile uobičajenih karakteristika bez vidljivih odstupanja od pravilne građe (*slika 9 a-e*).



Slika 9. Histološke karakteristike isečaka pankreasa i jetre

6.5. *Ex vivo* antioksidativna aktivnost dejstva ekstrakta rtanjskog čaja posle primene toksične doze paracetamola

6.5.1. Rezultati biohemijskih ispitivanja

Rezultati aktivnosti alkalne fosfataze aspartat i alanin aminotransferaze u serumu ispitivanih životinja su prikazani u **tabeli 37**, izraženi u jedinicama po litru (U/L).

Tabela 37. Aktivnost alkalne fosfataze, aspartat i alanin transaminaze (ALP, AST, ALT, U/L, $x \pm SD$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola.

	Fiziološki rastvor (K)	Fiziološki + paracetamol (K+P)	Rtanjski čaj (R)	Rtanjski čaj + paracetamol (R+P)
ALP (U/L)	293,50±27,83	373,17±42,14*	293,67±49,77 ^y	337,17±22,84 ^{*, x, y}
ALT (U/L)	33,83±2,04	39,67±0,82*	34,67±5,47	39,17±1,83 ^{*, x}
AST (U/L)	97,00±8,22	105,83±6,65*	100,17±5,08	109,17±2,79 ^{*, x}

*p<0,05 u odnosu na kontrolu,

^x p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu ekstraktom rtanjskog čaja,

^y p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola.

Primena toksične doze paracetamola u grupi pretretiranoj fiziološkim rastvorom dovela je do statistički značajnog povećanja aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) u serumu pacova u poređenju sa kontrolom.

Aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST) u serumu pacova kojima je pre toksične doze paracetamola dat ekstrakt rtanjskog čaja, statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je tretirana samo ekstraktom rtanjskog čaja.

Aktivnost aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) u serumu pacova koji su pre toksične doze paracetamola dobijali ekstrakt rtanjskog čaja, statistički je značajno niža u odnosu na grupu koja je tretirana fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola.

Rezultati aktivnosti gamaglutamil transaminaze i direktnog bilirubina u serumu ispitivanih životinja su prikazani u **tabeli 38**.

Tabela 38. Koncentracija gamaglutamil transferaze i direktnog (konjugovanog) bilirubina, u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola.

	Fiziološki rastvor (K)	Fiziološki + paracetamol (K+P)	Rtanjski čaj (R)	Rtanjski čaj + paracetamol (R+P)
Gamaglutamil transferaza (U/l)	0,83±0,41	1,83±0,41 ^z	1,08±0,49 ^y	1,67±0,52 ^{*,x}
Direktni bilirubin (μmol/L)	0,17±0,05	0,37±0,05 ^z	0,27±0,05 ^{*,y}	0,28±0,04 ^{*,y}

*p<0,01 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom,

^xp<0,05 u odnosu na grupu tretiranu ekstraktom rtanjskog čaja,

^yp<0,05 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola,

^zp<0,01 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom.

Primena toksične doze paracetamola dovela je do statistički značajnog povećanja gamaglutamil transferase i direktnog bilirubina u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola u poređenju sa kontrolom.

Koncentracija gamaglutamil transferaze u serumu pacova tretiranih kombinacijom toksične doze paracetamola i ekstraktom rtanjskog čaja statistički je značajno viša u poređenju sa koncentracijom kod grupe tretirane fiziološkim rastvorom i grupe tretirane ekstraktom rtanjskog čaja. Iako je koncentracija gamaglutamil transferaze u serumu pacova tretiranih kombinacijom toksične doze paracetamola i fiziološkog rastvora viša u odnosu na grupu koja je pre paracetamola dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, razlika nije statistički značajna.

Aktivnost direktnog bilirubina u grupi životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja i grupe koja je pre toksične doze paracetamola tretirana ekstraktom rtanjskog čaja statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je pre paracetamola dobijala fiziološki rastvor.

Iako je koncentracija direktnog bilirubina u serumu pacova tretiranih kombinacijom toksične doze paracetamola i fiziološkog rastvora viša u odnosu na grupu koja je pre paracetamola dobijala ekstrakt rtanjskog čaja, razlika nije statistički značajna.

U **tabeli 39** su prikazani rezultati koncentracije uree (mmol/L), kreatinina ($\mu\text{mol/L}$) i mokraćne kiseline ($\mu\text{mol/L}$) u serumu ispitivanih životinja.

Tabela 39. Koncentracija uree (mmol/L), kreatinina ($\mu\text{mol/L}$) i mokraćne kiseline ($\mu\text{mol/L}$) u serumu pacova tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola.

	Fiziološki (K)	Fiziološki + paracetamol (K+P)	Rtanjski čaj (R)	Rtanjski čaj + paracetamol (R+P)
Urea (mmol/L)	7,20±0,15	7,42±0,33*	7,25±0,29	7,35±0,59
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	38,17±1,17	39,67±0,82*	36,50±0,55*,y	36,00±2,10*,y
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	67,00±4,94	80,00±3,52*	79,00±2,61*	79,33±10,33*

*p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom,

y p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola.

Koncentracija uree, bila je statistički značajno viša kod grupa životinja koje su tretirane fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola u odnosu na kontrolu.

Koncentracija kreatinina bila je statistički značajno viša kod grupa životinja koje su tretirane fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola u odnosu na kontrolu. Koncentracija kreatinina bila je statistički značajno niža kod grupa koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja i kombinaciju ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola u odnosu na grupu životinja koje su tretirane fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola.

Koncentracija mokraćne kiseline je bila statistički značajno viša kod grupa tretiranih fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola u odnosu na kontrolnu grupu koja je dobijala samo fiziološki rastvor.

6.5.2. Rezultati određivanja pokazatelja oksidativnog stresa u homogenatima tkiva

6.5.2.1. Intenzitet lipidne peroksidacije

Intenzitet lipidne peroksidacije u grubom homogenatu jetre, životinja ispitivanih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola su prikazani u *tabeli 40*.

Tabela 40. *Određivanje aktivnosti lipidne peroksidacije (nmol malondialdehida/mg proteina, prikazani kao aritmetička sredina \pm SD) u grubom homogenate jetre, ispitivanih životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola.*

	Fiziološki rastvor (K)	Fiziološki + paracetamol (F+P)	Rtanjski čaj (R)	Rtanjski čaj + paracetamol (R+P)
Aktivnost lipidne peroksidacije (nmolMDA/mg proteina)	0,24 \pm 0,020	0,45 \pm 0,060*	0,27 \pm 0,020 ^x	0,27 \pm 0,020 ^x

*p<0,05 u odnosu na kontrolu,

^xp<0,05 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom pre toksične doze paracetamola.

Grupa životinja koja je pre toksične doze paracetamola tretirana fiziološkim rastvorom pokazala je statistički značajno višu aktivnost lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolnu grupu.

Aktivnost lipidne peroksidacije kod grupe životinja koja je pre toksične doze paracetamola tretirana ekstraktom rtanjskog čaja je statistički značajno niža u odnosu na grupu životinja koja je pre toksične doze paracetamola dobijala fiziološki rastvor.

6.5.2.2. Aktivnost enzima katalaze (CAT)

Rezultati određivanja aktivnosti katalaze (CAT) u grubom homogenatu jetre, životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola,

ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola su prikazani u *tabeli 41*.

Tabela 41. Određivanje aktivnosti katalaze (nmol/mg proteina, prikazani kao aritmetička sredina \pm SD) u grubom homogenatu životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola.

	Fiziološki rastvor (K)	Fiziološki + paracetamol (F+P)	Rtanjski čaj (R)	Rtanjski čaj + paracetamol (R+P)
Koncentracija CAT (nmol/mg proteina)	152,11 \pm 30,71	97.65 \pm 41,26	133,50 \pm 67,49	125,45 \pm 44,21

Između ispitivanih grupa nije zabeležena statistički značajna razlika u koncentracijama katalaze.

6.5.2.3 Aktivnost enzima glutation reduktaze (GR)

Rezultati određivanja glutation reduktaze (GR) u grubom homogenatu jetre, životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola, su prikazani u *tabeli 42*.

Tabela 42. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (nmol/mg proteina, prikazani kao aritmetička sredina \pm SD) u grubom homogenate jetre, životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola.

	Fiziološki rastvor (K)	Fiziološki + paracetamol (F+P)	Rtanjski čaj (R)	Rtanjski čaj + paracetamol (R+P)
Koncentracija GR (nmol/mg proteina)	0,16 \pm 0,019	0,10 \pm 0,013*	0,13 \pm 0,012 ^y	0,10 \pm 0,033

*p<0,05 u odnosu na kontrolu,

^yp<0,05 u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom pre toksične doze paracetamola.

Koncentracija glutation reduktaze u grupi koja je tretirana fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola pokazuje statistički značajno nižu vrednost u odnosu na kontrolnu grupu.

U grupi životinja koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja aktivnost glutation reduktaze je statistički značajno niža u poređenju sa grupom životinja koja je tretirana fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola.

6.5.2.4. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD)

Rezultati određivanja aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u grubom homogenatu jetre, životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola, su prikazani u **tabeli 43**.

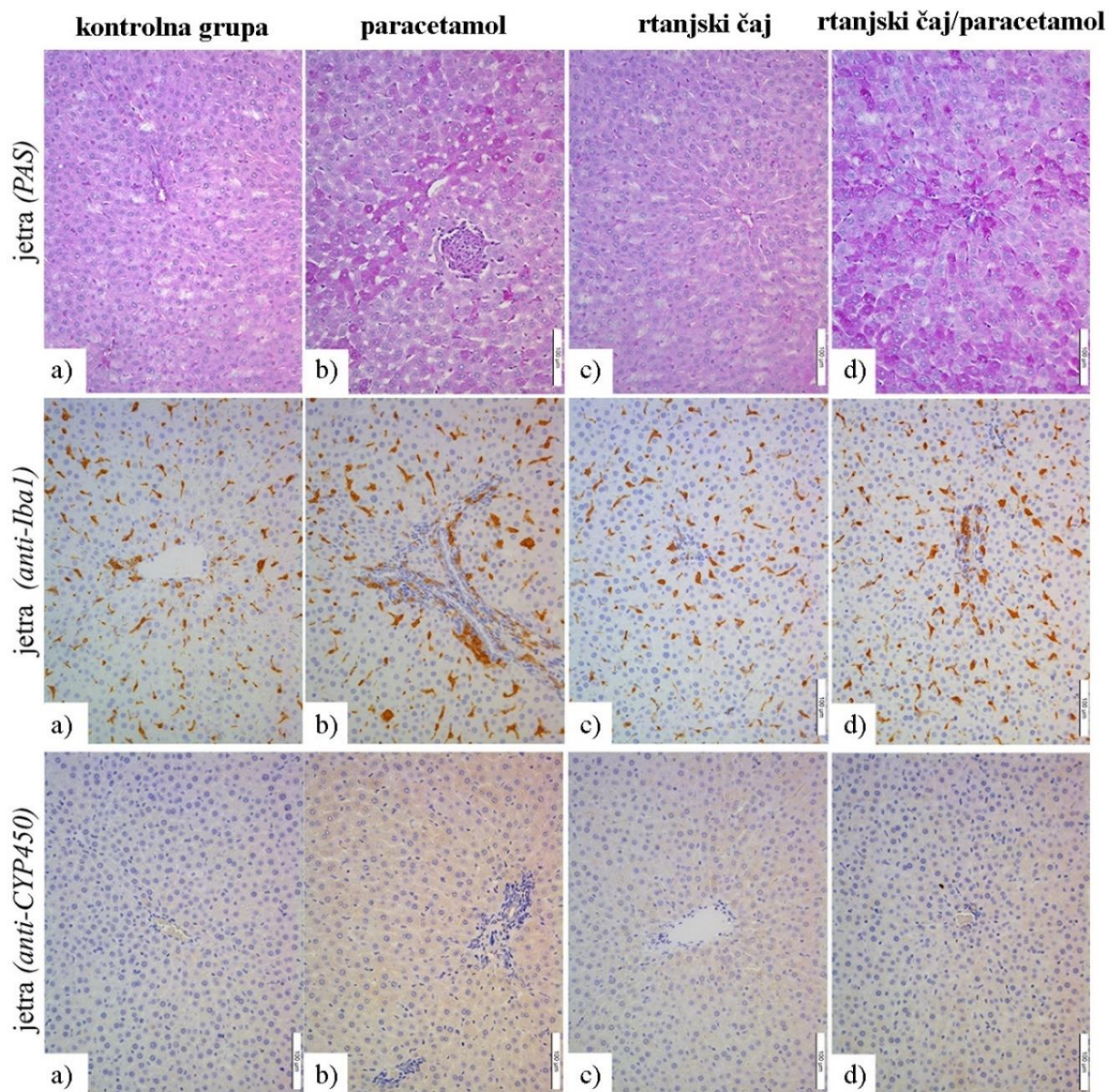
Tabela 43. *Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (U/mL, prikazani kao aritmetička sredina ± SD) u grubom homogenate jetre, životinja tretiranih fiziološkim rastvorom, fiziološkim rastvorom i toksičnom dozom paracetamola, ekstraktom rtanjskog čaja i kombinacijom ekstrakta rtanjskog čaja i toksične doze paracetamola.*

