

# Fitokemijski sastav i biološki učinci biljnih antidiijabetika hrvatske etnomedicine

---

**Bljajić, Kristina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:457755>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Kristina Bljajić

**FITOKEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI  
UČINCI BILJNIH ANTIDIJABETIKA  
HRVATSKE ETNOMEDICINE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Kristina Bljajić

**PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND  
BIOLOGICAL ACTIVITY OF CROATIAN  
ETHNOMEDICINE ANTIDIABETICS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Kristina Bljajić

**FITOKEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI  
UČINCI BILJNIH ANTIDIJABETIKA  
HRVATSKE ETNOMEDICINE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić

Zagreb, 2018.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Kristina Bljajić

**PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND  
BIOLOGICAL ACTIVITY OF CROATIAN  
ETHNOMEDICINE ANTIDIABETICS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Assoc. Prof. Marijana Zovko Končić, PhD

Zagreb, 2018.

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u području biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za Farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić, što mi je omogućila izradu doktorskog rada uz nesebične savjete i pomoć te veliku potporu i razumijevanje tijekom svih ovih godina.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Roberti Petlevski, doc. dr. sc. Lovorki Vujić i doc. dr. sc. Jasni Jablan na suradnji koja je bila važan dio ovog rada.

Kolegicama Adrijani, Barbari, Andrei, Ani, Nini, lektorici Ines...hvala na pomoći.

Svim djelatnicima Zavoda za farmakognoziiju zahvaljujem na pomoći i susretljivosti.

Najveće hvala mojoj obitelji na strpljenju i potpori, posebno sinu Josipu.

## Sažetak

Dijabetes je rastući zdravstveni problem u razvijenom svijetu. Uz konvencionalne lijekove koji učinkovito snižavaju razinu šećera u krvi, brojni oboljeli koriste i fitoterapijske pripravke. U radu su prikupljeni podaci o tome koje se biljne droge preporučuju i prodaju kao antidijabetici na tržnicama u najvećim hrvatskim gradovima. Istražen je kemijski sastav i biološki učinak vodenih i etanolnih (80 %) ekstrakata sljedećih biljnih droga: zeleni stolisnika (*Achillea millefolium*), pelina (*Artemisia absinthium*) i kičice (*Centaureum erythraea*), zatim listova breze (*Betula pendula*), bijelog duda (*Morus alba*), kadulje (*Salvia officinalis*) i borovnice (*Vaccinium myrtillus*), ljuski graha (*Phaseolus vulgaris*) te cvijeta bazge (*Sambucus nigra*). TXRF analiza pokazala je da biljni materijal nije sadržavao teške metale, dok je zelen pelina sadržavala krom, metal čiji se nedostatak povezuje s razvojem inzulinske rezistencije. U ekstraktima je određena i uspoređena količina različitih skupina biljnih polifenola te ispitana njihova antioksidativna aktivnost pomoću tri testa, kao i sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Istraživanja su pokazala da su etanolni ekstrakti, a posebice ekstrakt lista borovnice, bogatiji polifenolnim spojevima od vodenih. Najzastupljeniji među ispitivanim polifenolima bili su rutin i klorogenska kiselina. Ispitivani ekstrakti pokazali su i značajno antiradikalno djelovanje te inhibiciju degradacije  $\beta$ -karotena, dok je kelirajuća aktivnost bila slabije izražena. Etanolni i vodeni ekstrakti lista duda i borovnice te etanolni ekstrakti lista breze i zeleni stolisnika inhibirali su enzim  $\alpha$ -glukozidazu u jednakoj mjeri kao akarboza. Ekstrakti lista breze i lista borovnice normalizirali su koncentraciju reducirana glutationa u Hep G2 stanicama izloženima glukozom induciranom oksidativnom stresu. Sve navedeno ukazuje na značajan antidijabetički potencijal odabranih biljnih vrsta koje se u hrvatskoj etnomedicini koriste kao komplementarna terapija dijabetesa.

**Ključne riječi:** antioksidativna aktivnost, inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze, glutation, polifenoli, teški metali.



## Extended summary

**Background:** Diabetes is a chronic disease with growing prevalence worldwide. In addition to conventional therapy, many patients use phytotherapeutic preparations for the management of diabetes. Besides in pharmacies, those products are often purchased in city markets. However, their usefulness in terms of diabetes and its complications is often unknown.

**Aims:** To perform a detailed analysis of structure of herbalists working in urban environments in Croatia, as well as to record the products that they recommend as complementary therapy of diabetes. Additionally, the phytochemical composition and biological activity of species most used for phytotherapy of diabetes, as well as the species which use is characteristic for Croatia, will be further analyzed.

**Methods:** The herbalists were interviewed in the nine biggest cities of Croatia. The interview consisted of the open-type and closed-type questions. The data on sociodemographic characteristics, sources of their plant material and medicinal-plant related knowledge, as well as the plants that they recommend as complementary therapy of diabetes was collected. Based on the frequency of the recommendation and the subsequent literature search, several plants were selected for further study. The content of metals potentially useful in therapy of diabetes, as well of heavy metals, was assessed in plant material using total reflection X-ray fluorescence (TXRF). Two types of extracts were prepared by ultrasonication using water and 80% ethanol as solvent. Total phenolic content and total flavonoid content was determined using Folin–Ciocalteu reagent and aluminum chloride, respectively. The content of hydroxycinnamic acids was evaluated using the nitrite-molybdate reagent. Contents of individual flavonoids and phenolic acids was determined by RP-HPLC. Radical scavenging capacity were evaluated using DPPH free radical, while chelating activity was evaluated by the reaction of ferrozine and  $\text{Fe}^{2+}$  ions. Antioxidant activity in  $\beta$ -carotene-linoleic acid system was also assessed. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase was performed using the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae* and *p*-nitrophenyl-D-glucopyranoside as substrate. The influence of the selected extracts on the reduced glutathione content in glucose-induced oxidative stress in Hep G2 cells was assessed by monitoring the production of yellow colored 5-thio-2-nitrobenzoic acid from 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the appropriate post-hoc test.

**Results:** In this work, the demographic and professional data on herbalists working in the urban areas of Croatia was collected. The plants recommended by the interviewed herbalists as complementary therapy of diabetes were reported. In total, 34 plants were recommended, the

most frequent ones being *Urtica dioica*, *Phaseolus vulgaris*, *Cychorium intybus*, *Artemisia absinthium* and *Vaccinium myrtillus*. They were predominantly using as infuses prepared by mixing several plants. For the further investigation of chemical and biological properties the following plants were selected: areal parts of yarrow (*Achillea millefolium*), wormwood (*Artemisia absinthium*) and common centaury (*Centaureum erythraea*), leaves of silver birch (*Betula pendula*), white mulberry (*Morus alba*), sage (*Salvia officinalis*) and bilberry (*Vaccinium myrtillus*), as well as hulls of beans (*Phaseolus vulgaris*) and elderflower (*Sambucus nigra*). The TXRF analysis has shown that the plant samples did not contain elevated amounts of heavy metals. In addition to that, chromium, the metal important for combating insulin resistance, was found in the wormwood sample.

Aqueous and ethanolic (80 %) extracts were prepared from the selected plants, and the chemical composition and biological activity of the extracts compared. Polyphenolic content was higher in the ethanolic than in the aqueous extracts. The richest in total phenols, flavonoids and phenolic acids were ethanolic bilberry leaf extract ( $423,51 \pm 13,88$  mg GE/g), ethanolic mulberry leaf extract ( $154,51 \pm 22,64$  mg QE/g) and aqueous bilberry leaf extract ( $125,81 \pm 1,32$  mg CAE/g), respectively. Rutin and chlorogenic acid were the most abundant constituents of the extracts. The extracts have shown excellent antiradical activity, as well as the ability to inhibit  $\beta$ -carotene degradation in presence of linoleic acid, with some being as active as the positive control, BHA. Chelating activity, on the other hand, was significantly weaker.  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting activity of the investigated extracts was excellent. The most remarkable examples were the bilberry and the mulberry leaf extracts, as well as ethanolic birch and yarrow extracts. Their activity did not differ from the activity of acarbose. Furthermore, birch and bilberry extracts were able to normalize the reduced glutathione concentration in Hep G2 cells subjected to glucose-induced oxidative stress.

**Conclusions:** The aqueous and ethanolic extracts of selected medicinal plants possessed excellent antidiabetic properties, as demonstrated by the numerous assays performed in this study. In addition to being rich in polyphenols, such as flavonoids and phenolic acids, the extracts have shown the excellent antioxidant properties. Furthermore, the extracts strongly inhibited  $\alpha$ -glucosidase, sometimes with the activity equal to antidiabetic drug acarbose. The selected extracts were able to restore glutathione concentration in Hep G2 cells subjected to glucose-induced oxidative stress. Many of the observed biological properties may be attributed to rutin and chlorogenic acid, the main phenolic components of many of the investigated extracts. Even though the presented results partly explain the extent and popularity of the

selected medicinal plants use as a supportive therapy of diabetes, further studies are needed to assess the potential usefulness of the observed antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibiting and GSH restoring effect in Hep G2 cells.

**Keywords:**  *$\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, glutathione, polyphenols, heavy metals.*

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Šećerna bolest .....	2
1.2.	Farmakološko liječenje šećerne bolesti .....	5
1.3.	Etnomedicina .....	10
1.4.	Ljekovite biljne vrste i njihove sastavnice u terapiji dijabetesa .....	13
1.5.	Ispitivane biljne vrste.....	22
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	30
3.	MATERIJALI I METODE .....	32
3.1.	Kemikalije i uređaji .....	33
3.2.	Prikupljanje etnobotaničkih podataka .....	33
3.3.	Biljni material .....	34
3.4.	Priprema ekstrakata .....	35
3.5.	Određivanje metala TXRF metodom .....	36
3.6.	Određivanje ukupnih polifenola .....	36
3.7.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	36
3.8.	Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....	37
3.9.	HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida.....	37
3.10.	Određivanje antiradikalne aktivnosti .....	38
3.11.	Određivanje kelirajuće aktivnosti .....	39
3.12.	$\beta$ -karoten linoleatna analiza .....	40

3.13.	Ispitivanje inhibitorynog učinka ekstrakata na $\alpha$ -glukozidazu .....	41
3.14.	Kultura Hep G2 stanica.....	41
3.15.	Određivanje reducirana glutaciona .....	42
3.16.	Statistička analiza.....	42
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	43
4.1.	Prikupljanje etnobotaničkih podataka .....	44
4.2.	Biljne vrste preporučene za liječenje šećerne bolesti .....	47
4.3.	Određivanje metala TXRF metodom .....	51
4.4.	Određivanje ukupnih polifenola .....	57
4.5.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	62
4.6.	Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....	64
4.7.	HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida.....	66
4.8.	Određivanje antiradikalne aktivnosti.....	76
4.9.	Određivanje kelirajuće aktivnosti.....	82
4.10.	$\beta$ -karoten linoleatna analiza .....	84
4.11.	Ispitivanje inhibitorynog učinka ekstrakata na $\alpha$ -glukozidazu .....	87
4.12.	Utjecaj na koncentraciju reducirana glutaciona.....	91
5.	ZAKLJUČAK .....	95
6.	LITERATURA.....	98
7.	ŽIVOTOPIS .....	117
8.	PRILOG .....	119

## Kratice

AA\* – *Artemisia absinthium*

AM\* – *Achillea millefolium*

ANT – Antioksidativna aktivnost

BHA – *tert*-butil-4-hidroksianisol

BP – *Betula pendula*

cAMP – ciklički adenzin-monofosfat

CAT – Katalaza

CE\* – *Centaurium erythraea*

CAE – Ekvivalenti kavene kiseline

DNA – Deoksiribonukleinska kiselina

DPP-4 – Dipeptidil-peptidaza-4

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

GE – Ekvivalenti galne kiseline

GIP – Inzulinotropni polipeptid koji ovisi o glukozi

GLP-1 – Glukagonu sličan peptid-1

GLUT4 - Transporter glukoze tip 4

GPx – Glutation peroksidaza

GSH – Reducirani glutation

GST – Glutation S-transferaza

HbA1c – Glikozilirani hemoglobin

HDL – Lipoproteini velike gustoće

HOCl – Hpoklorasta kiselina

HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

iNOS – Inducibilna sintaza dušičnog kisika

KA – Kelirajuća aktivnost

LDL – Lipoproteini male gustoće

MA\* – *Morus alba*

NADPH – Reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata

PKA – Protein kinaza A

PV\* – *Phaseolus vulgaris*

QE – Ekvivalenti kvercetina

RNA – Ribonukleinska kiselina

ROS – Reaktivni kisikovi spojevi

RSA – Moć hvatanja slobodnih radikala

SGLT1 – Suprijenosnik natrija i glukoze 1

SGLT2 – Suprijenosnik natrija i glukoze 2

SN\* – *Sambucus nigra*

SO\* – *Salvia officinalis*

SOD – Superoksid dismutaza

TXRF – Potpuna refleksija rentgenskih zraka

VM\* – *Vaccinium myrtillus*

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

\* – nastavci -E i -V odnose se na etanolne, odnosno vodene ekstrakte navedenih biljnih

vrsta

## **1. UVOD**



## 1.1. Šećerna bolest

Šećerna bolest ili dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) kronična je metabolička bolest višestruke etiologije karakterizirana povišenim razinama glukoze u krvi. Bolest se javlja kad gušterača više nije u mogućnosti proizvoditi inzulin, hormon koji regulira razinu glukoze, ili kad tijelo ne može iskoristiti proizvedeni inzulin. Hperglikemija ili povišena razina glukoze u krvi česta je posljedica nekontrolirane bolesti i s vremenom dovodi do ozbiljnih oštećenja mnogih tjelesnih sustava, osobito živaca i krvnih žila (www.who.int, 2017).

Šećerna bolest jedan je od najznačajnijih javno-zdravstvenih problema razvijenih zemalja diljem svijeta od koje trenutno boluje 415 milijuna odraslih osoba u svijetu. Nastavi li se sadašnji rast, prognozira se da će do 2040. bolovati 642 milijuna ljudi. Procjenjuje se da 59,8 milijuna stanovnika Europe ima dijabetes s prevalencijom od 9,1 % populacije u dobi od 20 do 79 godina, prema podacima iz 2015. godine, i predviđa se da će 71,1 milijuna ljudi imati dijabetes do 2040. godine. Starenje europske populacije važan je čimbenik rizika razvoja dijabetesa te ima za posljedicu veliku prevalenciju dijabetesa tipa 2 u Europi (www.diabetesatlas.org). U Hrvatskoj je zabilježeno 216 000 oboljelih odraslih osoba u dobi od 20 do 79 godina s prevalencijom od 6,8 % u 2015. godini (www.idf.org, 2015).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, šećerna bolest klasificira se u nekoliko oblika koji se međusobno razlikuju prema etiologiji i mogućnosti liječenja.

Dijabetes tipa 1 (prije zvan juvenilni ili ovisan o inzulinu) definira se značajnim ili potpunim nedostatkom inzulina s ili bez naznaka autoimune destrukcije  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače (Pavlić Renar, 2009). Do razvoja bolesti dolazi zbog prisutne genetske predispozicije i poticaja okolišnih čimbenika. Može se pojaviti u svakoj životnoj dobi iako je češća pojavnost u djece i mladih. Okolišni čimbenici koji se povezuju s povećanim rizikom od razvoja šećerne bolesti tipa 1 jesu virusi – koksaki (*coxsackie*) B, citomegalovirus, enterovirusi, echovirusi, Epstein Barr virus, virus parotitisa, rotavirusi, kratko razdoblje dojenja i rano izlaganje proteinima kravljeg mlijeka, nizak unos cinka, nedostatak vitamina D, starija dob roditelja, porođajna težina i dobivanje na tjelesnoj masi u dojenačkoj dobi te stresni događaji (Poljičanin i Metelko, 2009). U mladih osoba bolest često počinje naglo, s izraženim simptomima hipoglikemije (poliurija, polidipsija, glad), dok se u starijih početak razvija sporije (Pavlić Renar, 2009). Iako su poznati potencijalni rizični čimbenici razvoja dijabetesa, učinkovite mjere prevencije za ovaj tip bolesti još nisu pronađene.

Dijabetes tipa 2 (prije zvan adultni oblik ili neovisan o inzulinu) heterogena je skupina oboljenja karakterizirana različitim stupnjevima inzulinske rezistencije, poremećenim djelovanjem i/ili lučenjem inzulina uz povećanu proizvodnju glukoze u jetri procesom glukoneogeneze (Kokić, 2009). Najučestaliji je oblik bolesti te čini 85 % – 95 % svih bolesnika oboljelih od šećerne bolesti (Poljičanin i Metelko, 2009). Rizik od razvoja uvjetovan je genetskim naslijeđem te načinom života koji uključuje prekomjernu težinu, nezdravu prehranu i fizičku neaktivnost. Simptomi mogu biti slični onima dijabetesa tipa 1, ali često su manje uočljivi ili odsutni, što rezultira godinama nedijagnosticiranom bolesti, sve do pojave komplikacija. Zato dijagnozu treba uzeti u obzir i pri prisutnosti rekurirajuće kožne infekcije, koronarnih srčanih oboljenja, perifernih vaskularnih oboljenja, inkontinencije urina, ulceracije stopala, periferne neuropatije te erektilne disfunkcije (Kokić, 2009).

Propadanje (apoptoza) vjerojatno je glavni oblik smrti  $\beta$ -stanica gušterače u oba navedena oblika bolesti. Nedavne studije ukazuju na to da oba oblika šećerne bolesti karakterizira ekspresija upalnih medijatora (osobito citokin interleukina IL-1 $\beta$ ) unutar Langerhansovih otočića, izazivajući konačan zajednički put apoptoze, progresivni gubitak  $\beta$ -stanica i dijabetes (Cnop i sur., 2005).

