



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Александра Г. Петровић

**Компаративна анализа ефеката мешавине
лековитог биља и деривата сулфонилуреа на
секундарне компликације дијабетеса код пацова**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе, осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.

Ниш, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Aleksandra G. Petrović

**Comparative analysis of effects of herbal mixture
and sulfonylurea derivatives on secondary
complications of diabetes in rats**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2023

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Љубиша Ђорђевић ванредни професор на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Нишу
Наслов:	Компаративна анализа ефеката мешавине лековитог биља и деривата сулфонилурее на секундарне компликације дијабетеса код пацова
Резиме:	<p>Дијабетес је системски метаболички поремећај угљених хидрата и липида, где хронична хипергликемија доводи до низа секундарних компликација попут дијабетесног поремећаја не-алкохолне масне јетре, нефропатије, ретинопатије, остеопорозе и Алцхајмерове болести. Прописана стандарна фармаколошка терапија дијабетеса се фокусира на одржавање нормалног нивоа шећера у крви, али не и на секундарне компликације које су чешћи узрок смрти оболелих од дијабетеса. С тога су циљеви студије били испитивање и упоређивање биолошке активности три мешавине лековитог биља са потенцијалним антидијабетским својствима и компаративно испитивање ефеката најефективније биљне мешавине и једне од група стандардне терапије дијабетеса – деривата сулфонилурее, на секундарне компликације дијабетеса. Упоредна анализа биолошких активности биљних мешавина испитане су <i>in vitro</i> тестовима антиоксидативне, антиамилазне и цитопротективне активности и тестом цитотоксичности, док је компаративни ефекат најефективније биљне мешавине и деривата сулфонилурее на дијабетес и његове секундарне компликације утврђен <i>in vivo</i> студијом на анималном моделу. Резултати <i>in vitro</i> испитивања показали су да је биљна мешавина-I показала највећу антиоксидативну, антиамилазну и цитопротективну активности, а притом и низак ниво цитотоксичности у поређењу са остале две биљне мешавине, на основу чега је процењена као најефективнија и најбезбеднија. HPLC анализом је у препарату биљне мешавине-I идентификовано 21 полифенолно једињење: катехин и 7 деривата катехина, <i>p</i>-хидроксибензоева киселина, дериват <i>p</i>-хидроксибензоеве киселине, кафеинска киселина, хлорогена киселина, цикорична киселина, два непозната деривата кафеинске киселине, хиперозид, изокверцетин, рутин, кверцитрин, изокверцитрин, изорамнетин и један непознати дериват кверцетина. Резултати <i>in vivo</i> студије показали су да биљна мешавина-I није токсична при дугорочној употреби и да ефикасније регулише ниво глукозе у крви и липидни статус животиња и да поседује већи хепатопротективни, нефропротективни и остеопротективни ефекат и велики потенцијал у спречавању развоја ретинопатије и Алцхајмерове болести од стандардне антидијабетске терапије (деривата сулфонилурее и инсулина) на дијабетичном моделу пацова.</p>

Научна област:	Биолошке науке
Научна дисциплина:	Физиологија. Ендокринологија
Кључне речи:	дијабетес, биљна мешавина, хепатопротективни ефекат, нефропротективни ефекат, остеопротективни ефекат, неуропротективни ефекат, ретинопатија
УДК:	633.88:632.954+616.379-008.64:599.324.2
CERIF класификација:	В 005; В 200; В 210; В 360; В 480; В 740
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD Ljubiša Đorđević Associate professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš
Title:	Comparative analysis of effects of herbal mixture and sulfonylurea derivatives on secondary complications of diabetes in rats
Abstract:	<p>Diabetes is a systemic disorder of carbohydrate and lipid metabolism in which chronic hyperglycemia leads to a number of secondary complications such as non-alcoholic fatty liver disease, nephropathy, retinopathy, osteoporosis, and Alzheimer's disease. Standard pharmacotherapy for diabetes focuses on regulating blood glucose levels, but not on the secondary complications that are the most common cause of death in diabetic patients. Therefore, the aims of the study were to evaluate and compare the biological activity of three herbal mixtures with potential antidiabetic activity and to compare the effect of the most effective herbal mixture with the effect of one of the standard antidiabetic drugs - a sulfonylurea derivative - on the secondary complications of diabetes. Comparative analysis of the biological activities of herbal mixtures was evaluated by <i>in vitro</i> tests of antioxidant, antiamylase, and cytoprotective activity and cytotoxicity, while the comparative analysis of the most potent herbal mixture effect and sulfonylurea derivative effect on diabetes and its secondary complications was determined by an <i>in vivo</i> study in a rat model. The results of the <i>in vitro</i> study showed that herbal mixture- I was the most effective one in terms of the highest antioxidant, antiamylase, and cytoprotective activities, as well as a low level of cytotoxicity. HPLC analysis identified 21 polyphenolic compounds in the preparation of herbal mixture-I: catechin and 7 catechin derivatives, <i>p</i>-hydroxybenzoic acid, <i>p</i>-hydroxybenzoic acid derivatives, caffeic acid, chlorogenic acid, chicoric acid, two caffeic acid derivatives, hyperoside, isoquercetin, rutin, quercitrin, isoquercetin, isorhamnetin and a quercetin derivative. The results of the <i>in vivo</i> study showed that the polyherbal mixture-I was non-toxic in long-term use and more effective in regulating blood glucose levels and lipid status of animals, had higher hepatoprotective, nephroprotective, and osteoprotective effects, and great potential in preventing the development of retinopathy and Alzheimer's disease than standard antidiabetic therapy (sulfonylurea derivative and insulin) in a diabetic rat model.</p>
Scientific Field:	Biological sciences
Scientific Discipline:	Physiology. Endocrinology
Key Words:	diabetes, herbal mixture, hepatoprotective effect, nephroprotective effect, osteoprotective effect, neuroprotective effect, retinopathy

UDC: 633.88:632.954+616.379-008.64:599.324.2

CERIF
Classification: B 005; B 200; B 210; B 360; B 480; B 740

Creative
Commons
License Type: **CC BY-NC-ND**



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Александра Г. Петровић
Ментор, МН:	Љубиша Ђорђевић
Наслов рада, НР:	Компаративна анализа ефеката мешавине лековитог биља и деривата сулфонилурее на секундарне компликације дијабетеса код пацова
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2023.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	8 поглавља, 157 страна, 310 цитата, 11 табела, 45 слика, 22 графика, 8 прилога
Научна област, НО:	Биолошке науке
Научна дисциплина, НД:	Физиологија. Ендокринологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	дијабетес, биљна мешавина, хепатопротективни ефекат, нефропротективни ефекат, остеопротективни ефекат, неуропротективни ефекат, ретинопатија
УДК	633.88:632.954+616.379-008.64:599.324.2
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, **ИЗ:**

Дијабетес је системски метаболички поремећај угљених хидрата и липида, где хронична хипергликемија доводи до низа секундарних компликација попут дијабетесног поремећаја не-алкохолне масне јетре, нефропатије, ретинопатије, остеопорозе и Алцхајмерове болести. Прописана стандарна фармаколошка терапија дијабетеса се фокусира на одржавање нормалног нивоа шећера у крви, али не и на секундарне компликације које су чешћи узрок смрти оболелих од дијабетеса. С тога су циљеви студије били испитивање и упоређивање биолошке активности три мешавине лековитог биља са потенцијалним антидијабетским својствима и компаративно испитивање ефеката најефективније биљне мешавине и једне од група стандардне терапије дијабетеса – деривата сулфониурее, на секундарне компликације дијабетеса. Упоредна анализа биолошких активности биљних мешавина испитане су *in vitro* тестовима антиоксидативне, антиамилазне и цитопротективне активности и тестом цитотоксичности, док је компаративни ефекат најефективније биљне мешавине и деривата сулфониурее на дијабетес и његове секундарне компликације утврђен *in vivo* студијом на анималном моделу. Резултати *in vitro* испитивања показали су да је биљна мешавина-I показала највећу антиоксидативну, антиамилазну и цитопротективну активности, а притом и низак ниво цитотоксичности у поређењу са остале две биљне мешавине, на основу чега је процењена као најефективнија и најбезбеднија. HPLC анализом је у препарату биљне мешавине-I идентификовано 21 полифенолно једињење: катехин и 7 деривата катехина, *p*-хидроксибензојева киселина, дериват *p*-хидроксибензојевог киселине, кафеинска киселина, хлорогена киселина, цикорична киселина, два непозната деривата кафеинске киселине, хиперозид, изокверцетин, рутин, кверцитрин, изокверцитрин, изорамнетин и један непознати дериват кверцетина. Резултати *in vivo* студије показали су да биљна мешавина-I није токсична при дугорочној употреби и да ефикасније регулише ниво глукозе у крви и липидни статус животиња и да поседује већи хепатопротективни, нефропротективни и остеопротективни ефекат и велики потенцијал у спречавању развоја ретинопатије и Алцхајмерове болести од стандардне антидијабетске терапије (деривата сулфониурее и инсулина) на дијабетичном моделу пацова.

Датум прихватања теме, **ДП:**

06.12.2021.

Датум одбране, **ДО:**

Чланови комисије, **КО:** Председник:

Члан:

Члан, ментор:



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Aleksandra G. Petrović
Mentor, MN :	Ljubiša Đorđević
Title, TI :	Comparative analysis of effects of herbal mixture and sulfonylurea derivatives on secondary complications of diabetes in rats
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2023
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 157 pages, 310 references, 11 tables, 45 pictures, 22 graphs, 8 appendixes
Scientific field, SF :	Biological sciences
Scientific discipline, SD :	Physiology, Endocrinology
Subject/Key words, S/KW :	diabetes, herbal mixture, hepatoprotective effect, nephroprotective effect, osteoprotective effect, neuroprotective effect, retinopathy
UC	633.88:632.954+616.379-008.64:599.324.2
Holding data, HD :	library
Note, N :	

Abstract, **AB**:

Diabetes is a systemic disorder of carbohydrate and lipid metabolism in which chronic hyperglycemia leads to a number of secondary complications such as non-alcoholic fatty liver disease, nephropathy, retinopathy, osteoporosis, and Alzheimer's disease. Standard pharmacotherapy for diabetes focuses on regulating blood glucose levels, but not on the secondary complications that are the most common cause of death in diabetic patients. Therefore, the aims of the study were to evaluate and compare the biological activity of three herbal mixtures with potential antidiabetic activity and to compare the effect of the most effective herbal mixture with the effect of one of the standard antidiabetic drugs - a sulfonylurea derivative - on the secondary complications of diabetes. Comparative analysis of the biological activities of herbal mixtures was evaluated by *in vitro* tests of antioxidant, anti-amylase, and cytoprotective activity and cytotoxicity, while the comparative analysis of the most potent herbal mixture effect and sulfonylurea derivative effect on diabetes and its secondary complications was determined by an *in vivo* study in a rat model. The results of the *in vitro* study showed that herbal mixture- I was the most effective one in terms of the highest antioxidant, anti-amylase, and cytoprotective activities, as well as a low level of cytotoxicity. HPLC analysis identified 21 polyphenolic compounds in the preparation of herbal mixture-I: catechin and 7 catechin derivatives, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid derivatives, caffeic acid, chlorogenic acid, chicoric acid, two caffeic acid derivatives, hyperoside, isoquercetin, rutin, quercitrin, isoquercetin, isorhamnetin and a quercetin derivative. The results of the *in vivo* study showed that the polyherbal mixture-I was non-toxic in long-term use and more effective in regulating blood glucose levels and lipid status of animals, had higher hepatoprotective, nephroprotective, and osteoprotective effects, and great potential in preventing the development of retinopathy and Alzheimer's disease than standard antidiabetic therapy (sulfonylurea derivative and insulin) in a diabetic rat model.

Accepted by the Scientific Board on, **ASB**:

06.12. 2021.

Defended on, **DE**:

Defended Board, **DB**:

President:

Member:

Member, Mentor:

Овај рад посвећујем,

*свим младим умовима који бесциљно лутају у прашини пролазности тражећи себе
последњим пламеном своје безбрижности;*

*са жељом да праведно поступају и успеју у сојим подухватима и да никада не
одустану ма колико се чинило тешко и недостижно, јер никад се не зна шта заправо
носи надлазећи дан.*

Захвалница

На путу ка циљу важнија је тежина срушених цигала непремостивих препрека и немерљива величина стечених пријатељстава него ли сама амбиција.

У то име се најсрдачније са пуно поштовања и дивљења захваљујем свом ментору и професионалном узору, проф. др Љубиши Ђорђевићу, на указаном поверењу, разумевању, храбрењу и стрпљивом и храбром вођењу кроз научни рад, наставно усавршавање и интелектуално уздизање уз идејну мисао да је у било којој сфери животи најбитније „бити и остати Човек“.

Велику захвалност дугујем и проф. др Перици Васиљевићу на бројним саветима и несебичној стручној помоћи. Веома сам захвална проф. др Стеви Најману на многобројним великодушним и несебичним стручним саветима и увођењу у свет научних експеримената уз крилатицу да и грешке нису грешке ако их другачије посматрамо.

Проф. др Бојану Златковићу хвала на стручној помоћи и саветима из области ботанике, али пре свега хвала на великој моралној подршци и непоколебљивом позитивном ставу. Проф. др Гордани Стојановић и њеној сарадници др. Ивани Златановић се најсрдачније захваљујем на помоћи у ХПЛЦ анализи, као и на бројним саветима из области хемије.

Ако се у невољи познају пријатељи онда је највећи доказ пружена рука верне пријатељице, др Вишње Модић, којој немам толико добрих речи нити мерљивих дела да се довољно захвалим на помоћи при извођењу експеримента и подршци при путовању бескрајним путевима кроз научни свет.

Хвала свим колегама са ПМФ-а на дивној сарадњи протеклих година, а посебно хвала колеги Немањи Младеновићу и колегиници Катарини Стојковић на помоћи у експерименталном раду и добром дружењу и позитивној атмосфери током његовог извођења.

*Весни Крстић, Милану Живановићу, Сузани Јовановић и Звонку Ристићу неизмерно хвала на помоћи пруженој у *in vivo* експериментима. Хвала Весни на огромној подршци и многобројним саветима. Хвала Милану и Звонку на стрпљењу и пожртвованости, а Сузи од свег срца хвала и на материнским саветима. Хвала свима за пријатељство, оданост и дивно проведене радне дане.*

*Хвала мојим пријатељицама на бодрењу, заједничком радовању свим нашим успесима
јер шта значи успех ако га нема са ким поделити?...*

*Највећу захвалност дугујем родитељима и сестри, за снагу коју су ми дали, веру коју су
ми улили, раме за плакање које су ми изнова и изнова подметали целог мог живота и
који се никада нису предали....и који то неуморно раде и даље...*

*На послетку, када постигнемо циљ, шта нам је друго чинити него ли.....тражити
нови циљ и нови сан. А овај сан, да ли је заиста био сан или само једна жеља, тешко је
разумети..*

Са дубоком наклоношћу и искреном захвалношћу,

Александра

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. ДИЈАБЕТЕС МЕЛИТУС	1
1.2. СЕКУНДАРНЕ КОМПЛИКАЦИЈЕ ДИЈАБЕТЕСА	2
1.2.1. Поремећај метаболизма липида	2
1.2.2. Оштећење јетре као последица дијабетеса	3
1.2.3. Дијабетесна нефропатија.....	4
1.2.4. Дијабетесна остеопороза	6
1.2.5. Дијабетесна ретинопатија.....	7
1.2.6. Дијабетес и ризик од деменције	8
1.3. ТЕРАПИЈА ДИЈАБЕТЕСА.....	11
1.3.1. Стандардна терапија.....	11
1.3.1.1. Деривати сулфонилурее.....	13
1.3.1.1.1. Глимепирид.....	14
1.3.2. Алтернативни третман.....	14
2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	19
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	21
3.1. ПРИКУПЉАЊЕ БИЉНОГ МАТЕРИЈАЛА.....	21
3.2. ОДРЕЂИВАЊЕ НАЈЕФЕКТИВНИЈЕ БИЉНЕ МЕШАВИНЕ НА ОСНОВУ <i>IN VITRO</i> ТЕСТИРАЊА БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ.....	21
3.2.1. Припрема водених екстраката биљних мешавина и лековитог биља	21
3.2.2. Одређивање садржаја укупних фенола	22
3.2.3. Одређивање садржаја укупних флавоноида	22
3.2.4. Одређивање потенцијала антиоксидативне активности	23
3.2.5. Одређивање потенцијала инхибиције α -амилазе	23
3.2.6. Одређивање цитопротективне активности и нивоа цитотоксичности	24
3.2.6.1. Узорковање крви и изоловање еритроцита	24
3.2.6.2. Одређивање цитопротективне активности тестом антихемоллизе	25
3.2.6.3. Одређивање нивоа цитотоксичности тестом хемоллизе	25
3.3. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ДЕКОКТА БИЉНЕ МЕШАВИНЕ-I И СУЛФОНИЛУРЕЕ НА МОДЕЛУ ПАЦОВА	26
3.3.1. Припрема декокта биљне мешавине-I и лековитог биља које улази у њен састав.....	26
3.3.2. „HPLC“ анализа	26
3.3.3. <i>In vivo</i> студија.....	27
3.3.3.1. Експерименталне животиње	27
3.3.3.3. Испитивање ефеката биљне мешавине-I и сулфонилурее на дијабетес код пацова	28
3.3.3.4. Испитивање ефеката суб-хроничне токсичности и метаболичких ефеката биљне мешавине-I на моделу пацова.....	28
3.3.3.5. Узорковање крви и ткива животиња	29
3.3.3.6. Биохемијска анализа серума	29
3.3.3.7. Тест липидне пероксидације.....	29
3.3.3.8. Припрема ткива за хистопатолошку анализу	30
3.3.3.9. Хистохемијско бојење ткива.....	31
3.3.3.9.1. Хематоксилин-еозин бојење (ХЕ).....	31
3.3.3.9.2. Масон трихромно бојење.....	31
3.3.3.9.3. Бојење перјодном киселином и Шифовим реагенсом (ПАС).....	32
3.3.3.9.4. Бојење по Нислу	33
3.3.3.9. Хистопатолошка анализа	33
3.3. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА	34
4. РЕЗУЛТАТИ	35
4.1. УПОРЕДНА <i>IN VITRO</i> АНАЛИЗА ЕКСТРАКАТА БИЉНИХ МЕШАВИНА И ЛЕКОВИТОГ БИЉА	35
4.1.1. Анализа садржаја укупних фенола и флавоноида	35
4.1.2. Анализа антиоксидативног потенцијала.....	36
4.1.3. Анализа потенцијал инхибиције α -амилазе.....	37

4.1.4. Анализа цитопротективне активности.....	38
4.1.5. Анализа нивоа цитотоксичности.....	39
4.2. АНАЛИЗА ЕФЕКТА ДЕКОКТА БИЉНЕ МЕШАВИНЕ-I И СУЛФОНИЛУРЕЕ.....	40
4.2.1. HPLC анализа декокта.....	40
4.2.2. Ефекат биљне мешавине-I и сулфонилурее на секундарне компликације дијабетеса код животиња.....	48
4.2.2.1. Ефекат на снижавање нивоа гликемије.....	48
4.2.2.2. Ефекат на промену индекса телесне масе и липидни статус.....	48
4.2.2.3. Ефекат на ниво биохемијских параметара који указују на оштећење јетре и бубрега.....	50
4.2.2.4. Хистопатолошке промене на јетри.....	52
4.2.2.5. Хистопатолошке промене на бубрегу.....	58
4.2.2.6. Хистопатолошке промене на бутној кости.....	63
4.2.2.8. Хистопатолошке промене у нервном ткиву (хипокампусу).....	72
4.2.3. Суб-хронична токсичност и ефекти биљне мешавине-I на метаболизам здравих животиња.....	78
4.2.3.1. Ефекат на ниво гликемије.....	78
4.2.3.2. Ефекат на индекс телесне масе.....	78
4.2.3.3. Ефекат на липидни статус и ниво оштећења јетре и бубрега.....	79
4.2.3.4. Хепатотоксичан ефекат.....	80
4.2.3.5. Нефротоксичан ефекат.....	84
4.2.3.6. Ефекат на коштану ткиво.....	86
4.2.3.7. Ефекат на ретину.....	91
4.2.3.8. Неуротоксични ефекат.....	93
5. ДИСКУСИЈА.....	96
5.1. <i>IN VITRO</i> АНАЛИЗА ЕКСТРАКТА БИЉНИХ МЕШАВИНА.....	97
5.2. HPLC АНАЛИЗА БИЉНЕ МЕШАВИНЕ-I.....	100
5.3. <i>IN VIVO</i> ЕФЕКАТ НА СЕКУНДАРНЕ КОМПЛИКАЦИЈЕ ДИЈАБЕТЕСА.....	101
5.4. <i>IN VIVO</i> ТОКСИЧНОСТ И МЕТАБОЛИЧКИ ЕФЕКТИ БИЉНЕ МЕШАВИНЕ-I.....	113
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	116
7. ЛИТЕРАТУРА.....	117
8. ПРИЛОЗИ.....	146

1. Увод

1.1. Дијабетес мелитус

Дијабетес (лат. *diabetes mellitus*) представља групу метаболичких поремећаја коју одликује стање хипергликемије изазвано поремећајем секреције и/или дејства инсулина (Swift et al., 1967). Постоји више типова дијабетеса класификованих по механизму патогенезе (Swift et al., 1967; Bastaki, 2005). Дијабетес мелитус типа 1 настаје као последица оксидативног или аутоимунског оштећења β -ћелија („бета“ ћелије) панкреаса, што доводи до инсулинске дефицијенције (Hall, 2016), док се код дијабетеса типа 2 јавља резистентност ткива на инсулин (Amparo et al., 2017).

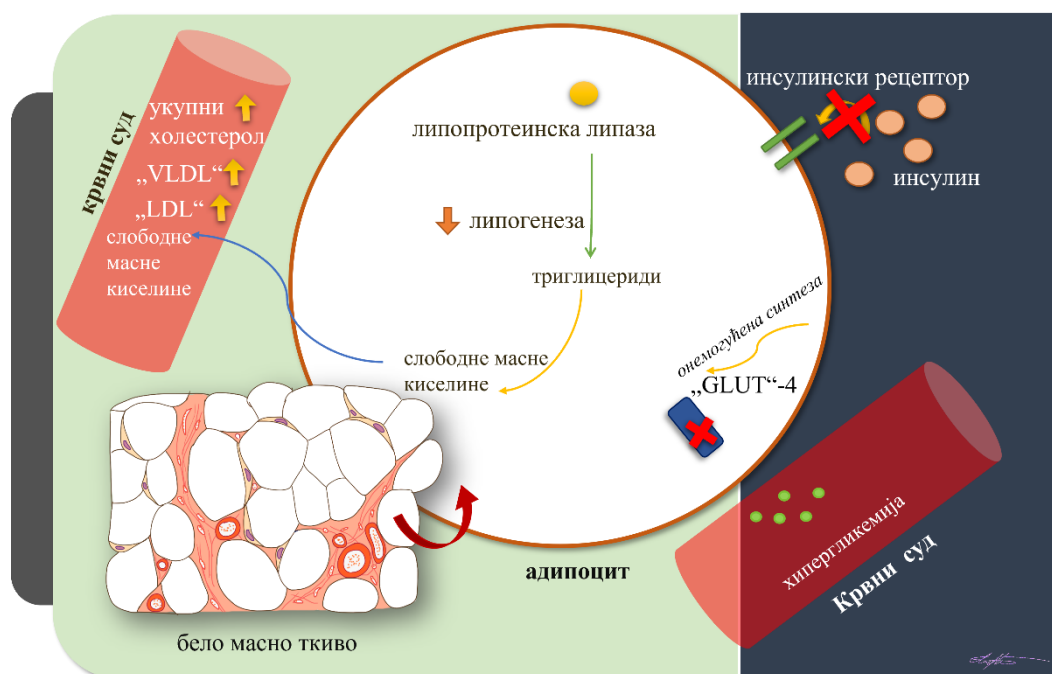
При нормалним условима шећери подлежу процесу гликозилације, при чему се издвајају интермедијерни производи који се природно елиминишу из организма. Када је ниво глукозе у крви повишен, интермедијерни производи се не елиминишу, већ акумулирају у крв и ткивима у виду липидних и протеинских комплекса (Parvin et al., 2014). Новонастали молекули, који се називају још и крајњи производи гликозилације или „AGE“ (енгл. *Advanced glycation end-product* – AGE), делују као оксидативни стресори и временом доводе до оштећења ткива и органа попут јетре, бубрега, ретине, срца, коштаног и нервног ткива. На тај начин развијају се друге, далеко опасније, болести које се једним именом називају секундарне компликације дијабетеса (Parvin et al., 2014; Amparo et al., 2017).

Најчесталији пратећи проблем је ослабљени имунски систем, па су особе са дијабетесом подложније вирусним, бактеријским и фунгалним инфекцијама (Petzold et al., 2015). Код великог броја оболелих од дијабетеса се због неадекватног лечења могу јавити хроничне компликације попут дијабетесне ретинопатије, нефропатије, неуропатије, остеопорозе, не-алкохолне масне јетра и појачан ризик од развоја Алцхајмерове болести (Dorner et al., 1977; Papatheodorou et al., 2018).

1.2. Секундарне компликации дијабетеса

1.2.1. Поремећај метаболизма липида

Поремећај метаболизма липида настаје због резистенције адипоцита на инсулин, због чега се код оболелих јавља повишен ниво LDL (енгл. *Low-density lipoprotein (LDL)* – липопротеин мале густине) и укупног холестерола и снижен ниво HDL холестерола (енгл. *High-density lipoprotein (HDL)* – липопротеин велике густине) у серуму. Акумулација липида у крвним судовима може довести до настанка атеросклерозе, због чега се, услед исхемије, јављају инфаркт миокарда и мождани удар (Regan et al., 1974; Taskinen, 2002; Betteridge, 2004; Savage et al., 2007).



Слика 1.1. Шематски приказ поремећаја метаболизма липида при инсулинској резистенцији (аутор: Александра Петровић)

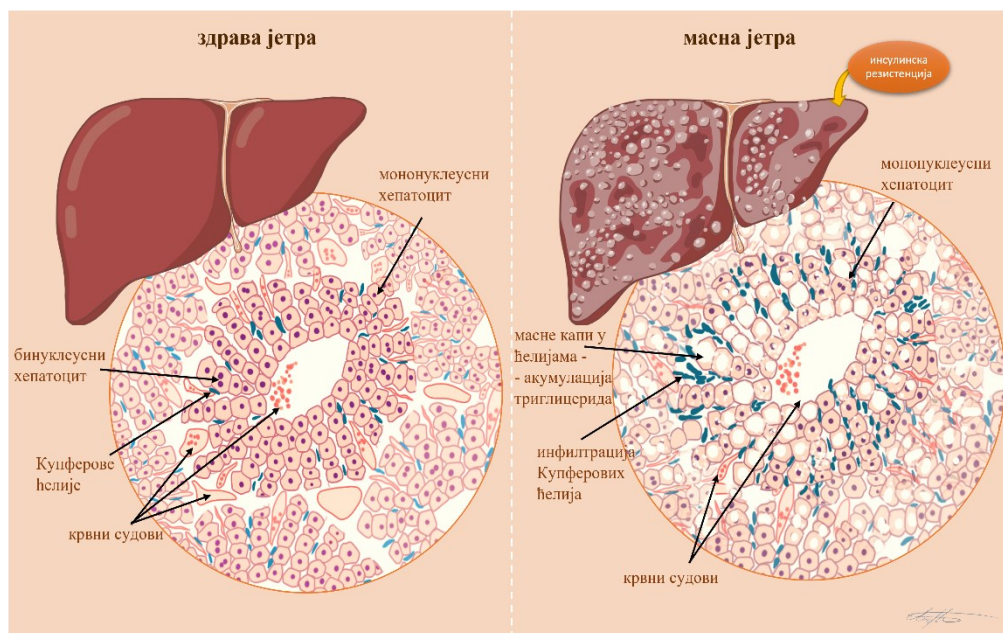
Адипозно ткиво представља депо триглицерида, чију разградњу контролише инсулин активацијом својих рецептора (Regan et al., 1974). Инсулин инхибира хормон-сензитивну липазу, ензим који каталише хидролизу триглицерида до слободних масних киселина и глицерола у адипоцитима, и на тај начин контролише њихово ослобађање у системску циркулацију (Hall, 2016). Када нема доступног инсулина активност липазе се повећава и долази до хидролизе триглицерида на слободне масне киселине и глицерол, који се потом ослобађају у крвоток (Scherer, 2016) (Слика 1.1). Део ослобођених масних киселина који улази у процес разградње β -оксидацијом користи се као извор енергије за ћелије, док се већи, непотрошени део транспортује до јетре, где се конвертује у

фосфолипиде и холестерол, а потом, у виду липопротеина мале и велике густине (LDL и HDL), враћаја у системску циркулацију (Ruan et al., 2002). Комплекси липопротеина у вишку таложе се уз зидове већих крвних судова и временом доводе до њиховог зачепљења (Taskinen, 2002; Betteridge, 2004).

1.2.2. Оштећење јетре као последица дијабетеса

Хипергликемија доводи до низа промена на јетри, почевши од поремећаја депоа гликогена и масти, па до предиспозиције за развој не-алкохолне масне јетре, цирозе и фиброзе јетре, акутног вирусног хепатитиса и хепатоцелуларног карцинома (Levinthal et al., 1999; Guven et al., 2006; Leclercq et al., 2007; Manna et al., 2010; Palsamy et al., 2010).

Једна од најзначајнијих улога инсулина је да највећи део неискоришћене глукозе депонује у јетру у виду гликогена, одакле ће се поново користити у постпрандијалном периоду када нема уноса глукозе путем исхране и када је ниво инсулина у серуму низак. Инсулин повећава транспорт глукозе из крви у ћелије јетре где се потом од појединачних молекула глукозе синтетише гликоген (Hall, 2016). Када је унете глукозе више од капацитета депоновања, инсулин подстиче конверзију гликогена у масне киселине, које се пакују у виду VLDL-а (енгл. *Very low density lipoprotein* – липопротеин веома мале густине) и транспортују путем крви до адипозног ткива (Leclercq et al., 2007; Stefan et al., 2014; Iroz et al., 2015). Услед инсулинске дефицијенције, у јетри се под дејством катехоламина и глукокортикоида масне киселине разлажу до ацето-ацетата, β -хидроксипутерне киселине и ацетона који смањује рН вредност крви, будући да се понаша као слаба кето-киселина. Ова појава познатија је као дијабетесна кетоацидоза (Reid et al., 2006; Crawford et al., 2009; Copstead and Banasik, 2013).



Слика 1.2. Шематски приказ изгледа здраве и не-алкохолне масне јетре код дијабетеса (аутор: Александра Петровић).

Дугорочна изложеност организма хипергликемијском оксидативном стресу доводи до нагомилавања масних киселина у хепатоцитима, услед чега се развија болест не-алкохолне масне јетре (Слика 1.2.) (Crawford et al., 1999; Reid et al., 2006; Romagnoli et al., 2010; Regnell et al., 2012).

Ткиво јетре се при хипергликемијском оксидативном стресу понаша као у стању интоксикације, па регрутује већи број Купферових ћелија које продукују слободне радикале попут супероксидног анијона, јона водоник пероксида и хидроксилног јона, како би елиминисале потенцијални токсични агенс (Слика 1.2). Слободни радикали се везују за мембране здравих хепатоцита и покрећу њихову апоптозу (Ahmed et al., 2004; Han et al., 2006; Wei et al., 2010; Al-Hussaini et al., 2012). Временом се функционално ткиво јетре замењује влакнима везивног ткива, што доводи до настанка фиброзе и цирозе јетре (Welt et al., 2004; Muscatiello et al., 2006; Hamden et al., 2008; Romagnoli et al., 2010; Regnell et al., 2011).

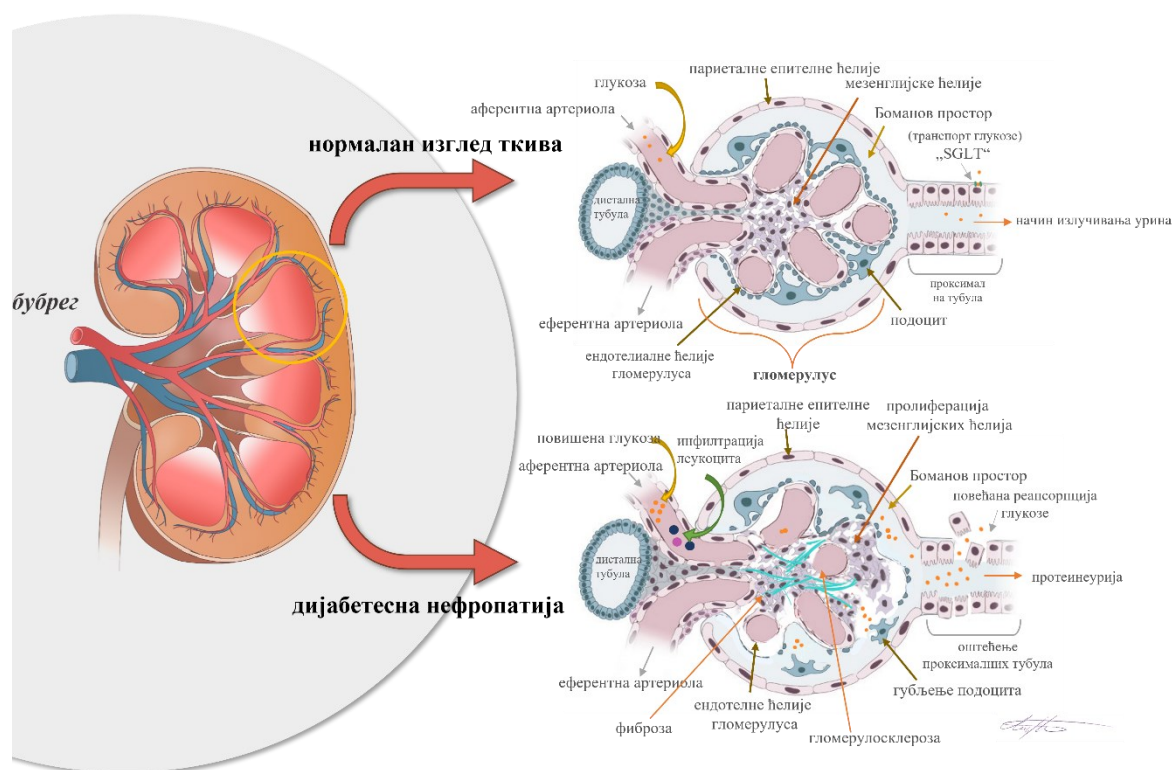
1.2.3. Дијабетесна нефропатија

Дијабетесна нефропатија се карактерише смањеном функцијом бубрега и представља једну од најтежих секундарних компликација дијабетеса (Evans et al., 2002).

Код дијабетесне нефропатије, крајњи производи гликозилације (AGEs) оштећују епител бубрежних каналића, чиме се повећава пропустљивости мембране епителних

ћелија за поједине јоне и воду што доводи до поремећаја осморегулације и јонорегулације у организму, као једних од веома битних аспеката уравнотеженог одвијања биохемијских процеса у ћелијама. Поремећај нивоа јона натријума, калијума и хлора утиче и на поремећај протока нервних импулса, па се дијабетесна нефропатија може посматрати и као системски проблем који за собом повлачи низ других поремећаја (Helen et al., 1994; Kataya et al., 2010).

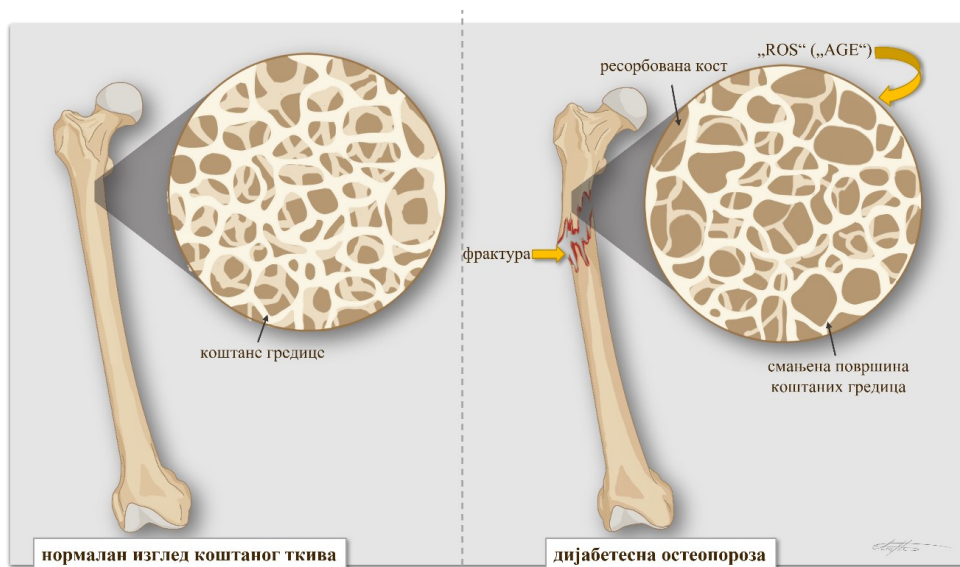
Специфичне лезије на бубрежним каналићима означене су појмом гломерулосклероза (Hall, 2016). У почетној фази дијабетесне нефропатије повећава се гломеруларна филтрација, чија прогресија доводи до оштећења епитела гломерулула, а касније и до пуцања капилара и изливања садржаја у Боманов простор. Оштећен епител повећава пропустљивост мембране за протеине (Слика 1.3), пре свега албумине, који се излучују путем мокраће због чега се јавља протеинурија и албуминурија које се користе као параметри дијагностиковања ове болести (Copstead and Banasik, 2013). Ниво креатинина и урее у серуму и мокраћи је у одмаклој фази болести промењен, тако да је праћење њиховог клиренса још један од параметара који се користе за одређивање нивоа бубрежног оштећења (Kataya et al., 2010).



Слика 1.3. Шематски приказ оштећења ткива код дијабетесне нефропатије (аутор: Александра Петровић)

1.2.4 . Дијабетесна остеопороза

Код старијих особа са дијабетесом јавља се повећан ризик од фрактуре костију, што се прво одражава на бутну кост, која трпи највећи ниво оптерећења током стајања и ходања, а потом и на кичмене пршљенове (Verhaeghe et al., 1989). Разлог томе је поремећај равнотеже јона калцијума до које долази због повећаног ослобађања AGE радикала. Оксидативни стрес, као окидач хуморалног система, интензивира ресорпцију костију због чега се смањује густина костију (Lebovitz, 2001) (Слика 1.4). Смањена густина коштаног ткива огледа се у повећаној порозности костију, која може бити блага у виду остеомалације и остеопеније и која нема ефеката на квалитет живота оболелих од дијабетеса (Silva et al., 2009). Међутим, са старењем процес напредује и јавља се компликованије стање означено као остеопороза код које се, због знатног губитка коштане масе, јављају бол у леђима, повијено држање, смањене телесне висине и учесталији преломи костију (Inzerillo et al., 2004; Duarte et al., 2015).



Слика 1.4. Шематски приказ коштаног ткива у нормалном стању и при дијабетесној остеопорози (аутор: Александра Петровић).

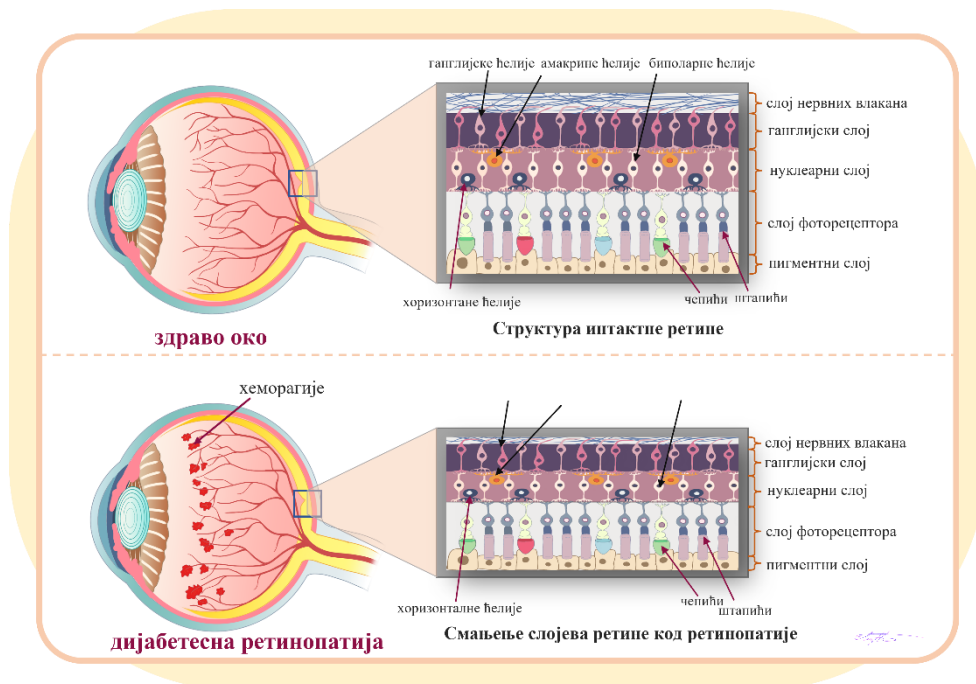
Један од механизма настанка дијабетесне остеопорозе је нерегулисан висок ниво шећера у крви и повећан ниво слободних радикала. Слободни радикали делују директно на коштаном ткиву тако што инхибирају диференцијацију остеогених ћелија, смањују способност остеобласта да минерализују коштани матрикс и подстичу активност остеокласта да ресорбују постојећи матрикс (King et al., 2004; Zhen et al., 2010; Bai et al., 2004). Смањена синтеза естрогена код жена у менопузи је још један фактор развоја остеопорозе, а удружена са оксидативним стресом додатно повећава ризик од развоја болести (Inzerillo et al., 2004).

1.2.5 . Дијабетесна ретинопатија

Код већине особа оболелих од дијабетеса развија се ретинопатија, као једна од најчесталијих секундарних компликација. Ретинопатија је вазопродлиферативна болест ока са микроанеуризмама, хеморагијама, проширеним крвним судовима и другим абнормалностима на ретини (Слика 1.5). Код ретинопатије долази до појаве неоваскуларизације и синтезе везивног ткива на површини ретине које могу оштетити неуроне у ретини (Engerman, 1989).

Ретинопатија је прогресивна болест која се развија у три фазе, и то као почетна ретинопатија, препродлиферативна ретинопатија и продлиферативна ретинопатија. Почетну ретинопатију карактерише појава микроанеуризми и малих хеморагија на капиларима око ретине, док препродлиферативну и продлиферативну прати развој већих оштећења капилара (Слика 1.5). Оштећени капилари се замењују новим, па је као пратећи проблем примећена повећана неоваскуларизација. Новонастали мали капилари су склонији хеморагијама, што доводи до постепеног губитка вида (Corstoad and Banasik, 2013).

Тачан механизам патогенезе дијабетесне ретинопатије није потпуно разјашњен, али постоје докази да је за то одговоран поремећај метаболизма глукозе и повећана експресија васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)) и фактора раста сличног инсулину-1 (енгл. *Insulin-like growth factor* (IGF-1)) (Gabby et al., 1973; Lee et al., 1996; Chibber et al., 2007). Повећан ниво крајњих продуката гликозилације прави микроанеуризме на зидовима капилара ока (Corstoad and Banasik, 2013). Нарушавање структуре ћелијске мембране епителних ћелија зида капилара подстиче експресију фактора раста како би се епител обновио. Међутим, повећан ниво VEGF-а у ткиву ретине делује и као хемотаксни агенс за ћелије имунског система. Појачана инфилтрација макрофага покреће процес инфламације која доводи до нових микрооштећења на капиларима (Коуа and King, 1998). На тај начин крв стиже до ретине и доводи до одумирања рецептора, услед чега се јавља делимични или потпуни губитак вида (Tarr et al., 2013).



Слика 1.5. Шематски приказ структуре здравог ока и дијабетесне ретинопатије (аутор: Александра Петровић).

Још један фактор развоја ретинопатије код особа са дијабетесом је нерегулисан повишен крвни притисак (Wilkinson-Berka, 2006). На ретини постоје рецептори за ангиотензин-II који реагују на промену крвног притиска (Funatsu et al., 2002), а доказано је да је број тих рецептора код особа са дијабетесом већи него код здравих особа (Ebrahimian et al., 2005).

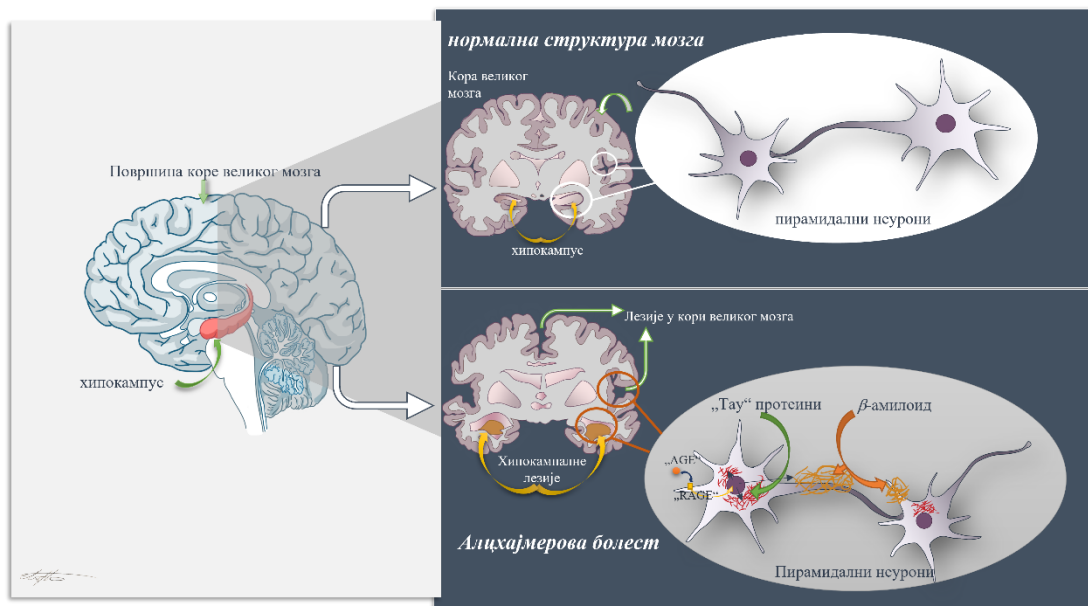
1.2.6 . Дијабетес и ризик од деменције

Алцхајмерова болест је прогресивно неуродегенеративно обољење, које се развија код старијих особа. Одликује га слабљење можданих функција, као што су памћење, учење, разумевање и расуђивање, насталих услед накупљања плака β -амилоида и пропадања можданих неурона у региону хипокампуса (Ott et al., 1999; Li et al., 2007).

Бројни случајеви показују да се код особа са дијабетесом типа 2 у каснијем животном добу деменција и Алцхајмерова болест јављају као последица инсулинске резистенције нервних ћелија (Arvanitakis et al., 2004; Inzucchi et al., 2015; Li et al., 2017). На ћелијској мембрани нервних ћелија, астроцита, микроглија и епителних ћелија крвних судова постоје специфични рецептори за крајње продукте гликозилације или „RAGE“ (енгл. *Receptor for advanced glycation end products (RAGE)*) (Derk et al., 2018) (Слика 1.6). Везивање AGE за рецепторе подстиче егзоцитозу β -амилоида у

екстрацелуларни матрикс (ЕЦМ). Што је виши ниво AGE-а, то је више егзоцитованих молекула β -амилоида који се накупљају у ЕЦМ-у и формирају β -амилоидне плаке. Плаке β -амилоида инхибирају инсулинске рецепторе на ћелијама у мозгу, па оне постају резистентне на инсулин (Cai et al., 2015). Процес формирања плака β -амилоида у нервним ћелијама потпомаже и ензим за деградацију инсулина (енгл. *Insulin-degrading enzyme* (IDE)) на тај начин што смањује ниво инсулина и доприноси даљем развоју резистенције (Carson and Riberio, 1993; Behl, 1997).

Таложeње β -амилоида доводи до инфламаторне реакције зидова капилара који чине крвно-моздану баријеру, због чега је поремећен транспорт материја до нервних ћелија (Chandran et al., 2020). Недостатак нутријената доводи до низа промена у телу неурона, као што је увећање Нислове супстанце и повећана експресија проапоптотских протеина што покреће процес ћелијске смрти (Smith et al., 1996; Nunomura et al., 2001; Dimakopoulos et al., 2005; Hall, 2016; Liu et al., 2007). До губитка неурона долази и због повећане експресије и формирања инклузија специфичне фибриларне форме „Тау“ протеина (Nielson et al., 1996; Li et al., 2007; Zhang et al., 2020).



Слика 1.6. Шематски приказ механизма развоја Алцхајмерове болести код дијабетеса (аутор: Александра Петровић)

Поред цитоплазматског „Тау“ протеина и β -амилоида, детектовано је и присуство протеина амилина у мозгу код особа са дијабетесом, који интерагује са амилоидом и „Тау“ протеином и у панкреасу и у хипокампусу (Martinez-Valbuena et al., 2019). Амилин је окарактерисан као амилоидогени пептид, који се јавља и код тумора β -ћелија панкреаса и још се назива и амилоидни полипептид острваца (енгл. *Islet amyloid*

polypeptide (IAPP)) и представља још један фактор развоја Алцхајмерове болести код дијабетичара (Sah et al., 2019).

Последњих деценија велика пажња се посвећује испитивању улоге неуротрофног можданог фактора (енгл. *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)) у патогенези Алцхајмерове болести. BDNF припада породици фактора раста и игра кључну улогу током ембрионалног развоја мозга и периферних нерава, а његова недовољна секреција се повезује са настанком психосоматских и неуродегенеративних обољења попут депресије, биполарног поремећаја личности, Хантингтонове, Алцхајмерове и Паркинсонове болести (Canals et al., 2004; Dwivedi et al., 2009; Grande et al., 2010; Chen et al., 2017; Palasz et al., 2020; Yi et al., 2022;). BDNF се синтетише у глија ћелијама, а везује за киназни рецептор тропомиозина “Б” (енг. *tropomyosin receptor kinase B* – TrkB) на мембрани нервних ћелија и на тај начин регулише ослобађање глутамата. Активација TrkB и PI3K (енгл. *phosphatidylinositol 3-kinase*) сигналног пута подстиче дефосфорилацију „Тау“ протеина, чиме је онемогућена његова полимеризација у филаментозни „Тау“ протеин, који је присутан у нервним ћелијама код Алцхајмерове болести (Li et al., 2007; Zhang et al., 2020). Смањена експресија BDNF инхибира синаптичку трансмисију, али подстиче акумулацију плака β -амилоида и фосфорилацију „Тау“ протеина (Nichols et al., 2015; Gong et al., 2017; Gao et al., 2022).

1.3. Терапија дијабетеса

У данашње време постоји велики број различитих терапијских стратегија у лечењу дијабетеса мелитуса и његових компликација. Примена инсулина и инсулинских аналога је окосница лечења дијабетес мелитуса, пре свега дијабетес мелитуса типа 1. Будући да је дијабетес мелитус веома комплексна болест са бројним патофизиолошким и клиничким поремећајима примењују се и други видови терапије који укључују примену лекова са различитим механизмима деловања у које се убрајају: лекови који подстичу секрецију инсулина, лекови који смањују инсулинску резистенцију, инхибитори глукозних носача, инхибитори дигестивних ензима панкреаса, инхибитори допамина и др. (Garvey et al., 1985; Brenner and Stevens, 2018).

1.3.1. Стандардна терапија

Инсулин се примењује у терапији дијабетеса типа 1 како би се директно надоместио његов смањен ниво у крви и делује директно на инсулинске рецепторе на циљним ћелијама. Међутим, прекомерна употреба може имати потпуно супротан ефекат, тј. довести до хипогликемије или, чак, хипогликемијског шока (Garvey et al., 1985). Свакодневна неконтролисана примена доводи и до повећања телесне масе управо због самог механизма деловања инсулина (описано у одељку 1.2.1).

Лекови који смањују инсулинску резистенцију делују на нивоу јетре, мишићног и масног ткива па су погоднија терапија дијабетеса типа 2. У ову групу медикамената спадају бигваниди (метформин) и тиазолидинеидиони (пиоглитазон). Метформин примарно делује на нивоу јетре и цревне флоре, док пиоглитазон на нивоу масног и мишићног ткива (Brenner and Stevens, 2018). Метформин инхибира процес гликогенолизе у јетри и смењује ресорпцију витамина Б12 у цревима на тај начин што смањује активност цревних бактерија (Niafar et al., 2015). Поред тога, метформин олакшава преузимање и искоришћавање глукозе у мишићном ткиву, док у масном ткиву смањује процес липолизе (Xu et al., 2015). И поред ефикасности у смањењу нивоа шећера у крви, бигванидини могу изазвати низ контраиндикација као што је инсуфицијенција бубрега са клиренсом креатинина мањим од 30 мл/мин. и дехидратација, а хронична употреба може довести и до неуропатије због недостатка витамина Б12 (Niafar et al., 2014). Лек се не треба примењивати уколико постоји анемија, или респираторна инсуфицијенција, или при слабој ухрањености, јер може погоршати ова стања и довести до анорексије (Lee et al., 2012).

Тиазолидинеидиони повећавају осетљивост масног ткива на инсулин и појачавају искоришћавање глукозе у мишићним ћелијама код дијабетеса типа 2, али немају ефекта на смањење повишеног LDL и укупног холестерол (Brenner and Stevens, 2018).

Инхибитори натријум-глукозних транспортера или „SGLT“ (енгл. *sodium-glucose linked transporter* (SGLT)) су група лекова који делују преко бубрега, а примењују се када постоји повећана реапсорпција глукозе из проксималних тубула бубрега код дијабетеса типа 2 и могу се комбиновати са другим антидијабетским лековима (Brenner and Stevens, 2018). SGLT инхибитори смањују албуминурију и HbA1c (хемоглобин „A1c“ – гликозилирани хемоглобин) у серуму, али и телесну масу и артеријски притисак. Међутим, њихова употреба доводи до многих нежељених ефеката као што је генитална гљивична инфекција, губљење апетита и телесне масе и смањење коштане масе и притом немају дуготрајни ефекат (Dowarah and Singh, 2020).

Инхибитори дигестивних ензима панкреасне α -амилазе и α -глукозидазе у цревима, који разграђује олигосахариде и дисахариде до моносахарида (глукозе) су медикаменти попут акарбозе или миглитола (Laube, 2002), али су због низа контраиндикација избачени из употребе у многим земљама укључујући и Републику Србију (Сл. Гласник РС). Од контраиндикација јавља се поремећај рада црева, интолеранција на лактозу и смањена апсорпција гвожђа (Hollander, 1992).

Амилин је панкреасни хормон који смањује апетит успоравајући пражњење желуца преко супресије секреције глукагона. Синтетички аналог амилину је лек прамлинтид ацетат који се примењује субкутано, али који може имати нежељена дејства у виду анорексије и главобоље (Dowarah and Singh, 2020).

У употреби су и агонисти допамина који испољавају ефекат на центар регулације циркадијалног ритма у хипоталамусу. Будући да се ради о дејству на нивоу регулаторног центра свих ендокриних жлезди, самим тим и свих хормона који учествују у хомеостазу организма, употребом ових медикамената може се пореметити и функција других органа (Brenner and Stevens, 2018).

У лекове који подстичу секрецију инсулина спадају деривати сулфониурее и меглитиниди који се примењују појединачно или у комбинацији са метформином или инсулином, док се код дијабетеса типа 2 примењују лекови инкретини који инхибирају глукагон и стимулишу секрецију инсулина (Brenner and Stevens, 2018).

1.3.1.1. Деривати сулфонилурее

Деривати сулфонилурее припадају групи антихипергликемијских лекова који појачавају секрецију инсулина из β -ћелија, на тај начин што су ћелије под хроничном стимулацијом и одржавају повишен ниво инсулина у циркулацији. Представљају хемијски модификована језгра урее са сулфонилном групом, који се при оралној употреби лако апсорбују и метаболишу. Међутим, њихови метаболити који се излучују путем урина поседују извесни хипогликемијски ефекат (Brenner and Stevens, 2018).

Постоје три групе деривата сулфонилурее класификованих по потентности, дужини деловања и селективности везивања за сулфонилурејни рецептор. Толбутамид и хлорпропамид, који припадају првој генерацији деривата, доводе до продужене хипогликемије и повећања телесне масе па су избачени из употребе. У деривате сулфонилурее друге генерације убрајају се глибенкламид, гликлазид, глипизид, гликвидон и глибурид, док деривате сулфонилурее треће генерације представља глимепирид (Schloot et al., 2015).

На кардиомиоцитама, β -ћелијама и ћелијама глатких мишића крвних судова налазе се рецептори сулфонилурее, који су по типу АТР-зависних калијумових канала. Ови канали се при везивању неког од деривата сулфонилурее затварају чиме је онемогућено излажење калијум из ћелија па долази до деполаризације мембране и инфлукса јона калцијума у ћелију. У β -ћелијама панкреаса јони калцијума покрећу егзоцитозу инсулина из секреторних гранула (Panten et al., 1996).

Деривати сулфонилурее су у широкој употреби због високе ефективности ка нормализацији гликемије и ниске цене, али се и поред тога не примењују у првим фазама развоја дијабетеса, већ након иницијалног третмана метформином. Могу се комбиновати и са другим лековима за лечење дијабетеса. Ређе се користе као монотерапија, осим код пацијената који не подносе метформин. Међутим, при комбинованој терапији мора се водити рачуна о типу другог лека како не би дошло до стања хипогликемије (Hemmingsen et al., 2014). Хипогликемија се јавља при примени сулфонилурее код дијабетеса са поремећајем функције бубрега и кардиоваскуларним болестима (Zimmerman, 1997).

Повољан терапијски ефекат дериватима сулфонилурее не траје дуго, јер повећана активност може довести до пропадања β -ћелија (Panten et al., 1996).

1.3.1.1.1. Глимепирид

Глимепирид је дериват сулфониурее треће генерације са двојаким деловањем: на секрецију инсулина и на повећавање сензитивности ткива за инсулин. Глимепирид се селективно везује за сулфониурејне рецепторе типа 1 на мембрани β -ћелија. Повећава сензитивност ткива за инсулин на тај начин што подстиче експресију „GLUT4“ носача (енгл. *glucose transporter 4 (GLUT4)* – глукозни транспортер 4) у мишићном и масном ткиву, док у јетри стимулише синтезу гликогена, а инхибира гликогенолизу (Panten et al., 1996; Zimmermann, 1997). Код адипоцита повећава ниво адипонектина и смањује „TNF- α “ (енгл. *Tumor necrosis factor α (TNF- α)* – фактор некрозе тумора- α), док на нивоу епитела доводи до ослобађања азот оксида (Koshiba et al., 2005). Дугорочна примена овог лека доводи до хипогликемије, повећавања телесне масе и апоптозе β -ћелија (Schloot et al., 2015).

Доступна терапија дијабетеса је усмерена на регулисање нивоа шећера у крви и нема ефеката на секундарне компликације, а поједини лекови, чак, подстичу настанак нових компликација. Како би се избегли штетни ефекти и надоместила уска специфичност синтетичких лекова у оквиру постојеће терапије дијабетеса, тежи се проналажењу алтернативних начина лечења активним компонентама из природе, као што су полифеноли из биљака, за које је добро познато да делују као антиоксидативни агенси, који би помогли у терапији, али и допринели побољшању општег стања организма (Seven et al., 2004). Предност природних активних компоненти је њихова лака доступност, не само на подручју Балкана са кога су биљне врсте о којима ће бити речи у даљем тексту, већ и широм света.

1.3.2. Алтернативни третман

Полифеноли су одговорни за постојање бројних позитивних деловања лековитог биља на биолошке системе, као што су антиоксидативни, цитопротективни, хепатопротективни, неуропротективни, нефропротективни, хиполипидемијски и хипогликемијски ефекат (Torabian et al., 2008; Fratianni et al., 2019; Ganesan et al., 2020; Oršolić et al., 2021). Повољни ефекти појединачног лековитог биља су ограничени, па се не могу примењивати као терапија системских обољења, попут искомпликованог дијабетеса. Због тога се све већи број студија бави изучавањем биљних мешавина справљаних од лековитог биља које имају различите ефекте (Ghorbani et al., 2013; Madić et al., 2019; Madić et al., 2021; Petrović et al., 2021; Huang et al., 2022; Chen et al., 2023).

Тако се три биљне мешавине, испитиване у овој дисертацији, у народу користе и за снижавање нивоа шећера у крви и за побољшање стања оштећене јетре и бубрега (Životić i Životić, 1979). Један од циљева дисертације је испитати и упоредити њихову ефикасност како би се одредило која од њих има највише потенцијала ка свеобухватном третману дијабетеса и његових секундарних компликација, а која би притом била и најбезбеднија за дугорочну употребу, јер је свака активна материја, било природна или вештачка, у већој концентрацији и токсична (појава позната као „Janus ефекат“) (Životić i Životić, 1979; Zeiger, 2003; Madić et al., 2019).