	Fiziološki rastvor (K)	Fiziološki + paracetamol (F+P)	Rtanjski čaj (R)	Rtanjski čaj + paracetamol (R+P)
Koncentracija SOD (U/mL)	70,68±3.56	64,85±4,76	68,91±3,03	66,68±5,10

Između ispitivanih grupa nije zabeležena statistički značajna razlika u koncentracijama superoksid dismutaze.

6.5.2.5. Histologija

Histološkim bojenjem na PAS u kontrolnoj grupi i grupi koja je primila samo ekstrakt rtanjskog čaja uočena je kompletna očuvanost citoarhitektonike jetrenog tkiva. Hepatociti su bili pravilno aranžirani u vidu Remakovih trabekula koji se radijalno pružaju od vene centralis dok su sinusoidalni prostori pravilnog izgleda, neprošireni. Portalni prostori su korektno pozicionirani bez vidljivih inflamatornih elemenata. Citoplazma hepatocita ovih grupa bila je uglavnom svetlije boje sa manjom količinom PAS pozitivnih glikogenih granula u njoj (*slika 10 a i slika 10 c*). U grupi koja je dobila samo toksičnu dozu paracetamola, uz očuvanu citoarhitektoniku uočena je naglašena zapaljenska reakcija dominantno prisutna u portnim prostorima, verovatno nastala kao posledica hepatotoksičnog dejstva paracetamola. U hepatocita centralne zone uočila se nešto veća pozitivnost na glikogene granule (*slika 10 b*). U grupi sa pretretmanom ekstraktom rtanjskog čaja i potom primenom paracetamola uočena je razlika pre svega u pogledu smanjenja broja inflamatornih ćelija. I u ovoj grupi uočena je nešto veća akumulacija PAS + glikogena unutar hepatocita (*slika 10 d*). Primenom anti-Iba1 imunohistohemijskog markera koji boji makrofage jetre, tzv. Kupferove ćelije u kontrolnoj i grupi koja je dobijala ekstrakt rtanjskog čaja možemo uočiti umerenu citoplazmatsku pozitivnost pomenutih ćelija lociranih u sinusoidalnim prostorima (*slika 10 a i slika 10 c*). Sa druge strane, u grupi koja je dobila samo paracetamol uočava se naglašen periportni i portni mešoviti zapaljenski infiltrat limfocita, plazmocita ali i jasno vidljivih Iba pozitivnih Kupferovih ćelija (*slika 10 b*). U grupi koja je dobila paracetamol sa pretretmanom ekstraktom rtanjskog čaja uočen je povećan broj Kupferovih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu jedinki ali u znatno manjem broju u odnosu na grupu gde je primenjen sam paracetamol (*slika 10 d*). Metabolička aktivnost citohroma P450 koja je identifikovana antitelom CYP2E1 bila je očekivano najoskudnija u kontrolnoj grupi jedinki (*slika 10 a*) a nešto naglašenija u grupi koja je primila ekstrakt rtanjskog čaja (*slika 10 c*). Primena paracetamola dovela je do difuzne aktivnosti ovog enzima u vidu citoplazmatske pozitivnosti pri imunohistohemijskom bojenju (*slika 10 b*) dok je sa druge strane u grupi koja je dobila paracetamol i ekstrakt rtanjskog čaja ta pozitivnost bila dominantno vidljiva kod dominantno pericentralnih hepatocita (*slika 10 d*).



Slika 10. Histološke karakteristike tkiva jetre, skala=100 μ m

6.6. In vitro ispitivanja antioksidativne aktivnosti

6.6.1. Sadržaj ukupnih fenola

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima rtanjskog čaja, izraženi kao kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog ekstrakta rtanjskog čaja (mg GAE/g SE) su prikazani u *tabeli 44*.

Tabela 44. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola (mg GAE/ g SE u ekstraktima rtanjskog čaja.

Rastvarači/ Metode	Voda	Me 50%	Me 90%	Et 50%	Et 90%
Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/ g SE)	1312,23	1418,4	1664,78 ^{*, x, y, z}	1485,57 [*]	1403,03

Me 50%: metanol 50%; Me 90%: metanol 90%; Et 50%: etanol 50%; Et 90%: etanol 90%

^{*}p<0,05 u odnosu na vodu,

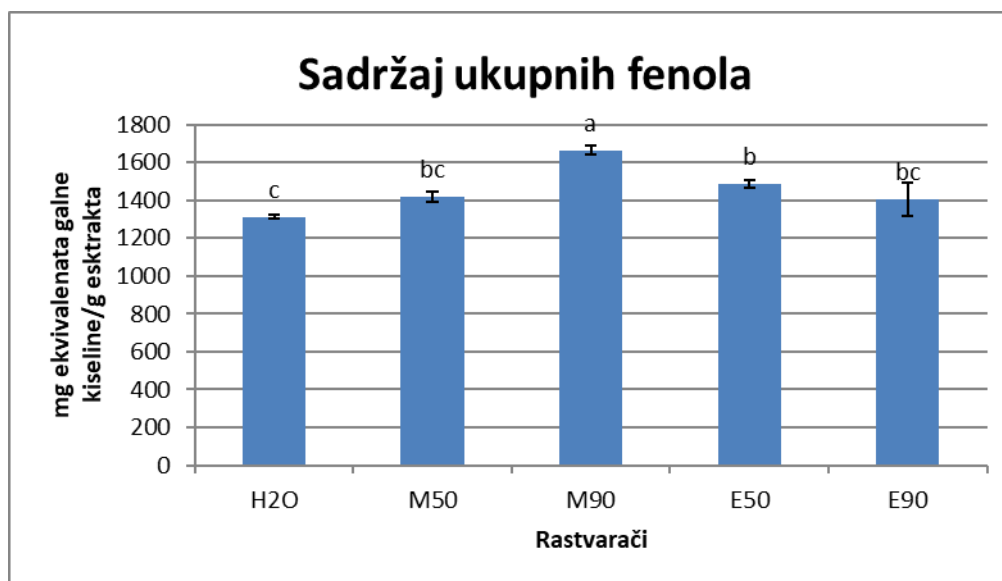
^xp<0,05 u odnosu na metanol 50%,

^yp<0,05 u odnosu na etanol 50%,

^zp<0,05 u odnosu na etanol 90%.

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima rtanjskog čaja su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog ekstrakta rtanjskog čaja (mg GAE/g SE).

Sadržaj ukupnih fenolnih komponenata u ispitivanim ekstraktima se kretao u opsegu 1312,13- 1664,78 mg GAE/g SE. Najmanja vrednost sadržaja ukupnih fenola dobijena je u vodenom ekstraktu, a najveća u 90 % metanolnom ekstraktu rtanjskog čaja. Sadržaj ukupnih fenola je statistički značajno veći u 90% metanolnom ekstraktu u odnosu na sve ostale ekstrakte rtanjskog čaja (*tabela 44*), dok je u 50% etanolom ekstraktu veći u odnosu na vodeni ekstrakt.



Grafikon 1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima rtanjskog čaja

6.6.2. Sadržaj ukupnih flavonoida

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima rtanjskog čaja, izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suvog ekstrakta (mg KE/g SE) su prikazani u *tabeli 45*.

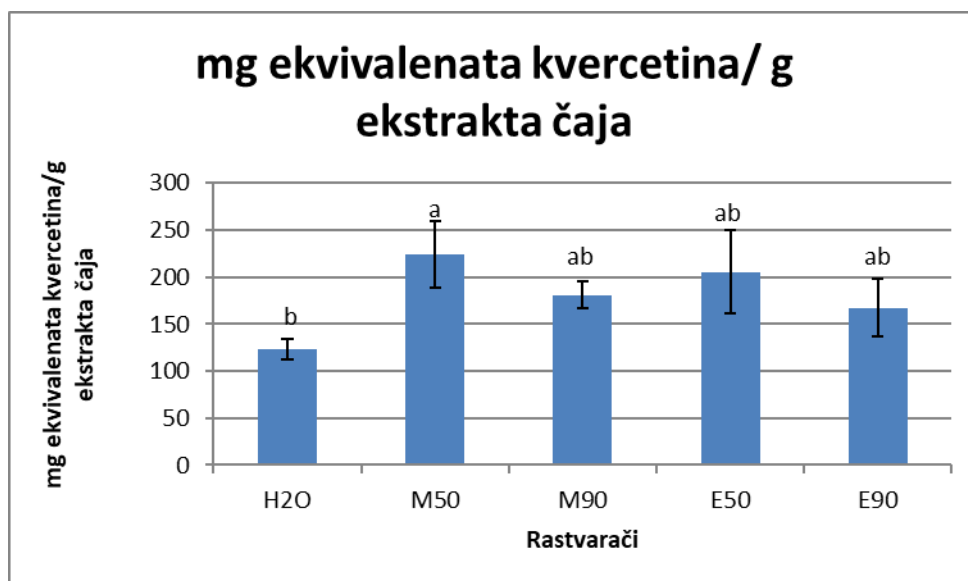
Tabela 45. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoida (mg KE/g SE), u ekstraktima rtanjskog čaja.

Rastvarači/Metode	Voda	Me 50%	Me 90%	Et 50%	Et 90%
Sadržaj ukupnih flavonoida (mg KE/ g SE)	122,85	224,02*	181,07	205,38	167,15

Me 50%: metanol 50%; Me 90%: metanol 90%; Et 50%: etanol 50%; Et 90%: etanol 90%

*p<0,05 u odnosu na vodeni ekstrakt.

Sadržaj flavonoida se kretao se u opsegu od 122,85 do 224,02 mg KE/g suvog ekstrakta. Najmanja vrednost sadržaja ukupnih flavonoida dobijena je u vodenom ekstraktu, a najveća u 50 % metanolnom ekstraktu rtanjskog čaja. Sadržaj ukupnih flavonoida je statistički značajno veći u 50% metanolnom ekstraktu u odnosu na vodeni ekstrakt rtanjskog čaja (*tabela 45*).