Gestacijski dijabetes privremeno je stanje koje se javlja u trudnoći i prestaje završetkom trudnoće, a javlja se u jedne od 25 trudnoća. Vrijednosti su glukoze u krvi iznad normalnih, ali još ispod razine za postavljanje dijagnoze dijabetesa. Dijagnosticira se testovima tijekom prenatalnog pregleda, a ne prijavljenim simptomima. Predstavlja rizik od razvoja komplikacija u trudnoći i tijekom poroda za majku i dijete te posljedično za njih predstavlja dugoročan rizik od razvoja dijabetesa tipa 2. U otprilike polovine žena s poviješću gestacijskog dijabetesa razvije se dijabetes tipa 2 pet do deset godina nakon trudnoće (www.idf.org, 2017).

Ostali specifični tipovi šećerne bolesti heterogena su skupina oboljenja koje karakterizira hiperglikemija prouzročena raznim stanjima i bolestima kao što su genetski defekti funkcije  $\beta$ -stanica, genetski defekti inzulinskog djelovanja, bolesti egzokrina dijela gušterače (npr. pankreatitis, trauma / pankreatomija), endokrinopatije (npr. akromegalija, Cushingov sindrom) prouzročene lijekovima ili kemikalijama, infekcijama te drugi genetski sindromi povremeno povezani sa šećernom bolesti, npr. Downov sindrom (Alberti i Zimmet, 1998).

Komplikacije šećerne bolesti postupno se razvijaju tijekom godina kao posljedica neprimjereno kontrolirane glikemije, no počinju mnogo prije nego što se dijagnoza postavi. Glavne su komplikacije makrovaskularne bolesti koje uključuju razna kardiovaskularna oboljenja, zatim mikrovaskularne bolesti poput retinopatije, nefropatije, neuropatije te

dijabetičkog stopala. Rizični čimbenici za razvoj kardiovaskularnih i mikrovaskularnih oboljenja u osoba sa šećernom bolesti su: povišene vrijednosti glikozilirana hemoglobina (HbA1c), debljina, povišeni krvni tlak, povišene vrijednosti kolesterola, pušenje, spol, dob i trajanje bolesti (Poljičanin i Metelko, 2009) te oksidativni stres koji nastaje kao posljedica povišene glikemije (Tibaut i Petrovič, 2016). Početak liječenja šećerne bolesti tipa 2 obuhvaća promjenu prehrane i fizičku aktivnost, a ako to nije dostatno, uvodi se farmakološko liječenje.

Dijabetes je dosegao epidemijske razmjere širom svijeta, a učestalost inzulinske rezistencije, glavni uzročni faktor u ranom razvoju dijabetesa tipa 2 i ključna patofiziološka značajka metaboličkog sindroma, u stalnom je porastu (Evans i Bahng, 2000). Utvrđeno je da hiperglikemija uzrokuje oštećenja tkiva kroz nekoliko glavnih mehanizama: povećanjem intracelularnih produkta uznapredovale glikacije; povećanjem ekspresije receptora za produkte uznapredovale glikacije i njihovih aktivirajućih liganada; povećanjem metabolizma glukoze i drugih šećera preko puta poliola; aktivacijom izoformi proteina kinaze C, signalne molekule koja povećava žilnu permeabilnost i disfunkciju endotela te prekomjernom aktivnosti puta heksozamina. Pokazalo se da se svih pet navedenih mehanizama aktivira prekomjernom proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u mitohondrijima koji uzrokuju nastanak oksidativnog stresa (Rahimi-Madiseh i sur., 2016). ROS-ovi predstavljaju vrstu visoko reaktivnih molekula izvedenih iz metabolizma kisika. To uključuje radikale superoksidne ( $\bullet\text{O}_2$ ), hidroksilne (OH), peroksilne ( $\bullet\text{RO}_2$ ) i ne-radikalne vrste kao što su vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hipoklorasta kiselina (HOCl). Kronična hiperglikemija i oksidativni stres snažno su povezani s mnogim posljedičnim mikrovaskularnim komplikacijama, uključujući retinopatiju, nefropatiju i neuropatiju (Vinayagam i sur., 2016). Suprotno tomu, dijabetička makrovaskularna i srčana oštećenja rezultat su povećane oksidacije masnih kiselina nastalih zbog specifične otpornosti na inzulin (Rahimi-Madiseh i sur., 2016). Slobodne masne kiseline također mogu dovesti do oslobađanja ROS-a, oslobađanja citokina koji mogu dovesti do upalnih procesa povezanih s disfunkcijom organa, oštećenjima mitohondrijske DNA (deoksiribonukleinska kiselina) i smanjenjem funkcije  $\beta$ -stanica gušterače (Rahimi-Madiseh i sur., 2016; Vinayagam i sur., 2016). Mogući mehanizmi oksidativnog stresa u razvoju ovih komplikacija uključuju autooksidaciju glukoze, smanjenu koncentraciju tjelesnih antioksidansa niske molekulske mase poput glutationa i vitamina E te smanjenu aktivaciju antioksidacijskih obrambenih enzima poput katalaze i superoksid dismutaze (Rahimi-Madiseh i sur., 2016).

## 1.2. Farmakološko liječenje šećerne bolesti

Cilj liječenja šećerne bolesti otklanjanje je simptoma vezanih uz hiperglikemiju kako bi se odgodila ili smanjila pojava kroničnih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija bolesti te omogućio što normalniji način života. Standard u procjenjivanju dugoročne kontrole glikemije mjerenje je HbA1c. Pri dužim povišenim razinama glukoze u serumu raste neenzimska glikacija hemoglobina koja odražava glikemiju u prethodna 2 do 3 mjeseca. Glikozilirani hemoglobin treba mjeriti u svih dijabetičara, pri čemu u bolesnika s dijabetesom tipa 1 četiri puta godišnje, dok kod dijabetesa tipa 2 svakih šest mjeseci (Kokić, 2009). Smatra se da bi ciljni HbA1c trebao biti  $\leq 7\%$  (Rahelić i sur., 2016).

Nefarmakološke mjere poput edukacije, oprezna izbora hrane, redovita vježbanja te samokontrole glukoze u plazmi temelj su svakog liječenja šećerne bolesti (Pavlić Renar, 2009; Rahelić i sur., 2016). Farmakološke terapije s mehanizmima djelovanja neovisnima o izlučivanju ili djelovanju inzulina, s prihvatljivim sigurnosnim profilima te niskim rizikom od hipoglikemije i debljanja, mogu povećati mogućnosti bolesnika da ostvare i održe kontrolu glikemije (Cornell, 2015). Nadalje, antihiperglikemijski lijekovi koji potiču gubitak mase, snižavaju krvni tlak i poboljšavaju profil lipida imaju veću vjerojatnost utjecaja na dijabetički morbiditet i mortalitet od lijekova koji samo smanjuju koncentraciju glukoze u plazmi (Abdul-Ghani i sur., 2015). Trenutačno nije dostupan nijedan lijek koji utječe na sve organe i tkiva uključene u patogenezu. Vrlo je važan individualan pristup bolesniku i intenzivirano liječenje kombiniranom terapijom ako se ne postignu ciljne vrijednosti HbA1c. Preporuke se temelje na učinku snižavanja glukoze, djelovanjima koja mogu smanjiti dugoročne komplikacije, podnošljivosti, sigurnosti, jednostavnosti korištenja te cijeni lijekova (Cornell, 2015).

Registrirani lijekovi u Hrvatskoj za liječenje šećerne bolesti mogu se podijeliti u tri glavne skupine: inzuline,  $\beta$ -citotropne lijekove koji stimuliraju  $\beta$ -stanice na lučenje inzulina (derivati sulfonilureje, glinidi, inhibitori enzima dipeptidil-peptidaze 4 i agonisti receptora glukagonu sličnog peptida) i ne- $\beta$ -citotropne lijekove koji hipoglikemijski učinak postižu drugim mehanizmima (bigvanidi, tiazolidindioni, inhibitori suprijenosnika natrija i glukoze 2 (SGLT2) i inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze) (Rahelić i sur., 2016).

## **Inzulini**

Inzulinski pripravci u prošlosti bili su životinjskog podrijetla. U današnjoj primjeni prisutni su humani inzulini proizvedeni DNA tehnologijom s rekombinantnom humanom strukturom te analozi dobiveni modificiranjem molekule humana inzulina (Piljac i Metelko, 2009; Rahelić i sur., 2016). Primjena inzulina redovito je supkutana, osim u rijetkim indikacijama kad se primjenjuje intravenski. Inzulinski preparati općenito se dijele na brzodjelujuće, srednjedugodjelujuće, dugodjelujuće te inzulinske pripravke s bifazičnim djelovanjem (Rahelić i sur., 2016).

Skupinu brzodjelujućih inzulina čine pripravci humanih inzulina i pripravci inzulinskih analoga u kojima je zamijenjen redoslijed aminokiselina (lispro, aspart, glulizin). Zamjena je omogućila izostanak međusobne agregacije inzulina u otopini te njihovu brzu apsorpciju i kraće djelovanje u odnosu na humani inzulin. Primjenjuju se prije obroka u osoba sa šećernom bolesti tipa 2 jer podmiruju potrebu za inzulinom uz obrok (Rahelić i sur., 2016).

Netopljive suspenzije inzulina kombinirane s proteinom protaminom i cinkovim ionima čine srednjedugodjelujuće pripravke inzulina. Na hrvatskom tržištu to su neutralni protaminski Hagedornovi inzulini (NPH). Karakteristična su mutna izgleda, a sastoje se od ekvivalentne količine protamina i inzulina (Piljac i Metelko, 2009). Primjenjuju se kao bazalni inzulini, najčešće u dvije dnevne doze. S obzirom na to da su u obliku suspenzije, iznimno je važno dobro ih resuspendirati prije primjene (Rahelić i sur., 2016).

Dugodjelujući pripravci su bazalni inzulinski analozi. Zbog dugog djelovanja, najčešće se primjenjuju jednom dnevno. Glargin, zahvaljujući svojem pH-u, nakon injekcije u potkožno tkivo stvara mikroprecipitate. Dugotrajna distribucija osigurava se neprestanim otpuštanjem malenih količina inzulina glargina iz mikroprecipitata. Molekule inzulina detemira se međusobno snažno vežu na mjestu injiciranja te se vežu za albumin putem postraničnog lanca masnih kiselina, što mu omogućuje produljenu ravnomjernu koncentraciju i distribuciju do 24 sata. Kod inzulina degludeka nakon supkutane injekcije dolazi do stvaranja topljivih i stabilnih multiheksamera koji tvore depo inzulina u supkutanom tkivu. Postupnim odvajanjem monomera od multiheksamera dolazi do njegova neprestanog i polaganog otpuštanja u cirkulaciju te do djelovanja duljeg od 42 sata (Rahelić i sur., 2016).

Inzulinski analozi s bifazičnim djelovanjem mješavine su brzodjelujućeg inzulina (humanog inzulina ili inzulinskih analoga) i istog inzulina kristaliziranog protaminom, čime se dobije komponenta srednjedugodjelujućeg inzulina. Kombinirani su u omjerima 25/75, 30/70, 50/50 i karakterizira ih mutan izgled. Ovakvi inzulinski analozi primjenjuju se neposredno prije ili tijekom obroka, dok se humani inzulini primjenjuju pola sata prije obroka. Prednost

predmiješanih inzulina pokrivanje je potreba za bazalnom količinom inzulina i prandijalnim potrebama (Piljac i Metelko, 2009; Rahelić i sur., 2016).

U oblik inzulinskog liječenja ubraja se i liječenje inzulinskom pumpom. Kontinuiranom supkutanom primjenom inzulina osigurava se bazalna doza ultrakratkodjelujućeg inzulina, dok pacijent prije svakog obroka dodatno titrira prandijalnu dozu istog inzulina. Prednosti ovog oblika liječenja manje su učestalosti hipoglikemija, bolja glukoregulacija te posljedično manja učestalost komplikacija šećerne bolesti. Nedostaci su učestalije ketoacidoze kod prekida dotoka inzulina jer se u ovoj vrsti terapije ne koristi dugodjelujući inzulin (Piljac i Metelko, 2009).

### **Bigvanidi**

Metformin je aktivni bigvanid koji djeluje na smanjenje proizvodnje glukoze suprimirajući glukoneogenezu i glikogenolizu u jetri, smanjujući inzulinsku rezistenciju, povećavajući osjetljivost jetre i skeletnih mišića na inzulin preko AMP-aktivirane proteinske kinaze te odgađajući apsorpciju glukoze u crijevima (Rizvi i sur., 2015). Poboljšavanje tkivne osjetljivosti na inzulin posredno može poboljšati djelovanje  $\beta$ -stanica. Budući da mehanizam djelovanja nije posredovan inzulinom, ne uzrokuje hipoglikemiju. U kliničkim studijama primjena metformina povezuje se sa stabilnom tjelesnom masom ili s njezinim umjerenim gubitkom (Rahelić i sur., 2016). Metformin ima pozitivan učinak na metabolizam lipida neovisno o svojem djelovanju na razinu glukoze u krvi tako da snižava razinu ukupnoga kolesterola, LDL kolesterola (eng. *low-density lipoprotein*) i triglicerida ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Najčešće su nuspojave gastrointestinalne prirode koje uključuju gubitak teka, mučninu, napuhnutost, proljev i metalni okus u ustima, no u većine su oboljelih prolazne i samo u oko 5 % slučajeva dovode do prekida korištenja terapije. Metformin, ako nije kontraindiciran i ako se podnosi, poželjan je početni farmakološki izbor za liječenje dijabetesa tipa 2 (Rahelić i sur., 2016).

### **Derivati sulfonilureje**

Kao sekretagozi inzulina, derivati sulfonilureje stimuliraju zatvaranje kalijevih kanala  $\beta$ -stanica gušterače te posljedično uzrokuju otpuštanje inzulina (Stumvoll i sur., 2005). Toj skupini pripadaju lijekovi glibenklamid, gliklazid, glikvidon (druga generacija) i glimepirid (treća generacija). Djelovanje se temelji na stimulaciji  $\beta$ -stanica na lučenje inzulina neovisno o razini glukoze, pri čemu je pretpostavka za njihovo djelovanje postojanje očuvanih  $\beta$ -stanica. Oni su lijekovi koji najsnažnije snižavaju glikemiju, no pogoršanje disfunkcije  $\beta$ -stanica i slabljenje njihova djelovanja nastupa znatno brže nego primjenom drugih lijekova (Rahelić i

sur., 2016). Također je objavljeno da imaju i druge učinke kao što su poticanje oslobađanja GPI-proteina (glikozil-fosfatidilinozitol) i aktivaciju nuklearnog transkripcijskog čimbenika PPAR $\gamma$  (engl. *peroxysome proliferator-activated receptor gamma*) (Rizvi i sur., 2015). Lijekovi iz ove skupine uzrokuju povećanje tjelesne mase, a posebice dovode do nakupljanja visceralnoga masnog tkiva. Mogu prouzročiti i pojavu hipoglikemije, što se najrjeđe događa uz primjenu gliklazida, a najčešće uz primjenu glibenklamida (Rahelić i sur., 2016). Rezultati istraživanja provedenog u Velikoj Britaniji (UKPDS, 1998) pokazali su smanjenje rizika od pojave mikrovaskularnih komplikacija upotrebom derivata sulfonilureje, dok je smanjenje rizika od razvoja makrovaskularnih bolesti bilo otprilike 16 %. U istom je istraživanju antihipertenzivna terapija smanjila rizik od makrovaskularnih komplikacija za otprilike 20 %, dok je kombinirana primjena derivata sulfonilureje i antihipertenziva dodatno smanjila taj rizik.

### **Meglitinidi**

Skupina meglitinida (glinida) sastoji se od nateglinida i repaglinida. Nateglinid se veže na isto receptorsko mjesto kao derivati sulfonilureje, dok se repaglinid veže na mjesto blizu istog receptora, pri čemu dovode do otpuštanja inzulina (Stumvoll i sur., 2005). Stimulacija sekrecije inzulina iz  $\beta$ -stanica postiže se brže, uz kraći i intenzivniji učinak, zbog čega se meglitinidi daju neposredno prije obroka ili uz njega. Hipoglikemija je jedna od glavnih nuspojava glinida, no zbog kraćeg poluživota u nekim kontroliranim ispitivanjima, pojavljivala se znatno rjeđe nego kod derivata sulfonilureje (Rahelić i sur., 2016).

### **Inhibitori $\alpha$ -glukozidaze**

Akarboza pripada skupini inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze. Ne djeluje izravno na patofiziologiju šećerne bolesti i ne snižava izravno koncentraciju glukoze u plazmi. Učinak se očituje smanjenjem apsorpcije glukoze iz tankog crijeva, gdje djelomičnom inhibicijom enzima  $\alpha$ -glukozidaze usporava razgradnju disaharida, oligosaharida i polisaharida. Ima antihiperglikemijski učinak, pri čemu sama ne izaziva hipoglikemiju (Rahelić i sur., 2016). Akarboza štiti od razvoja dijabetesa i kardiovaskularnih oboljenja osobe s oštećenom tolerancijom glukoze, odnosno u stanju predijabetesa (Chiasson i sur., 1998). Nadalje, njezina upotreba u osoba s oštećenom tolerancijom glukoze povezana je ne samo sa smanjenjem rizika od progresije dijabetesa nego i sa smanjenjem rizika od razvoja novih slučajeva hipertenzije te smanjenjem rizika od kardiovaskularnih događaja (Ceriello, 2005).