Постоји велики број литерарних података који показују да биљне врсте које се користе за израду поменутих биљних мешавина, кичица (лат. *Centaurium erythrea*), водопија (лат. *Sycorium intybus*), жута стежа (лат. *Potentilla erecta*), маслчак (лат. *Taraxacum officinale*), рузмарин (лат. *Rosmarinus officinalis*), бели пелин (лат. *Arthemisia absinthium*) и бела бреза (лат. *Betula pendula*) (Životić i Životić, 1979), садрже многобројне биоактивне компоненте са различитим биолошким активностима.

Кичица, лат. *C. erythrea* (Слика 1.7), се традиционално примењује код поремећаја варења и за побољшање апетита због високог садржаја горких иридоилних гликозида. Горке материје подстичу лучење пљувачке, панкреасних ензима за варење и жучних киселина чиме се олакшава варење хране (Menyiy et al., 2021). Такође је и добар антиоксиданс због присуства бројних флавоноида попут галне и розмаринске киселине због чега се користи као средство за јачање и опоравак организма (Zlatković et al., 2013; Mihaylova et al., 2019; Kachmar et al., 2019). Водени екстракт надземног дела кичице делује и као благи антипиретик (Berkan et al., 1991).

Најновијим истраживањима установљено је да кичица поседује хипогликемијско и хиполипидемијско деловање (Adel et al., 2017; Bouyahya et al., 2019) и да помаже регенерацију ткива јетре и бубрега (Ђорђевић et al., 2022). Поред тога, делује неуропротективно и антитуморски (Ahmed, 2009; Trifunović-Momčilović et al., 2016).



Слика 1.7. *C. erythrea*, кичица (аутор: Александра Петровић).

Водопија, лат. *C. intybus* (Слика 1.8), подстиче лучења жучи, а због присуства горких материја може се, попут кичице, користити за подстицање апетита, боље варење и побољшање активности желуца (Zlatković et al., 2013; Street et al., 2013). Доказан је и њен ефекат на регенерацију јетре након интоксикације, а користи се и као диуретик (Ahmed et al., 2003). Екстракт корена и листа водопије има антимикуробно дејство (Verma



Слика 1.8. *C. intybus*, водопија (аутор: Александра Петровић).

et al., 2013). Корен и лист *C. intybus* садрже доста флавоноида, од којих су најзначајније *p*-хидроксибензоева, хининска киселина, кафеинско-хининска и кафтарна киселина, за које је познато да су добри хватачи слободних радикала (Liu et al., 2013; Gholami et al., 2018; Zeb et al., 2019).

На анималном моделу је показано да водопија снижава ниво шећера, холестерола и триглицерида у крви (Draz et al., 2010; Yao et al., 2013), а постоје подаци о њеној ефикасности у терапији хуманог карцинома дојке (Gospdinova and Krasteva, 2015). Поред наведених лековитих својстава, самлевени корен водопије се користи и као замена за кафу због високог садржаја кафтарне киселине (Liu et al., 2013; Street, et al., 2013).

Жута стежа, срчењак, трава од срдоболје или лат. *P. erecta* (Слика 1.9), је биљка из фамилије ружа, од које се у лековите сврхе користи ризом, због присуства бројних биоактивних супстанци, као што су кумарин, хесперидин, *p*-кумаринска киселине и рутин (Tomović et al., 2015; Uysal et al., 2018; Kaltalioglu et al., 2020). Употребљава се за смањење неспецифичне упале слузокоже црева и за испирање уста и грла (Wiater et al., 2008).



Слика 1.9. *P. erecta*, жута стежа (аутор: Александра Петровић).

Чај од корена и листа маслачка, лат. *T. officinalae* (Слика 1.10), има широку примену у народној медицини. Због садржаја горких материја користи се као аперитив. Поред тога, подстиче лучење жучи, смањује упалу жучне кесе и олакшава пражњене црева, а користи се и као диуретик (Karakuş et al., 2016; Mahboubi and Mahboubi, 2020). На основу малог броја студија потврђено је благотворно дејство у лечењу мишићног реуматизма (фибромиалгија) и вирусног хепатитиса (Jeon et al., 2008).



Слика 1.10. *T. officinale*, маслачак (аутор: Александра Петровић).

Корен маслачка садржи бројна флавоноидна једињења попут деривата кафеолне, тараксинске и кафеинске киселине (Jedrejek et al., 2019). Маслачак инхибира активност панкреасне амилазе (Huang et al, 2021; Li et al., 2021), па се може примењивати и за снижавање нивоа шећера у крви.

Рузмарин, лат. *R. officinalis* (Слика 1.11) повећава прокрвљеност коже и побољшава рад срчаног мишића (Khalil et al., 2012). Користи се и као средство за ублажавање грчева, стимулисање лучења жучи, олакшавања варења и елиминацију гасова (Posadas et al., 2009; Oliviera, et al., 2019). Може се примењивати дермално за ублажавање болова и смањење упале код реуматизма, миалгија и неуралгија (Wollinger et al., 2016; Penkov et al., 2018). Позната му је антиоксидативна активност, а користи се и као зачин (Tomovic et al., 2015; Uysal et al., 2018).



Слика 1.11. *R. officinalis*, рузмарин (аутор: Александра Петровић).

Листови рузмарина садрже кумарин, хесперидин, *p*-кумаринску киселину, рутин, карноеву киселину и розмаринску киселину (Mashentseva et al., 2011; Wollinger et al., 2016; Penkov et al., 2018; Mihaylova et al., 2019; Kachmar et al., 2019). Рузмарин инхибира активност панкреасне глукозидазе у цревима те на тај начин смањује апсорпцију глукозе из хране (Ahamad et al, 2020).



Слика 1.12. *A. absinthium*, пелин (аутор: Александра Петровић).

Надземни део пелина, лат. *A. absinthium* (Слика 1.12), садржи сесквитерпенске лактоне, феноле и флавоноиде (Bhat et al., 2018; Коуунсу, 2018) због чега делује као антиоксиданс (Zengin et al, 2017), а као горко ароматично средство подстиче лучење жучи и елиминише гасове у цревима (Ivanov et al., 2021). Примењује се за побољшање апетита (Ivanov et al., 2021). Поседује антимикробну, антиинфламаторну активност (Ahmad et al., 1992; Juteau et al., 2002; Mihajlov-Krstev et al., 2014; Stanković et al., 2016; Коуунсу, 2018). Есенцијално уље пелина има хипогликемијско дејство (Jaradat et al, 2021).

Бреза, лат. *B. pendula* (Слика 1.13), позната је по многобројним биолошким активностима због великог садржаја биоактивних компоненти попут катехина, мирицетина, кверцетина, нарингенина и *p*-кумаринске киселине (Azman et al., 2017).

Екстракти листова *B. pendula* садрже доста фенола и флавоноида, а сам екстракт има велики антиоксидативни потенцијал (Millet et al., 2009; Mashentseva et al., 2011; Penkov et al., 2018). Бетулин из брезе инхибира активност панкреасне амилазе (Шуна et al, 2014) због чега се примењује као додатак терапији дијабетеса (Adefegha et al, 2016).



Слика 1.13. *B. pendula*, бреза (аутор: Александра Петровић).

Користи се за ублажавање упале мокраћних путева и жучне кесе и спречавање формирања песка у бубрезима (Sharma et al., 2017). Због своје антиинфламаторне активности користи се и у терапији реуме и артритиса, док се сок младог дрвета употребљава за смањење упалних процеса код гихта, при инфекцији бешике и бубрега (Rastogi et al., 2015).

2. Предмет и циљеви истраживања

Дијабетес мелитус је метаболички поремећај кога прати повишен ниво глукозе у крви. Нерегулисана хипергликемија доводи до оштећења многих органа и настанка секундарних компликација са смртним исходом. Постојећа терапија инсулином и лековитим биљкама са хипогликемијским деловањем ефикасно снижава ниво глукозе у крви и даје предуслове за превенцију и одлагање компликација болести, али их не може у потпуности контролисати. Због тога се све више пажње придаје изучавању ефеката лековитог биља, које се употребљава као допуна постојећој терапији дијабетеса (Ali et al., 2006; Torabian et al., 2008; Fratianni et al., 2019). Појединачно лековито биље има ограничено деловање, па се тежи употреби биљних мешавина справљаних од лековитог биља са различитим деловањима (Madić et al., 2019; Petrović et al., 2021; Savych, 2021; Huang et al., 2022; Chen et al., 2023).

Постоји више антидијабетских мешавина лековитог биља описаних у литератури, међу којима су и три биљне мешавине испитиване у овом раду. Биљна мешавина-I, справљена од надземног дела кичице, корена водопије и ризома жуте стеже, биљна мешавина-II, справљена од листова пелина, корена маслачка и ризома жуте стеже, и биљна мешавина-III, справљена од надземног дела кичице, корена маслачка и листова брезе и рузмариног, се на просторима Балкана користе у народној медицини за лечење дијабетеса удруженог са оштећењима јетре и бубрега (Životić i Životić, 1979). О наведеним ефектима и потенцијалној токсичности поменутих биљних мешавина нема доступних података, па је овом студијом прво испитана њихова биолошка активност *in vitro* и међусобно упоређена. Потом је одређен фитохемијски састав најефективније биљне мешавине (биљна мешавина-I) и тестирана њена примена у терапији примарних и секундарних компликација дијабетеса на дијабетесном моделу пацова, а резултати упоређени са ефектима деривата сулфонилурее. У складу са тим постављени су циљеви студије којима ће се:

1. Утврдити која од наведених „антидијабетских“ биљних мешавина има најоптималније лековите ефекте антидијабетску на основу *in vitro* анализе њихових водених екстраката тестовима:
 - 1.1. одређивања садржаја укупних фенола и флавоноида;
 - 1.2. процене антиоксидативног потенцијала;
 - 1.3. процене антидијабетског потенцијала;
 - 1.4. одређивања нивоа цитотоксичности;

- 1.5. одређивања нивоа цитопротективне активности;
2. Анализирати фитохемијски састав декокта мешавине лековитог биља процењене као најефективније (биљна мешавина-I) методом течне хроматографије високих перформанси;
3. Испитати ефекте биљне мешавине-I и сулфониљуреа (глимепирида) на примарне и секундарне компликације дијабетеса на дијабетичном моделу пацова путем:
 - 3.1. анализе ефекта на ниво глукозе у параметре липидног статуса у серуму крви;
 - 3.2. анализе ефеката на не-алкохолну масну јетре;
 - 3.3. анализе ефеката на дијабетесну нефропатију;
 - 3.4. анализе ефеката на дијабетесну остепорозу;
 - 3.5. анализе ефеката на дијабетесну ретинопатију;
 - 3.6. анализе ефеката на превенцију развоја Алзхајмерове болести;
4. Испитати ниво суб-хроничне токсичности биљне мешавине-I на здравим пацовима путем:
 - 4.1. анализе ефекта на промену биохемијских параметара у серуму;
 - 4.2. утврђивања нивоа хепатотоксичности;
 - 4.3. утврђивања нивоа нефротоксичности;
 - 4.4. анализе ефеката на здраво коштано ткиво;
 - 4.5. анализе ефеката на здраву ретину;
 - 4.6. утврђивања нивоа неуротоксичности.

3. Материјал и методе

3.1. Прикупљање биљног материјала

Лековито биље коришћено у овом раду, *Centaurium erythrea* Rafin. (Gentianaceae), *Cichorium intybus* L. (Asteraceae), *Potentilla erecta* L. (Rosaceae), *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), *Taraxacum officinale* Weber (Asteraceae), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) и *Betula pendula* Roth. (Betulaceae), је прикупљено на територији југо-источне Србије током 2020. године (Стара планина 43 21.943 N; 22 46.000 E; Власинско језеро 42 43.940 N; 22 19.533 E; Нишка Бања 42 17.008 N; 22 01.727 E; Горња Коритница 43 09.128 N; 22 20.200 E; Сићевачка клисура 43 19.308 N; 22 11.382 E), таксономски идентификовано и сортирано под идентификационим бројевима колекције хербара Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу (ХМН: 14454-14460).

Биљни материјал је сушен 2-3 недеље на собној температури заштићен од директне светлости, након чега је уситњен до конзистенције прашка. Мешавине лековитог биља („биљна мешавина-I“, „биљна мешавина-II“ и „биљна мешавина-III“) припремљене су на основу модификоване постојеће традиционалне рецептуре (Životić and Životić, 1979). Биљна мешавина-I (100 g) припремљена је мешањем 15 g корена цикорије (*C. intybus*), 15 g надземног дела кичице (*C. erythrea*) и 70 g ризома и корена жуте стеже (*P. erecta*), док је биљна мешавина-II (100 грама) припремљена мешањем 15 g листова пелина (*A. absinthium*), 40 g корена маслачка (*T. officinale*) и 45 g ризома и корена жуте стеже (*P. erecta*). За прављење 100 g биљне мешавине-III помешано је 20 g листова брезе (*B. pendula*), 24 g надземног дела кичице (*C. erythrea*), 28 g листова рузмарина (*R. officinalis*) и 28 g корена маслачка (*T. officinale*).

3.2. Одређивање најефективније биљне мешавине на основу *in vitro* тестирања биолошке активности

3.2.1. Припрема водених екстраката биљних мешавина и лековитог биља

Водени екстракти биљних мешавина и појединачних биљака добијени су уситњавањем 10 грама сувог биљног материјала, који је потом потопљен 48 сати у 100 милилитара растварача (дестилована вода), након чега је растварач потпуно уклоњен вакуум упаривачем („КА RV10“ ротирајући евапоратор са „НВ10“ купатилом,

Гаитхерсбург). Добијени екстракти су чувани на сувом и хладном месту, заштићеном од светлости до коришћења у *in vitro* тестовима.

3.2.2. Одређивање садржаја укупних фенола

Укупни садржај фенола водених екстраката мешавина лековитог биља и њихових појединачних биљних компоненти одређен је спектрофотометријски употребом „Фолин-Циокалтеу“ (енгл. „Folin-Ciocalteu“) реагенса који се као оксидационо средство при реакцији са полифенолима редукује до волфрам-оксида и молибден-оксида, док се фенолна једињења оксидују до феноксидних ањона (Lamuela-Raventos, 2018). При тој реакцији добија се плава боја раствора, чији је интензитет пропорционалан количини фенола у узорку и очитава се спектрофотометријски на апсорбанци од 740 nm таласне дужине (Stanojević et al., 2009).

Испитивани узорци екстраката растворени су у 100% метанолу (1 mg/ml) и 0,3 ml раствора помешано са 1,5 ml „Folin-Ciocalteu“ реагенса („Carlo Erba Reagent“, Шпанија) разблаженог у метанолу у односу 1:10 и 1,2 ml 7,5% Na₂CO₃ и инкубирано 2 сата на собној температури у мраку. Након инкубације очитана је апсорбанца на 740 nm у односу на слепу пробу (метанол) на спектрофотометру („UV-1650PC“, „Shimadzu Europe“ 1650), а концентрација укупних фенола у узорку одређена на основу калибрационе криве галне киселине (100-1000 mg/ml разблажене у метанолу) („Merck“, САД). Добијене вредности су изражене као милиграм еквивалента галне киселине по граму сувог екстракта (mg GAE/g).

3.2.3. Одређивање садржаја укупних флавоноида

Одређивање садржаја укупних флавоноида у воденим екстрактима биљних мешавина и њихових појединачних биљних компоненти вршено је спектрофотометријски на основу жуте бојене реакције флавоноида са металима (алуминијум), где је интензитет бојене реакције пропорционалан уделу флавоноида у узорку (Pękal and Purgzyska, 2014).

Испитивани узорци екстраката су растворени у 100% метанолу (1 mg/ml) и 1 ml раствора помешан са 6,4 ml дестиловане воде, 0,3 милилитра 5 % воденог раствора NaNO₂, 0,3 милилитра 10% воденог раствора AlCl₃ и 2 милилитра 1 моларног воденог раствора NaOH. Смеша је инкубирана 30 минута на собној температури, у мраку, након чега је очитана апсорбанца на 510 nm таласне дужине, а укупан садржај флавоноида у

екстрактима одређен на основу калибрационе криве кверцетин-хидрата (10–100 mg/l, раствореног у метанолу) („Sigma Adrich“, САД). Вредности су изражене као милиграм еквивалент кверцетина по граму сувог екстракта (mg QuE/g).

3.2.4. Одређивање потенцијала антиоксидативне активности

Способност екстраката да вежу слободне радикале и испоље антиоксидативну активност утврђена је на основу „DPPH“ теста спектрофотометријски. DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) („Sigma Aldrich“, САД) је синтетички слободни радикал, који се употребљава за тестирање способности антиоксидативних агенаса да га редукују при чему се одиграва бојена реакција из плаве у жуту (Blois, 1958).

Разблажења тестираних водених екстраката направљена су у 100% метанолу у концентрацији 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 µg/ml. По 0,3 ml сваког разблажења сваког појединачног екстракта помешано је са 2,7 ml раствора DPPH (0,04 mg/ml разблаженог у 100% метанолу), лагано промућкано и инкубирано 30 минута на собној температури у мраку. Након инкубације је очитана апсорбанца (А) на таласној дужини од 517 nm у односу на слепу пробу (апсолутни метанол). Као позитивна контрола коришћена је смеша 0,3 ml метанола и 2,7 ml DPPH раствора. Капацитет неутралисања DPPH радикала израчуната је по формули:

$$\text{Антиоксидативна активност (\%)} = [A(\text{контроле}) - A(\text{узорка}) / A(\text{контроле})] \times 100$$

Као референтни стандард коришћен је бутиловани хидрокситолуен (енгл. *Butylated hydroxytoluene* (BHT)).

3.2.5. Одређивање потенцијала инхибиције α-амилазе

In vitro антидијабетски потенцијал водених екстраката мешавина лековитог биља и њихових појединачних биљних компоненти испитан је тестом инхибиције активности α-амилазе, тј. способности екстраката да инхибирају активност овог ензима који разграђује скроб до малтозе (Ali et al., 2006). Као реагенс се користи „DNSA“ (енгл. *3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA)* – 3,5 -динитросалицилна киселина) бојени реагенс који при реакцији везивања за малтозу мења боју раствора од жуте до црвене. Интензитет промене боје је пропорционалан концентрацији ослобођене малтозе и детектује се спектрометријски.

Разблажења водених екстракта направљена су у диметил сулфоксиду (DMSO) („Acros Organics“, Белгија) у концентрацијама 10, 25, 50, 75, и 100 µg/ml. По 1 ml сваког разблажења сваког тестираног екстракта помешан је са 1 ml панкреасне α-амилазе (A3176, тип Б „Sigma Aldrich“, САД) (1 IJ/ml растворене у 0,02 моларном натријум фосфатном пуферу (са 6,7 mmol/l NaCl, pH 6,9)) и инкубиран 20 минута у воденом купатилу на 37°C. Потом је 1 ml инкубираног раствора помешан са 1 ml 0,5% раствора кромпировог скроба (S5651, „Sigma Aldrich“, САД) раствореног у 0,02 моларном натријум фосфатном пуферу (са 6,7 mmol/l NaCl; pH 6,9) и стабилизован загревањем 15 минута на 70°C. Добијена смеша је поново инкубирана 20 минута на 37°C у воденом купатилу. Након инкубације додат је по 1 ml „DNSA“ реагенса у сваки тестирани узорак и смеша кувана 5-10 минута до појаве наранџасте или црвене боје, а потом брзо охлађена. Након хлађења, у сваки узорак је додато по 9 милилитара дестиловане воде и очитана апсорбанца (А) на таласној дужини од 540 nm наспрам слепе пробе (1 ml „DMSO“, 1 ml натријум фосфатног пуфера, 1 ml скроба и 1 ml „DNSA“ припремљеног на исти начин као тестирани узорци). Као позитивна контрола коришћен је „DMSO“ уместо раствора екстракта. Концентрација ослобођене малтозе изражена је на основу калибрационе криве малтозе (0,05-2 mg/ml).

Потенцијал инхибиције α -амилазе је израчунат по формули:

$$\text{потенцијал инхибиције (\%)} = [A(\text{позитивне контроле}) - A(\text{узорка}) / A(\text{позитивне контроле})] \times 100$$

Припрема DNSA реагенса: 1 g „DNSA“ (динитросалицилна киселина, „Alfa Aesar“, САД) растворити у 20 ml једнонормалне NaOH уз мешање и загревање, а потом додати 30 g натријум -калијум тартарата и мешати док се не раствори. Охладити раствор, додати дестиловану воду до 100 ml, профильтрирати и чувати на тамном месту на собној температури.

3.2.6. Одређивање цитопротективне активности и нивоа цитотоксичности

3.2.6.1. Узорковање крви и изоловање еритроцита

Пуна крв је узета хепаринизованим шприцем пункцијом срца пацова соја *Wistar* анестезираног 10% Кетамидором у складу са принципима Етичке комисије Медицинског факултета, Универзитета у Нишу (бр. 323-07-01762/2019-05/8). Узорак крви је центрифугиран на 2000 rpm на + 4°C, одбачен супернатант са крвном плазмом,

леукоцитима и тромбоцитима и додата једнака запремина PBS-а (0,9%; pH 7,4), а потом центрифугирана три пута како би се добили пречишћени еритроцити (Kalili et al., 2014). Четворопостотна суспензија еритроцита је добијена разблаживњем PBS-ом.

3.2.6.2. Одређивање цитопротективне активности тестом антихемоллизе

Потенцијал заштите ћелијске мембране еритроцита од оксидативног стреса испитиваних водених екстраката, утврђен је тестом антихемоллизе (Kalili et al., 2014). Разблажења испитиваних екстраката направљена су у PBS-у у концентрацијама 25, 50, 75, 125, и 250 µg/ml, а тест је рађен у трипликату. По један милилитар суспензије еритроцита је пажљиво помешан са 0,5 ml узорка екстракта, а потом је додат PBS до запремине од 2,5 ml. Након 5 минута инкубације на собној температури додато је 250 µl 0,3% водоник-пероксида (H₂O₂), како би се индуковало оксидативно оштећење мембране еритроцита, и инкубирано 4 сата на 37°C у воденом купатилу. Након инкубације узорци су центрифугирани на 2000 rpm, а потом је 0,2 ml супернатанта помешано са 3 ml Драбкиновог реагенса и инкубирано 10 минута на собној температури. Апсорбанца (A) узорака очитана је на 540 nm. Као негативна контрола коришћен је PBS, док је дестилована H₂O₂ употребљена као позитивна контрола. ВНТ, разблажен у истим концентрацијама као и екстракти, коришћен је као стандард. Антихемолитичка активност екстраката прерачуната је по формули:

$$\text{Антихемолитичка активност (\%)} = [A(\text{позитивна контрола}) - A(\text{узорка}) / A(\text{позитивна контрола}) - A(\text{негативна контрола})] \times 100$$

3.2.6.3. Одређивање нивоа цитотоксичности тестом хемоллизе

Процена цитотоксичности екстраката урађена је тестом хемоллизе по методи Kalili et al. (2014). Разблажења екстраката биљних мешавина и појединачног лековитог биља припремљена су разблаживањем у PBS-у до концентрација 250, 500, 750, 1250 и 2500 µg/ml. Тест је рађен у трипликату. По 0,5 ml суспензије еритроцита пажљиво је помешано са 0,5 ml разблажења тестираних екстраката и инкубирано 2 сата на 37°C. Након периода инкубације, узорци су били центрифугирани на 2000 rpm, 5 минута на 4°C, након чега је 0,2 ml супернатанта узорка помешан са 0,3 ml Драбкиновог реагенса и инкубирано 10 минута на собној температури. Промена боје Драбкиновог реагенса услед везивања за хемоглобин лизираних еритроцита пропорционална је цитотоксичности испитиваног узорка и апсорбанца (A) је очитана на 540 nm

спектрофотометријски („UV-1650PC“, Shimadzu Europe“ 1650). Као негативна контрола употребљен је PBS-а, а дестилована вода као позитивна контрола. Хемолитичка активност тестираних узорка прерачуната је по формули:

$$\text{Хемолитичка активност (\%)} = \frac{A(\text{узорка}) - A(\text{негативне контроле})}{A(\text{позитивне контроле}) - A(\text{негативне контроле})} \times 100$$

Ниво цитотоксичности тестираних екстраката одређен је на основу стандардне дефиниције из литературе. Према томе се ниво хемолитичке активности дефинише се као **неутрални**, где је хемолитичка активност тестираних екстраката приближна негативној контроли; **слаб**, где је хемолиза < 20% у односу на негативну контролу; **јак**, где је хемолиза већа од 20% у односу на негативну контролу и **висок**, где је хемолитичка активност > 50% у односу на негативну контролу (Antosiewicz et al., 1990; Khalil et al., 2014).

3.3. Испитивање ефеката декокта биљне мешавине-I и сулфонилурее на моделу пацова

3.3.1. Припрема декокта биљне мешавине-I и лековитог биља које улази у њен састав

Декокоти биљне мешавине-I и појединачног лековитог биља које улази у њен састав добијени су тако што је 10 грама биљног материјала укувавано у 100 милилитара дестиловане воде док 90 милилитара течности не испари, након чега су сви декокти профилирани и коришћени истог дана за „HPLC“ анализу (енгл. *High-performance liquid chromatography* (HPLC) – течна хроматографија високих преформанси). Dekokt biljne mešavine-I korišćen je i za dalja *in vivo* ispitivanja.

3.3.2. „HPLC“ анализа

Фитохемијски састав декоката биљне мешавине-I, *C. erythraea*, *C. intybus* и *P. erecta* анализиран је течном хроматографијом високих перформанси са „DAD-UV“ детектором (енгл. *High-performance Liquid Chromatography coupled to Diode-Array Ultraviolet Detector* (HPLC-DAD-UV). Анализа је изведена на течном хроматографу „Agilent“ 1200 опремљеним „C18“ колоном („Zorbax Eclipse XDB-C18“, 5 µm, 4.6×150 mm), детектором са серијом диода (енгл. *diode array detector*), софтвером *Chemstation* (Agilent Technologies, САД), кватернерном пумпом, вакуум дегасером, аутосемплером и

опцијом за термостатирање колоне. Елуирање узорака изведено је у градијентном моду, варирањем запреминских односа елуента А (0,27 М раствор мравље киселине) и елуента Б (метанол): иницијално 70 % А (0-5 мин.), 70-30 % А (5-20 мин.), 30-10 % А (20-25 мин.). Температура колоне је била 25°C, ињектована запремина узорка 5 µl, проток елуента 1 ml/мин., опсег таласних дужина 190–400 nm, а таласна дужина детекције 254, 280 и 350 nm.

Идентификација компоненти екстракта је изведена на основу ретенционих времена и апсорпционих спектра комерцијално доступних стандарда галне киселине, мирицетина, кемпферол-3-глукозида, акацетина, хризина, кафеинске киселине, елагичне киселине, кафтарне киселине, транс-ферулне киселине, сиригинске киселине, изорамнетина, изокверцитрина, кверцитрина, кверцетина, рутина, рузмаринске киселине, танинске киселине, хесперидина, апигенина, нарингенина, катехина, епикатехина и хиперозида („Sigma Aldrich“, САД) и на основу постојеће литературе из онлине база „PubMed“ (<https://pubmed.ncbi.nlm.gov/>), „Web of Science“ (<https://www.chemsrc.com>) и „PubChem“ (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih>). Квантификација је извршена на основу калибрационих кривих за галну киселину (гална киселина, *p*-хидроксибензоева и деривати), катехин (катехин и деривати), кафену киселину (кафеинска киселина и деривати), *p*-кумарна (*p*-кумарна и деривати), рутин (рутин и остали гликозиди).

3.3.3. *In vivo* студија

Након утврђеног фитохемијског састава биљне мешавине-I испитана је њена ефикасност у третирању дијабетеса и његових патофизиолошких последица у виду секундарних компликација на моделу пацова са хемијски индукованим дијабетесом. Како би се утврдили могући штетни ефекти биљне мешавине-I анализирана је потенцијална токсичност на моделу пацова, али без индукције дијабетеса.

3.3.3.1. Експерименталне животиње

Како би се индуковао стабилан дијабетес у раду су коришћене женке пацова (Vital, 2006) соја *Wistar* (220-270 грама) са Института за Биомедицину Медицинског факултета у Нишу, Србија. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима при константној температури (23 ± 2 °C) и влажности ваздуха ($55 \pm 10\%$), одржаваном циркадијалном ритму сменом дана и ноћи на 12 сати и доступности воде и

хране *ad libitum*. Експерименталне процедуре спроведене су у складу са Законом о добробити животиња (Сл. гласник РС, бр. 41/09) и дозволом Етичке комисије Медицинског факултета у Нишу и Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде – Управа за ветерину (бр. 323-07-08987/2022-05).

3.3.3.3. Испитивање ефеката биљне мешавине-I и сулфониуреје на дијабетес код пацова

Од 40 животиња коришћених у овој студији, дијабетес је индукован код 35 животиња интраперитонеалним ињектирањем алоксан-монохидрата (150 mg/kg) раствореног у хладном PBS-у, након преконоћног гладовања, док је преосталих 5 животиња чинило здраву контролну групу без индукованог дијабетеса (не-дијабетична група – НД-К) и третирано само PBS-ом. Сат времена након ињектирања алоксан-монохидрата, животињама је даван 5% раствор глукозе у наредних 48 сати, *ad libitum*, ради спречавања појаве хипогликемије. Животиње код којих је ниво глукозе у крви 14 дана након ињектирања алоксана био већи од 20 mmol/l подељене су у седам засебних група по 5 животиња (Д-К, Д-2.5, Д-5, Д-10, Д-15, Д-И и Д-Г). Наредних 14 дана свакодневно Д-2.5, Д-5, Д-10, Д-15 група животиња је третирана оралном гаважом декоктом биљне мешавине-I (2,5, 5, 10 и 15 грама суве биљне материје по килограму) и Д-Г глимепиридом („Amaril“, „Senofi“, Француска) (1 mg/kg) док је Д-И група примала инсулин гларгин („Senofi“, Francuska) (13 IU/kg) интраперитонеалним ињектирањем. Дијабетична (Д-К) и не-дијабетична (НД-К) група су у наставку експеримента добијале воду оралним путем. Током експеримента је свакодневно мерена телесна маса животиња. Ниво глукозе у крви мерен је глукометром („FreeStyle Precision Neo“, „Abbott Diabetes Care Inc.“, УК) из репне вене пре ињектирања алоксана „нултог“ дана (0. дан), четрнаест дана након ињектирања алоксана (14. дан) и по завршетку третмана (28. дан).

3.3.3.4. Испитивање ефеката суб-хроничне токсичности и метаболичких ефеката биљне мешавине-I на моделу пацова

За испитивање суб-хроничне токсичности биљне мешавине-I коришћено је 25 животиња подељених у 5 група по 5 животиња. Четири групе (З-2.5, З-5, З-10 и З-15) су третиране орално декоктом биљне мешавине-1 (2.5, 5, 10 и 15 грама сувог биљном материјала по килограму), док је контролна група (З-К) добијала воду свакодневно током наредних 28 дана. Током третмана свакодневно је мерена тежина животиња, а једном недељно је мерен ниво глукозе у крви глукометром из репне вене и то 0. („нултог“), 7.,

14. и 28. дана од почетка експеримента („FreeStyle Precision Neo“, „Abbott Diabetes Care Inc.“, УК).

3.3.3.5. Узорковање крви и ткива животиња

По завршетку третмана животиње су након двадесетчетворчасовног гладовања анестезиране 10% кетаминим и крв је извучена хепаринизованим шприцем пункцијом срца. Крв је центрифугирана на 3500 rpm 10 минута, а добијени серум издвојен за биохемијску анализу. Ткиво јетре, леви бубрег и леви фемур су узорковани, испрани физиолошким раствором и фиксирани 10% формалдехидом, док су очи и мозак након узорковања фиксирани 4% формалдехидом. Десни бубрег је узоркован за потребе теста липидне пероксидације (Suvarna et al., 2012).

3.3.3.6. Биохемијска анализа серума

Ниво укупног холестерола, липопротеина велике густине (енгл. *High-density lipoprotein* (HDL)) и триглицерида, за одређивање липидног статуса третираних животиња, као и аспартат трансминазе (енгл. *Aspartate transaminase* (AST)), аланин трансминазе (енгл. *Alanine transaminase* (ALT)), алкалне фосфатазе (енгл. *Alkaline phosphatase* (ALP)), креатинина и урее измерени су спектрофотометријски из серума крви експерименталних животиња на аутоматизованом биохемијском анализатору („Cobas c311“, Roche) употребом комерцијално доступних китова и анализом по упутству произвођача („Roche Diagnostics GmbH“, Немачка). Концентрација липопротеина веома мале густине (енгл. *Very-low-density lipoprotein* (VLDL)) изражена је као једна петина концентрације триглицерида, док је концентрација липопротеина мале густине (енгл. *Low-density lipoprotein* (LDL)) израчуната по формули:

$$LDL \text{ (mmol/l)} = \text{триглицериди} - HDL - VLDL \text{ (Friedewald et al., 1992).}$$

3.3.3.7. Тест липидне пероксидације

Тест липидне пероксидације рађен је по методи Ohkawa et al. (1978) уз мање модификације. Користи се за доказивање нивоа оксидативног стреса у организму и ткивима на основу нивоа ослобођеног малондиалдехида (енгл. *Malondialdehyde* (MDA), „Sigma Aldrich“, САД) у узорку. MDA у узорку серума или хомогената ткива при интеракцији са тиобарбитурном киселином (енгл. *Tiobarbituric acid* (ТВА)) и трихлорсирћетном киселином (енгл. *Trichloroacetic acid* (ТСА)) формира „ТВАРС“ комплекс (енгл. *Tiobarbituric acid reactive substance* – реактивну супстанцу

тиобарбитурне киселине) који мења боју раствора у пинк. Интензитет боје се детектује спектрофотометријски на 532 nm.

Десетопостотни хомогенат бубрежног ткива у „TRIS-HCl“ (0,5 М; рН 7,4) центрифугиран је (10000 rpm, 10 минута, па + 4°C). Два ml узорка (супернатант хомогената бубрега/серум) и 2 ml „ТВА/ТСА/НСl“ реагенса је помешано и загрејано 20-30 минута на 95°C до формирања ружичастог хромогена. Раствор је охлађен и центрифугиран на 4000 rpm, 10 минута на +4°C. Интензитет бојене реакције измерен је на 532 nm („UV-1650PC“, „Shimadzu Europe“ 1650), а количина малондиалдехида у серуму и бубрегу израчуната на основу стандардне криве MDA. Концентрација MDA је изражена у $\mu\text{mol/ml}$ серума, односно nmol/g ткива бубрега.

3.3.3.8. Припрема ткива за хистопатолошку анализу

Узорци ткива јетре, бубрега, фемура, ока и мозга су, након 4 дана фиксације у формалину на + 4°C, пребачени у 70% етанол да стоје 2 сата уз једну промену након једног сата на собној температури. Затим су пребачени у 80% етанол, па у 96% етанол такође 2 сата уз једну промену на сат времена, а потом пребачени у 100% етанол да стоје 12 сати на собној температури. Затим су ткива пребачена у свеж 100% етанол и остављена да стоје 3 сата уз једну промену након једног сата и 30 минута. Након 3 сата замењен је нови 100% етанол и остављена да стоји 12 сати на собној температури. Након 12 сати ткивима је замењен етанол толуеном наредна 3 сата уз једну промену на 1 сат и 30 минута, а потом су пребачени у мешавину толуена и парапласта у односу 1:1 и остављени 2 сата на 65°C у термостату док толуен не испари. Мешавина је одливена и додат је свежи парапласт да стоји 12 сати у термостату на 65°C, након чега је одливен, додат свежи и након 2 сата су ткива укалупљена.

Калупљење ткива у парапласт је рађено на уређају за калупљење са топлотом и хладом плочом („Leica EG1150“, Немачка) у калупима за калупљење уз правилну оријентацију узорака ткива, преко чега је стављена мрежица за калупљење и охлађена. Готови калупи ткива су изрезани у трапез и скинут вишак парапласта ради прецизније израде пресека дебљине 5 μm на микротому (Leica RM2125 RT, Немачка). Добијени пресеци ткива налепљени су на предметна стакла и остављени на сушење.

3.3.3.9. Хистохемијско бојење ткива

Сува предметна стакла са ткивним пресецима су подвргнута различитим хистохемијским бојењима. Пре процеса бојења пресеци су депарафинисани на 65°C у термостату 1 сат, а потом избељивани 8 минута у толуену и хидратисани до воде проласком кроз опадајућу серију етанола на собној температури. Узорци су након бојења заштићени покровним стаклима залепљеним „DPX“-ом.

3.3.3.9.1. Хематоксилин-еозин бојење (ХЕ)

Бијење хематоксилином и еозином користи се за рутинско бојење једра и цитоплазме у ћелијама и екстрацелуларног матрикса парафинисаних ткива (Fischer et al., 2008).

Узорци ткива су депарафинисани и хидратисани кроз опадајућу серију етанола (100-80%) до воде, а потом бојени Харисовим хематоксилином 10 минута, испирани текућом водом 5 минута, а затим испрани дестилованом водом 3 минута. Потом су бојени еозином 20 секунди, испрани дестилованом водом (2 минута) и дехидратисани серијом растуће концентрације етанола (80-100%). Затим су сушени 5 минута на 65°C и одмах пребачени у толуен да стоје 8 минута на собној температури.

Припрема Харисовог хематоксилина (100 ml): 1 g хематоксилина растворен је у 10 ml 100% етанола, а потом помешано са 20 g калијумског алума ($KAl(SO_4)_2 \times H_2O$) раствореног у 190 ml вруће дестиловане воде и загрејано до кључања. У кључали раствор додато је полако 0,5 g живе(II)оксида (HgO) и кувано још 2-3 минута. Раствор је охлађен и додато је 20 милилитара глацијалне сирћетне киселине.

Припрема шток и радног раствора еозина: за припрему штока еозина растворено је 2 g еозина у 40 ml дестиловане воде и 160 ml 96% етанола. Радни раствор направљен је тако што је 50 ml штока разблажено у 12 ml етанола и 30 ml дестиловане воде и потом додат 1 ml глацијалне сирћетне киселине.

3.3.3.9.2. Масон трихромно бојење

Масон трихромно бојење се користи за бојење колагена у екстрацелуларном матриксу парафинисаних ткива (Suvarna et al., 2012). Пресеци ткива су депарафинисани и хидратисани серијом опадајуће концентрације етанола (100-80%) до воде, а потом бојени 5 минута „Weigert“-овим хематоксилином, испрани текућом водом 5 минута,

бојени 3 минута раствором киселог фуксина и „Ranseau“ бојом (помешаних у односу 1:2), па испрани дестилованом водом. Потом су предметна стакла преливена 1% фосфомолибденском киселином и држана 2 пута по 1 минут. Преко фосфомолибденске киселине додата је боја „анилин плаво“ (енгл. *anilin blue*) и држана 5 минута. Након тога су узорци испрани дестилованом водом и серијом растуће концентрације етанола (80-100%) и сушени 5 минута на 65°C. Врућа предметна стакла пребачена су у толуен да стоје 8 минута на собној температури.

Припрема „Weigerth“-ovog хематоксилина: Раствор А (2 g хематоксилина раствореног у 200 ml 96% етанола) помешан је са раствором Б (8 ml 29% гвожђе (III) хлорида (FeCl_3) раствореног у 2 ml концентроване HCl и 190 ml дестиловане воде), профилиран и чуван на 4°C.

Припрема раствора киселог фуксина: 1 g киселог фуксина растворено је у 100 ml вруће дестиловане воде, раствор охлађен, додат 1 ml глацијалне сирћетне киселине и профилиран.

Припрема „Ranseau“ боје: 1 g „Ranseau 2R“ растворен је у 100 ml вруће дестиловане воде, додат 1 ml глацијалне сирћетне киселине и раствор профилиран.

Припрема боје анилин плаво: 2,5 g „*anilin blue*“ растворено је у 100 ml вруће дестиловане воде, додато 2,5 милилитара глацијалне сирћетне киселине и раствор профилиран.

3.3.3.9.3. Бојење перјодном киселином и Шифовим реагенсом (ПАС)

Бојење перјодном киселином и Шифовим реагенсом се користи за бојење гликогена у парафинским препаратима ткива (Chawla et al., 2017). Ткивни узорци су депарафинисани и хидратисани серијом опадајуће концентрације етанола (100-80%) и дестилованом водом, подрвгнути деловању перјодне киселине 30 минута на + 4°C, испрани текућом водом 5 минута, а потом бојени Шифовим реагенсом 30 минута на + 4°C и испрани текућом водом 10 минута. Након тога су узорци бојени Харисовим хематоксилином 10 минута, испрани текућом водом 5 минута, а затим дехидратисани до 100% етанола и сушени 5 минута на 65°C. Врућа предметна стакла пребачена су у толуен да стоје 8 минута на собној температури.

Припрема перјодне киселине: 0,5 g перјодне киселине растворено је у 100 ml дестиловане воде и чувано на + 4°C.

Припрема Шифовог реагенса: Раствор А (1 g парарозанилина раствореног у 30 ml 1 нормалне HCl) је помешан са раствором Б (1 g натријум-метабисулфита раствореног у 170 ml дестиловане воде) и остављен да стоји 24 сата у мраку на собној температури. Раствору је потом додато 3 g активног угља, енергично промешано и исфилтрирано тако да се добије бистра течност. Чува се на + 4°C.

3.3.3.9.4. Бојење по Нислу

Бојење по Нислу се користи за бојење Нислове супстанце (плаве грануле у ћелијама) у здравим неуронима узорака мозга (Ooigawa et al., 2006). Депарафинисани и хидратисани узорци бојени су 0,1 % воденим раствором крезил виолет боје (енгл. *Cresyl violet*) 10 минута на собној температури, а потом испрани текућом, па дестилованом водом. Узорци су сушени 5 минута на 65°C а онда одмах прекривена покровним стаклом. Тамно обојена тела неурона, без видљивог једра су сматрана деградираним.

3.3.3.9. Хистопатолошка анализа

Ткиво бубрега и јетре подвргнути су ХЕ, Масон трихромном и ПАС методама хистохемијских бојења, коштаном ткивом ХЕ и Масон трихромном бојењу, пресеци ока ХЕ бојењу, а пресеци мозга методи бојења по Нислу. За потребе анализе 5-10 видних поља по пресеку ткива је снимано на светлосном микроскопу (Leica DM2500, Немачка) на увећањима 200x и 400x. Попречни пресеци кортикалног дела костију снимани су на стереоскопској лупи („Leica M205 C“, Немачка) на увећању 20x. Хистопатолошка анализа вршена је у софтверу ImageJ („НИН“, SAD).

У ткиву јетре анализиран је процентуални удео укупних хепатоцита (број укупних хепатоцита / укупан број ћелија јетре, %), процентуални удео Купферових ћелија (број Купферових ћелија / укупан број ћелија јетре, %), процентуални удео бинуклеусних хепатоцита (број бинуклеусних хепатоцита / број укупних хепатоцита, %), однос нуклеуса и цитоплазме (Н:Ц) у моноклеусним и бинуклеусним хепатоцитима, процентуална заступљеност количине колагена (%) (Масон-трихромним бојењем) и процентуална заступљеност депоа гликогена (ПАС бојењем).

На хистолошким препаратима бубрега анализирана је површина гломерулуса (μm^2), површина епитела проксималних тубула (μm^2), ниво колагена (%) и процентуална

заступљеност ПАС позитивних поља (%) и израчунат гломерулосклеротски индекс (ГСИ) (%) на основу процента ПАС позитивних поља у гломерулу (25%, 50%, 75% и 100% у по 10 гломерулу по животињи).

На попречном пресеку кортикалног дела дијафизе фемура измерена је површина кортикалног дела кости (П КДК = површина целе кости – површина костне сржи, mm^2), површина лакуна остеоцита (μm^2) и ниво колагена у коштаном ткиву (%), док је на уздужном пресеку епифиза фемура измерена површина трабекула (mm^2) и површина лакуна остеоцита (μm^2).

На пресеку ока измерене су ширине слојева ретине (μm), и то ширина спољашњег и унутрашњег сегмента (С+УС), спољашњег нуклеарног слоја (СНС), унутрашњег нуклеарног слоја (УНС) и слоја ганглијских ћелија (ГС) (Fathalipour et al., 2019).

На пресеку мозга анализиран је процентуални удео броја вијабилних нервних ћелија у регионима *Cornu ammonis* (CA1, CA2, CA3 и CA4) хипокампуса на основу бојења по Нислу (вијабилни неурони (светло-плаво обојени) (%) = (број вијабилних неурона / број укупних неурона) x 100. (Anjomshoa et al., 2020).

3.3. Статистичка анализа података

Статистичка анализа података извршена је у софтверу GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Калифорнија). Сви *in vivo* експерименти су изведени у трипликату, док су *in vivo* изведени у пентапликату. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

Разлика између контрола и тестираних концентрација екстраката у *in vitro* тестовима, као и контрола и третираних група експерименталних животиња у *in vivo* студијама, анализирана је једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) Тукијевим тестом вишеструког поређења. Зависност између укупних фенола, укупних флавоноида, ИЦ₅₀ вредности DPPH теста и ИЦ₅₀ вредности теста инхибиције α -амилазе анализирана је тестом Пирсоновог коефицијента корелације. Статистички значајна разлика је прихваћена уколико је *p* вредност мања од 0,05.

4. Резултати

4.1. Упоредна *in vitro* анализа екстракта биљних мешавина и лековитог биља

4.1.1. Анализа садржаја укупних фенола и флавоноида

Укупни феноли, укупни флавоноиди и принос свих тестираних екстракта приказани су у табели 1. На основу теста корелације утврђено је да је принос екстракта позитивно корелисан са вредностима укупног садржаја фенола тестираних екстракта ($r = 0,39$; $p < 0,05$). Вредности укупног садржаја фенола су такође у корелацији са вредностима укупног садржаја флавоноида екстракта ($r = 0,89$; $p < 0,001$).

Садржај укупних фенола свих тестираних екстракта је следећи: *R. officinalis* ($283,00 \pm 3,61$ mg GAE/g) > *P. erecta* ($266,67 \pm 2,52$ mg GAE/g) > биљна мешавина-I ($198,33 \pm 1,53$ mg GAE/g) > биљна мешавина-III ($165,33 \pm 0,06$ mg GAE/g) > биљна мешавина-II ($147,66 \pm 0,57$ mg GAE/g) > *B. pendula* ($106,00 \pm 1,00$ mg GAE/g) > *A. absinthium* ($98,33 \pm 0,58$ mg GAE/g) > *C. erythrea* ($93,67 \pm 1,52$ mg GAE/g) > *T. officinale* ($49,00 \pm 1,00$ mg GAE/g) > *C. intybus* ($39,33 \pm 0,57$ mg GAE/g) (Табела 1).

Табела 1. Принос, укупан садржај фенола и укупан садржај флавоноида тестираних екстракта.

Екстракт	Принос екстракта (%)	Укупни садржај фенола (mg GAE/g)	Укупни садржај флавоноида (mg QuE/g)
Биљна мешавина-I	18,88	$198,33 \pm 1,53^{бв}$	$88,67 \pm 8,5^б$
Биљна мешавина-II	23,64	$147,66 \pm 0,57^{аб}$	$105,33 \pm 4,61^{аб}$
Биљна мешавина-III	17,88	$165,33 \pm 0,06^{аб}$	$77,67 \pm 2,31^б$
<i>C. intybus</i>	51,34	$39,33 \pm 0,57^а$	$25,33 \pm 1,53^а$
<i>C. erythrea</i>	21,69	$93,67 \pm 1,52^{аб}$	$45,33 \pm 8,39^{аб}$
<i>P. erecta</i>	24,14	$266,67 \pm 2,52^{аб}$	$145,68 \pm 8,71^{аб}$
<i>R. officinalis</i>	6,74	$283,00 \pm 3,61^б$	$169,67 \pm 3,21^б$
<i>T. officinale</i>	34,34	$49,00 \pm 1,00^{бв}$	$22,67 \pm 0,57^{бв}$
<i>A. absinthium</i>	11,04	$98,33 \pm 0,58^б$	$78,33 \pm 1,53^б$
<i>B. pendula</i>	23,08	$106,00 \pm 1,00^б$	$53,00 \pm 2,64^б$

Статистички значајна разлика у односу на биљну мешавину-I (а) биљну мешавину-II (б) и биљну мешавину-III (в), $p < 0,001$.

Садржај укупних флавоноида тестираних екстракта је: *R. officinalis* ($169,67 \pm 3,21$ mg QuE/g) > *P. erecta* ($145,68 \pm 8,71$ mg QuE/g) > биљна мешавина-II ($105,33 \pm 4,61$ mg QuE/g) > биљна мешавина-I ($88,67 \pm 8,50$ mg QuE/g) > *A. absinthium* ($78,33 \pm 1,53$ mg QuE/g) > биљна мешавина-III ($77,67 \pm 2,31$ mg QuE/g) > *B. pendula* ($53,00 \pm 2,64$ mg QuE/g)

QuE/g) > *C. erythrea* (45,33 ± 8,39 mg QuE/g) > *C. intybus* (25,33 ± 1,53 mg QuE/g) > *T. officinale* (22,67 ± 0,57 mg QuE/g) (Табела 1).

Све три биљне мешавине садрже доста фенола и флавоноида. Екстракт биљне мешавине-I садржи највише фенола у поређењу са екстрактима друге две биљне мешавине (биљне мешавину-II и биљну мешавину-III), а износи 198,33 ± 1,53 mg GAE/g док биљна мешавина-II (105,33 ± 4,61 mg QuE/g) садржи највише укупних флавоноида у поређењу са другим биљним мешавинама (Табела 1).

4.1.2. Анализа антиоксидативног потенцијала

Антиоксидативни потенцијал тестираних екстраката биљних мешавина и њихових појединачних биљних компоненти анализираних методом елиминисања DPPH слободних радикала приказан је на графику 1. Резултати теста показују да сви екстракти, како биљних мешавина тако и појединачног лековитог биља, поседују одређени потенцијал елиминације слободних радикала DPPH. ИЦ₅₀ вредности антиоксидативне активности и укупних фенола ($r = 0,48$; $p < 0,05$) и ИЦ₅₀ вредности антиоксидативне активности и укупног садржаја флавоноида ($r = 0,38$; $p < 0,05$) свих тестираних екстраката показују корелацијску зависност.

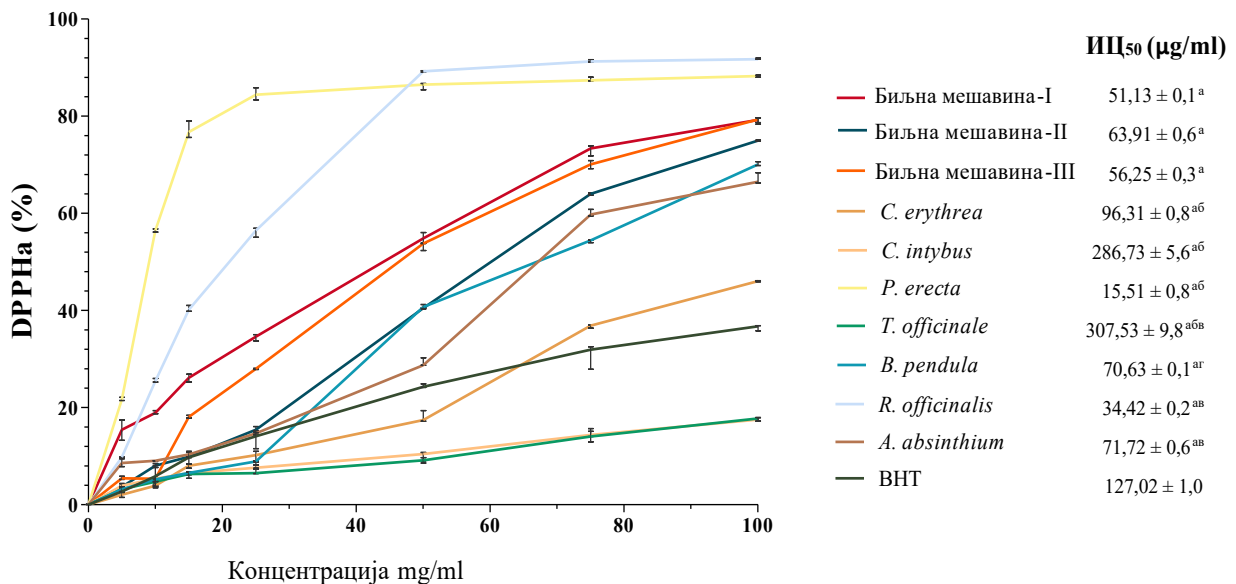


График 1. Антиоксидативна активност и ИЦ₅₀ вредности тестираних екстраката. Статистички значајна разлика у односу на ВНТ (а), биљну мешавину-I (б), биљну мешавину-II (в) и биљну мешавину-III (г), $p < 0,001$.

Сви тестирани екстракти, осим *T. officinale* и *C. intybus* имали су значајно већи антиоксидативни капацитет од ВНТ-а коришћеног као стандард ($p < 0,001$). ИЦ₅₀

вредности антиоксидативне активности тестираних екстраката је следећи: *P. erecta* ($15,51 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$) > *R. officinalis* ($34,42 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$) > биљна мешавина-I ($51,13 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$) > биљна мешавина-III ($56,25 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$) > биљна мешавина-II ($63,91 \pm 0,60 \mu\text{g/ml}$) > *B. pendula* ($70,63 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$) > *A. absinthium* ($71,72 \pm 0,60 \mu\text{g/ml}$) > *C. erythrea* ($96,31 \pm 0,80 \mu\text{g/ml}$) > ВНТ ($127,02 \pm 1,00 \mu\text{g/ml}$) > *C. intybus* ($286,73 \pm 5,60 \mu\text{g/ml}$) > *T. officinale* ($307,53 \pm 9,80 \mu\text{g/ml}$) (График 1).

Све три биљне мешавине показују велики антиоксидативни потенцијал, с тим што је највећи капацитет неутралисања DPPH поседовао екстракт биљне мешавине-I, док је екстракт биљне мешавине-II био најслабији антиоксиданс ($p < 0,001$).

4.1.3. Анализа потенцијал инхибиције α -амилазе

Потенцијал инхибиције α -амилазе екстраката све три биљне мешавина и њихових појединачних биљних компоненти, као и њихове ИЦ₅₀ вредности инхибиторне активности, приказани су на графику 2. ИЦ₅₀ вредности инхибиције α -амилазе свих тестираних екстраката су позитивно корелисани са вредностима садржаја укупних фенола ($r = 0,52$; $p < 0,05$) и флавоноида ($r = 0,33$; $p < 0,05$) екстраката.

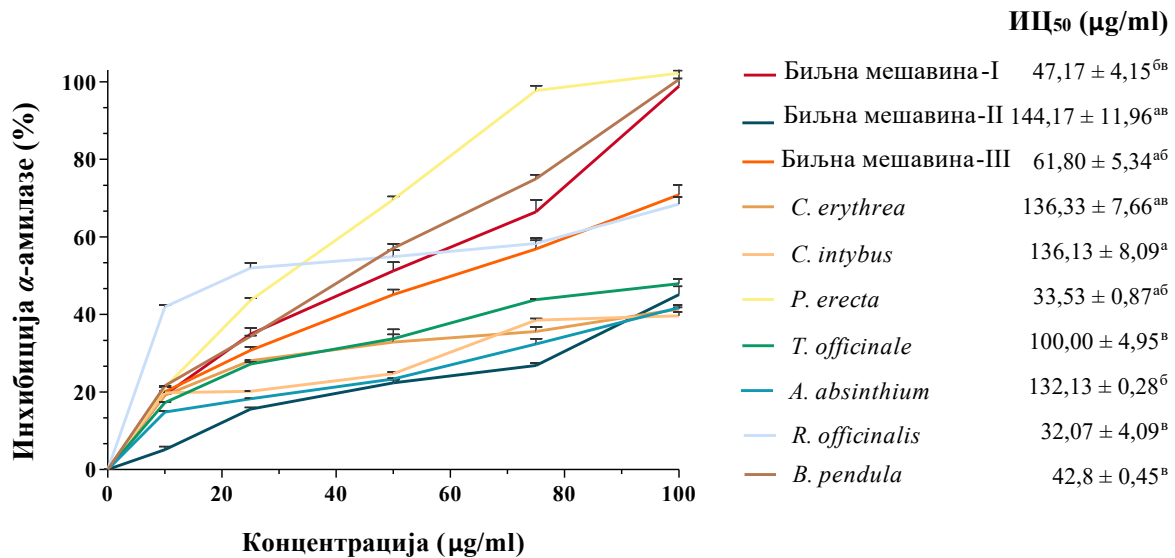


График 2. Потенцијал инхибиције α -амилазе и вредности ИЦ₅₀ тестираних екстраката. Статистички значајна разлика односу на биљну мешавину-I (а), биљну мешавину-II (б) и биљну мешавину-III (в) ($p < 0,01$).

Резултати теста показују да тестирани екстракти у одређеној мери инхибирају активност α -амилазе, а постоји и концентрацијска зависност дате активности са порастом концентрација екстраката ($p < 0,001$). ИЦ₅₀ вредности инхибиције α -амилазе свих

екстраката су следећи: *R. officinalis* ($32,07 \pm 4,09 \mu\text{g/ml}$) < *P. erecta* ($33,53 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$) < *B. pendula* ($42,8 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$) < биљна мешавина-I ($47,17 \pm 4,15 \mu\text{g/ml}$) < биљна мешавина-III ($61,80 \pm 5,34 \mu\text{g/ml}$) < *T. officinale* ($100,00 \pm 4,95 \mu\text{g/ml}$) < *A. absinthium* ($132,13 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$) < *C. intybus* ($136,13 \pm 5,34 \mu\text{g/ml}$) < *C. erythrea* ($136,33 \pm 7,66 \mu\text{g/ml}$) < биљна мешавина-II ($144,17 \pm 11,96 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0,001$).

Међусобним поређењем концентрација екстраката биљних мешавина који инхибирају 50% активности ензима (ИЦ₅₀), најснажније инхибиторно дејство показао је екстракт биљне мешавине-I ($47,17 \pm 4,15 \mu\text{g/ml}$), док је екстракт биљне мешавине-II показао најслабији ефекат ($144,17 \pm 11,96 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0,001$).

4.1.4. Анализа цитопротективне активности

Резултати теста антихемолизе показали су да све три биљне мешавине, као и њихове појединачне биљне компоненте штите мембране еритроцита од деловања H_2O_2 коришћене у различитим концентрацијама и да притом нема линеране корелисаности антихемолитичке активности са порастом концентрације екстраката (График 3).

Највећи цитопротективни потенцијал испољио је екстракт биљне мешавине-I у односу на екстракте друге две биљне мешавине ($p < 0,001$). Биљна мешавина-I при концентрацији од $25 \mu\text{g/ml}$ показује најснажније протективно дејство на оштећење мембрана H_2O_2 -ом, у поређењу са њеним појединачним биљним компонентама при истој концентрацији, и то: биљна мешавина-I ($93,01 \pm 0\%$) > *C. intybus* ($72,53 \pm 3,43\%$) > *C. erythrea* ($59,05 \pm 1,91\%$) > *P. erecta* ($7,176 \pm 0\%$) (График 3).

Биљна мешавина-II показује сличне ефекте, јер при концентрацији $75 \mu\text{g/ml}$ испољава најснажније антихемолитичко дејство у поређењу са њеним појединачним биљним компонентама коришћених у истој концентрацији, и то: биљна мешавина-II ($84 \pm 4,1\%$) > *A. absinthium* ($79,45 \pm 3,35\%$) > *T. officinale* ($76,71 \pm 1,89\%$) > *P. erecta* ($-230,87 \pm 7,01\%$) (График 3).

При концентрацији $75 \mu\text{g/ml}$ биљна мешавина-III показује најснажнији цитопротективни ефекат у поређењу са њеним појединачним биљним компонентама и то: биљна мешавина-III ($84 \pm 4,1\%$) > *C. erythrea* ($81,12 \pm 5,73\%$) > *T. officinalis* ($76,71 \pm 1,89\%$) > *B. Pendula* ($68,22 \pm 3,3\%$) > *R. Officinalis* ($33,33 \pm 3,36\%$) (График 3).