Grafikon 2. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima rtanjskog čaja

6.6.3. Neutralizacija DPPH• radikala (*Radical scavenger capacity- RSC*)

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom u ekstraktima rtanjskog čaja su prikazani u *tabeli 46*.

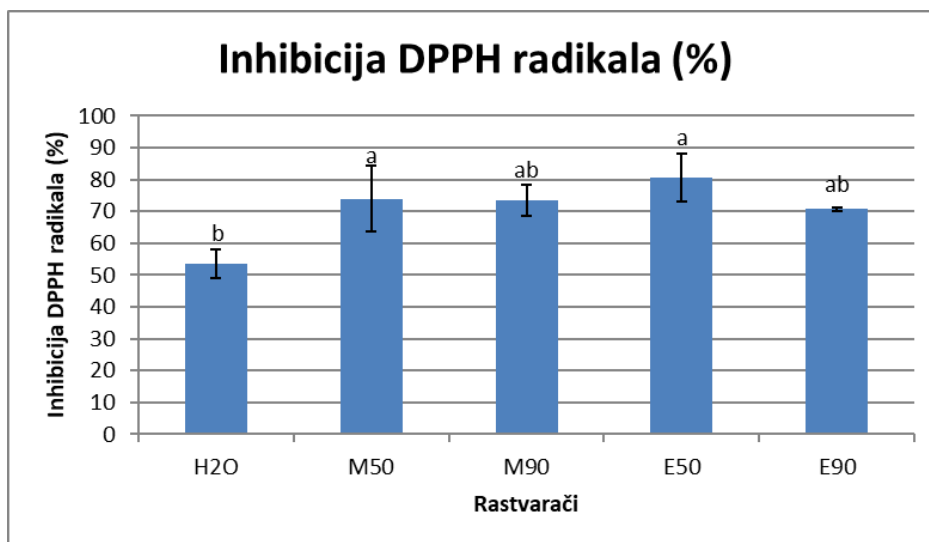
Tabela 46. Inhibicija DPPH radikala (%) u ekstraktima rtanjskog čaja.

Rastvarači/Metode	Voda	Me 50%	Me 90%	Et 50%	Et 90%
DPPH (%)	53,64	73,95*	73,54	80,66 *	70,71

Me 50%: metanol 50%; Me 90%: metanol 90%; Et 50%: etanol 50%; Et 90%: etanol 90%

* $p < 0,05$ u odnosu na vodu.

Vrednosti DPPH testa u ispitivanim ekstraktima su se kretale u opsegu 53,64 – 80,66 %. Najmanja vrednost DPPH testa dobijena je u vodenom ekstraktu, a najveća u 90% etanolnom ekstraktu rtanjskog čaja. Procenat inhibicije DPPH radikala je statistički značajno veći u 50% metanolnom ekstraktu i 50% etanolnom ekstraktu u odnosu na vodeni ekstrakt rtanjskog čaja (*tabela 46*).



Grafikon 3. Vrednost DPPH testa u ekstraktima rtanjskog čaja

6.6.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO• radikala

Rezultati određivanja sposobnosti neutralizacije NO• radikala u ekstraktima rtanjskog čaja, zasnovanog na spektrofotometrijskom merenju koncentracije generisanih nitritnih jona su prikazani u *tabeli 47*.

Tabela 47. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO• radikala (%) u ekstraktima rtanjskog čaja.

Rastvarači/ Metode	Voda	Me 50%	Me 90%	Et 50%	Et 90%
Sposobnost neutralizacije NO• radikala (%)	58,99 ^{y, q}	60,37 ^{y, q}	54,81 ^{y, q}	37,66	44,33 ^y

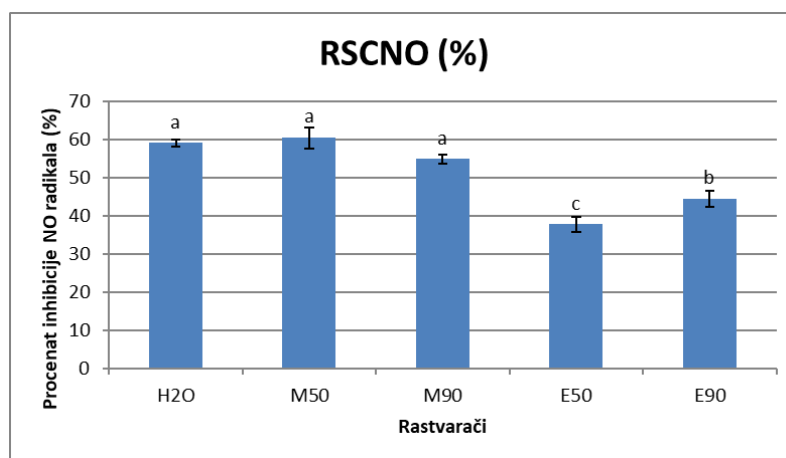
Me 50%: metanol 50%; Me 90%: metanol 90%; Et 50%: etanol 50%; Et 90%: etanol 90%

^yp<0,05 u odnosu na etanol 50%,

^qp<0,05 u odnosu na etanol 90%.

Vrednosti neutralizacije NO• radikala u ispitivanim ekstraktima su se kretale u opsegu 37,66 – 60,37 %. Najmanja vrednost neutralizacije NO• radikala dobijena je u 50% etanolnom ekstraktu, a najveća u 50% metanolnom ekstraktu rtanjskog čaja. Procenat neutralizacije NO• radikala je statistički značajno veći u vodenom, 50% metanolnom i 90% metanolnom ekstraktu u odnosu na 50% etanolni i 90% etanolni ekstrakt rtanjskog čaja

(*tabela 47*). Takođe, 90% etanolni ekstrakt pokazao veći procenat neutralizacije NO• radikala u odnosu na 50% etanolni ekstrakt.



Grafikon 5. Procenat neutralizacije NO• radikala u ekstraktima rtanjskog čaja

6.6.5. Određivanje redukcione sposobnosti ekstrakta rtanjskog čaja FRAP testom (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

rezultati određivanja redukcione sposobnosti ekstrakta rtanjskog čaja FRAP testom su prikazani u *tabeli 48*.

Tabela 48. Određivanje redukcione sposobnosti ekstrakta rtanjskog čaja FRAP testom

Rastvarači/ Metode	Voda	Me 50%	Me 90%	Et 50%	Et 90%
FRAP	40,77	43,12 ^{z, q}	29,59	39,3	27,75

Me 50%: metanol 50%; Me 90%: metanol 90%; Et 50%: etanol 50%; Et 90%: etanol 90%

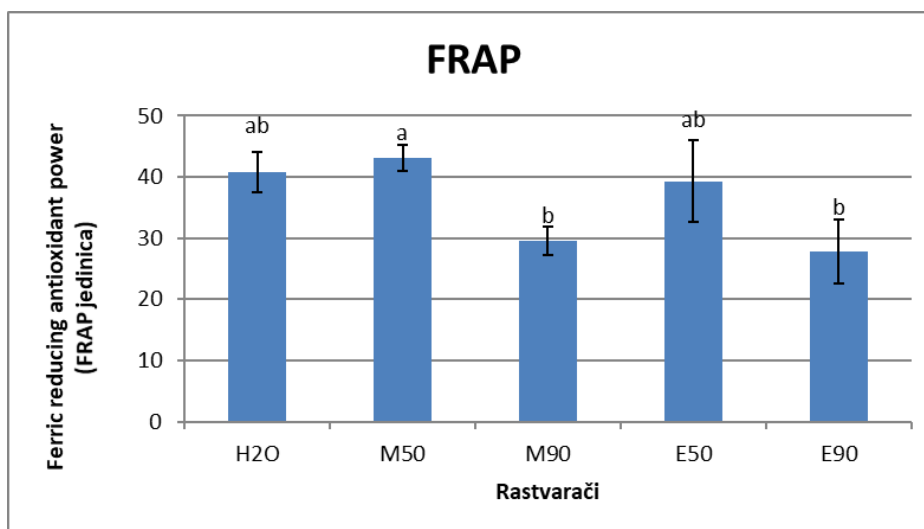
^zp<0,05 u odnosu na metanol 90%,

^qp<0,05 u odnosu na etanol 90%.

Redukcioni kapacitet se izražava brojem FRAP jedinica, gde jedna FRAP jedinica predstavlja onu koncentraciju ekstrakta koja je dovoljna za redukciju 100 µM Fe³⁺.

Vrednosti redukcione sposobnosti ekstrakata rtanjskog čaja FRAP testom su prikazane u *tabeli 48* i nalazile su se u opsegu 29.59 - 43.12 FRAP jedinica. Najmanji redukcion kapacitet pokazao je 90% etanolni ekstrakti, a najveći 50% metanolnom ekstrakt rtanjskog čaja. 50 % metanolni ekstrakt rtanjskog čaja je pokazao veće FRAP vrednosti u odnosu na

90% metanolni i 90% etanolni ekstrakt.



Grafikon 6. Vrednost FRAP testa u ekstraktima rtanjskog čaja

6.6.6. Određivanje sposobnosti neutralizacije •OH radikala

Sposobnost neutralizacije •OH radikala (%) u ekstraktima rtanjskog čaja je prikazana u **tabeli 49**.

Tabela 49. Određivanje sposobnosti neutralizacije •OH radikala (%) u ekstraktima rtanjskog čaja.

Rastvarači/Metode	Voda	Me 50%	Me 90%	Et 50%	Et 90%
Sposobnost neutralizacije •OH radikala (%)	52,73 ^{y, q}	90,4 ^{*, y, z, q}	55,61 ^{y, q}	7,73	7,25

Me 50%: metanol 50%; Me 90%: metanol 90%; Et 50%: etanol 50%; Et 90%: etanol 90%

* p < 0.05 u odnosu na vodeni ekstrakt,

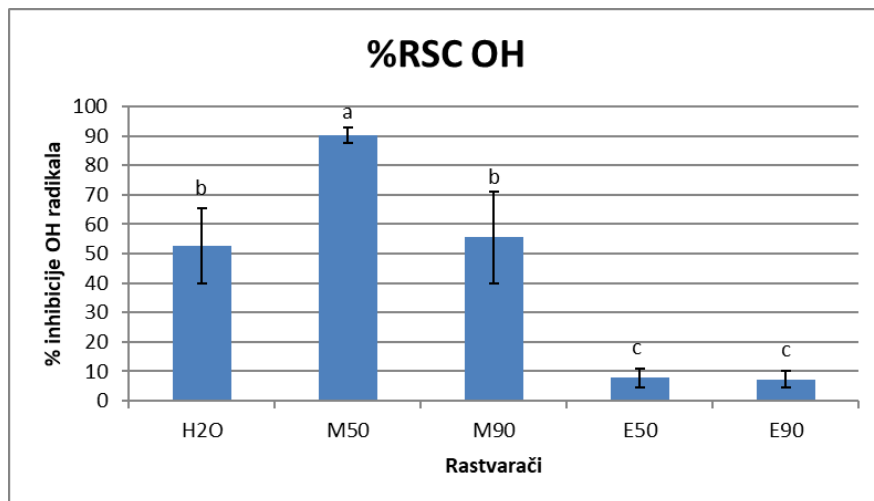
^y p < 0.05 u odnosu na etanol 50%,

^z p < 0.05 u odnosu na metanol 90%,

^q p < 0.05 u odnosu na etanol 90%.