## **Tiazolidindioni**

Tiazolidindioni (glitazoni) aktiviraju specifičan receptor u jezgri koji regulira transkripciju inzulino-odgovarajućih gena PPAR- $\gamma$ . Poboljšavaju osjetljivost na inzulin u masnom tkivu, mišićima i jetri mijenjajući metabolizam i distribuciju masnog tkiva te smanjuju proizvodnju glukoze u jetri. Imaju snažan hipoglikemijski učinak, a ne povećavaju rizik od razvoja hipoglikemije (Rahelić i sur., 2016). Za pioglitazon je, kao sekundarni ishod u velikom kliničkom ispitivanju, uočeno da u oboljelih s prisutnom makrovaskularnom bolesti donosi korist vezanu uz kardiovaskularne događaje (Dormandy i sur., 2005). Nadalje, tiazolidindioni smanjuju cirkulirajuću koncentraciju proinflammatoryh citokina koji potiču rezistenciju na inzulin (npr. tumor nekrotizirajući faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukin 6) te povećavaju koncentraciju adiponektina koji ima inzulin-senzibilizirajuća i protuupalna svojstva (Stumvoll i sur., 2005).

## **Inhibitori dipeptidil-peptidaze-4**

Inkretinski hormoni oslobađaju se iz endokrinih stanica crijeva tijekom obroka. Potiču sekreciju inzulina izazvanu glukozom i mogu biti odgovorni za do 70 % postprandijalnog lučenja inzulina. Oni uključuju glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1) koji stimulira lučenje inzulina i inzulotropni polipeptid koji ovisi o glukozu (GIP), od kojih oba mogu također poticati proliferaciju / neogenezu  $\beta$  stanica i spriječiti njihovu apoptozu. Oba hormona pridonose izlučivanju inzulina od početka obroka, a njihovi se učinci progresivno povećavaju kako raste koncentracija glukoze u plazmi. GLP-1 se iznimno brzo metabolizira i inaktivira enzimom dipeptidil-peptidaza-4 (DPP-4). Učinak inkretina značajno je smanjen ili odsutan u bolesnika s dijabetesom tipa 2 (Holst i sur., 2009).

Inhibitori DPP-4 skupina su oralnih hipolipemika koji inhibiraju degradaciju inkretina GLP-1 i GIP. Nakon obroka prisutne aktivne endogene koncentracije GLP-1 povećavaju se dva do tri puta s DPP-4 inhibitorima (Thornberry i Gallwitz, 2009), a ovisne su o endogenoj sekreciji hormona (Rahelić i sur., 2016). Ovakvo djelovanje dovodi ne samo do povećanja lučenja inzulina, sve dok je prisutna hiperglikemija, nego i do smanjenja izlučivanja glukagona (Thornberry i Gallwitz, 2009). Dobro se podnose, a s obzirom na to da je mehanizam djelovanja ovisan o glukozu, pojava hipoglikemije može biti samo iznimna ili je vezana uz učinak drugog lijeka pri kombiniranom liječenju. DPP-4-inhibitori ne dovode do porasta tjelesne mase u liječenih osoba, odnosno imaju neutralan učinak (Rahelić i sur., 2016).



### **Agonisti GLP-1-receptora**

Pojačavaju lučenje inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače ovisno o glukozi. Zbog razlika u molekularnoj strukturi u odnosu na endogeni inkretinski hormon, otporni su na razgradnju DPP-4 enzimom. Primjena je supkutana. Razlikujemo kratkodjelujuće (eksenatid i liksisenatid) i dugodjelujuće (eksenatid u formulaciji produljena oslobađanja, liraglutid, albiglutid, dulaglutid) agoniste GLP-1. Imaju dodatne poželjne učinke vezane uz čimbenike kardiovaskularnog rizika kao što su smanjenje tjelesne mase, sniženje arterijskog tlaka i poboljšanje lipidnog profila (Rahelić i sur., 2016).

### **Inhibitori SGLT2**

U početnom dijelu proksimalnog tubula bubrega nalazi se SGLT2 i odgovoran je za reapsorpciju od 80 % do 90 % filtrirane glukoze (Abdul-Ghani i sur., 2015). Inhibitori SGLT2 smanjuju prijenos glukoze i natrija iz lumena proksimalnih tubula u krv i pojačavaju izlučivanje glukoze u urinu. Istodobno, tekućina proksimalnog tubula, koja sadrži nisku koncentraciju klorida zbog inhibicije SGLT2, prenosi se u Henleovu petlju. Kada su razine klorida niske, mehanizmi reapsorpcije Henleove petlje ne djeluju, poput stanja kad u petlji djeluju diuretici tako da dolazi do snižavanja krvnog tlaka. Dakle, kombiniranim metaboličkim i hemodinamskim djelovanjem sinergistički se smanjuje rizik koji dovodi do ateroskleroze i oštećenja organa (Kimura, 2016). Budući da je djelovanje SGLT2 inhibitora neovisno o inzulinu, postoji manji rizik od hipoglikemije u usporedbi s lijekovima koji ovise o inzulinu, dok povećano izlučivanje glukoze i povezanih kalorija pomoću SGLT2 inhibitora smanjuje tjelesnu masu (Cornell, 2015).

## **1.3. Etnomedicina**

Tijekom razvoja čovječanstva upotreba bilja i njihovih pripravaka bila je osnovni način olakšavanja tegoba brojnih bolesti. Podaci o upotrebi bilja za liječenje datiraju od 4000 do 5000 godina p. n. e. (Hosseinzadeh i sur., 2015). Neki od tradicionalnih načina upotrebe određenih ljekovitih biljnih vrsta ostali su sačuvani, mnogi su se promijenili ili nestali dok se pojedino ljekovito bilje počelo koristiti na drugi način. Naime, mnoge danas popularne biljne vrste u europskoj narodnoj medicini koriste se stoljećima, no načini na koje se danas koriste razlikuju se od zabilježenih u povijesnim tekstovima. Istodobno je diljem Europe ugroženo očuvanje

tradicionalnoga medicinskog znanja zbog kretanja kultura, stoga se javila potreba prikupljanja i dokumentiranja trenutačnoga znanja (Quave i sur., 2012).

Bitno je razlikovati dva dijela aktivnosti namijenjenih očuvanju tradicionalnih znanja: terensko istraživanje lokalnih resursa ili dokumentacije tradicionalnih liječničkih praksi te znanstveno proučavanje tih znanja i preparata koji se koriste. U mnogim krajevima svijeta znanje je bilo, ili je i dalje, uglavnom prenošeno usmeno iz jedne generacije iscjelitelja na drugu. Prikupljanje tog znanja u središtu je pozornosti istraživača koji se nazivaju etnobotaničarima. Godine 1896. pojam 'etnobotanika' počeo je primjenjivati američki botaničar William Harshberger da bi opisao istraživanje upotrebe bilja u ljudi. Pojam se općenito temelji na detaljnom promatranju i analizi upotrebe biljnih vrsta koje se koriste u društvu te svih vjerovanja i kulturnih praksi povezanih s takvom upotrebom. Stoga se može smatrati da svaka studija koja se usredotočuje na dokumentaciju i sustavno proučavanje lokalne i tradicionalne upotrebe bilja ima etnobotaničko značenje (Heinrich, 2010).

Etnobotaničke studije provedene na području jugoistočne Europe pružaju mogućnost međukulturalne analize lokalne upotrebe ljekovita bilja. Pojedine ljekovite biljke koriste se na vrlo različite načine u različitim regijama, čak i na područjima koja dijele sličnu floru, ali imaju različitu kulturnu ili jezičnu baštinu. Time je važnost dokumentiranja još i veća, poglavito jer se i dalje pojavljuju jedinstvene pripreme i medicinske primjene bilja (Quave i sur., 2012). To pokazuju brojne etnobotaničke studije provedene u susjednim zemljama (Ferrier i sur., 2015; Menković i sur., 2011; Šarić-Kundalić i sur., 2011), čime su sačuvani podaci o tradicionalnoj upotrebi ljekovita bilja, dok su studije s područja Hrvatske vrlo rijetke (Pieroni i sur., 2003).

Ljekovito bilje i njihovi pripravci i danas igraju važnu ulogu u cijelom svijetu u sprječavanju i liječenju bolesti ljudi. Početkom novog tisućljeća Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da se brojno stanovništvo većine zemalja još oslanja na autohtone ili tradicionalne oblike liječenja. Procjenjuje se da u razvijenim zemljama poput Sjedinjenih Američkih Država biljni lijekovi čine čak 25 % ukupnih lijekova, dok u zemljama s brzim razvojem poput Kine i Indije čine čak 80 %. Stanovništvo u razvijenim zemljama, razočarano modernom zdravstvenom skrbi, teži samoliječenju ljekovitim biljnim pripravcima te se korištenje biljnih lijekova znatno povećalo u drugoj polovici dvadesetog stoljeća. Iako stoljetno korištenje određenih biljnih vrsta u tradicionalnom liječenju može poslužiti kao svjedočanstvo da je određena biljna sastavnica učinkovita ili sigurna, postoji nekoliko nepoznanica koje se trebaju otkloniti da bi te biljne vrste bile ugrađene u modernu praksu. Primjerice, sastavnice koje su bile sigurne u tradicionalnom liječenju akutnih simptoma nisu nužno sigurne i u suvremenoj primjeni za kontinuirano korištenje u pri promicanju zdravlja i prevenciji bolesti.

Osim toga, nužno je potvrditi učinkovitost biljnih sastavnica pristupom temeljenim na znanstvenim dokazima koji se tek nedavno počeo provoditi (Hosseinzadeh i sur., 2015). Nadalje, upitna je sigurnost primjene, primjerice kod smanjene funkcije jetre, a nije rijetka ni pojava hepatotoksičnosti u bolesnika koji se sami liječe biljem (Quave i sur., 2012).

Bilje i njihove sastavnice dio su moderne medicine od početka njezina razvoja, te su izvori važnih lijekova koji se danas koriste kao što su atropin, kodein, morfin i kinin (Hosseinzadeh i sur., 2015). Primjer je i bigvanid metformin, polusintetski derivat aktivnoga prirodnog produkta galegina, izoliran iz biljke *Galega officinalis* L. (Fabaceae) koja se još u srednjem vijeku koristila za ublažavanje intenzivnog uriniranja u osoba s dijabetesom (Heinrich, 2010). Diljem svijeta u alopatskoj se medicini koristi 119 lijekova poznatih struktura dobivenih iz manje od 90 biljnih vrsta. Otprilike 74 % njih otkrili su kemičari koji su pokušavali identificirati kemijske tvari u bilju koje su bile odgovorne za njihovu medicinsku upotrebu u ljudi. Budući da na svijetu ima najmanje 250 000 vrsta viših biljnih vrsta, logično je pretpostaviti da će se u biljnom kraljevstvu naći mnogo više korisnih lijekova ako se potraga za ovim entitetima provede na logičan i sustavan način (Farnsworth, 1990). Svjetska zdravstvena organizacija također je prepoznala važnost tradicionalne medicine i stvorila strategije, smjernice i standarde botaničkih lijekova (www.who.int, 2013).

Razvoj lijekova usredotočuje se na kemijske sastavnice, a lokalno i tradicionalno znanje ključna je polazna točka za takvo istraživanje pod uvjetom da postoji spremnost za potporu takvim ispitivanjima koja se uglavnom nalaze na granici između temeljnih i primijenjenih istraživanja (Heinrich, 2010). Služenje podacima tradicionalne medicine ponovno postaje zanimljivo, što se može pripisati nekoliko čimbenika, uključujući neostvarene terapijske potrebe; značajnu raznolikost kemijskih struktura i bioloških aktivnosti sekundarnih metabolita koji se prirodno pojavljuju; razvoj novih i osjetljivih tehnika za otkrivanje biološki aktivnih prirodnih sastavnica; poboljšane tehnike za izolaciju, pročišćavanje i strukturalno obilježavanje tih aktivnih sastojaka te napredak u rješavanju zahtjeva za opskrbom složenih prirodnih proizvoda (Clark, 1996).

Tradicionalna medicina može pružiti podatke korisne pri odabiru biljnih vrsta za eksperimentalne farmakološke studije. Etnofarmakologija je grana znanosti koja se bavi analizom podataka iz etnomedicine s ciljem razvoja novih lijekova. Rezultat takvih studija obično je odabir prihvatljiva broja biljnih vrsta koje treba testirati u biološkim sustavima za koje se vjeruje da mogu predvidjeti djelovanje tih lijekova u ljudi (Farnsworth, 1990). Pritom je potrebno savladati i brojne prepreke poput nedostatka ispitivanja, evidencija o sigurnosti i učinkovitosti, jaz između starih koncepata i suvremena razumijevanja za čije je svladavanje

potrebno uložiti dodatan napor, kao i za sprječavanje gubitka ovoga bogatog tradicionalnog znanja koje može pomoći otkrivanju lijekova naredni dugi niz godina (Khamkar i sur., 2015).

#### **1.4. Ljekovite biljne vrste i njihove sastavnice u terapiji dijabetesa**

U literaturi se može pronaći više od 400 biljnih vrsta s hipoglikemijskim djelovanjem, no i dalje se teži traženju novih antidijabetičkih lijekova iz prirodnih izvora, a novija istraživanja stalno pronalaze nove biljne tvari koje različitim mehanizmima mogu djelovati na dijabetes. Većina bilja sadrži glikozide, alkalioide, terpenoide, flavonoide, karotenoide, itd., koje se povezuje s antidijabetskim učinkom (Malviya i sur., 2010). Pregledom objavljenih istraživanja u kojima su obrađeni mehanizmi djelovanja biljnih vrsta na šećernu bolest može se uočiti nekoliko mehanizama djelovanja koji dovode do istoga biološkog učinka te mogućnost jedne biljne vrste da ispoljava više učinaka. Tablica 1. prikazuje različite biološke učinke s povezanim mehanizmima djelovanja, od kojih su mnogi usporedivi s mehanizmima djelovanja lijekova za šećernu bolest.

Među biljnim vrstama koje uzrokuju povećano otpuštanje inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače nalazi se kava, *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) povećavajući proizvodnju inkretinskog hormona GLP-1. Za to je djelovanje vjerojatno odgovorna klorogenska kiselina koja je glavni polifenol u kavi. Osim toga, utvrđeno je da klorogenska kiselina inhibira crijevni transport glukoze na membranama crijevnih resica oponašajući akarbozu. Češnjak, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), pojačava učinak inzulina povećavajući njegovo lučenje iz postojećih  $\beta$ -stanica. Ovi učinci uglavnom se pripisuju spojevima tipa alicina (El-Abhar i Schaalán, 2014). Također, na povećano izlučivanje inzulina djeluje biljka *Catharanthus roseus* Linn. (Apocynaceae) koja se koristi za liječenje dijabetesa u subtropskim i tropskim područjima, te *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) koja je odgovorna za antihyperglikemijsku, inzulinotropnu i glukagonostatsku aktivnost biljke, što objašnjava njezinu tradicionalnu upotrebu (El-Abhar i Schaalán, 2014; Malviya i sur., 2010). Sličan obrazac učinkovitosti pokazuju listovi bijele imele, *Viscum album* L. (Santalaceae). *Panax ginseng* C. A. Mey. (Araliaceae) ima snažno djelovanje na više načina. Njegove sastavnice, što prije svega vrijedi za ginsenozyd Rh2, povećavaju ekspresiju gena GLUT4 (transporter glukoze tip 4) na razini mRNA (glasnička ribonukleinska kiselina) i proteina, što dovodi do povećana unosa glukoze u mišićne stanice. Osim toga, poboljšava očuvanje  $\beta$ -stanica te sekreciju inzulina stimuliranu

glukozom preko cAMP / PKA ovisnih i / ili neovisnih puteva. U piskavici, *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae), izolirana je aminokiselina 4-hidroksileucin koja omogućuje glukozom uvjetovano izlučivanje inzulina, a djelovanje je potvrđeno i inhibicijom crijevne glukozidaze (El-Abhar i Schaalán, 2014). Plodovi korijandra, *Coriandrum sativum* L. (Umbelliferae), korišteni su za liječenje dijabetesa i njegovih komplikacija. Potvrđena je njihova hipoglikemijska aktivnost u štakora kroz otpuštanje inzulina iz  $\beta$ -stanica vezanjem na receptore sulfonilureje, kao i pojačavanje aktivnosti i broja  $\beta$ -stanica gušterače (Hosein i sur., 2015).

Inhibicija apsorpcije glukoze u crijevima postiže se inhibicijom djelovanja nekoliko enzima i neenzimskog transporta glukoze. Ekstrakti lista i stabljike *C. sativum* pokazale su inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze (Hosein i sur., 2015). Alkaloid mahanimbin izoliran iz poznatoga indijskog začina currya, *Murraya koenigii* (L.) Spreng. (Rutaceae), pokazao je mogućnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze. Do inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze dovode i antocijanini iz korijena slatkoga krumpira ili batata, *Ipomoea batatas* (L.) Poir. (Convolvulaceae), te flavonoid kaempferol i 3-*O*-gentiobiozid iz biljke *Senna alata* (L.) Roxb. (Leguminosae) (Ezuruike i Prieto, 2014). Biljna vrsta *Tournefortia hartwegiana* Steud. (Boraginaceae), tradicionalno korištena kao antidijabetik u Meksiku, kontrolira razinu glukoze inhibicijom  $\alpha$ -glukozidaze te drugih intestinalnih enzima poput maltaze i saharaze koji su uključeni u probavu polisaharida i oligosaharida. Crni kim, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), inhibiciju apsorpcije glukoze postiže neenzimatskim putem, inhibirajući crijevni suprijenosnik natrija i glukoze 1 (SGLT1) koji je glavni transporter glukoze u crijevima (El-Abhar i Schaalán, 2014).

Nekoliko je načina kojima se može povećanim unosom glukoze u različite stanice sudjelovati u regulaciji glikemije. Pokazalo se da gingeroli iz đumbira, *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), povećavaju unos glukoze u mišiće kao rezultat izravna povećanja ekspresije GLUT4 receptora (Ezuruike i Prieto, 2014). Kliničke studije potvrdile su da ekstrakt batata u bolesnika s dijabetesom tipa 2 kontrolira razinu glukoze u plazmi kroz povećanje osjetljivosti na inzulin zajedno s povećavanjem razine adiponektina. Gorka dinja, *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), i cimet, *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae), povećavaju unos glukoze u adipocite, dok crni kim povećava osjetljivost na inzulin u stanicama jetre (El-Abhar i Schaalán, 2014). Djelovanje agonistički na PPAR $\gamma$  receptor poput oralnih antidijabetika tiazolidindiona pokazale su biljne vrste dobro poznate na našem području poput *Zea mays* L. (Poaceae), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae), *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), *Urtica dioica* L. (Urticaceae), *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) (El-Abhar i Schaalán, 2014).