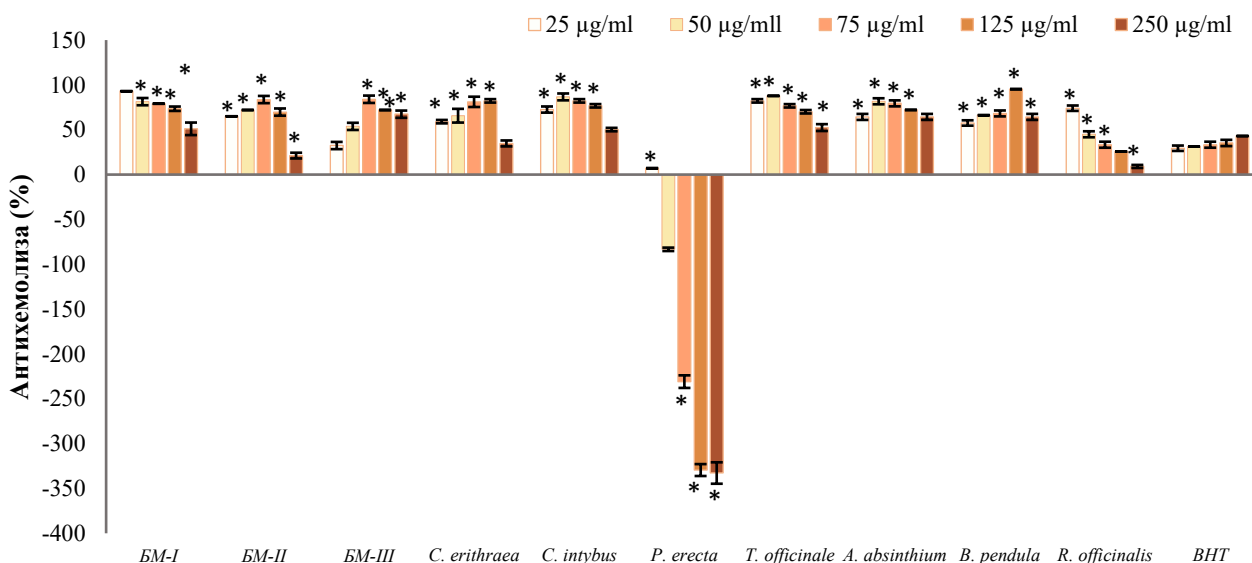


График 3. Антихемолитичка активност (%) тестираних екстраката: БМ-I: биљна мешавина-I; БМ-II: биљна мешавина-II; БМ-III: биљна мешавина-III; ВНТ: бутилхидроксианизол. Статистички значајна разлика у односу на ВНТ (*) $p < 0,01$.

Поред тога су сви тестирани екстракти осим екстракта *P. erecta* показали снажнији антихемолитички ефекат у поређењу са ВНТ-ом ($p < 0,01$).

4.1.5. Анализа нивоа цитотоксичности

Цитотоксичност водених екстраката три биљне мешавине и њихових појединачних биљних компоненти утврђена је на основу њихове хемолитичке активности на еритроците пацова. Као што је приказано на графику 4, сви тестирани екстракти поседују одређени ниво хемолитичке активности са концентрацијском зависношћу сваког појединачног екстракта ($p < 0,001$).

Упоређивањем хемолитичке активности екстраката при највећој тестираној концентрацији од 2500 µg/ml запажен је следећи ниво хемолитичке активности: *T. officinale* ($3,31 \pm 0,58\%$) < *C. intybus* ($5,08 \pm 0,22\%$) < *C. erythraea* ($5,73 \pm 0,19\%$) < *A. absinthium* ($6,77 \pm 0,19\%$) < *B. pendula* ($8,03 \pm 0,35\%$) < биљна мешавина-III ($11,57 \pm 0,79\%$) < биљна

мепавина-I ($16,08 \pm 0,74\%$) < биљна мешавина-II ($18,99 \pm 0,29\%$) < *R. officinalis* ($19,64 \pm 1,05\%$) < *P. erecta* ($43,44 \pm 1,62\%$) (График 4).

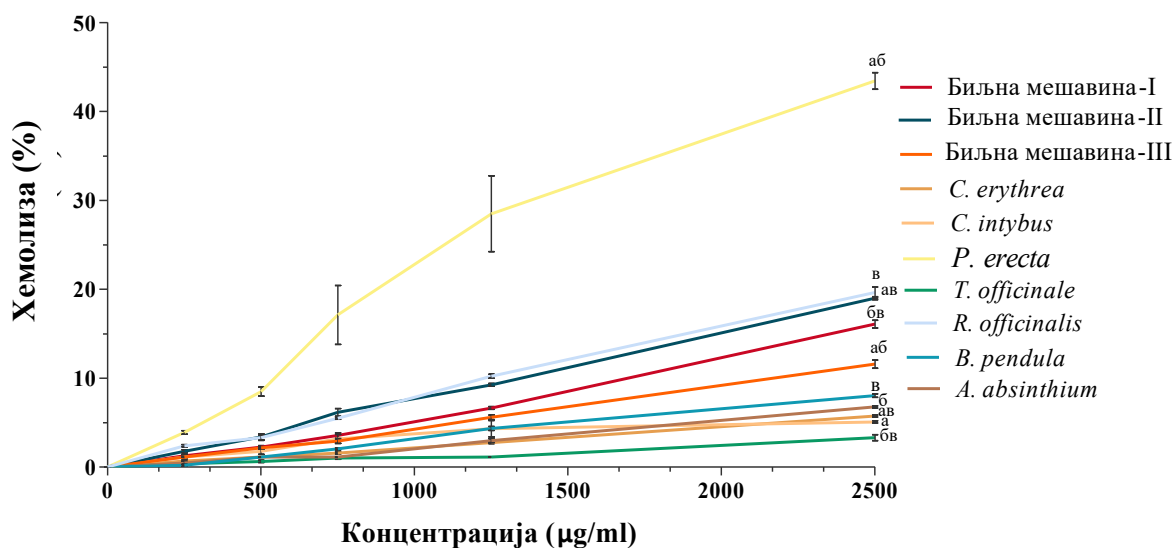


График 4. Хемолитичка активност тестираних екстраката. Статистички значајна разлика у односу на биљну мешавину-I (а), биљну мешавину-II (б) и биљну мешавину-III (в), $p < 0,001$.

Све три биљне мешавине показују слабу цитотоксичност, чак и при највећој тестираној концентрацији ($2500 \mu\text{g/ml}$). Поређењем њихових међусобних вредности, биљна мешавина-III показује најмању, а биљна мешавина-II највишу хемолитичку активност и то: биљна мешавина-III ($11,57 \pm 0,79\%$) < биљна мешавина-I ($16,08 \pm 0,74\%$) < биљна мешавина-II ($18,99 \pm 0,29\%$) са статистичком значајношћу $p < 0,001$.

4.2. Анализа ефеката декокта биљне мешавине-I и сулфонилурее

4.2.1. HPLC анализа декокта

HPLC-UV методом у декокту биљне мешавине идентификована је двадесетједна фитохемијска компонента на различитим таласним дужинама: катехин, епигалокатехин, галокатехин, катехин галат, епигалокатехин галат, епикатехин галат, епикатехин, *p*-хидроксибензоева киселина, дериват *p*-хидроксибензоеве киселине, кафеинска киселина, хлорогена киселина, цикорична киселина, два непозната деривата кафеинске киселине, хиперозид, изокверцетин, рутин, кверцитрин, изокверцитрин, изорамнетин и један непознати дериват кверцетина, као што је приказано у табели 2 и на графику 5.

Табела 2. Фитохемијска једињења у декокту биљне мешавине-I идентификованих HPLC методом.

	λ (nm)	једињење	р.т. (мин.)	п.п. (mAU*s)	конц. ($\mu\text{g/ml}$)
1	254, 280	катехин	3,015	120316,00	746,00
2	254, 280	епигалокатехин	3,455	6767,36	408,71
3	254	галокатехин галат	3,609	5370,00	321,07
4	254, 280	катехин галат	3,635	10700,00	650,07
5	254, 280	епигалокатехин галат	3,915	3474,57	203,49
6	254, 280	епикатехин галат	4,929	30044,92	174,40
7	254, 280	<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	6,582	13300,00	810,88
8	254	епикатехин	8,015	2549,67	146,21
9	254, 280	дериват <i>p</i> -хидроксибензоеве киселине	9,055	2946,03	170,78
10	254, 350	дериват кверцетина	12,249	113,15	7,95
11	254, 280	цикорична киселина	12,969	83,47	10,73
12	280	кверцитрин(кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид)	13,475	1009,14	58,87
13	254, 280	изокверцитрин	14,735	1378,03	79,84
14	280	кафеинска киселина	15,375	224,19	17,79
15	254, 280	хиперозид(кверцетин 3- <i>O</i> -галактозид)	15,895	176,07	11,53
16	254, 350	хлорогена киселина	16,502	113,15	12,22
17	350	изокверцетин(кверцетин3- <i>O</i> -глукозид)	17,135	515,98	30,84
18	350	рутин (кверцетин 3- <i>O</i> -рутинозид)	18,155	308,49	19,05
19	350	изорамнетин (3-метилкверцетин)	19,215	1599,48	92,42
20	350	дериват кафеинске киселине-1	20,055	149,95	14,02
21	350	дериват кафеинске киселине-2	21,602	78,08	10,46

λ - таласна дужина; р.т.: ретенционо време (мин.); п.п.: површина пика; конц.: концентрација једињења у декокту ($\mu\text{g/ml}$).

Најзаступљеније компоненте су *p*-хидроксибензоева киселина (810,00 $\mu\text{g/ml}$), катехин (764,00 $\mu\text{g/ml}$), катехин галат (650,07 $\mu\text{g/ml}$), епигалокатехин (408,71 $\mu\text{g/ml}$), галокатехин (321,07 $\mu\text{g/ml}$), епигалокатехин галат (203,49 $\mu\text{g/ml}$), епикатехин галат (174,40 $\mu\text{g/ml}$), дериват *p*-хидроксибензоеве киселине (170,78 $\mu\text{g/ml}$), епикатехин (146,21 $\mu\text{g/ml}$), изорамнетин (92,42 $\mu\text{g/ml}$), изокверцитрин (79,87 $\mu\text{g/ml}$), кверцитрин (58,87 $\mu\text{g/ml}$), изокверцетин (30,84 $\mu\text{g/ml}$), као и рутин (19,05 $\mu\text{g/ml}$), кафеинска киселина (17,79 $\mu\text{g/ml}$), дериват кафеинске киселине-1 (14,02 $\mu\text{g/ml}$), хлорогена киселина (12,22 $\mu\text{g/ml}$), цикорична киселина (10,73 $\mu\text{g/ml}$), дериват кафеинске киселине-2 (10,46 $\mu\text{g/ml}$), хиперозид (11,53 $\mu\text{g/ml}$) и дериват кверцетина (7,95 $\mu\text{g/ml}$) у траговима (Табела 2).

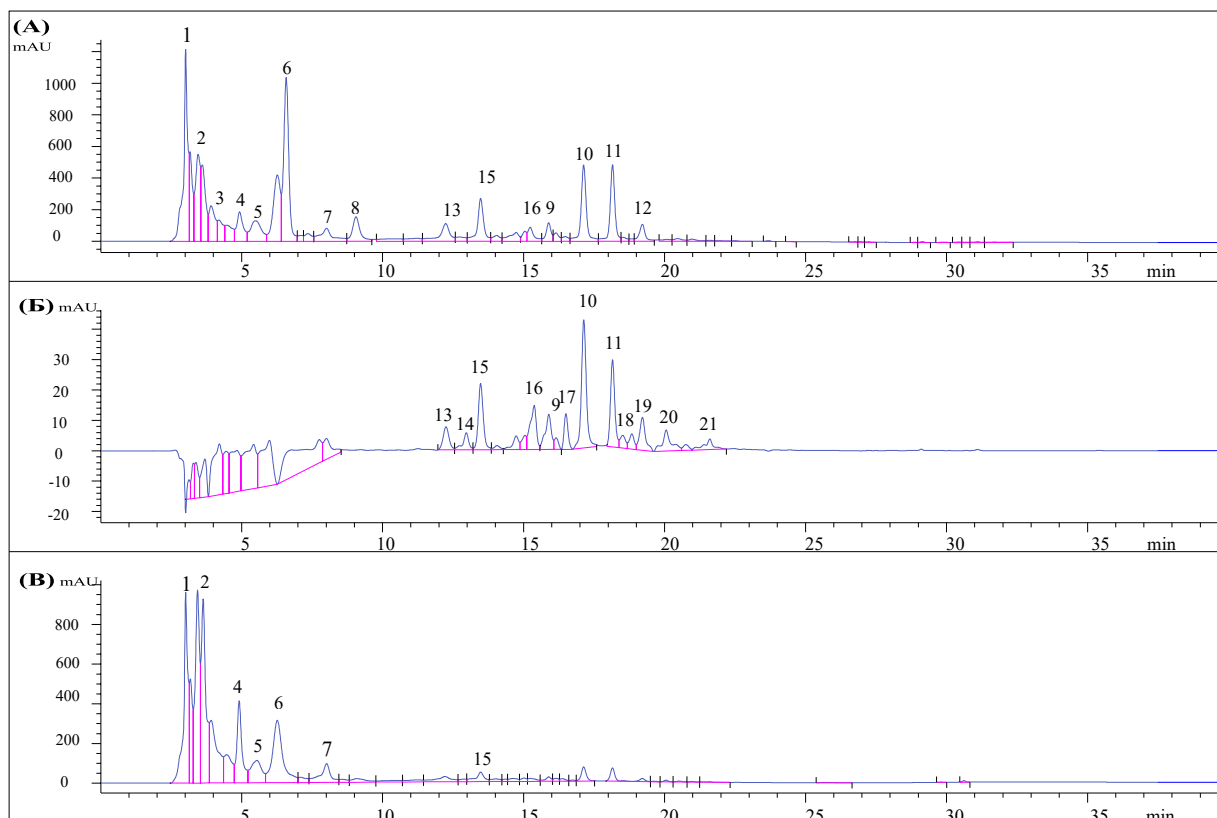


График 5. HPLC хроматограм фитохемијских једињења декокта биљне мешавине снимљен на 254 (А), 350 (Б) и 280 nm (В). 1: катехин; 2: епигалокатехин; 3: галокатехин; 4: катехин галат; 5: епигалокатехин галат; 6: епикатехин галат; 7: *p*-хидроксибензоева киселине; 8: епикатехин; 9: дериват *p*-хидроксибензоева киселине; 10: дериват кверцетина; 11: цикорична киселина; 12: кверцитрин; 13: изокверцитрин; 14: кафеинска киселина; 15: хиперозид; 16: хлорогена киселина; 17: изокверцетин; 18: рутин; 19: изорамнетин; 20: дериват кафеинске киселине-1; 21: дериват кафеинске киселине-2.

У табели 3 и на трафику 6 приказано је 16 фитохемијских компоненти идентификованих у декокту *C. erythrea* на различитим таласним дужинама: тартарна киселина, деривати *p*-кумарне киселине, гална киселина, *p*-хидроксибензоева киселина и њени деривати, дериват сиригинске киселине и осам деривата кемпферола.

Табела 3. Фитохемијска једињења у декокту кичице (*C. erythrea*) идентификованих HPLC методом.

	λ (nm)	једињење	р.т. (мин.)	п.а. (mAU*s)	конц. ($\mu\text{g/ml}$)
1	254	тартарна киселина	3,008	6719,86	404,76
2	280	дериват <i>p</i> -кумарне киселине-1	3,188	1768,38	97,77
3	280	дериват <i>p</i> -кумарне киселине-2	3,408	4947,01	294,84
4	280	гална киселина	3,782	1145,58	59,15
5	254, 280	<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	6,16	1352,96	72,01
6	254	дериват <i>p</i> -хидроксибензоеве киселине-1	6,795	2226,63	126,18
7	254, 280	дериват сиригинске киселине	7,508	4860,62	289,49
8	254, 280	дериват <i>p</i> -хидроксибензоеве киселине-2	8,422	13900,00	852,03
9	350	дериват кемпферола-1	14,255	146,16	13,90
10	280, 350	дериват кемпферола-2	15,568	224,16	17,81
11	350	дериват кемпферола-3	16,068	778,18	45,63
12	350	дериват кемпферола-4	18,235	365,18	24,90
13	350	дериват кемпферола-5	18,582	400,18	26,66
14	280, 350	дериват кемпферола-6	19,848	646,10	38,96
15	350	дериват кемпферола-7	20,588	144,99	13,82
16	350	дериват кемпферола-8	21,482	255,63	19,37

λ - таласна дужина; р.т.: ретенционо време (мин.); п.п.: површина пика; конц. : концентрација једињења у декокту ($\mu\text{g/ml}$).

Најзаступљеније компоненте су дериват *p*-хидроксибензоеве киселине-2 (852,03 $\mu\text{g/ml}$), тартарна киселина (404,76 $\mu\text{g/ml}$), дериват *p*-кумарне киселине-2 (294,84 $\mu\text{g/ml}$), дериват сиригинске киселине (289,49 $\mu\text{g/ml}$), дериват *p*-хидроксибензоеве киселине-1 (126,18 $\mu\text{g/ml}$), *p*-хидроксибензоева киселина (72,01 $\mu\text{g/ml}$), дериват *p*-кумарне киселине-1 (97,77 $\mu\text{g/ml}$), гална киселина (59,15 $\mu\text{g/ml}$). У мањој количини садржи и 8 деривата кемпферола и то дериват кемпферола-3, -6, -5, -4, -8, -2, -1 и -7 (45,63; 38,96; 26,66; 24,90; 19,37; 17,81; 13,90 и 13,82 $\mu\text{g/ml}$) (Табела 3).

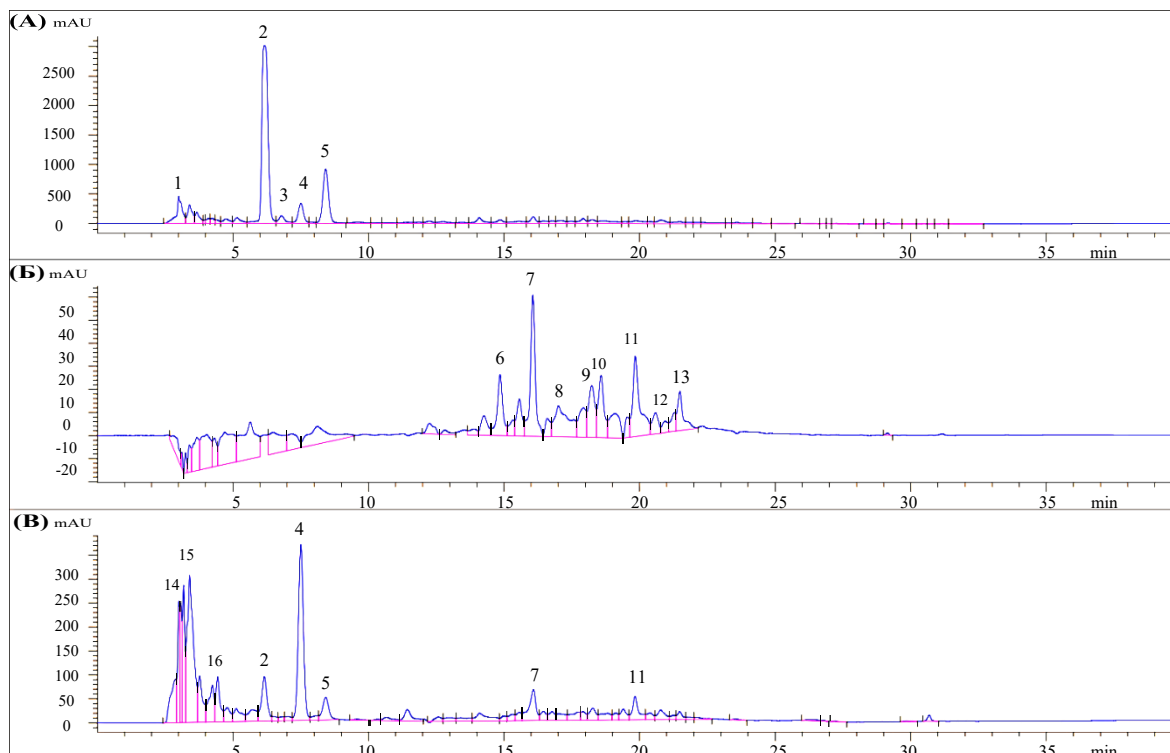


График 6. HPLC хроматограм фитохемијских једињења декокта кичице (*C. erythraea*) снимљен на 254 (А), 350 (Б) и 280 nm (В). 1: тартарна киселина; 2: *p*-хидроксибензоева киселина; 3: дериват *p*-хидроксибензоеве киселине-1; 4: дериват сиригинске киселине; 5: дериват *p*-хидроксибензоеве киселине-2; 6: дериват кемпферола-1; 7: дериват кемпферола-2; 8: дериват кемпферола-3; 9: дериват кемпферола-4; 10: дериват кемпферола-5; 11: дериват кемпферола-6; 12: дериват кемпферола-7; 13: дериват кемпферола-8; 14: гална киселина; 15: дериват *p*-кумарне киселине-1; 16: дериват *p*-кумарне киселине-2.

У декокту *C. intybus* детектовано је 13 фитохемијских компоненти идентификованих на различитим таласним дужинама, и то: протокатехинска киселина и 6 деривата протокатехинске киселине, гална киселина, кафтарна киселина, кафеинска киселина, цикорична киселина, хлорогена киселина и један непознати дериват кафеинске киселине (Табела 4; График 7).

Најзаступљенија идентификована једињења су протокатехинска киселина (93,61 $\mu\text{g/ml}$) и деривати протокатенинске киселине-2 и -1 (64,88 и 64,36 $\mu\text{g/ml}$). У знатно мањој концентрацији садржи дериват протокатехинске киселине-5, -4 и -6 (33,06; 20,69 и 19,21 $\mu\text{g/ml}$), кафеинску киселину (27,34 $\mu\text{g/ml}$), кафтарну киселину (21,85 $\mu\text{g/ml}$) и галну киселину (20,69 $\mu\text{g/ml}$), док су дериват протокатехинске киселине-3 (14,30 $\mu\text{g/ml}$), хлорогена киселина (13,63 $\mu\text{g/ml}$), дериват кафеинске киселине (11,79 $\mu\text{g/ml}$) и цикорична киселина (9,58 $\mu\text{g/ml}$) заступљени у траговима (Табела 4).

Табела 4. Фитохемијска једињења у декокту водопије (*C. intybus*) идентификованих HPLC методом.

	λ (nm)	једињење	р.т. (мин.)	п.а. (mAU*s)	конц. ($\mu\text{g/ml}$)
1	254, 280	дериват протокатехинске киселине-1	3,013	1229,48	64,36
2	254, 280	дериват протокатехинске киселине-2	3,706	1237,98	64,88
3	280	гална киселина	3,99	516,70	20,16
4	254	дериват протокатехинске киселине-3	4,553	422,14	14,30
5	254, 280	протокатехинска киселина	5,366	1701,28	93,61
6	350	кафтарна киселина	5,979	305,03	21,85
7	254, 280	дериват протокатехинске киселине-4	7,086	525,18	20,69
8	254, 280	дериват протокатехинске киселине-5	9,225	724,68	33,06
9	254, 280	дериват протокатехинске киселине-6	14,573	501,45	19,21
10	350	цикорична киселина	14,906	60,62	9,58
11	350	кафеинска киселина	15,373	414,40	27,34
12	350	хлорогена киселина	15,699	141,25	13,63
13	350	дериват кафеинске киселине-3	17,166	104,66	11,79

λ - таласна дужина; р.т.: ретенционо време (мин.); п.а.: површина пика; конц. : концентрација једињења у декокту ($\mu\text{g/ml}$).

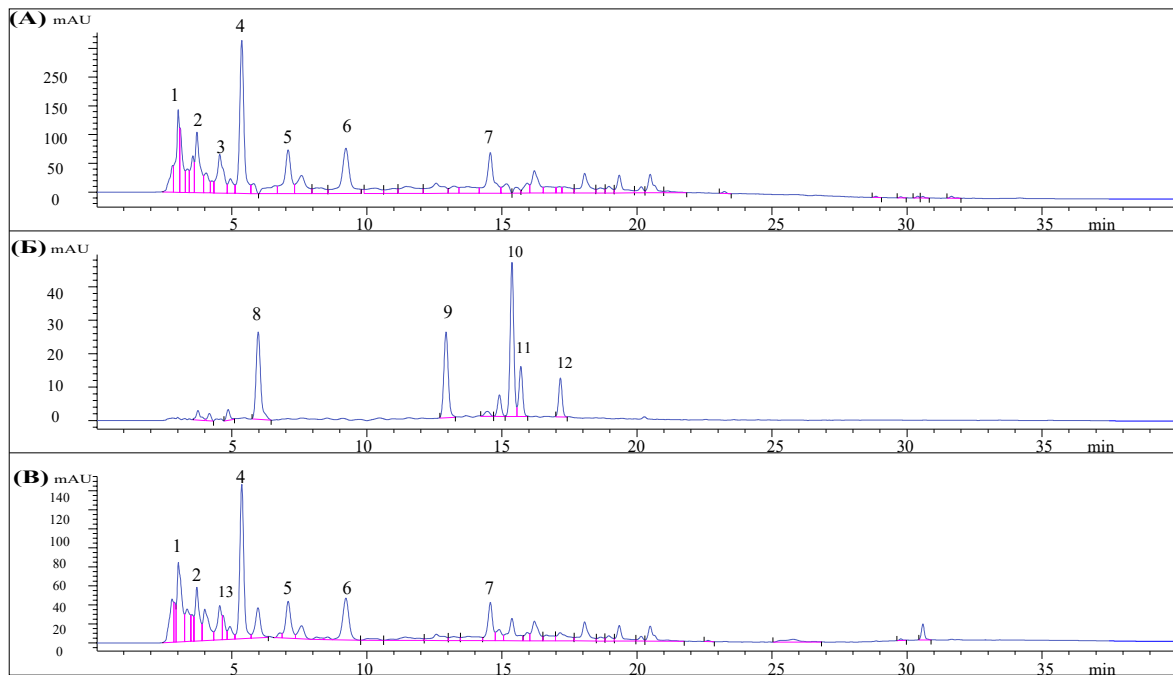


График 7. HPLC хроматограм фитохемијских једињења декокта водопије (*C. intybus*) снимљен на 254 (А), 350 (Б) и 280 nm (Б). 1: дериват протокатехинске киселине-1; 2: дериват протокатехинске киселине-2; 3 : дериват протокатехинске киселине-3; 4: протокатехинска киселина; 5: дериват протокатехинске киселине-4; 6: дериват протокатехинске киселине-5; 7: дериват протокатехинске киселине-6; 8: кафтарна киселина; 9: цикорична киселина; 10: кафеинска киселина; 11: хлорогена киселина; 12: дериват кафеинске киселине; 13 : гална киселина.

Декокт *P. erecta* садржи 14 фитохемијских компоненти идентификованих на различитим таласним дужинама: катехин, 3 непозната деривата катехина, галокатехин,

епигалокатехин, епикатехин, епикатехин галат, кверцитрин, изокверцитрин, изорамнетин, рутин и један непознати дериват кверцетина (Табела 5; График 8).

Табела 5. Фитохемијска једињења у декокту жуте стеже (*P. erecta*) идентификованих HPLC методом.

	λ (nm)	једињење	р.т. (мин.)	п.а. (mAU*s)	конц. ($\mu\text{g/ml}$)
1	254, 280	катехин	3,009	15800,00	982,00
2	280	галоказехин	3,609	8070,94	488,53
3	280	епигалокатехин галат	3,916	5515,37	330,08
4	254	дериват катехина-1	3,169	6522,32	392,51
5	280	епикатехин галат	3,456	10000,00	610,68
6	254, 280	катехин -3 -O-галат	4,896	4937,05	294,23
7	254	дериват катехина-2	5,516	4908,09	292,43
8	254, 280	дериват катехина-3	6,242	20000,00	1230,35
9	350	дериват кверцетина	12,189	3748,33	214,54
10	254, 380	кверцитрин (кверцетин-3-O-рамнозид)	13,436	5646,30	322,41
11	254, 350	хиперозид (кверцетин-3-O-галактозид)	15,876	1662,37	95,99
12	254, 350	изокверцитрин (кверцетин-3-O-глукозид)	17,109	8637,94	492,43
13	254, 350	рутин (кверцетин-3-O-рутинозид)	18,136	8404,28	420,36
14	254, 350	изорамнетин (3-метилкверцетин)	19,209	1718,44	99,18

λ - таласна дужина; р.т.: ретенционо време (мин.); п.п.: површина пика; конц.: концентрација једињења у декокту ($\mu\text{g/ml}$).

Најзаступљеније компоненте су дериват катехина-3 (1230,35 $\mu\text{g/ml}$), катехин (982,00 $\mu\text{g/ml}$), епигалокатехин (610,68 $\mu\text{g/ml}$), галокатехин (488,53 $\mu\text{g/ml}$), изокверцетин (492,43 $\mu\text{g/ml}$), рутин (420,36 $\mu\text{g/ml}$) и незнатно мање заступљене дериват катехина-1 (392,51 $\mu\text{g/ml}$), епигалокатехин галат (330,08 $\mu\text{g/ml}$), епикатехин галат епикатехин галат (294,23 $\mu\text{g/ml}$), дериват катехина-2 (292,43 $\mu\text{g/ml}$), кверцитрин (322,41 $\mu\text{g/ml}$), дериват кверцетина (214,54 $\mu\text{g/ml}$), изорамнетин (99,18 $\mu\text{g/ml}$) и хиперозид (95,99 $\mu\text{g/ml}$) (Табела 5).

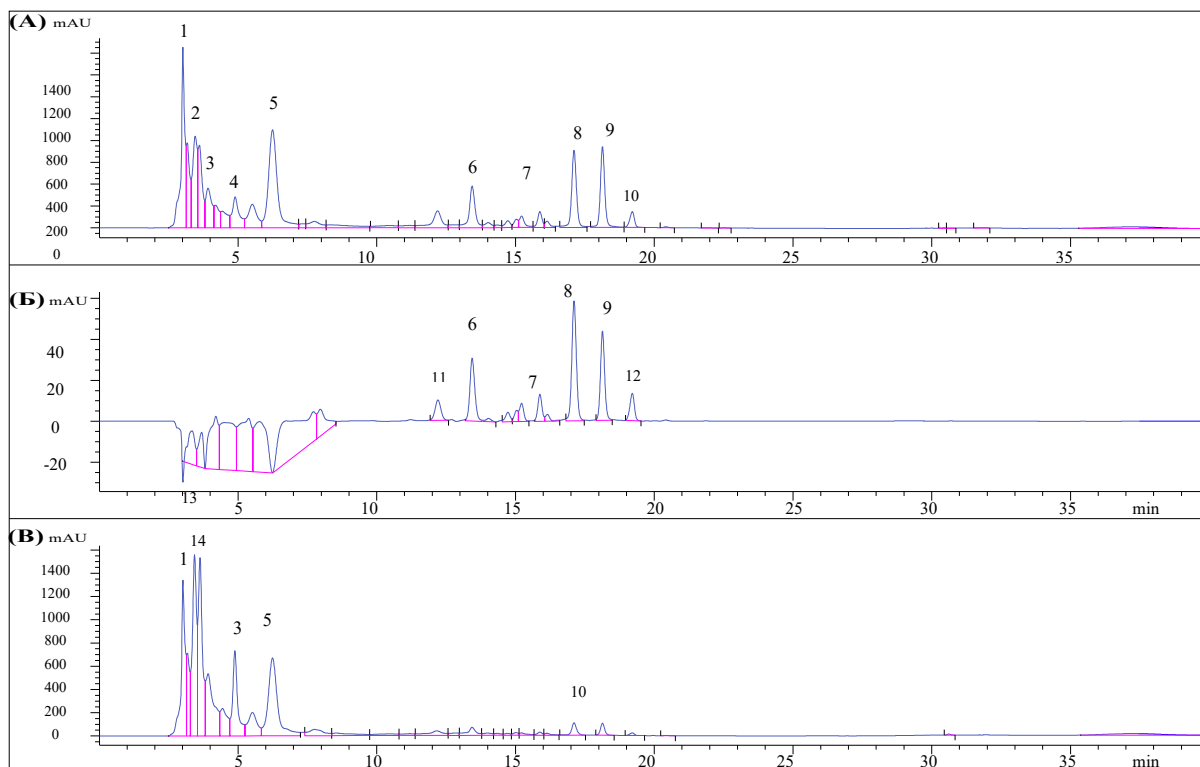


График 8. HPLC хроматограм фитохемијских једињења декокта жуте стеже (*P. erecta*) снимљен на 254 (A), 350 (Б) и 280 nm (B). 1: катехин; 2: дериват катехина-1; 3: епикатехин галат; 4: дериват катехина-2; 5: дериват катехина-3; 6: хиперозид; 7: кверцитрин; 8: изорамнетин; 9: рутин; 10: кверцетин-3-*O*-глукозид; 11: дериват кверцетина; 12: епигалокатехин; 13: галокатехин; 14: епигалокатехин галат.

4.2.2. Ефекат биљне мешавине-I и сулфонилурее на секундарне компликације дијабетеса код животиња

4.2.2.1. Ефекат на снижавање нивоа гликемије

У табели 6 приказан је ниво глукозе у крви пацова пре индукције дијабетеса (0. дана), након индукције дијабетеса (14. дана) и на крају третмана биљном мешавином, инсулином и глимепиридом (28. дан). Након 14 дана од ињектирања алоксан монохидрата, ниво шећера у крви експерименталних група са индукованим дијабетесом (25,93-28,13 mmol/l) био је значајно виши у поређењу са здравом контролном групом ($3,83 \pm 0,68$ mmol/l) ($p < 0,001$). Са порастом концентрације биљне мешавине-I ниво глукозе у крви третираних животиња се значајно смањује у поређењу са нивоом глукозе у крви дијабетичне контролне групе ($23,87 \pm 1,05$ mmol/l) ($p < 0,001$) до потпуне редукције хипергликемије при концентрацији 15 g/kg ($5,24 \pm 0,06$ mmol/l). Третмани инсулином и глимепиридом такође смањују ниво шећера у крви ($15,72 \pm 0,84$ и $17,47 \pm 0,75$ mmol/l), али у знатно мањој мери од биљне мешавине ($p < 0,001$) (Табела 6).

Табела 6. Ниво глукозе у крви код дијабетичних група животиња измерен нултог, 14. и 28. дана од почетка експеримента.

Експериментална група	Ниво глукозе у крви (mmol/l)		
	0. дан	14. дан	28. дан
Д-К	$3,43 \pm 0,15^b$	$25,96 \pm 1,64^b$	$23,87 \pm 1,05^b$
Д-2.5	$4,93 \pm 0,37$	$27,36 \pm 0,42^a$	$16,62 \pm 0,79^{ab}$
Д-5	$4,83 \pm 0,32$	$26,87 \pm 0,84^a$	$15,08 \pm 0,69^{ab\gamma}$
Д-10	$5,06 \pm 0,40^a$	$25,93 \pm 1,75^a$	$8,77 \pm 0,11^{ab\gamma}$
Д-15	$4,70 \pm 0,86$	$26,33 \pm 1,25^a$	$5,24 \pm 0,06^{ab\gamma}$
Д-И	$5,47 \pm 0,35^a$	$26,73 \pm 0,45^a$	$15,72 \pm 0,84^{ab\gamma}$
Д-Г	$4,67 \pm 1,04$	$28,13 \pm 1,15^a$	$17,47 \pm 0,75^{ab\gamma}$
НД-К	$4,97 \pm 0,51$	$3,83 \pm 0,68^a$	$4,53 \pm 0,15^{ab\gamma}$

Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^a $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^b $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^γ $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^γ $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

4.2.2.2. Ефекат на промену индекса телесне масе и липидни статус

Промена телесне масе животиња до 7-ог и 14-ог дана од почетка третмана приказана је на графику 9. Животиње дијабетичне контролне групе су значајно губе на маси ($-11,73 \pm 4,80\%$ 7-ог дана и $-16,91 \pm 5,87\%$ 14-ог дана од почетка третмана) у поређењу са не-дијабетичном контролном групом ($22,68 \pm 6,81\%$ 7-ог дана и $38,51 \pm 9,67\%$ 14-ог дана од почетка третмана) ($p < 0,001$). Знатно повећање индекса телесне масе

забележено је код експерименталне групе третиране биљном мешавином у концентрацији 15 g/kg ($20,68 \pm 12,64\%$ 7-ог дана и $26,22 \pm 13,47\%$ 14 -ог дана од почетка третмана), док је незнатно повећање забележено код група третираних глимепиридом ($9,39 \pm 8,79\%$ 7-ог дана и $17,25 \pm 13,65\%$ 14-ог дана од почетка третмана) Д-К (График 9).

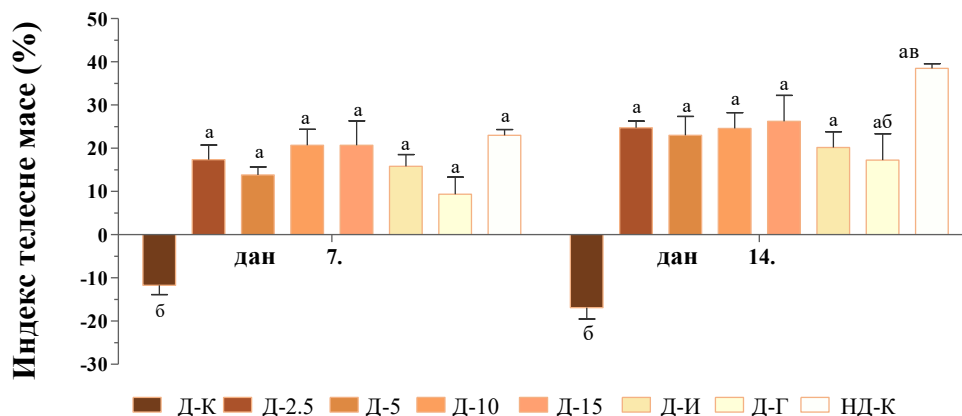


График 9. Индекс телесне масе дијабетичних група животиња 7. и 14. дана од почетка експеримента. Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^a $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^б $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^{аб} $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^а $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

Ефекат биљне мешавине-I на липидни статус дијабетичних животиња приказан је у табели 7. Код дијабетичне контролне групе запажен је повишен ниво укупног холестерола, LDL-а, триглицерида и VLDL-а у крвном серуму ($2,47 \pm 0,14$; $1,45 \pm 0,09$; $1,80 \pm 0,14$ и $0,36 \pm 0,03$ mmol/l) у поређењу са не-дијабетичном контролном групом ($1,45 \pm 0,02$; $0,45 \pm 0,05$; $0,43 \pm 0,03$ и $0,09 \pm 0,02$ mmol/l) ($p < 0,001$), док је ниво HDL-а смањен код Д-К групе ($0,21 \pm 0,06$ mmol/l) у поређењу са НД-К групом ($1,39 \pm 0,11$ mmol/l) ($p < 0,001$). Ниво укупног холестерола, LDL-а, триглицерида и VLDL-а линеарно опада са порастом концентрације биљне мешавине, док ниво HDL-а линеарно расте при третману растуће концентрације биљне мешавине у поређењу са дијабетичном контролном групом ($p < 0,001$).

Третман биљном мешавином и при концентрацији 2,5 g/kg значајно редукује повећан ниво укупног холестерола, LDL-а, триглицерида и VLDL-а ($1,48 \pm 0,48$; $0,35 \pm 0,02$; $0,43 \pm 0,15$ и $0,09 \pm 0,03$ mmol/l) доводећи их на ниво код здраве контролне групе ($p < 0,001$), док је при концентрацији 15 g/kg вредност LDL-а значајно побољшана ($0,01 \pm$

0,01 mmol/l) и у односу на здраву контролну групу ($p < 0,001$). Третмани инсулином и глимепиридом потпуно редукују ниво LDL-а ($0,35 \pm 0,08$ и $0,35 \pm 0,10$ mmol/l) до нивоа као код НД-К групе ($p < 0,001$), ниво триглицерида и VLDL-а снижавају ($0,35 \pm 0,01$ и $0,17 \pm 0,03$ mmol/ml) у односу на Д-К групу ($p < 0,001$), али не регулишу у потпуности до нивоа НД-К групе ($p < 0,001$), док на ниво укупног холестерола немају никаквог ефекта. Ниво HDL-а је повећан до нивоа као код здравих животиња услед третмана биљном мешавином са вишим концентрацијама 10 g/kg ($1,27 \pm 0,04$ mmol/l) и 15 g/kg ($1,34 \pm 0,09$ mmol/l) и инсулином ($1,52 \pm 0,11$ mmol/l), док третман глимепиридом, чак, повећава вредност ($1,74 \pm 0,10$ mmol/l) у односу на НД-К групу, али без значајне разлике (Табела 7).

Табела 7. Липидни статус дијабетичних група животиња на крају експеримента.

Експериментална група	Укупни холестерол (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)	Триглицериди (mmol/l)	VLDL (mmol/l)
Д-К	$2,47 \pm 0,14^b$	$0,21 \pm 0,06^{бвг}$	$1,45 \pm 0,09^{бвг}$	$1,80 \pm 0,14^{бвг}$	$0,36 \pm 0,03^{бг}$
Д-2.5	$1,48 \pm 0,48^a$	$0,78 \pm 0,04^{абвг}$	$0,35 \pm 0,02^a$	$0,43 \pm 0,15^{авг}$	$0,09 \pm 0,03^{авг}$
Д-5	$1,48 \pm 0,13^a$	$0,96 \pm 0,14^{abcd}$	$0,34 \pm 0,01^a$	$0,40 \pm 0,04^{авг}$	$0,08 \pm 0,01^{авг}$
Д-10	$1,46 \pm 0,35^a$	$1,27 \pm 0,04^{ар}$	$0,06 \pm 0,01^{абвг}$	$0,32 \pm 0,04^{авг}$	$0,06 \pm 0,01^{авг}$
Д-15	$1,42 \pm 0,04^a$	$1,34 \pm 0,09^{ар}$	$0,01 \pm 0,01^{абвг}$	$0,30 \pm 0,06^{абг}$	$0,06 \pm 0,01^{авг}$
Д-И	$2,01 \pm 0,29$	$1,52 \pm 0,11^a$	$0,35 \pm 0,08^a$	$1,42 \pm 0,03^{бг}$	$0,35 \pm 0,01^{вг}$
Д-Г	$2,24 \pm 0,63$	$1,74 \pm 0,10^{аб}$	$0,35 \pm 0,10^a$	$0,73 \pm 0,13^{абв}$	$0,17 \pm 0,03^{абв}$
НД-К	$1,45 \pm 0,02^a$	$1,39 \pm 0,11^{ар}$	$0,45 \pm 0,05^a$	$0,43 \pm 0,03^{абг}$	$0,09 \pm 0,02^{авг}$

Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^a $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^б $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^в $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^г $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

4.2.2.3. Ефекат на ниво биохемијских параметара који указују на оштећење јетре и бубрега

Као што је приказано у табели 8 ниво AST, ALT, ALP, креатинина и урее у серуму крви дијабетичне контролне групе значајно је повећан након индукције дијабетеса ($538,30 \pm 36,49$ U/l; $151,5 \pm 18,52$ U/l; $757,87 \pm 18,13$ U/l; $61,67 \pm 1,53$ μ m/ml и $43,63 \pm 2,67$ mol/l) у поређењу са здравом контролном групом ($182,49 \pm 7,99$ U/l; $47,4 \pm 4,16$ U/l; $104,33 \pm 2,08$ U/l; $41,67 \pm 3,21$ μ mol/l и $9,30 \pm 0,53$ mol/l) ($p < 0,001$). До значајног смањења поменутих вредности, до нивоа вредности као код здравих животиња, у поређењу са дијабетичном контролном групом, дошло је при третману биљном мешавином (15 g/kg) ($172,30 \pm 11,98$ U/l; $51,67 \pm 2,16$ U/l; $104,67 \pm 4,04$ U/l; $44,33 \pm 1,15$ μ mol/l и $10,79 \pm 0,33$ mol/l) ($p < 0,001$). Третман инсулином смањује, али не регулише потпуно ниво AST

(196,70 ± 38,88 IU/l), ALT (63,07 ± 2,02 IU/l), ALP (412,67 ± 8,96 IU/l), креатинина (52,67 ± 3,21 и 41,67 ± 3,21 μmol/l) и урее (20,37 ± 0,32 mol/l) ($p < 0,001$). Глимепирид такође има ефекат на регулисање нивоа AST, ALT, ALP и урее, али слабији у поређењу са биљном мешавином (Табела 8).

Табела 8. Ниво AST, ALT, ALP, креатинина и урее дијабетичних група животиња на крају експеримента.

Експериментална група	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	ALP (IU/l)	креатинин (μmol/l)	уреа (mol/l)
Д-К	538,30 ± 36,49 ^{бвг}	151,5 ± 18,52 ^{бвг}	757,87 ± 18,13 ^{бвг}	61,67 ± 1,53 ^б	43,63 ± 2,67 ^б
Д-2.5	534,33 ± 21,73 ^{бвг}	150,63 ± 8,68 ^{бвг}	742,67 ± 2,89 ^{бвг}	54,33 ± 2,08 ^б	31,50 ± 1,49 ^{абв}
Д-5	335,47 ± 50,23 ^{абвг}	104,50 ± 9,71 ^{абвг}	725,27 ± 11,15 ^{бвг}	49,00 ± 4,00 ^а	27,60 ± 2,26 ^{абв}
Д-10	293,43 ± 72,23 ^{ав}	109,20 ± 2,82 ^{абвг}	242,27 ± 2,53 ^{абвг}	47,67 ± 2,31 ^а	18,57 ± 2,02 ^{абг}
Д-15	172,30 ± 11,98 ^а	51,67 ± 2,16 ^а	104,67 ± 4,04 ^{авг}	44,33 ± 1,15 ^{аг}	10,79 ± 0,33 ^{авг}
Д-И	196,70 ± 38,88 ^а	63,07 ± 2,02 ^а	412,67 ± 8,96 ^{аб}	52,67 ± 3,2 ^б	20,37 ± 0,32 ^{аб}
Д-Г	254,00 ± 41,08 ^а	69,47 ± 8,41 ^а	447,33 ± 27,01 ^{аб}	55,67 ± 7,37 ^б	31,03 ± 1,50 ^{аб}
НД-К	182,49 ± 7,99 ^а	47,4 ± 4,16 ^а	104,33 ± 2,08 ^{авг}	41,67 ± 3,2 ^{авг}	9,30 ± 0,53 ^{авг}

Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); D-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); D-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); D-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: недијабетична контрола; AST: аспартат трансминаза; ALT: аланин трансминаза; ALP: алкална фосфатаза. Статистички значајна разлика ^а $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^б $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^в $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^г $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

Тестом липидне пероксидације показано је да се ниво малондиалдехида и у серуму и у ткиву бубрега значајно повећава код дијабетичне контролне групе (26,28 ± 1,22 mmol/ml серума и 33,84 ± 1,50 nmol/g ткива) у поређењу са здравом контролном групом (9,98 ± 0,09 mmol/ml серума и 13,53 ± 0,28 nmol/g ткива) ($p < 0,001$) (График 9). Најзначајнија редукција нивоа MDA, до нивоа као код здраве контролне групе, забележена је код групе третиране биљном мешавином концентрације 15 g/kg (10,86 ± 0,058 mmol/ml серума и 14,95 ± 0,69 nmol/g ткива) у поређењу са Д-К групом ($p < 0,001$). Биљна мешавина у најнижој коришћеној концентрацији (2,5 g/kg) најслабије редукује ниво малондиалдехида у серуму и бубрежном ткиву (13,13 ± 0,37 mmol/ml серума и 22,38 ± 2,21 nmol/g ткива) у односу на дијабетичну контролну групу ($p < 0,001$). Третмани инсулином (11,43 ± 1,89 mmol/ml серума и 19,01 ± 1,28 nmol/g ткива) и глимепиридом (13,77 ± 0,57 mmol/ml серума и 20,96 ± 2,39 nmol/g ткива) показују слабији ефекат од биљне мешавине ($p < 0,001$) (График 10).

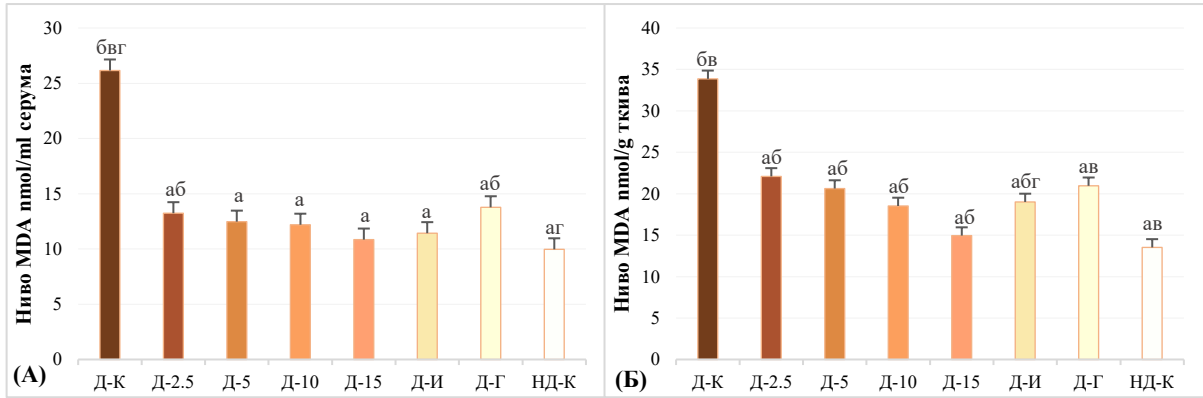


График 10. Ниво малондиалдехида (MDA) у серуму (А) и ткиву бубрега (Б) дијабетичних група животиња. Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^а $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^б $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^в $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^г $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

4.2.2.4. Хистопатолошке промене на јетри

Удео укупних хепатоцита и бинуклеусних хепатоцита, као и процентуални однос нуклеуса и цитоплазме код мононуклеусних и код бинуклеусних хепатоцита је значајно смањен као последица индукције дијабетеса ($60,95 \pm 2,58$; $8,36 \pm 0,65$; $15,97 \pm 1,28$ и $17,06 \pm 0,64\%$; $p < 0,001$) у поређењу са здравом контролном групом ($76,46 \pm 2,14$; $20,91 \pm 2,44$; $22,67 \pm 1,44$ и $28,04 \pm 0,95\%$; $p < 0,001$) (График 11 (А, В, Г и Д)). Удео Купферових ћелија је повећан код дијабетичне контролне групе ($39,05 \pm 2,58\%$) у односу на здраву контролну групу ($25,97 \pm 4,48\%$; $p < 0,001$) (График 11 (Б)). Биљана мешавина значајно повећава удео укупних хепатоцита при концентрацији 2,5 g/kg ($72,93 \pm 4,07\%$), 5 g/kg ($71,63 \pm 2,23\%$), 10 g/kg ($72,43 \pm 3,58\%$) и 15 g/kg ($70,90 \pm 5,67\%$) у односу на дијабетичну контролну групу ($p < 0,001$). Исти случај забележен је и при смањењу удела Купферових ћелија где биљна мешавина значајно редукује њихов број при концентрацији 2,5 g/kg ($27,06 \pm 4,07\%$) 5 g/kg ($28,47 \pm 2,29\%$), 10 g/kg ($27,58 \pm 3,58\%$) и 15 g/kg ($29,09 \pm 5,67\%$) у поређењу са Д-К ($p < 0,001$).

Удео бинуклеусних ћелија у укупном броју хепатоцита је највећи при третману биљном мешавином од 10 g/kg ($12,72 \pm 0,52\%$) и 15 g/kg ($12,10 \pm 2,45\%$) у поређењу са дијабетичном контролном групом ($p < 0,001$) (График 11 (В)). Однос нуклеуса и цитоплазме код мононуклеусних хепатоцита је значајно већи код група Д-10 и Д-15 ($22,21 \pm 2,49$ и $24,31 \pm 1,62\%$) где су третмани вратили вредности на ниво здраве контролне групе ($p < 0,001$) (График 11 (Г)). Тај је однос код бинуклеусних хепатоцита

услед третмана биљном мешавином као и третманом инсулином и глимепиридом значајно повећан и доведен до нивоа здраве контролне групе ($26,11 \pm 1,00$; $26,78 \pm 2,05$; $26,14 \pm 1,76$; $26,07 \pm 2,81$ и $27,10 \pm 0,60\%$ код група Д-5, Д-10, Д-15, Д-И и Д-Г) (График 11 (Д)).

Ниво колагена у ткиву јетре животиња дијабетичне контролне групе ($39,36 \pm 2,39\%$) је значајно повећан у односу на здраву контролну групу ($26,06 \pm 2,12\%$) ($p < 0,001$), док је ниво гликогена код дијабетичне контролне групе ($40,25 \pm 1,84\%$) значајно смањене вредности у поређењу са животињама не-дијабетичне контролне групе ($56,92 \pm 1,04\%$) ($p < 0,001$) (График 11 (Ђ и Е)). Третман биљном мешавином у концентрацијама 10 и 15 g/kg редукује ниво колагена до вредности групе НД-К ($26,65 \pm 0,99$ и $25,06 \pm 0,96\%$) са значајношћу $p < 0,001$ у односу на Д-К групу (График 11 (Ђ)). Депо гликогена у ћелијама јетре се значајно повећава до нивоа здраве контролне групе при третману највишом концентрацијом биљне мешавине, али и инсулином и глимепиридом ($57,43 \pm 4,77$; $59,23 \pm 1,79$ и $57,04 \pm 2,36\%$ код група Д-15, Д-И и Д-Г) ($p < 0,001$) (График 11 (Е)).

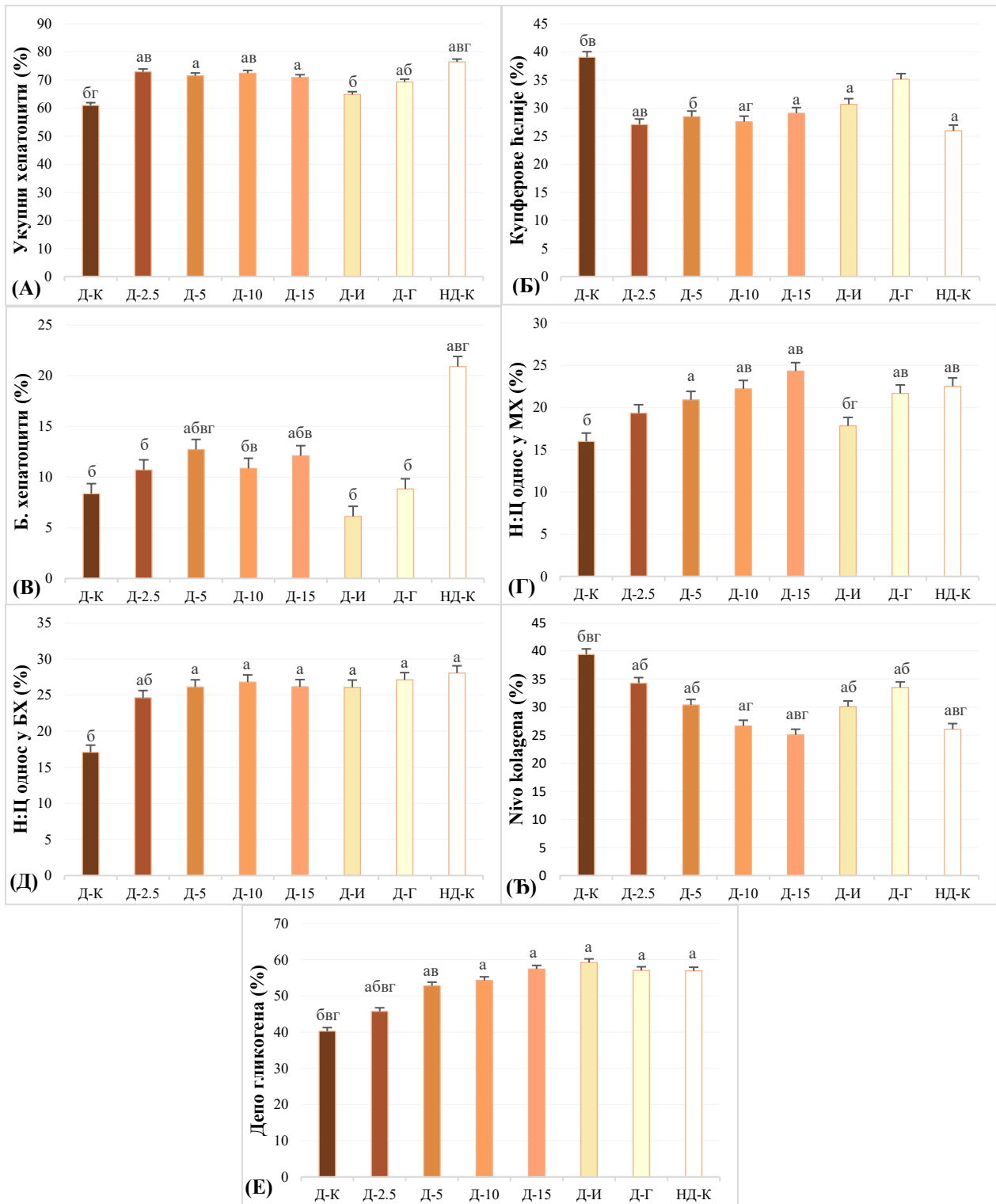
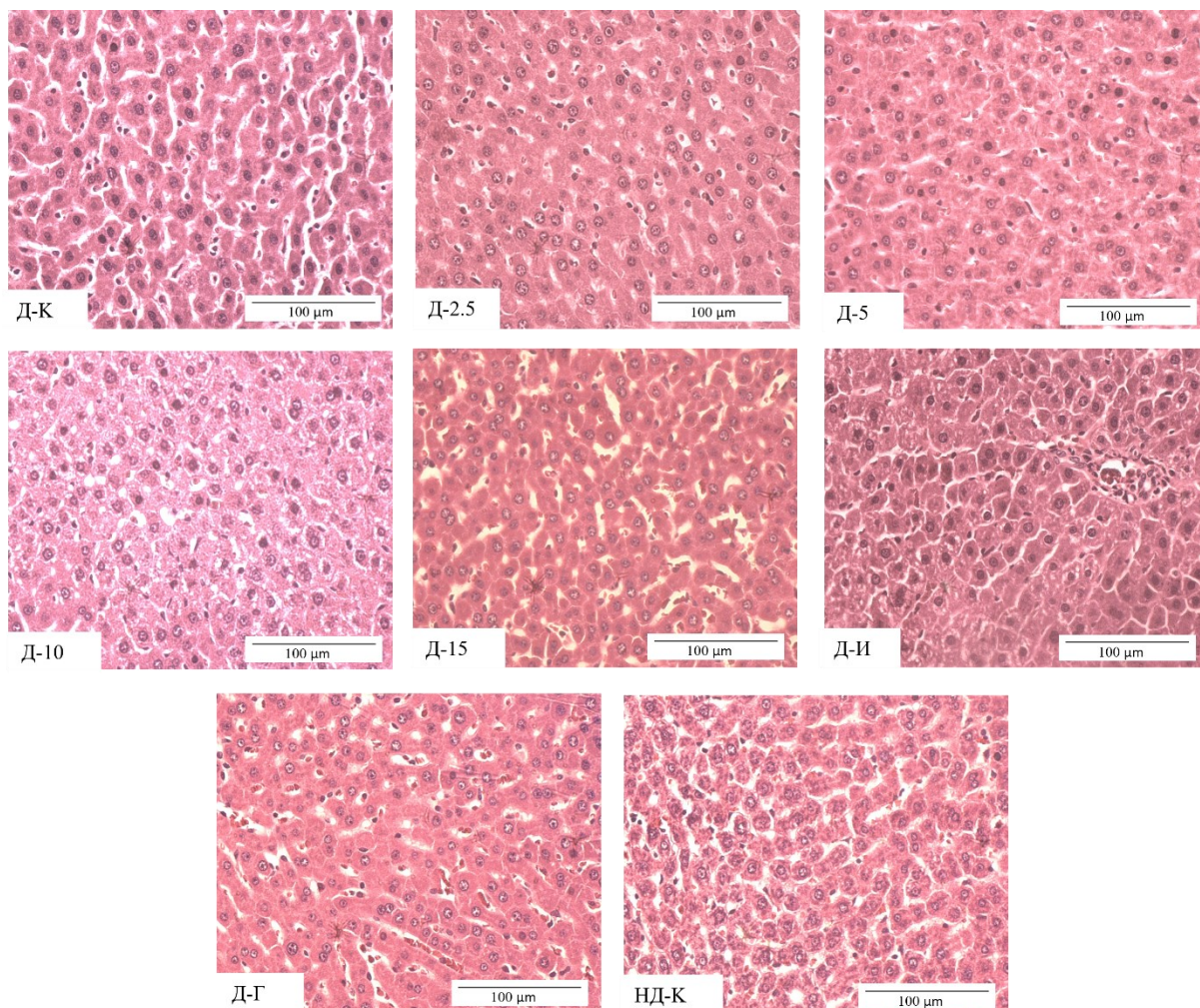


График 11. Хистопатолошка анализа јетре дијабетичних група животиња: (А) удео укупних хепатоцита (%); (Б) удео Купферових ћелија (%); (В) удео бинуклеусних хепатоцита (%); (Г) Н:Ц однос у мононуклеусним хепатоцитима (%); (Д) Н:Ц однос у бинуклеусним хепатоцитима (%); (Ђ) ниво колагена у ткиву (%); (Е) депо гликогена у ћелијама (%). Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^а $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^б $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^в $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^г $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

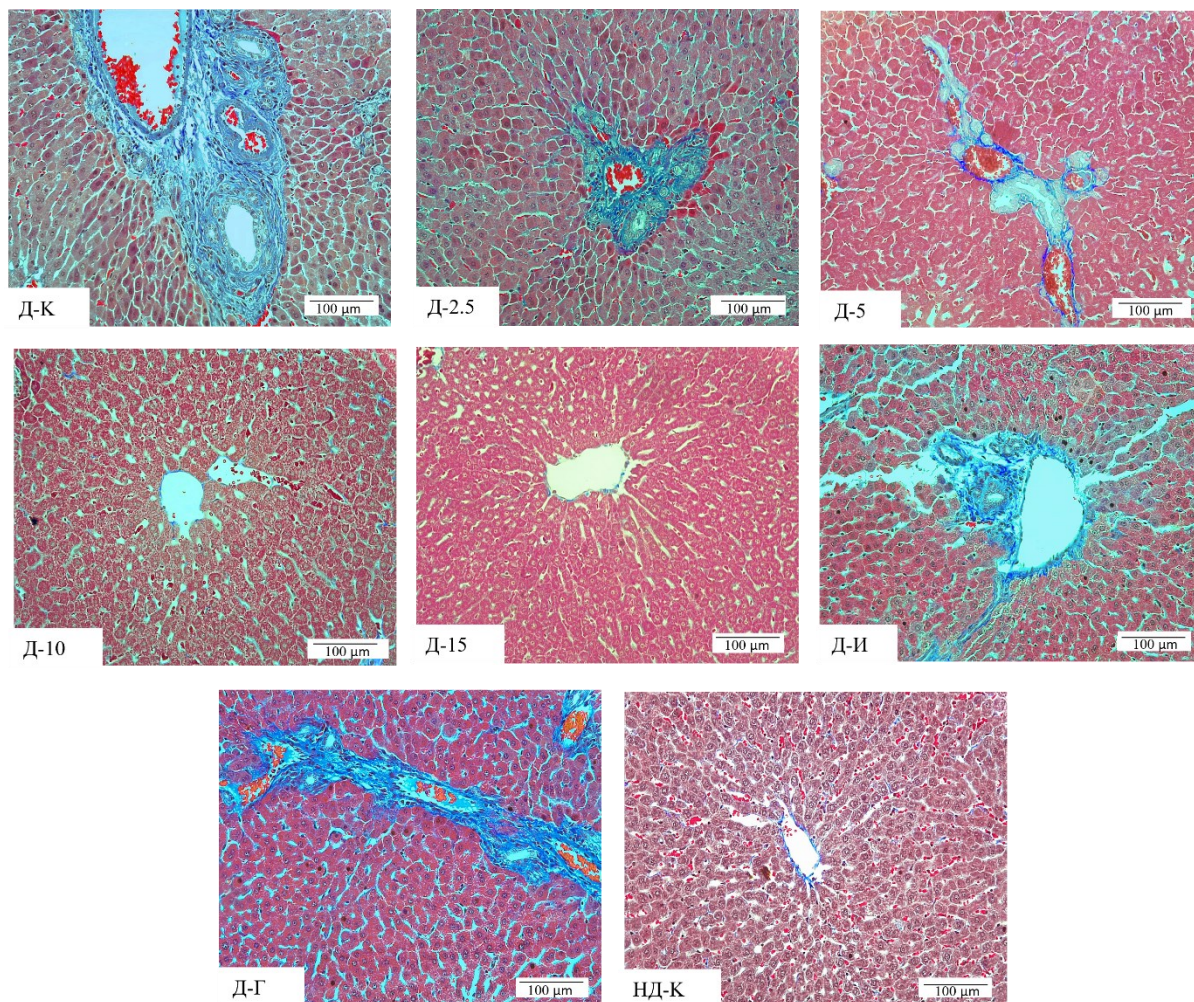
На слици 2.1 приказане су промене у ткиву јетре код дијабетичних група животиња. Код Д-К групе видљива је повећана инфилтрација Купферових ћелија и смањена густина хепатоцита у односу на НД-К групу, као и линеарно смањење броја Купферових ћелија и повећање густине хепатоцита са повећањем концентрације биљне мешавине, тако да је код Д-15 групе ткиво јетре приближно исте структуре као код недијабетичне контролне групе. Код групе третиране инсулином не запажају се видне промене хистолошке грађе ткива, док је код групе третиране глимепиридом примећен повећан број Купферових ћелија, приближно дијабетичној контролној групи животиња.