Vrednosti neutralizacije •OH radikala su prikazane u **tabeli 49** i nalazile su se u opsegu 7,25 – 90,4 %. Najmanju vrednost neutralizacije •OH radikala pokazao je 50% etanolni ekstrakti, a najveću 50% metanolni ekstrakt rtanjskog čaja. Vrednosti neutralizacije

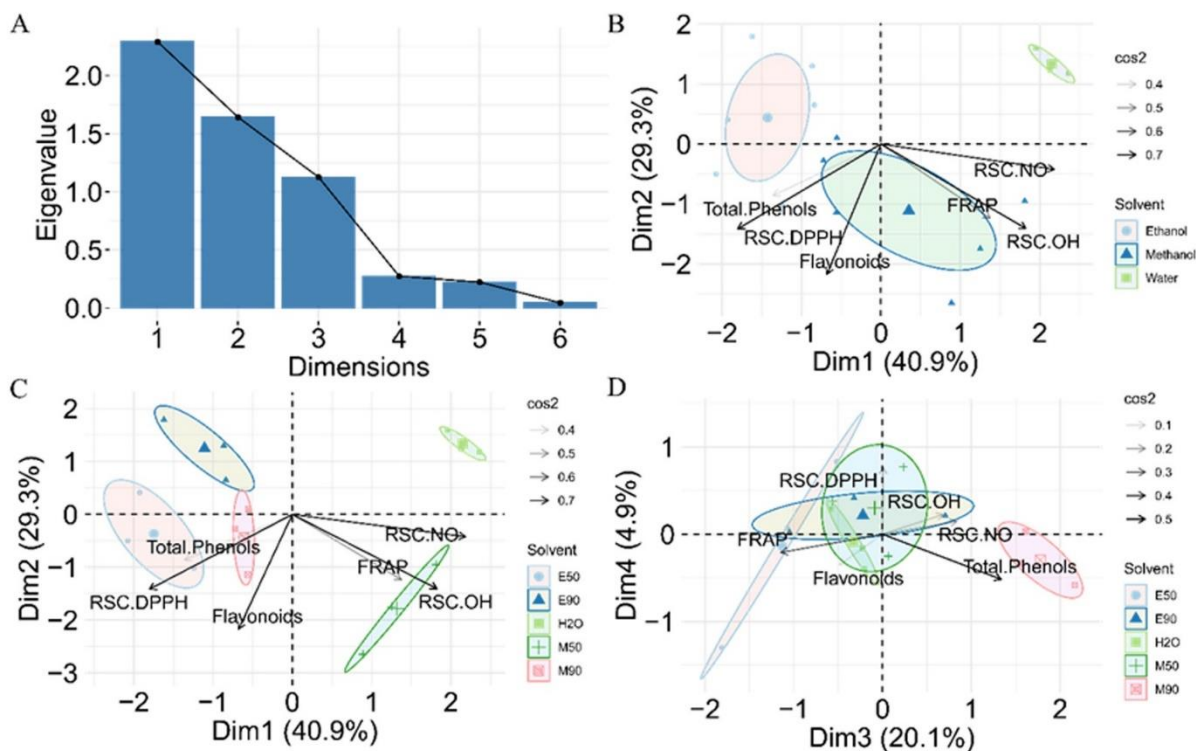
•OH radikala 50% metanolnom ekstraktu su statistički značajno veće, nego u svim ostalim ekstraktima, takođe, vrednosti neutralizacije •OH radikala vodenog i 90% metanolnog ekstrakta su statistički značajno veće od 50 % etanolnog i 90% etanolnog ekstrakta rtanjskog čaja.



Grafikon 7. Vrednosti neutralizacije •OH radikala u ekstraktima rtanjskog čaja

6.6.7. Analiza glavnih komponentata (PCA- *Principal Component Analysis*)

Dobijene sopstvene vrednosti su ukazivale na značaj prve tri glavne komponente u grupisanju podataka (*slika 11*). Pošto su njihove vrednosti bile 1.0, fokusirali smo se na interpretaciju multivarijantnog skupa podataka kroz interakciju između sve tri komponente.



Slika 11. Multivarijantna analiza odabranih tipova rastvarača. (A) Sopstvene vrednosti odgovaraju količini varijanse koju zadržava svaka komponenta. (B) PCA grafikon zasnovan na tipu rastvarača koji se koristi za pripremu ekstrakata. (C, D) PCA grafikoni rastvarača različitih koncentracija korišćenih za ekstrakciju. PCA je urađen na korelacionoj matrici. Centroidi grupe su predstavljeni većim tačkama; elipsa označava interval poverenja oko težišta grupe. Dim 1, 2, 3, i 4 su zadržane glavne komponente. cos2 pokazuje doprinos varijabli u određivanju date glavne komponente.

Prva i druga glavna komponenta (PC) čine 70,2% ukupne varijacije u skupu podataka (*slika 11 B*). Sve testirane grupe su bile razdvojene preko biplota, bilo prvom ili drugom dimenzijom. Značajni vektori za razdvajanje grupa u prvoj dimenziji bili su testovi neutralizacije radikala DPPH, NO, i OH. Pošto neki od vektora očigledno nisu značajno doprineli razdvajanju grupa, odlučili smo da iscertamo treću i četvrtu glavnu komponentu (*slika 11 D*). Dakle, može se jasno videti da se najveći doprinos flavonoida pripisuje drugoj glavnoj komponenti, koja odvaja rastvarače poput etanola i vode od metanola obe koncentracije (*slika 11 C*). Kada je u pitanju treća glavna komponenta, FRAP vrednost je najdominantniji vektor u razdvajanju grupa širom biplota, zajedno sa ukupnim sadržajem fenola (*slika 11 D*).

7. DISKUSIJA

Ispitivani ekstrakt biljke *Satureja montana* L. predstavlja bogat izvor polifenolnih komponenti, među kojima je najzastupljenija rozmarinska kiselina ($52,1 \pm 1,04 \mu\text{g}/\text{mg}$), praćena manjim saržajem hlorogenske, p-kumarinske i kafeinske kiseline. Takođe su prisutne i značajne flavonoidne komponente hiperozid i rutin.

U pređašnjim ispitivanjima ekstrakata vrste *Satureja*, takođe je dokazano prisustvo fenolnih komponenti među kojima je najzastupljenija rozmarinska kiselina.

Kremer i saradnici su u svom istraživanju sastava biljaka *Satureja montana* L. i *Satureja subspicata*, uzgajanih na teritoriji Hrvatske potvrdili da je rozmarinska kiselina najzastupljenija komponenta obe vrste sa sadržajem (w/w suve materije) koji se kretao od 1,11% do 3,31% respektivno (40). Pored toga, rozmarinska kiselina je identifikovana među četiri glavne komponente biljke *Satureja montana* L. uzgajane u Portugalu sa sadržajem od 21,19% (80). Etanolni ekstrakt nadzemnih delove biljke *Satureja kitaibelii* uzgajane na teritoriji Srbije je takođe bogat fenolnim i flavonoidnim komponentama, sa rozmarinskom kiselonom kao najzastupljenijom (18,30–29,52 mg/g) (81).

Fitohemijaska istraživanja etil acetatnog i n-butanolnog ekstrakta biljke rtański čaj, sakupljene u regionu planine Zlatibor, Srbija, pokazala su prisustvo sledećih fenolnih kiselina: hidroksibenzoeve (protokatehinska, siringinska i vanilinska), hidroksicinaminske (kafeinska, p-kumarinska i ferulinska), njihovih derivata i flavanola ((+) katehin i 2-epikatehin) (16).

Sposobnost fenolnih jedinjenja da vrše redukciju skoro svih reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta pripisuje se njihovoj hemijskoj strukturi, velikom broju elektron-donorskih hidroksilnih grupa i sposobnosti rezonancije elektrona u fenolnom jezgru (37, 82). Smatra se da je sposobnost neutralizacije slobodnih radikala fenolnih jedinjenja i do četiri puta efikasnija od askorbinske kiseline ili α -tokoferola (83-85).

Dijabetes melitus je hronični metabolički poremećaj uzrokovan hroničnom hiperglikemijom nastalom usled nedostatka sekrecije i/ili dejstva insulina.. Visoki nivoi glukoze u krvi koji karakterišu ovo stanje dovode do mnogobrojnih dijabetesnih komplikacija. Antioksidativne supstance koje imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, mogu prevenirati nastanak dijabetesne neuropatije i mikrovaskularnih komplikacija prisutnih kod dijabetesa, inhibicijom reakcije proteinske glikolizacije.

Supstance koje poseduju antioksidativne osobine ili imaju uklanjanja slobodnih radikala, mogu dovesti do inhibicije reakcija oksidacije koje su povezane sa proteinskom glikolizacijom, a koja predstavlja ključni momenat u razvoju dijabetesne neuropatije i mikrovaskularnih komplikacija prisutnih kod dijabetesa.

U sprovedenom istraživanju, za indukciju hiperglikemije kod laboratorijskih životinja korišten je streptozotocin čijom primenom je izazvano zapaljenje i nekroza endokrinog pankreasa. Streptozotocin je N-nitrozo derivat D-glukozamina koji se široko koristi za indukovanje eksperimentalnog dijabetesa kod različitih laboratorijskih životinja. Prvobitno je izolovan iz strukture *Streptomyces Achromogenes* 1960. godine. Vezuje se za GLUT 2 glukozne transportere koji se nalaze na površini beta ćelija pankreasa i ulazi u iste, gde stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta dovodi do oštećenja ćelije. Sam streptozotocin uzrokuje fragmentaciju DNK u ćelijama Langerhansovih ostrvaca što dovodi do smanjenja ćelijskog nivoa nukleotida i povezanih jedinjenja, posebno NAD+. Na ovaj način uzrokovana je brza nekroza beta ćelija pankreasa (86).

Interakcija lekova i biljnih preparata još uvek nije dovoljno ispitana. Njihova istovremena upotreba može dovesti do ispoljavanja bilo pozitivnih bilo negativnih fizioloških efekata. U studiji koju su sprovedeli Gupta i saradnici, a na osnovu dostupnih literaturnih podataka, o interakcijama biljnih lekova i antidijabetika, zaključeno je da biljni lekovi mogu promeniti farmakokinetiku i farmakodinamiku antidijabetesnih lekova (87). Interakcije biljnih preparata i hemiskih lekova su veoma složene i uključuju različite mehanizme delovanja. Uprkos potencijalu za ispoljavanje neželjenih efekata, češće se pokazalo da kombinacije biljaka i antidijabetesnih lekova imaju pozitivne kliničke implikacije jer mogu dovesti do pojačanih antidijabetičkih efekata, potencijalno omogućavajući smanjenje doze antidijabetesnih lekova, čime se minimiziraju njihovi neželjeni efekti.

Metformin je jedan od najčešće korišćenih oralnih antihiperglikemika koji ima više mehanizama delovanja. Ovaj lek između ostalog smanjuje resorpciju glukoze iz tankog creva pa zbog toga ne dovodi do povećanja telesne mase, a takođe može smanjiti i količinu masnog tkiva u organizmu (88).

Metformin stimuliše intracelularnu sintezu glikogena delujući na glikogen sintazu i povećava prenosni kapacitet specifičnih tipova membranskih transportera za glukozu (GLUT-1 i GLUT-4). Takođe, ima korisne uticaje na metabolizam lipida kod ljudi, nezavisno od dejstva na glikemiju. To je dokazano pri primeni terapijske doze u kontrolisanim kliničkim

ispitivanjima srednjeg i dugog trajanja: metformin smanjuje koncentraciju ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida u serumu (89).