Više biljnih vrsta pokazalo je sposobnost obnavljanja  $\beta$ -stanica gušterače poput gorke dinje (El-Abhar i Schaalán, 2014), cimeta (Arulselvan i sur., 2014) i biljne vrste *Coccinia indica* Wight & Arn. (Cucurbitaceae) koja se kao antidijabetik koristi u Africi i jugoistočnoj Aziji, a za čije je djelovanje odgovoran toluen (Malviya i sur., 2010). Tamarind, *Tamarindus indica* L. (Leguminosae), povećava razinu glikogena u jetri i skeletnim mišićima (El-Abhar i Schaalán, 2014), dok je oralna konzumacija lišća curryja u štakora rezultirala povećanjem koncentracije glikogena u jetri (Malviya i sur., 2010).

Budući da se antioksidansi koriste kao komplementarna terapija u pacijenata s dijabetesom radi smanjenja komplikacija bolesti, neprestano se nastoje otkriti sastavnice koje bi u tome bile učinkovite (El-Abhar i Schaalán, 2014). Plodovi šipka, *Rosa canina* (Rosaceae), koji se koriste u tradicionalnoj medicini mnogobrojnih zemalja pokazali su hipoglikemijsko djelovanje u štakora s dijabetesom tipa 1 pojačavajući antioksidacijske funkcije i uklanjanje slobodnih radikala te da njihova glavna aktivna sastavnica trans-tilirozid ublažava toleranciju na glukozu i inzulinsku rezistenciju. Cvjetovi šipka, *Punica granatum* (Punicaceae), pokazali su poboljšanje antioksidacijske obrane enzimima glutation peroksidaze (GPx), glutation S-transferaze (GST), superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) te poboljšavaju neenzimski antioksidativni učinak reduciranim glutationom (GSH) koji štiti stanični sustav od toksičnih učinaka lipidne peroksidacije (Hosein i sur., 2015).

Inhibicija formiranja glikolizirana proteina također je jedan od načina sprječavanja razvoja dijabetičkih komplikacija. Sastavnica biljke *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae), galna kiselina, pokazala se uspješnom u inhibiciji formiranja glikolizirana proteina (Hosein i sur., 2015). Inhibicija puta poliola kojim se sprječava razvoj mikrovaskularnih komplikacija postiže se inhibicijom enzima aldoza reduktaze. Autori Ezuruike i Prieto (2014) navode nekoliko sastavnica odgovornih za taj učinak. Jestivi orah iz gorke kole, *Garcinia kola* Heckel (Clusiaceae), koja se koristi u zapadnoj Africi, sadrži mješavinu flavanona pod nazivom kolaviron za koju se pokazalo da inhibira aldoza reduktazu u leći štakora. Elagična kiselina i izoklorogenska kiselina A iz lista batata pokazale su se potencijalnim inhibitorima aldoza reduktaze, dok su metoksi fenil derivati iz podanka đumbira uspjeli suprimirati akumulaciju sorbitola u ljudskim eritrocitima.

Tablica 1. Primjeri bioloških učinaka biljaka

Učinak	Mehanizam djelovanja	Sastavnice odgovorne za učinak	Biljna vrsta	Literatura	
Povećavanje otpuštanja inzulina iz stanica gušterače	Posreduju lučenje inzulina putem cAMP / PKA ovisnih i / ili neovisnih puteva	ginsenzoidi i baicalein	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey. (Araliaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014	
			<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni (Asteraceae), <i>Viscum album</i> L. (Santalaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014	
	Povećavanje proizvodnje inkretinskog hormona GLP-1	klorogenska kiselina	<i>Coffea arabica</i> L. (Rubiaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014	
			spojevi tipa allicina	<i>Allium sativum</i> L. (Amaryllidaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	Inhibicija DPP-4		<i>Mangifera indica</i> L. (Anacardiaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014	
			<i>Catharanthus roseus</i> Linn. (Apocynaceae)	Malviya i sur., 2010	
			<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (Meliaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014	
			4-hidroksileucin – u piskavici	<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae), <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. (Leguminosae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	Sposobnost vezanja na receptore sulfonilureje			<i>Coriandrum sativum</i> L. (Umbelliferae)	Hosein i sur., 2015

Tablica 1. Primjeri bioloških učinaka biljaka – nastavak

Učinak	Mehanizam djelovanja	Sastavnice za učinak	odgovorne Biljna vrsta	Literatura
Inhibicija apsorpcije glukoze u crijevima	Inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze	mahanimbin	<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng. (Rutaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014
		mahanimbin	<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng. (Rutaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014
		anthocijani	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Poir. (Convolvulaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014
	Inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze	kaemferol i njegov 3-O-gentiobiozid	<i>Senna alata</i> (L.) Roxb. (Leguminosae)	Ezuruike i Prieto, 2014
			<i>Coriandrum sativum</i> L. (Umbelliferae)	Hosein i sur., 2015
	Inhibicija $\alpha$ -glukozidaze, maltaze i saharaze u crijevima		<i>Tournefortia hartwegiana</i> Steud. (Boraginaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	Inhibicija crijevnog SGLT1		<i>Nigella sativa</i> L. (Ranunculaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
Povećavani unos glukoze i smanjenje izlučivanja glukoze iz jetre	Agonistički na PPAR $\gamma$ receptor		<i>Zea mays</i> L. (Poaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014, El-Abhar i Schaalán, 2014
			<i>Camelliasinensis</i> (L.) Kuntze (Theaceae), <i>Salvia officinalis</i> L. (Lamiaceae), <i>Urtica dioica</i> L. (Urticaceae), <i>Origanum majorana</i> L. (Lamiaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014



Tablica 1. Primjeri bioloških učinaka biljaka – nastavak

Učinak	Mehanizam djelovanja	Sastavnice odgovorne za učinak	Biljna vrsta	Literatura
Povećavani unos glukoze u...	mišićne stanice povećanjem ekspresiju gena za GLUT4, na razini mRNA i proteina	6, 8 i 10 gingeroli	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014
		ginsenzoid Rh2	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey. (Araliaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	mišićne stanice povećanjem razine adiponektina	antocijani	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Poir. (Convolvulacea)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	adipocite	<i>n. s.</i>	<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae), <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (Lauraceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	u jetru	<i>n. s.</i>	<i>Nigella sativa</i> L. (Ranunculaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
Obnavlja $\beta$ -stanice gušterače	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>	<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	<i>n. s.</i>	toluen	<i>Coccinia indica</i> Wight & Arn. (Cucurbitaceae)	Malviya i sur., 2010
	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>	<i>Coriandrum sativum</i> L. (Umbelliferae)	Hosein i sur., 2015
	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (Lauraceae)	Arulselvan i sur., 2014

Tablica 1. Primjeri bioloških učinaka biljaka – nastavak

Učinak	Mehanizam djelovanja	Sastavnice za učinak	odgovorne	Biljna vrsta	Literatura
Obnavljanje glikogena	U jetri i skeletnim mišićima	<i>n. s.</i>		<i>Tamarindusindica</i> L. (Leguminosae)	El-Abhar i Schaalán, 2014
	U jetri	<i>n. s.</i>		<i>Murraya koenigii</i> Linn. (Rutaceae)	Malviya i sur., 2010
Antioksidativno	Pojačavanje antioksidacijske funkcije i uklanjanje slobodnih radikala	trans-tilirozid		<i>Rosa canina</i> (Rosaceae)	Hosein i sur., 2015
	Prevenција oštećenja prouzročениh slobodnim radikalima kisika te povećanje iskorištavanja glukoze	<i>n. s.</i>		<i>Catharanthus roseus</i> Linn. (Apocynaceae)	Malviya i sur., 2010
	Enzimima GPx, GST, SOD i CAT te neenzimatski putem GSH	<i>n. s.</i>		<i>Punica granatum</i> (Punicaceae)	Hosein i sur., 2015
	Inhibicija formiranja lipidnih peroksida, reaktivacija antioksidacijskih enzima i obnova razina GSH-a	<i>n. s.</i>		<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)	El-Abhar i Schaalán, 2014

Tablica 1. Primjeri bioloških učinaka biljaka – nastavak

Učinak	Mehanizam djelovanja	Sastavnice za učinak	odgovorne Biljna vrsta	Literatura
		kolaviron – mješavina flavanona	<i>Garcinia kola</i> Heckel (Clusiaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014
Inhibicija puta poliola	Inhibicija enzima aldoza reduktaze	metoksi fenil derivati	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae)	Ezuruike i Prieto, 2014
		elagična kiselina i izoklorogenska kiselina A iz lista	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Poir. (Convolvulacea)	Ezuruike i Prieto, 2014
Inhibicija formiranja glikolizirag proteina	<i>n. s.</i>	galna kiselina	<i>Lawsonia inermis</i> L. (Lythraceae)	Ezuruike i Prieto, 2014

*n. s.* – nije specificirano

Antioksidansi mogu inhibirati djelovanje slobodnih radikala kroz nekoliko mehanizama, uključujući uništavanje slobodnih radikala, inhibiciju njihova stvaranja te vezanje na metale koji stimuliraju proizvodnju slobodnih radikala. Enzimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation *S*-transferaza i glutation reduktaza) i neenzimatski antioksidanti (reducirani glutation, fenolne kiseline, vitamin C i vitamin E) imaju važnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa u organizmu te posljedično razvoju dijabetičkih komplikacija (Vinayagam i sur., 2016).

Fenolni spojevi ili polifenoli predstavljaju jednu od najbrojnijih skupina sekundarnih metabolita bilja. Do danas je poznato više od 8000 struktura. Prirodni polifenoli obuhvaćaju sastavnice u rasponu od jednostavnih molekula (fenolne kiseline, flavonoidi) do visokopolimeriziranih spojeva (lignani, tanini) (Soobrattee i sur., 2005). Flavonoidi imaju brojna ljekovita svojstva. Mnogi među njima pokazali su posjedovanje nekoliko bioloških aktivnosti, uključujući antioksidativno, protuupalno, antitumorsko, antialergijsko, neuroprotektivno, kardioprotektivno i antimikrobno djelovanje. Antioksidativna svojstva flavonoida igraju važnu ulogu u prevenciji i smanjenju oksidativnog stresa. Tako pojedini flavonoidi sprječavaju različite procese povezane s oksidacijskim stresom izravnim smanjenjem razine intracelularnih slobodnih radikala i / ili reaktivnih vrsta, čime sprječavaju njihov nastanak i posljedična oštećenja drugih biomolekula kao što su lipidi, proteini i DNA. Flavonoidi također mogu ometati aktivnost središnjih enzima koji proizvode slobodne radikale, kao što je ksantin oksidaza i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza (NADPH-oksidaza) ili inducibilna sintaza dušičnoga kisika (iNOS) te mogu čak modulirati intracelularne razine prooksidansa i/ili antioksidacijskih enzima (Catarino i sur., 2014). Imaju sposobnost djelovanja na neenzimatske antioksidanse sprječavajući smanjenje razina reducirana glutationa ili utjecanjem na povećavanje njegove biosinteze (Singh i Singh, 2012).

Fenolne kiseline važna su kategorija fenolnih spojeva koji su univerzalno prisutni u bilju. Imaju visoku antioksidativnu sposobnost i sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, a mogu i inhibirati određene enzime odgovorne za proizvodnju ROS-a. Jedno je od najpoznatijih svojstava fenolnih kiselina u metabolizmu ugljikohidrata inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze, ključnog enzima odgovornog za razgradnju kompleksnih ugljikohidrata na glukozu (Vinayagam i sur., 2016).

Mnoge su studije pokazale da oksidativni stres ubrzava razvoj dijabetičkih poremećaja, dok antioksidansi iz hrane, poput polifenola, vitamina, minerala i drugih sastavnica, smanjuju rizik od razvoja otpornosti na inzulin i dijabetesa tipa 2 (Vinayagam i sur., 2016). Zbog toga postoji potreba za pronalaskom pouzdanih biljnih sredstava koja mogu usporiti progresiju

dijabetičkih komplikacija. Postoji mnogo ljekovitih biljnih vrsta s antidijabetičkim svojstvima, mnoge posjeduju antioksidacijske aktivnosti. One mogu pružiti izvore za razvoj novih lijekova korisnih u liječenju dijabetesa i njegovih komplikacija (Rahimi-Madiseh i sur., 2016).

## 1.5. Ispitivane biljne vrste

### *Achillea millefolium* L. (Asteraceae)

Stolisnik je višegodišnja biljka visine stabljike od 30 do 80 cm (Slika 1). U proljeće iz svijetlosmeđega trajnog podanka rastu široki, prizemni listovi složeni u obliku rozete iz kojih zatim izrasta uspravna stabljika. Zelenkasta stabljika okrugla je i glatka te se pri vrhu grana. Prizemni svjetliji listovi imaju peteljku, dok gornji tamniji obuhvaćaju stabljiku i naizmjenično su izrasli. Listovi su sitno perasti, duguljasti, dužine i do 20 cm (naročito listovi iz rozete), dvostruko ili trostruko su rascijepljeni. Različite su dužine, nazubljena ruba, s mlađim listovima dlakavijima od starijih. Bijeli ili ružičasto-bijeli cvjetovi skupljeni su u ovalne cvjetne glavice promjera do 5 mm. Na kratkoj peteljci glavice sadrže 4 – 5 žućkastobijelih, bijelih, ružičastih ili grimiznih jezičastih, ženskih cvjetova i 3 – 20 hermafroditnih, žutih, cjevastih cvjetova. Cvat je štitasto građen. Vrijeme cvatnje je od lipnja do rujna. Rasprostranjen je u Europi, Aziji, Sjevernoj Americi i Australiji. Raste pojedinačno ili u velikom mnoštvu na livadama i pašnjacima, u vrtovima te uz putove i rubove polja kao čest korov (Kuštrak, 2005; Schafner i sur., 1999; Willfort, 1974).

Zelen stolisnika sadržava 0,2 – 1 % eteričnog ulja vrlo varijabilnog sastava, zatim gorku tvar ahilein, flavonoide, fenolkarboksilne kiseline i kumarine. Sadrži seskviterpenske laktone, poliacetilene, betaine, inulin te fosfate, nitrata i kalijeve soli. Zahvaljujući visokom sadržaju gorkih tvari i eteričnog ulja, stolisnik se u prvom redu ubraja u aromatične gorke droge. Stoga se koristi za povećanje apetita, kod gastrointestinalnih teškoća poput upale, grčeva i nadutosti. Stolisnik ima protuupalno, spazmolitičko i antimikrobno djelovanje. Studijama na životinjama potvrđeno je koleretičko i antitumorsko djelovanje te antihepatotoksično djelovanje vodenog ekstrakta kod intoksikacije paracetamolom. Vanjska primjena alkoholnih pripravaka pomaže kod kožnih upala i cijeljenja rana. Etanolni ekstrakt djeluje kao repelent za komarce. Vodeni ekstrakt i esencijalna ulja imaju antibakterijsko i antifungalno djelovanje (Wichtl, 2004). Prekliničke studije upućuju na to da može imati antiulcerozne, hepatoprotektivne i

anksiolitičke aktivnosti. Istraživanja na životinjama također su pokazala da je stolisnik općenito siguran i dobro podnošljiv (Applequist i Moerman, 2011).

### ***Artemisia absinthium* L. (Asteraceae)**

Pelin je trajnica svijetlo sive boje, polugrnastog oblika, visine 30 – 100 cm s drvenastim donjim dijelovima (Slika 2). Ima razgranatu stabljiku s brojnim mladim sitnim svilastodlakavim izdancima. Listovi na donjem dijelu stabljike imaju kratku peteljku, trostruko su perasto razdijeljeni, sivo pustenasti i prekriveni gustim dlačicama. Donji listovi na stabljici trostruko su perasti s duguljastim lancetastim dijelovima listova, dok su prema vrhu sve manji i jednostavniji. Uzdužno naborana stabljika ima u sredini svijetlu srčiku, dok je izvana sivkasto dlakava. Na razgranatim brojnim uspravnim ograncima nalaze se obilno cvatuće cvjetne glavice sa sivim dlakavim ovojnim listićima. Cvjetovi su žuti i cjevasti, od kojih vanjski imaju samo pestić, dok su unutarnji cvjetići dvospolni. Cvate od srpnja do rujna. Listovi se sabiru prije cvatnje, a tijekom cvatnje sabire se čitava biljka. Obično raste na kamenitim i suhim staništima, na pustim i neobrađenim mjestima uz putove i rubove šuma. Uzgaja se u vrtovima i vinogradima te ne zahtijeva gotovo nikakvu njegu. Razmnožavanje se postiže sjemenom ili dijeljenjem starijih grmova. Kao samonikla biljka rasprostranjen je u Aziji, južnoj Europi i sjevernoj Africi dok je u Sjedinjene Američke Države i Novi Zeland prenesen (Kuštrak, 2005; Schafner i sur., 1999; Willfort, 1974).

Pelin sadrži 0,03 – 0,3 % eteričnog ulja bogatog terpenoidnim sastavnicama, nadalje gorki glikozid absintin, druge gorke tvari i organske kiseline. Utvrđene su i tvari poput karotenoida, flavonoida, fenolnih kiselina i kumarina. Koristi se za poticanje apetita, te kod probavnih smetnji poput gastritisa i nadutosti. U tradicionalnoj medicini koristio se kao koleretik, antihelminetik te kod amenoreje i dismenoreje. Eterično ulje djeluje kao repelent za insekte, a ima i antibakterijska i antifungalna svojstva (Wichtl, 2004). Novija istraživanja upućuju na to da bi upotreba pelina mogla biti korisna u terapiji Crohnove bolesti, a potvrđeno je i njegovo hepatoprotektivno djelovanje (Lachenmeier, 2010).