Слика 2.1. Ткиво јетре дијабетичних група животиња, ХЕ бојење, 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

На слици 2.2 уочава се фиброза јетре дијабетичних група животиња у виду промене количине колагена запаженог око крвних судова. Највише је колагена заступљено код дијабетичне контролне групе, док је код не-дијабетичне контролне групе

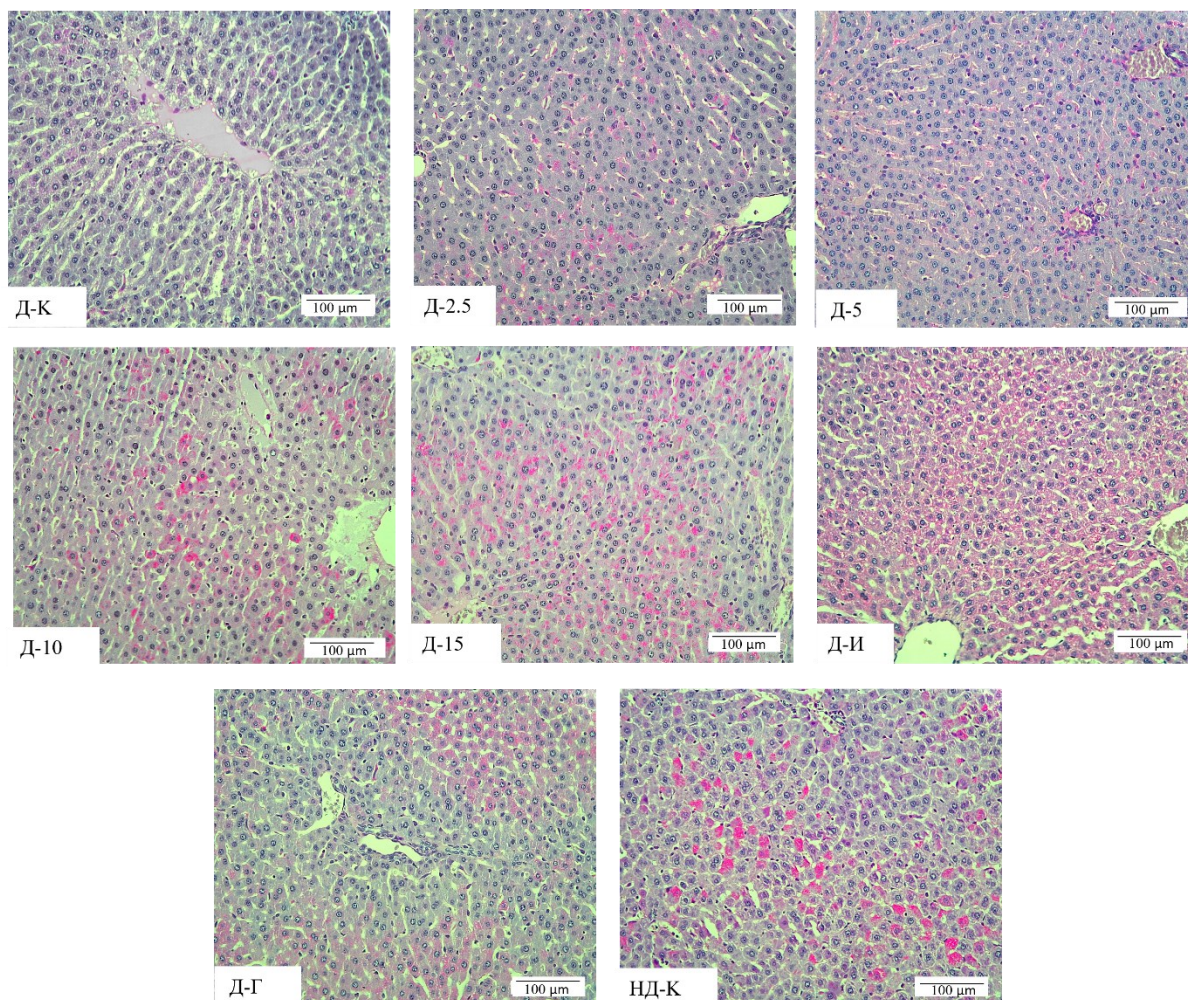
присутан у знатно мањој мери у виду танког прстена око крвних судова. Код групе Д-2.5 и Д-5 је запажен мањи степен фиброзе у односу на Д-К групу, док је код Д-10 и Д-15 групе потпуно редукована фиброза и ниво колагена доведен на ниво као код здравих животиња (НД-К). При третманима инсулином и глимепиридом ниво колагена око крвних судова је редукован у односу на Д-К групу, али не у потпуности.



Слика 2.2. Колаген у ткиву јетре дијабетичних група животиња, Масон-трихромно бојење, 200 x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

Гликоген у хепатоцитима не-дијабетичне групе се запажа у великој концентрацији у виду пинк обојене цитоплазме великог броја ћелија, док је код дијабетичне контролне групе видно редукован и налази се само у назнакама светлије обојених цитоплазми малог броја ћелија (Слика 2.3). Са порастом концентрације биљне мешавине, код Д-2.5, Д-5, Д-10 и Д-15 група, примећен је пораст броја ћелија са обојеним гликогеном у цитоплазми, с тим да је код група Д-10 и Д-15 исте количине као код

здравих животиња из НД-К групе. Код групе животиња третираних инсулином ниво гликогена је повећан у односу на Д-К групу до нивоа као код НД-К групе. Код групе животиња третиране глимепиридом количина гликогена у хепатоцитима је већа у односу на Д-К групу, али у мањој мери и од третмана биљном мешавином и од третмана инсулином.



Слика 2.3. Гликоген у ћелијама јетре дијабетичних група животиња, ПАС бојење, 200x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола..

4.2.2.5. Хистопатолошке промене на бубрегу

Површина гломерулуса и површина епитела проксималних тубула бубрега су значајно смањени код Д-К групе ($3017,45 \pm 82,54$ и $0,64 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$) у поређењу са НД-К групом ($8010,57 \pm 481,24$ и $0,84 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$), док је присуство колагена код Д-К групе значајно повећано ($20,95 \pm 0,39\%$) у односу на НД-К групу ($1,76 \pm 0,11\%$) (График 12 (А, Б и В)).

Удео ПАС позитивних поља бубрежног ткива је, такође, повећан код дијабетичне контролне групе ($28,09 \pm 3,12\%$) у поређењу са НД-К групом ($4,17 \pm 0,26\%$) ($p < 0,001$) (График 12 (Г)). Највећа површина гломерулуса, до нивоа здраве контролне групе, је забележена код Д-10 и Д-15 експерименталних група ($8161,34 \pm 651,68$ и $8249,81 \pm 964,82 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$), док је највећа површина епитела проксималних тубула забележена код групе Д-15 од $0,86 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$, приближно вредностима здраве контролне групе ($p < 0,001$) (График 12 (А и Б)).

Третман биљном мешавином у концентрацијама 10 и 15 g/kg ($4,01 \pm 0,54$ и $3,80 \pm 0,18\%$) у поређењу са групом Д-К ($p < 0,001$) смањује ниво колагена у ткиву бубрега до нивоа као код здраве контролне групе (График 12 (В)). С друге стране, третман биљном мешавином од 15 g/kg ($2,01 \pm 0,37\%$) ($p < 0,001$) враћа и опсег ПАС позитивних поља на ниво здраве контролне групе. Гломерулосклеротски индекс код Д-К групе износи $2,68 \pm 0,14$ и значајно је већи у поређењу са НД-К групом ($0,03 \pm 0,01$) ($p < 0,001$) (График 12 (Г)). Код експерименталне групе Д-15 забележено је изразито смањење гломерулосклеротског индекса у вредности од $0,56 \pm 0,11$, док је најмањи ефекат показао третман инсулином ($1,86 \pm 0,51$) (График 12 (Д)).

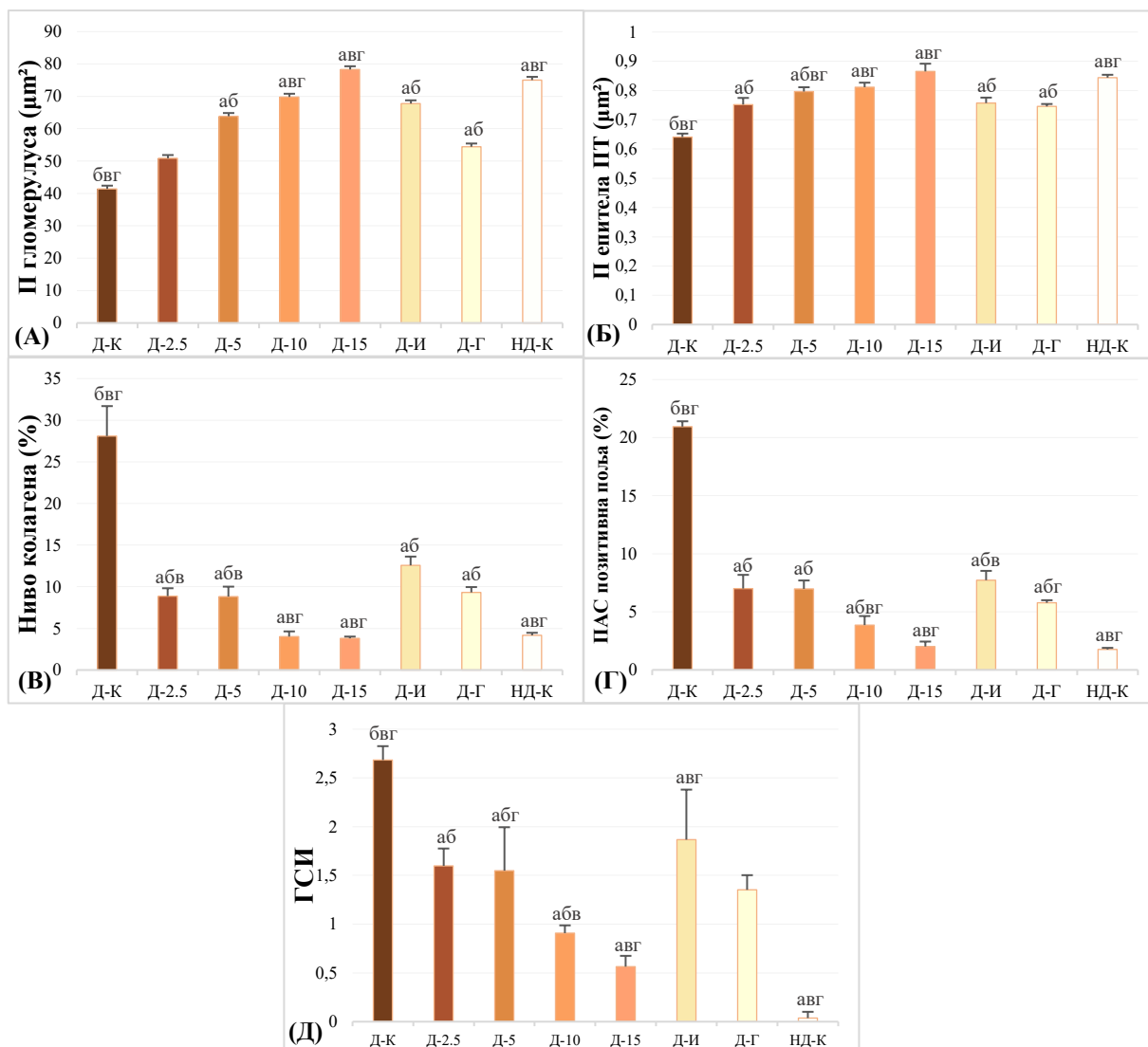
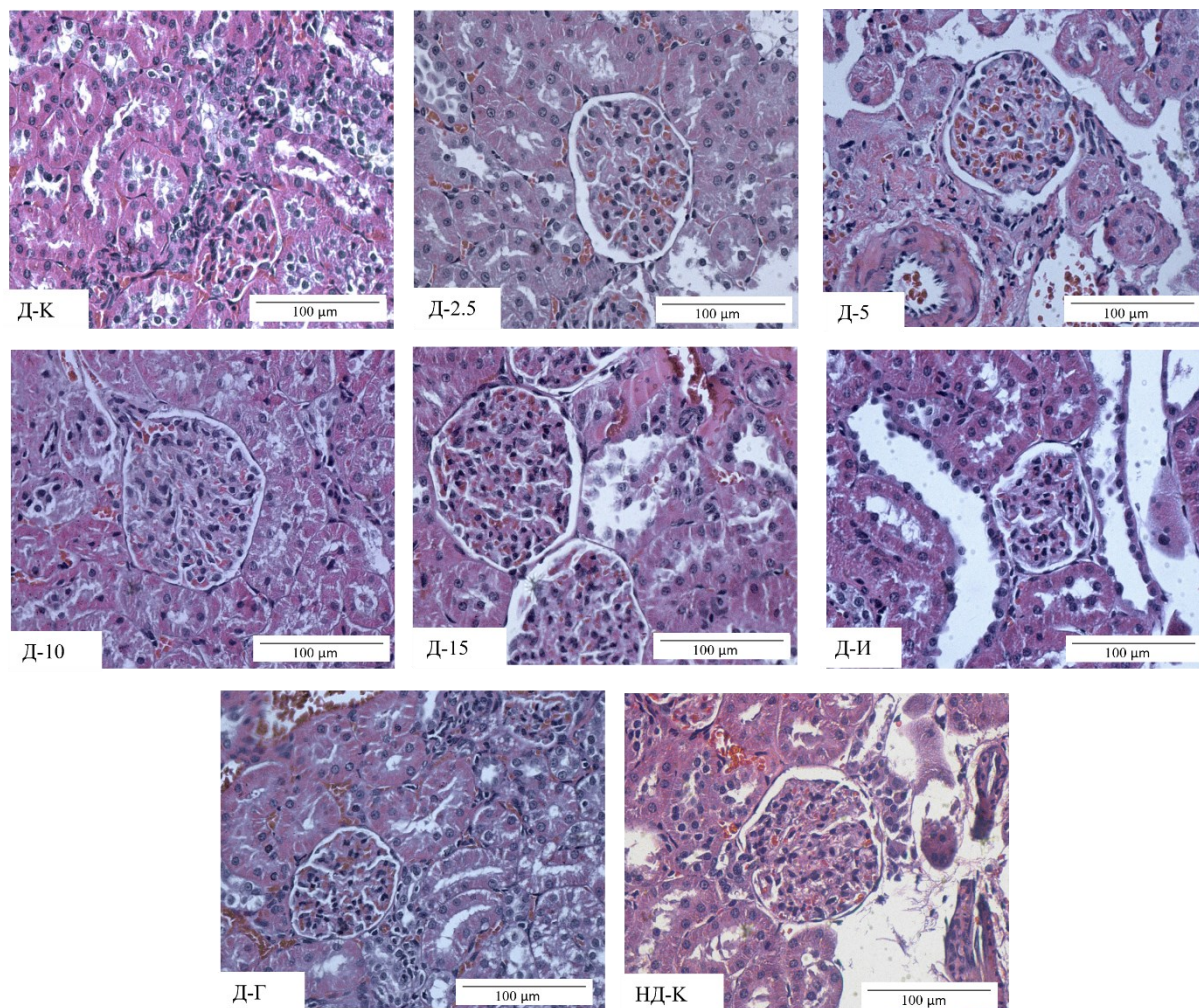


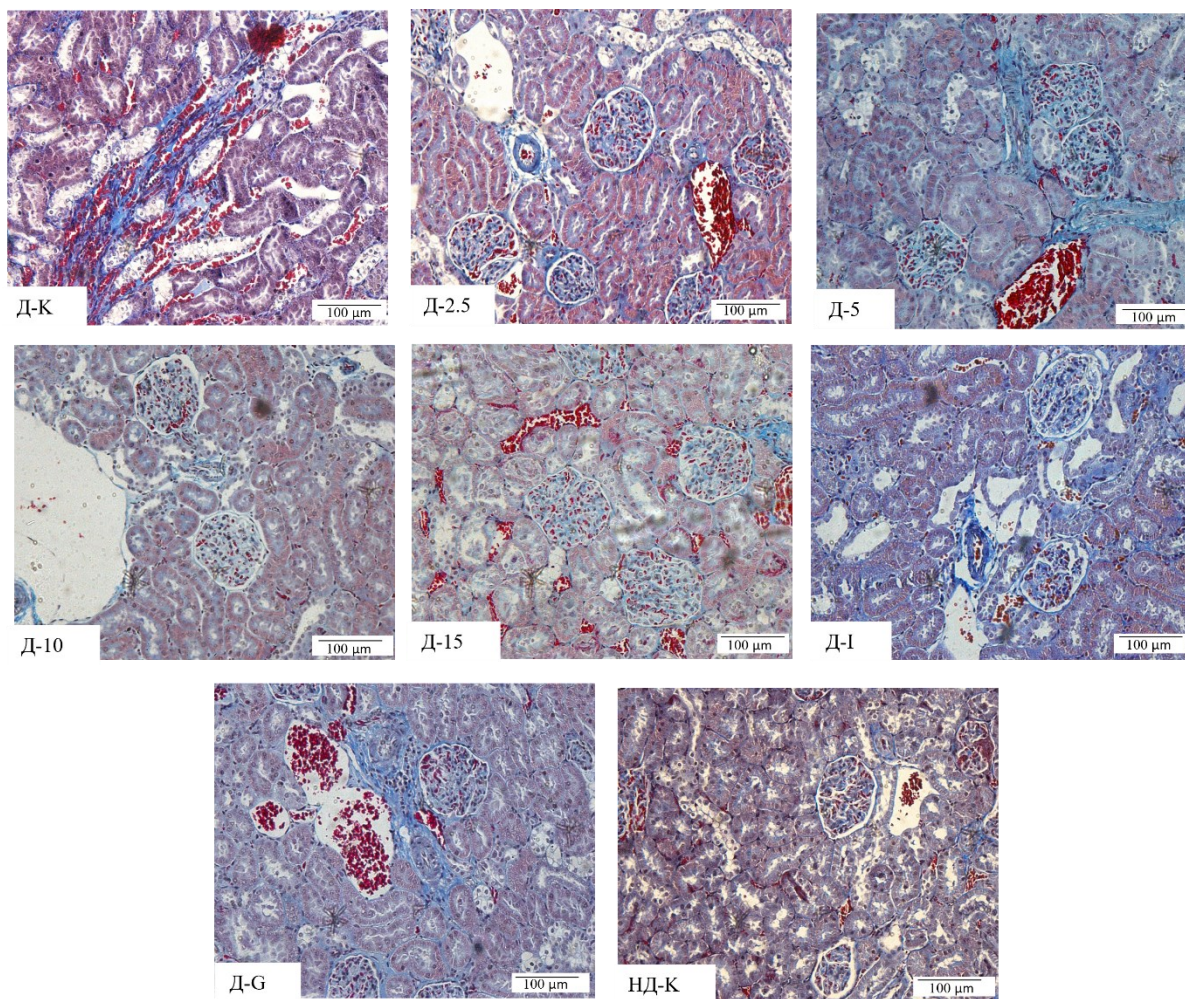
График 12. Хистопатолошка анализа бубрега дијабетичних група животиња: (А) површина гломерулуса (μm^2); (Б) површина епитела проксималних тубула (μm^2); (В) ниво колагена у ткиву (%); (Г) ПАС позитивна поља у ткиву (%); (Д) гломерулосклеротски индекс (%). Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^а $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^б $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^в $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^г $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

На слици 2.4 приказана је промена хистолошке грађе бубрега код дијабетичних група животиња и здравих животиња. Код Д-К групе се запажа знатно смањена величина гломерулуса у односу на здраве животиње (НД-К група). При свим третманима биљне мешавине (2,5; 5; 10 и 15 g/kg) је примећено повећање гломерулуса које је као код НД-К групе, док је при третманима инсулином и глимепиридом веће у односу на Д-К, али је ипак мање у односу на не-дијабетичну контролну групу. Притом је код Д-К групе примећена интертубуларна инфилтрација макрофага, за разлику од осталих група.



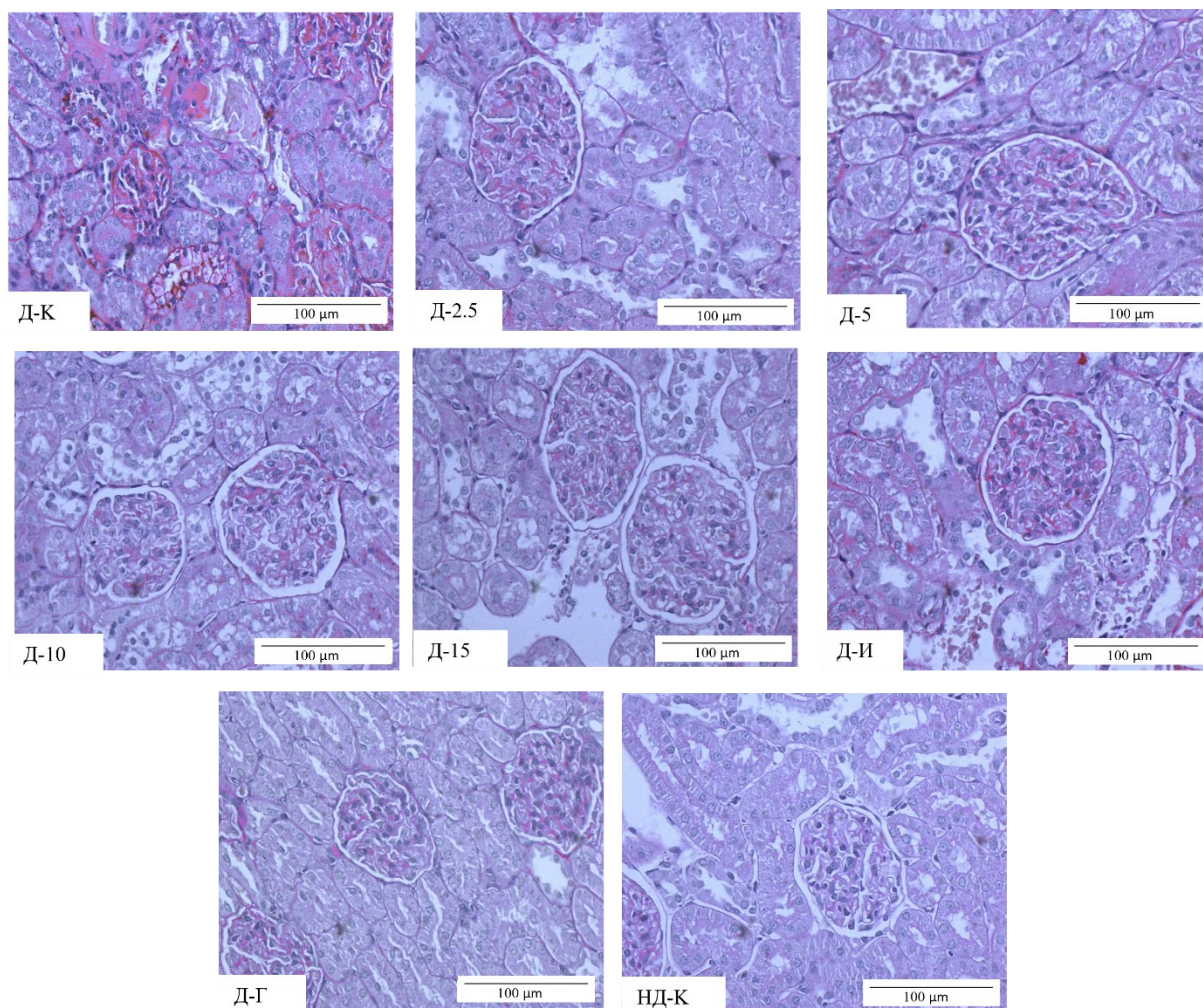
Слика 2.4. Ткиво бубрега дијабетичних група животиња, ХЕ бојење, 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

Интертубуларна фиброза ткива дијабетичних група животиња у односу на здраве животиње приказана је на слици 2.5. Запажа се повећано присуство колагена око сабирних каналића код Д-К групе, за разлику од НД-К групе код које се уочава само око крвних судова у малим количинама. Мање колагена од Д-К групе, али више од НД-К групе, запажа се код Д-2.5, Д-5 и Д-Г, док је код Д-10, Д-15 и Д-И редукована фиброза ткива, количина колагена до нивоа недијабетичне контролне групе.



Слика 2.5. Колаген у ткиву бубрега дијабетичних група животиња, Масон-трихромно бојење, 200x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

На слици 2.6 приказан је ниво заступљености гломерулосклерозе у бубрезима дијабетичних група животиња у односу на здраве животиње, на основу присуства ПАС позитивних места у ткиву. Код Д-К групе запажа се много више ПАС позитивних места у гломерулу, интертубуларно и интратубуларно за разлику од НД-К групе код које скоро да нема ПАС позитивних места. Са порастом концентрације биљне мешавине смањују се поља ПАС позитивних места до потпуног редуковања гломерулосклерозе код Д-15 групе, као код здравих животиње. При третману инсулином и глимепиридом примећена је мала површина ПАС позитивних места само у гломерулусима.



Слика 2.6. Гломерулосклероза у ткиву бубрега дијабетичних група животиња, ПАС бојење, 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

4.2.2.6. Хистопатолошке промене на бутној кости

Хистопатолошка анализа фемура приказана је на графику 13. Површина кортикалног дела кости је значајно смањена код дијабетичне контролне групе ($3,38 \pm 0,19 \text{ mm}^2$) у односу на не-дијабетичну контролну групу ($5,7 \pm 0,54 \text{ mm}^2$) ($p < 0,001$), а запажено је и линеарно повећање површине са порастом концентрације биљне мешавине. Третман биљном мешавином 5 g/kg ($5,59 \pm 0,38 \text{ mm}^2$) и 10 g/kg ($5,96 \pm 0,66 \text{ mm}^2$) је регенерисао коштано ткиво до нивоа НД-К групе ($p < 0,001$), док су третмани инсулином ($4,07 \pm 0,57 \text{ mm}^2$) и глимепиридом ($4,96 \pm 0,57 \text{ mm}^2$) успорили губљење коштане масе, али не и потпуно регенерисали ткиво ($p < 0,001$) (График 13 (А)).

Површина лакуна остеоцита у кортикалном делу кости и епифизама кости дијабетичне контролне групе ($42,51 \pm 3,12$ и $37,73 \pm 3,11 \text{ }\mu\text{m}^2$) је значајно смањена у односу на НД-К групу ($79,35 \pm 1,27$ и $98,4 \pm 2,92 \text{ }\mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$) (График 13 (Б и В)). Третман биљном мешавином у концентрацији 10 g/kg ($73,13 \pm 2,88 \text{ }\mu\text{m}^2$) и 15 g/kg повећава површину лакуна у кортикалном делу кости до нивоа НД-К групе ($83,56 \pm 0,98 \text{ }\mu\text{m}^2$), док на површину лакуна у епифизама има слабији ефекат ($76,26 \pm 1,57 \text{ }\mu\text{m}^2$ при концентрацији 15 g/kg) ($p < 0,001$). Третман инсулином и третман глимепиридом показују ефекте на површину лакуна и у кортикалном делу кости ($70,45 \pm 0,64$ и $64,03 \pm 1,49 \text{ }\mu\text{m}^2$) и у епифизама ($53,73 \pm 1,49$ и $56,80 \pm 1,52 \text{ }\mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$), али слабије од биљне мешавине (График 13 (Б и В)).

Површина трабекула у епифизама фемура је значајно смањена код Д-К групе ($0,67 \pm 0,18 \text{ mm}^2$) у односу на НД-К групу ($2,08 \pm 0,05 \text{ mm}^2$) ($p < 0,001$) (График 13 (Г)). Запажа се линеарно повећање површине трабекула при третману растућих концентрација биљне мешавине, где се при највишој концентрацији (15 g/kg) потпуно регенерише коштано ткиво у епифизама ($2,18 \pm 0,05 \text{ mm}^2$) статистички значајно у односу на Д-К групу ($p < 0,001$). Третмани инсулином и глимепиридом нису показали значајне ефекте на овај параметар (График 13 (Г)). Ниво колагена у екстрацелуларном матриксу коштаног ткива кортикалног дела фемура је значајно смањен код Д-К групе ($14,37 \pm 1,81\%$) у односу на НД-К групу ($36,38 \pm 3,64\%$) ($p < 0,001$) (График 13 (Д)). Са повећањем концентрације биљне мешавине је линеарно стимулисана и синтеза колагена тако да је код Д-15 групе потпуно обновљен ниво колагена у екстрацелуларном матриксу ($33,35 \pm 2,52\%$) ($p < 0,001$), док третмани инсулином и глимепиридом нису показали никакав значајан ефекат на овај параметар (График 13 (Д)).

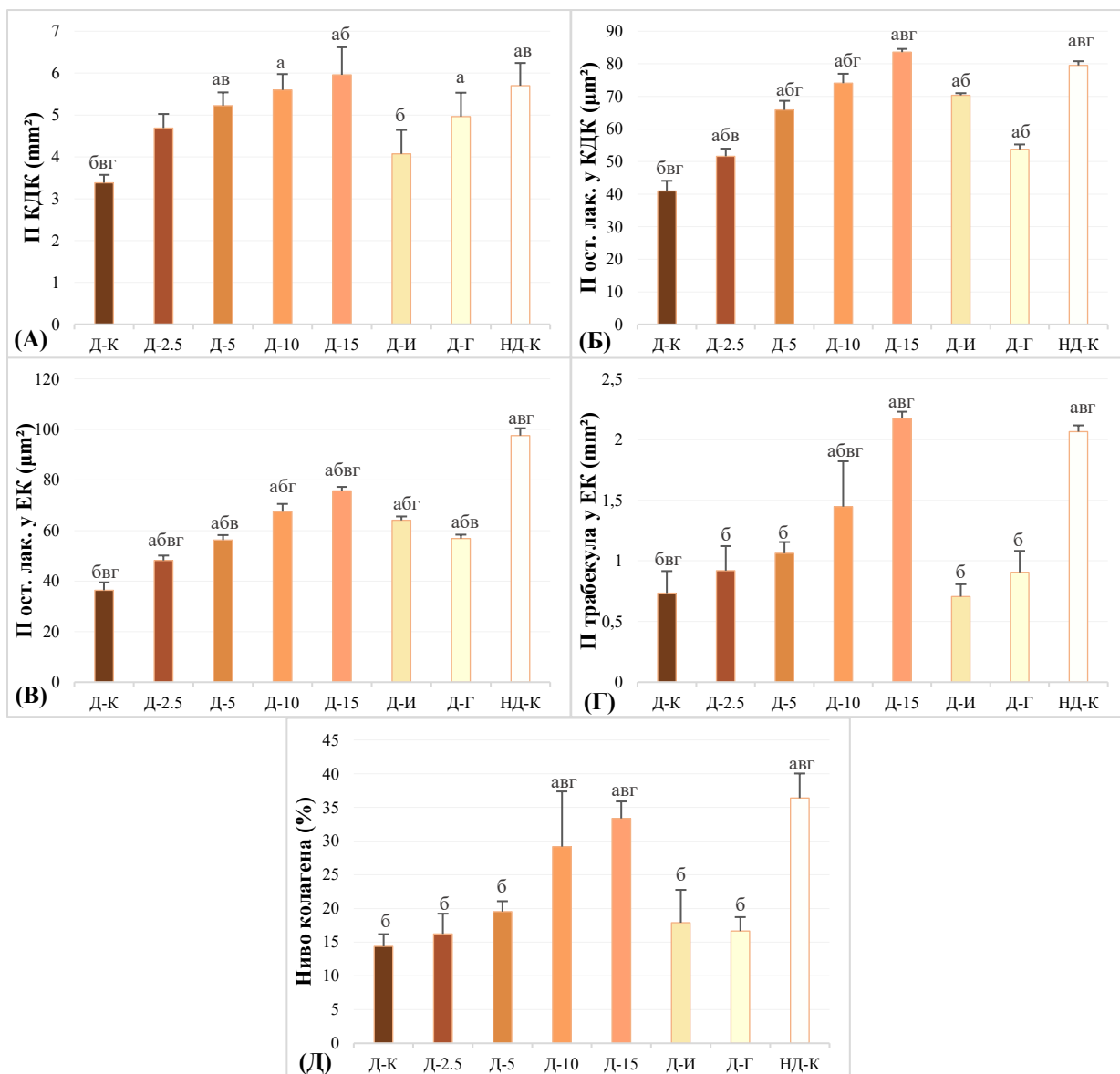
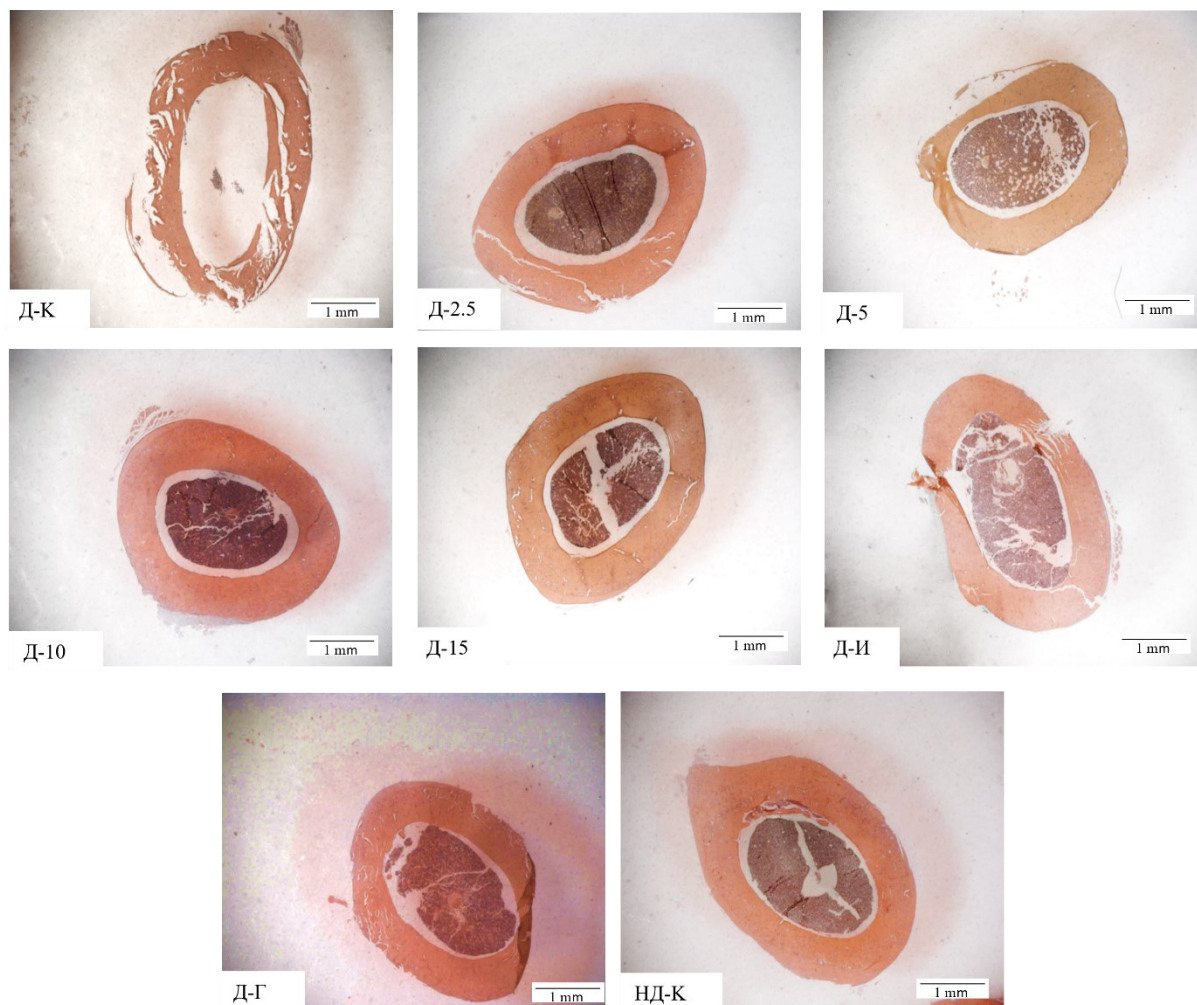


График 13. Хистопатолошка анализа фемура дијабетичних група животиња: (А) површина кортикалног дела костију (mm²); (Б) површина лакуна остеоцита у кортикалном делу кости (µm²); (В) површина лакуна остеоцита у епифизама костију (µm²); (Г) површина трабекула епифиза костију (µm²); (Д) ниво колагена у коштаном ткиву (%): Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^а*p* < 0,001 у односу на Д-К; ^б*p* < 0,001 у односу на НД-К; ^в*p* < 0,001 у односу на Д-И групу; ^г*p* < 0,001 у односу на Д-Г.

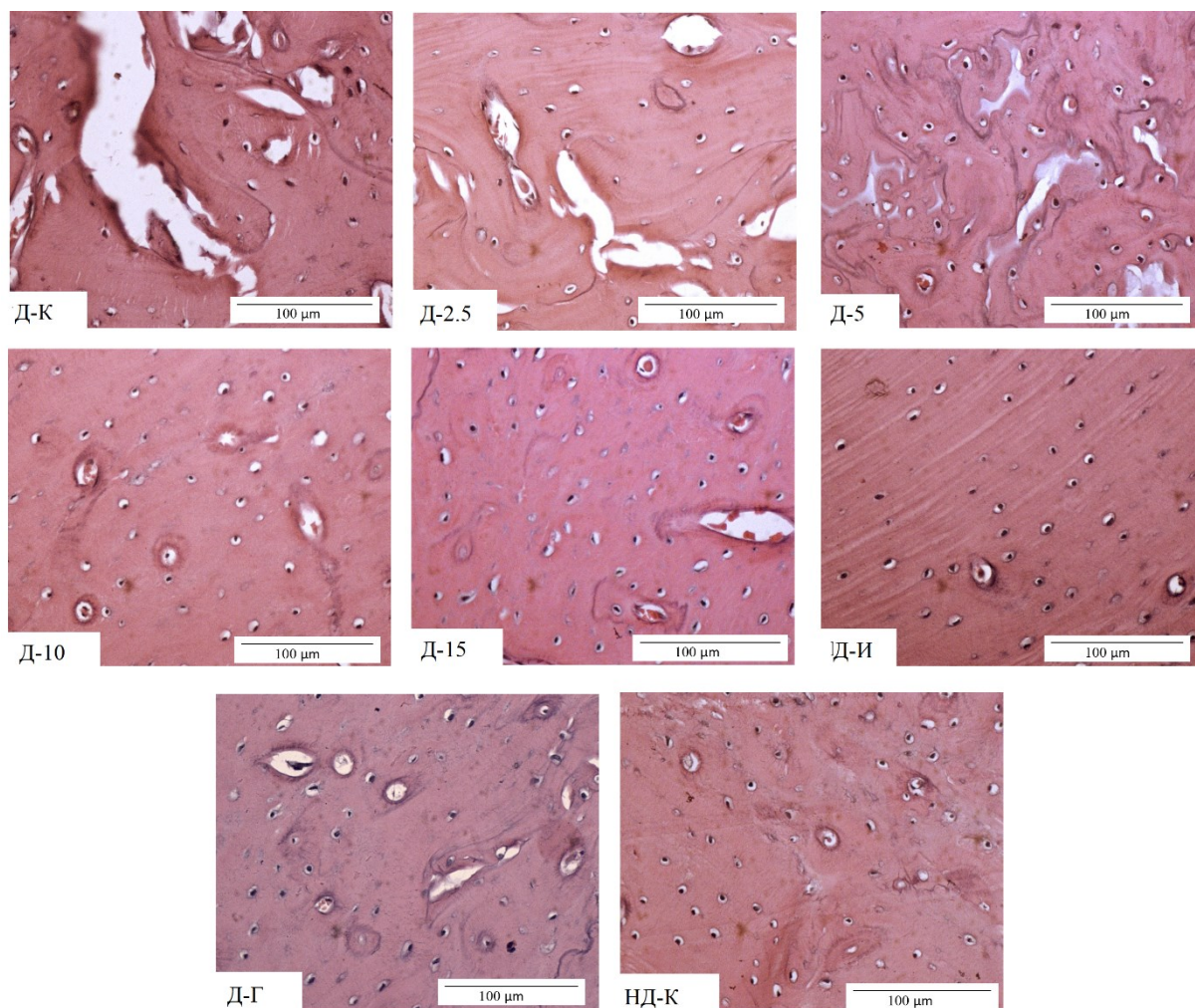
На слици 2.7 приказан је попречни пресек кортикалне кости средишњег дела дијафизе фемура експерименталних група животиња. Површина кортикалне кости је знатно смањена код Д-К групе у односу на НД-К групу, док је код свих третираних дијабетичних група приближно исте површине као код здравих животиња. Код Д-К

групе се у делу пресека уочава и више ресорпционих површина у односу на остале групе животиња.



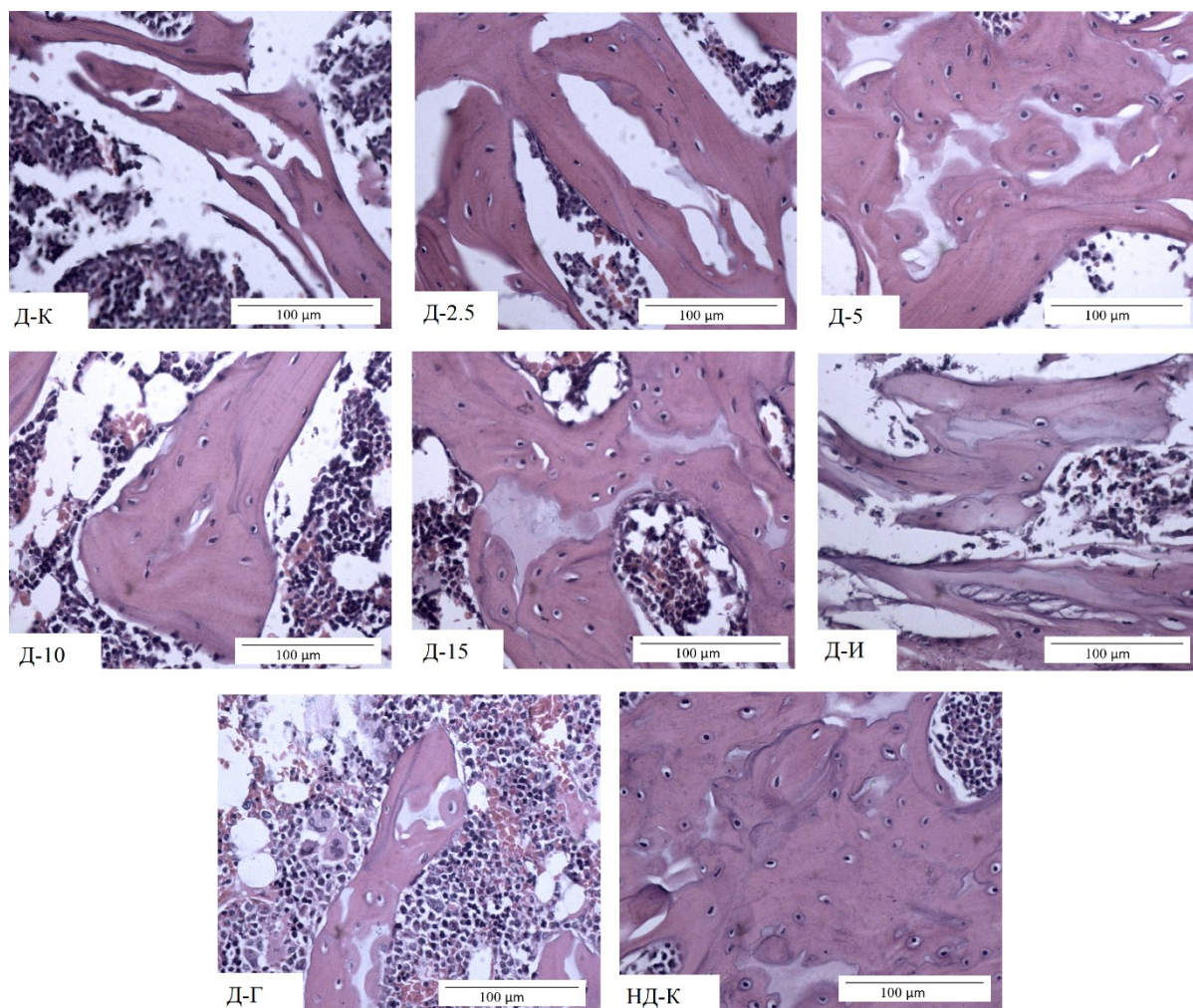
Слика 2.7. Попречни пресек дијафизе фемура (кортикални део кости) дијабетичних група животиња, ХЕ бојење, 20x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

У кортикалном делу кости фемура се на већем увећању (400x) уочава већа ресорпциона површина (Хаушипове лакуне) код Д-К групе и више мањих Хаушипових лакуна код група Д-2.5 и Д-5, док се код осталих група не запажају (слика 2.8). Густина остеоцита је код Д-К групе мања у односу на НД-К групу, а запажа се и смањен број Хаверзових канала код дијабетичне контролне групе. Код група животиња третираних биљном мешавином у концентрацијама 10 и 15 g/kg, глимепиридом и инсулином хистолошка грађа коштаног ткива је као код не-дијабетичне контролне групе.



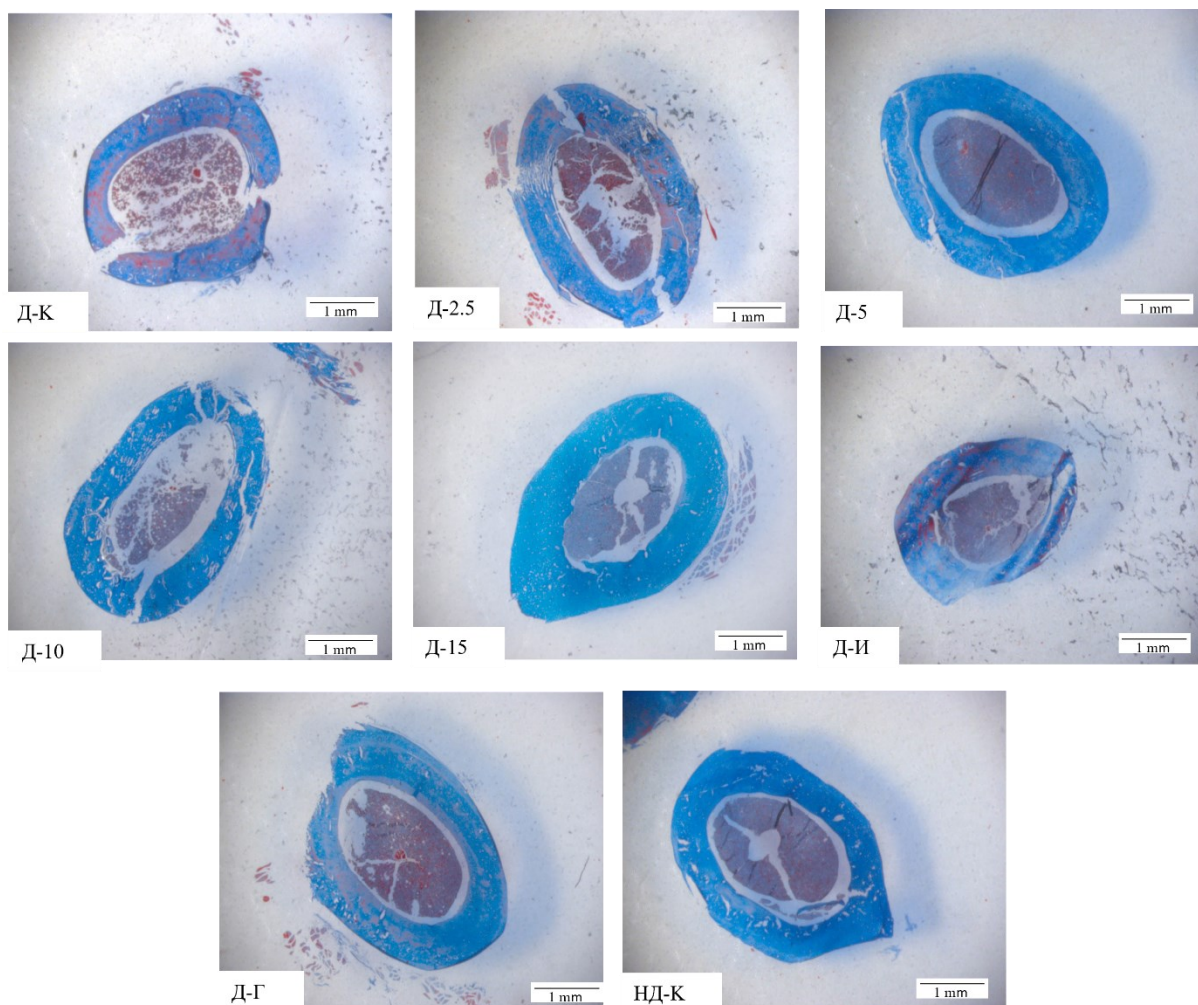
Слика 2.8. Коштано ткиво кортикалног дела фемура дијабетичних група животиња, ХЕ бојење, 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); D-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола

На слици 2.9 приказано је коштано ткиво у трабекулама епифиза фемура дијабетичних група животиња. Коштано ткиво је редуковано код Д-К групе у поређењу са НД-К групом, док се са порастом концентрације биљне мешавине смањује губљење коштаног ткива, тако да је код група Д-10 и Д-15 потпуно регенерисано до нивоа здравих животиња. Присутна је и појава новоформираног коштаног ткива код група Д-5, Д-10, Д-15, Д-И, Д-Г и НД-К. Код групе третиране глимепиридом није примећно повећање површине коштаног ткива и поред уочене површине новоформиране кости. Број остеоцита по трабекули је смањен код Д-К групе у поређењу са осталим анализираним групама.



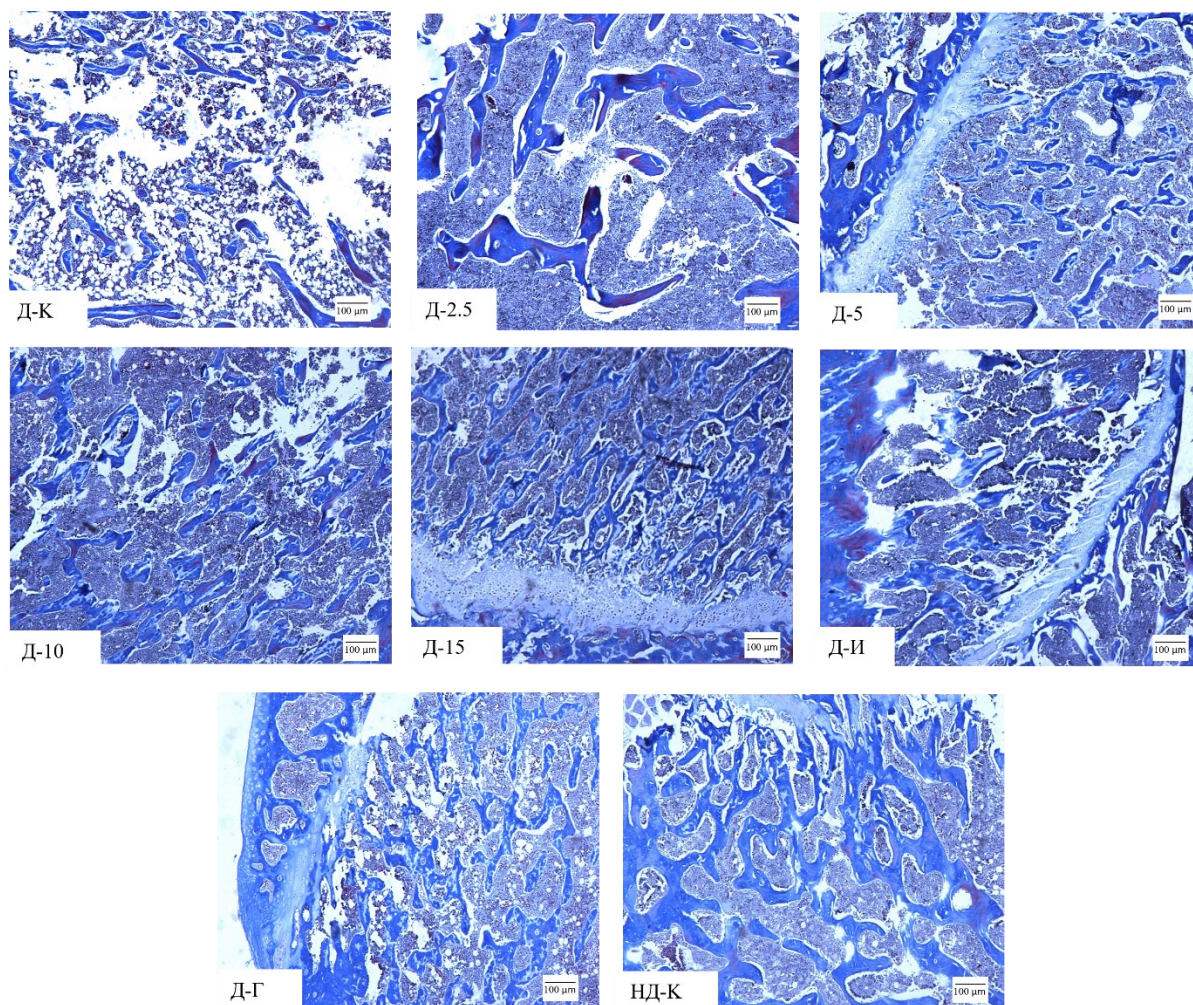
Слика 2.9. Коштано ткиво у епифизама фемура дијабетичних група животиња, ХЕ бојење, 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); D-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: недијабетична контрола

На слици 2.10 приказан је ниво колагена у коштаном матриксу у кортикалном делу фемура дијабетичних група животиња у поређењу са здравом контролном групом (НД-К). Код Д-К групе се запажа повећана разградња коштаног матрикса услед смањене количине колагена, за разлику од недијабетичне контролне групе где се ове промене не запајају. Са порастом концентрације биљне мешавине повећава се синтеза колагена у коштаном матриксу, тако да се при третману концентрацијом 15 g/kg потпуно ресинтетисао. Код Д-И и Д-Г групе удео колагена је смањен као код Д-К групе.



Слика 2.10. Колаген у ткиву кортикалног дела фемура дијабетичних група животиња, Масон-трихромно бојење, 20x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); D-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола

На слици 2.11 приказана је хистолошка грађа спонгиозне кости у епифизама фемура дијабетичних група животиња. Код дијабетичне контролне групе запажа се смањење површине, броја и густине трабекула у поређењу са нормалном хистолошком грађом код не-дијабетичне контролне групе. Код Д-2.5 експерименталне групе третман биљном мешавином утиче на повећање површине трабекула, али не и на повећање броја и густине трабекула, док се код Д-5, Д-10 и Д-15 уочава линеарно повећање површине, броја и густине коштаних гредица, до приближно нивоа НД-К групе. Код Д-И и Д-Г групе су коштане гредице мање густине и површине у односу на Д-15 и НД-К групу, али су ипак веће површине и гушће распоређене у поређењу са хистолошком грађом дијабетичне контролне групе.



Слика 2.11. Колаген у трабекулама епифиза фемура дијабетичних група животиња, Масон-трихромно бојење, 50x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); D-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

4.2.2.7. Хистопатолошке промене на ретини

Резултати хистопатолошке анализе ретине ока приказани су на Графику 14. Ширина С+У сегмента, спољашњег нуклеарног слоја, унутрашњег нуклеарног слоја и слоја ганглијских ћелија ретине је код животиња дијабетичне контролне групе ($25,13 \pm 4,59$; $33,43 \pm 3,08$; $34,74 \pm 2,47$ и $15,62 \pm 3,68 \mu\text{m}^2$) значајно смањена у односу на НД-К групу ($50,23 \pm 3,74$; $58,72 \pm 7,42$; $55,21 \pm 2,07$ и $22,46 \pm 1,93 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$). Ширина слојева се при третманима биљном мешавином линеарно повећава са повећањем концентрације биљне мешавине. Биљна мешавина најзначајнији ефекат има на ширину слоја ганглијских ћелија где већ при концентрацији 5 g/kg ($21,78 \pm 1,01 \mu\text{m}$) поправља стање на ниво као код НД-К групе, са статистичком значајношћу $p < 0,001$ у односу на Д-К групу (График 14 (Г)). Код гупе Д-15 значајно су повећане ширине С+У сегмента

(41,52 ± 3,21 μm), спољашњег нуклеарног слоја (52,84 ± 2,32 μm) и унутрашњег нуклеарног слоја (45,18 ± 2,66 μm) у односу на Д-К групу ($p < 0,001$) (График 14 (А, Б и В)). Третман глимепиридом у односу на Д-К групу испољава значајан ефекат само на спољашњи нуклеарни слој (46,23 ± 1,69 μm) ($p < 0,001$) (График 14 (Б)), док третман инсулином показује ефекте на слој ганглијских ћелија (19,56 ± 4,79 μm) ($p < 0,001$), али слабије од биљне мешавине (График 14 (В)).