Naši rezultati u velikoj meri potvrđuju ovu činjenicu. Telesne mase dijabetesnih životinja iz grupa koje su tretirane metforminom ili kombinacijom rtanjskog čaja i metformina nisu pokazale porast telesne mase u odnosu na kontrolnu grupu životinja, odnosno zdrave životinje. Dijabetične životinje koje su tretirane samo rtanjskim čajem pokazale su sa druge strane porast telesne mase u odnosu na zdrave životinje koje su tretirane samo fiziološkim rastvorom, pri čemu je ova razlika nakon 7. dana bila statistički značajna. Ovo nas navodi na zaključak da rtanjski čaj ne utiče na resorpciju glukoze iz tankog creva slično metforminu.

Masa jetri u svim grupama životinja koje su imale dijabetes, bez obzira na tretman, bile su statistički značajno veće u odnosu na zdrave životinje. Ovakav nalaz je očekivan zbog odlaganja viška glukoze u masnom tkivu i u jetri.

Rezultati prethodnih ispitivanja ekstrakta rtanjskog čaja (*Satureja montana* L.) na glikemijski status pacova variraju u zavisnosti od eksperimentalnih uslova izvođenja analize, kao i od porijekla biljnog materijala.

U našem istraživanju, metformin je kod eksperimentalnih životinja tokom celokupnog perioda posmatranja doveo do statistički značajnog smanjenje glukoze u krvi u odnosu na dijabetične životinje koje su primale fiziološki rastvor. Već smo rekli da metformin ima više mehanizama delovanja i upravo smanjenjem resorpcije glukoze iz GIT-a sa jedne strane i povećanjem osetljivosti perifernih tkiva odnosno povećanjem osetljivosti receptora na ciljnim ćelijama na glukozu sa druge strane može da se objasne ovako dobijeni rezultati (88, 89). Slična situacija se nalazi i kod dijabetesnih životinja koje su tretirane rtanjskim čajem. Vrednosti glikemije kod dijabetesnih životinja koje su tretirane samo metforminom i samo rtanjskim čajem su skoro identične. To ukazuje da i ekstrakt rtanjskog čaja značajno utiče na smanjenje glikemije. Iz prethodnog smo videli da tretman rtanjskim čajem ne utiče na telesnu masu životinja ali da utiče na smanjenje glikemije slično kao i metformin. Zbog toga možemo pretpostaviti da rtanjski čaj ne utiče na smanjenje resorpcije glukoze na nivou GIT-a pa zbog toga imamo porast telesne mase životinja koje su tretirane ovim ekstraktom, ali da efekat ispoljava na periferiji povećavajući iskoristljivost glukoze. Takođe, mogući mehanizam delovanja ekstrakta rtanjskog čaja jeste i delovanje na sam pankreas. U prilog ovoj tezi govori i studija sprovedena od strane Mirazi i saradnika, a koja govori u prilog tome da stepen sekrecije insulina kod životinja kod kojih je dijabetes izazvan streptozotocinom i

koje su tretirane hidroetanolnim ekstraktom listova biljke *Satureja montana L.* u dozi od 200 mg/kg značajno raste u odnosu na dijabetičnu grupu životinja koja nije primala ovaj ekstrakt (64). Uzimajući u obzir da je primena streptozotocina uzrokovala uništenje β ćelija pankreasa i ćelijske DNK, smatra se da primena ekstrakta *Satureja montana* doprinosi zaštiti ili oporavku oštećenog tkiva pankreasa od upale i nekroze izazvane dejstvom streptozotocina, povećavajući aktivnost superoksid dismutaze i glution peroksidaze, pa je stoga poboljšana ćelijska stimulacija i obnovljeno tkivo pankreasa (64).

Takođe, u studiji na pacovima koju su sproveli Abdolahi i saradnici, zabeležene su značajno niže vrednosti glukoze u krvi i triglicerida, kod grupe koja je dobijala etarsko ulje biljke *Satureja Khuzestanica* u odnosu na kontrolnu grupu kod koje je dijabetes izazvan streptozotocinom, a uticaj na snižavanje vrednosti glukoze je pripisan supresiji oksidativnog stresa (30). Rezultati u okviru našeg istraživanja pokazali su da su statistički značajno niže vrednosti triglicerida zabeležene u grupi koja je 14. i 28. dana dobijala ekstrakt rtanjskog čaja u odnosu na dijabetičnu grupu koja je dobijala fiziološki rastvor. Takođe, nalazimo statistički značajno više vrednosti triglicerida i u grupi dijabetičnih životinja koje su 28. dana tretirane metforminom u odnosu na životinje koje su tretirane ekstraktom rtanjskog čaja.

Dislipidemija kao jedna od najčešćih posledica dijabetes melitusa dovodi do povećanja vrednosti triglicerida i LDL holesterola i smanjenja HDL vrednosti, povećavajući rizik od nastanka prevremene ateroskleroze (90). Zabeleženo je da dijabetes melitus povećava i indekse oksidativnog stresa. Mnogi istraživači su objavili da oksidativni stres, naročito kiseonični slobodni radikali igraju ključnu ulogu u razvoju rezistencije na insulin. Zbog toga mogu da indukuju i stimulišu druge mehanizme oštećenja kod dijabetes melitusa. S obzirom na porast markera oksidativnog stresa u dijabetes melitusu, upotreba antioksidanasa je korisna u lečenju i smanjenju kliničkih simptoma dijabetes melitusa i mogućnošću njihove kontrole (91).

Postoji veoma mali broj objavljenih studija u kojima je ispitivan uticaj biljaka iz roda *Satureja* na lipidni status. U dosada objavljenim studijama u kojima je ispitivan uticaj biljke *Satureja Khuzestanica* postoji nedoslednost u rezultatima koji se odnose na uticaj ove biljke na lipidni status kod humanih i životinjskih modela. Vosough-Ghanbari i saradnici su objavili rezultate *in vivo* studije koja je ispitivala uticaj suplementa (tablete) koji je sadržao 250 mg suvog lišća biljke *Satureja Khuzestanica* na lipidni status hiperlipidemičnih pacijenata koji su imali dijabetes mellitus tip 2 (92). Nakon 60 dana tretmana preparat biljke *Satureja Khuzestanica* doveo je do značajnog snižavanja vrednosti ukupnog holesterola, LDL

holesterola kao i povećanja vrednosti HDL holesterola i ukupne antoksidativne aktivnosti, dok na vrednosti TG i glikemije nije bilo uticaja (92).

Hafezi i saradnici su ispitali uticaj vodenootanolnog ekstrakta biljke *Satureja Khuzestanica* na lipidni status pacova sa indukovanim dijabetesom (93). Ekstrakt je primenjivan u dozi 100 mg/kg u periodu od 30 dana a rezultati su pokazali značajno snižavanje vrednosti triglicerida, LDL i VLDL holesterola (93). U istraživanju sprovedenom od strane Abdollahi i saradnika potvrđen je uticaj *S. khuzestanica* na snižavanje nivoa glukoze i triglicerida diabetičnih i hiperlipidemičnih pacova, uz poboljšanje lipidne peroksidacije i ukupne antoksidativne aktivnosti, dok na ukupne vrednosti holesterola nije pokazan efekat (30).

Kada su u pitanju pokazatelji funkcije jetre i bubrega kod životinja kod kojih smo indukovali dijabetes streptozotocinom nismo uočili značajnu razliku u aktivnosti ovih pokazatelja između različitih eksperimentalnih grupa.

Hiperlipoproteinemija je metabolički poremećaj kod koga dolazi do povećanja nivoa lipoproteina u krvi, koji je jedan od značajnih faktora rizika za nastanak ateroskleroze, moždanog udara, koronarne bolesti srca i infarkta miokarda. Najčešće korićena grupa lekova za lečenje hiperlipoproteinemije su statini koji inhibiraju HMG-CoA reduktazu, enzim koji pretvara HMG-CoA u mevalonsku kiselinu, prekursor holesterola, čime dolazi do smanjenja sinteze holesterola u jetri.

Momtaz i saradnici ukazuju na činjenicu da pojedine vrste iz roda *Satureja* osim svojih analgetičkih, antiseptičkih, antibakterijskih, antivirusnih, antigljivičnih, antiinflamatornih, antiproliferativnih i mnogih drugih poželjnih efekata pokazuju i antihiperlipidemijska svojstva (94). Upotreba flavonoida izolovanih iz biljke *Satureja hortensis* kod hiperlipidemičnih zečeva imala je za rezultat značajno smanjenje koncentracije serumskog holesterola u odnosu na grupu koja je dobijala samo holesterol (95). Primenom eteričnih ulja biljke *Satureja khuzestanica* na pacovima značajno se smanjila aktivnost lipidne peroksidacije i time poboljšala ukupna antioksidativna snaga, čime se objašnjava i efekat snižavanja triglicerida (30). Pored toga, osnovni sastojci pomenute biljne vrste su izopropranoidi čija aktivnost može značajno smanjiti serumske nivoe holesterola. Autori navode da flavonoidi kojih ima u izobilju u biljkama ovog roda takođe potenciraju njihova antihiperlipidemijska svojstva (4).

Rezultati ove studije su pokazali da koncentracija LDL frakcije holesterola ima značajno niže vrednosti u grupama životinja kojima je indukovana hiperlipidemija, a koje su

tretirane ekstraktom biljke *Satureja montana* u odnosu na hiperlipidemične životinje tretirane samo fiziološkim rastvorom. Ekstrakt rtanjskog čaja nije pokazao pozitivne efekte na vrednosti HDL frakcije holesterola u poređenju sa ostalim ispitivanim grupama.

Na kraju oglada, vrednosti indeksa ateroskleroze u grupi životinja koje su dobijale ekstrakt rtanjskog čaja su značajno niže, u poređenju sa hiperlipidemičnim životinjama, tretiranim fiziološki rastvorom, što govori u prilog smanjenju ukupnog kardiovaskularnog rizika kod tih životinja.

Vrednosti parametara pokazatelja funkcije bubrega i jetre: AST, urea, kreatinin i mokraćna kiselina bile su značajno niže u grupi tretiranoj ekstraktom rtanjskog čaja u odnosu na kontrolnu grupu koja je bila na ishrani obogaćenoj mastima, $p < 0,05$.

Druge studije takođe govore u prilog antidijabetesnom i antihiperlipidemijskom dejstvu ove biljke, a autori to najvećim delom objašnjavaju sposobnošću njenih aktivnih sastojaka, pre svega katehina, fenolnih kiselina i flavonoida da se suprotstave poremećajima izazvanim reaktivnim kiseoničnim vrstama (9).

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta *Satureja montana* L. sprovedeno je na pacovima, korišćenjem paracetamola kao hepatotoksičnog sredstva. Toksične doze paracetamola proizvode visoke koncentracije N-acetil-p-beznohinon imina, što rezultira značajnom redukcijom redukovano glutaciona u jetri, glavnog endogenog peptida značajnog za prevenciju oštećenja tkiva reaktivnim, prooksidativnim jedinjenjima. U ovakvim stanjima nastaju teški oblici centrilobularne nekroze jetre, prvenstveno zbog ireverzibilnog, kovalentnog vezivanja prooksidantnog N-acetil-p-beznohinon imina za proteinsku strukturu hepatocita (96). Rezultati koje smo dobili nisu u korelaciji sa prethodnim istraživanjem gde je pretretman metanolnim ekstraktom *Satureja macrostema*, *Lamiaceae* (200, 400 i 600 mg/kg), pre toksična doza CCl₄ smanjio povišene vrednosti AST, ALT, ALP i povećao nivo HDL (97). Takođe, u jednoj studiji pretretman ekstraktom *Satureja montana* L. pre toksične doze CCl₄ pokazuje značajno niže nivoe AST, ALT i bilirubina (98).