Slika 1. *Achillea millefolium* L.

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Šarić Šemso



Slika 2. *Artemisia absinthium* L.

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Semir Maslo

### ***Betula pendula* Roth (Betulaceae)**

Breza je do 26 m visoko drvo s visećim granama i korom stabla koja se najčešće guli u vodoravnim trakama (Slika 3). Dok je stablo mlado, bijele je boje, a kako stari, postaje tamnije. Listovi su najčešće rombasti, dvostruko pilasti, dugih zašiljenih vrhova te goli kad narastu. Dugi su 3 – 7 cm i široki 2 – 4 cm. Donja površina listova nosi male, žućkasto-sive pramenove kose na graničnim točkama žila. Gornja je površina tamno zelena, a donja je svjetlije zelena s izraženom nervaturom. Ima viseće muške i ženske rese. Krilca na plodu šira su 2 – 3 puta od samog ploda. Vrijeme cvatnje je od travnja do svibnja, a listovi se beru od svibnja do sredine srpnja. Rasprostranjena je u gotovo cijeloj Europi, zapadnoj Aziji dok se u Sjevernoj Americi sadi. Ima vrlo male zahtjeve što se tiče tla i klime, a vrlo je otporna na niske temperature i sušna razdoblja (Schafner i sur., 1999; Wichtl, 2004; Willfort, 1974).

Lišće breze sadrži oko 3 % flavonoida s najzastupljenijima hiperozidom i avikularinom. Sadržaj je veći u mlađim listovima. Također sadrže fenolne kiseline, triterpene, malo eteričnog ulja, vitamin C te mineralne tvari poput soli kalija. Smatra se da zbog visokog sadržaja flavonoida djeluje kao diuretik, te se koristi kod bakterijskih i upalnih tegoba urinarnog trakta poput pijelonefritisa, uretritisa i cistitisa. U tradicionalnoj medicini koristi se za smanjenje simptoma gihta, reumatskih bolesti i gubitka kose (Wichtl, 2004).

### ***Centaurium erythraea* Rafn (Gentianaceae)**

Kičica je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka s uspravnom i razgranatom stabljikom visine 20 do 50 cm (Slika 4). Stabljika je četvrtasta, gola i šuplja. Listovi se razvijaju u obliku rozete i jajolika su oblika, do 5 cm dugi, goli i s kratkom peteljkom. Na stabljici su listovi rijetki,

nasuprotni i sjedeći, jajolika do duguljasta oblika, cijela ruba i s 3 – 5 žila. Cvjetovi se razvijaju u pazušcima listova na vrhu stabljike i ogranka, ljevka su oblika i ružičasto-crvene boje. Nalaze se u paštastim cvatovima i otvoreni su samo za lijepa i sunčana vremena kada je najmanje 20 °C. Prašnici se nakon cvatnje karakteristično savijaju u spiralu. Cvate od lipnja do rujna. Raste gotovo po cijeloj Europi, sjevernoj Africi, zapadnoj Aziji (Iran) te je prenesena u Sjevernu Ameriku. Kičica uspijeva na šumskim livadama i šumskim čistinama, pogoduje joj vapnenasto, ilovasto i toplo tlo, no prilagođava se i drugim uvjetima staništa, čak i močvarnom tlu (Kuštrak, 2005; Schafner i sur., 1999; Willfort, 1974).

Najvažnija ljekovita tvar kičice je gorki glikozid eritrocentaurin, a u manjim količinama kičica sadržava i eterično ulje, triterpene, fitosterole, flavonoide, fenolne kiseline te alkaloida. Upotrebljava se kao gorka tvar za povećanje apetita. Posebno je ljekovita u terapiji želučanih tegoba gdje utječe na pojačavanje izlučivanja želučanih sokova. Ima dugu tradiciju korištenja kao roborans i tonik. Vodeni ekstrakti pokazali su protuupalno, analgetsko i antipiretsko djelovanje (Wichtl, 2004).



Slika 3. *Betula pendula* Roth

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Semir Maslo



Slika 4. *Centaurium erythraea* Rafn

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Šarić Šemso

### ***Morus alba* L. (Moraceae)**

Bijeli dud ima jednobojno, listopadno i 8 do 15 m visoko stablo s gustom lisnatom krunom i tamnom sivo-smeđom korom. Listovi su zeleni, djelomično dlakavi (Slika 5). Muške su rese duge od 10 do 20 mm s cvijećem. Muški su cvjetovi dugi 2,5 mm, a ženski su jajoliki,



duljine od 5 do 10 mm. Žensko je cvijeće dugo ili nešto veće od muških cvjetova. Plodovi su tamnozeleni, jestivi, ovalni i do 2,2 cm dugi (Abbasi i sur., 2013).

Lišće sadrži prosječno 6,0 – 6,9 % proteina u svježem stanju, aminokiseline, masti i masne kiseline, vitamine i sterole. Također sadrži nekoliko minerala (kalcij, fosfor, mangan, željezo, bakar, cink). Uzgaja se najviše zbog lišća koje služi kao hrana gusjenicama svilenog prelca. Lišće se također koristi kao stočna hrana te se jede kao povrće (Srivastava i sur., 2003). Pokazalo se učinkovitim u snižavanju arterijskog tlaka, a također služi za liječenje upale grla. Nadalje, vodeni i alkalni ekstrakt lišća dudu djeluje protiv gram-pozitivnih bakterija i kvasaca (Soni i sur., 2009).

### ***Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae)**

Grah je jednogodišnja zeljasta biljka (Slika 6). Ovisno je li niska ili visoka sorta, naraste od 50 do 300 cm. Listovi su trodijelni. Cvat je kraći od lisne peteljke s bijelim, ružičastim ili ljubičastim cvjetovima. Mahuna je glatka i duga 10 – 20 cm, žućkasto-bijele boje. Sastoji se od djelomično kovrčavih, tankih komada do 15 cm dugih i odvojenih od sjemena. Cvate od srpnja do kolovoza. Rasprostranjena je prvobitno u Srednjoj i Južnoj Americi, vjerojatno kao kultivirani oblik (Schafner i sur., 1999; Wichtl, 2004).

Ljuske graha sadrže šećere, aminokiseline, hemicelulozu, mineralne tvari te krom. Koristi se kao diuretik i antidijabetik (Wichtl, 2004). Različiti ekstrakti *P. vulgaris* pokazali su analgetsko, antibakterijsko, antikancerogeno, protuupalno, hepatoprotektivno te hipolipidemijsko djelovanje (Saleem i sur., 2016).



Slika 5. *Morus alba* L.

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Semir Maslo



Slika 6. *Phaseolus vulgaris* L.

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Šarić Šemso

### ***Salvia officinalis* L. (Lamiaceae)**

Kadulja je višegodišnji polugrm visine 30 – 100 cm s drvenastom stabljikom i jakim korijenom (Slika 7). Donji dio stabljike je drvenast, a gornji zeljast. Čvrsti i debeli listovi su uski, eliptični, naborani i na dugoj peteljci nasuprotno poredani. Cijela biljka pokrivena je gustim dlakama zbog kojih je sivo-zelene do srebrnaste boje. Ljubičasti, rijetko ružičasti ili bijeli cvjetovi razvijaju se u prividnim klasovima na vrhu ogranaka. Cvjetovi imaju 1,7 – 3 cm dug vjenčić s dva prašnika. Cvate od svibnja do srpnja. Plod je kalavac koji se raspada u četiri oraščića. Rasprostranjena je u južnoj Europi kao samonikla, dok se u srednjoj Europi u toplijim krajevima uzgaja ili je samonikla. Kao samonikla biljka pokriva prostrane površine krša našeg priobalja i otoka. Raste između razdrobljena kamenja među kojima zemlju crljenicu veže drvenastim korijenjem i štiti od raznošenja burom. Prilikom sabiranja ne smije se čupati s korijenom jer stvara osnove za pošumljavanje krša (Kuštrak, 2005; Schafner i sur., 1999; Willfort, 1974).

Sadrži 1 – 2,5 % eteričnog ulja koje se sastoji većinom od monoterpena s visokim sadržajem tujona te seskviterpena. Droga sadrži 1 – 3 % flavonoida, tanine i gorke tvari. U obliku grgljača djeluje protuupalno kod oboljenja grla, usne šupljine i desni. Koristi se kod probavnih smetnji, nadutosti, upala crijevne sluznice te proljeva. Također služi za regulaciju znojenja jer se smatra da umanjuje pretjerano znojenje, a povećava smanjeno znojenje (Wichtl, 2004). Nekoliko studija ukazuje na to da kadulja može potencijalno pridonijeti olakšanju ili liječenju bolesti kao što su depresija, demencija, pretilost, dijabetes, lupus i tumor te smanjivati razne triglicerida i poboljšavati omjer HDL / LDL (Hamidpour i sur., 2014).

### ***Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae)**

Bazga raste kao grm ili drvo visoko 3 do 10 m (Slika 8). Kora stabla je na donjem dijelu svijetlosmeđa, dok je prema gore sivo-bijela i pomalo izbrazdana. Drvo okružuje bijela, plutasta i vrlo lagana srž. Listovi rastu nasuprotno, nepravilno su perasti s jajolikim, zašiljenim, tamnozelenim i pilasto nazubljenim listićima. Cvjetovi su žućkasto-bijeli i sastavljeni u plosnati paštitač. Iz cvjetova se razvijaju u početku zelene, zatim smeđe-crne i u stanju zrelosti sjajno-crne, sočne bobice. Cvate od svibnja do lipnja. Rasprostranjena je po cijeloj Europi. Raste na rubovima šuma ili u jako svijetlim šumama. Može se naći u blizini naselja i na zapuštenim mjestima (Schafner i sur., 1999; Willfort, 1974).

Cvjetovi bazge sadrže 0,03 – 0,14 % eteričnog ulja bogata slobodnim masnim kiselinama. Zatim sadrže monoterpena, 0,7 – 3,5 % flavonoida (flavonole i njihove glikozide) te 5,1 % derivata hidroksicimetnih kiselina, tanine, sluzi te kalijeve soli. U tragovima se može

naći sambunigrin, triterpenski alkoholi, triterpenske kiseline te steroli. Podražajno djeluje na rad znojnih žlijezda kada se pije što topliji infuz. Čaj od cvjetova bazge koristi se kao stimulator bronhijalne sekrecije kod upalnih bolesti dišnih puteva. Koristi se kao korektiv okusa (Wichtl, 2004).



Slika 7. *Salvia officinalis* L.

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Semir Maslo



Slika 8. *Sambucus nigra* L.

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Semir Maslo

### ***Vaccinium myrtillus* L. (Ericaceae)**

Borovnica je nizak, vrlo razgranat trajni grm visine 20 do 50 cm (Slika 9). Ima puzavi korijen i žilave, zelene stabljike. Mali listovi dugi su 2 – 3 cm, jajoliki, s kratkom peteljkom, na rubu sitno pilasti i s obje strane zeleni. Zelenkasto-ružičasti pojedinačni cvjetovi, okruglasto-zvonolika oblika smješteni su u pazuhu lista. Plod je crno-modra, okrugla i sočna bobica veličine graška koja gore završava kružnom udubinom. Borovnica cvate od travnja do lipnja, a vrijeme je sazrijevanja plodova od lipnja do kolovoza. Vrlo je rasprostranjena, raste u planinskom i brdskom području, gdje pokriva tlo bjelogoričnih i crnogoričnih šuma srednje i sjeverne Europe, sjeverne Azije i Sjeverne Amerike. U Hrvatskoj raste na velikoj površini, uglavnom u planinskim predjelima. Raste i na nadmorskoj visini većoj od 2000 m (Kuštrak, 2005; Willfort, 1974).

Listovi borovnice sadrže 0,8 – 6,7 % katehinskih trijeslovina, pentahidroksiflavone poput glikozida kvercetina, iridoide, alkaloida te fenolne kiseline od kojih naročito klorogensku kiselinu. Arbutin i hidrokinon mogu se pronaći u tragovima ili nisu prisutni, dok je zabilježen i

relativno visok udio mangana i kroma. Odavno se u pučkoj medicini upotrebljava pri liječenju dijabetesa, a djelovanje mu se objašnjava sadržajem kroma ili flavonoida. Upotrebljava se eksterno kao adstringent. Studijama na životinjama potvrđeno je smanjenje razine triglicerida prilikom uporabe lista borovnice (Wichtl, 2004).



Slika 9. *Vaccinium myrtillus* L.

Flora Croatica Database, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupanja 27.01.2018., autor Šarić Šemso

Slike 1. – 9. odobrene su za korištenje u ovom radu od strane autora.

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Iako su provedene brojne etnobotaničke studije u susjednim zemljama, etnofarmakološka istraživanja u Hrvatskoj još su rijetkost. Imajući na umu rastuću prevalenciju dijabetesa u Hrvatskoj i svijetu, cilj je predložena doktorskog rada utvrditi koje se sve biljne vrste u hrvatskoj etnomedicini koriste za liječenje dijabetesa. Među njima će biti odabrane one čiji antidijabetički potencijal do sada nije prikladno istražen. Nadalje, utvrdit će se sigurnost primjene ispitivanih uzoraka s obzirom na količine teških metala u njima, ali i količine kroma, metala čiji je nedostatak povezan s pojavom inzulinske rezistencije. Izradit će se etanolni (80 %) te vodeni ekstrakti odabranih biljnih vrsta, odnosno njihovih organa koji se tradicionalno koriste kao antidijabetici. Utvrdit će se i usporediti kemijski sastav priređenih ekstrakata. Pritom će posebna pozornost biti posvećena biljnim polifenolima kao čestim nosiocima antidijabetičkog djelovanja tradicionalnih biljnih antidijabetika. Potencijal ispitivanih ekstrakata u suzbijanju dijabetičkih komplikacija ispitat će se određivanjem njihove antioksidativne aktivnosti i utjecaja na razinu glutationa u Hep G2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima. Ispitat će se i inhibitorno djelovanje na  $\alpha$ -glukozidazu, enzim koji sudjeluje u razgradnji disaharida, oligosaharida i polisaharida u tankom crijevu, a time neizravno i na razinu šećera u krvi.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Kemikalije i uređaji

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae* tipa I, aluminijev klorid heksahidrat,  $\beta$ -karoten, ferozin, etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), ferulična kiselina 99 %, kavena kiselina  $\geq$  98 %, kemferol  $\geq$  97,0 %, Folin-Ciocalteu reagens, klorogenska kiselina  $\geq$  95 %, krizin 97 %, kvercetin dihidrat 98 %, galna kiselina 97 %, *p*-kumarna kiselina  $\geq$  98 %, miricetin  $\geq$  96 %, linoleinska kiselina, rutin-hidrat 95 %, ružmarinska kiselina 96 %, sinapična kiselina  $\geq$  98 %, *tert*-butil-4-hidroksianisol (BHA), vanilinska kiselina  $\geq$  97,0 % (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD), hiperozid 98 % i luteolin 98 % (Indofine Chemical Company). Metanol (Lach-ner) bio je HPLC čistoće. Ostale kemikalije i otapala bili su p. a. čistoće.

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: čitač mikrotitarskih pločica (Awareness technology inc., SAD), inkubator (INKO, Zagreb), HPLC (Agilent 1200 serija, Agilent Technologies, USA) s autosamplerom i VWD detektorom, mlin za usitnjavanje biljnog materijala (UD Corporation, SAD), spektrometar S2 Picofox benchtop TXRF (Bruker Nano GmbH, Berlin, Njemačka), spektrometar T70 + UV/Vis (PG Instruments Ltd., Leicestershire, UK) i ultrazvučna kupelj (Bandelin SONOREX® Digital 10 P DK 156 BP, Berlin, Njemačka).

### 3.2. Prikupljanje etnobotaničkih podataka

Razgovori su provedeni u 9 gradova (Zagreb, Sesvete, Velika Gorica, Slatina, Rijeka, Zadar, Šibenik, Trogir i Split) od travnja 2013. do listopada 2016. godine s 26 osoba. Na tržnicama u Dubrovniku, Slavonskom Brodu i Vodicama u navedenom razdoblju nisu zatečene osobe koje prodaju ljekovito bilje. Obuhvaćeno je ukupno 18 tržnica, dok su se na 15 provodili razgovori. Otprilike 33 % stanovništva Hrvatske obuhvaćeno je gradovima u kojima je istraživanje provedeno zajedno s gradovima u kojima nije bilo travara. Travarima je na početku razgovora, odnosno prije prikupljanja samih podataka, objašnjena pozadina istraživanja te je dobiven njihov usmeni pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je obuhvaćalo pitanja otvorenog i zatvorenog tipa te podatke o socio-demografskim osobinama ispitanika kao što su dob, spol; duljina bavljenja travarstvom, podaci o izvoru njihova znanja o biljkama;



podaci o kupcima poput spola, dobi i njihove upoznatosti s tegobama zbog kojih su došli; preporuke nakon spoznaje da kupci imaju postavljenu dijagnozu šećerne bolesti; ljekovite biljke koje bi preporučili, narodni nazivi, organi biljaka koje preporučuju za korištenje, izvor nabave biljnog materijala, preporučene načine primjenjivanja u tradicionalnom liječenju dijabetesa. Istraživanje se provelo u skladu s etičkim načelima *International Society of Ethnobiology* (The ISE Code of Ethics, 2008).