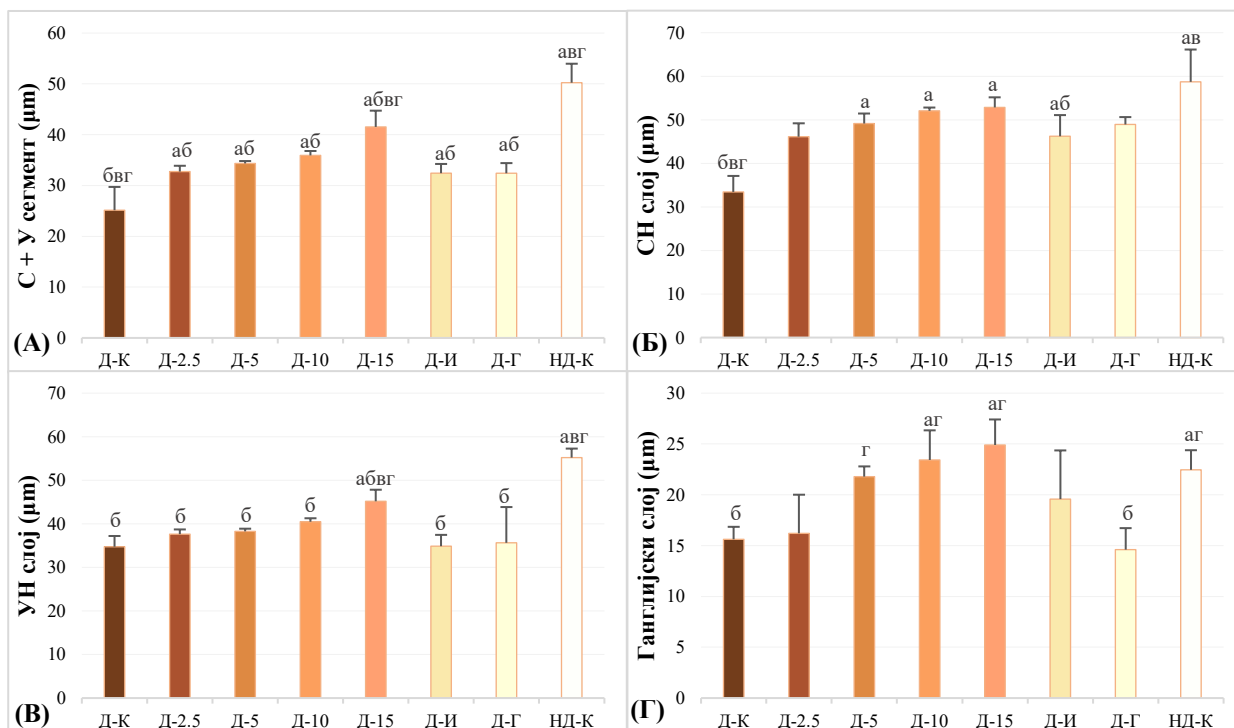
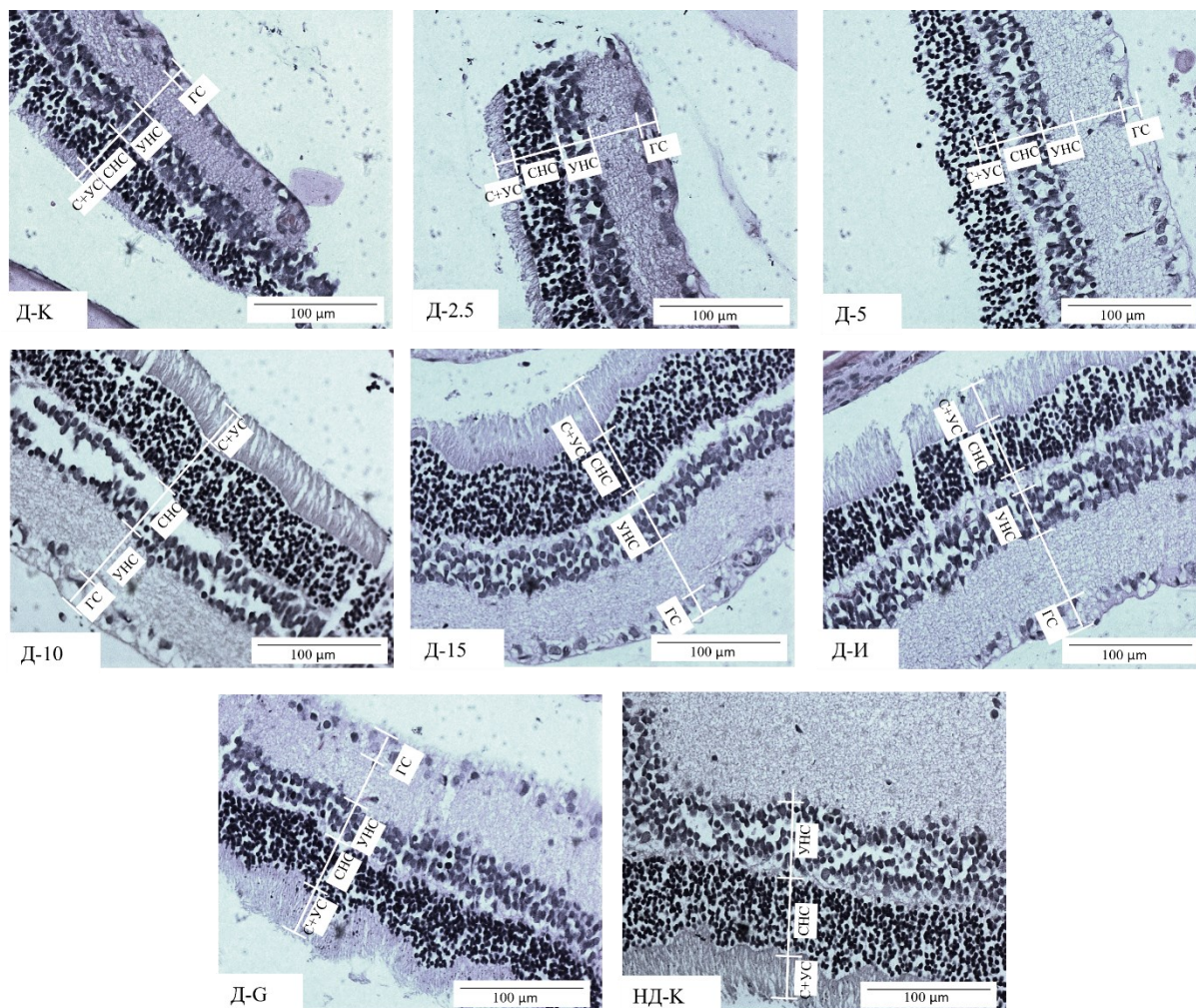


График 14. Хистопатолошка анализа ретине ока дијабетичних група животиња: (А) ширина спољашњег и унутрашњег сегмента фоторецептора (μm); (Б) ширина спољашњег нуклеарног слоја (μm); (В) ширина унутрашњег нуклеарног слоја (μm); (Г) ширина слоја ганглијских ћелија (μm); Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-И (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-И (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-И (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-И (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^a $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^b $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^б $p < 0,001$ у односу на Д-И; ^г $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

На слици 2.12 приказана је хистолошка грађа ретине ока дијабетичних група животиња. Површина ретине је код Д-К групе доста смањена у поређењу са НД-К групом, док је услед третмана биљном мешавином са порастом концентрације биљне мешавине запажено линерано повећање површине ретине. Код Д-И и Д-Г група је, такође, површина ретине већа у односу на Д-К групу, али мања у односу на НД-К групу. Ширина слоја ганглијских ћелија, спољашњег и унутрашњег нуклеарног слоја и спољашњег и унутрашњег сегмента фоторецептора је мања код Д-К групе у поређењу са

нормалном грађом ретине НД-К групе. Са порастом концентрације биљне мешавине линеарно се повећава ширина поменутих слојева. Код Д-И групе ширина свих слојева осим унутрашњег нуклеарног слоја је већа од ширина код Д-К групе, док је код Д-Г групе третман има ефекта само на спољашњи нуклеарни слој.



Слика 2.12. Слојеви ретине ока дијабетичних група животиња, ХЕ бојење, 400х увећање: С+УС: спољашњи и унутрашњи сегмент фоторецептора; СНС: спољашњи нуклеарну слој; УНС: унутрашњи нуклеарни слој; ГС: гангијски слој; Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола

4.2.2.8. Хистопатолошке промене у нервном ткиву (хипокампусу)

Утицај биљне мешавине-1, сулфонилуреа (глимепирида) и инсулина на број вијабилних пирамидалних нервних ћелија хипокампуса експерименталних група животиња приказан је на графику 15. Број вијабилних неурона у регионима (СА1, СА2, СА3 и СА4) хипокампуса је значајно смањен ($p < 0,001$) код дијабетичне контролне групе ($33,66 \pm 5,26$; $26,73 \pm 4,67$; $48,03 \pm 3,17$ и $18,06 \pm 4,83\%$) у поређењу са здравом контролном групом ($99,25 \pm 1,29$; $97,71 \pm 2,32$; $95,98 \pm 4,83$ и $96,26 \pm 3,47\%$). Значајно повећање броја вијабилних пирамидалних ћелија запажа се код групе Д-15, третиране биљном мешавином у концентрацији 15 g/kg, у свим анализираним регионима (СА1, СА2, СА3 и СА4) хипокампуса ($96,71 \pm 2,78$; $97,07 \pm 0,69$; $95,87 \pm 1,66$ и $93,17 \pm 0,71\%$), приближно вредностима код не-дијабетичне контролне групе ($p < 0,001$).

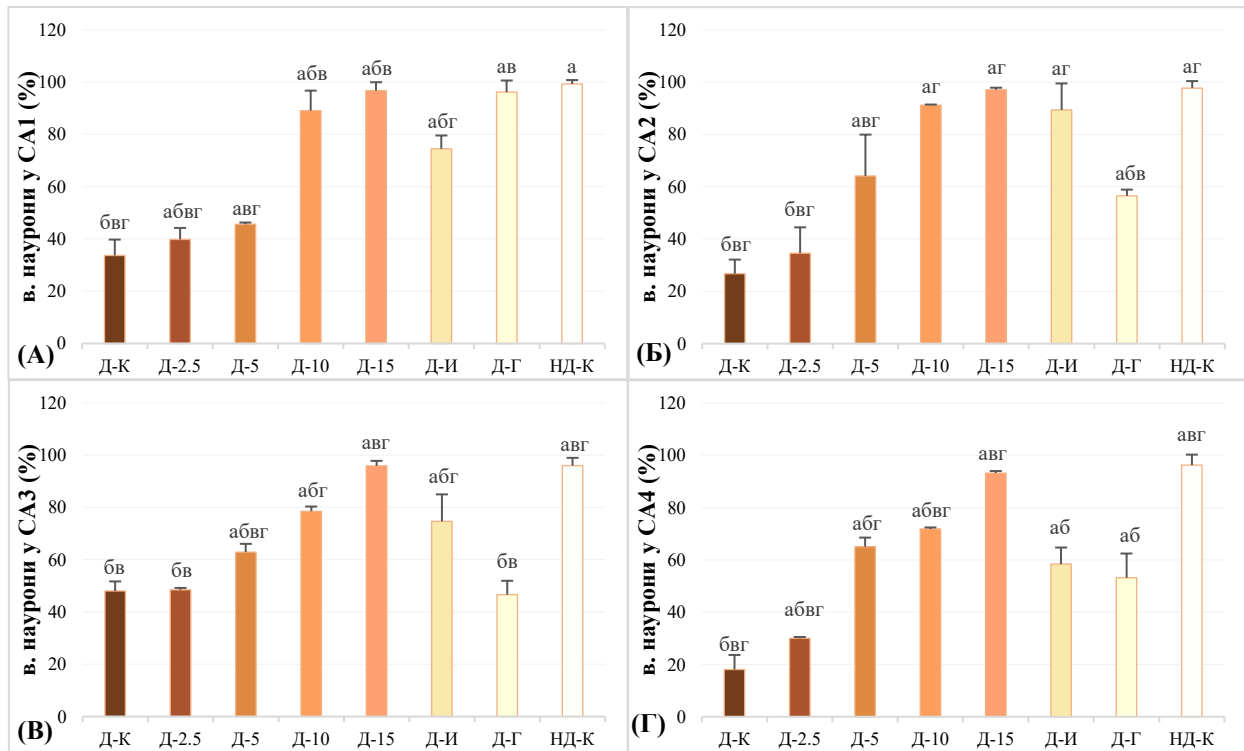


График 15. Хистопатолошка анализа хипокампуса дијабетичних група животиња: удео вијабилних неурона у: (А) СА1; (Б) СА2; (В) СА3 и (Г) СА4 региону хипокампуса (%). Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-1 (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-1 (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-1 (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-1 (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола. Статистички значајна разлика ^а $p < 0,001$ у односу на Д-К; ^б $p < 0,001$ у односу на НД-К; ^в $p < 0,001$ у односу на Д-И групу; ^г $p < 0,001$ у односу на Д-Г.

Код експерименталне групе третиране глимепиридом у СА1 региону се такође запажа повећан удео вијабилних неурона ($96,16 \pm 3,84\%$) у поређењу са Д-К ($p < 0,001$)

и то, чак, до нивоа здраве контролне групе (График 15 (А)), док је код експерименталне групе третиране инсулином удео вијабилних нервних ћелија у СА2 региону ($89,37 \pm 8,77\%$), приближне вредности здравој контролној групи (График 15 (Б)). Третман инсулином показује ефекте и на број вијабилних неурона у СА1 ($74,45 \pm 5,11 \mu\text{m}$) и СА3 ($74,66 \pm 10,32 \mu\text{m}$), али знатно слабије од биљне мешавине (График 15 (А и В)).

На слици 2.13, 2.14, 2.15 и 2.16 приказана је промена броја вијабилних пирамидалних неурона у СА1, СА2, СА3 и СА4 региону хипокампуса. Код дијабетичне контролне групе је у свим регионима запажен повећан број пирамидалних ћелија са хроматолизом Нислове супстанце (око 90% некротичних неурона) као одговор на исхемију која се препознаје као тамније обојена цитоплазма у телу неурона, за разлику од не-дијабетичне контролне групе код које су запажени само вијабилни неурони са светлије обојеним Нисловим гранулама у цитоплазми уз ћелијску мембрану.

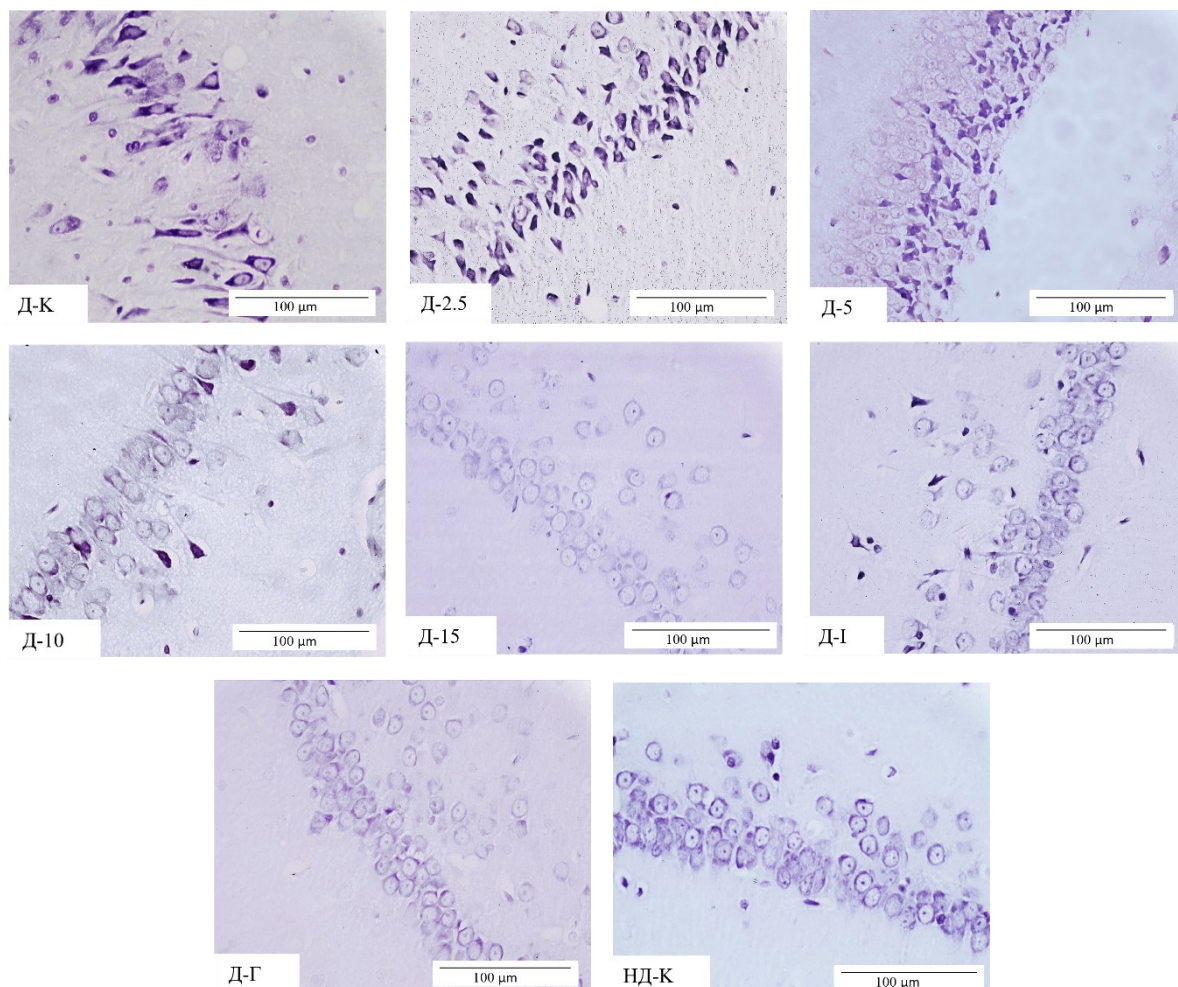
Број тамније обојених пирамидалних ћелија у СА1 региону је мањи код свих третираних група животиња у односу на Д-К групу, а запажа се линеарно опадање броја тамних неурона са порастом концентрације биљне мешавине, тако да је код групе Д-15 смањен до нивоа код здравих животиња. Грађа СА1 региона при третману глимепиридом је иста као код здравих животиња и групе третиране највишом концентрацијом биљне мешавине (Д-15 група), док се при третману инсулином појављује изванредан број некротичних неурона (Слика 2.13).

У СА2 региону је код група третираних биљном мешавином запажена иста ситуација, тј. да постоји линеарна зависност смањења броја неурона у дегенерацији са повећањем концентрације биљне мешавине. Код Д-И групе је, међутим, примећено потпуно одсуство дегенерисаних неурона, док је код Д-Г групе заступљено око 50% вијабилних и 50% неурона у процесу дегенерације (Слика 2.14).

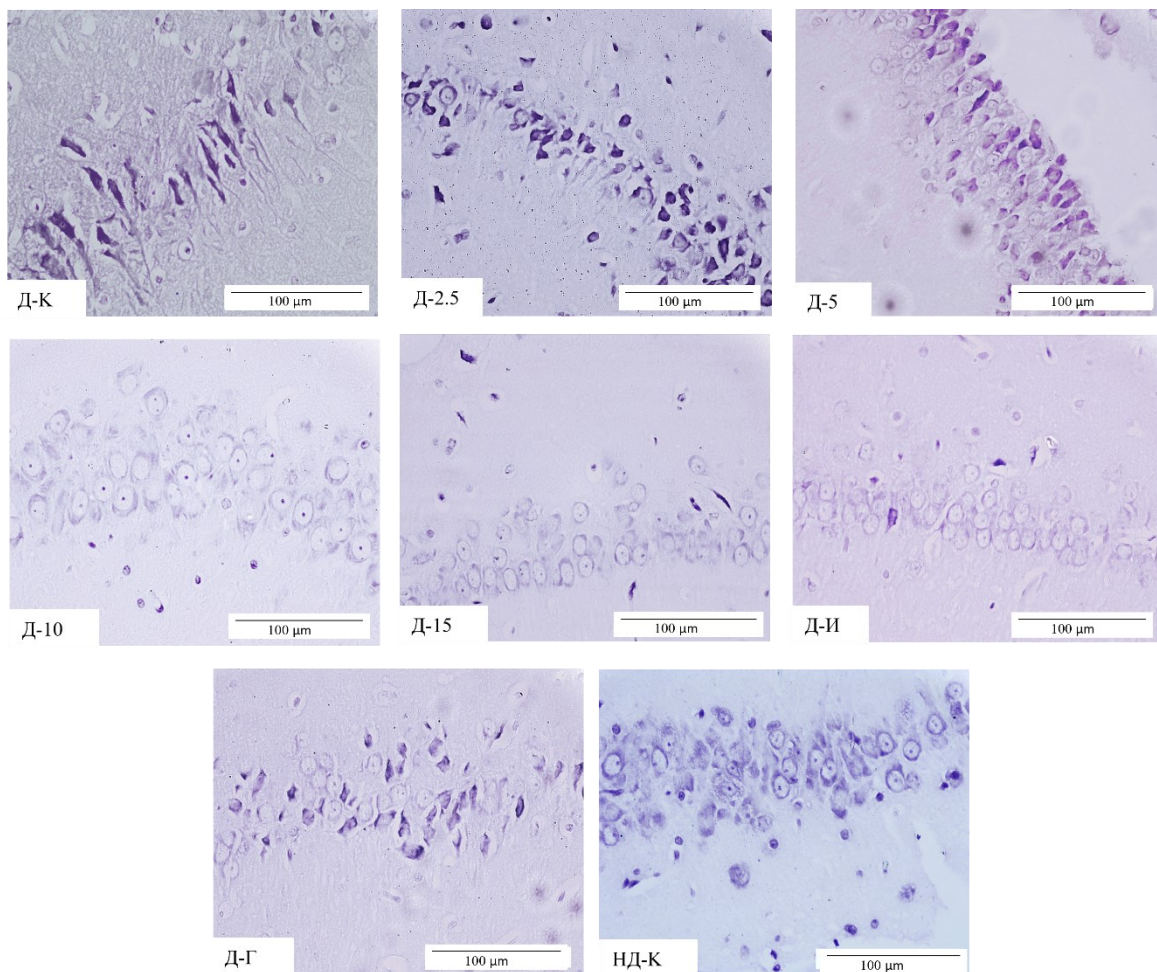
На слици 2.15 приказана је линеарно повећање броја вијабилних неурона и смањење броја дегенерисаних неурона са повећањем концентрације биљне мешавине, до потпуне редукције броја дегенерисаних неурона код Д-15 групе у СА3 региону хипокампуса. Код Д-И групе присутан је мали број неурона у дегенерацији, док је код Д-Г групе у овом региону присутно око 90% дегенерисаних и незнатан број вијабилних неурона, приближно грађи Д-К групе.

Однос броја вијабилних и дегенерисаних неурона у СА4 региону хипокампуса је сличан односу у СА2 региону код свих третираних група, тако да постоји линеарна

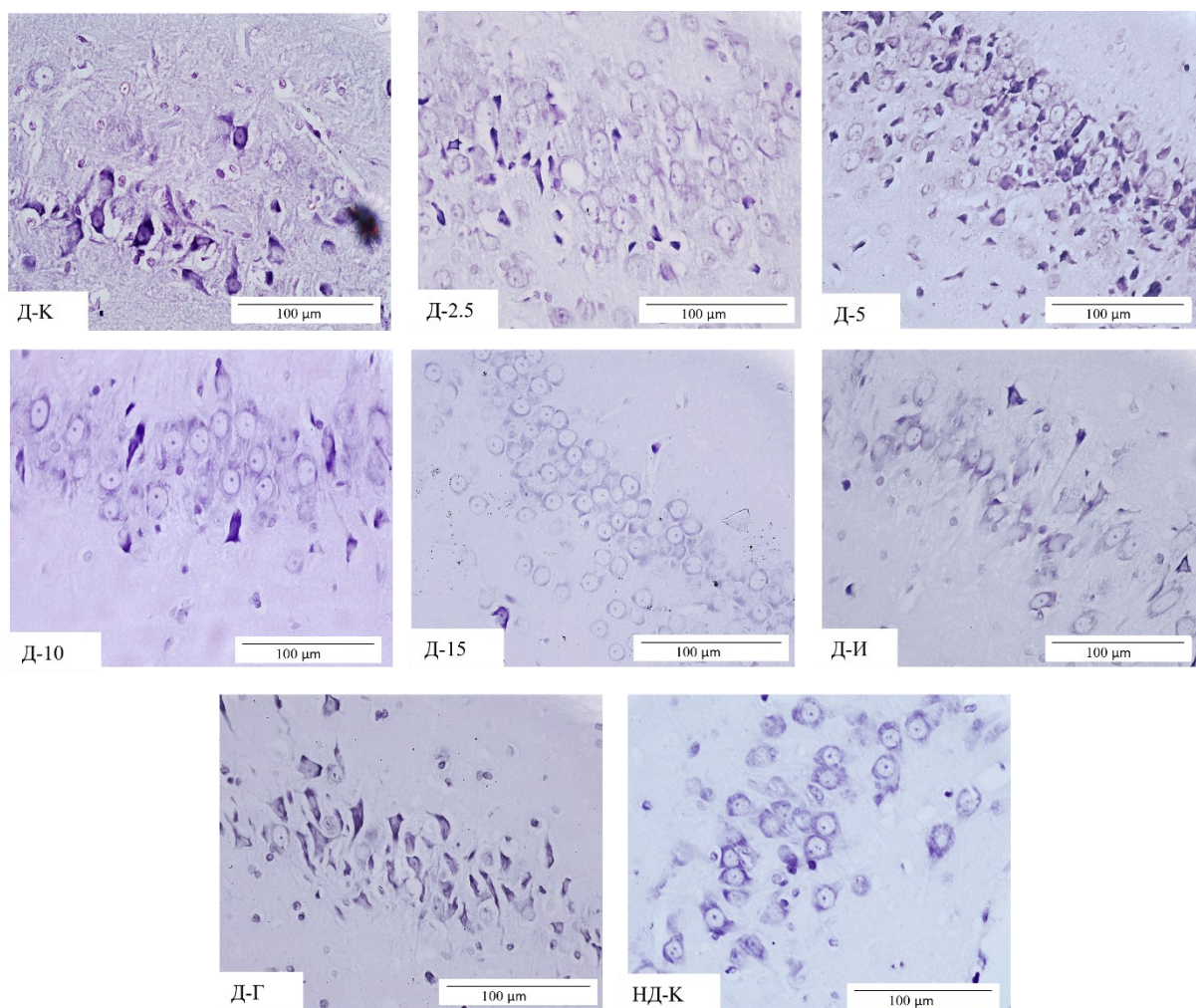
зависност смањења броја неурона у дегенерацији са повећањем концентрације биљне мешавине до њихове потпуне редукције код Д-15 групе, као и код Д-Г групе, док су код Д-И групе заступљени око 50% од укупног броја неурона у датом региону (Слика 2.16).



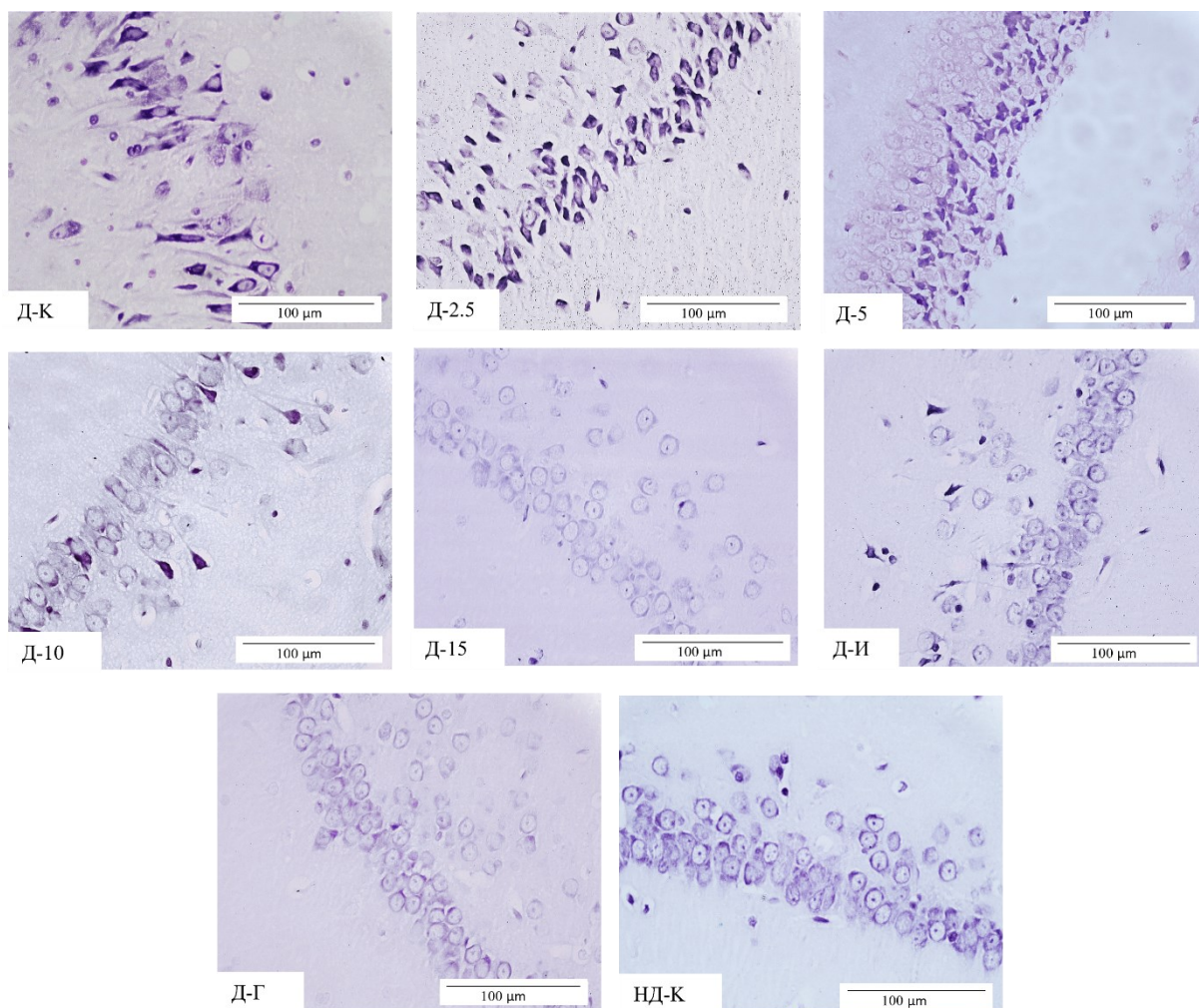
Слика 2.13. Пирамидалне ћелије СА1 региона хипокампуса дијабетичних група животиња, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или небојена цитоплазма), 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.



Слика 2.14. Пирамидалне ћелије СА2 региона хипокампуса дијабетичних група животиња, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или необојена цитоплазма), 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д -Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.



Слика 2.15. Пирамидалне ћелије СА3 региона хипокампуса дијабетичних група животиња, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или необојена цитоплазма), 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.



Слика 2.16. Пирамидалне ћелије СА4 региона хипокампуса дијабетичних група животиња, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или необојена цитоплазма), 400x увећање: Д-К: дијабетична контрола; Д-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); Д-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); Д-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); Д-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); Д-И: инсулин; Д-Г: глимепирид; НД-К: не-дијабетична контрола.

4.2.3. Суб-хронична токсичност и ефекти биљне мешавине-I на метаболизам здравих животиња

4.2.3.1. Ефекат на ниво гликемије

Ниво глукозе у крви животиња је током експеримента суб-хроничне токсичности при третману биљном мешавином-I био у опсегу нормалних вредности након 14 дана од почетка третмана (Табела 9). Међутим, примећено је да се ниво глукозе у крви код животиња здраве контролне групе повећавао током експеримента тј. са почетне вредности $3,84 \pm 0,49$ mmol/l на $4,77 \pm 0,31$ mmol/l док је са порастом концентрације биљне мешавине та разлика смањена, тако да је код групе 3-10 на почетку и на крају експеримента ниво шећера у крви био $3,36 \pm 0,09$ mmol/l и $3,57 \pm 0,415$ mmol/l, док је код 3-15 групе био $4,02 \pm 0,53$ mmol/l и $3,9 \pm 0,25$ mmol/l (Табела 9).

Табела 9. Ниво глукозе у крви код група животиња измерен нултог, 14. и 28. дана од почетка експеримента суб-хроничне токсичности.

Експериментална група	Ниво глукозе у крви (mmol/l)		
	0. дан	14. дан	28. дан
3-К	$3,84 \pm 0,49$	$4,03 \pm 0,49$	$4,77 \pm 0,31$
3-2.5	$3,88 \pm 0,35$	$3,87 \pm 0,45$	$4,20 \pm 0,10^*$
3-5	$3,56 \pm 0,23$	$3,67 \pm 0,25$	$4,00 \pm 0,10^*$
3-10	$3,36 \pm 0,09$	$3,33 \pm 0,12$	$3,57 \pm 0,15^*$
3-15	$4,02 \pm 0,53$	$3,63 \pm 0,21$	$3,90 \pm 0,25^*$

3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg). Статистички значајна разлика * $p < 0,001$ у односу на 3-К.

4.2.3.2. Ефекат на индекс телесне масе

Индекс телесне масе животиња се повећавао у складу са индексом телесне масе животиња контролне групе без значајног варирања вредности између третираних група до 21. дана третмана (График 16). На крају експеримента је, пак, примећено благо смањење индекса телесне масе животиња код 3-10 групе и 3-15 групе у односу на 21. дан.

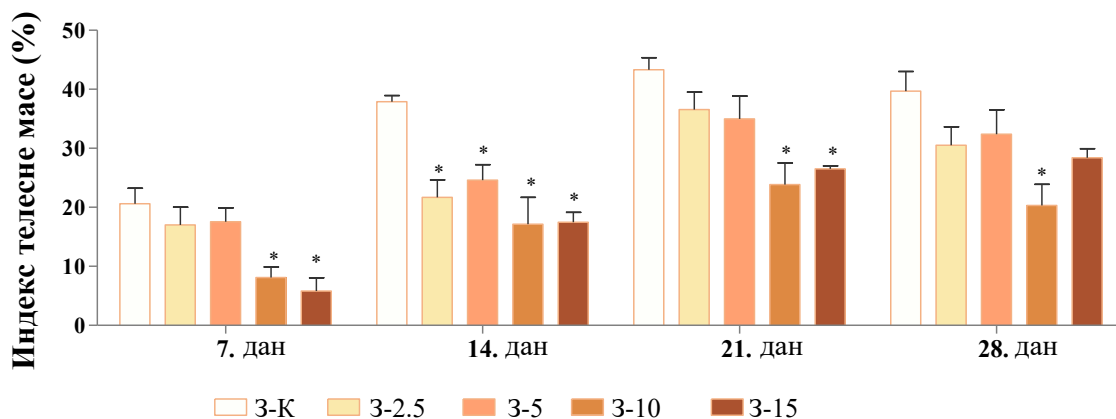


График 16. Индекс телесне масе животиња 7., 14., 21. и 28. дана од почетка ексеримента суб-хроничне токсичности: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавна-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg), * $p < 0,05$ у поређењу са 3-К.

4.2.3.3. Ефекат на липидни статус и ниво оштећења јетре и бубрега

Третман биљном мешавином-I нема значајног ефекта на промену параметара липидног статуса тестираних група (Табела 10). Након 28 дана третмана није дошло до значајних промена нивоа AST, ALT, креатинина и урее у серуму, које би указивале на токсично деловање биљне мешавине (Табела 11). Услед третмана биљном мешавином ниво ALP је значајно смањен код 3-15 групе ($78,33 \pm 3,21$ IU/l), у односу на контролну групу ($104,33 \pm 3,05$ IU/l) ($p < 0,001$) (Табела 11)

Табела 10. Липидни статус животиња на крају експеримента суб-хроничне токсичности.

Експериментална група	Укупни холестерол (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)	триглицериди (mmol/l)	VLDL (mmol/l)
3-К	$1,45 \pm 0,03$	$1,36 \pm 0,12$	$0,45 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,01$
3-2.5	$1,27 \pm 0,27$	$1,27 \pm 0,18$	$0,62 \pm 0,13$	$0,45 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$
3-5	$1,66 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,00$
3-10	$1,62 \pm 0,08$	$1,16 \pm 0,15$	$0,47 \pm 0,14$	$0,49 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,02$
3-15	$1,53 \pm 0,33$	$1,29 \pm 0,11$	$0,46 \pm 0,15$	$0,54 \pm 0,05$	$0,11 \pm 0,01$

3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавна-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg), * $p < 0,05$ у поређењу са 3-К.

Табела 11. Ниво AST, ALT, ALP, креатинина и урее животиња на крају експеримента суб-хроничне токсичности.

Експериментална група	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	креатинин ($\mu\text{mol/l}$)	уреа (mol/l)
3-К	184,67 \pm 11,64	48,10 \pm 3,98	104,33 \pm 3,05	42,33 \pm 2,08	9,27 \pm 0,40
3-2.5	166,67 \pm 8,44	37,10 \pm 9,79	83,00 \pm 9,54	44,33 \pm 3,05	8,43 \pm 1,57
3-5	155,13 \pm 17,35	41,17 \pm 5,83	82,00 \pm 10,44	43,00 \pm 4,35	8,87 \pm 0,83
3-10	167,13 \pm 11,43	41,40 \pm 5,93	91,33 \pm 4,01	46,33 \pm 1,55	9,70 \pm 0,65
3-15	164,23 \pm 14,05	38,53 \pm 6,01	78,33 \pm 3,21*	44,33 \pm 1,53	8,50 \pm 1,53

3-К: контрола; 3-2.5: биљна мепавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg). Статистички значајна разлика * $p < 0,001$ у односу на 3-К.

На основу теста липидне пероксидације, ниво малондиалдехида у серуму и у ткиву бубрега је остао непромењен при третманима биљном мешавином у односу на контролну групу (График 17).

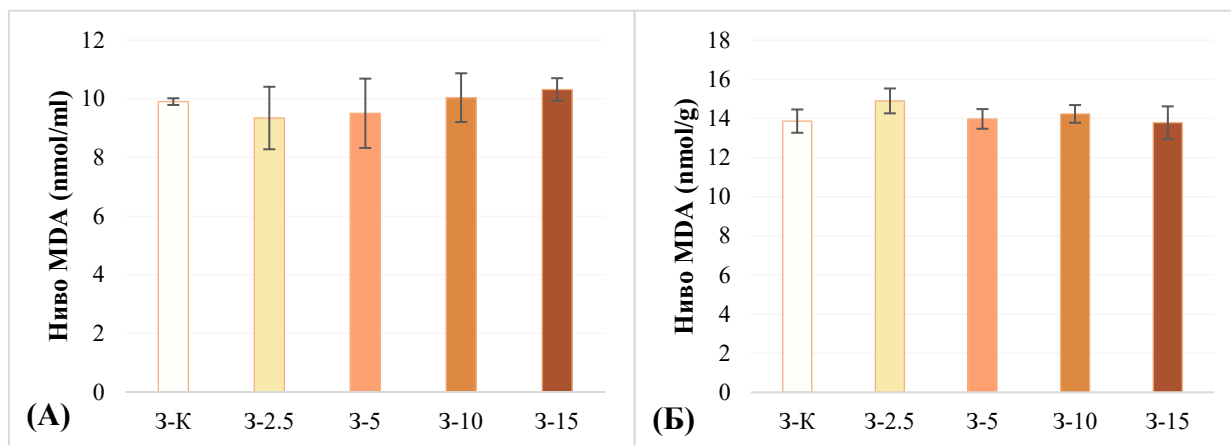


График 17. Ниво малондиалдехида (MDA) у серуму (А) и ткиву бубрега (Б) животиња на крају експеримента суб-хроничне токсичности. 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мепавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

4.2.3.4. Хепатотоксичан ефекат

На основу хистопатолошке анализе јетре, биљна мешавина није значајно утицала на удео укупних хепатоцита, односа нукелуса и цитоплазме бинуклеусних ћелија, као ни на ниво гликогена и колагена у ткиву јетре. Удео броја Купферових ћелија је значајно повећан при третману концентрацијом 10 g/kg (31,39 \pm 1,54%) ($p < 0,05$) у односу на контролну групу (25,13 \pm 3,45%), као и удео бинуклеусних хепатоцита при концентрацијама 2,5 g/kg (17,40 \pm 0,72%) и 10 g/kg (16,91 \pm 0,78%) ($p < 0,05$) у односу на 3-К (19,31 \pm 0,58%) (График 18 (А, Б, В, Г, Д, Ђ и Е)).

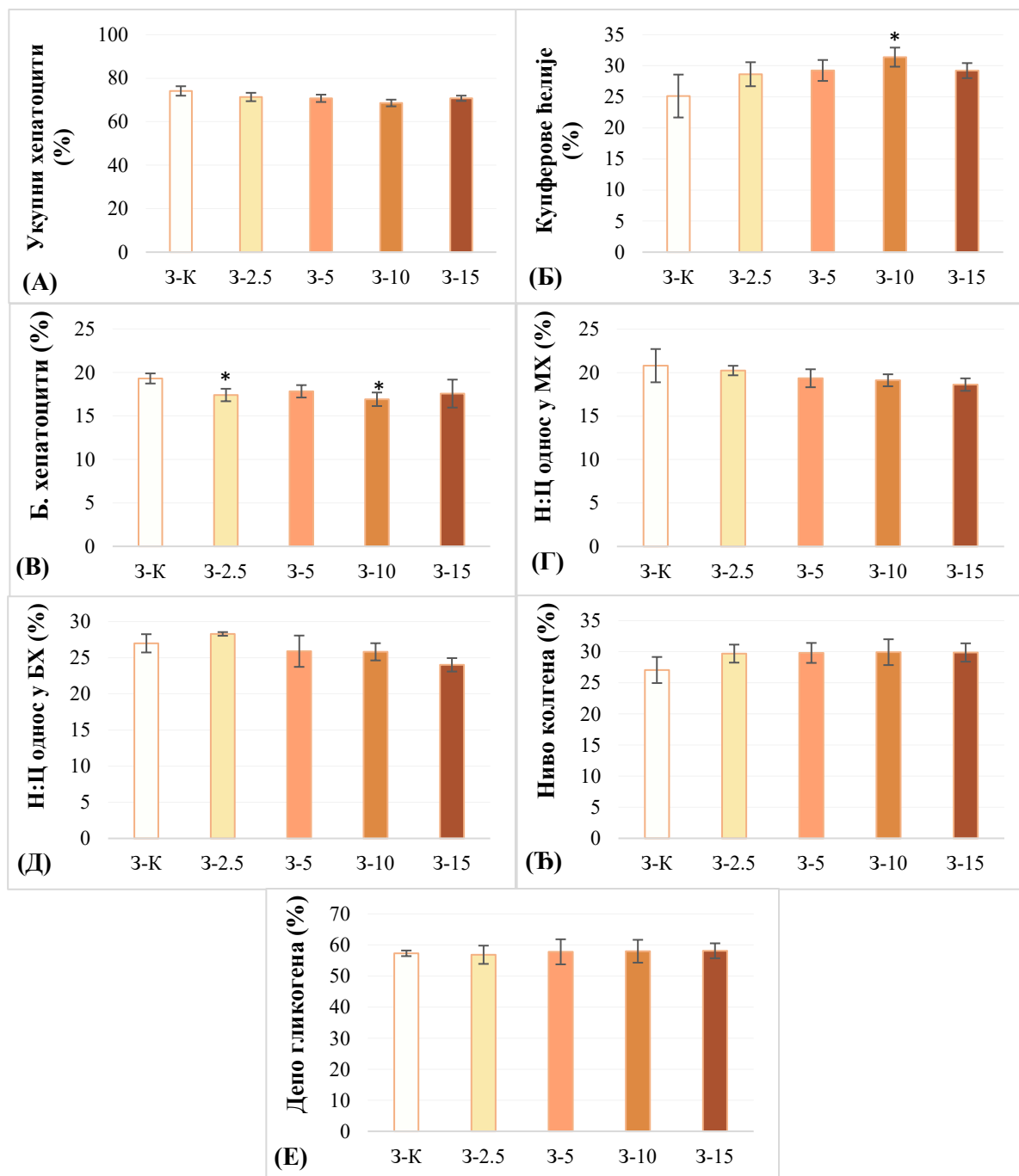
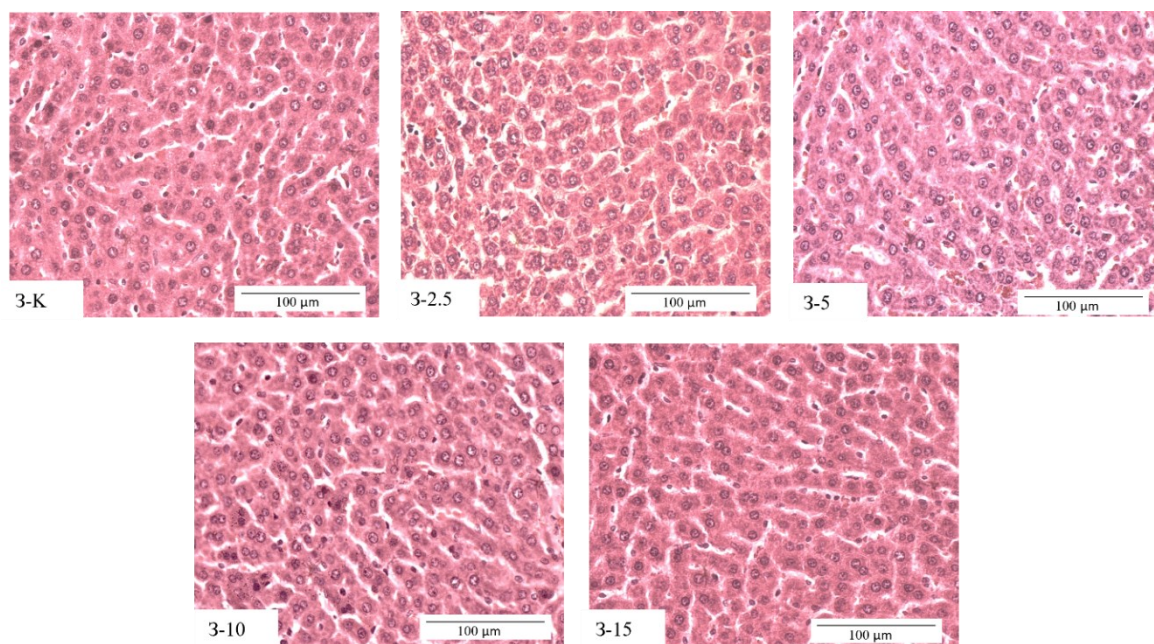
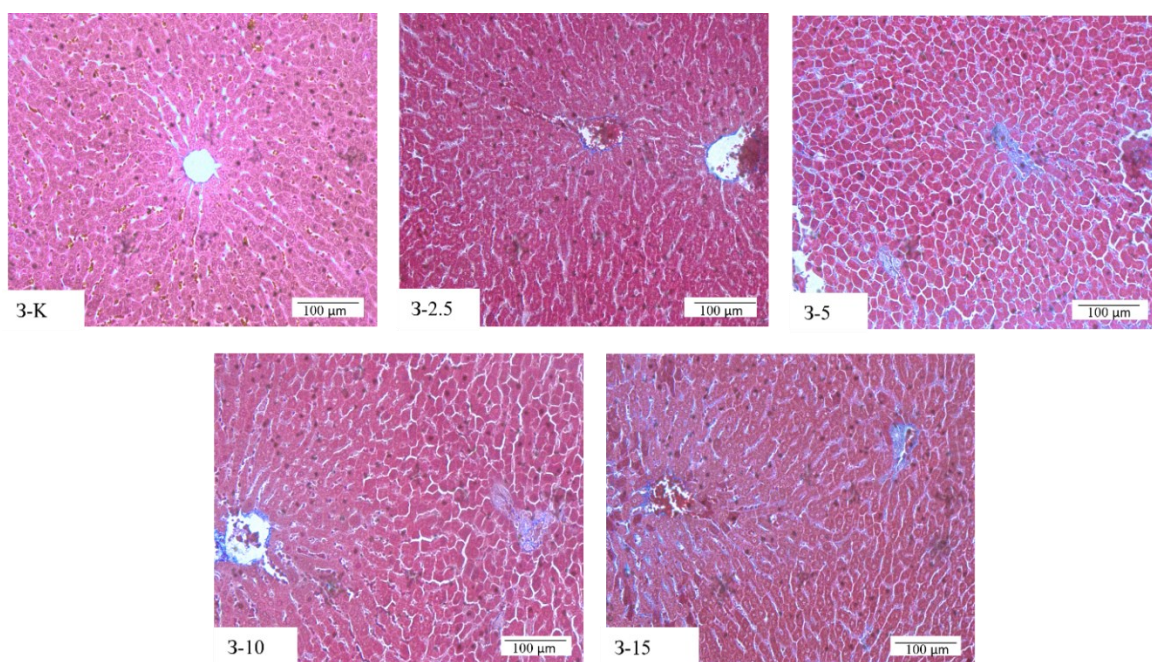


График 18. Хистопатолошка анализа јетре група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности: (А) удео укупних хепатоцита (%); (Б) удео Купферових ћелија (%); (В) удео бинуклеусних хепатоцита (%); (Г) Н:Ц однос у мононуклеусним хепатоцитима (%); (Д) Н:Ц однос у бинуклеусним хепатоцитима (%); (Е) ниво колгена у ткиву (%); (Ж) депо гликогена у ћелијама (%): 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg); * $p < 0,001$ у поређењу са 3-К.

На слици 3.1 приказано је ткиво јетре група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности биљне мешавине. Код свих група се запажа нормална хистолошка грађа јетре, без видљивих патолошких промена.



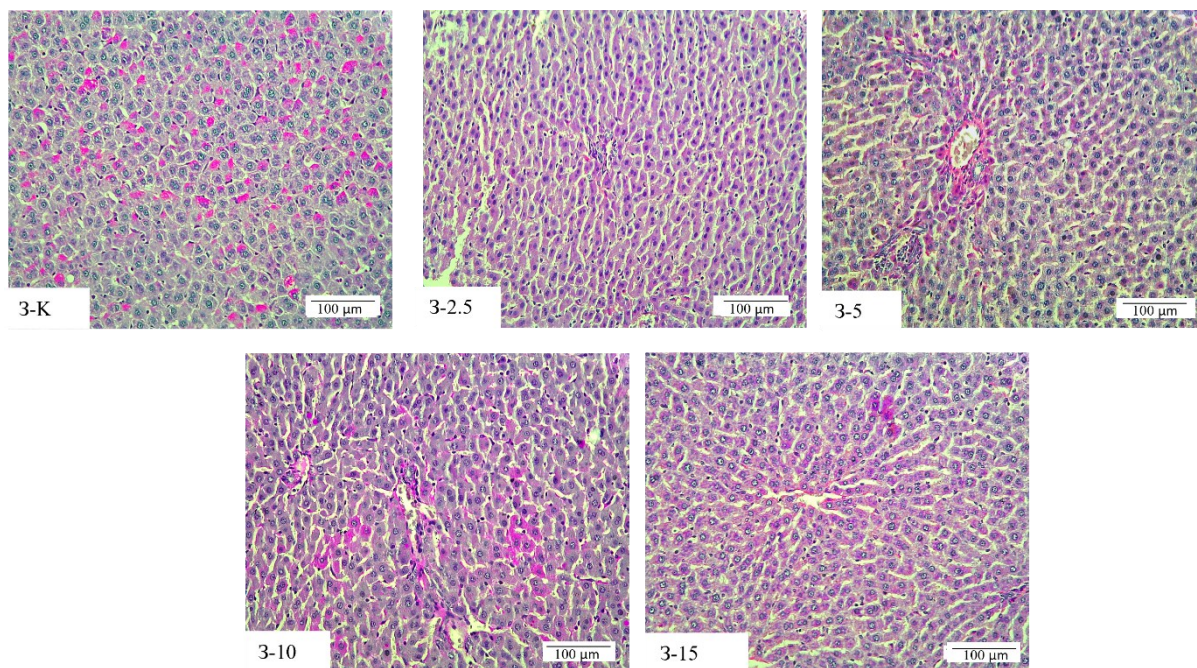
Слика 3.1. Ткиво јетре група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, ХЕ бојење, 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.2. Колаген у ткиву јетре група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, Масон-трихромно бојење, 200 x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

На Слици 3.2 приказано је присуство колагена у ткиву јетре група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности биљне мешавине. Код свих група се запажа

нормалан ниво колагена око крвних судова без значајног варирања у односу на контролну групу животиња.



Слика 3.3. Гликоген у ћелијама јетре група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, ПАС бојење, 200x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

На Слици 3.3 је приказан ниво гликогена у ћелијама јетре код група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности биљне мешавине. Код свих група запажа се подједнак број хепатоцита са депоом гликогена као код контролне групе.

4.2.3.5. Нефротоксичан ефекат

Биљна мешавина-I ни у једној концентрацији није довела до значајних хистопатолошких промена на бубрегу експерименталних група у поређењу са контролном групом на крају експеримента суб-хроничне токсичности (График 19).

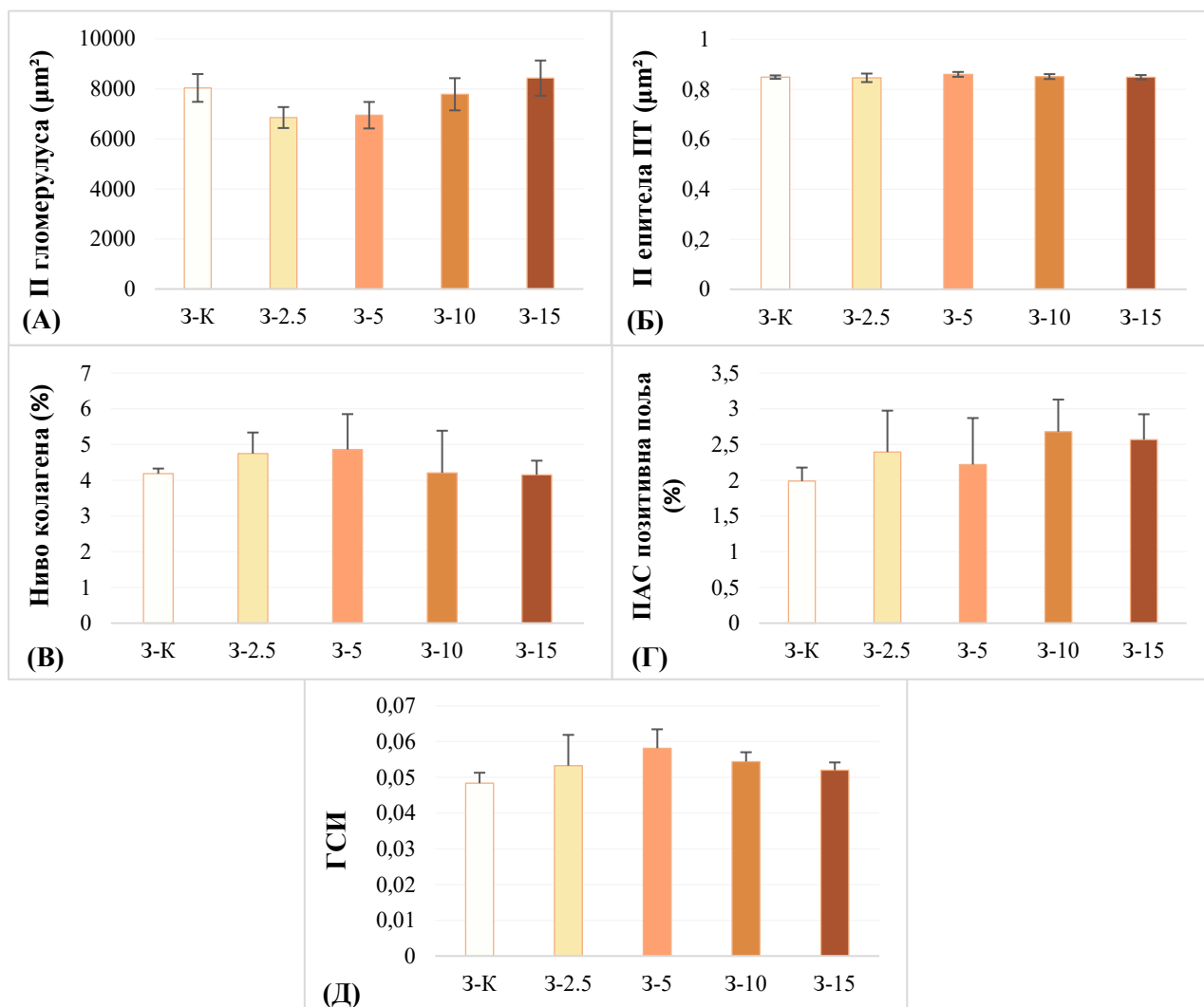
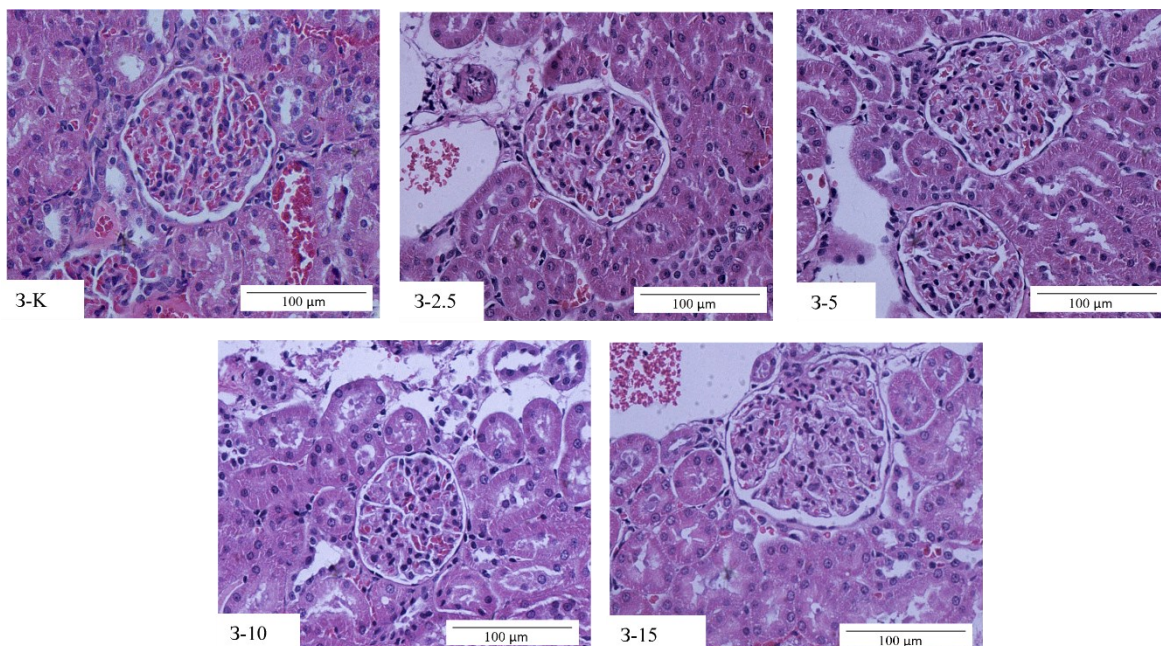


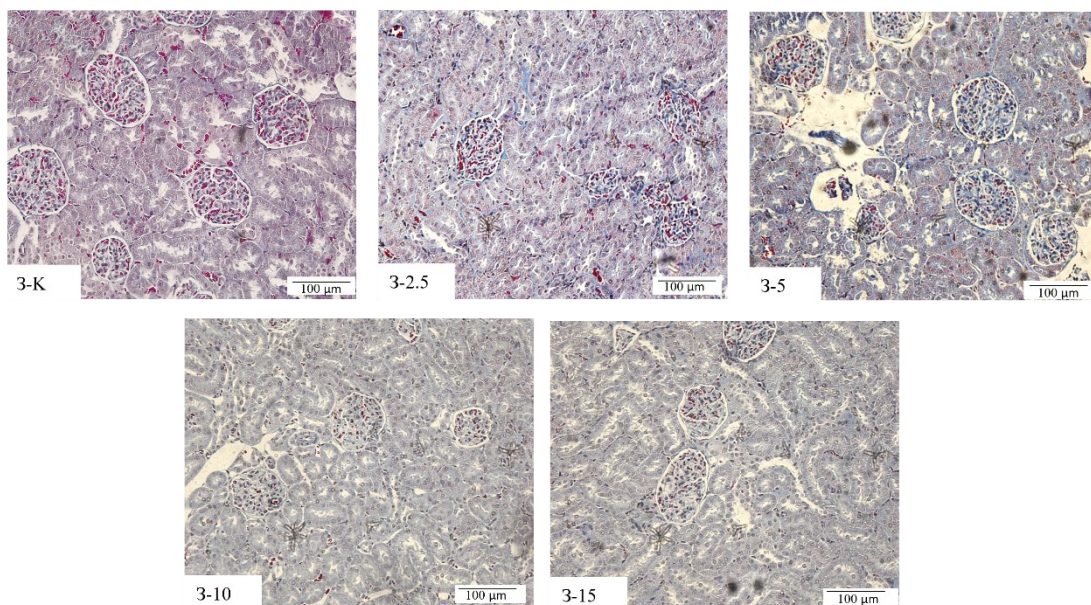
График 19. Хистопатолошка анализа бубрега група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности: (А) површина гломерулуса (μm^2); (Б) површина епитела проксималних тубула (μm^2); (В) ниво колагена у ткиву (%); (Г) ПАС позитивна поља у ткиву (%); (Д) гломерулосклеротски индекс (%). 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

На слици 3.4 представљено је ткиво бубрега код група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности биљне мешавине и нема видљивих хистопатолошких промена ни код једног од третмана у односу на контролну групу.