U našem istraživanju pretretman ekstraktom *Satureja montana* L. pokazao je smanjenje koncentracije ALP u odnosu na grupu koja je dobila paracetamol, međutim ALT, AST i GGT nisu izmenjeni i statistički su povećani u poređenju sa kontrolnom grupom (fiziološki rastvor), što ukazuje na curenje ćelija. Iako je citoarhitektonizam u histološkim uzorcima bio netaknut u svim grupama, u grupama koje su dobijale toksičnu dozu paracetamola primećena je povišena akumulacija PAS i glikogena, što ukazuje na oštećenje ćelijske membrane. Ovaj rezultat je u korelaciji sa propustom povišenog nivoa jetrenih

enzima koji je nastao usled oštećenja ćelijskih membrana hepatocita. Pored toga, povećan je nivo LPk i smanjen GR u grupi koja je dobijala paracetamol, što ukazuje na smanjeni antioksidativni kapacitet tkiva jetre, ali je pretretman sa ekstraktom *Satureja montana* L. sprečio ovaj efekat toksične doze paracetamola, vraćajući nivo antioksidativnih enzima na nivo kao u grupi tretiranoj samo fiziološkim rastvorom. S obzirom da ekstrakt *Satureja montana* L. značajno smanjuje intenzitet lipidne peroksidacije i potencira aktivnost enzima antioksidativne zaštite, može se zaključiti da upotreba ovog ekstrakta štiti životinje od reaktivnih kiseoničnih vrsta i smanjuje efekte izloženosti oksidativnom stresu.

Uticao na oksidativno oštećenje lipida, odnosno intenzitet peroksidacije lipida procenjen je indirektno kroz koncentraciju malondialdehida, koji je sekundarni proizvod u ovom procesu. Malondialdehid je glavni reaktivni aldehid koji nastaje kao rezultat peroksidacije bioloških membrana koje sadrže polinezasićene masne kiseline (94, 99). Katalaza, kao jedan od najvažnijih enzima u zaštiti organizma od oksidativnog stresa, pretežno se nalazi u eritrocitima i u jetri. Funkcija CAT je zaštita ćelijskih organela, posebno mitohondrija, koje su najugroženije organele usled ćelijske respiracije (99, 100). U našim rezultatima koncentracija katalaze u grupi životinja tretiranih ekstraktom *Satureja montana* L. pre toksične doze paracetamola je veća u poređenju sa grupom koja je tretirana fiziološkim rastvorom pre toksične doze paracetamola, ali nije bilo statističkih značajnih razlika između grupa. Ovaj rezultat se može objasniti kratkim trajanjem ogleda u periodu od 7 dana.

Superoksid dismutaza je takođe pokazala svoju antioksidativnu aktivnost, jer je značajno veću aktivnost ovog enzima pokazala grupa koja je bila tretirana fiziološkim rastvorom pre toksične doze paracetamola u poređenju sa grupom koja je primala ekstrakt *Satureja montana* L. pre toksične doze paracetamola. Mehanizam ovih efekata se objašnjava činjenicom da aktivni principi ekstrakta *Satureja montana* L. sprečavaju razvoj svih štetnih efekata oksidativnog stresa, na različite načine i u različitim tkivima. Uzimajući u obzir da je ekstrakt *Satureja montana* L. bogat fenolnim jedinjenjima i flavonoidima, koji su visoko efikasni hvatači slobodnih radikala, njima možemo pripisati opštu antioksidativnu aktivnost (101). Međutim, ova činjenica ne objašnjava u potpunosti rezultate našeg istraživanja jer nismo dobili statistički značajne rezultate u pogledu aktivnosti katalaze.

Direktni bilirubin u serumu je bio statistički povišen u grupama tretiranim toksičnom dozom paracetamola u poređenju sa kontrolnom grupom, međutim nivo direktnog bilirubina je bio statistički niži u grupi prethodno tretiranoj ekstraktom *Satureja montana* L. Ovaj nalaz doprinosi antioksidativnom potencijalu ekstrakta. U našoj studiji ispitivana je koncentracija

uree, kreatinina i mokraćne kiseline u serumu kao biomarkera funkcije bubrega. Ovi biohemijski parametri su povećani u grupi koja je primala paracetamol, ali je ponovljena upotreba ekstrakta *Satureja montana* L. sprečila povećanje njihove koncentracije.

Ovo je u korelaciji sa visokim nivoom rozmarinske kiseline koji je izmeren u našim ekstraktima koji su pokazali hepatoprotektivne efekte protiv oštećenja jetre izazvanih ugljen-tetrahloridom kod pacova (102).

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ispitivanim u ovoj studiji kretao se u opsegu od 1312,1378 mg GA/g do 1664,78 mg GA/g, dok je sadržaj ukupnih flavonoida varirao od 122,85 do 224,02 mg QE/g.

Dobijene vrednosti ukupnih fenola u našem istraživanju bile su više od dobijenih vrednosti iz studija koje su sprovedi López-Cobo i saradnici za *Satureja montana subsp. Kitaibelii*, (25,82 mg GAE/g) (103), Hajdari i saradnici za metanolni ekstrakt *Satureja montana* L. (68,1–102,6 mg CAE/g) (104), Čavar Zeljković i saradnici za metanolni ekstrakt *Satureja montana* L. (614,7 mg GAE/g) (105), i Serrano i saradnici za etanolni ekstrakt biljke *Satureja montana* (111,18 mg GAE/g) (56) i više od vrednosti koje su objavili Hudz i saradnici navodeći da se koncentracija TPC za tinkturu *Satureja montana* kretala od 13,0 - 22,7 mg GAE/g i 26,16 - 45,63 mg rutina/g (106).

Četković i saradnici su prijavili da je ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u etil acetatnom (969,43 µg CAE/g) i n-butanolnom (1358,14 µg CAE/g) ekstraktu *Satureja montana subsp. Kitaibelii* bio značajno veći nego u vodenom ekstraktu (96,36 µg/g), takođe Gopčević i saradnici su ispitivanjem biljke *Satureja Kitaibelii* prijavili vrednosti ukupnih fenola u opsegu 105.06-195.95 GAE/g (81, 107).

Sadržaj flavonoida u ekstraktu rtajskog čaja koji je ispitivan u okviru ove studije, bio je veći od sadržaja flavonoida u metanolnom ekstraktu biljke *S. montana* L. (38,3-67,0 mg CA/g) i veći od sadržaja flavonoida u etanolnom ekstraktu biljke *Satureja kitaibelii* 29,18-44,0 mg Qu/g (81, 104).

DPPH vrednosti koje su bile u opsegu 53,64-80,66% ukazuju da naš ekstrakt pokazuje značajan antioksidativni potencijal. Najveća vrednost DPPH zabeležena je u 50% etanolnom ekstraktu. Studija koju su sprovedi Četojević-Simin i saradnici pokazuje da su n-butanolni, metanolni i vodeni ekstrakt *Saturaja montana* L. pokazali odličan antioksidativni efekat prema DPPH metodi, (u koncentracijama 0.20 i 0.30 mg/ml, antioksidatina aktivnost=100%) (63). Takođe, i druge studije potvrđuju antioksidativni efekat etanolnog ekstrakta *Satureja*

montana L. sa DPPH aktivnošću od 108,79 µg/ml i *Satureja Kitaibelii* 71,20 – 125,65 µg/mL (56, 81).

Polarnost rastvarača ima značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost. Veća sposobnost inhibicije DPPH radikala u ekstraktu dobijenom nakon maceracije sa alkoholnim rastvaračima u odnosu na vodu može biti objašnjena činjenicom da etanolni rastvarači lakše razaraju ćelijski zid usitnjene droge, u poređenju sa vodom.

FRAP vrednosti ispitivanog ekstrakta bile su u rasponu od 27,75-43,12 FRAP jedinica, a najveća vrednost je detektovana u 50% metanolnom ekstraktu. FRAP vrednosti *Satureja montana* L. koje su dobili Serrano i saradnici iznosile su 221,74 i 271,88 mmol Fe/g za hladne i vruće vodene ekstrakte, respektivno, a za ekstrakt etanola 93,60 mmol Fe/g (56). U studiji koju su sproveli Gopčević i saradnici za *Satureja Kitaibelii* FRAP vrednosti za etanolni ekstrakt bile su u opsegu 0,74-1,94 mmol Fe/mg, sa najvećom aktivnošću za ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom (81).

Sposobnost neutralizacije hidroksil radikala (OH·) (%) ispitivanog ekstrakta bila je u opsegu 7,25-90,4 %, a najveća aktivnost je pokazana u ekstraktu pripremljenom sa rastvorom 50% metanola. Naši rezultati se mogu uporediti sa rezultatima Četković i saradnici za *Satureja montana* L. *subsp. Kitaibelii* ekstrakt sa prijavljenim vrednostima od 42,67 do 100%, pokazali su da se sposobnosti ispitivanih uzoraka da uklone hidroksilne radikale opadaju sledećim redosledom: n-butanol>etil acetat>voda>hlороform (107).

Pošto su naši rezultati prvi koji se odnose na određivanje sposobnost neutralizacije azot-oksida (NO) (%) u ovoj biljci, dostupnih literaturnih podataka za poređenje nema.

Multivarijantna analiza je pokazala različita svojstva ispitivanih rastvarača. Očigledno, koncentracija rastvarača je pokazala da se različiti metaboliti i kapacitet neutralizacije radikala takođe menjaju u zavisnosti od toga da li je za ekstrakciju korišćeno 50% ili 90% alkohol. Sve u svemu, vodeni ekstrakti su pokazali najmanji antioksidativni kapacitet. Na osnovu tipa rastvarača u analizi PCA plot, izbor rastvarača koji se koristi za medijum za ekstrakciju ima veliki uticaj na antioksidativni potencijal. Zanimljivo je da 90% metanolni ekstrakti pokazuju neku sličnost sa 50% etanolnim ekstraktima, i oni imaju tendenciju da se grupišu blizu kao što se vidi na *slici II C*. Kada je reč o 50% metanolnim ekstraktima, oni imaju potpuno drugačija svojstva u poređenju sa ostalima. Ovu koncentraciju karakteriše visok kapacitet neutralizacije slobodnih radikala, posebno NO· i OH· radikala, a takođe je karakteriše i visok sadržaj ukupnih fenola. To može značiti da bi prag za efikasnu ekstrakciju antioksidativnih jedinjenja mogao biti niži nego što se obično

misli. Da bi se dodatno potvrdila ova tvrdnja, možda će biti potrebni dodatni eksperimenti, sa ciljem da se precizno odredi najefikasniji rastvarač i koncentracija. Bolji antioksidativni efekat se odnosi na bolju rastvorljivost rozmarinske kiseline u metanolu i etanolu nego u vodi (108). Pokazalo se da metanolni ekstrakti *Satureja hortensis* L. imaju farmakološki važna fenolna jedinjenja, posebno rozmarinsku kiselinu istu kao i *Satureja montana* L. u našoj studiji, te je stoga dragocena za farmaceutske i funkcionalne formulacije hrane u cilju održavanja normalnog zdravstvenog stanja ili kao lek kod raznih bolesti izazvanih oksidativnim stresom (109).