### **3.3. Biljni material**

Materijal biljne vrste *A. millefolium* dobiven je od travara koji ga je sakupio na planini Velebit u Hrvatskoj, dok je ostali biljni materijal kupljen od travara u Gornjim Kolibama u Bosni i Hercegovini. U Tablici 2. nalaze se biljne vrste, njihova oznaka u ispitivanju, porodica, narodna imena i dijelovi bilja koji su korišteni u ispitivanjima. Identitet biljnog materijala za vrste *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium*, *Betula pendula*, *Centaurium erythraea*, *Salvia officinalis* i *Sambucus nigra* provjeren je prema monografijama 8. izdanja europske farmakopeje (Eur. Ph. 8,0, 2013). Vrste koje nisu oficinalne u farmakopeji identificirane su prema prikladnim znanstvenim studijama. List biljne vrste *Morus alba* identificiran je prema (Abbasi et al., 2013), dok je list biljne vrste *Vaccinium myrtillus* identificiran prema (Ponikierska et al., 2004; Wichtl, 2004).

Tablica 2. Biljne vrste korištene u ispitivanju

Oznaka u ispitivanju*	Biljna vrsta	Porodica	Hrvatski naziv	Dijelovi biljke
AM	<i>Achillea millefolium</i>	Asteraceae	Stolisnik	Nadzemni dio/zelen
AA	<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae	Pelin	Nadzemni dio/zelen
BP	<i>Betula pendula</i>	Betulaceae	Obična breza	List
CE	<i>Centaurium erythraea</i>	Gentianaceae	Kičica	Nadzemni dio/zelen
MA	<i>Morus alba</i>	Moraceae	Bijela murva	List
PV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Grah	Usplode (ljuska)
SO	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Kadulja	List
SN	<i>Sambucus nigra</i>	Caprifoliaceae	Bazga	Cvijet
VM	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Ericaceae	Borovnica	List

\*Dodatak oznake E i V odnosi se na etanolne, odnosno vodene ekstrakte.

### 3.4. Priprema ekstrakata

Osušeni biljni materijal samljeven je u mlinu i prosijan kroz sito veličine od 850  $\mu\text{m}$ . Biljni prah (2 g) preliven je s 20 mL prikladnog otapala u Erlenmeyerovoj tikvici od 50 mL. S ciljem ekstrakcije hidrofilnih i umjereno lipofilnih sastavnica kao otapala su korišteni voda, odnosno 80-postotni etanol. Ekstrakcija je provedena na ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 30 minuta, pri 80 °C (720 W i frekvencija od 35 Hz). Otopine su zatim centrifugirane 30 minuta (3400 rpm) te je supernatant prebačen u odmjernu tikvicu. Preostali talog u Erlenmeyerovim tikvicama ispran je još dva puta s 10 mL pripadajućeg otapala. Otopine iznad taloga centrifugirane su 30 minuta te su međusobno spojene. Etanolni ekstrakti uparavani su na rotavaporu na 30 °C dok su vodeni ekstrakti liofilizirani.

### **3.5. Određivanje metala TXRF metodom**

Metali su određeni metodom potpune refleksije rentgenskih zraka (Total Reflection X-ray Fluorescence, TXRF). Samljevenu biljnom materijalu (0,3 g) dodano je 15 mL HNO<sub>3</sub> (0,14 M) te je provedena ultrazvučna ekstrakcija na 25 °C tijekom 10 min. U 1000 µL ekstrakta stavljeno je 10 µL standardne otopine itrija koncentracije 1 g/L. Nakon homogenizacije 10 µL dobivene otopine pipetirano je u središte nesilikonirana nosača od kvarcnog stakla, osušeno je u laboratorijskom sušioniku na temperaturi od otprilike 50 °C i stavljeno u TXRF spektrometar. Vrijeme mjerenja iznosilo je 1000 s. Koncentracija određivanih elemenata određena je prema poznatoj količini itrija.

### **3.6. Određivanje ukupnih polifenola**

U ekstraktima je provedeno određivanje polifenolnih spojeva prema modificiranom propisu po Singleton i sur. (1998). Stavljeno je 20 µL ekstrakata u jažice mikrotitarske ploče. U ekstrakte je zatim dodano 80 µL Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđenog vodom u omjeru 1 : 3) te 80 µL 10-postotne vodene otopine natrijeva karbonata. Količina ukupnih polifenola određena je pomoću baždarnoga pravca galne kiseline (0,4 mg/mL). Nakon 1 sata inkubacije na sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija na 630 nm. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija otopina uzoraka te baždarna pravca galne kiseline ( $y=42,226x-0,0614$ ,  $R^2=0,9984$ ). Rezultati su prikazani kao ekvivalenti galne kiseline (GE), u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta (mg GE/g).

### **3.7. Određivanje ukupnih flavonoida**

Određivanje flavonoida u ekstraktima provedeno je prema modificiranim literaturnim propisima Kumazawa i sur., (2004) te Woisky i Salatino, (1998). U jažice je pipetirano 120 µL ekstrakta, zatim je dodano 120 µL 0,2-postotne metanolne otopine AlCl<sub>3</sub>. Sadržaj flavonoida

određen je u ekstraktima pomoću baždarnoga pravca 20-postotne metanolne otopine kvercetin dihidrata. Uzorci i standard stajali su 1 sat na sobnoj temperaturi na tamnome mjestu te im je zatim izmjerena apsorbancija na 405 nm. Rezultati određivanja prikazani su kao ekvivalenti kvercetin dihidrata (QE) u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta (mg QE/g).

### 3.8. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih kiselina u ekstraktima provedeno je prema modificiranome literaturnom propisu iz Europske farmakopeje (Eur. Ph. 5,0, 2004) za određivanje derivata ružmarinske kiseline u listu ružmarina. U jažice mikrotitarske ploče stavljeno je 100  $\mu$ L ekstrakata. Zatim je dodano 50  $\mu$ L 0,5 M HCl, 50  $\mu$ L nitrit-molibdat reagensa i 50  $\mu$ L 8,5-postotne vodene otopine NaOH. Odmah je izmjerena apsorbancija na 492 nm. Količina ukupnih fenolnih kiselina određena je pomoću baždarna pravca kavene kiseline. Rezultati određivanja prikazani su kao ekvivalenti kavene kiseline (CAE) u miligramima fenolnih kiselina po gramu suhe tvari ekstrakta (mg CAE/g).

### 3.9. HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida

Za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) standardi fenolnih kiselina i flavonoida pripremljeni su u koncentraciji od 0,2 mg/mL u metanolu, dok su ekstrakti pripremljeni u koncentraciji od 2 mg/mL. Za hidrolizu je u 1 mL otopine ekstrakta dodano 400  $\mu$ L HCl (6 M). Dobivena smjesa grijala se 2 sata u vodenoj kupelji, a zatim filtrirala u volumetrijsku tikvicu volumena 5 mL. Precipitat na filtarskom papiru ispran je metanolom i dodan sadržaju tikvice. Prije injektiranja otopine standarda i ekstrakta filtrirane su kroz 0,45  $\mu$ m PTFE filter. Separacija je provedena na Zorbax Eclipse XDB-C18 (5  $\mu$ m, 12.5 mm  $\times$  4.6 mm, Agilent) koloni opremljenoj s odgovarajućom pretkolonom. Smjesa vode, metanola i mravlje kiseline u omjeru 93 : 5 : 2 (V/V/V) i 3 : 95 : 2 (V/V/V) korišteni su kao pokretna faza A, odnosno B. Razdvajanje je provedeno pri 40 °C prema sljedećem protokolu: 0 minuta 20 % B, 10 minuta 40 % B i 35

minuta 50 % B. Brzina protoka bila je 1,0 mL/min. Primijenjeni volumen bio je 10  $\mu$ L ili 80  $\mu$ L za nehidrolizirane ili hidrolizirane uzorke. Identifikacija se temeljila na usporedbi retencijskog volumena uzorka i standarda te na usporedbi kromatograma ponovljenih ispitivanja u kojima je apliciran u određenoj količini uvećan sadržaj uzorka. Komponente su kvantificirane prema kalibracijskim krivuljama pri 270 nm (galna kiselina, vanilinska kiselina, luteolin, rutin-hidrat, miricetin, hiperozid, krizin, kemferol) ili 320 nm (klorogenska kiselina, kavena kiselina, ružmarinska kiselina, kvercetin dihidrat, *p*-kumarna kiselina, ferulična kiselina, sinapična kiselina). Granica detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) određene su prema literaturi Ermer i McB. Miller (2005).

$$\frac{\text{LOD}}{\text{LOQ}} = \frac{\text{SD}}{b} \times F$$

gdje je:

- SD standardna devijacija regresijskog pravca
- b nagib regresijskog pravca
- F faktor 3,3 za LOD i 10 za LOQ.

### 3.10. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Određivanje antiradikalne aktivnosti provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu prema radu Yen i Chen (1995). U jažice mikrotitarske pločice pipetirano je 120  $\mu$ L uzorka. Zatim je dodano 120  $\mu$ L metanolne otopine DPPH-a koncentracije 0,21 mg/mL. Negativna kontrola sastojala se od 120  $\mu$ L metanola i iste količine DPPH-a. Pozitivna kontrola bila je metanolna otopina BHA. Nakon stajanja 30 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija na 545 nm.

Moć hvatanja slobodnih radikala (eng. *Radical scavenging activity*, RSA) izračunata je kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH-a nakon dodatka otopine uzorka i apsorbancije otopine DPPH-a kojoj nije dodana otopina uzorka, prema formuli (1):

$$\text{RSA} = \frac{A_D - A_U}{A_D} \times 100 \quad (1)$$

gdje je:

- $A_U$  apsorbancija otopine DPPH-a nakon dodatka otopine uzorka
- $A_D$  apsorbancija otopine DPPH-a kojoj nije dodana otopina uzorka (negativna kontrola).

Rezultati su prikazani kao  $EC_{50}$ , vrijednost koja označava količinu ekstrakta koja hvata 50 % slobodnih radikala DPPH-a prisutnih u otopini.

### 3.11. Određivanje kelirajuće aktivnosti

Određivanje kelirajuće aktivnosti u ekstraktima provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu Decker i Welch (1990). U jažice je pipetirano 130  $\mu\text{L}$  ekstrakta te 50  $\mu\text{L}$  metanolne otopine  $\text{FeSO}_4$  (0,25 mmol/L). Nakon pet minuta, reakcija je pokrenuta dodatkom 50  $\mu\text{L}$  otopine ferozina koncentracije 1 mmol/L. Negativna kontrola sadržavala je metanol umjesto ekstrakta. Kao pozitivna kontrola korištena je metanolna otopina EDTA-e. Nakon deset minuta stajanja na tamnome mjestu pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija na 545 nm. Kelirajuća aktivnost (KA) izražena je u postotcima inhibicije prema formuli (2):

$$\text{KA} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

gdje je:

- $A_0$  apsorbancija negativne kontrole
- $A_1$  apsorbancija u prisutnosti uzorka.

Rezultati su prikazani kao  $EC_{50}$ , vrijednost koja označava količinu ekstrakta koja kelira 50 % iona željeza prisutnih u otopini.

### 3.12. $\beta$ -karoten linoleatna analiza

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu po Amarowiczu (Amarowicz i sur., 2004).

U tikvicu okrugla dna stavljeno je 0,006 g  $\beta$ -karotena otopljena u 4 mL kloroforma. Zatim je dodano 0,27 g Tweena 40, a kloroform je uklonjen pomoću rotavapora u hladnoj kupelji. U tikvicu je dodano 33,4  $\mu$ L linoleinske kiseline i 66,7 mL aerirane destilirane vode u manjim obrocima uza snažno miješanje.

Alikvoti od 200  $\mu$ L ove emulzije preneseni su u jažice koje su sadržavale po 5  $\mu$ L uzorka koncentracije 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ L i 45  $\mu$ L metanola. Kao pozitivna kontrola korištena je smjesa otopine BHA koncentracije 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ L i 200  $\mu$ L emulzije, dok je za negativnu kontrolu uzeto 5  $\mu$ L Tweena i 45  $\mu$ L destilirane vode. Jažice su snažno promiješane te je odmah izmjerena apsorbanacija na 450 nm ( $t=0$ ). Smjesa je inkubirana pri 50 °C. Apsorbancija na 450 nm mjerena je tijekom 120 min u intervalima od 15 min od trenutka pripreme, odnosno dodatka emulzije ( $t = 0$ ), pa do kraja pokusa ( $t = 120$ ).

Antioksidativna aktivnost (ANT) izračunata je kao postotak inhibicije brzine izbjeljivanja  $\beta$ -karotena u odnosu na kontrolu prema jednadžbi:

$$\text{ANT (\%)} = \frac{R_{\text{kontrola}} - R_{\text{uzorak}}}{R_{\text{kontrola}}} \times 100 \quad (3)$$

gdje je:

- $R_{\text{kontrola}}$  prosječna brzina izbjeljivanja  $\beta$ -karotena u emulziji bez antioksidansa (negativna kontrola)
- $R_{\text{uzorak}}$  prosječna brzina izbjeljivanja  $\beta$ -karotena u emulziji s biljnim ekstraktom.

### 3.13. Ispitivanje inhibitornog učinka ekstrakata na $\alpha$ -glukozidazu

Inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze određena je prema metodi opisanoj u radu Tiwari i sur. (2011) uz manje modifikacije. 100  $\mu$ L uzoraka otopljenih u 10 % DMSO-a (4, 2, 1 i 0,5 mg/mL otopine) inkubiralo se s 50  $\mu$ L  $\alpha$ -glukozidaze (1,0 U/mL otopljena u 0.1 M fosfatnom puferu, pH 6.8) tijekom 10 minuta na 37 °C. Nakon toga u reakcijsku smjesu dodano je 50  $\mu$ L supstrata (5 mM *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid pripremljen u istom puferu) i otpuštanje *p*-nitrofenola mjereno je na 405 nm spektrofotometrijski nakon 5 minuta inkubacije. Ispravak pozadinske apsorbcije proveden je mjerenjem otopine gdje je supstrat zamijenjen s 50  $\mu$ L pufera. Negativna kontrola sadržavala je 100  $\mu$ L 10-postotnog DMSO-a umjesto uzoraka za testiranje. Postotak enzimske inhibicije izračunat je korištenjem jednadžbe (4):

$$AG = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{kontrola}}} \times 100 \quad (4)$$

gdje je  $A_{\text{kontrola}}$  apsorbcija smjese bez ispitivana spoja (ekstrakta) i  $A_{\text{uzorak}}$  predstavlja apsorbciju ekstrakta. Kao standardna referenca korištena je akarboza. Primjenom prikladne regresijske analize dobiven je  $EC_{50}$  (koncentracija ispitivanog uzorka potrebnog za inhibiciju 50 % aktivnosti enzima).

### 3.14. Kultura Hep G2 stanica

Kultura stanica hepatocita humana karcinoma jetre (Hep G2) europske zbirke staničnih kultura (ECACC) uzgojene su na minimalno esencijalnom mediju (MEM) obogaćenom 10-postotnim fetalnim goveđim serumom, 20 IU/mL penicilinom i 20  $\mu$ g/mL streptomycinom. Stanice su uzgajane na 37 °C u vlažnoj atmosferi pod 5 %  $CO_2$ . Medij je bio osvježen dvaput na tjedan. U svrhu istraživanja stanice su uzgojene u 6 jažica i kultivirane 24 sata u uobičajenom mediju. Sljedećeg dana medij je usisan i stanice Hep G2 isprane su dvaput s medijem bez seruma. Za indukciju hiperglikemijskoga stanja stanice su uzgojene u MEM mediju i tretirane s 20 mM glukozom. Za istraživanje učinka ekstrakata u hiperglikemijskim uvjetima na Hep G2 stanice, one su tretirane 24 sata s 20 mM glukoze te 0.5 mg/mL (D – 0,5),



0,1 mg/mL (D – 0.1), ili 0,05 mg/mL (D – 0,05) ekstraktima. Stanice negativne kontrole (c) držane su u MEM mediju koji je sadržavao 5,56 mM glukoze.

### **3.15. Određivanje reducirana glutationa**

Hep G2 stanice su lizirane pomoću ultrasonizacije. Koncentracija GSH-a zatim je određena u staničnom lizatu Hep G2 koji je tretiran s 20 mL otopine glukoze i različitih koncentracija ekstrakata. U supernatant je dodano 5 % trikloroctene kiseline te je smjesa centrifugirana (3000 rpm, 10 min). U supernatant (100  $\mu$ L) dodani su fosfatni pufer (600  $\mu$ L, 0,3 M, pH 7,4) i 2,2-ditiobisinitro benzojeva kiselina (DTNB ili Ellmanov reagens, 50  $\mu$ L) koja je otopljena u istom puferu. Proizvodnja žute 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline mjerena je na 405 nm. Rezultati su izračunati korištenjem molarloga ekstinkcijskog koeficijenta produkta ( $14150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

### **3.16. Statistička analiza**

Pokusi su provedeni u triplicatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Statistička analiza provedena je korištenjem jednofaktorske analize varijance (ANOVA). Za usporedbu srednje vrijednosti rezultata uzoraka s kontrolom primijenjen je Dunnettov *post-hoc* test, a za usporedbu među uzorcima korišten je Tukeyjev *post-hoc* test. Statistički značajnima smatrane su vrijednosti  $P < 0.05$ . Statistička analiza provedena je korištenjem programa JMP V6 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Prikupljanje etnobotaničkih podataka

Kako bi se dokumentiralo i sačuvalo znanje o medicinskoj upotrebi bilja, prikupljene su informacije o biljnim vrstama i biljnim organima preporučenima isključivo za utjecaj na šećernu bolest. Upitnik je proveden među travarima na tržnicama u Hrvatskim gradovima. U 9 gradova ispitano je 26 prodavača, 9 muškaraca i 17 žena (Tablica 3). Dob ispitanika bila je između 20 i 80 godina, pri čemu je prosječna starost 53 godine (20 – 50: 42,3 %, 51 – 80: 57,7 %). Ispitanici se bave travarstvom u prosjeku 17 godina. Većina travara (16) dolazi na tržnicu 6 do 7 dana u tjednu. Jedan travar dolazi samo ljeti, dok zimi prodaje bilje kod kuće. Na tržnici se zadržavaju u prosjeku gotovo 6 sati.