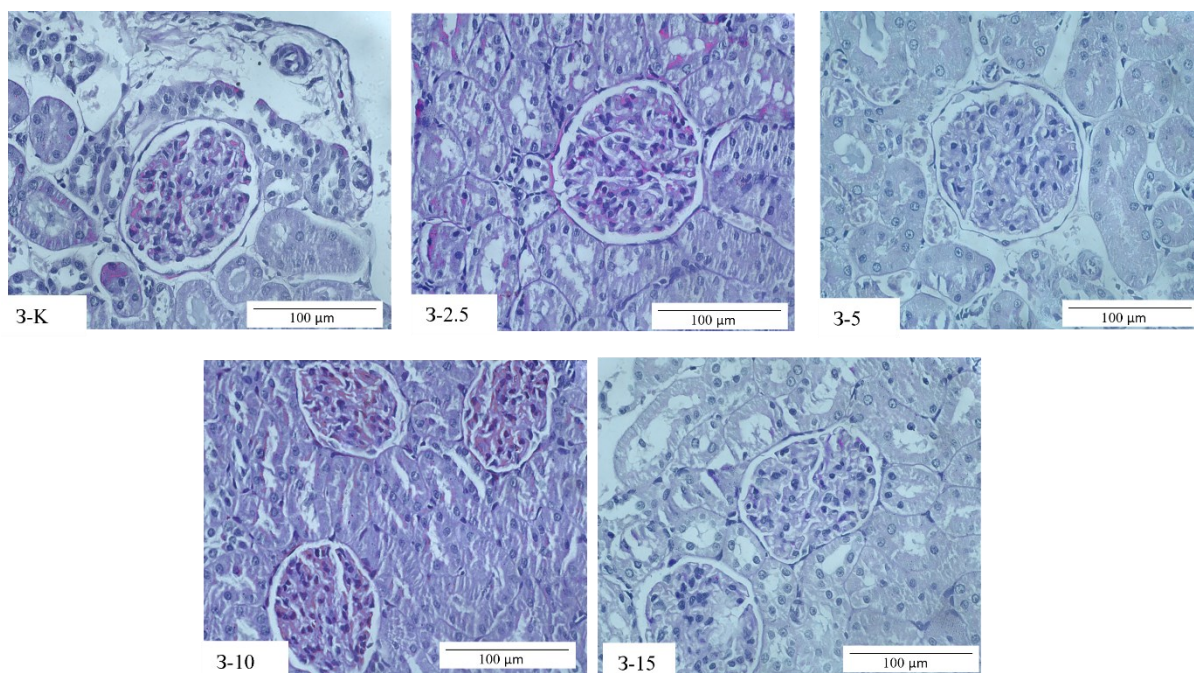


Слика 3.4. Ткиво бубрега група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, ХЕ бојење, 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

Као што је приказано на слици 3.5 количина колагена око гломерулула и тубула бубрега је код свих експерименталних група третираних биљном мешавином остала непромењена током 28 дана и притом нема назнака гломерулосклерозе.



Слика 3.5. Колаген у ткиву бубрега група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, Масон-трихромно бојење, 200x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.6. Ткиво бубрега група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, ПАС бојење, 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

4.2.3.6. Ефекат на коштаног ткиво

Третман биљном мешавином-I у периоду од 28 дана није довео до значајних хистопатолошких промена коштаног ткива фемура у поређењу са контролном групом (График 20).

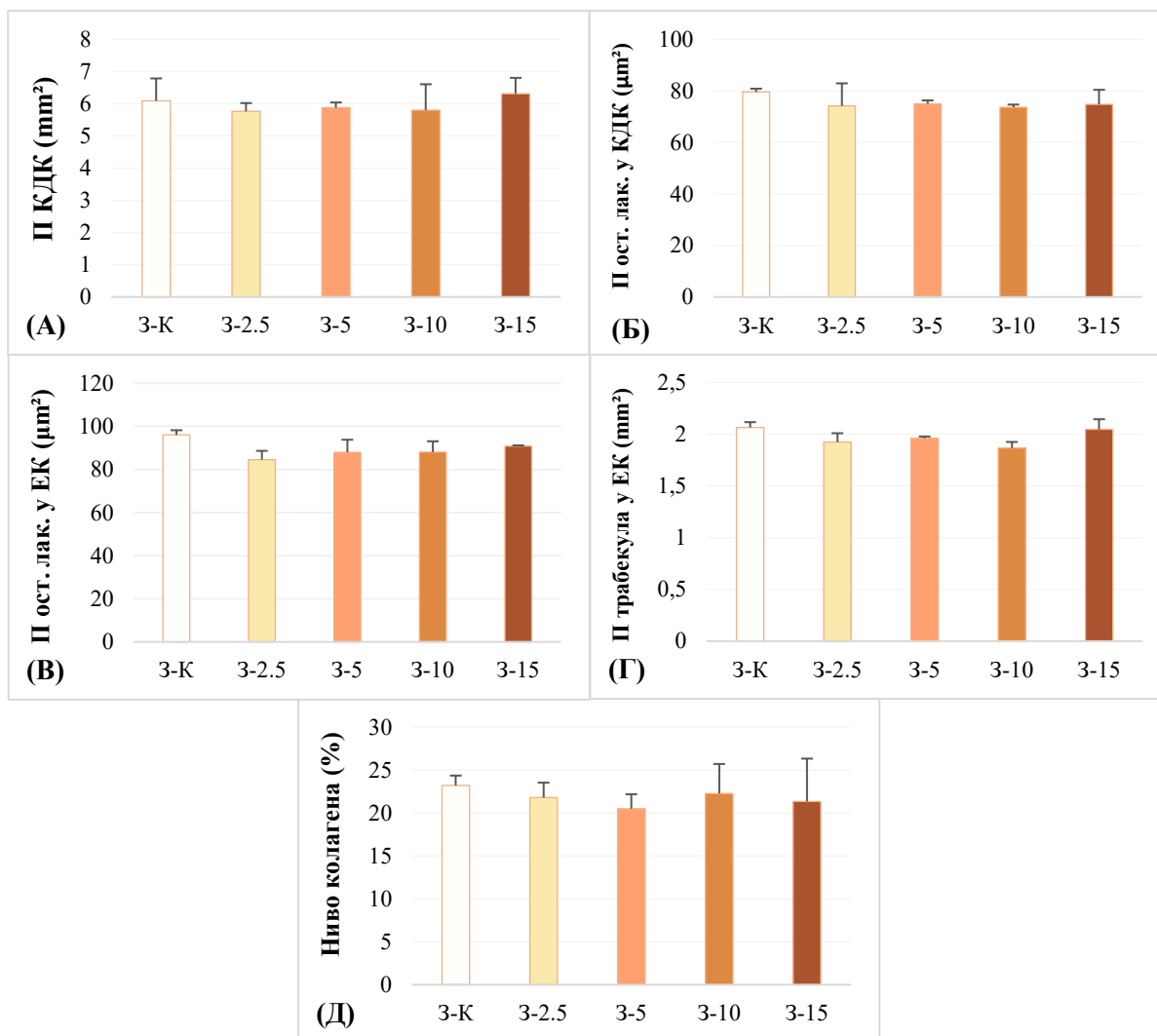


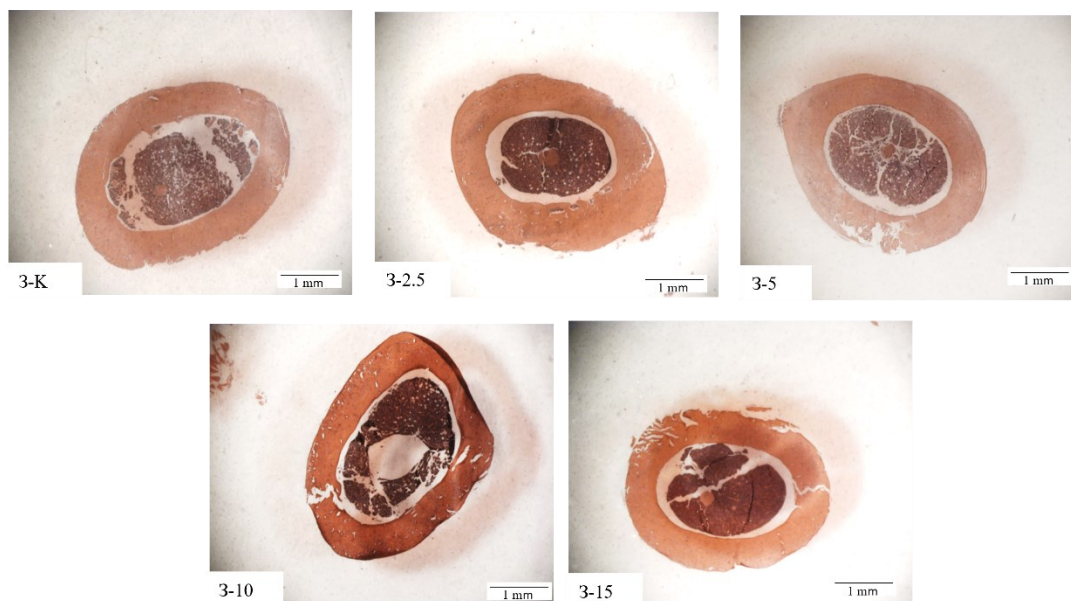
График 20. Хистопатолошка анализа фемура група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности: (А) површина кортикалног дела костију (mm²); (Б) површина лакуна остеоцита у кортикалном делу кости (μm²); (В) површина лакуна остеоцита у епифизама костију (μm²); (Г) површина трабекула епифиза костију (μm²); (Д) ниво колагена у коштаном ткиву. 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

Површина коштаног ткива у кортикалном делу фемура се није променила код третираних група (3-2.5; 3-5; 3-10 и 3-15) у поређењу са 3-К групом (Слика 3.7).

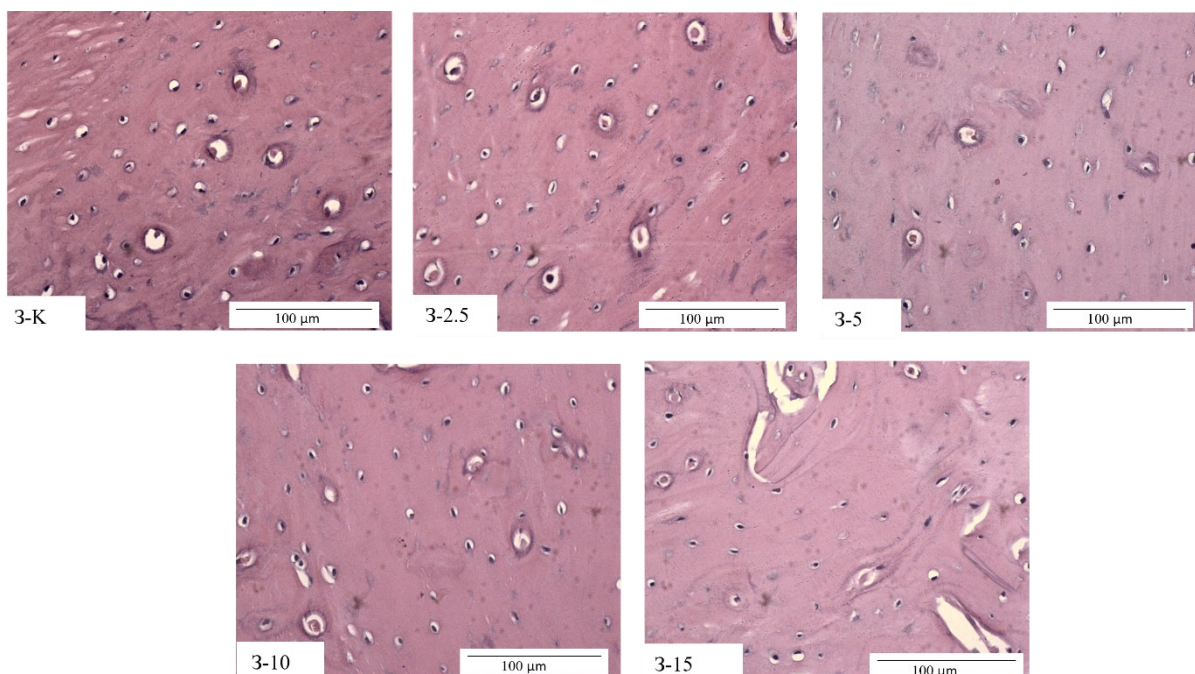
Коштано ткиво у кортикалном делу и епифизама је нормалне хистолошке грађе код свих група третираних различитим концентрацијама биљне мешавине-I, а чак се код 3-10 и 3-15 група уочава и присуство новоформираног коштаног ткива (Слика 3.8. и 3.9).

Колаген у коштаном матриксу кортикалног дела костију је подједнаког нивоа код свих третираних група животиња у односу на контролну групу (Слика 3.10), али је

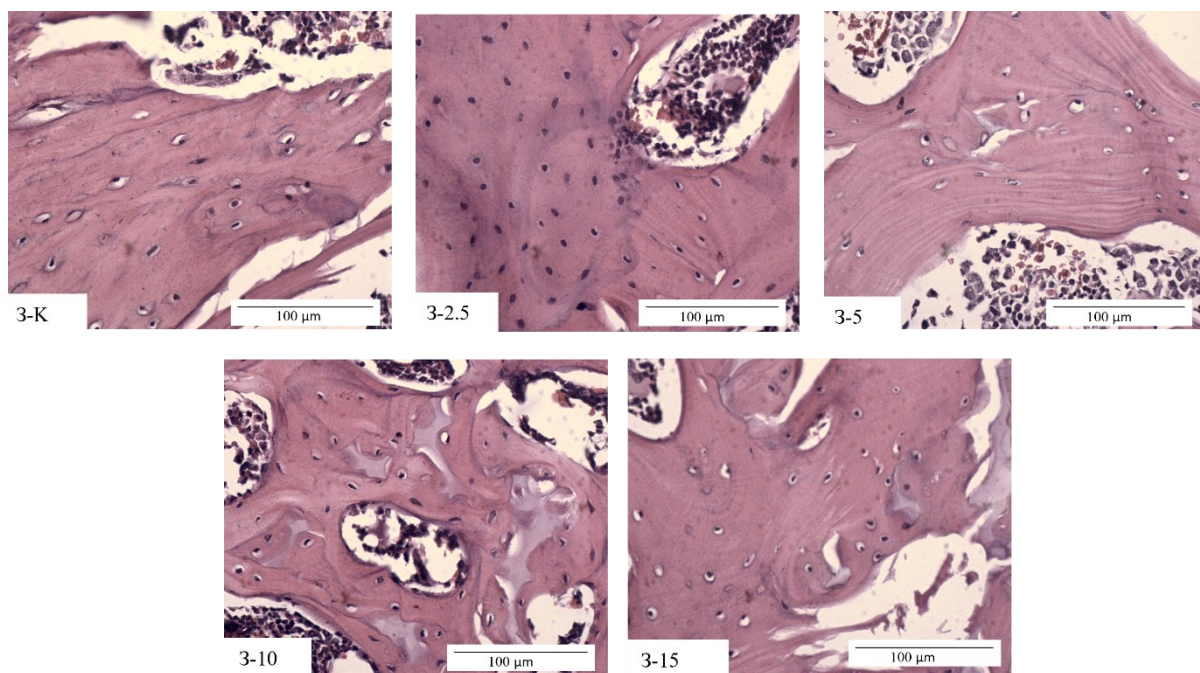
примећен гушћи распоред коштаних гредица у нивоу епифиза фемура код третираних група животиња у односу на 3-К (Слика 3.11).



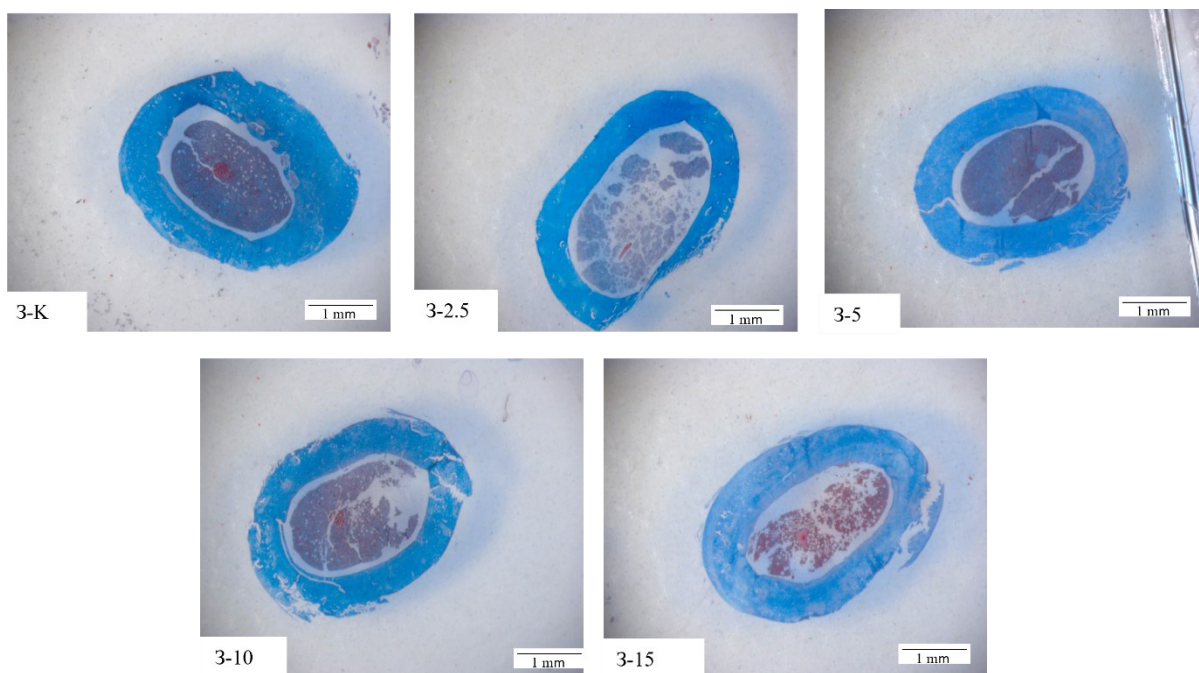
Слика 3.7. Попречни пресек дијафизе фемура (кортикални део кости) група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, ХЕ бојење, 20x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).).



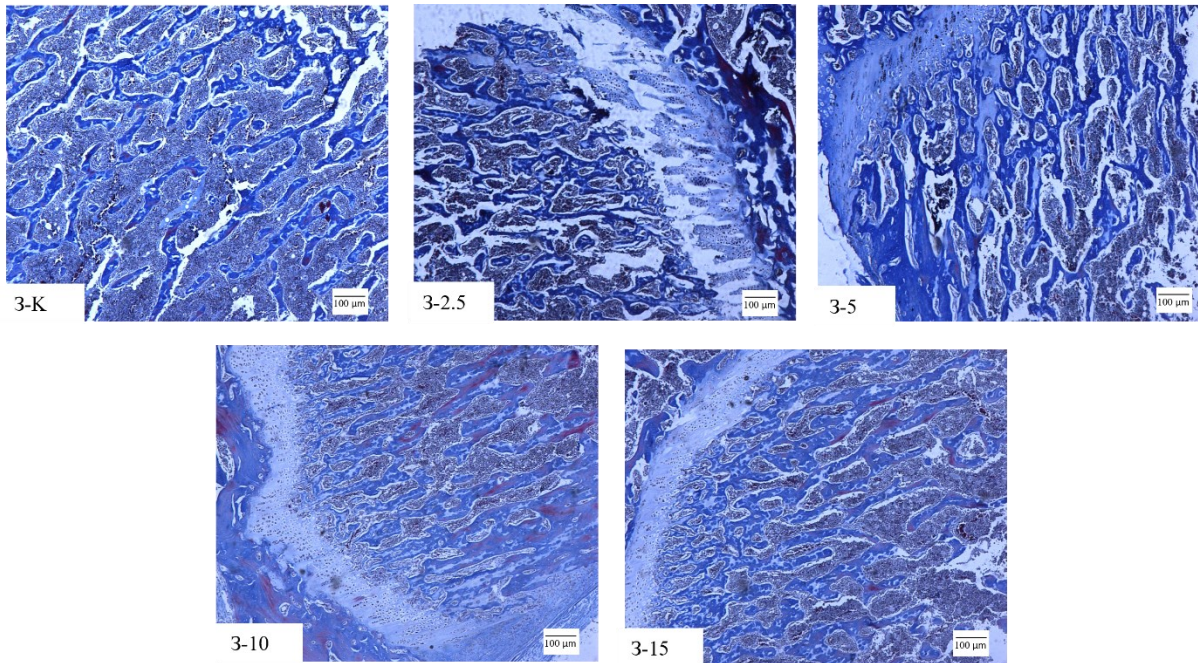
Слика 3.8. Коштано ткиво кортикалног дела фемура група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, ХЕ бојење, 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.9. Коштано ткиво у епифизама фемура група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, X&E бојење, 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.10. Колаген у ткиву кортикалног дела фемура група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, Масон-трихромно бојење, 20x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.11. Колаген у трабекулама епифиза фемура група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, Масон-трихромно бојење, 50х увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

4.2.3.7. Ефекат на ретину

Третман биљном мешавином-I није имао значајног утицаја на промену хистолошких параметара ретине ока здравих животиња након 28 дана третмана (График 21).

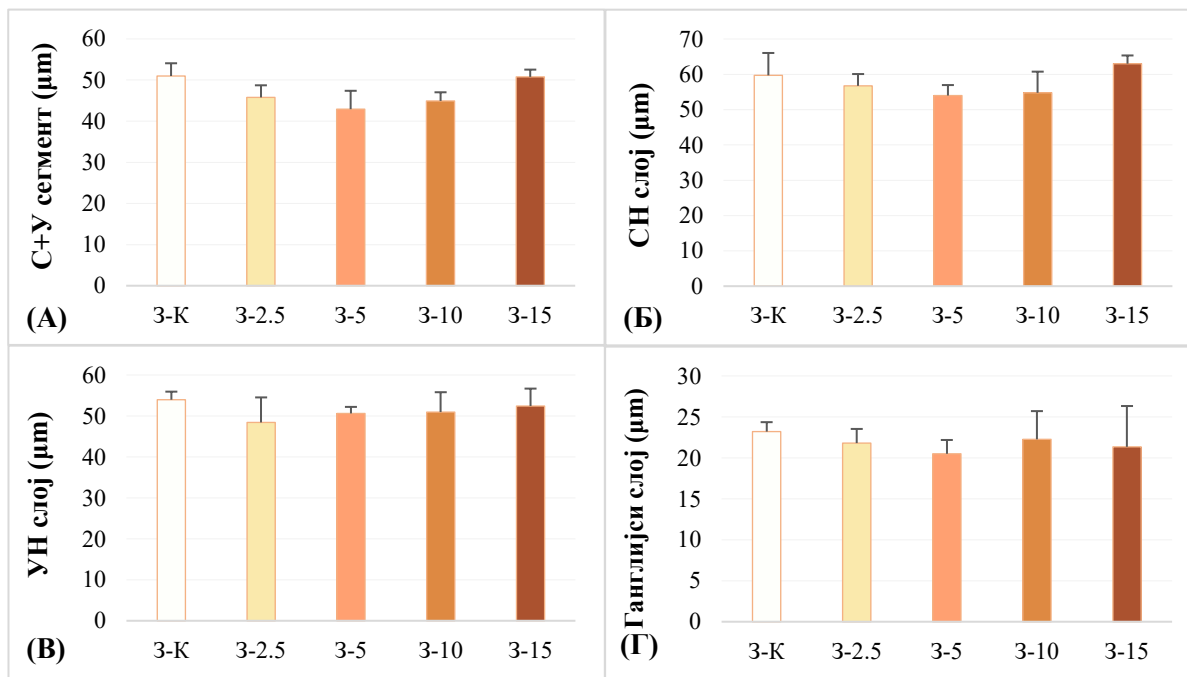
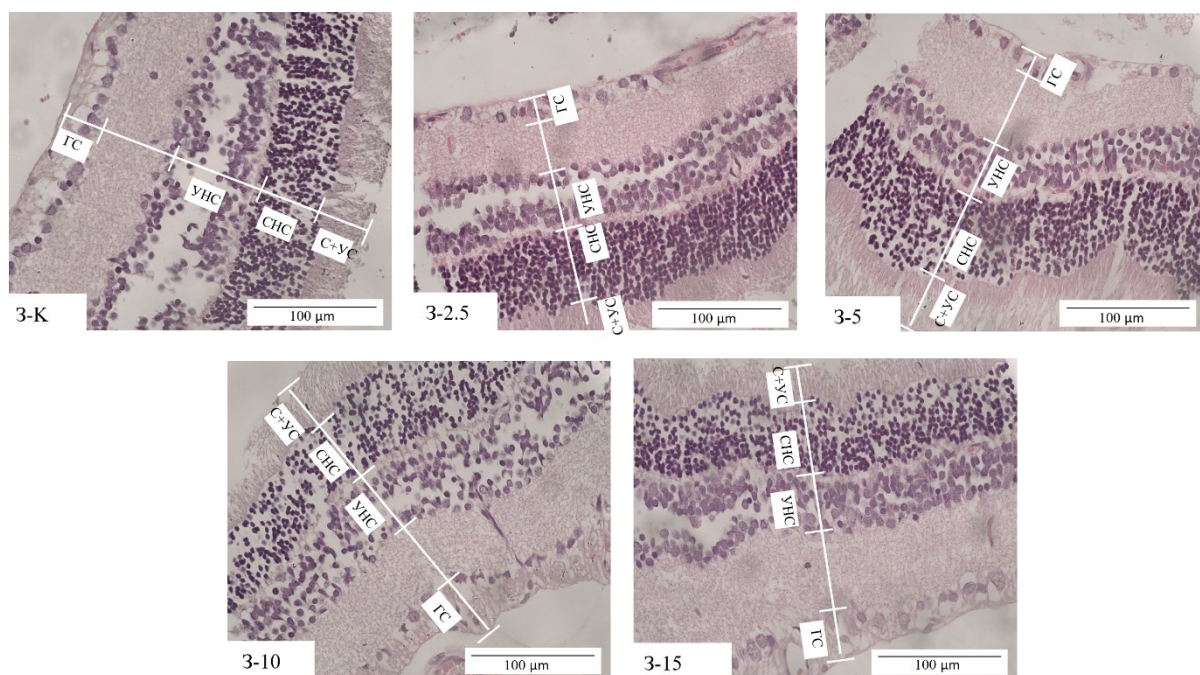


График 21. Хистопатолошка анализа ретине ока група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности: (А) ширина спољашњег и унутрашњег сегмента (µm); (Б) ширина спољашњег нуклеарног слоја (µm); (В) ширина унутрашњег нуклеарног слоја (µm); (Г) ширина слоја ганглијских ћелија (µm). 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

На Слици 3.12 приказана је хистолошка грађа ретине ока здравих животиња третираних биљном мешавином-I различитих концентрација и однос ширина појединачних слојева ретине. Код контролне групе и свих третираних група ретина је нормалне хистолошке грађе и нема назнака ка патолошким променама током 28 дана третмана биљном мешавином.



Слика 3.12. Слојеви ретине ока група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, Х&Е бојење, 400x увећање: С+УС: спољашњи и унутрашњи сегмент; СНС: спољашњи нуклеарну слој; УНС: унутрашњи нуклеарни слој; ГС: грануларни слој. 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

4.2.3.8. Неуротоксични ефекат

Третман биљном мешавином-I током 28 дана није довео до значајних промена броја вијабилних неурона ни у једном од региона хипокампуса (График 22), као што је приказано и на хистолошким препаратима СА1 (Слика 3.13), СА2 (Слика 3.14), СА3 (Слика 3.15) и СА4 (Слика 3.16) региона хипокампуса где се уочава присуство вијабилних неурона са више од 90% од укупног броја ћелија у ткиву и код третираних и код нетретираних животиња.

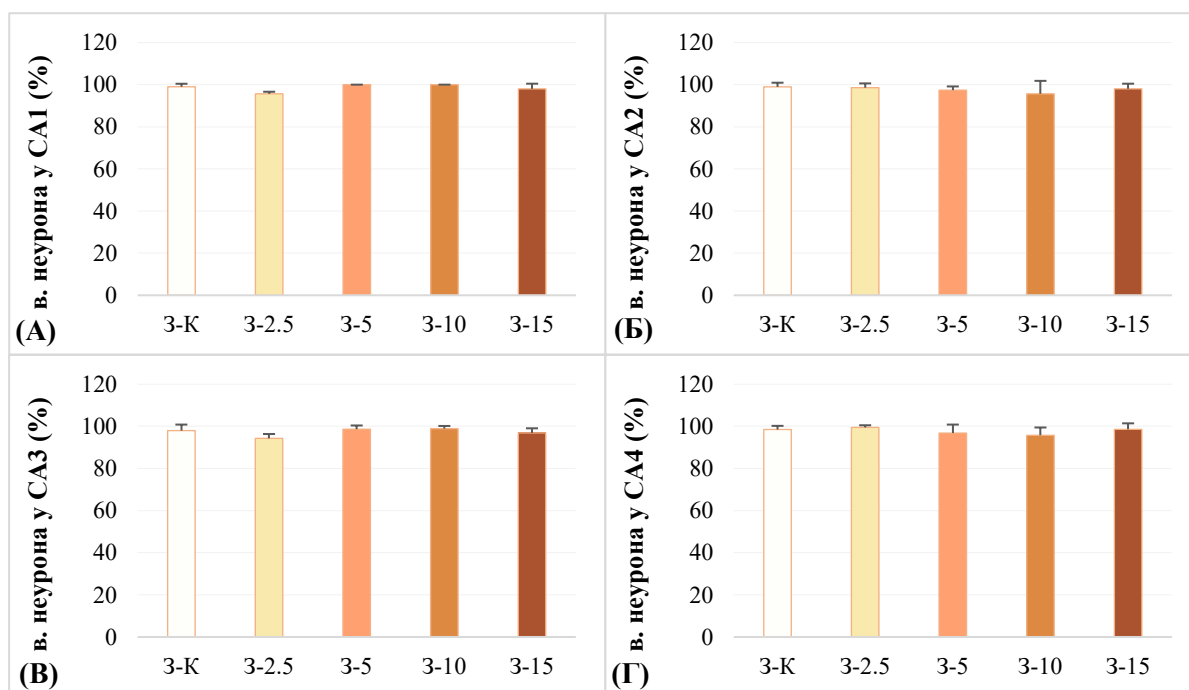
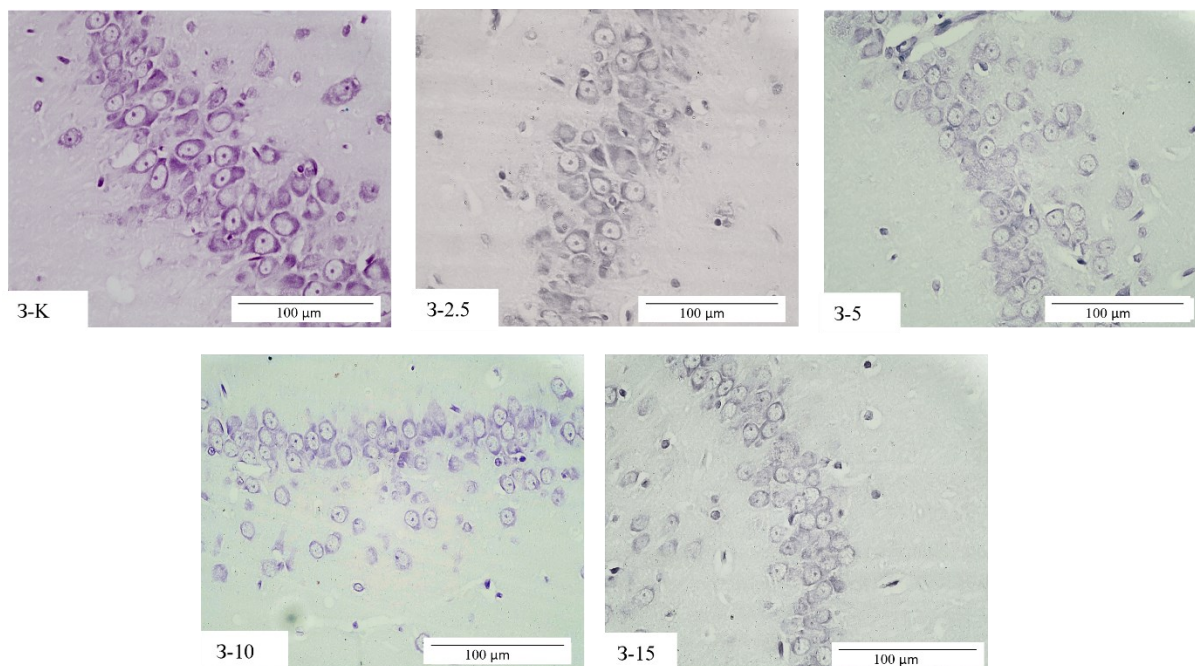
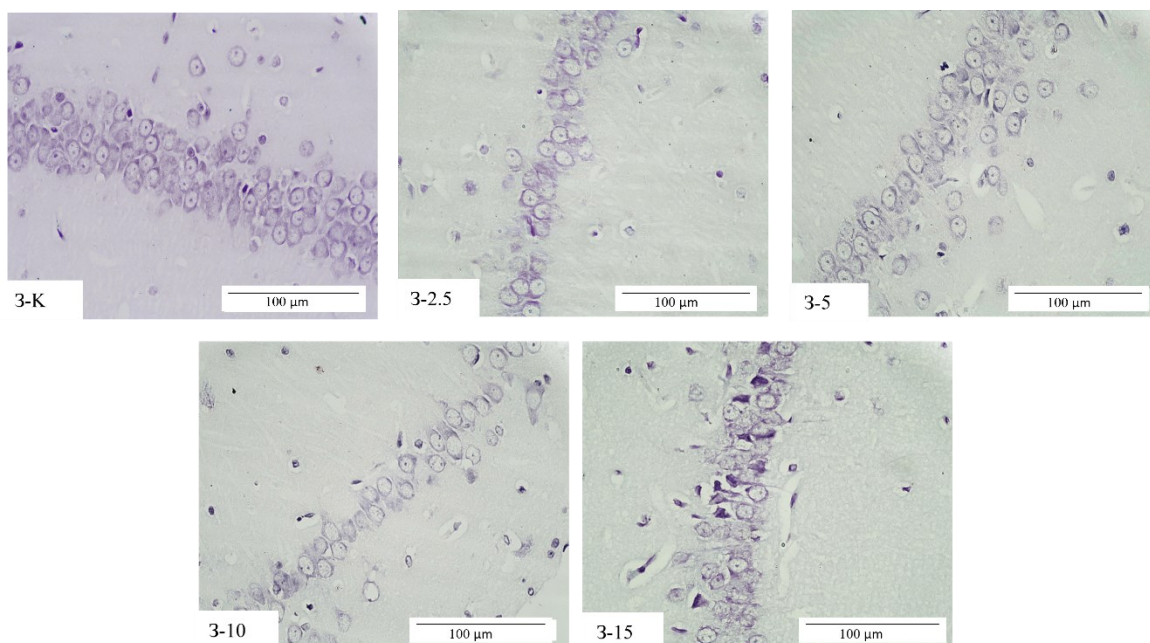


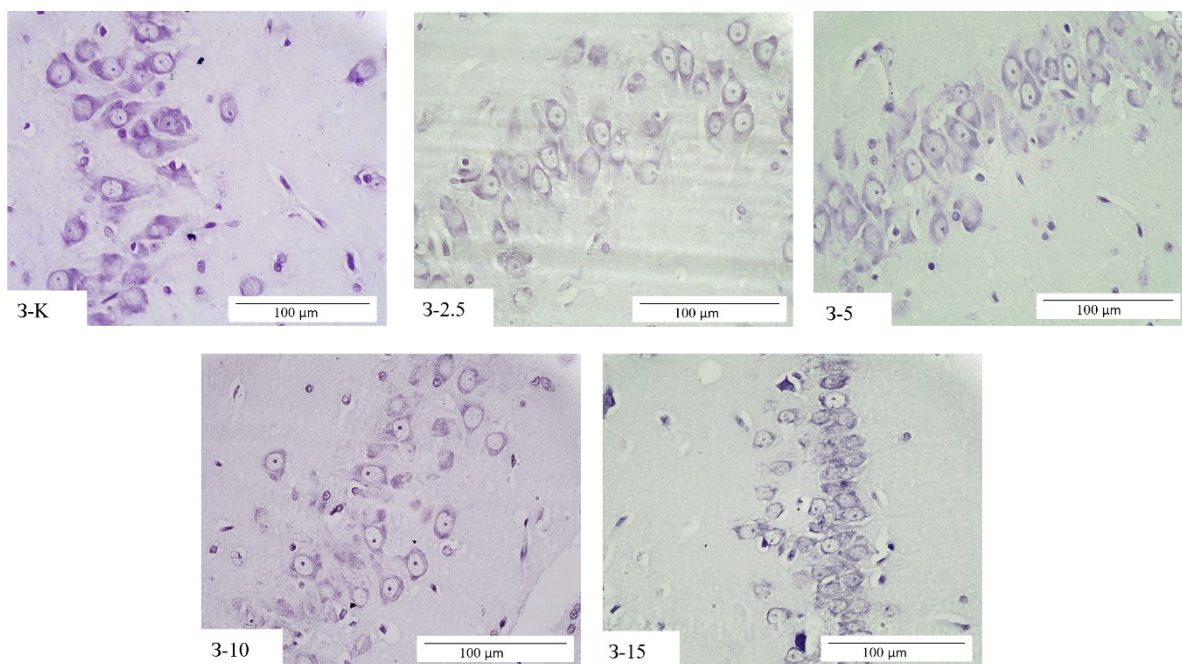
График 22. Хистопатолошка анализа хипокампуса група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности: удео вијабилних неурона у: (А) СА1; (Б) СА2; (В) СА3 и (Г) СА4 региону хипокампуса (%). 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



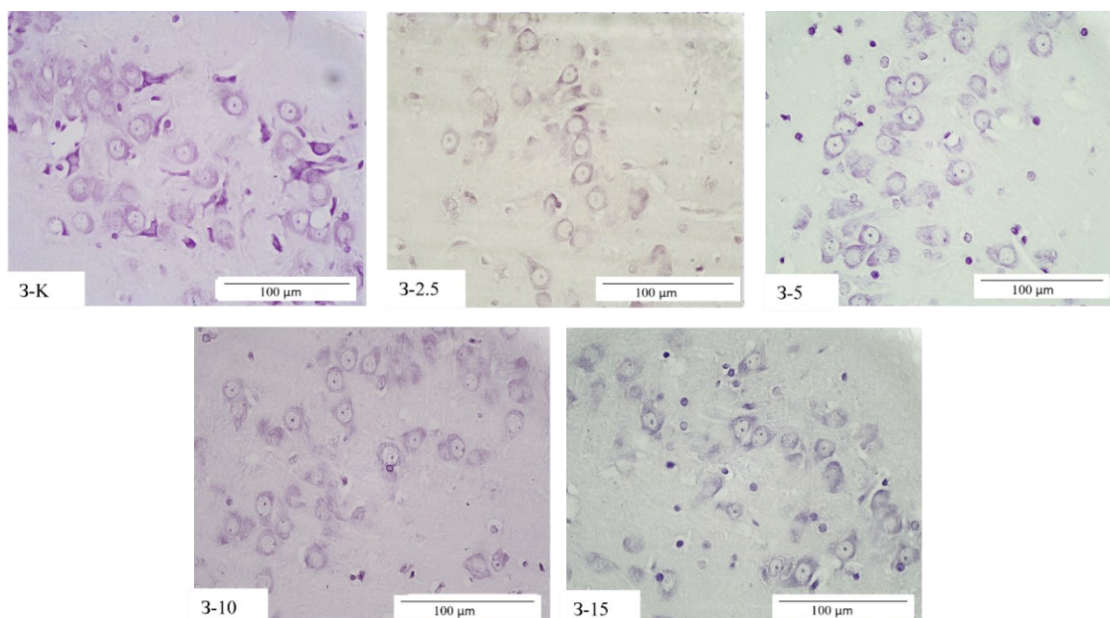
Слика 3.13. Пирамидалне ћелије СА1 региона хипокампуса група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или необојена цитоплазма), 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.14. Пирамидалне ћелије СА2 региона хипокампуса група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или необојена цитоплазма), 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.15. Пирамидалне ћелије СА3 региона хипокампуса група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или необојена цитоплазма), 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).



Слика 3.16. Пирамидалне ћелије СА4 региона хипокампуса група животиња из експеримента суб-хроничне токсичности, бојење по Нислу: дегенерисани неурони (тамно-плава цитоплазма); вијабилни неурони (светло-плава или необојена цитоплазма), 400x увећање: 3-К: контрола; 3-2.5: биљна мешавина-I (2,5 g/kg); 3-5: биљна мешавина-I (5 g/kg); 3-10: биљна мешавина-I (10 g/kg); 3-15: биљна мешавина-I (15 g/kg).

5. Дискусија

Дијабетес мелитус је метаболички поремећај високе преваленце, који се манифестује повишеним нивоом шећера у крви и бројним секундарним компликацијама, које доприносе већем степену морталитета међу оболелима од дијабетеса (Swift et al., 1967; Parvin et al., 2014). Постојећа терапија подразумева употребу инсулина и лекова са хипогликемијским деловањем, који ефикасно одржавају ниво глукозе у крви у физиолошки нормалним границама, али који у већем броју случајева не пружају задовољавајуће ефекте при спречавању настанка секундарних компликација и њиховом лечењу (Garvey et al., 1985; Brenner and Stevens, 2018). Због тога се све више пажње придаје изучавању ефеката лековитог биља и биљних мешавина у терапији дијабетеса и секундарних компликација како би се користиле као допуне постојећој стандардној терапији (Ali et al., 2006; Torabian et al., 2008; Fratianni et al., 2019). У саставу лековитог биља налази се велики број биоактивних једињења одговорних за постојање биолошких активности препарата лековитог биља, која своје ефекте испољавају кроз различите механизме деловања (Ali et al., 2006; Torabian et al., 2008). Међутим, и појединачно лековито биље има ограничено деловање, па све већи број студија проучава ефекте мешавина више лековитих биљака са различитим ефектима, јер се на тај начин допуњују позитивни и елиминишу негативни ефекти биолошки активних једињења (Madić et al., 2019; Petrović et al., 2021; Savych, 2021; Huang et al., 2022; Chen et al., 2023). Из тог разлога у овој дисертацији испитане су и упоређене биолошке активности *in vitro* три биљне мешавине са хипогликемијским, хепатопротективним и нефропротективним деловањем (Životić i Životić, 1979), чије активности нису потврђене досадашњим студијама. Утврђен је детаљан фитохемијски састав најефективније биљне мешавине (биљна мешавина-I) и тестирана њена примена у терапији примарних и секундарних компликација дијабетеса на анималном моделу, а ефекти упоређени са једном од стандардних терапија дијабетеса. Установљена је и потенцијална токсичност биљне мешавине-I *in vivo*.

5.1. *In vitro* анализа екстраката биљних мешавина

Познато је да концентрација полифенола у лековитим биљкама одређују ниво њихове биолошке активности (Ali et al, 2006; Torabian et al., 2008; Fratianni et al., 2019), па је у ту сврху прво анализиран садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима биљних мешавина и њихових појединачних биљних компоненти.

На основу фитохемијске анализе показано је да све три биљне мешавине садрже више укупних фенола и флавоноида од већег броја њихових појединачних компоненти, осим од *P. erecta* и *R. officinalis*, а из литературе је познато да ове две биљке садржи већу количину биолошки активних материја као што су кумарин, хесперидин, *p*-кумаринска киселина, рутин, карнозинска и розмаринска киселина, од осталих испитиваних биљака (Mashentseva et al., 2011; Tomovic et al., 2015; Wollinger et al., 2016; Penkov et al., 2018; Uysal et al., 2018; Mihaylova et al., 2019; Kachmar et al., 2019).

Антиоксидативни потенцијал биљних мешавина и њихових појединачних биљних компоненти потиче од количине биолошки активних једињења у њима (Torabian et al., 2008; Fratianni et al., 2019), па је очекивано да екстракти *P. erecta* и *R. officinalis*, као и све три анализирани биљне мешавине, имају доста висок антиоксидативни потенцијал јер садрже највећу концентрацију полифенола (График 1) (Mashentseva et al., 2011; Tomovic et al., 2015; Wollinger et al., 2016; Penkov et al., 2018; Uysal et al., 2018; Mihaylova et al., 2019; Kachmar et al., 2019). Екстракти *B. pendula*, *A. absinthium* и *C. erythrea* показали су се као добри антиоксидативни агенси, јер садрже извесну количину кверцетина, кининске киселине, кафеинске киселине и кумаринске киселине (Коуџи, 2017; Bhat et al., 2018; Millet et al., 2009; Mashentseva et al., 2011; Penkov et al., 2018; Mihaylova et al., 2019; Kachmar et al., 2019; Vouyahya et al, 2019), али не и бољи од *P. erecta* и *R. officinalis* и све три биљне мешавине. Екстракти *C. intybus* и *T. officinale* показују најслабији потенцијал везивања DPPH радикала, јер је и количина њихових биоактивних једињења мања у поређењу са осталим тестираним екстрактима (Liu et al., 2013; Gholami et al., 2018; Zeb et al., 2019; Jedrejek et al., 2019).

Поређењем активности биљних мешавина са њиховим појединачним биљним компонентама, показано је да биљна мешавина-I боље везује слободне радикале од две своје компоненте, *C. intybus* и *C. erythrea*, док је трећа компонента, *P. erecta*, била јачи антиоксиданс од биљне мешавине. На сличан начин, биљна мешавина-II није јачи антиоксиданс од њене компоненте *P. erecta*-е, али у поређењу са друге две компоненте

A. absinthium и *T. officinale*, има далеко већа антиоксидативна својства, као и биљна мешавина-III, која је бољи антиоксиданс од три своје појединачне компоненте и то *B. pendula*, *C. erythrea* и *T. officinale*, док је приближно добар антиоксиданс као њена четврта компонента *R. officinalis* (График 1). Разлог веће антиоксидативне активности биљних мешавина од већег броја појединачних компоненти је адитивно и синергистичко деловање фитохемијских једињења појединачног биља када се употреби у виду мешавине (Madić et al., 2019; Petrović et al., 2021; Savych, 2021; Huang et al., 2022; Chen et al., 2023).

Полифеноли из екстракта лековитог биља инхибирају активност дигестивних ензима као што је панкреасна α -амилазе (Ali et al, 2006; Demir et al., 2019; Ganesan & Xu, 2019; Kuar et al, 2021). Инхибицијом овог ензима могуће је спречити даље повећање нивоа серумске глукозе (Zhang et al, 2020) и стабилисати хипергликемију код особа оболелих од дијабетеса (Ali et al, 2006; Demir et al., 2019; Ganesan & Xu, 2019). Сходно томе тестиран је инхибиторни потенцијал екстракта биљних мешавина и лековитог биља и утврђено да сви екстракти у одређеној мери инхибирају активност овог ензима (Dalar and Konczak, 2014; Ilyna et al, 2014; Bouyahya et al, 2019; Usysal et al., 2019; Adefegha et al, 2016; Ahamad et al, 2020; Menyiy et al, 2021), а показана је и позитивна зависност дате активности и количином укупних фенола и флавоноида (Ilyna et al, 2014).

Поређењем биљних мешавина са појединачним лековитим биљем које чине њихов састав, биљна мешавина-I се показала као снажнији инхибитор α -амилазе од већег броја својих компоненти. Поседује далеко већу антиамилазну активност од *C. intybus* и *C. erythrea*, а приближно добро инхибира ензим као трећа компонента, *P. erecta* што је пропорционално количини њихових фенолних једињења (График 1 и 2). Слична ситуација је и са биљном мешавином-III, која је показала већи потенцијал ка инхибицији α -амилазе од *T. officinale* и *C. erythrea*, а приближно једнак као друге две компоненте, *R. officinalis* и *B. pendula* (График 2). Добијени резултати су у сагласности са претходним студијама, које показују да екстракти мешавина лековитих биљака имају снажнију биолошку активност од већег броја својих појединачних конституената (Madić, 2019; Savych, 2021; Huang et al., 2022; Chen et al., 2023).

Потенцијал инхибиције α -амилазе биљне мешавине-II је био мањи од потенцијала њених појединачних компоненти *T. officinale*, *A. absinthium* и *P. erecta*, за које је познато да поседују антиамилазну активност (Zengin et al, 2017; Li et al., 2021; Huang et al, 2021).

Разлог томе је чињеница да биоактивне компоненте појединчаног лековитог биља у биљној мешавини, поред синергистичких, подлежу и антагонистичким интеракцијама, што смањује њихову биолошку активност (Mennen et al., 2005; Colone et al., 2015). На основу међусобног поређења антиамилазне активности екстраката биљних мешавина, најснажније инхибиторно дејство испољио је екстракт биљне мешавине-I, док је екстракт биљне мешавине-II деловао најслабије (График 2).

Због високог нивоа полинезасићених масних киселина и улоге транспорта кисеоника, црвена крвна зрнца су прве мете реактивних кисеоникових радикала (ROS), што може покренути настанак других обољења услед исхемије органа (Rice-Evans et al., 1986; Yu et al., 2001; Yang et al., 2006). Како би се утврдило да ли екстракти биљних мешавина и појединачног лековитог биља штите мембрану еритроцита од оштећења, спроведен је тест антихемолитичке активности којим је показано да су све три биљне мешавине, као и већина њихових појединачних биљних компоненти, деловале протективно на мембране еритроцита, али у различитим концентрацијама (График 3).

Биљна мешавина-I има најснажније антихемолитичко дејство при најнижој коришћеној концентрацији од 25 µg/ml у поређењу са својим појединачним биљним компонентама у истој концентрацији (График 3). Ранијим студијама је показано да екстракти лековитог биља имају најснажнију цитопротективну активност управо при мањим концентрацијама, што потврђује добијене резултате (Zeiger, 2003; Madić et al., 2019). Биљна мешавина-II и биљна мешавина-III показале су сличне активности, јер су при концентрацији 75 µg/ml испољиле најснажније антихемолитичко дејство у поређењу са појединачним биљним компонентама (График 3) (Bhat et al., 2018). Снажнија антихемолитичка активност биљних мешавина потиче од синергистичког деловања више фитохемјских једињења у односу појединачног лековитог биља (Ranasinghe et al., 2012). Полифенолна једињења из биљних мешавина штите мембрану еритроцита од оксидативног оштећења, као и у случају хипергликемијског оксидативног стреса, па на тај начин делују превентивно на штетни утицај хроничне хипергликемије (Sharma and Sharma, 2001; Yu et al., 2001; Ebrahimzadeh et al., 2010).

Антиоксидативни и антихемолитички ефекат тестираних екстраката упоређен је и са ефектима стандардног антиоксиданса, ВНТ (Yehye et al., 2015), у односу на који се већина екстраката показала као бољи антиоксиданс. У поређењу са ВНТ, једино *T. officinale* и *C. intybus* нису показали већу антиоксидативну активност, док су остали

екстракти појединачних биљних компоненти и све три биљне мешавине јачи антиоксиданси, што је у складу са претходним студијама у којима је већина антиоксидативних фитохемијских састојака имала бољу антиоксидативну активност од поменутог стандарда (von Gadow et al., 1997; Sebranek et al., 2004). Такође су сви тестирани екстракти при највећој тестираној концентрацији, осим *P. erecta*, имали знатно већу антихемолитичку активност од ВНТ (Yehye et al., 2015).

Екстракти лековитог биља, поред лековитих својстава, поседују и одређени ниво токсичности када се употребе у већим концентрацијама. Ова појава је позната као „*Janus* ефекат“ и важи за било коју супстанцу или препарат који се примењује на живе системе (Zeiger, 2003). Због тога је процењен токсичан ефекат екстраката лековитог биља и биљних мешавина на црвене крвне ћелије тестирањем њихове хемолитичке активности. При највишој концентрацији (2500 µg/mL), *T. officinale*, *C. intybus*, *C. erythrea*, *A. absinthium*, *B. pendula*, биљна мешавина-III и биљна мешавина-I имале су неутралан, биљна мешавина-II и *R. officinalis* слабу, док је *P. erecta* показала висок ниво токсичности (График 4). Према претходним истраживањима једино је *P. erecta* показала изванредан ниво цитотоксичности (Radovanović et al., 2013), за разлику од осталих тестираних екстраката о чијим нивоима токсичности нема доступних података.

На основу добијених резултата закључује се да су испитиване биљне мешавине моћни антиоксиданси и ефикасни инхибитори дигестивних ензима, са том разликом што биљна мешавина-I има највећу антиоксидативну, антиамилазну и цитопротективну активност у односу на преостале две мешавине биљака, а притом веома слабу цитотоксичност (График 1, 2, 3 и 4).

Даљим анализама детаљније је испитан фитохемијски састав декокта биљне мешавине-I, ефекти биљне мешавине и деривата сулфонилурее на примарне и секундарне компликације, као и токсичност биљне мешавине *in vivo* условима.

5.2. HPLC анализа биљне мешавине-I

Методом течне хроматографије утврђен је детаљан фитохемијски састав декоката биљне мешавине-I, *C. erythrea*, *C. intybus* и *P. erecta* (Табела 2, 3, 4 и 5). Декокт биљне мешавине садржи велики број различитих полифенола укључујући фенолна једињења којих нема у декоктима појединачних биљака. У декокту биљне мешавине детектована је *p*-хидроксибензоева киселина и њени деривати, очитаних и у декокту *C. erythrea*,

кафеинска киселина, цикорична и хлорогена киселина којих има и у декокту *C. intybus*, као и велика концентрација деривата катехина и кверцетина, хиперозида, изокверцетина и рутина које садржи и декокт *P. erecta*. Присуство наведених једињења у надземном делу кичице, корену цикорије и ризому жуте стеже је описано у ранијој литератури (Liu et al., 2013; Tomović et al., 2015; Uysal et al., 2018; Gholami et al., 2018; Mihaylova et al., 2019; Kachmar et al., 2019; Bouyahya et al., 2019; Zeb et al., 2019) (Табела 2, 3, 4 и 5; График 5, 6, 7 и 8).

Квалитативном анализом HPLC записа потврђено је и присуство катехина, епикатехина и два непозната деривата кверцетина и кафеинске киселине, који нису детектовани у декоктима појединачних биљака (Табела 2, 3 и 4; График 5, 6 и 7). У декоктима *C. erythrea* и *C. intybus* присутне су тартарна, гална и кафтарна киселина и деривати кемпферола, кумарне, сиригинске и протокатехинске киселине који нису очитани у декокту биљне мешавине, јер се за прављење биљне мешавине користи мала количина суве материје *C. erythrea* и *C. intybus* па је и концентрација поменутих једињења незнатна и долази до преклапања пикова једињења са приближним ретенционим временом при читавању узорка (Životić i Životić, 1978; Liu et al., 2013; Ahmad, 2016; Gholami et al., 2018; Mihaylova et al., 2019; Kachmar et al., 2019; Bouyahya et al., 2019; Zeb et al., 2019).

5.3. *In vivo* ефекат на секундарне компликације дијабетеса

Ефекати биљне мешавине-I и сулфониурее на примарне и секундарне компликације дијабетеса испитани су на моделу пацова, код којих је дијабетес индукован алоксан монохидратом (Gupta et al., 2020). Алоксан монохидрат је токсично једињење које доводи до оштећења и одумирања β -ћелија панкреаса, због чега се јавља повећан ниво глукозе у крви (Rohilla and Ali, 2012). Крајњи производи гликозилације (AGEs) су након 14 дана довели до патолошких промена на јетри, бубрегу, костима, мозгу и ретини ока (Middha et al., 2012; Elangovan et al., 2019; Ganesan et al., 2020; Madić et al., 2021), што је доказано хистопатолошким анализом поменутих органа животиња дијабетичне контролне групе (График 11, 12, 13, 14 и 15). Пошто је алоксан монохидрат неспецифичне реактивности, у студију су укључене само животиње са стабилним дијабетесом, којима је ниво глукозе у крви 14 дана након ињектирања алоксана био већи од 20 mmol/l (Madić et al., 2021).

Код животиња дијабетичне контролне групе ниво глукозе у крви је на крају експеримента био значајно повишен ($p > 0,001$), док је индекс телесне масе животиња био смањен ($p > 0,001$) у поређењу са здравом контролном групом (Табела 6; График 9), што доказује да је дијабетес остао стабилан до краја експеримента (Kim and Ha, 2013). Третман биљном мешавином је при свим концентрацијама значајно смањео ниво глукозе у крви, док је при највишој концентрацији (15 g/kg) потпуно редуковао хипергликемију за разлику од инсулина и деривата сулфонилуреа (глимепирида) који су показали слабији ефекат ($p > 0,001$) (Табела 6). Добијене резултате потврђују претходне студије у којима је показано да хидроксibenзоева киселина, катехин, кверцетин, изокверцетин, хиперозид, кафена киселина и рутин, који су у декокту биљне мешавине детектовани у великој концентрацији (Табела 2), снижавају ниво шећера у крви код пацова са индукованим дијабетесом (Peungvich et al., 1998; Jayachandran et al., 2000; Pitchai and Minkkam, 2011; Jadhav and Puchchakayala, 2012; Lee et al., 2020; Oršolić et al., 2021). Слабији ефекат глимепирида на третман дијабетеса потврђује више студија у којима је показано да деривати сулфонилуреа слабије делују на снижавање нивоа шећера у крви од полифенола из биљака (Ahmad et al., 2012; Mechchate et al., 2021).

Индекс телесне масе животиња дијабетичне контролне групе је значајно смањен у поређењу са не-дијабетичном контролном групом и третираним групама ($p > 0,001$) (График 9). До губљења телесне масе долази због повишеног нивоа непотрошене глукозе у крви што покреће процес глуконеогенезе од других извора енергије, попут липидних молекула из белог масног ткива (Kim and Ha, 2013; Yan et al., 2016; Madić et al., 2021). Поремећај метаболизма липида се јавља због недовољног лучења инсулина или резистентности адипоцита на инсулин (Regan et al., 1974; Taskinen, 2002; Betteridge, 2004; Savage et al., 2007). Недостатак инсулина подстиче хидролизу триглицерида на слободне масне киселине и глицерол, који се потом из адипоцита ослобађају у системску циркулацију и у јетри конвертују у фосфолипиде и холестерол (Scherer, 2016). Прогресивно губљење телесне масе је услед третмана и биљном мешавином и стандардном терапијом смањено (График 9), јер су третмани редуковали хипергликемију регенерисањем β -ћелија панкреаса и нивоа инсулина, који директно регулише метаболизам липида у адипоцитима (Regan et al., 1974; Scherer, 2016; Seo et al., 2019).

Због поремећаја метаболизам липида у адипоцитима долази до нагомилавања липида у крвним судовима, па је код животиња дијабетичне контролне групе ниво триглицерида, укупног холестерола, LDL-а и VLDL-а био повишен, а ниво HDL-а

смањен ($p > 0,001$) (Табела 7). Поменути молекули се таложе уз зидове већих крвних судова и временом доводе до њиховог зачепљења (Ruan et al., 2002; Taskinen, 2002; Betteridge, 2004; Ito et al., 2019). Полифенолна једињења у биљној мешавини, попут хидроксibenзоеве киселине, кверцетина, хиперозида, кафинске киселине и рутина, су потпуно регулисали ниво поменутих параметара липидног статуса код Д-5, Д-10 и Д-15 група животиња (Табела 2 и 7; График 5). Ова фенолна једињења смањују ниво холестерола и триглицерида у крви много ефикасније од деривата сулфонилурее, који је и у овом случају показао слабији ефекат од биљне мешавине (Peungvich et al., 1998; Celik et al., 2009; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2018; Ganesan et al., 2020; Oršolić et al., 2021; Schaalán et al., 2008; Aldayel et al., 2020).