Sama upotreba ekstrakta *Satureja montana* L. ne utiče na aktivnost glikogena niti na broj tkivnih makrofaga, odnosno Kupferovih ćelija. S druge strane, sam ekstrakt *Satureja montana* L. u manjoj meri izaziva aktivaciju CIP2E1. Uz upotrebu paracetamola i ekstrakta *Satureja montana* L., hepatociti su sa značajno očuvanom citoarhitektonikom i sa nešto izraženom akumulacijom glikogena, što je uočeno i u kontrolnoj grupi paracetamola. Upotreba ekstrakta *Satureja montana* L. ukazuje na antiinflamatorno dejstvo sa smanjenjem broja Kupferovih ćelija u odnosu na grupu koja je dobila toksičnu dozu paracetamola. Takođe u poređenju sa grupom koja je dobila paracetamol, ekstrakt *Satureja montana* L. je izazvao manji induktivni efekat u smislu CIP2E1. Ovi rezultati sugerišu da ekstrakt *Satureja montana* L. ima antiinflamatorno dejstvo, s obzirom na to da smanjuje aktivaciju CIP2E1 i sprečava indukciju stanja oksidativnog stresa.

8. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezulta istraživanja doneli smo sledeće zaključke:

1. Ispitivani ekstrakt biljke *Satureja montana* L. predstavlja bogat izvor fenolnih jedinjenja za koje je dokazana antioksidativna aktivnost. Među ovim jedinjenjima najzastupljenija je rozmarinska kiselina. Pored nje u značajnoj meri prisutne su još i hlorogena, p-kumarinska i kafeinska kiselina.

2. Ekstrakt biljke *Satureja montana* L. slično kao i metformin uzrokovao je smanjenje glikemije kod dijabetičnih pacova. Takođe, kod dijabetičnih pacova, primećeno je statistički značajno smanjenje vrednosti triglicerida u serumu kod životinja koje su 28 dana tretirane ekstraktom biljke *Satureja montana* L. dok na ostale lipidne frakcije ovaj ekstrakt nije ispoljio značajniji uticaj. Kada je u pitanju funkcija jetre, dugotrajni tretman dijabetičnih životinja ispitivanim ekstraktom uzrokovao je statistički značajno smanjenje vrednosti ukupnog bilirubina i smanjenje vrednosti AST i direktnog bilirubina koje nije bilo statistički značajno. Na vrednosti ALT i ALP ovaj ekstrakt nije ispoljio nikakav uticaj. Dugotrajni tretman dijabetičnih životinja ekstraktom biljke *Satureja montana* L. doveo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti kreatinina dok na vrednosti uree i mokraćne kiseline nije ispoljio nikakav uticaj.

3. Dvonedeljni tretman ekstraktom biljke *Satureja montana* L. životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima statistički značajno je smanjio vrednosti ukupnog holesterola. Vrednosti ukupnog holesterola su i posle 28 dana bile niže kod ovih životinja ali nisu bile statistički značajne. Vrednosti LDL holesterola su takođe bile statistički značajno manje kao posle kratkotrajnog tako i posle dugotrajnog tretmana životinja ovim ekstraktom. Vrednosti HDL holesterola bile su statistički značajno smanjene posle 14 dana tretmana ali neznatno niže u odnosu na kontrolu grupu životinja nakon 28 dana. Uopšteno, indeks ateroskleroze je bio niži kod životinja tretiranih ekstraktom biljke *Satureja montana* L. pri čemu je ova razlika tokom dugotrajnog tretmana postala statistički značajna. Dugotrajni tretman životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima ekstraktom biljke *Satureja montana* L. uzrokovao je statistički značajno smanjenja vrednosti AST dok na ostale pokazatelje funkcije jetre ovaj ekstrakt nije ispoljio bitnije efekte. Ekstrakt biljke *Satureja*

montana L. pozitivno je uticao na funkciju bubrega kod životinja koje su dobijale hranu obogaćenu lipidima i doveo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti uree, kreatinina i mokraćne kiseline u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

4. Kod primene toksične doze paracetamola ekstrakt biljke *Satureja montana* L. ispoljio je hepato-protektivni, antiinflamatorni i antioksidativni potencijal. Ovaj ekstrakt uzrokovao je kod životinja kod kojih je primenjena toksična doza paracetamola statistički značajno smanjenje vrednosti ALP i direktnog bilirubina kao i smanjenje vrednosti AST, ALT i GGT koje nije bilo statistički značajno. Takođe, pokazatelji funkcije bubrega bili su niži kod životinja koje su prethodno tretirane ekstraktom biljke *Satureja montana* L., sa vrednostima kreatinina koje su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolu. Enzimi pokazatelji oksidativnog stresa pokazali su *in vivo* antioksidativnu aktivnost, odnosno aktivnost lipidne peroksidaze bila je statistički značajno smanjena, dok je aktivnost CAT, GR i SOD bila povećana ali bez statističke značajnosti. Pored toga, pretretman ekstraktom biljke *Satureja montana* L. uzrokovao je smanjenje broja inflamatornih ćelija zajedno sa aktivnošću enzima CIP2E1.

5. Koristeći analizu glavnih komponenti uočeno je da selekcija rastvarača ima veliki uticaj na antioksidativni efekat suvog ekstrakta rtanjskog čaja. Trenutni rezultati pokazuju da suvi ekstrakt rtanjskog čaja ima potencijal za suplementaciju antioksidansima sa smanjenjem efekta na oksidativno oštećenje jetre na životinjskom modelu, što sugeriše potencijalnu upotrebu u prirodnim proizvodima bogatim antioksidansima. Potrebno je sprovesti dalja istraživanja uzimajući u obzir izbor medijuma za formulaciju ili novog nosača (poput čvrstih nanočestica lipida) za suvi ekstrakt *Satureja montana* L..

9. LITERATURA

1. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*. 2012;6(11):1.
2. Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima. Službeni glasnik RS br. 30/2010, 107/2012, 113/2017 - dr. zakon i 105/2017 - dr. zakon [cited: 2019 January 20]. Available from: https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_lekovima_i_medicinskim_sredstvima.html
3. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda. Službeni glasnik RS br. 45/2010, 27/2011, 50/2012, 21/2015, 75/2015. c 2015 [cited: 2019 January 20]. Available from: <https://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik-zdravstvenoj-ispravnosti-dijetetskih-proizvoda.html>
4. Bezić N, Samanić I, Dunkić V, Besendorfer V, Puizina J. Essential oil composition and internal transcribed spacer (ITS) sequence variability of four South-Croatian *Satureja* species (Lamiaceae). *Molecules*. 2009;14(3):925-38.
5. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991; 40(4):405-12.
6. Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhão RC, Abdalla DS. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 1995; 117(1):61-71.
7. Slavkowska V, Jancic R, Bojovic S, Milosavljevic S, Djokovic D. Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* wierz. ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula. *Phytochemistry*. 2001;57(1):71-6.
8. Bräuchler C, Meimberg H, Heubl G. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae)—taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010;55(2):501-23.
9. Jančić R. *Botanika farmaceutika*. 4 izd. Beograd: Službeni glasnik; 2011.
10. Dodoš T, Rajčević N, Tešević V, Matevski V, Janačković P, Marin PD. Composition of Leaf n-Alkanes in Three *Satureja montana* L. Subspecies from the Balkan Peninsula: Ecological and Taxonomic Aspects. *Chemistry & biodiversity*. 2015;12(1):157-69.
11. Kovačević N. *Osnovi farmakognozije (treće izdanje)*. Srpska školska knjiga. 2004.
12. Singh G. *Plant Systematics, 3/ed.: An Integrated Approach*. CRC Press; 2016 Apr 19.
13. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003;64(1):3-19.
14. Mihajilov-Krstev T, Radnović D, Kitić D, Jovanović V, Mitić V, Stojanović-Radić Z, et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of *Satureja montana* L. ssp *montana* essential oil. *Open Life Sciences*. 2014;9(7):668-77.

15. Čavar S, Maksimović M, Šolić M, Jerković-Mujkić E, Bešta R, Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils, *Food Chem.* 2008; 111:648–53.
16. Četković GS, Mandić AI, Čanadanović-Brunet JM, Djilas SM, Tumbas VT. HPLC screening of phenolic compounds in winter savory (*Satureja montana* L.) extracts. *Journal of liquid chromatography & related technologies.* 2007;30(2):293-306.
17. Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food chemistry.* 2009;112(1):77-83.
18. Ibraliu A, Dhillon BS, Faslia N, Stich B. Variability of essential oil composition in Albanian accessions of *Satureja montana* L. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2013;4(14):1359-64.
19. Bezić N, Skočibušić M, Dunkić V. Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica.* 2005;64(2):313-22.
20. PubChem. 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thymol> Accessed 27.06.2017
21. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 2016;210:402-14.
22. Deb DD, Parimala G, Saravana Devi S, Chakraborty T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chem Biol Interact.* 2011;193(1):97-106.
23. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak, V. Anticancer activity of essential oils: a review. *J Sci Food Agric.* 2013;93(15):3643-53.
24. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Bianchi T, Bordoni L, Marabini L. Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology.* 2006;77(3):130-6.
25. Bhandari SS, Kabra MP. To evaluate anti-anxiety activity of thymol. *Journal of Acute Disease.* 2014;3(2):136-40.
26. Lee SJ, Umano T, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 2005;91(1):131-7.
27. Gehan IK, Rasoul A, Abdelgaleil S. Comparative anti fungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pest Biochem Physiol.* 2012;103(1):56-61.
28. PubChem. 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvacrol#section=Top>. Accessed 27.06.2017.

29. Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food control*. 2007;18(12):1518-23.
32. Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramania C, Pugalendi KV. Antihyperlipidemic effect of carvacrol on D-galactosamine induced hepatotoxic rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2009;20(1):15-28.
30. Abdollahi M, Salehnia A, Mortazavi S, Ebrahimi M, Shafiee M, Fouladian F, et al. Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja Khuzestanica* in rat in vivo: a toxicopharmacological study. *Medical Science Monitor* 2003;9(9):331-35.
31. Melo FH, Venâncio ET, De Sousa DP, De França Fonteles MM, De Vasconcelos SM, Viana GS, et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2010;24(4):437-43.
32. Sroka Z. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2005;60(11-12):833-43.
33. Karamac M, Kosińska A, Pegg RB. Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2005;14(2):165-70.
34. Lee KG, Shibamoto T, Takeoka GR, Lee SE, Kim JH, Park BS. Inhibitory effects of plant-derived flavonoids and phenolic acids on malonaldehyde formation from ethyl arachidonate. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(24):7203-7.
35. Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JL, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids-a structure-activity relationship study. *Free Radic. Res*. 2006;40:433-42.
36. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*. 2006;78(25):2872-88.
37. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*. 1996;20(7):933-56.
40. Kremer D, Kosir IJ, Koncic MZ, Cerenak A, Potocnik T, Srecec S, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (Lamiaceae). *Current drug targets*. 2015;16(14):1623-33.
41. Gülçin İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 2006;217(2):213-20.
42. Reyes MT, Mourelle M, Hong E, Muriel P. Caffeic acid prevents liver damage and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in the rat. *Drug development research*. 1995;36(3):125-8.
43. Chen JH, Ho CT. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem*. 1997;45:2374-78.
44. Lu YR, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem*. 2001;75(2):197-202.