Prodavači su opisali različite načine učenja o bilju: većina njih (49,0 %) stekla je znanje o ljekovitim biljkama iz knjiga, 21,6 % od ostalih travara te 17,7 % od rodbine ili poznanika (djedovi, roditelji, supružnici, prijatelji ili drugi prodavači). Tako se polovina ispitanika oslanja na tradicionalna saznanja, novim saznanjima koristi se 7,7 % travara, dok ih gotovo polovina koristi istodobno tradicionalna i nova saznanja. Neki od njih čitaju informacije na internetu iako su svjesni da su dostupni tekstovi na hrvatskom jeziku često nepotpuni. Nekoliko travara koji se kratko bave travarstvom spomenulo je da su pohađali tečaj organiziran od tvrtke koja se bavi prodajom bilja. Uočeno je da postoji velika razlika u znanju među travarima koji se dugo bave travarstvom i onih koji su se počeli time baviti prije nekoliko godina. Stariji travari pokazali su dodatno znanje o različitim lokalnim imenima, indikacijama, načinu korištenja i staništima raznih biljnih vrsta. Gotovo je svima zajedničko poznavanje latinskih imena biljnih vrsta o kojima govore. Brojni travari spominju da nikad ne savjetuju osobe s dijabetesom tipa 1 da koriste ljekovito bilje za tu dijagnozu.

Od svih biljnih vrsta koje imaju u ponudi naveli su da ih uzgajaju 29,8 %, dok 39,0 % prikupljaju prodavači, a 31,2 % pomažu prikupljati pomagači. Većina bilja gotovo se uvijek sakuplja s istoga područja. Najveći dio bilja (71,9 %) prodaju u razdoblju od mjesec do godinu nakon prikupljanja, odnosno do sljedećeg prikupljanja.

Tablica 3. Struktura i podaci o radu travara u urbanim dijelovima Hrvatske

	<b>Postotak (%)</b>
<b>Spol ispitanika</b>	
Muškarci	34,6
Žene	65,4
<b>Dob ispitanika</b>	
20 – 30 godina	3,8
31 – 40 godina	15,4
41 – 50 godina	23,1
51 – 60 godina	26,9
61 – 70 godina	23,1
≥ 71 godina	7,7
<b>Period bavljenja travarstvom</b>	
≤ 10 godina	26,9
11 – 20 godina	50,0
21 – 30 godina	15,4
≥ 31 godina	7,7
<b>Izvori znanja</b>	
Drugi travar	21,6
Član obitelji	17,7
Iskustvo prijatelja/poznanika	4,7
Knjige	49,0
Internet	7,0
<b>Prevažuju li u radu više</b>	
a) tradicionalna saznanja	50,0
b) nova saznanja	7,7
c) tradicionalna i nova saznanja	42,3
<b>Broj dana boravka na tržnici u tjednu</b>	5,2
<b>Zadržavanje na tržnici u danu (h)</b>	5,9
<b>Koliko često se biljke skupljaju s istih lokacija</b> (uvijek – 5, 4, 3, 2, 1 – ne vodim računa)	3,9

Tablica 3. Struktura i podaci o radu travara u urbanim dijelovima Hrvatske – nastavak

	<b>Postotak (%)</b>
<b>Vrste bilja u ponudi koje su</b>	
a) uzgojene	29,8
b) ubrane u prirodi od prodavača	39,0
c) ubrane u prirodi od pomagača	31,2
<b>Koliko dugo prosječno prođe od nabave do prodaje biljke</b>	
Do 1 tjedan	0,8
Između tjedna i mjeseca	10,7
Više od mjeseca	36,3
Više od 6 mjeseci	35,6
Više od godine	16,6
<b>Dob kupaca</b>	
0 – 20 godina	6,3
20 – 40 godina	23,2
40 – 60 godina	33,8
Više od 60 godina	36,7
<b>Spol kupaca</b>	
Muškarci	44,6
Žene	55,4
<b>Kupci dolaze</b>	
Najmanje jednom mjesečno	29,4
Najmanje jednom u godini	48,3
Novi kupci koje ne poznaje	22,3
<b>Kupci od travara traže proizvode</b>	
a) za dijagnozu zbog koje uzimaju i redovitu terapiju	49,4
b) za bolesti za koje ne uzimaju nikakvu terapiju iako su zbog nje išli liječniku i imaju dijagnozu	25,0
c) za oboljenja za koja još nisu posjetili liječnika	25,6

Njihovi korisnici uglavnom su stariji od 40 godina (70,5 %) iako im dolaze i mlađi od 20 godina (oko 6 %). Iako je većina navela da im podjednako dolaze žene i muškarci, ostali ispitanici navode da im u nešto većoj mjeri dolaze žene. Većina kupaca osobe su koje su ih posjetile više puta. Oko polovice kupaca koji su došli po savjet zna dijagnozu i uzima lijekove, četvrtina njih ne uzima lijekove iako su posjetili liječnika i postavljena im je dijagnoza, a četvrtina nije ni posjetila liječnika zbog svojih tegoba.

#### **4.2. Biljne vrste preporučene za liječenje šećerne bolesti**

Tijekom razgovora travari su naveli da za liječenje dijabetesa preporučuju 34 biljne vrste iz 17 porodica (Tablica 4). Naveli su bilje koje su imali u vrijeme prodaje, kao i one koje nisu uspjeli sakupiti, ali koriste ih za prodaju i znaju da se mogu naći na ovome klimatskom području. Najčešće spomenuta porodica bila je Asteraceae (7 vrsta), zatim slijedi Lamiaceae (4 vrste), dok su porodice Fabaceae, Moraceae i Poaceae zastupljene s 3 biljne vrste. Najčešće spomenute ljekovite biljke bile su: *U. dioica*, *P. vulgaris*, *C. intybus*, *A. absinthium*, *V. myrtillus* i *C. erythraea*. Ostale ljekovite biljke koje su spomenula najmanje četiri ispitanika bile su *T. officinale*, *M. nigra*, *B. pendula*, *T. chamaedrys* i *V. album*.

Tablica 4. Biljne vrste preporučene za liječenje šećerne bolesti

Latinsko ime	Porodica	Narodno ime	Organ biljke	Iz prirode	Uzgojene	Učestalost	Priprava
<i>Achillea millefolium</i> L.	Asteraceae	Stolisnik	nadzemni dio	x		3	infuz
<i>Arctium lappa</i> L.	Asteraceae	Čičak	korijen, list	x		2	infuz, dekokt
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	Ericaceae	Medvjетка	list	x		1	infuz
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Asteraceae	Pelin	nadzemni dio, list	x	x	9	infuz, dekokt
<i>Avena sativa</i> L.	Poaceae	Zob	sjeme		x	2	infuz
<i>Betula pendula</i> Roth	Betulaceae	Breza	list	x		5	infuz, dekokt
<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	Neven	cvijet	x		2	infuz
<i>Centaureum erythraea</i> Rafn	Gentianaceae	Kičica	nadzemni dio	x		8	infuz, dekokt
<i>Cichorium intybus</i> L.	Asteraceae	Cikorija, Vodopija	korijen, nadzemni dio	x		12	infuz, dekokt
<i>Cynara cardunculus</i> L.	Asteraceae	Artičoka	list	x	x	2	infuz, dekokt
<i>Equisetum arvense</i> L.	Equisetaceae	Preslica	nadzemni dio	x		1	infuz
<i>Ficus carica</i> L.	Moraceae	Smokva	list	x		1	infuz
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	Komorač	nadzemni dio		x	1	infuz
<i>Galega officinalis</i> L.	Fabaceae	Ždraljevina	nadzemni dio	x		1	infuz
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Poaceae	Ječam	sjeme		x	1	dekokt
<i>Lathyrus sativus</i> L.	Fabaceae	Grah jari	sjeme		x	2	kao kava se prži, melje i kuha
<i>Mentha x piperita</i> L.	Lamiaceae	Metvica	nadzemni dio		x	1	infuz
<i>Morus alba</i> L.	Moraceae	Bijeli dud (murva)	list	x		1	infuz

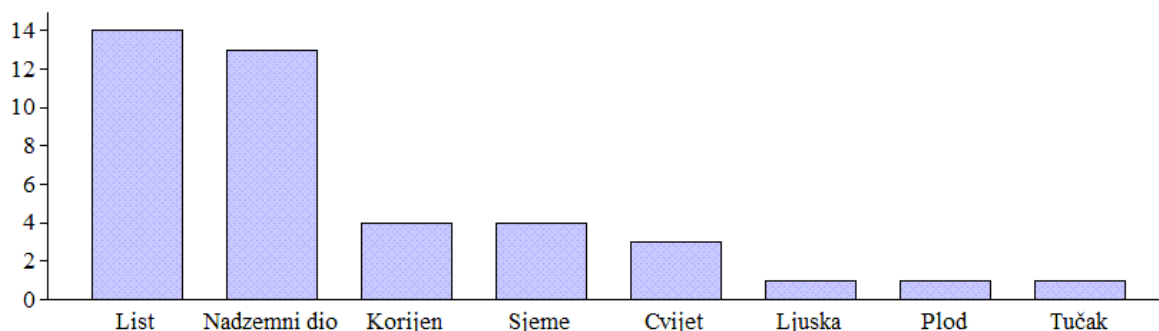
Tablica 4. Biljne vrste preporučene za liječenje šećerne bolesti – nastavak

Latinsko ime	Porodica	Narodno ime	Organ biljke	Iz prirode	Uzgojene	Učestalost	Priprava
<i>Morus nigra</i> L.	Moraceae	Crni dud (murva)	list	x		6	infuz, dekokt
<i>Morus sp.</i>	Moraceae	Murva	list	x		3	infuz, dekokt
<i>Olea europaea</i> L.	Oleaceae	Maslina	list		x	1	infuz
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Fabaceae	Grah	ljuska		x	13	infuz, dekokt
<i>Polygonum aviculare</i>	Polygonaceae	Troskot	nadzemni dio	x		1	infuz
<i>Rosa canina</i> L.	Rosaceae	Šipak	plod	x		1	dekokt
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	Kadulja	list	x		2	dekokt
<i>Sambucus nigra</i> L.	Caprifoliaceae	Bazga	cvijet	x		2	dekokt
<i>Taraxacum officinale</i> Weber	Asteraceae	Maslačak	korijen, list	x		7	infuz, dekokt
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	Lamiaceae	Dubčac	nadzemni dio	x		4	infuz
<i>Teucrium montanum</i> L.	Lamiaceae	Trava Iva	cvijet	x		2	infuz, dekokt
<i>Trigonella foenum- graecum</i> L.	Fabaceae	Piskavica, Jarčev rog	sjeme, nadzemni dio	x		3	infuz
<i>Urtica dioica</i> L.	Urticaceae	Kopriva	korijen, list, nadzemni dio	x	x	17	infuz, dekokt
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Ericaceae	Borovnica	list	x	x	9	infuz
<i>Veronica officinalis</i> L.	Scrophulariaceae	Čestoslavica	nadzemni dio	x		2	infuz, dekokt
<i>Viscum album</i> L.	Loranthaceae	Imela	list	x		4	infuz, dekokt, macerat
<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	Kukuruzna svila	njuška cvijeta		x	2	dekokt



Prema Slici 10. listovi (34,15 %) bili su najčešće preporučeni biljni organi, a slijede ih korijenje (31,71 %), sjemenke (9,76 %) i cvjetovi (7,32 %), dok su najmanje bili zastupljeni ljuska, plod i njuška cvijeta (po 3 % svaki organ). Pretpostavlja se da su listovi najzastupljeniji jer su uključeni u fotosintezu i proizvodnju metabolita (Ghorbani, 2005).

Bilje koje travari imaju u prodaji uglavnom je sakupljeno u prirodi, dok iz uzgoja imaju manje količine. Travari prikupljaju količine koje mogu prodati do sljedećeg branja ili manje ako ne mogu naći željene količine bilja. Oni s dugogodišnjim iskustvom znaju količinu koja se može prodati u razdoblju do sljedeće sezone branja. Većina travara imala je bilje u obliku mješavine u plastičnim vrećicama označenim narodnim imenom i binarnom nomenklaturom. Čajne mješavine koje sadrže imenovane biljne vrste kao biljne dijelove u smjesama, čine identifikaciju vrlo izazovnom. Kada je to moguće, ljekovito bilje koje su spomenuli ispitanici identificirali su ispitivači. U slučajevima kada bilje nije bilo prisutno na tržnici u trenutku razgovora ili kada je identifikacija u smjesi bila nemoguća, bilje je identificirano binarnom nomenklaturom kao i narodnim imenima (<http://hirc.botanic.hr/fcd>, 2013). U slučaju bilo kakve nedoumice travar je ponovno kontaktiran, a identifikacija je potvrđena pomoću slike.



Slika 10. Učestalost preporuke pojedinih biljnih organa od ispitanika.

Gotovo sve ljekovito bilje bilo je preporučeno uzimati u obliku čaja. Najčešći preporučeni način pripremanja bio je infuz. Rezultati ispitivanja pokazuju da je 19 vrsta (55,88 %) navedeno da se može koristiti odvojeno ili zajedno s drugim biljnim vrstama (u mješavinama), dok je za 14 biljnih vrsta (41,18 %) preporučeno korištenje u mješavinama. Mogući je razlog taj da interakcije između različitih vrsta u mješavinama poboljšavaju terapeutsko djelovanje i smanjuju toksičnost ili štetne učinke nekih biljnih vrsta (Leitão i sur., 2013). Samo jednu vrstu, *L. sativus*, nije preporučeno koristiti u mješavini, nego isključivo samostalno. Njezin je način pripreme drukčiji od svih ostalih biljnih vrsta: poput pripreme kave,

prži se te zatim melje i kuha. Četiri travara preporučuju individualnu upotrebu bilja, 3 travara preporučuju korištenje bilja zasebno ili u smjesama, a ostatak njih preporučuje mješavine. Uputa pojedinih travara priprema je veće količine (oko 1 litre) čaja ujutro i pijenje tijekom dana, dok drugi preporučuju svježu pripremu prije upotrebe i konzumaciju 2 do 3 šalice dnevno pripremljene s jednom čajnom žlicom bilja. Navedeno otapalo u receptu uvijek je voda, a pripravak se uzima oralno u redovitim razmacima.

### **4.3. Određivanje metala TXRF metodom**

Uzimanje različitih elemenata kroz korijenski sustav iz tla ovisi o pojedinoj biljnoj vrsti, botaničkoj strukturi specifična tkiva, tipu tla i elementu. Osim toga, mikroelementi mogu ući u biljku iz vanjskog okoliša (Ražić i sur., 2005). Dobro je poznato da neki elementi ovisno o koncentraciji mogu igrati različite uloge u razvoju i životu biljne vrste (Imbrea i sur., 2016; Król i sur., 2016; Ražić i sur., 2005). Istodobno, mikronutrienti su esencijalne hranjive tvari koje ljudsko tijelo zahtijeva svakodnevno u tragovima ili malim količinama da bi ispravno funkcioniralo (Siddiqui i sur., 2014).

Iako su ispitanici u etnobotaničkom dijelu istraživanja navodili da su mjesta sakupljanja bilja bila daleko od prometnica, s obzirom na dob pojedinih ispitanika te činjenicu da su imali pomagače koji nisu bili pod njihovim nadzorom, nije isključena mogućnost ponude bilja ubrana uz manje korištene prometnice. U literaturi su zabilježena ispitivanja sadržaja pojedinih elemenata u biljnim vrstama obuhvaćenima ovim istraživanjem provedenim s ciljem ispitivanja potencijalne toksičnosti za čovjeka (Dghaim i sur., 2015; Salamon i sur., 2015) ili određivanja razine zagađenosti okoliša (Brudzińska-Kosior i sur., 2012). U ovom je radu korištena ukupna rendgenska fluorescentna analiza za istodobno analiziranje više elemenata u biljnom ekstraktu da bi se istražila sigurnost biljnog materijala korištenog u ovoj studiji. Rezultati su prikazani u Tablici 5., a izraženi su u mg metala po kg biljne vrste. Analizirani su metali koji bi mogli utjecati na tijek dijabetičkih promjena bilo povećanjem ulaska glukoze u stanice ili sprječavanjem razvoja dijabetičkih komplikacija, te teški metali koji bi mogli pokazati štetno djelovanje na organizam i tako pridonijeti narušavanju zdravlja dijabetičkih pacijenata.

Krom (Cr) je element u tragovima uključen u metabolizam ugljikohidrata, lipida i proteina uglavnom povećanjem učinkovitosti inzulina. Nedostatak kroma utječe na održavanje normalne tolerancije glukoze i razina lipida. Postoji više teorija o mehanizmu djelovanja, no

najprihvaćenija uključuje oligopeptid koji veže krom, nazvan kromodulin. Ima sposobnost vezati četiri atoma kroma i samo u tom obliku pokazuje svoju punu biološku aktivnost. Prisutan je u citoplazmi i jezgri stanica osjetljivih na inzulin u neaktivnu obliku. Nakon vezanja inzulina se aktivira, što dalje dovodi do aktivacije ATP-ovisne protonske pumpe, smanjenja pH-a, oslobađanja kroma od transferina i njegovo vezanje na kromodulin. Nakon vezanja četiriju atoma kroma, molekula kromodulina pretvara se u biološki aktivan oblik koji se veže na  $\beta$ -podjedinicu inzulinskog receptora, prethodno aktivirana hormonom, što rezultira aktivacijom receptorske tirozinske kinaze i pojačanja signala inzulina (Lewicki i sur., 2014). Krom je pronađen u ovom radu samo u uzorku biljne vrste *A. absinthium*.