Висок ниво оксидативног стреса довео је до оштећења јетре (Lucchesi et al., 2013), што потврђује повишен ниво трансминаза, алкалне фосфатазе и малондиалдехида у крви дијабетичних животиња и патолошким променама на ткиву јетре (Табела 8; График 11) што је у складу са већим бројем досадашњих студија (Crawford et al., 1999; Reid et al., 2006; Romagnoli et al., 2010; Regnell et al., 2012).

Изокверцетин, хиперозид и кафeинска киселина присутни у декокту биљне мешавине (Табела 2; График 5) смањили су ниво трансминаза, MDA и алкалне фосфатазе у крви, док при концентрацији биљне мешавина од 15 г/кг потпуно регулишу ниво (Табела 8) и на тај начин подстакнули регенерацију јетре (Jayachandran et al., 2000; Zhang et al., 2018; Oršolić et al., 2021). Третман инсулином и глимепиридом је снизио вредности поменутих параметара, али је ефекат на регенерацију ткива био слабији од биљне мешавине (Табела 8), што је у складу са претходним стидијама у којима су биљни препарати показали снажније хепатопротективне ефекте од стандардних лекова (Schaalan et al., 2009; Aldayel et al., 2020).

Хистопатолошком анализом потврђено је да је алоксан монохидрат довео до знатног оштећење ткива јетре дијабетичних животиња (График 11; Слика 2.2). Код животиња Д-К групе примећено је смањење броја укупних и бинуклеусних хепатоцита уз промену волумена цитоплазме у ћелијама, што указује на смањени регенеративни капацитет јетре (Ozbek et al., 2016; Madić et al., 2021). Велика количина колагена присутног око крвних судова упућује на развој фиброзе јетре услед пропадања функционалног ткива (Liu et al., 2010; Popescu et al., 2012; Ozbek et al., 2016; Wilkinson et al., 2019; Madić et al., 2021).

Код дијабетичне контролне групе примећен је и повећан број Купферових ћелија у поређењу са здравим животињама (График 11; Слика 2.1) што значи да је дошло до имунског одговора ткива на стрес (Karsdal et al., 2019; Madić et al., 2021). Услед оксидативног стреса регрутује се већи број Купферових ћелија које продукују слободне радикале попут супероксидног ањона, јона водоник пероксида и хидроксилног јона (Ahmed et al., 2004; Han et al., 2006). Слободни радикали се везују за мембране здравих хепатоцита и покрећу њихову апоптозу, због чега долази до губљења великог броја функционалних хепатоцита (Wei et al., 2010; Al-Hussaini et al., 2012).

Третманима биљном мешавином значајно је редуковано оштећење јетре, јер је број и волумен хепатоцита повећан у односу на Д-К групу (График 11). Поред тога, дошло је и до регенерација јетре јер је ниво колагена у ткиву смањен и повећан број бинуклеусних хепатоцита (Ozbek et al., 2016; Madić et al., 2021). Овакви резултати су очекивани због присуства кафеинске киселине и епикатехина у декокту биљне мешавине који подстичу регенерацију јетре и добро познате хепатопротективне активности кичице и водопије (Quine and Raghu, 2005; Celik et al., 2009; Zlatković et al., Đorđević et al., 2022). Инсулин и глимепирид су редуковали оштећење, али нису потпуно регенерисали ткиво (График 11; Слика 2.2) (Aldayel et al., 2020).

Индукован дијабетес је код животиња довео до поремећаја метаболизма шећера у јетри (Greenberg et al., 2006), на шта указује смањен депо гликогена у хепатоцитима дијабетичне контролне групе (График 11; Слика 2.3). Разлог смањеном депоу гликогена је тај што инсулин омогућује депоновање неискоришћене глукозе у јетру у виду гликогена (Hall, 2016). Будући да је код дијабетичне контролне групе смањена или, чак, потпуно спречена синтеза инсулина, онемогућено је депоновање серумске глукозе у хепатоцитима, а самим тим и синтеза гликогена (Leclercq et al., 2007; Stefan et al., 2014). Пошто се организам понаша као у стању гладовања, покреће се гликогенолиза и глуконеогенеза у ћелијама јетре, односно, гликоген се разлаже на појединачне молекуле глукозе, како би се искористили као извор енергије (Leclercq et al., 2007; Stefan et al., 2014; Iroz et al., 2015).

Третман биљном мешавином повећао је ниво депонованог гликогена због присуства хидроксибензојеве киселине у декокту (График 11; Слика 2.3). Хидроксибензојева киселина је регулисала ниво гликогена у јетри на тај начин што је подстакла обнављање β -ћелија и лучење инсулина (Peungvicha et al., 1998). Глимепирид

је показао једнаке ефекте као биљна мешавина, али другачијим механизмом (График 11; Слика 2.3). Деловао је директно на експресију GLUT4 протеина у ћелијама јетре и тиме омогућио транспорт глукозе без учешћа инсулина (Mori et al., 2008).

Дијабетесна нефропатија је честа секундарна компликација прогресије дијабетеса типа 1 и 2 код које долази до оштећења епитела бубрежних каналића и гломерулуса или, чак, потпуног престанка рада бубрега, што је један од главних разлога повећане смртности оболелих (Helen et al., 1994; Evans et al., 2002; Kataya et al., 2010). Крајњи производи гликозилације оштећују епител бубрежних каналића, због чега се повећава пропустљивост мембране епителних ћелија за поједине јоне и воду, па долази до поремећаја осморегулације и регулације јонског састава организма (Helen et al., 1994; Kataya et al., 2010).

Индукован дијабетес је довео до оштећења бубрега, што се запажа на основу повишеног нивоа креатинина и урее у крви дијабетичне контролне групе (Табела 8), као једних од показатеља дисфункције бубрега (Chang et al., 2005; Oktem et al., 2005; Gowda et al., 2010). Повећан ниво MDA у серуму дијабетичних животиња указује на повећање процеса оксидације липида у организму, док висок ниво MDA у хомогенату бубрега ($p < 0.001$) (График 10) настаје као последица повећане разградње липида мембране епителних ћелија бубрега (Oktem et al., 2005; Gowda et al., 2010). Смањена величине гломерулуса и присуство гломерулосклерозе услед повећаног осмотског притиска у крвним судовима, указују на оштећење бубрежног ткива и поремећај бубрежне филтрације (График 12; Слика 2.4 и 2.6). Гломерулосклероза настаје због оштећења и пуцања капилара и изливања крвне плазме у Боманов простор, што се може приметити по већој површини ПАС позитивних места код дијабетичне контролне групе у односу на здраву контролну групу и третиране групе (Слика 2.6; График 12). Оштећен епител гломерулуса омогућује пролаз протеина из серума у филтрат мокраће између ћелија, због чега се јавља протеинурија (Alsaad and Herzenberg, 2007; Tarvaert et al., 2010; Baues et al., 2019; Bouteldija et al., 2021).

Смањена површина епитела проксималних тубула и веће присуство колагених влакана указују на оштећење епитела бубрежних каналића, што доводи до поремећаја ресорпције воде и минерала (Helen et al., 1994; Kataya et al., 2010). Ниво креатинина и урее у серуму је такође промењен, тако да је праћење њиховог нивоа још један од параметара који се користе за одредјивање функционалног стања бубрега (Kataya et al.,

2010). Код дијабетичне контролне групе је примећен повишен ниво креатинина и урее у серуму (Табела 8), што указује на немогућност бубрега да их елиминише из организма (Hall, 2016). Третман биљном мешавином (10 и 15 g/kg) смањило је ниво серумског креатинина и урее и ниво MDA у хомогенату бубрега и редуковао оштећење ткива (График 10 и 12) због присуства великог садржаја полифенола са нефропротективним ефектима, као што је хиперозид, који не само да регулише ниво урее и креатинина у крви, већ и инхибира синтезу колагена делујући превентивно на настанак фиброзе (Ramamurthy et al., 1972; Zhang et al., 2016). Нека истраживања су показала да кафена киселина, изокверцетин и рутин смањују ниво MDA и регенеришу оштећено ткиво код мишева са индукованим дијабетесом (Jayachandran et al., 2000; Ganesan et al., 2020; Oršolić et al., 2021). Епикатехин због присуства бензоевог прстена и ароматичних група поседује велики афинитет ка везивању хидроксилних радикала насталих оксидацијом липида у мембрани те на тај начин смањује даље оштећење епитела (Quine and Raghu, 2005; Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2021). Смањен ниво шећера у крви редуковао је концентрацију филтрираног шећера у бубрезима код група третираних биљном мешавином што се запажа по смањеној површини места позитивних на ПАС бојење (График 12; Слика 2.6).

Третмани инсулином и глимепиридом побољшали су стање бубрежног ткива, али нису довели до његове потпуне регенерације, што је доказано претходним студијама (Petrica et al., 2009).

Остеопенија и остеопороза су још једна од секундарних компликација дијабетес мелитуса, које утичу на квалитет живота особа оболелих од дијабетеса тако што повећава ризик од фрактура костију пре свега бутне коси, јер она трпи највећи ниво оптерећења током стајања и ходања (Verhaeghe et al., 1989; Vestergaard et al., 2009). Код старијих особа са дијабетесом долази до повећане ресорпције коштаног ткива и смањења густине костију (Lebovitz, 2001). Због знатног губитка коштане масе се код оболелих јавља бол у леђима, повијено држање, смањене телесне висине и чести преломи костију (Inzerillo et al., 2004; Duarte et al., 2015).

Механизам појаве фрагилних костију као секундарне компликације дијабетеса, није потпуно разјашњен, али се зна да код дијабетеса типа 2 у каснијим фазама болести долази до накупљања крајњих продуката гликозилације (AGE) у коштаном ткиву, који доводе до одумирања остеогених ћелија и редукције коштаног матрикса (Bucala and

Vlassara, 1995; Prouillet et al., 2004; Ђорђевић et al., 2015). Студије појединих аутора су показале да крајњи продукти гликозилације супримирају ћелијску линију остеобласта, подстичу апоптозу остеобласта и смањују минерализацију костију (Abbassy et al., 2007; Alikhani et al., 2007; Sanguineti et al., 2008; Okazaki et al., 2012; Ђорђевић et al., 2015; Vestergaard et al., 2009).

Хистопатолошком анализом фемура (График 13; Слика 2.7, 2.8, 2.9 и 2.11) утврђено је да је оксидативни стрес довео до смањења количине коштаног матрикса услед разградње колагена и одумирања ћелија коштаног ткива (Behera et al., 1981; Spanheimer et al., 1988). Редукован број и смањена површина коштаних гредица сунђерасте кости у епифизама код животиња дијабетичне контролне групе (График 13; Слика 2.7 и 2.9) је први знак развоја остеопеније и остеопорозе, настале као последица нерегулисаног дијабетеса (Napson et al., 1998; Lopez-Ibarra et al., 2001; Mastrandrea et al., 2008). Поред тога, примећено је значајно смањење површине лакуна остеоцита у епифизама и кортикалном делу костију, што указује на даљи развој остеопорозе (График 13; Слика 2.8). Значајно смањење површине кортикалног дела кости и нивоа колагена услед ресорпције коштаног матрикса (График 13; Слика 2.7 и 2.10), потврђује прогресивно губљење коштане масе као последице употребе агенаса за индукцију дијабетеса (Yokoyama et al., 2009).

Измењена функција остеоцита је један од важних фактора смањења густине костију због њихове кључне улоге у ремоделацији костију (Leite Durte et al., 1996). Многе досадашње студије су показале да оксидативни стрес индукован алоксаном покреће апоптозу остеоцита и инхибира диференцијацију остеобласта у остеоците, због чега се јавља смањен број остеоцита по површини коштаног ткива (Leite Durte et al., 1996; Mody et al., 2001; Bai et al., 2004; El-Tantawy et al., 2014; Ђорђевић et al., 2015).

Коштано ткиво је услед третмана биљном мешавином (15 g/kg) потпуно регенерисано до нивоа здравих животиња (Табела 2; График 5), што се запажа по повећању површине и густине трабекула у епифизама, површине лакуна остеоцита кортикалног дела костију, као и нивоа колагена и површине коштаног ткива у дијафизи, због присуства полифенола са познатом остеопротективном активношћу (Shirke et al., 2009; Oka et al., 2011; Hasan et al., 2014; Domazetovic et al., 2019). Хидроксibenзоева киселина, као најзаступљенији полифенол у декокту биљне мешавине, показује ефекте сличне естрогену јер повећава пролиферацију ћелија MCF-7 путем активације ERK, АКТ

(серин/треонин киназа или протеин киназа Б), PI3K (енгл. *phosphoinositide 3-kinase* - фосфоинозитид 3-киназа) и ER α (естрогенски рецептор α) (Nguyen et al., 2022). На моделу мишева показано је да се губитак коштане масе може смањити супресијом RANKL (енгл. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* – лиганд рецепторског активатора за нуклеарни фактор каппа Б) који представља сигнал за активацију остеокласта, ћелија које ресорбују коштану ткиво (Hsiao et al., 2017). Изокверцетин, присутан у декокту биљне мешавине, подстиче експресију VEGF-а и β -катенина укључених у процес обнављања коштаног матрикса (Fayed et al., 2019; Jayachandra et al., 2019; Fayed, et al., 2019).

Фитохемијском анализом декокта биљне мешавине потврђена је велика заступљеност рутина, катехина и његових деривата, који испољавају повољне ефекте на регенерацију коштаног ткива. Huang и сарадници (2020) су показали да катехин подстиче остеобластогенезу стимулацијом процеса апоптозе остеокласта, чиме се успорава процес ресорпције костију, док у исто време подстиче диференцијацију остеоених мезенхимских матичних ћелија и преживљавање остеобласта код анималног модела (Chen et al., 2003; Lin et al., 2009; Chen et al., 2019). Рутин, пак, подстиче регенерацију костију на тај начин што инхибира активност остеокласта и инхибира апоптозу остеобласта (Horsajada-Molteni et al., 2000; Kyung et al., 2008; Wang et al., 2017).

Многе студије показују да кверцетин својом антиоксидативном активношћу редукује ресорпцију костију у условима *in vitro* (Yokayama et al., 2009; Derakhshanian et al., 2013). Орална примена кверцетина смањује губитак коштаног ткива код пацова са индукованим дијабетесом (Alonso-Magdalena et al., 2011; Liang et al., 2011; Abu Ayana et al., 2018) тако што смањује процес ресорпције коштаног матрикса делујући инхибиторно на активност остеокласта (Prouillet et al., 2004; Kanter et al., 2007; Varhoma et al., 2019). Познато је да хиперозид и кафеинска киселина, којих у биљној мешавини има у мањој концентрацији, штите остеобласте од утицаја крајњих продуката гликозилације (Tolba et al., 2017; Chen et al., 2018; Qi et al., 2020).

Површина лакуна остеоцита у епифизама се благо повећала услед третмана биљном мешавином, али не до нивоа здравих животиња због недовршеног процеса регенерације, будући да су епифизе секундарни осификациони центри, где се процесом диференцијације формирају нови остеоцити (Villarino et al., 2006). У прилог томе је на хистолошким препаратима епифиза фемура запажено повећање површине

новоформиране кости код третираних група животиња у односу на дијабетичну контролну групу (Слика 2.9). Инсулин и глимепирид су показали веома слаб ефекат на регенерацију коштаног ткива јер су свој ефекат испољили само на спречавање одумирања остеогених ћелија, али не и на синтезу коштаног матрикса (Zhang et al., 2020; Yang et al., 2021).

Ретинопатија је прогресивна вазопрولیферативна болест ока коју прати појава микроанеуризми, хеморагија и све већих оштећења капилара ретине (Engerman, 1989). Оштећени капилари се замењују новим, па је као пратећи проблем примећена убрзана неоваскуларизација. Новоформирани ситни капилари су склонији хеморагијама, што доводи до постепеног губитка вида (Copstead and Banasik, 2013).

Један од механизма генезе дијабетесне ретинопатије је поремећај метаболизма глукозе и повећана експерсија васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) и фактора раста IGF-1 (Gabby et al., 1973; Lee et al., 1996; Chibber et al., 2007). Крајњи продуци гликозилације индукују микроанеуризме на зидовима капилара ока (Copstead and Banasik, 2013) што подстиче експресију фактора раста како би се епител обновио. Повећан ниво VEGF-а у ткиву ретине делује и као хемотаксни агенс за ћелије имунског система, чија инфилтрација покреће процес инфламације која доводи до нових микрооштећења на зидовима капилара (Koya and King, 1998). На тај начин крв долази до ретине и подстиче одумирање рецептора, услед чега се јавља делимични или потпуни губитак вида (Tarr et al., 2013).

Још један фактор развоја ретинопатије код особа са дијабетесом је нерегулисан повишен крвни притисак (Wilkinson-Berka, 2006). На ретини постоје рецептори за ангиотензин-II који реагују на промену крвног притиска (Funatsu et al., 2002), а доказано је да је број тих рецептора код особа са дијабетесом већи него код здравих особа (Ebrahimian et al., 2005). На ћелијама ретине доказано је присуство GLUT4 носача који се експримирају као одговор на везивање инсулина, па нерегулисана инсулинемија и хипергликемија могу довести до прогресивног губитка вида и, чак, потпуног слепила (Reiter and Gardner, 2003). На тај начин је индуковани дијабетес довео до промена на ретини у виду губитка ћелија укључених у трансмисију светлосног сигнала и акционог потенцијала (График 14; Слика 2.12). Ширина слојева ретине који садрже фоторецепторе и њихове сегменте, као и ганглијске и биполарне ћелије, је код дијабетичне контролне групе значајно смањена, што указује на оштећење и одумирање ганглијских и

биполарних ћелија у ганглијском слоју и унутрашњем нуклеарном слоју, као и тела и сегмената фоторецептора у спољашњем нуклеарном слоју (График 14; слика 2.12).

Третман биљном мешавином је већ при концентрацији 5 g/kg спречио пропадање ганглијских ћелија, док је на биполарне ћелије и фоторецепторе имао слабији ефекат и при највишој концентрацији (График 14). Повољни ефекти биљне мешавине испољавају се због присуства епикатехина, хиперозида и кафеинске киселине (Табела 2) за које је већ познато да спречавају апоптозу и оштећење ћелија ретине у нуклеарном и ганглијском слоју на тај начин што супримирају синтезу проапоптотских, а подстичу активност антиапоптотских протеина (Kim et al., 2014; Wu et al., 2014; Fathalipour et al., 2019). Присутна фенолна једињења попут катехина, кверцетина и поменуте кафеинске киселине, спречавају неоваскуларизацију ткива ока и тако онемогућују даље оштећење ретине (Kim et al., 2009; Chen et al., 2017; Wang et al., 2018; Chai et al., 2021; Li et al., 2021).

Глимепирид није поправио стање ретине (График 14), што је у сагласности са другим студијама, које показују да деривати сулфонилуреа немају повољан ефекат у терапији дијабетесне ретинопатије (Oraebosi et al., 2019).

Алцхајмерова болест је прогресивно неуродегенеративно обољење које се развија код старијих особа, а одликује се слабљењем можданих функција, насталих услед накупљања плака β -амиоида и филаментозних инклузија „Тау“ протеина и пропадања можданих неурона у региону хипокампуса, центра задуженог за формирање дугорочне меморије (Davis, 1964; Pascoe and Redd, 1989; Reed, 1990; Ott et al., 1999; Broadbent et al., 2004; Eichenbaum 2004; Biessels and Gispen, 2005; Li et al., 2007; Bree et al., 2009; Beauquis et al., 2010; Hori et al., 2010).

Алцхајмерова болест се код оболелих од дијабетеса јавља као последица инсулинске резистенције нервних ћелија и деловања крајњих продуката гликозилације (Magarinos and Mc Even, 2000; Kamal et al., 2003; Arvanitakis et al., 2004; Biessels and Gispen, 2005; Tomlinson and Gardiner, 2008; Jung et al. 2010; Rasgon et al., 2011; Inzucchi et al., 2015; Li et al., 2017; Zhang et al., 2022). На ћелијској мембрани нервних ћелија, астроцита, микроглија и епителних ћелија крвних судова присутни су специфични рецептори за које се везују крајњи продукте гликозилације, такозвани RAGE (енгл. *Receptor for advanced glycation end products* – рецептор за крајње продукте гликозилације) (Derk et al., 2018). Везивање AGE за рецепторе подстиче егзоцитозу β

амилоида у екстрацелуларни матрикис (ЕЦМ), који се накупљају у ЕЦМ-у и формирају β -амилоидне плаке. Плаке β -амилоида инхибирају инсулинске рецепторе на ћелијама у мозгу, па на тај начин постају резистентне на инсулин (Cai et al., 2015).

Таложена β -амилоида доводи до инфламаторне реакције зидова капилара који чине крвно-моздану баријеру, због чега је поремећен транспорт материја до нервних ћелија (Chandran et al., 2020). Недостатак нутријената доводи до низа промена у телу неурона, означених као хроматолиза ћелије, која подразумева увећање Нислове супстанце и покретање процеса програмиране ћелијске смрти, на основу чега је одређен број вијабилних и дегенерисаних неурона у регионима хипокампуса (Smith et al., 1996; Nunomura et al., 2001; Dimakopoulos et al., 2005; Hall, 2016; Liu et al., 2007).

Код дијабетичне контролне групе животиња број живих и функционалних пирамидалних ћелија у регионима СА1, СА2, СА3 и СА4 хипокампуса значајно је смањен у поређењу са НД-К групом животиња (График 15; Слика 2.13), што указује на постојање предуслова за развој Алцхајмерове болести (Sheih et al., 2020).

Код свих третираних група запажено је повећање броја вијабилних неурона у свим регионима хипокампуса, што указује на неуропротективно дејство биљне мешавине и стандардне терапије (График 15; Слика 2.13, 2.14, 2.15 и 2.16). Број вијабилних неурона у сва четири ЦА региона код групе Д-15 приближно је једнак недијабетичној контролној групи (График 15; Слика 2.13, 2.14, 2.15 и 2.16), што значи да је редуковањем нивоа глукозе у крви могуће смањити губитак неурона у поменутиим регионима (Inzucchi et al., 2015; Li et al., 2017; Zhang et al., 2022).

Бројне студије показују да полифеноли из биљних препарата смањују губитак неурона и делују превентивно на појаву деменције и Алцхајмерове болести (Ahmed, 2009). Кверцетин, као један од најзаступљенијих полифенола у биљној мешавини, спречава апоптозу нервних ћелија на тај начин што онемогућује формирање плака β -амилоида и инхибира активност микроглија и астроцита у хипокампусу (Vargas-Restrepo et al., 2018). Неке студије показују да се применом епикатехина, кафеинске киселине и рутина смањује ниво AGE-а у кортикалном делу мозгу, чиме је спречено даље накупљање „Тау“ протеина и β -амилоида у нервним ћелијама и у ванћелијском матриксу (Cuevas et al., 2009; Javed et al., 2012; Huang et al., 2013; Parashar et al., 2017; Fu et al., 2017; Morroni et al., 2018; Koga et al., 2019; Anjomshoa et al., 2020).

Поред тога што делују директно на редуковање оксидативног стреса, полифеноли побољшавају учење и памћење регулацијом сигналних путева у нервним ћелијама, као што је подстицање активности АМРА глутаматног рецептора (α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионска киселина), који представља главни ексцитаторни сигнални пут у кори великог мозга и хипокампусу (Nichols et al, 2015; Chen et al., 2017). Доказано је да полифенол хиперозид, кога садржи декокт биљне мешавине, подстиче експресију неуротрофног можданог фактора (BDNF) у хипокампусу (Nichols et al, 2015; Chen et al., 2017; Yi et al., 2022; Gong et al., 2017). Неуротрофни мождани фактора (BDNF) припада породици фактора раста и игра кључну улогу у ембрионалном развоју мозга и периферних нерава, а његова смањена секреција доводи до настанка бројних психосоматских и неуродегенеративних поремећаја, укључујући и Алцхајмерову болест (Canals et l., 2004; Dwivedi et al., 2009; Grande et al., 2010; Chen et al., 2017; Palasz et al., 2020; Yi et al., 2022;). BDNF се синтетише у глија ћелијама, а везује за киназни рецептор тропомиозина Б (TrkB) на мембрани нервних ћелија и на тај начин регулише ослобађање глутамата. Активација TrkB/PI3K сигналног пута подстиче дефосфорилацију „Тау“ протеина, чиме је онемогућена његова полимеризација у филаментозни „Тау“ протеин, који је присутан у нервним ћелијама код Алцхајмерове болести (Li et al., 2007; Zhang et al., 2020). Смањена експресија BDNF инхибира синаптичку трансмисију и подстиче акумулацију плака β -амилоида и форсфорилацију „Тау“ протеина (Nichols et al, 2015; Gong et al., 2017; Gao et al., 2022), па је подстицање његове секреције један од погодних терапијских приступа у превенцији развоја Алцхајмерове болести код особа са дијабетесом.

Изокверцетин и рутин, присутни у декокту биљне мешавине, показују неуропротективне ефекте на тај начин што смањују инфламацију путем инхибиције ослобађања фактора тумор некрозе- α и интерлеукина-6 укључених у процес инфламације ткива (Wang et al., 2013; Song et al., 2014; Wang et al., 2016; Chen et al., 2017; Dai et al., 2018; Nkraa et al., 2019; Çelik et al., 2020).

Глимепирид је потпуно спречио одумирање неурона у СА1 региону, док је у осталим регионима имао знатно слабији ефекат (График 15; Слика 2.13). Инсулин је сличну активност показао у СА2 региону у односу на остале регионе хипокампуса (График 15; Слика 2.14). Оно што је познато из ранијих студија је да глимепирид редукује оштећење синапси спречавањем акумулирања β -алмилоида (Osborne et al., 2016) и на тај

начин смањује ризик од настанка деменције код особа са дијабетесом за 35% (Hsu et al., 2011).

5.4. *In vivo* токсичност и метаболички ефекти биљне мешавине-I

Декокт биљне мешавине ни у једној од испитиваних концентрација није показао знакове токсичности код здравих животиња при свакодневном третману током 28 дана. Ниво глукозе у крви и телесна маса животиња се нису мењали током експеримента ван опсега нормалних вредности, а ниво параметара липидног статуса, трансминаза, урее и креатинина (Табела 9 и 10; График 16) је на крају експеримента измерен у опсегу нормалних вредности, што указује на нормалну функцију јетре и бубрега, као и на то да се компоненте декокта биљне мешавине метаболишу без изазивања оштећења органа (Ozer et al., 2008; Gowda et al., 2010). Познато је да се катехин и кверцетин у декокту биљне мешавине (Табела 2; График 5) потпуно метаболишу у јетри пацова. Такође, коадминистрација не утиче на промену њихове хемијске стурктуре (Donovan et al., 2001; Silberberg et al., 2005). Орална администрација кверцетина не доводи до поремећаја метаболизма липида код здравих животиња (Sun et al., 2014). У корист овој тврдњи је и измерен стабилан ниво серумског малондиалдехида (График 17), који се ослобађа услед метаболизма липида и који уједно представља један од главних параметара нивоа оксидативног оштећења (Tsikas, 2017). Епикатехин, чији је велики удео детектован у декокту биљне мешавине, метаболише се у хепатоцитима процесом метилације, а продукти његовог метаболисања се излучују путем бубрега не реметећи струкуту и функцију органа (Okushio et al., 1999). У складу са тим су и добијени резултати за ниво MDA у хомогенату ткива бубрега који је измерен у границама физиолошки нормалних вредности, што значи да биљна мешавина није довела до оштећења бубрежног епитела (График 17).

Хистопатолошка анализа јетре и бубрега је у складу са добијеним вредностима биохемијских параметара (График 18 и 19; Слика 3.1 и 3.4). Број хепатоцита и Купферових ћелија (График 18; Слика 3.1), однос нуклеуса и цитоплазме у ћелијама и удео бинуклеусних хепатоцита по укупном броју хепатоцита је остао непромењен, што показује да разградња компонентни биљне мешавине и при највишој тестираној концентрацији, не подстиче имунски одговор и не делује токсично на ћелије јетре (Liu et al., 2010; Popescu et al., 2012; Wilkinson et al., 2019). Није примећена назнака ка фибрози јетре (Korsdal et al., 2019), јер је ниво колагена у ткиву јетре измерен у опсегу здравих

вредности (Слика 3.2), а нормалан ниво гликогена у хепатоцитима (График 18; Слика 3.3) потврђује да биљна мешавина не ремети процес метаболизма угљених хидрата (Greenberg et al., 2006) у складу са забележеним нормалним вредностима гликемије при третману биљном мешавином (Табела 11; График 18).

Будући да је ниво урее и креатинина у серуму, као и MDA у ткиву бубрега указао на нормалан рад бубрега (Табела 11; График 19; Слика 3.4, 3.5 и 3.6), хистопатолошка анализа ткива бубрега је додатно потврдила да нема промена које указују на оштећења бубрега, попут величине гломерулуса, ширине епитела проксималних тубула и депоа колагена у ткиву бубрега и ПАС позитивних места, на основу чега се може закључити да декокт биљне мешавине није утицао на бубрежну филтрацију и ресорпцију шећера (Oktem et al., 2005; Gowda et al., 2010), као и да не оштећује епител гломерулуса и не доводи до фиброзе ткива (Alsaad and Herzenberg, 2007; Baues et al., 2019; Bouteldija et al., 2021).

Већ је поменуто да је ниво глукозе у крви током експеримента одржан у границама нормалних вредности, али је на крају експеримента ипак примећен благо снижен ниво у поређењу са нивоом на почетку експеримента код група 3-10 и 3-15 (Табела 9). Будући да није било утицаја на метаболизам угљених хидрата, као и да нема промена у нивоу гликогена у ћелијама јетре (График 18; Слика 3.3), разлог овој појави је велика инхибиторна активност биљне мешавине према панкреасној α -амилази (График 4). Третман биљном мешавином ни у једној од концентрација није довео до промена анализираних параметара костију здравих животиња (График 20; Слика 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 и 3.11) тако да не ремети правилан метаболизам костију, па нема ризика од повећања густине костију у односу на здраву контролну групу (Tuukkanen et al., 2000; Chauhan et al., 2018; Shirke et al., 2009).

Биљна мешавина није довела до промене структуре ретине, тако да је ткиво очувано и након 28 дана третмана од почетка третмана (График 21; Слика 3.12), што је и очекивано, будући да полифеноли из биљака имају протективно, а не токсично дејство на ћелије ока (Amina, et al., 2021).

Примена многих фармаколошких препарата може имати и неуротоксичан ефекат (de Oliveira et al., 2008), па је сходно томе испитан и утицај декокта биљне мешавине на број пирамидалних неурона у хипокампусу (Hori et al., 2010; Omotoso et al., 2018). Добијени резултати су показали да нема промена у броју вијабилних неурона у сва

четири СА региона хипокампуса (График 22; Слика 3.13, 3.14, 3.15 и 3.16), што је потврђено у другим студијама где полифеноли из биљака не доводе до оштећења можданих структура здравих животиња (Gong et al., 2017; Morroni et al., 2018).

Из низа великог броја различитих врста терапија дијабетеса и помоћних средстава попут препарата лековиог биља, издвојена је као најуспешнија терапија декоктом биљне мешавине (биљна мешавина-I) справљене од ризома жуте стеже, корена водопије и надземног дела кичице, чија се билошка активност први пут испитује тестовима коришћеним у овој дисертацијом. Установљено је да је, поред тога што се издваја као најуспешнија међу другим мешавинама сродног лековитог деловања, ефективнија у регулисању нивоа глукозе и поремећаја липидног статуса, али и у спречавању напредовања, појаве и лечења секундарних компликација дијабетеса где се убрајају не-алкохолна масна јетра, нефропатија, ретинопатија, остеоопороза и Алцхајмерова болест, од стандардне терапије дијабетеса (деривата сулфонилурее и инсулина у овом случају) који на поменуте проблеме имају врло слаб или немају никакав ефекат. Тест токсичности биљне мешавине-I на лабораторијским животињама показао је да биљна мешавина није токсична и да се као таква може примењивати и у највећим концентрацијама и до 30 дана узастопно, а да не изазове поремећај метаболизма и оштети органе попут јетре, бубрега, костију, очију, па и мозга. Здравим особама којима је ниво глукозе на доњој граници (око 4 mmol/l) се не препручује употреба велике дозе или констатна дугорочна употреба у мањим дозама, јер може доћи до пада нивоа шећера у крви испод доње границе нормалних вредности, односно хипогликемије, која би могла да угрози здравствено стање. Поменуто својство биљне мешавине се, пак, може употребити као превентива стања преддијабетеса или у фази управо дијагностикованог дијабетеса, када је првобитно потребно променити начин исхране и животне навике.

6. Закључци

1. Све три биљне мешавине су моћнији антиоксиданси и цитопротективни агенси, ефикаснији инхибитори дигестивних ензима и слабије цитотоксичности од већег броја појединачних лековитих биљака које их чине;
2. Екстракт биљне мешавине-I поседује већу антиоксидативну, антиамилазну и цитопротективну активност, као и мањи ниво цитотоксичности од екстракта биљне мешавине-II и биљне мешавине-III;
3. Декокт биљне мешавине-I је ефикасније снизио ниво глукозе у крви и регулисао липидни статус и телесну масу дијабетичних животиња од стандардне терапије инсулином и сулфонилуреом;
4. Декокт биљне мешавине-I је смањио оштећење јетре, бубрега и костију код дијабетичних животиња и потпуно регенерисао ткива, у поређењу са стандардном терапијом;
5. Декокт биљне мешавине-I је побољшао стање дијабетесом оштећене ретине, и то боље од терапије инсулином и сулфонилуреом;
6. Декокт биљне мешавине-I је показао бољи неуропротективни ефекат од стандардне терапије коришћене у експерименту;
7. Декокт биљне мешавине-I благо снижава ниво шећера у крви при концентрацији 15 g/kg, али у опсегу нормалних вредности;
8. Декокт биљне мешавине-I нема ефеката на телесну масу и липидни статус здравих животиња;
9. Декокт биљне мешавине-I не показује хепатотоксичан, нефротоксичан и неуротоксичан ефекат на здраве животиње;
10. Декокт биљне мешавине-I не ремети метаболизам костију и структуру ретине здравих животиња.

7. Литература

- Abbassy, M.A., Watari, I., Soma, K., 2010. The effect of diabetes mellitus on rat mandibular bone formation and microarchitecture. *Eur J Oral Sci* 118:364-369.
- Abu Ayana, M.A., Elmasry, N.A., Shehata, F.I., Khalil, N.M.: Efficacy of quercetin on alveolar bone structure of rats with induced diabetes. *Alexandria Dental Journal* 2017, 42:141-146.
- Adefegha, S.A., Oboh, G., Omojikun, O.S., Tech, M., Jimoh, T.O., Tech, M., Oyeleye, S.I., Tech, M., 2016. *In vitro* antioxidant activities of African birch (*Anogeissus leiocarpus*) leaf and its effect on the α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *J Taibah Univ Medical Sci* 11, 236-242.
- Ahamad, J., Uthirapathy, S., Ameen, M.S.M., Answer, E.T., 2020. Essential Oil Composition and Antidiabetic, Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Leaves from Erbil (Iraq). *J. Essent. Oil-Bear. Plants* 22, 1544-1553. 10.1080/0972060X.2019.1689179
- Ahmad, F., Khan, R.A., Rasheed, S., 1992. Study of analgesic and antiinflammatory activity from plant extracts of *Lactuca scariola* and *Artemisia absinthium*. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 5(2), 111-114.
- Ahmad, I.A.H., 2016. Necessary analytic skills and knowledge for identifying understanding, and performing HPLC troubleshooting. *Chromatographia* 80(5), 705-730. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3225-7>
- Ahmed N, Thornalley PJ, Lüthen R, Häussinger D, Sebekova K, Schinzel R, et al. Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 41:913–19. doi: 10.1016/j.jhep.2004.08.007.
- Ahmed, D., Sharma, M., Mukerjee, A., Kamal Kant, R., Kumar, V., 2012. Antidiabetic, Anti-hyperlipidemic & Hepatoprotective effect of a Polyherbal Unani formulation “Qurs Tabasheer” in STZ-diabetic wistar rats. *Nature Precedings*. 10.1038/npre.2012.7056.1
- Ahmed, N., 2009. Alloxan diabetes-induced oxidative stress and impairment of oxidative defense system in rat brain: neuroprotective effects of *Cichorium intybus*. *Int J Diabetes & Metabolism* 17(3).
- Aldayel, T.S., Alshammari, G.M., Omar, U.M., Grace, M.H., Lila, M.A., Yahya, M.A., 2020. Hypoglycaemic, insulin releasing, and hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Aloe perryi* Baker resin (Socotran Aloe) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Taibah University for Science* 14, 1671–1685. <https://doi.org/10.1080/16583655.2020.1855859>
- Al-Hussaini AA, Sulaiman NM, Alzahrani MD, Alenizi AS, Khan M. Prevalence of hepatopathy in type 1 diabetic children. *BMC Pediatr* 2012; 12:160. doi: 10.1186/1471-2431-12-160.

- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., 2006. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol* 107, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.004>
- Alikhani, M., Alikhani, Z., Boyd, C., MacLellan, C.M., Raptis, M., Liu, R., Pischon, N., Trackman, P.C., Gerstengeld, L., Graves, D.T., 2007. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 40, 345-353.
- Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Quesada, I. Belen Ropero A., 2011. Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells Angel Nadal, *Frontiers in Bioscience* 16, 251-260.
- Alsaad, K.O., Herzenberg, A.M., 2007. Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: An update. *J Clin Pathol* 60, 18-26. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.035592>
- Amina, M., Bhat, R.S., Al-Dbass, A.M., Mudayeib, N.M., Fahmy, R., Alhadlaq, L., El-Ansary, A., 2021: The protective effect of *Moringa oleifera* plant extract against glutamate-induced DNA damage and reduced cell viability in a primary retinal ganglion cell line. *ReerJ*, 10.7717/peerj.11569
- Amparo, P.A., Sara, M.E., Markus, P., 2017. Pro- and Antioxidant Functions of the Peroxisome-Mitochondria Connection and Its Impact on Aging and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 9860841. doi: 10.1155/2017/9860841
- Antosiewicz, D., 1990. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of ledarkin. *Folia Histochem Cytobiol* 28, 79-95.
- Anjomshoa, M., Boroujeni, S.N., Ghasemi, S., Lorigooini, Z., Amiri, A., Balali-Dehkordi, S., Amini-Khoei, H., 2020. Rutin via Increase in the CA3 Diameter of the Hippocampus Exerted Antidepressant-Like Effect in Mouse Model of Maternal Separation Stress: Possible Involvement of NMDA Receptors. *Behavioural Neurology* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4813616>
- Arvanitakis, Z., Wilson, R., Benias, J.L., Evans, D.A., Bennett, D.A., 2004. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arc Neurol* 61, 661-666.
- Azman, N.A.M., Skowyra, M., Muhammad, K., Gallego, M.G., Almajano, M.P., 2017. Evaluation of the antioxidant activity of *Betula pendula* leaves extracts and its effects on model foods. *Pharmaceutical Biology* 55(1), 912-912. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1282528>

- Bai, X. C., Lu, B., Bai, J., Zheng, H., Ke, Z., Li, X., Luo, S., 2004. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 197–207.
- Barhoma, R.A., Hegab, I.I., Atef, M.M., El-Shamy, A.M., 2019. Unraveling the Role of Melatonin/Quercetin in Attenuating the Metabolic and Bone Turnover Alternations in Iron Treated-Ovariectomized Female Rats. *Med J Cairo Univ* 87, 2857-2870.
- Bastaki, S., 2005. Diabetes mellitus and its treatment. *International Journal of Diabetes and Metabolism*. 13(3), 111-134.
- Baues, M., Klinkhammer, B.M., Ehling, J., Gremse, F., van Zandvoort, M.A.M.J., Reutelingsperger, C.P.M., Daniel, C., Amann, K., Bábíčková, J., Kiessling, F., Floege, J., Lammers, T., Boor, P., 2020. A collagen-binding protein enables molecular imaging of kidney fibrosis in vivo. *Kidney Int* 97, 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.08.029>
- Beauquis, J., Roig, P., de Nicola, A.F., Saravia, F., 2010. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS one* 5(11), e13993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013993>
- Behera, H.N., Patnaik, B.K., 1981. Recovery from Alloxan Diabetes as Revealed by Collagen Characteristics of Bone, Skin and Tendon of Swiss Mice. *Gerontology* 27, 32-36.
- Behl, C., 1997. Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell and tissue Research* 290, 471-480.
- Berkan, T., Üstünes, L., Lermioglu, F., Özer, A., 1991. Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centurium*. *Planta Med* 57(1), 34-37. 10.1055/s-2006-960011
- Betteridge, J., 2004. Dyslipidaemia and diabetes-the clinical realities. *Br J Cardiol* 11(2): 11-15.
- Bhat, M.Y., Gul, M.Z., Lohamror, L.R., Qureshi, I.A., Ghazi, I.A., 2018. An *in vitro* Study of the Antioxidant and Antiproliferative Properties of *Artemisia absinthium*- A Potent Medicinal Plant. *Free radicals and Antioxidants* 8, 18-25.
- Biessels G. J., Gispen W. H., 2005. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiology of Aging* 26(1), 36–41.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181, 1199–1200. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bouteldja, N., Klinkhammer, B.M., Bülow, R.D., Droste, P., Otten, S.W., von Stillfried, S.F., Moellmann, J., Sheehan, S.M., Korstanje, R., Menzel, S., Bankhead, P., Mietsch, M.,

- Drummer, C., Lehrke, M., Kramann, R., Floege, J., Boor, P., Merhof, D., 2021. Deep learning-based segmentation and quantification in experimental kidney histopathology. *Journal of the American Society of Nephrology* 32, 52–68. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020050597>
- Bouyahya, A., Belmehdi, O., el Jemli, M., Marmouzi, I., Bourais, I., Abrini, J., Faouzi, M.E.A., Dakka, N., Bakri, Y., 2019. Chemical variability of *Centaureum erythraea* essential oils at three developmental stages and investigation of their in vitro antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective and antibacterial activities. *Ind Crops Prod* 132, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.042>
- Bree, A. J., Puente, E. C., Daphna-Iken, D., Fisher, S. J., 2009. Diabetes increases brain damage caused by severe hypoglycemia. *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism* 297(1)194–201.
- Brenner, G. M., Stevens, G. W., 2018. *Brenner and Stevens' pharmacology*. 5th edition, Elsevier, Inc.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E., 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 14515–14520.
- Bucala, R., Vlassara, H., 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am. J. Kidney Dis* 26, 875–888.
- Cai, Z., Liu, N., Wang, C., Qin, B., Zhou, Y., Xiao, M., Chang, L., Yan, L-Y., Zhao, B., 2015. Role of RAGE in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* 36(4), 483-95. [10.1007/s10571-015-0233-3](https://doi.org/10.1007/s10571-015-0233-3)
- Canals, J.M., Pienda J.R., Torres-Peraza, J.F., Bosch, M., Martín-Ibañez, R., Muñoz, M.T., Mengod, G., Ernfors, P., Alberch, J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 24(35), 7727-39. [10.1523/JNEUROSCI.1197-04.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1197-04.2004)
- Carson, D., Joao R., 1993. Apoptosis and Disease Changes during Apoptosis. *EMBO Rep* 5(7), 1251–54.
- Çelik, H., Kandemir, F.M., Caglayan, C., Özdemir, S., Çomaklı, S., Kucukler, S., Yardım, A., 2020. Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the CREB/BDNF expressions. *Mol Biol Rep* 47, 2023–2034. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05302-z>
- Celik, S., Erdogan, S., Tuzcu, M., 2009. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 60, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.017>

- Chai, G.R., Liu, S., Yang, H.W., Chen, X.L., 2021. Quercetin protects against diabetic retinopathy in rats by inducing heme oxygenase-1 expression. *Neural Regen Res* 16, 1344. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.301027>
- Chandran, R., Li, W., Ahmed, H.A., Dong, G., Ward, R.A., He, L., Doueiry, C., Ergul, A., 2020. Diabetic rats are more susceptible to cognitive decline in a model of microemboli-mediated vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *Brain research* 1749, 147132.
- Chang, J.M., Kuo, M.C., Kuo, H.T., Chiu, Y.W., Chen, H.C., 2005. Increased glomerular and extracellular malondialdehyde levels in patients and rats with diabetic nephropathy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 146, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.05.007>
- Chauhan, S., Sharma, A., Upadhyay, N.K., Singh, G., Lal, U.R., Goyal, R., 2018. *In-vitro* osteoblast proliferation and in-vivo anti-osteoporotic activity of *Bombax ceiba* with quantification of Lupeol, gallic acid and β -sitosterol by HPTLC and HPLC. *Complementary and Alternative Medicine* 18, 233.
- Chawla, M., Verma, V., Kapoor, M., Kapoor, S., 2017. A novel application of periodic acid–Schiff (PAS) staining and fluorescence imaging for analysing tapetum and microspore development. *Histochem Cell Biol* 147, 103–110. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1481-0>
- Chen, C.H., Ho, M.L., Chang, J.K., Hung, S.H., Huang, H.T., Wang, C., Yeh, C.H., Wang, G.J., 2003. Green tea catechins enhance the expression of osteoprotegerin (OPG) in pluripotent stem cells. *J Orthop Surg Taiwan* 20, 178–183.
- Chen, D., Chen, X., He, C., Chen, Z., Chen, Q., Chen, J., Bo, H., 2023. Sanhuang xiexin decoction synergizes insulin/PI3K-Akt/FoxO signaling pathway to inhibit hepatic glucose production and alleviate T2DM. *J Ethnopharmacol*, 116162.
- Chen, M., Dai, L.H., Fei, A., Pan, S.M., Wang, H.R., 2017. Isoquercetin activates the ERK1/2-Nrf2 pathway and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in vivo and in vitro. *Exp Ther Med* 13, 1353–1359. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4093>
- Chen, S.T., Kang, L., Wang, C.Z., Huang, P.J., Huang, H.T., Lin, S.Y., Chou, S.H., Lu, C.C., Shen, P.C., Lin, Y.S., Chou, S.H., Lu, C.C., Shen, P.C., Lin Y.S., Chen, C.H., 2019. (–)-Epigallocatechin-3-Gallate Decreases Osteoclastogenesis via Modulation of RANKL and Osteoprotegerin. *Molecules* 24, 156.
- Chen, Y., Dai, F., He, Y., Chen, Q., Xia, Q., Cheng, G., Lu, Y., Zhang, Q., 2018. Beneficial effects of hyperoside on bone metabolism in ovariectomized mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 107, 1175-1182.

- Chibber, R., Ben-Mahmud, B.M., Chibber, S., Kohner, E.M., 2007. Leukocytes in diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews* 3, 3–14.
- Colon, M., Nerin, C., 2015. Synergistic, antagonistic and additive interactions of green tea polyphenols. *European Food Research and Technology* 242, 211-220
- Copstead, L-E., Banasik, J. *Pathophysiology*. 5th edition, 2013, Saunders, Elsevier, Inc.
- Crawford, J.M., 1999. The liver and biliary tract. In: Cortan, R.S., Kumar, V., Collins, T. Eds., *Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Saunders, 833–90.
- Cuevas, E., Limón, D., Pérez-Severiano, F., Díaz, A., Ortega, L., Zenteno, E., Guevara, J., 2009. Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amyloid-beta 25-35 in rats. *Eur J Pharmacol* 616, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.013>
- Dai, Y., Zhang, H., Zhang, J., Yan, M., 2018. Isoquercetin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-mediated inhibition of the NOX4/ROS/NF-κB pathway. *Chem Biol Interact* 284, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.017>
- Dalar, A., Konczak, I., 2014. *Cichorium intybus* from Eastern Anatolia: Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Ind Crops Prod* 60, 79-85.
- Davis, B.J., 1964. Disc Electrophoresis II. Methods and application to human serum *Ann N Y Acad Sci* 121, 404-427.
- De Oliviera, J.R., Camargo, S.E.A., de Oliviera, L.D., 2019. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science* 26(5).
- Derakhshanian, H., Ghadbeigi, S., Rezaian, M., Bahreman, A., Javanbakht, M.H., Golpaie, A., Hosseinzadeh, P., Tajik, N., Dehpour, A.R. 2013. Quercetin improves bone strength in experimental biliary cirrhosis. *Hepato Res* 43, 394-400.
- Derk, J., MacLean, M., Juranek, J., Schmidt, A.M., 2018. The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and mediation of inflammatory neurodegeneration. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* PMC6293973.
- Dimakopoulos, A.C., 2005. Protein aggregation in Alzheimer's disease and other neuropathological disorders. *Curr Alzheimer Res* 2,19-28.
- Domazetovic, V., Marcucci, G., Pierucci, F., Bruno, G., Di Cesare, Mannelli, L., Ghelardini, C., Brandi, M.L., Iantomasi, T., Meacci, E., Vincezini, M.T., 2019. Blueberry juice protects osteocytes and bone precursor cells against oxidative stress partly through SIRT1. *FEBS open bio* 9, 1082-1096.

- Donovan, J.L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., Ré, C., Sy, M., 2001. Nutrient Metabolism Catechin Is Metabolized by Both the Small Intestine and Liver of Rats, *J Nutr* 131(6), 1753-7. doi: 10.1093/jn/131.6.1753
- Dordević, Miloš, Grdović, N., Mihailović, M., Jovanović, J.A., Uskoković, A., Rajić, J., Dordević, Marija, Tolić, A., Mišić, D., Šiler, B., Poznanović, G., Vidaković, M., Dinić, S., 2020. Centaurium erythraea extract reduces redox imbalance and improves insulin expression and secretion in pancreatic β -cells exposed to oxidative and nitrosative stress. *Arch Biol Sci* 72, 117–128. <https://doi.org/10.2298/ABS200127005D>
- Dorner, M., Pinget, M., Brogard, J.M., 1977. Essential labile diabete. *MMW, Munchener Medizinische Wochenschrift* 119(19), 671–74.
- Dowarah, J., Singh, V.P., 2020. Anti-diabetic drugs recent approaches and advancements. *Bioorg Med Chem* 28(5), 115263. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115263>
- Draz, S.N., Abo-zid, M.M., Ally, A.F., El-Debis, A.A., 2010. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chicory (*Chicorium intybus* L.) herb in diabetic rats. *Minufiya J Agric Res* 35(4), 1201-1208.
- Drever, A., 2009. Bone health and osteoporosis. *Pract Nurse* 38(6), 13–22.
- Dwivedi, Y., 2009. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatr Dis Treat* 5, 433-449. 10.2147/ndt.s5700
- Ebrahimian, T.G., Tamarat, R., Clergue, M., Duriez, M., Levy, B.I., Silvestre, J.S., 2005. Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arteriosclerosis, trombosis, and Vascular Biology* 25(1), 65–70.
- Eichenbaum, H., 2004. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44, 109–120.
- El Menyiy, N., Guaouguaou, F.E., el Baaboua, A., el Omari, N., Taha, D., Salhi, N., Shariati, M.A., Aanniz, T., Benali, T., Zengin, G., El-Shazly, M., Chamkhi, I., Bouyahya, A., 2021. Phytochemical properties, biological activities and medicinal use of Centaurium erythraea Rafn. *J Ethnopharmacol* 276(10), 114171. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114171>
- Elangovan, A., Subramanian, A., Durairaj, S., Ramachandran, J., Lakshmanan, D.K., Ravichandran, G., Nambirajan, G., Thilagar, S., 2019. Antidiabetic and hypolipidemic efficacy of skin and seed extracts of Momordica cymbalaria on alloxan induced diabetic model in rats. *J Ethnopharmacol* 241. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111989>
- El-Tantawy, W.H., Al Haleem, E.N.A., 2014. Therapeutic effects of stem cell on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress in alloxan-treated rats. *Molecular cell bioshchemistry* 391, 193-200.

- Engerman, R.L., 1989. Pathogenesis of Diabetic Retinopathy *Diabetes* 38(10), 1203-6. doi: 10.2337/diab.38.10.1203.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 599–622.
- Fathalipour, M., Eghtedari, M., Borges, F., Silva, T., Moosavi, F., Firuzi, O., Mirkhani, H., 2019. Caffeic acid alkyl amide derivatives ameliorate oxidative stress and modulate ERK1/2 and AKT signaling pathways in a rat model of diabetic retinopathy. *Chem Biodivers* 16(12), e1900405.
- Fayeda, H.A., Barakata, B.M., Elshaerb, S.S., Abdel-Naimc, A.B., Menzed, E.T., 2019. Antiosteoporotic activities of isoquercitrin in ovariectomized rats: Role of inhibiting hypoxia inducible factor-1 alpha. *European Journal of Pharmacology* 865, 172785.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R., 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* 2008, pdb.prot4986. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT4986>
- Fратиани, F., Cozzolino, A., De Feo, V., Coppola, R., Ombra, M.N., Nazzaro, F., 2019. Polyphenols, Antioxidant, Antibacterial, and Biofil Inhibitory Activities of Peel and Pulp of *Citrus medica* L., *Citrus bergamia*, and *Citrus medica* cv. Salò Cultivated in Southern Italy. *Molecules* 24, 4577.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Determination of LDL cholesterol. *Textbook of Clinical Biochemistry*, ed. A. Gaw (London: Churchill Livingstone)
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972: „Determination of LDL cholesterol“. *Textbook of Clinical Biochemistry*, ed. A. Gaw (London: Churchill Livingstone)
- Fu, W., Wang, H., Ren, X., Yu, H., Lei, Y., Chen, Q., 2017. Neuroprotective effect of three caffeic acid derivatives via ameliorate oxidative stress and enhance PKA/CREB signaling pathway. *Behavioural Brain Research* 328, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.012>
- Funatsu, H., Yamashita, H., Nakanishi, Y., Hori, S., 2002. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology* 86, 311–315.
- Gabbay, K.H., 1973. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *The New England Journal of Medicine* 288(16), 831–836.
- Ganesan, D., Albert, A., Paul, E., Ananthapadmanabhan, K., Andiappan, R., Sadasivam, S.G., 2020. Rutin ameliorates metabolic acidosis and fibrosis in alloxan induced diabetic nephropathy

- and cardiomyopathy in experimental rats. *Mol Cell Biochem* 471, 41–50. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03758-y>
- Ganesan, K., Xu, B., 2019. Anti-diabetic effects and mechanisms of dietary polysaccharides. *Molecules*. 24(14), 2556. <https://doi.org/10.3390/molecules24142556>
- Gan, L., Zhang, Y., Sterling, K., Song, W., 2022. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Translational Neurodegeneration* 11(4).
- Garvey, W.T., Olefsky, J.M., Griffin, J., Hamman, R.F., Kolterman, G., 1985. The Effect of Insulin Treatment on Insulin Secretion and Insulin Action in Type II Diabetes Mellitus. *Diabetes* 34(3), 222-34. doi: 10.2337/diab.34.3.222.
- Gholami, H., Saharkhiz, M.J., Fard, F.R., Ghani, A., Nadaf, F., 2018. Humic acid and vermicompost increased bioactive components, antioxidant activity and herb yield of Chicory (*Cichorium intybus* L.). *ISBAB* 14, 286-292.
- Ghorbani, A., Shafiee-Nick, R., Rakhshandeh, H., Borji, A., 2013. Antihyperlipidemic Effect of a Polyherbal Mixture in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Lipids* 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/675759>
- Gong, Y., Yang, Y., Chen, X., Yang, M., Huang, D., Yang, R., Zhou, L., Li, C., Xiong, Q., Xiong, Z., 2017. Hyperoside protects against chronic mild stress-induced learning and memory deficits. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 91, 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.019>
- Gospodinova, Z., Krasteva, M. 2015. *Chicorium intybus* L. from Bulgaria inhibits viability of human breast cancer cells *in vitro*. *Genetics and Plant Physiology* 5(1), 15-22.
- Gowda, S., Desai, P.B., Kulkarni, S.S., Hull, V. v, Math, A.A.K., Vernekar, S.N., 2010. Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci* 2(4), 170-3.
- Grande, I., Fries, G.R., Kuny, M., Kapcyinski, F., 2010. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. *Psychiatry Investig* 7(4), 243-250. [10.4306/pi.2010.7.4.243](https://doi.org/10.4306/pi.2010.7.4.243)
- Greenberg, C.C., Jurczak, M.J., Danos, A.M., Brady, M.J., 2006. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways glycogen structure and key enzymes of its metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, 1–8. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00652.2005>.-Glycogen
- Güven, A., Yavuz, O., Cam, M., Ercan, F., Bukan, N., Comunoglu, C., Gokce, F., 2006. Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochem* 108, 85–93. [10.1016/j.acthis.2006.03.005](https://doi.org/10.1016/j.acthis.2006.03.005).
- Hall, J. E., 2016. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 13th edition, Elsevier, Inc.

- Hamden, K., Carreau, S., Boujbiha, M.A., Lajmi, S., Aloulou, D., Kchaou, D., Elfeki, A., 2008. Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: Protective effect of 17 beta-estradiol. *Steroids* 73, 495–501. doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.026.
- Hampson, G., Evans, C., Pettitt, R.J., Evans, D., Woohead, S.J., Peters, J.R., Ralston, S.H., 1998. Bone mineral density, collagen type 1 α 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. *Diabetologia* 41, 1314–1320.
- Han, D., Hanawa, N., Saberi, B., Kaplowitz, N., 2006. Mechanisms of liver injury: III - Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, 1–7. doi: 10.1152/ajpgi.00001.2006.
- Hasan, W., Ahmad, S., Thakur, H., Abbas, M., 2014. *In vitro* regulation of osteoclast generation: a costeffective strategy to combat osteoporosis with natural antioxidants and polyphenols like EGCG. *European academic research* 2, 2286-4822.
- Helen, V., Richard, B., Lihare, S., 1994. Biology of disease: pathologenic effect of advanced glycosylation: biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70, 138-148.
- Hemmingsen, B., Schroll, J.B., Wetterslev, J., Gluud, C., Vaag, A., Sonne, D.P., Lundstrom, L.H., Almdal, T., 2014. Sulfonylurea versus metformin monotherapy in patients with type 2 diabetes: a Cochrane systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials and trial sequential analysis. *CMAJ Open* 2, 162–175. <https://doi.org/10.9778/cmajo.20130073>
- Hollander, P., 1992. Safety Profile of Acarbose, an α -Glucosidase Inhibitor. *Drugs* 44(3), 47-53. doi: 10.2165/00003495-199200443-00007
- Horcajada-Molteni, M-N., Crespy, V., Coxam, V., Davicco, M-J., Rémésy, C., Barlet, J-P., 2000. Rutin Inhibits Ovariectomy-Induced Osteopenia in Rats. *Journal of bone and mineral research* 15, 2251-2258.
- Hori, N., Kadota, M.T., Watanabe, M., Ito, Y., Akaike, N., Carpenter, D.O., 2010. Neurotoxic effects of methamphetamine on rat hippocampus pyramidal neurons. *Cell Mol Neurobiol* 30, 849–856. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9512-1>
- Hsiao, H-B., Wu, J-B., Lin, W-C., 2017. (-)-Epicatechin 3-O- β -D-allopyranoside prevent ovariectomy-induced bone loss in mice by suppressing RANKL-induced NF- κ B and NFATc-1 signaling pathways. *BMC complementary and alternative medicine* 17, 245.
- Hsu, C-C., Wahlqvist, M.L., Lee, M-S., Tsai, H-N., 2011. Incidence of dementia is increasing in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin, *J Alzheimers Dis* 24(3), 485-93.

- Huang, J. Q., Wang, X. Q., Tao, G. Y., Song, Y., Ho, C. T., Zheng, J., & Ou, S. Y., 2018. Feruloylated oligosaccharides from maize bran alleviate the symptoms of diabetes in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Food & Function* 9, 1779–1789. <https://doi.org/10.1039/C7FO01825H>
- Huang, R., Wang, B., He, J., Zhang, Z., Xie, R., Li, S., Li, Q., Tian, C., Tou, Y., Chen, W., Xiang, M., 2022. Lian-Qu formula treats metabolic syndrome via reducing fat synthesis, insulin resistance and inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* 306, 116060.
- Huang, Y., Jin, M., Pi, R., Zhang, J., Chen, M., Ouyang, Y., Liu, A., Chao, X., Liu, P., Liu, J., Ramassamy, C., Qin, J., 2013. Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Neurosci Lett* 535, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.12.051>
- Ilyina, A., Arredondo-Valdes, R., Farkhutdinov, S., Sagura-Ceniceros, E.P., Martinez-Hernandez, J.L., Zaynullin, R., Kunakova, R., 2014. Effect of Betulin-containing Extract from Birch Tree Bark on α -Amylase Activity *In vitro* and on Weight Gain of Broiler Chickens *In vivo*. *Plant Foods Hum Nutr* 69, 65–70. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0404-2>
- Inzerillo, A.M., Epstein, S., 2004. Osteoporosis and diabetes mellitus. *Reviews in Endocrine and Metabolic* 5, 261-268.
- Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nuck, M., Peters, A.L., Tsapas, A., Wender, R., Matthews, D.R., 2015. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 38, 140–149.
- Iroz, A., Couty, J.P., Postic, C., 2015. Hepatokines: Unlocking the multiorgan network in metabolic diseases. *Diabetologia* 58, 1699–1703. doi: 10.1007/s00125-015-3634-4.
- Ito, F., Sono, Y., Ito, T., 2019. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants* 8(3), 72. <https://doi.org/10.3390/antiox8030072>
- Ivanov, I., 2017. Antimicrobial Activity of Extract From Aerial Parts of *Potentilla* (*Potentilla Reptans* L.). *Industrial technologies* 4(1), 37-43.
- Jadhav, R., Puchchakayala, G., n.d. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Int J Pharm Sci* 4(2), 251-256.