45. Pérez-Fons L, Garzón MT, Micol V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;58(1):161-71.
45. Lin L, Cui C, Wen L, Yang B, Luo W, Zhao M. Assessment of in vitro antioxidant capacity of stem and leaf extracts of *Rabdosia serra* (Maxim.) Hara and identification of the major compound. *Food Chem*. 2011;126(1):54-9.
46. Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob. Agents Ch*. 2007;51:3367-70.
47. Anusuya C, Manoharan S. Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. 2011;30:199-211.
48. Pietsch K, Saul N, Chakrabarti S, Stürzenbaum SR, Menzel R, Steinberg CE. Hormetins, antioxidants and prooxidants: Defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology*. 2011;12(4):329-47.
49. Wu CF, Kariotib A, Rohra D, Bilia AR, Efferth T. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells. *Food Chem*. 2016;15:192-297.
50. Nabavi SF, Tenore GC, Daglia M, Tundis R, Loizzo MR, Nabavi SM. The cellular protective effects of rosmarinic acid: From bench to bedside. *Curr. Neurovasc. Res*. 2015;12(1):98-105.
51. Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidant in plants: Location and functional significance. *Plant Sci*. 2012;196:67-76.
52. Anand P, Singh B. Flavonoids as lead compounds modulating the enzyme targets in Alzheimer's disease. *Med Chem Res*. 2013;22:3061-75.
53. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13:572-84.
54. Silva M, Santos M, Caroco G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radic. Res*. 2002;36(11):1219-27.
55. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalaska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2004;55(4):279-90.
56. Serrano C, Matos O, Teixeira B, Ramos C, Neng N, Nogueira J, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *J. Sci. Food Agric*. 2011;91(9):1554-60.
57. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007;18(5):414-20.
58. Carramiñana JJ, Rota C, Burillo J, Herrera A. Antibacterial efficiency of spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork, *J. Food Protect*. 2008;71(3):502-8.

59. Pepeljnjak S, Stanic G, Potocki P. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Satureja montana* ssp. *montana*. *Acta Pharmaceutica*. 1999;49:65-9.
60. Haloc E, Toska V, Baldisserotto A, Goci E, Vertuani S, Manfredini S. Evaluation of antifungal activity of *Satureja montana* essential oil before and after inclusion in β -cyclodextrine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6(7):189-91.
61. Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, Ueba N, et al. Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biol Pharm Bull*. 1998;21(8):829-33.
62. Čavar S, Šolić ME, Maksimović M. Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt. Biokovo. *Botanica serbica*. 2013;37(2):159-65.
63. Četojević-Simin DD, Čanadanović-Brunet JM, Bogdanović GM, Četković GS, Tumbas VT, Djilas SM. Antioxidative and antiproliferative effects of *Satureja montana* L. extracts. *J. BUON*. 2004;9(4):443-49.
64. Mirazi N, Rezaei M, Mirhoseini M. Hypoglycemic effect of *Satureja montanum* L. hydroethanolic extract on diabetic rats. *J HerbMed Pharmacol*. 2016;5(1):17-22.
65. Lampronti I, Saab A.M, Gambari R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int. J. Oncol*. 2006;29(4):989-95.
66. Zavatti M, Zanolini P, Benelli A, Rivasi M, Baraldi C, Baraldi M. Experimental study on *Satureja montana* as a treatment for premature ejaculation. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;133(2):629-33.
67. Abd El Tawab AM, Shahin NN, AbdelMohsen MM. Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chemico-biological Interactions*. 2014;224:196-205.
68. Stanic G, Samaržija I. Diuretic Activity of *Satureja montana* subsp. *montana* extracts and oil in rats. *Phytotherapy Research*. 1993;7(5):363-6.
69. Silva FV, Martins A, Salta J, Neng NR, Nogueira JM, Mira D, et al. Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(24):11557-63.
70. 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.
71. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press; 1974;67:674-84.
72. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*. 1974;30(6):665-7.
73. McCord, J.M.; Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.

74. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods enzymol.* 1999;299:152-78.
75. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 2002;10(3):178-82.
76. Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques.* 2000;11(5):330-8.
77. Tsai P, Tsai TH, Yu C, Ho SC. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of Green Tea. *Food Chem.* 2007;103(1):181-7.
78. Benzie I.F.; Strain J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods enzymol.* 1999;299:15-27.
79. Verma AR, Vijayakumar M, Rao CV, Mathela CS. In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. *Food Chem. Toxicol.* 2010;48(2):704-9.
80. Gião MS, Gomes S, Madureira AR, Faria A, Pestana D, Calhau C et al. Effect of in vitro digestion upon the anti-oxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia sp.* and *Satureja montana*. *Food Chem.* 2012;131(3):761-7.
81. Gopčević K, Grujić S, Arsenijević J, Karadžić I, Izrael-Živković L, Maksimović Z. Phytochemical Properties of *Satureja kitaibelii*, Potential Natural Antioxidants: a New Insight. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2019;26:1-6.
82. Bors W, Langebartels C, Michel C, Sandermann H. Polyamines as Radical Scavengers and Protectants against Ozone Damage. *Phytochemistry.* 1989;28:1589-95.
83. Buckley C, Bund SJ, McTaggart F. Oxidized low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxations in isolated large and small rabbit coronary arteries. *J. Auton. Pharmacol.* 1996;16:261-7.
84. Heinloth A, Brune B, Fischer B, Galle J. Nitric oxide prevents oxidised LDL-induced p53 accumulation, cytochrome c translocation and apoptosis in macrophages via guanylate cyclase stimulation. *Atherosclerosis.* 2002;162:93-101.
85. Pratico D, Lawson JA, Rokach J, Fitzgerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001;12:243-7.
86. Thulesen J, Ørskov C, Holst JJ, Poulsen SS. Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology.* 1997;138(1):62-8.
87. Gupta RC, Chang D, Nammi S, Bensoussan A, Bilinski K, Roufogalis BD. Interactions between antidiabetic drugs and herbs: an overview of mechanisms of action and clinical implications. *Diabetol Metab Syndr.* 2017;9(1):59.

88. Pournaghi P, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S, Foroughi A. An investigation on body weights, blood glucose levels and pituitary-gonadal axis hormones in diabetic and metformin-treated diabetic female rats. *Vet Res Forum*. 2012;3(2):79-84.
89. Agencija za lekove i medicinska sredstva [Internet], Sažetak karakteristika leka Glucophage 1000mg, film tablete; [cited 2020 July 14]. Available from: https://www.alims.gov.rs/doc_file/lekovi/smpc/515-01-02209-19-001.pdf.
90. Ugochukwu NH, Babady NE, Cobourne M, Gasset SR. The effect of Gongronema latifolium extracts on serum lipid profile and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *J Biosci*. 2003;28(1):1–5.
91. Ahmadvand H, Tavafi M, Shahsavari G, Khosrobeigi A, Bagheri S, Abdolahpour F. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of Satureja khuzestanica essential oil in alloxaninduced type 1 diabetic rats. *Zahedan J Res Med Sci*. 2013;15(8):26–9.
92. Vosough-Ghanbari S, Rahimi R, Kharabaf S, Zeinali S, Mohammadirad A, Amini S, et al. Effects of Satureja khuzestanica on Serum Glucose, Lipids and Markers of Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2010;7(4):465-70.
93. Hafezi H, Vahdati A, Sepehrimanesh M. Effect of Satureja khuzestanica Jamzad extract on serum lipid profile, blood glucose level and body weight gain in diabetes mellitus: a Rattus norvegicus model. *Comp Clin Pathol* 2015;24:1033–7.
94. Momtaz S, Abdollahi M. A Systematic Review of the Biological Activities of Satureja L. Species. *Int. J. Pharmacol*. 2010;6(4):454-61.
95. Mchedlishvili D, Kuchukashvili Z, Tabatadze T, Davitaia G. Influence of flavonoids isolated from Satureja hortensis L. on hypercholesterolemic rabbits. *Research Letter* 2005;37(4):259-60.
96. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med*. 2007;43(4):477-503.
97. Gutierrez, R.M.; Navarro, Y.T. Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of Satureja macrostema. *Pharmacogn. Mag*. 2010;6(22):125-31.
98. Čebovic T, Vladić J, Gavarić A, Zeković Z, Vidović S. Assessment of antioxidant and hepatoprotective potential of Satureja montana extracts against CCl4 induced liver damage. *Lekovite sirovine*. 2019;39:5-10.
99. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci*. 2004;61(2):192-208.
100. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant defenses. *Braz. J. Med Biol. Res*. 2005;38(7):995-1014.
101. 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 Chem. Toxicol*. 2008;46:724-32.

102. Touiss I, Ouahhoud S, Harnafi M, Khatib S, Bekkouch O, Amrani S, et al. Toxicological Evaluation and Hepatoprotective Efficacy of Rosmarinic Acid-Rich Extract from *Ocimum basilicum* L. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;2021:6676998.
103. López-Cobo A, Gómez-Caravaca AM, Švarc-Gajić J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *J. Funct. Foods.* 2015; 18:1167–78.
104. Hajdari A, Mustafa B, Kaçiku A, Mala X, Lukas B, Ibraliu A et al. Chemical composition of the essential oil, total phenolics, total flavonoids and antioxidant activity of methanolic extracts of *Satureja Montana* L. *Rec. Nat. Prod.* 2016;10(6):750–60.
105. Ćavar Zeljković S, Topčagić A, Požgan F, Štefane B, Tarkowski P, Maksimović M. Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L. *Ind. Crop. Prod.* 2015;76:1094–99.
106. Hudz N, Makowicz E, Shanaida M, Białoń M, Jasicka-Misiak I, Yezerska O, et al. Phyto-chemical evaluation of tinctures and essential oil obtained from *Satureja montana* herb. *Molecules.* 2020;25(20):4763.
107. Ćetković GS, Čanadanović-Brunet JM, Djilas SM, Tumbas VT, Markov SL, Cvetković DD. Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* extracts. *Int. J. Mol. Sci.* 2007;8(10):1013-27.
108. Wüst Zibetti A, Abdelkarim A, Claumann CA, Eladeb A, Adberraba M. Correlation of solubility and prediction of the mixing properties of rosmarinic acid in different pure solvents and in binary solvent mixtures of ethanol+water and methanol+water from (293.2 to 318.2) K. *J. Mol. Liq.* 2016;216:370-6.
109. Boroja T, Katanić J, Rosić G, Selaković D, Joksimović J, Mišić D et al. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 2018;118:252-63.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА РТАЊСКОГ ЧАЈА (<i>SATUREJA MONTANA L. (LAMIACEAE)</i>) НА ХИПЕРГЛИКЕМИЈУ И ХИПЕРЛИПИДЕМИЈУ КОД ПАЦОВА СОЈА <i>W1STAR</i>
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Завод за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду б) в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије, молекулска медицина Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
1. Опис података
1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Спроведено истраживање је обухватило претклиничко испитивање ефеката екстракта ртаљског чаја на моделу пацова соја <i>W1STAR</i> – утицај на гликемију, липиде, биохемијске параметаре показатеља функције јетре и бубрега код здравих и животиња са експериментално изазваним дијабетесом, утицај на гликемију, липиде, биохемијске параметаре показатеља функције јетре и бубрега код здравих и животиња које су биле на исхрани обогаћеној липидима; антиоксидативни ефекат – <i>in vitro, ex vivo</i> ; хистолошка евалуација ефеката.
1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови

- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- д) узорци ткива: навести врсту **панкреас, јетра, трбушна аорта**
- ђ) снимци, фотографије: навести врсту **фотографије хистолошких препарата**
- е) текст, навести врсту _____
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

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

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли **велики број варијабли**
- _____

- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **велики број меренја на 78 експерименталних животиња**

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је **7 дана**
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

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

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип **израда докторске дисертације**

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____

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

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

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

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

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

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

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

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

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

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertation.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да*
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____*
- в) Не*

Ако је одговор не, навести разлог _____

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

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

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

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

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

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

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

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

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

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

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

података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

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

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

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Протокол огледа одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду, одобрење број 01-90/17-1, 02.10.2015.

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

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

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

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

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

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

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

Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

6. Улоге и одговорност

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

Маја Штајнбах, stajnbah@yahoo.com

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

Маја Штајнбах, stajnbah@yahoo.com

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

Маја Штајнбах, stajnbah@yahoo.com