- Jaradat, N., 2021. Phytochemical profile and in vitro antioxidant, antimicrobial, vital physiological enzymes inhibitory and cytotoxic effects of *Artemisia jordanica* leaves essential oil Palestine. *Molecules* 26(9), 2831. <https://doi.org/10.3390/molecules26092831>
- Javed, H., Khan, M.M., Ahmad, A., Vaibhav, K., Ahmad, M.E., Khan, A., Ashafaq, M., Islam, F., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., Islam, F., 2012. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 210, 340–352. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.02.046>
- Jayachandran, M., Zhang, T., Ganesan, K., Xu, B., Chung, S.S.M., 2018. Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism via insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 829, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.04.015>
- Jedrejek, D., Lis, B., Rolnik, A., Stochmal, A., Olas, B., 2019. Comparative phytochemical, cytotoxicity, antioxidant and haemostatic studies of *Taraxacum officinale* root preparations. *Food Chem Toxicol* 126, 233-247
- Jeon, H.J., Kang, H.J., Jung, H.J., Kang, Y.S., Lim, C.J., Kim, Y.M., Park, E.H., 2008. Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *J Ethnopharmacol* 115, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.006>
- Jung, S. W., Han, O. K., Kim, S. J., 2010. Increased expression of β amyloid precursor gene in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice with memory deficit and anxiety induction. *Journal of Neural Transmission* 117 (12), 1411–1418.
- Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti, V., Milos, M., Mastelic, J., Bessiere, J.-M., Viano, J., n.d. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica* 69(2), 158-61. doi:10.1055/s-2003-37714
- Kachmar, M.R., Oliveira, A.P., Valentão, P., Gilzquierdoc, A., Domínguez-Perlesc, R., Ouahbia, A., ElBadaouia, K., Andradeb, P.B., Ferreresc, F., 2019. HPLC-DAD-ESI/MSn phenolic profile and *in vitro* biological potential of *Centaureum erythraea* Rafn aqueous extract. *Food chemistry* 278, 424-433.
- Kamal, A., Artola, A., Biessels, G.J., Gispen, W.H., Ramakers, G.M.J., 2003. Increased spike broadening and slow afterhyperpolarization in CA1 pyramidal cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience* 118, 577–583. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00874-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00874-6)
- Kanter, M., Altan, M.F., Donmez, S., Ocakci, A., Kartal, M.E., 2007. The effects of quercetin on bone minerals, biomechanical behavior, and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell biochemistry and function* 25, 747-752.

- Karakuş, A., Değer, Y., Yıldırım, S., 2017. Protective effect of *Silybum marianum* and *Taraxacum officinale* extracts against oxidative kidney injuries induced by carbon tetrachloride in rats. *Ren Fail* 39, 1–6. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2016.1244070>
- Karsdal, M.A., Daniels, S.J., Holm Nielsen, S., Bager, C., Rasmussen, D.G.K., Loomba, R., Surabattula, R., Villesen, I.F., Luo, Y., Shevell, D., Gudmann, N.S., Nielsen, M.J., George, J., Christian, R., Leeming, D.J., Schuppan, D., 2020. Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver International* 40(4), 736-750. <https://doi.org/10.1111/liv.14390>
- Kataya, H.H., Hamza, A.E.A., Ramadan, G.A., Khasawneh, M.A., 2011. Effect of licorice extract on the complications of diabetes nephropathy in rats, *Drug and Chemical Toxicology* 34(2), 101–108.
- Khalil, O.A., Ramadan, K.S., Danial, E.N., Alnahdi, N.S., Ayaz, N.O., 2012. Antidiabetic activity of *Rosmarinus officinalis* and its relationship with the antioxidant property. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(14), 1031-1036
- Khalili, M., Ebrahimzadeh, M. A. Safdari, Y., 2014. Antihaemolytic activity of thirty herbal extracts in mouse red blood cells. *Arch Ind Hyg Toxicol* 65,399-406.
- Kim, M.J., Ha, B.J., 2013. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of fermented *Rhynchosia nulubilis* in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicol Res* 29, 15–19. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.1.015>
- King, G.L., Loeken, M.R., 2004. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* 122, 333–338.
- Koga, M., Nakagawa, S., Kato, A., Kusumi, I., 2019. Caffeic acid reduces oxidative stress and microglial activation in the mouse hippocampus. *Tissue Cell* 60, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2019.07.006>
- Koyuncu, I., 2018. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium L.* Extract. *CMB* 64:3. <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.3.5>
- Kyung, T-W., Lee, J-E., Shin, H-H., Choi, H-S., 2008. Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF- α by inhibiting activation of NF- κ B. *Experimental and molecular medicine* 40, 52-58.
- Lamuela-Raventós, R.M., 2018. Folin-ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity. Recent Trends and Applications*, 107-117.

- Laube, H., 2002. Acarbose An Update of Its Therapeutic Use in Diabetes Treatment. *Clin Drug Invest* 46(6), 1025-54. doi: 10.2165/00003495-199346060-00007.
- Lebovitz, H.E., 2001. Diagnosis, classification, and pathogenesis of diabetes mellitus. *Journal of Clinical Psychiatry* 62, 5–9.
- Leclercq, I.A., Da Silva Morais, A., Schroyen, B., Van Hul, N., Geerts, A., 2007. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. *J Hepatol* 47, 142–56. doi: 10.1016/j.jhep.2007.04.002.
- Lee, C.K., Choi, Y.J., Park, S.Y., Kim, J.Y., Won, K.C., Kim, Y.W., 2012. Intracerebroventricular injection of metformin induces anorexia in rats. *Diabetes Metab J* 36(4), 293-299. <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.4.293>
- Leite Duarte, M.E., da Silva, R.D., 1996. Histomorphometric analysis of the bone tissue in patients with non-insulin-dependent diabetes (DMNID). *Rev Hosp Clin Fac* 51, 7–11.
- Levinthal, G.N., Tavill, A.S., 1999. Liver disease and diabetes mellitus. *Clin Diabetes* 17, 73.
- Li, F., Feng, K-L., Zang, J-C., He, Y-S., Guo, H., Wang, S-P., Gan, E-Y., 2021. Polysaccharides from dandelion (*Taraxacum magnolicum*) leaves: insights into innovative drying techniques on their structural characterisations and biological activities. *Int Jour of Bio Macromolecules* 167, 995-1005. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.054>
- Li, T-C., Yang, C-P., Tseng, S-T., Li, C-I., Liu, C-S., Lin, W-Y., Hwang, K-L., Yang, S-Y., Chiang, J-H., Lin, C-C., 2017. Visit-to-Visit Variations in Fasting Plasma Glucose and HbA1c Associated With an Increased Risk of Alzheimer Disease: Taiwan Diabetes Study. *Diabetes Care* 40, 1210-1217.
- Li, Z-G., Zhang, W., Sima, A.A.F., 2007. Alzheimer-Like Changes in Rat Models of Spontaneous Diabetes. *Diabetes* 56, 1817-1824.
- Liang, W., Luo, Z., Ge, S., Li, M., Du, J., Yang, M., Yan, M., Ye, Z., Luo, Z., 2011. Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia. *European Journal of Pharmacology* 670, 317–324.
- Lin, R., Chen, C., Wang, Y., Ho, M., Hung, S., Chen, I., Wang, G., 2009. (–)-Epigallocatechin gallate inhibition of osteoclastic differentiation via NF-kappaB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 1033–1037.
- Liu, Cheng, Tao, Q., Sun, M., Wu, J.Z., Yang, W., Jian, P., Peng, J., Hu, Y., Liu, Chenghai, Liu, P., 2010. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Laboratory Investigation* 90, 1805–1816. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.123>

- Liu, H., Wang, Q., Liu, Y., Chen, G., Cui, J., 2013. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Cichorium Intybus Root Extract Using Orthogonal Matrix Design. *J Food Sci* 78, 2.
- Liu, Q., Xie, F., Rolston, R., Moreira, P.I., Nunomura, A., Zhu, X., Smith, M.A., Perry, G., 2007. Prevention and treatment of Alzheimer disease and aging: antioxidants. *Mini Rev Me Chem* 7, 171-180.
- Lopez-Ibarra, P.J., Pastro, M.M., Escobar-Jiménez, F., Pardo, M.D., González, A.G., Luna, J.D., Requena, M.E., Diosdado, M.A., 2001. Bone mineral density at time of clinical diagnosis of adult-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr Pract* 7, 346–351.
- Lucchesi, A.N., Tavares De Freitas, N., Langoni, L., Iii, C., Fernando, S., Marques, G., Spadella, T., 2013. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease 1. *Acta Cirúrgica Brasileira* 28(7), 502-8.
- Madić, V., Petrović, A., Jušković, M., Jugović, D., Djordjević, L., Stojanović, G., Vasiljević, P., 2021. Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes. *J Ethnopharmacol* 265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113210>
- Madić, V., Popović, A. Ž., Vukelić-Nikolić, M., Đorđević, L., & Vasiljević, P., 2018. Ethnopharmacological therapies in the treatment of diabetes in Serbia. *Glasnik Antropološkog društva Srbije* 53, 1-2.
- Madić, V., Stojanović-Radić, Z., Jušković, M., Jugović, D., Žabar Popović, A., Vasiljević, P., 2019. Genotoxic and antigenotoxic potential of herbal mixture and five medicinal plants used in ethnopharmacology. *South African Journal of Botany* 125, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.043>
- Magariños A.M., Ewen, B.S. 2000 Experimentald diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20) 11056–11061.
- Mahboubi, Mohaddese, Mahboubi, Mona, 2020. Hepatoprotection by dandelion (*Taraxacum officinale*) and mechanisms. *Asian Pac J Trop Biomed* 10, 1–10. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.273081>
- Manna, P., Das, J., Ghosh, J., Sil, P.C., 2010. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radic Biol Med* 48, 1465–84. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.025.

- Martínez-Flórez, S., Gutiérrez-Fernández, B., Sánchez-Campos, S., González-Gallego, J., Tuñón, M.J., 2005. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr* 135,1359–65.
- Martinez-Valbuena, I., Valents-Azcarate, R., Amat-Villegas, I., Riverol, M., Marcilla, I., de Andrea, C.E., Sanchez-Arias, J.A., Carmona-Abellan, M.M., Marti, G., Erro, M-E., Martinez-Vila, E., Tunon, M-T., Luwuin, M-R., 2019. Amylin as a Potential Link between Type 2 Diabetes and Alzheimer Disease. *American Neurological Association* 86, 539-551.
- Mashentseva, A.A., Dehaen, W., Seitembetov, T.S., Seitemetova, A.J., 2011. Comparison of the antioxidant activity of the different *Betula pendula* Roth. Extracts from Northern Kazakhstan. *Journal of Phytology* 3(1), 19-25.
- Mastrandrea, L.D., Wactawsski-Wende, J., Donahue, R.P., Hovey, K.M., Clark, A., Quattrin, T., 2008. Young women with type 1 diabetes have lower bone mineral density that persists over time. *Diabetes Care* 31, 1729–1735.
- Mechchate, H., Es-safi, I., Haddad, H., Bekkari, H., Grafov, A., Bousta, D., 2021. Combination of Catechin, Epicatechin, and Rutin: Optimization of a novel complete antidiabetic formulation using a mixture design approach. *Journal of Nutritional Biochemistry* 88, 108520. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108520>
- Middha, S.K., Usha, T., RaviKiran, T., 2012. Influence of *Punica granatum* L. on region specific responses in rat brain during Alloxan-induced diabetes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(2), 905-909. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60334-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60334-7)
- Mihajlov-Krstev, T., Jovanović, B., Jović, J., Ilić, B., Miladinović, D., Matejić, J., Rajković, J., Đorđević, Lj., Cvetković, V., Zlatković, B., 2014. Antimicrobial, antioxidative, and insect repellent effects of *Artemisia absinthium* essential oil. *Planta Med* 80, 1698-1705.
- Mihaylova, D., Vrancheva, R., Popova, A., 2019. Phytochemical profile and in vitro antioxidant activity of *Centaureum erythraea* Rafn. *Bulgarian Chemical Communications* 51, 95-100.
- Millet, A., Stintzing, F., Merfort, I., 2010. Flavonol quantification and stability of phenolics in fermented extracts from fresh *Betula pendula* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53(2), 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.001>
- Mody, N., Parhami, F., Sarafian, T.A., Demer, I.L., 2001. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free radical biology and medicine* 31, 509-519.
- Mori, R.C.T., Hirabara, S.M., Hirata, A.E., Okamoto, M.M., Machado, U.F., 2008. Glimepiride as insulin sensitizer: Increased liver and muscle responses to insulin. *Diabetes Obes Metab* 10, 596–600. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00870.x>

- Morroni, F., Sita, G., Graziosi, A., Turrini, E., Fimognari, C., Tarozzi, A., Hrelia, P., 2018. Neuroprotective effect of caffeic acid phenethyl ester in a mouse model of alzheimer's disease involves Nrf2/HO-1 pathway. *Aging Dis* 9, 605–622. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0903>
- Moscatiello, S., Manini, R., Marchesini, G., 2007. Diabetes and liver disease: An ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17, 63–70. doi: 10.1016/j.numecd.2006.08.004.
- Nguyen, Q. N., Lee, S. R., Kim, B., Hong, J-H., Jang, Y. S., Lee, D. E., Pang, C., Kang, K. S., Kim, K. H., 2022. Estrogenic Activity of 4-Hydroxy-Benzoic Acid from *Acer tegmentosum* via Estrogen Receptor α -Dependent Signaling Pathways. *Plants* 11, 3387.
- Niafar, M., Hai, F., Porhomayon, J., Nader, N.D., 2015. The role of metformin on vitamin B12 deficiency: a meta-analysis review. *Intern Emerg Med* 10, 93-102. <https://doi.org/10.1007/s11739-014-1157-5>
- Nichols, M., Zhang, J., Polster, B.M., Elustondo, P.A., Thirumaran, A., Pavlov, E. v., Robertson, G.S., 2015. Synergistic neuroprotection by epicatechin and quercetin: Activation of convergent mitochondrial signaling pathways. *Neuroscience* 308, 75–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.012>
- Nielson, K.A., Nolan, J.H., Berchtold, N.C., Sandman, C.A., Mulnard, R.A., Cotman, C.W., 1996. Apolipoprotein-E Genotyping of Diabetic Dementia Patients: Is Diabetes Rare in Alzheimer's Disease?. *American Geriatrics Society* 44, 897-904.
- Nkpaa, K.W., Onyeso, G.I., Kponee, K.Z., 2019. Rutin abrogates manganese—Induced striatal and hippocampal toxicity via inhibition of iron depletion, oxidative stress, inflammation and suppressing the NF- κ B signaling pathway. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 53, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.01.014>
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E.K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya ,T., Shimohama, S., Chiba, S., Ateood, C.S., Petron, R.B., Smith, M.A., 2001. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(8), 759-67. doi: 10.1093/jnen/60.8.759.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry* 95(2), 351-8. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- Oka, Y., Iwai, S., Amano, H., Irie, Y., Yatomi, K., Ryu, K., Yamada, S., Inagaki, K., Oguchi, K., 2011. Polyphenols Inhibit Rat Osteoclast Formation and Differentiation. *J of pharmacologic science* 118, 55-64.

- Okazaki, K., Yamaguchi, T., Tanaka, K., Notsu, M., Ogawa, N., Yano, S., Sugimoto, T., 2012. Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis. *Calcif Tissue Int* 91, 286-296.
- Oktem, F., Ozguner, F., Mollaoglu, H., Koyu, A., Uz, E., 2005. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: Protection by melatonin. *Arch Med Res* 36, 350–355. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.03.021>
- Okushio, K., Suzuki, M., Matsumoto, N., Nanjo, F., Hara, Y., 1999. Identification of (-)-Epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat. *ASPET* 27(2), 09-316.
- Omotoso, O.G., Kolo, R.M., Afolabi, T., Jaji-Sulaimon, R., Gbadamosi, I.T., 2018. *Moringa oleifera* Ameliorates Histomorphological Changes Associated with Cuprizone Neurotoxicity in the Hippocampal *Cornu ammonis* (CA) 3 Region. *J Physiol Sci* 33(1), 95-99.
- Ooigawa, H., Nawashiro, H., Fukui, S., Otani, N., Osumi, A., Toyooka, T., Shima, K., 2006. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: Difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol* 112, 471–481. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0108-2>
- Oraebosi, M.I., Olurishe, T.O., Ayanwuyi, L.O., 2019. Chronomodulated nifedipine supports concurrent glimepiride administration with subsequent amelioration of retinopathy and peripheral neuropathy in diabetic rats.
- Oršolić, N., Sirovina, D., Odeh, D., Gajski, G., Balta, V., Šver, L., Jembrek, M.J., 2021. Efficacy of Caffeic acid on diabetes and its complications in the mouse. *Molecules* 26(11), 3262. <https://doi.org/10.3390/molecules26113262>
- Osborne, C., West, E., Nolan, W., McHale-Owen, H., Williams, A., Bate, C., 2016. Glimepiride protects neurons against amyloid- β -induced synapse damage. *Neuropharmacology* 101, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.09.030>
- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A.P., Hofman, A., Breteler, M.M.B. 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *American Academy of Neurology* 53, 1937-1942.
- Ozbek, H., Acikara, O.B., Keskin, I., Kirmizi, N.I., Ozbilgin, S., Oz, B.E., Kurtul, E., Ozrenk, B.C., Tekin, M., Saltan, G., 2017. Evaluation of hepatoprotective and antidiabetic activity of *Alchemilla mollis*. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 86, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.005>

- Palsamy, P., Sivakumar, S., Subramanian, S., 2010. Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Chem Biol Interact* 186, 200–10. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.028.
- Palasz, E., Wysocka, A., Gasirowska, A., Chalimoniuk, M., Niewiadomski, W., Niewidomska, G., 2020. BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 21(3), 1170. 10.3390/ijms21031170
- Pan, S.Y., Zhou, S.F., Gao, S.I., Yu, Z.L., Zhang, S.F., Tang, M.K., Sun, J.N., Ma, D.L., Han, Y.F., Fong, W.F., Ko, K.M., 2013. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 627375.
- Panten, U., Schwanstecher, M., Schwanstecher, C., 1996. Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104(1), 1-9. 10.1055/s-0029-1211414.
- Papatheodorou, K., Banach, M., Bekiari, E., Rizzo, M., Edmonds, M., 2018. Complications of diabetes 2017. *Journal of Diabetes Research*. 2018: 3086167. <https://doi.org/10.1155/2018/3086167>
- Parashar, A., Mehta, V., Udayabanu, M., 2017. Rutin alleviates chronic unpredictable stress-induced behavioral alterations and hippocampal damage in mice. *Neurosci Lett* 656, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.058>
- Parvin, M., Zahra, B., Fereidoun, A., 2014. Functional Foods-based Diet as a Novel Dietary Approach for Management of Type 2 Diabetes and its Complications. *World J Diabetes* 5(3), 267-281.
- Pascoe, G.A., Redd, D.J., 1989. Cell calcium, vitamin E and the thiol redox system in cystotoxicity. *Free Radic Biol Med* 6(2), 209-224.
- Pękal, A., Pyrzynska, K., 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods* 7, 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Penkov, D., Andonova, V., Delev, D., Kostandinov, I., Kassarova, M., 2018. Antioxidant Activity of Dry Birch (*Betula Pendula*) Leaves Extract. *Folia Medica* 60, 571-579. 10.2478/folmed-2018-0035.
- Petrica, L., Petrica, M., Vlad, A., Dragos Jianu, C., Gluhovschi, G., Ianculescu, C., Dumitrascu, V., Giju, S., Gluhovschi, C., Bob, F., Ursoniu, S., Gadalean, F., Velciov, S., Bozdog, G., Marian, R., 2009a. Nephro- and neuroprotective effects of rosiglitazone versus glimepiride in

- normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *Wien Klin Wochenschr* 121, 765–775. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1279-3>
- Petrović, A., Madić, V., Jušković, M., Đorđević, Lj., Vasiljević, P., 2021. Osteoprotective Effects of ‘Anti-Diabetic’ Polyherbal Mixture in Type 1 Diabetic Rats. *Acta Veterinaria* 71, 256-272. <https://doi.org/10.2478/acve-2021-0023>
- Petzold, A., Solimena, M., Knoch, K.P., 2015. Mechanisms of Beta Cell Dysfunction Associated With Viral Infection". *Current Diabetes Reports* 15(10), 73. doi:10.1007/ s11892-015-0654-x
- Peungvich, P., Temsiriririkkul, R., Kurmar Prasain, J., Tezuka, Y., Kadota, S., Thirawarapan, S.S., Watanabe, H., 1998. 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root, *J Ethnopharmacol* 62(1), 79-84. 10.1016/s0378-8741(98)00061-0.
- Pitchai, D., Manikkam, R., 2012. Hypoglycemic and insulin mimetic impact of catechin isolated from *Cassia fistula*: A substantiate in silico approach through docking analysis. *Medicinal Chemistry Research* 21, 2238–2250. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9722-1>
- Popescu, R., Filimon, M.N., Dumitrescu, G., Ciochina, L.P., Dumitrascu, V., Vlad, D., Verdes, D., 2012. Histological and Morphometrical Studies in Liver Regeneration in Mice, *Scientific Papers: Animal Sciences and Biotechnologies*.
- Posadas, S.J., Caz, V., Largo, C., de la Gándara, B., Matallanas, B., Reglero, G., de Miguel, E., 2009. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol* 44, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.015>
- Prouillet, C., Maziere, J.C., Maziere, C., Wattel, A., Brazier, M., Kamel, S., 2004. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol* 67, 1307–1313.
- Qi, X-C., Li, B., Wu, W-L., Liu, H-C., Jiang, Y-P., 2020. Protective effect of hyperoside against hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative stress in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 48,1.
- Radovanović, A.M., Cupara, S.M., Popović, S.Lj., Tomović, M.T., Slavkovska, V.N., Janković, S.M., 2013. Cytotoxic effect of *Potentilla reptans* L. rhizome and areal part extracts. *Acta Pol Pharm* 70(5), 851-4.
- Ramamurthy, N.S., Zebrowski, E.J., Golub L., 1972. The effect of alloxan diabetes on finfival collagen metabolism in rats. *Archives of oral biology* 17, 1551-1560.

- Ranasinghe, P., Ranasinghe, P., Abeyssekera, W.P.K.M., Premakumura, G.A.S., Perera, Y.S., Gurugama, P., Gunatilake, S.B., 2012. *In vitro* erythrocyte membrane stabilization properties of *Carica papaya* L., leaf extracts. *Pharmacognosi Res* 4(4), 196-202.
- Rasgon, N.L., Kenna, H.A., Wroolie, T.E., Kelley, R., Silverman, D., Brooks, J., Williams, K.E., Powers, B.N., Hallmayer, J., Reiss, A., 2011. Insulin resistance and hippocampal volume in women at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32, 1942-8.
- Rastogi, S., Pandey, M.M., Rawat, A.K.S., 2015. Medicinal plants of the genus *Betula* - Traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *J Ethnopharmacol* 159, 62-83. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.010>
- Reed, D.J., 1989. Status of calcium and thiols in hepatocellular injury by oxidative stress. *Semin Liver Dis* 10, 285-292.
- Regan, T. J., Ettinger, P.O., Khan, M.J., Jesrani, M.U., Lyons, M.M., Olderurtel, H.A., Weber, M., 1974. Altered Myocardial Function and Metabolism Diabetes Mellitus without Ischemia in Dogs. *Circulation Research*, 35.
- Regnell, S.E., Lernmark, Å., 2011. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud* 8, 454–67. doi: 10.1900/rds.2011.8.454.
- Reid, A.E., 2006. Non-alcoholic fatty liver disease. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, Eds. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology/diagnosis/management*, 8, 1772–99.
- Reiter, C.E.N., Gardner, T.W., 2003. Functions of insulin and insulin receptor signaling in retina: possible implications for diabetic rethinopathy. *Prog Retin Eye Res* 22(4), 545-62.
- Rice-Evans, C., Omorphos, S.C., Baysal, E., 1986. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J* 237(1), 265-269. doi. 10.1042/bj2370265
- Rohilla, A., Ali, S., n.d. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects 3, 819-823.
- Romagnoli, M., Gomez-Cabrera, M.C., Perrelli, M.G., Biasi, F., Pallardó, F.V., Sastre, J., Poli, G., Vina, J., 2010. Xanthine oxidase-induced oxidativestress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 49,171–7.doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.024.
- Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T.R., Van Parijs, L., Lodish, H.F., 2002. Tumor necrosis factoralpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 51:1319 –1336.

- Ruan, H., Wang, J., Hu, L., Lin, C.-S., Lamborn, K.R., Deen, D.F., 1999. Killing of Brain Tumor Cells by Hypoxia-Responsive Element Mediated Expression of BAX. *Neoplasia* 1, 431–437. <https://doi.org/10.1038/SJ.NEO.7900059>
- Sah, S.K., Samuel, V.P., Dahiya, S., Singh, Y., Gilhorta, R.M., Gupta, G., Mishra, A., Sharma, R.K., Kumar, G.S., Sree Harsha, N., Chellappan, D.K., Dua, K., 2019. A contemporary biological pathway of islet amyloid polypeptide for the management of diabetic dementia. *Chemico-Biological Int* 306, 117-122.
- Sánchez-Chávez, G., Peña-Rangel, M.T., Riesgo-Escovar, J.R., Martínez-Martínez, A., Salceda, R., 2012. Insulin stimulated-glucose transporter Glut 4 is expressed in the retina. *PLoS One* 7(12):e52959. [10.1371/journal.pone.0052959](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052959)
- Sanguineti, R., Storace, D., Monacelli, F., Federici, A., Odetti, P., 2008. Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. *Ann NY Acad Sci* 1126, 166-172.
- Savage, D., Petersen, K. F., Shulman, G., 2007. Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *The American Physiological Society* 87, 507-520.
- Schaalan, M., El-Abhar, H.S., Barakat, M., El-Denshary, E.S., 2009. Westernized-like-diet-fed rats: effect on glucose homeostasis, lipid profile, and adipocyte hormones and their modulation by rosiglitazone and glimepiride. *J Diabetes Complications* 23, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2008.02.003>
- Scherer, P.E., 2016. The multifaceted roles of adipose tissue— therapeutic targets for diabetes and beyond: the 2015 Banting Lecture. *Diabetes* 65(6), 1452–1461. <https://doi.org/10.2337/db16-0339>
- Schlott, N.C., Haupt, A., Schütt, M., Badenhoop, K., Laimer, M., Nicolay, C., Reaney, M., Fink, K., Holl, R.W., 2016. Risk of severe hypoglycemia in sulfonylurea-treated patients from diabetes centers in Germany/Austria: How big is the problem? Which patients are at risk? *Diabetes Metab Res Rev* 32, 316–324. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2722>
- Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L., Houser, T.A., 2005. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Sci* 69, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.010>
- Seo, Y.J., Lee, K., Chei, S., Song, J.H., Lee, B.Y., 2019. *Ishige okamurae* extract ameliorates the hyperglycemia and body weight gain of db/db mice through regulation of the PI3K/Akt Pathway and Thermogenic Factors by FGF21. *Mar Drugs* 17(7), 407 <https://doi.org/10.3390/md17070407>

- Seven, A., Guzel, S., Seymen, O., Civelek, S., Bolayirli, M., Uncu, M., Barçak, G., 2004. Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: Investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J* 45, 703–10. 10.3349/ymj.2004.45.4.703.
- Sharma, A., Thakur, R., Lingaraju, M.C., Kumar, Dharendra, Mathesh, K., Telang, A.G., Singh, T.U., Kumar, Dinesh, 2017. Betulinic acid attenuates renal fibrosis in rat chronic kidney disease model. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 89, 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.181>
- Shieh, J.C.C., Huang, P.T., Lin, Y.F., 2020. Alzheimer’s Disease and Diabetes: Insulin Signaling as the Bridge Linking Two Pathologies. *Mol Neurobiol* 57, 1966-1977. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01858-5>
- Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C.S., Petersen, R.B., Smith, M.A., 2001. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 759-767.
- Shirke, S.S., Sanket, R.J., Jagtap, A.G., 2009. Osteoprotective effect of Phaseolus vulgaris L in ovariectomy-induced osteopenia in rats: *The Journal of The North American Menopause Society* 16, 589-596.
- Silberberg, M., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Remesy, C., 2005. Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci* 77, 3156–3167. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.033>
- Silva, M.J., Brodt, M.D., Lynch, M.A., McKenzie, J.A., 2009. Type 1 Diabetes in Young Rats Leads to Progressive Trabecular Bone Loss, Cessation of Cortical Bone Growth, and Diminished Whole Bone Strength and Fatigue Life. *Journal of bone and mineral research* 24, 1618-1627.
- Smith, M.A., Siedlak, S.L., Richey, P.L., Nagaraj, R.H., Elhammer A, Perry, G., 1996. Quantitative solubilization and analysis of insoluble paired helical filaments from Alzheimer disease. *Brain Res* 717, 99-108
- Song, K., Kim, S., Na, J.Y., Park, J.H., Kim, J.K., Kim, J.H., Kwon, J., 2014. Rutin attenuates ethanol-induced neurotoxicity in hippocampal neuronal cells by increasing aldehyde dehydrogenase 2. *Food and Chemical Toxicology* 72, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.028>
- Spanheimer, R.G., Umpierrez, G.E., Stumpf, V., 1998. Decreased Collagen Production in Diabetic Rats. *Diabetes* 37.
- Stanković, N., Mihajlov-Krstev, T. Zlatković, B., Stanković-Jovanović, V., Mitić, V., Jović, J., Čomić, Lj., Kocić. B., Bernstein, N., 2016. Antibacterial and antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan Peninsula. *NJAS* 78, 21-28.

- Stanojević, L., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Čanadanovic-Brunet, J., Tumbas, V., 2009. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hpieracium pilosella* L. extracts. *Sensors* 9, 5702–5714. <https://doi.org/10.3390/s90705702>
- Stefan, N., Sun, Q., Fritsche, A., Machann, J., Schick, F., Gerst, F., Jeppesen, C., Joost, H-G., Hu, F.B., Boring, H., Ullrich, S., Häring, H-U., Schulze, M.B., 2014. Impact of the adipokine adiponectin and the hepatokine fetuin-A on the development of type 2 diabetes: Prospective cohort- and cross-sectional phenotyping studies. *PLoS One* 9, 92238. doi: 10.1371/journal.pone.0092238.
- Street, R.A., Sidana, J., Prinsloo, G., 2013. *Cichorium intybus*: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 579319. <https://doi.org/10.1155/2013/579319>
- Sun, X., Yamasaki, M., Katsube, T., Shiwaku, K., 2015. Effects of quercetin derivatives from mulberry leaves: Improved gene expression related hepatic lipid and glucose metabolism in short-term high-fat fed mice. *Nutr Res Pract* 9, 137–143. <https://doi.org/10.4162/nrp.2015.9.2.137>
- Suvarna, K.S., Layton, C., Bancroft, J.D., 2019. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th edition, Elsevier Limited.
- Swift, C.R., Seidman, F., Stein, H., 1967. Adjustment problems in juvenile diabetes. *Journal of Biobehavioral Medicine*, 29(6), 555-571.
- Tarr, J.M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E.M., Chibber, R., 2013. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology* 13, 343560.
- Taskinen, M.R., 2022. Diabetic dyslipidemia. *Atheroscler Suppl* 3(1), 47–51.
- Temsiriririkkul, R., Pilón, R.S., Peungvicha, P., Kurmar Prasain, J., Tezuka, Y., Kadota, S., Thirawarapan, S.S., Watanabe, H., 1998. 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. *Journal of Ethnopharmacology* 62(1), 79-84. doi: 10.1016/s0378-8741(98)00061-0.
- Tervaert, T.W., Mooyaart, A.L., Amann, K., Cohen, A.H., Cook, H.T., Brachenberg, C.B., Ferrario, F., Fogo, A.B., Haas, M., de Heer, E., Joh, K., Noël, L.H., Radhakrishnan, J., Seshan, S.V., Bajem, M., Bruijn, J.A., 2010. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21(4), 556-563.
- Tolba, M.F., El-Serafi, A., Omar, H.A., 2017. Caffeic acid phenethyl ester protects against glucocorticoid-induced osteoporosis in vivo: Impact on oxidative stress and RANKL/OPG signals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 324, 26-25.

- Tomlinson, D. R., Gardiner, N. J., 2008. Glucose neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience* 9(1) 36–45.
- Tomovic, M.T., Cupara, S.M., Popovic-Milenkovic, M.T., Ljubic, V.T., Kostic, M.J., Jankovic, S.M., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Potentilla reptans* L. *Acta Pol Pharm* 22, 137-145.
- Torabian, S., Haddad, E., Rajarm, S., Banta, J., Sabate, J., 2009. Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. *J Hum Nutr Diet* 22, 64-71.
- Trifunović-Momčilov, M., Krstić-Milošević, D., Trifunović, S., Podolski-Renić, A., Pešić, M., Subotić, A., 2016. Secondary Metabolite Profile of Transgenic Centaury (*Centaureum erythraea* Rafn.) Plants, Potential Producers of Anticancer Compounds, in: *Transgenesis and Secondary Metabolism* 1–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27490-4_5-2
- Tsikas, D., 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 524, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Tuukkanen, J., Koivukangas, A., Jämsä, T., Sundquist, K., MacKay, C.A., Marks, Jr S.C., 2000. Mineral density and bone strength are dissociated in long bones of rat osteopetrotic mutations. *Journal of bone and mineral research* 15, 10.
- Uysal, S., Zengin, G., Mohomoodally, M.F., Yilmaz, M.A., Aktumsek, A., 2018. Chemical profile, antioxidant properties and enzyme inhibitory effects of the root extracts of selected *Potentilla* species. *S Afr J Bot* 120, 124-128. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.014>
- Vargas-Restrepo, F., Sabogal-Guáqueta, A.M., Cardona-Gómez, G.P., 2018. Quercetin ameliorates inflammation in CA1 hippocampal region in aged triple transgenic Alzheimer’s disease mice model. *Biomedica* 38, 1–23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3761>
- Verhaeghe, J., Suiker, A.M., Nyomba, B.L., Visser, W.J., Einhorn, T.A., Dequeker, J., Bouillon, J., 1989. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. II. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology* 124, 573–582.
- Verma, R., Gangrade, T., Punasiya, R., Ghulaxe, C., 2014. *Rubus fruticosus* (blackberry) use as an herbal medicine. *Pharmacogn Rev* 8(16), 101-104. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.134239>
- Vestergaard, P., Rejnmark, L., Mosekilde, L., 2009. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. *Calcified Tissue International* 84, 45–55.

- Villarino, M.E., Sánchez, L.M., Bozal, C.B., Ubios, Á.M., 2006. Influence of short-term diabetes on osteocytic lacunae of alveolar bone. *Acta odontologica latinoamericana* 19, 23-28.
- Vital, P., Larrieta, E., Hiriart, M., 2006. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol* 190(2), 425-32. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06596>
- von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C.F., 1997. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem* 45(3), 632-638. <https://doi.org/10.1021/jf960281n>
- Wang, C.P., Li, J.L., Zhang, L.Z., Zhang, X.C., Yu, S., Liang, X.M., Ding, F., Wang, Z.W., 2013. Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via suppression of TLR4-NF- κ B signal pathway. *Neurochem Int* 63, 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.09.018>
- Wang, C.P., Shi, Y.W., Tang, M., Zhang, X.C., Gu, Y., Liang, X.M., Wang, Z.W., Ding, F., 2017. Isoquercetin Ameliorates Cerebral Impairment in Focal Ischemia Through Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Effects in Primary Culture of Rat Hippocampal Neurons and Hippocampal CA1 Region of Rats. *Mol Neurobiol* 54, 2126–2142. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9806-5>
- Wang, Q.I., Huo, X.C., Wang, J.H., Wang, D.P., Zhu, Q.I., Liu, B., Xu, I.I., 2017. Rutin prevents the ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 21, 1911-1917.
- Wei, Y., Chen, P., de Bruyn M.D., Zhang, W., Bremer, E., Helfrich, W., 2010. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol* 10, 42. doi: 10.1186/1471-230X-10-42.
- Welt, K., Weiss, J., Martin, R., Dettmer, D., Hermsdorf, T., Asayama, K., Meister, S., Fitzl, G., 2004. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes and acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract. *Exp Toxicol Pathol* 55, 331–45. doi: 10.1078/0940-2993-00337.
- Wiater, A., Pleszczyńska, M., Próchniak, K., Szczodrak, J., 2008. Anticariogenic activity of the crude ethanolic extract of *Potentilla erecta* (L.) Raeusch. *Herba Polonica* 54(2), 41-45.
- Wilkinson, P.D., Delgado, E.R., Alencastro, F., Leek, M.P., Roy, N., Weirich, M.P., Stahl, E.C., Otero, P.A., Chen, M.I., Brown, W.K., Duncan, A.W., 2019. The Polyploid State Restricts Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration in Mice. *Hepatology* 69, 1242–1258. <https://doi.org/10.1002/hep.30286>

- Wilkinson-Berka, J.L., 2006. Angiotensin and diabetic retinopathy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38, 752–765.
- Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., Kunz, W., 2015. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie* 19, 754-765. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.12.014>
- Wu, Y., Tang, L., Chen, B., 2014. Oxidative Stress: Implications for the Development of Diabetic Retinopathy and Antioxidant Therapeutic Perspectives. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity* 2014(14), 752387.
- Xu, T., Brandmaier, S., Messias, A.C., Herder, C., Draisma, H.H.M., Demirkan, A., Yu, Z., Ried, J.S., Haller, T., Heier, M., Campillos, M., Fobo, G., Stark, R., Holzapfel, C., Adam, J., Chi, S., Rotter, M., Panni, T., Quante, A.S., He, Y., Prehn, C., Roemisch-Margl, W., Kastenmuller, G., Willemsen, G., Pool, R., Kasa, K., van Dijk, K.W., Hankemeier, T., Meisinger, C., Thorand, B., Ruepp, A., de Angelis, M.H., Li, Y., Wichmann, H.E., Stratmann, B., Strauch, K., Metspalu, A., Gieger, C., Suhre, K., Adamski, J., Illig, T., Rathmann, W., Roden, M., Peters, A., van Duijn, C.M., Boomsma, D.I., Meitinger, T., Wang-Sattler, R., 2015. Effects of metformin on metabolite profiles and LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 38, 1858–1867. <https://doi.org/10.2337/dc15-0658>
- Yan, Y., Zhou, Z., Kong, F., Feng, S., Li, X., Sha, Y., Zhang, G., Liu, H., Zhang, H., Wang, S., Hu, C., Zhang, X., 2016. Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery Suppresses Hepatic Gluconeogenesis and Increases Intestinal Gluconeogenesis in a T2DM Rat Model. *Obes Surg* 26, 2683–2690. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2157-5>
- Yang, B.R., Cha, S.H., Lee, K.E., Kim, J.W., Lee, J., Shin, K.H., 2021. Effect of dipeptidyl peptidase IV inhibitors, thiazolidinedione, and sulfonylurea on osteoporosis in patients with type 2 diabetes: population-based cohort study. *Osteoporosis International* 2021 32:9 32, 1705–1712. <https://doi.org/10.1007/S00198-020-05801-6>
- Yang, R.Y., Tsou, S.C.S., Lee, T.C., Chang, L-C., Kuo, G., Lai, P-Y., 2006. Moringa, a novel plant rich in antioxidants, bioavailable iron, and nutrients. *Am Chem Soc Symp Series* 925(17), 224-239.
- Yao, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, J., Wang, Y. 2013. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Chicorium gladiosum* seeds. *Food Chemistry* 139(1-4), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.045>

- Yau, J.W.Y., Rogers, S.L., Kawasaki, R., Lamoureux, E.L., Kowalski, J.W., Bek, T., Chen, S.J., Dekker, J.M., Fletcher, A., Grauslund, J., 2012. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 35(3), 556-564.
- Yehye, W.A., Rahman, N.A., Ariffin, A., Hamid, S.B.A., Alhadi, A.A., Kadir, F.A., Yaeghoobi, M., 2015. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylates hydroxitoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 101, 295-312.
- Yi, JH., Moon, S., Cho, E., Kwon, H., Lee, S., Jeon, J., Park, AY., Lee, HL., Kwon, KJ., Ryu, JH., Jeon, SJ., Shin, CY., Shim, SH., Kim, DH. 2022. Hyperoside improves learning and memory deficits by amyloid β 1-42 in mice through regulating synaptic calcium-permeable AMPA receptors. *EJP* 931, 175188. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175188>
- Yin, Y., Chen, F., Wang, W., Wang, H., Zhang, X., 2017. Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling pathway. *Molecular Vision* 23, 242.
- Yokoyama, A., Sakakibara, H., Crozier, A., Kawai, Y., Matsui, A., Terao, J., Kumazawa, S., Shimoi, K., 2009. Quercetin metabolites and protection against peroxynitrite-induced oxidative hepatic injury in rats. *Free Radic Res* 43, 913-21.
- Yu, P., Sprague, M., Egan, M.A.R., Castleman, G.H., Leury, B.J., 2001. Comparison of raw and roasted nerbo beans (*Vicia narbonensis*) on performance and meat sensory attributes of lambs fed a roughage-based diet. *Anim Feed Sci Technol* 92(1), 1-16.
- Zeb, A., Haq, A., Murkovic, M., 2019. Effects of microwave cooking on carotenoids, phenolic compounds and antioxidant activity of *Cichorium intybus* L. (chicory) leaves. *Eur Food Res Technol* 245, 365–374. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3168-3>
- Zeiger, E., 2003. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mutant Res* 543, 191-194. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00111-4)
- Zengin, G., Mollica, A., Aktumsek, A., Picot, C.M.N., Mahomoodally, M.F., 2017. *In vitro* and *in silico* insights of *Cupressus sempervirens*, *Artemisia absinthium* and *Lippia triphylla*: Bridging traditional knowledge and scientific validation. *EUJIM* 12, 135-141. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.eujim.2017.05.010>
- Zhang, C-Y., He, F-F., Su, H., Zhang, C., M, X-F., 2020. Association between chronic kidney disease and Alzheimer's disease: an update. *Metab Brain Dis* 35(6), 883-894. [10.1007/s11011-020-00561-y](https://doi.org/10.1007/s11011-020-00561-y).

- Zhang, L., He, S., Yang, F., Yu, H., Xie, W., Dai, Q., Zhang, D., Liu, X., Zhou, S., Zhang, K., 2016. Hyperoside ameliorates glomerulosclerosis in diabetic nephropathy by downregulating miR-21. *Can J Physiol Pharmacol* 94(12),1249-1256.
- Zhang, R., Yao, Y., Wang, Y., Ren, G., 2011. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-Ay mice. *Nutrition & Metabolism* 8, 85.
- Zhang, Y., Wang, M., Dong, H., Yu, X., Zhang, J., 2018. Anti-hypoglycemic and hepatocyte-protective effects of hyperoside from *Zanthoxylum bungeanum* leaves in mice with high-carbohydrate/high-fat diet and alloxan-induced diabetes. *Int J Mol Med* 41, 77–86. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3211>
- Zhen, D., Chen, Y., Tang, X., 2010. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabet Complications* 24, 334–344.
- Zhou, J., Zhang, S., Sun, X., Lou, Y., Bao, J., Yu, J., 2021. Hyperoside ameliorates diabetic nephropathy induced by STZ via targeting the miR-499–5p/APC axis. *J Pharmacol Sci* 146, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2021.02.005>
- Zhou, L., An, X.F., Teng, S.C., Liu, J.S., Shang, W.B., Zhang, A.H., Youan, Y.G., Zu, J.Y., 2012. Pretreatment with the total flavone glycosides of *Flos Abelmoschus manihot* and hyperoside prevents glomerular podocyte apoptosis in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *J Med Food* 15(5),461-468.
- Zimmerman, B.R., 1997. Sulfonilueras. *Current therapies for diabetes* 26(3)1, 511-522.
- Zlatković, B.K., Bogosavljević, S.S., Radivojević, A.R., Pavlović, M.A., 2013. Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison. *J Ethnopharmacol* 151, 704-713.
- Životić, D., Životić, D., 1979. *Lekovito bilje u narodnoj medicini*, 5th edition, Otokar keršovani – Rijeka, Beograd, Jugoslavija.

8. Прилози

Листа скраћеница

- AGE** – (енгл. *advanced glycation end-product*) крајњи продукт гликозилације
- мтДНК** – митохондријална ДНК
- LDL** – (енгл. *low-density lipoprotein*) липопротеин мале густине
- HDL** – (енгл. *high-density lipoprotein*) липопротеин велике густине
- VLDL** – (енгл. *very low density lipoprotein*) липопротеин веома мале густине
- DAG** – (енгл. *diacylglycerol*) диацилглицерол
- PKC** – (енгл. *protein kinase C*) протеин киназа Ц
- VEGF** – (енгл. *vascular endothelial growth factor*) васкуларни ендотелијални фактор раста
- RAGE** – (енгл. *receptor for advanced glycation end products*) рецептор за AGE
- BDNF** – (енгл. *brain-derived neurotrophic factor*) неуротрофни мождани фактор
- TrkB** – (енгл. *tropomyosin receptor kinase B*) киназни рецептор тропомиозина Б
- PI3K** – (енгл. *phosphatidylinositol 3-kinase*) фосфатидилинозитол 3-киназа
- IGF-1** – (енгл. *insulin-like growth factor-1*) инсулину сличан фактор раста-1
- HbA1c** – гликозилирани хемоглобин А1с
- IDE** – (енгл. *insulin-degrading enzyme*) ензима деградације инсулина
- IAPP** – (енгл. *islet amyloid polypeptide*) амилоидни полипептид остраваца
- SGLT** – (енгл. *sodium-glucose linked transporter*) натријум -глукозни транспортер
- АТР** – (енгл. *adenosine triphosphate*) аденозин трифосфат
- GLUT4** – (енгл. *glucose transporter 4*) глукозни транспортер 4
- TNF- α** – (енгл. *tumor necrosis factor α*) фактор некрозе тумора- α
- GAE** – (енгл. *galic acid equivalent*) еквивалента галне киселине

QuE – (енгл. *quercetin equivalent*) еквивалент кверцетина

DPPH – 2,2-дифенил-1-покрилхидразил

BHT – (енгл. *butylated hydroxytoluene*) бутиловани хидрокситоулен

DNSA – (енгл. *3,5-dinitrosalicylic acid*) 3,5 -динитросалицилна киселина

DMSO – (енгл. *dimethyl sulfoxide*) диметил сулфоксид

A – apsorbanca

PBS – (енгл. *phosphate buffer saline*) слани фосфатни пуфер

HPLC – (енгл. *High-performance Liquid Chromatography*) течна хроматографија високе преформансе

DAD-UV – (енгл. *Diode-Array Ultraviolet Detector*) ултравиолетни детектор са низом диода

НД-К – (не-дијабетична) контролна група здравих животиња

Д-К – контролна група дијабетичних животиња

Д-2.5 – група дијабетичних животиња третирана биљном мешавином I (2,5 g/kg)

Д-5 – група дијабетичних животиња третирана биљном мешавином I (5 g/kg)

Д-10 – група дијабетичних животиња третирана биљном мешавином I (10 g/kg)

Д-15 – група дијабетичних животиња третирана биљном мешавином I (15 g/kg)

Д-И – група дијабетичних животиња третирана инсулином

Д-Г – група дијабетичних животиња третирана глимепиридом

З-К – контролна група здравих животиња

З-2.5 – група здравих животиња третирана биљном мешавином I (2,5 g/kg)

З-5 – група здравих животиња третирана биљном мешавином I (5 g/kg)

З-10 – група здравих животиња третирана биљном мешавином I (10 g/kg)

З-15 – група удравих животиња третирана биљном мешавином I (15 g/kg)

AST – (енгл. *aspartat transaminase*) аспартат трансминаза

- ALT** – (енгл. *alanine transaminase*) аланин трансминаза
- ALP** – (енгл. *alkaline phosphatase*) алкалне фосфатаза
- MDA** – (енгл. *malondialdehyde*) малондиалдехид
- TCA** – (енгл. *trichloroacetic acid*) трихлорсирћетна киселина
- TBA** – (енгл. *tiobarbituric acid*) тиобарбитурном киселином
- TBARS** – (енгл. *tiobarbituric acid reactive substance*) реактивну субстанцу тиобарбитурне киселине
- ХЕ** – хематоксилин и еозин
- ПАС** – перјодна киселина и Шифов реагенс
- ГСИ** – гломерулосклеротски индекс
- КДК** – кортикални део кости
- ЕК** – епифиза кости
- С + УС** – спољашњи и унутрашњи сегмент
- СНС** – спољашњи нуклеарни слој
- УНС** – унутрашњи нуклеарни слој
- ГС** – ганглијски слој
- СА** - *Cornu amonis*
- ANOVA** – (енгл. *analysis of variance*) анализа варијансе
- ИЦ₅₀** – половина максималне инхибиторне концентрације
- БМ-I** – биљна мешавина-I
- БМ-II** – биљна мешавина-II
- БМ-III** – биљна мешавина-III
- Н:Ц** – нуклеус:цитоплазма
- МХ** – моноклеусни хепатоцити
- БХ** – бинуклеусни хепатоцити

ERK – (енгл. *extracellular signal-regulated kinase*) киназа регулисана екстрацелуларним сигналом

АКТ – серин /тхреонин киназа или протеин киназа Б

PI3K – (енгл. *phosphoinositide 3-kinase*) фосфоинозитид 3-киназа

ER α – (енгл. *estrogen receptro*) естрогенски рецептор α

RANKL – (енгл. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) лиганд рецепторског активатора за нуклеарни фактор каппа Б

АМРА – (енгл. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*) α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионска киселина

IL-6 – (енгл. *interleukin 6*) интерлеукин 6

Извод

Дијабетес је системски метаболички поремећај угљених хидрата и липида, где хронична хипергликемија доводи до низа секундарних компликација попут дијабетесног поремећаја не-алкохолне масне јетре, нефропатије, ретинопатије, остеопорозе и Алцхајмерове болести. Прописана стандарна фармаколошка терапија дијабетеса се фокусира на одржавање нормалног нивоа шећера у крви, али не и на секундарне компликације које су чешћи узрок смрти оболелих од дијабетеса.

С тога су циљеви студије били испитивање и упоређивање биолошке активности три мешавине лековитог биља са потенцијалним антидијабетским својствима и компаративно испитивање ефеката најефективније биљне мешавине и једне од група стандардне терапије дијабетеса – деривата сулфонилурее, на секундарне компликације дијабетеса. Упоредна анализа биолошких активности биљних мешавина испитане су *in vitro* тестовима антиоксидативне, антиамилазне и цитопротективне активности и тестом цитотоксичности, док је компаративни ефекат најефективније биљне мешавине и деривата сулфонилурее на дијабетес и његове секундарне компликације утврђен *in vivo* студијом на анималном моделу.

Резултати *in vitro* испитивања показали су да је биљна мешавина-I показала највећу антиоксидативну, антиамилазну и цитопротективну активности, а притом и низак ниво цитотоксичности у поређењу са остале две биљне мешавине, на основу чега је процењена као најефективнија и најбезбеднија. HPLC анализом је у препарату биљне мешавине-I идентификовано 21 полифенолно једињење: катехин и 7 деривата катехина, *p*-хидроксибензоева киселина, дериват *p*-хидроксибензоеве киселине, кафеинска киселина, хлорогена киселина, цикорична киселина, два непозната деривата кафеинске киселине, хиперозид, изокверцетин, рутин, кверцитрин, изокверцитрин, изорамнетин и један непознати дериват кверцетина. Резултати *in vivo* студије показали су да биљна мешавина-I није токсична при дугорочној употреби и да ефикасније регулише ниво глукозе у крви и липидни статус животиња и да поседује већи хепатопротективни, нефропротективни и остеопротективни ефекат и велики потенцијал у спречавању развоја ретинопатије и Алцхајмерове болести од стандардне антидијабетске терапије (деривата сулфонилурее и инсулина) на дијабетичном моделу пацова.

Summary

Diabetes is a systemic disorder of carbohydrate and lipid metabolism in which chronic hyperglycemia leads to a number of secondary complications such as non-alcoholic fatty liver disease, nephropathy, retinopathy, osteoporosis, and Alzheimer's disease. Standard pharmacotherapy for diabetes focuses on regulating blood glucose levels, but not on the secondary complications that are the most common cause of death in diabetic patients.

Therefore, the aims of the study were to evaluate and compare the biological activity of three herbal mixtures with potential antidiabetic activity and to compare the effect of the most effective herbal mixture with the effect of one of the standard antidiabetic drugs - a sulfonylurea derivative - on the secondary complications of diabetes. Comparative analysis of the biological activities of herbal mixtures was evaluated by *in vitro* tests of antioxidant, antiamylase, and cytoprotective activity and cytotoxicity, while the comparative analysis of the most potent herbal mixture effect and sulfonylurea derivative effect on diabetes and its secondary complications was determined by an *in vivo* study in a rat model.

The results of the *in vitro* study showed that herbal mixture-I was the most effective one in terms of the highest antioxidant, antiamylase, and cytoprotective activities, as well as a low level of cytotoxicity. HPLC analysis identified 21 polyphenolic compounds in the preparation of herbal mixture-I: catechin and 7 catechin derivatives, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid derivatives, caffeic acid, chlorogenic acid, chicoric acid, two caffeic acid derivatives, hyperoside, isoquercetin, rutin, quercitrin, isoquercetin, isorhamnetin and a quercetin derivative. The results of the *in vivo* study showed that the polyherbal mixture-I was non-toxic in long-term use and more effective in regulating blood glucose levels and lipid status of animals, had higher hepatoprotective, nephroprotective, and osteoprotective effects, and great potential in preventing the development of retinopathy and Alzheimer's disease than standard antidiabetic therapy (sulfonylurea derivative and insulin) in a diabetic rat model.

Биографија са библиографијом

Биографија

Александра Г. Петровић је рођена 14.07.1994. у Лесковцу. Основну школу “Бора Станковић” у Вучју је завршила 2009. године, а средњу школу, гимназију “Гимназија Лесковац”, у Лесковцу, 2013. године. Основне академске студије биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу, уписала је 2013. године, а завршила 2016. године. Мастер академске студије биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу уписала је 2016. године, а завршила 2018. године са одбрањеним мастер радом на тему “Утицај пириметанила на хистолошку грађу штитне и надбубрежне жлезде”.

Године 2018. уписала је Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу, и још увек је студент докторских студија. Исте године стекла је звање истраживач-приправник на Природно-математичком факултету, Универзитета у Нишу, а 2021. године и звање истраживач-сарадник. Од 2018. до 2019. године била је учесник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом „Виртуелни коштаноглобни систем човека и његова примена у претклиничкој и клиничкој пракси“ (ИИИ4107).

Од 2018. године ангажована је у извођењу наставе у виду вежби на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу на департману за биологију и екологију на предметима Биологија ћелије, Развиће животиња, Физиологија животиња, Упоредна физиологија животиња. Године 2019. похађала је стручну праксу из области скелетохронологије на водоземцима, на Универзитету Овидиус у Констанци у Румунији, путем „Erasmus+ Traineeship“ програма размене студената. Школске 2019/20. и 2020/21. године добила је радно ангажовање за извођење наставе у специјализованим одељењима за ученике са посебним способностима за биологију и хемију у гимназији “Бора Станковић” у Нишу, од стране Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, а у сарадњи са гимназијом “Бора Станковић” у Нишу.

Од 2019. године је учесник на научним скуповима од међународног значаја. Објавила је један ауторски и један коауторски рад у часописима од врхунског међународног значаја, један ауторски рад у часопису од међународног значаја и један ауторски рад у часопису од врхунског националног значаја.

Библиографија

А: Радови у врхунским међународним часописима (M21):

Petrović A, Madić V, Zlatković B, Zlatanović I, Stojanović G, Vasiljević P, Đorđević Lj: Antidiabetic effects of polyherbal mixture made of *Centaureum erythraea*, *Cichorium intybus* and *Potentilla erecta*. Journal of Ethnopharmacology, 2023. 117032. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117032>

Madić V, **Petrović A**, Jušković M, Jugović D, Djordjević Lj, Stojanović G, Vasiljević P: Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes. Journal of Ethnopharmacology, 2021. 265,113210. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113210>

Б: Радови у међународним часописима (M23):

Petrović A, Madić V, Jušković M, Đorđević Lj, Vasiljević P. Osteoprotective effects of 'anti-diabetic' polyherbal mixture in type 1 diabetic rats. Acta Veterinaria – Beograd, 2021. 71(3), 256-272.

В: Радови у часописима од врхунског националног значаја (M51):

Petrović A., Stojković, K., Madić, V., Đorđević. Lj.: *In vitro* antioxidant and antidiabetic potential of herbal mixture traditionally used in treatment of *diabetes mellitus*. Biologica Nyssana, 2022. 13(2): 165-172.

Г: Саопштења на научним скуповима од међународног значаја штампана у изводу (M34):

Madić V, **Petrović A**, Jušković M, Žabar-Popović A, Aleksić M, Vasiljević P: Hypoglycemic effect of traditionally used herbal mixture in normal and diabetic rats. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina Mt., 2019. 172

Petrović A, Madić V, Mladenović N, Stojković K, Zlatković B, Vasiljević P, Đorđević Lj. Antioxidative, antidiabetic and cytoprotective activity of two polyherbal mixtures and five medical plants traditionally used in type 2 diabetes therapy. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, 2022. 191

Madić V, **Petrović A**, Žabar Popović A, Maksimović B, Jušković M, Vasiljević P. Biological activity of 'anti-diabetic' herbal mixture and five medicinal plants methanolic and ethanolic extracts. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, 2022. 189

Maksimović B, **Petrović A**, Madić V, Mladenović N, Zlatković B, Vasiljević P, Đorđević Lj. Traditionally used polyherbal mixture ameliorates diabetes-related spleen damage in a rat model of type 2 diabetes. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, 2022. 190

Д: Саопштења на научним скуповима од националног значаја штампана у изводу (М64):

Петровић А, Мадих В, Максимовић Б, Младеновић Н, Златковић Б, Васиљевић П, Ђорђевић Љ. Ефекат традиционалне мешавине лековитог биља на стање бубрега код пацова са почетном дијабетесном нефропатијом. Трећи конгрес биолога Србије, Златибор, 2022. 353.

Петровић А, Мадих В, Младеновић Н, Максимовић Б, Златковић Б, Васиљевић П, Ђорђевић Љ. Остеопротективно дејство традиционалне мешавине лековитог биља код пацова са дијабетесом типа 2. Трећи конгрес биолога Србије, Златибор, 2022. 354.

Максимовић Б, Мадих В, **Петровић А**, Младеновић Н, Јушковић М, Васиљевић П. Протективни ефекат биљне мешавине на слезину пацова са индукованим дијабетесом типа 1. Трећи конгрес биолога Србије, Златибор, 2022. 358.

Мадих В, **Петровић А**, Максимовић Б, Ђорђевић Љ, Васиљевић П. Утицај инсулина гларгина на редуцију оштећења панкреаса у алоксаном индукованом моделу дијабетеса. Трећи конгрес биолога Србије, Златибор, 2022. 360.

Изјаве аутора

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ЕФЕКТА МЕШАВИНЕ ЛЕКОВИТОГ БИЉА И ДЕРИВАТА СУЛФОНИЛУРЕЕ НА СЕКУНДАРНЕ КОМПЛИКАЦИЈЕ ДИЈАБЕТЕСА КОД ПАЦОВА

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 22.08.2023.

Потпис аутора дисертације:



Александра Г. Петровић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ЕФЕКТА МЕШАВИНЕ ЛЕКОВИТОГ БИЉА И
ДЕРИВАТА СУЛФОНИЛУРЕЕ НА СЕКУНДАРНЕ КОМПЛИКАЦИЈЕ
ДИЈАБЕТЕСА КОД ПАЦОВА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 22.08.2023.

Потпис аутора дисертације:



Александра Г. Петровић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ЕФЕКТА МЕШАВИНЕ ЛЕКОВИТОГ БИЉА И ДЕРИВАТА СУЛФОНИЛУРЕЕ НА СЕКУНДАРНЕ КОМПЛИКАЦИЈЕ ДИЈАБЕТЕСА КОД ПАЦОВА

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делили под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делили под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 22.08.2023.

Потпис аутора дисертације:



Александра Г. Петровић