Magnezij (Mg) je kofaktor u više od 300 enzimskih reakcija, a važan je za električnu stabilnost stanica, održavanje integriteta membrane, kontrakcije mišića, provođenje živčanog sustava i vaskularni tonus. Nedostatak je povezan s brojnim kliničkim poremećajima, uključujući inzulinsku rezistenciju, dijabetes tipa 2, hipertenziju i kardiovaskularnu bolest. Istraživanja su pokazala da je razina magnezija u plazmi obrnuto proporcionalna osjetljivosti na inzulin u odraslih osoba te s tjelesnom masom djece. Parenteralni dodatak magnezija poboljšava osjetljivost na inzulin kao i izlučivanje inzulina u bolesnika s dijabetesom tipa 2. Nadalje, objavljeno je da oralna primjena magnezija (u vidu otopine magnezijeva klorida) povisuje razine magnezija u serumu i poboljšava osjetljivost na inzulin u bolesnika s dijabetesom tipa 2 (Evans i Bahng, 2000).

Cink (Zn) je još jedan važan mineral u ljudskoj prehrani. Sa širokim rasponom bioloških funkcija sudjeluje u radu više od 200 enzima. Interakcija cinka s inzulinom izaziva konformacijske promjene i pojačava vezanje na inzulinski receptor. Cinkovi ioni posjeduju inzulinsko-mimetičku aktivnost, pretpostavlja se kroz sposobnost inhibiranja proteinskih tirozin fosfataza. Cink je kofaktor nekoliko ključnih enzima vezanih uz metabolizam glukoze. Aktivator je fruktoza-1-6-bisfosfat aldolaze i inhibitor fruktoza-1-6-bisfosfataze. Također može djelovati antioksidativno, te je kofaktor u bakar/cink superoksid dismutazi, glavnom antioksidacijskom enzimu (Evans i Bahng, 2000).

Mangan (Mn) igra važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima kao sastavnim dijelovima nekih enzima kao što su piruvatna karboksilaza i arginaza te aktivatora različitih enzima poput fosfoenolpiruvatne karboksinaze i glutaminske sintetaze. Ovi enzimi aktivirani manganom igraju važnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata, aminokiselina i kolesterola. Mangan pomaže u metabolizmu glukoze i potreban je za normalnu sintezu te izlučivanje inzulina (Siddiqui i sur., 2014).

Bakar (Cu) može imati dvostruku ulogu, smatra se snažnim katalizatorom enzima i opasnim reagensom koji stvara hidroksilni radikal. Nedostatak bakra dovodi do netolerancije glukoze, smanjena odgovora na inzulin i povećana odgovora na glukozu. Povezan je s hiperkolesterolemijom i aterosklerozom (Siddiqui i sur., 2014).

S obzirom na to da se pripravci kupljeni kod travara koriste u dozi do 3 žličice dnevno, važno je istaknuti da se svi metali koji su analizirani u ispitivanim uzorcima nalaze ispod maksimalne dozvoljene dnevne doze (www.efsa.europa.eu, 2015; apps.who.int, www.efsa.europa.eu, 2017) bez obzira na to koriste li se u smjesi ili pojedinačno. Iako je broj uzoraka bilo premali za detaljnu statističku analizu, može se uočiti da su najbogatije magnezijem bile ljuske graha, dok su zeleni i cvjetovi općenito sadržavali veću količinu cinka i bakra od ostalih uzoraka. List borovnice bio je izrazito bogat manganom no sadržaj tog metala je još uvijek bio ispod maksimalno dozvoljene dnevne doze. Sadržaj olova, nikla i arsena je općenito bio nizak, s tim da je najveću količinu olova sadržavao stolisnik, nikla ljuske graha, dok je sadržaj arsena najveći bio u listu breze.

Metali potencijalno štetni za ljudsko zdravlje dugo se zadržavaju u tlu i mogu se prenijeti u hranidbeni lanac u znatnim količinama, pri čemu teški metali zbog toksičnih posljedica za okoliš i visoka kapaciteta akumuliranja predstavljaju jedan od najvažnijih suvremenih ekoloških problema (Salamon i sur., 2015).

Među proučavanim metalima olovo (Pb) najpoznatiji je toksični zagađivač okoliša. Reagira ili stvara komplekse s mnogim biomolekulama te nepovoljno utječe na reproduktivne, živčane, gastrointestinalne, imunološke, bubrežne, kardiovaskularne, skeletne i mišićne sustave, kao i razvojne procese (Krejpcio i sur., 2007). Prema smjernicama (apps.who.int) dopušteni je sadržaj olova u biljnim lijekovima i proizvodima 10 mg/kg. Sadržaj olova u ispitivanim uzorcima kretao se od 0,3 do 1,6 mg/kg.

Arsen (As) široko je rasprostranjen u prirodi i uglavnom se transportira vodom. Može se naći u anorganskim i organskim, mnogo manje toksičnima, oblicima u okolišu. Izvori izloženosti arsenu uključuju zrak, vodu za piće i hranu. Utvrđeno je da je karcinogen te povezan s drugim bolestima kao što su vaskularna i srčana oboljenja. Neke su epidemiološke studije pokazale da je izloženost arsenu povezana s povećanim rizikom od razvoja dijabetesa (Sung i sur., 2015).

Kao teški metal, nikal (Ni) široko je rasprostranjen u okolišu. Izloženost niklu ostvaruje se kroz zrak, hranu i pitku vodu. Do danas je uglavnom nejasno je li izloženost niklu povezana s rizikom od razvoja dijabetesa u ljudi. Nekoliko studija na životinjama pokazalo je da izloženost niklu može izazvati hiperglikemiju, vjerojatno zbog njegovih učinaka u promicanju

jetrene glikolize i otpuštanja glukagona gušterače te smanjenja perifernog iskorištavanja glukoze. Međutim, dokazi iz humanih studija ograničeni su te se još istražuju navodi da je povećana koncentracija nikla u urinu povezana s povišenom prevalencijom dijabetesa tipa 2 u ljudi (Liu i sur., 2015).

Poznato je da određeni elementi, osobito Zn, Cu i Mn imaju ključnu ulogu u raznim biokemijskim redoks-reakcijama kao katalitičkim centrima različitih enzima. Stoga su Król i sur. (2016) ispitivali djelovanje ekstrakta *M. alba* na dijabetes u štakora i pronašli da veće količine Cu (12,49 mg/kg) te znatno veće količine Zn (45,00 mg/kg) u ekstraktu od pronađenog u ovom radu nisu smanjile sposobnost polifenola *M. alba* da keliraju Cu te povoljno utječu na dijabetes.

Sadržaj elemenata u bilju koje je dostupno u travara ispitivalo se i prije. Tako su na tržnicama Srbije Ražić i sur. (2005) ispitivali biljne vrste među kojima su se nalazile *A. absinthium*, *A. millefolium*, *S. officinalis* i *P. vulgaris*. U svim biljnim vrstama sadržaj Mn bio je veći od koncentracija određenih u ovom radu dok je sadržaj Cu i Zn bio niži, s izuzetkom *S. officinalis* koja je u navedenom radu imala više Zn. Također je ispitivan sadržaj Cu i Zn u biljci *A. millefolium* (Malinowska i Jankowski, 2017) s tri različita područja s obzirom na sadržaj vlage u tlu i dobiveni su rezultati u skladu s rezultatima u ovom radu (Cu 9,99 mg/kg, Zn 25,98 mg/kg).

U radu Brudzińska-Kosior i sur. (2012) ispitivan je sadržaj Mg i Cr u *C. erythraea* s 31 lokaliteta u Poljskoj te su zabilježene količine elemenata znatno veće od rezultata u ovom radu. Nadalje, Brudzińska-Kosior navodi da je *C. erythraea* sposobna akumulirati povišene razine metala, stoga je neophodno oprezno odabrati mjesta za prikupljanje ove vrste da bi se izbjegao povećan unos metala u prehrambeni lanac, a ove mjere predostrožnosti posebno su važne kada se biljka koristi u većim količinama.

Zbog njihove toksičnosti, posebna pozornost posvećena je sadržaju metala As, Cu, Ni i Pb koji je u ekstraktu *V. myrtillus* bio mnogo niži nego što je propisano zakonom za dodatke prehrani i značajno niži od dobivenoga sadržaja u ispitivanju u Poljskoj (Kandziora-Ciupa i sur., 2013). U literaturi je zabilježeno da list *V. myrtillus* sadrži Cr (Wichtl, 2004), no isti nije pronađen u ovom radu, što je u skladu sa studijom provedenom u sjevernoj Europi (Reimann i sur., 2001). Određeni autori smatraju da je upravo krom odgovoran za antidijabetički učinak lista *V. myrtillus* (Wichtl, 2004), no s obzirom na to da nije prisutan u biljkama sa svih staništa, ne može mu se sa sigurnošću pripisivati glavna odgovornost za učinak svih primjeraka *V. myrtillus*. Da se toksični Pb može naći na tržnicama, pokazao je Dghaim i sur. (2015) u *S. officinalis* na tržnicama Ujedinjenih Arapskih Emirata, gdje je sadržaj Pb bio veći od

dopuštenoga prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) ([apps.who.int](http://apps.who.int)), a ujedno je 64 % uzoraka s tržnice sadržavalo veći sadržaj Pb od dopuštenoga prema istim smjernicama. Sigurnije količine Pb i Ni u Slovačkoj su pronašli Salamon i sur. (2015) u cvjetovima *S. nigra*, gdje je bila visoka, iako još u prihvatljivim granicama razina Ni (2,79 mg/kg), dok je Pb bio prisutan u mnogo nižoj količini od dopuštene granične vrijednosti. Provjeravanje utjecaja blizine prometnica i staništa bilja sa sadržajem metala provedeno je u Poljskoj te je u listu *B. pendula* (Kosiorek i sur., 2016) pronađen Cr, dok je Cu, Pb i Ni potvrđeno šest puta manje, a Mn i Zn više nego u ovom radu. Kosiorek i sur. (2016) pokazali su da postoji poveznica između većeg sadržaja pojedinih metala u biljkama prikupljenima blizu urbana područja ili prometne ceste u uzorcima, za razliku od sakupljenih uz manje prometna područja.

Tablica 5. Sadržaj elemenata u uzorcima

	Cr	Mg	Zn	Mn	Cu	Pb	Ni	As
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
AA	0,5 ± 0,1	205 ± 80	31,85 ± 0,15	28,4 ± 0,2	25,15 ± 0,1	1,55 ± 0,05	1,95 ± 0,05	0,8 ± 0,05
AM	n. d.	655 ± 90	21,4 ± 0,1	24,55 ± 0,2	11 ± 0,1	0,75 ± 0,05	0,6 ± 0,05	1,05 ± 0,05
BP	n. d.	545 ± 80	19,8 ± 0,1	24 ± 0,2	6,85 ± 0,1	0,95 ± 0,05	0,65 ± 0,05	3,3 ± 0,05
CE	n. d.	295 ± 80	29,52 ± 1,25	37,05 ± 2,25	13,59 ± 1	0,44 ± 4,25	3,13 ± 0,07	1,31 ± 4
MA	n. d.	795 ± 110	14,35 ± 0,1	9,5 ± 0,15	5,6 ± 0,1	0,8 ± 0,05	1,45 ± 0,05	1 ± 0,05
PV	n. d.	1575 ± 110	16,4 ± 0,1	12,5 ± 0,15	11,25 ± 0,1	0,25 ± 0,05	5,8 ± 0,1	1,15 ± 0,05
SN	n. d.	715 ± 105	22,5 ± 0,15	11,1±0,15	12 ± 0,1	0,35 ± 0,05	0,35 ± 0,05	1,05 ± 0,05
SO	n. d.	310 ± 75	16,65 ± 0,1	7,8 ± 0,1	9,65 ± 0,1	0,4 ± 0,05	0,5 ± 0,05	0,55 ± 0,05
VM	n. d.	355 ± 90	18,05 ± 0,1	474 ± 0,95	7,1 ± 0,1	0,55 ± 0,05	0,2 ± 0,05	1,05 ± 0,05

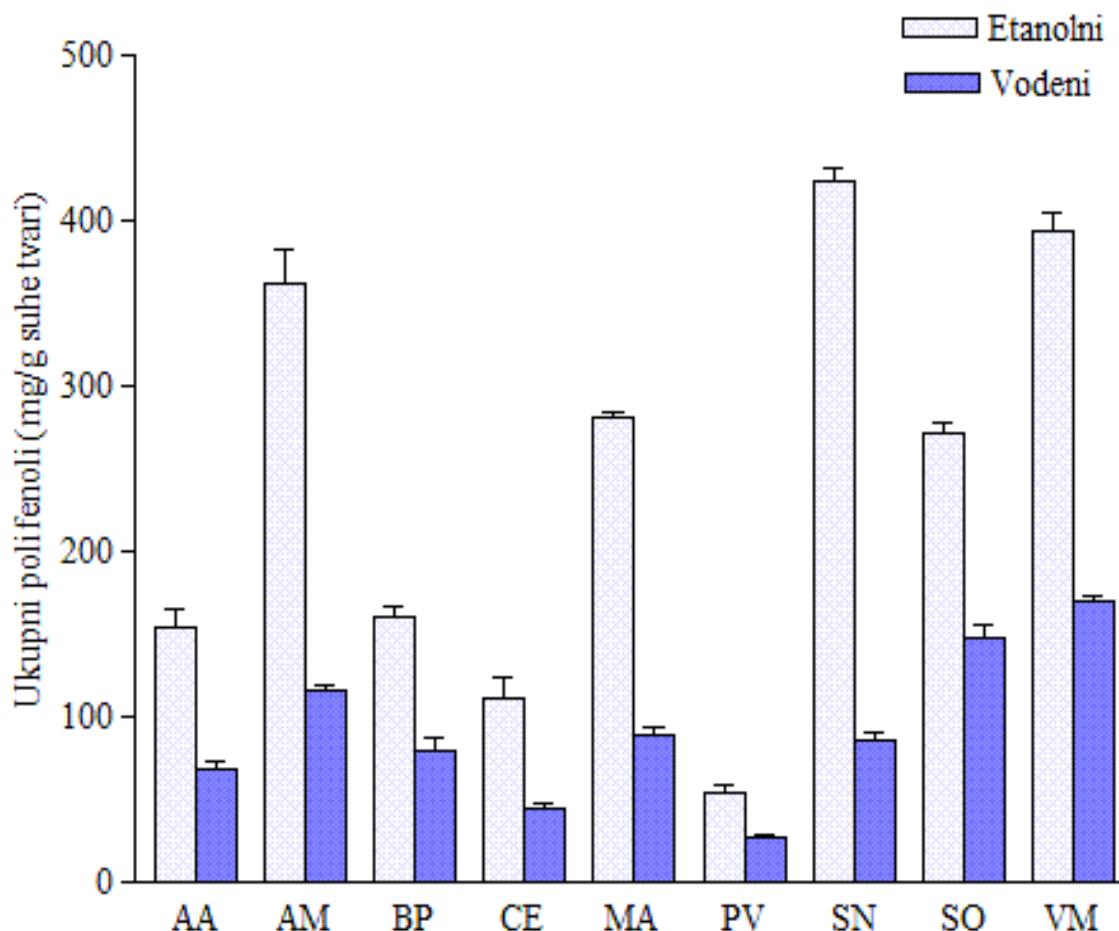
n. d. – nije detektiran

#### 4.4. Određivanje ukupnih polifenola

Istraživanja su pokazala da je dugotrajna konzumacija hrane bogate biljnim polifenolima povoljno utjecala na sprječavanje razvoja dijabetesa, raka, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih bolesti (Solayman i sur., 2016). Korištenjem navedenih saznanja u istraživanju dijabetesa nastoji se odrediti odnos između različitih čimbenika rizika i komplikacija te objasniti djelovanja spojeva učinkovitih u sprječavanju razvoja komplikacija dijabetesa (Singh R. i sur., 2013). Mehanizmi fenolnih spojeva u kontroli glukoze u pacijenata s dijabetesom uključuju inhibiciju apsorpcije glukoze, zaštitu od oštećenja  $\beta$ -stanica gušterače, poboljšanje oslobađanja inzulina i osjetljivosti te modulaciju puta metabolizma ugljikohidrata (Solayman i sur., 2016). Istraživanja na molekularnoj razini pokazala su da fenoli mogu djelovati na modulaciju u stanici sudjelujući u interakciji s brojnim molekulama u signalizaciji staničnih procesa (Soobrattee i sur., 2005). Sposobnost uklanjanja radikala uglavnom je posljedica posjedovanja hidroksilnih skupina. Budući da imaju snažnu sposobnost uklanjanja radikala, oni inhibiraju nastajanje krajnjih produkata glikacije te su stoga korisni za suzbijanje komplikacija povezanih s dijabetesom (Singh S. i sur., 2013).

Količina ukupnih polifenola određena je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa koji s reducirajućim fenolnim spojevima stvara kromogene produkte čiji se intenzitet obojenja može mjeriti spektrofotometrijski. Kemijska struktura Folin-Ciocalteu reagensa nije potpuno razjašnjena, no vjeruje se da se sastoji od fosfomolibdenskih i fosfovolframskih heteropoli kiselina koje su žute boje. U bazičnom reakcijskom mediju u prisustvu fenola nastaje Mo-W kompleks koji reakcijsku smjesu oboji u plavo. Smatra se da je mehanizam reakcije fenolna redukcija šesterovalentnog iona molibdena u peterovalentnu formu, pri čemu se boja mijenja iz žute u plavu (Agbor i sur., 2014). Količina ukupnih polifenola u ispitivanim ekstraktima prikazana je na Slici 11., a detaljna statistička analiza u Tablici 6.





Slika 11. Količina ukupnih polifenola u ispitivanim ekstraktima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Rezultati prikazani na Slici 11. pokazuju da je količina ukupnih polifenola veća u etanolnim ekstraktima nego u vodenima, što je u skladu s umjerenom polarnosti i dobrom topljivosti prirodnih polifenola u 80-postotnom etanolu. Ipak, podaci prikazani u Tablici 6. pokazuju da ta razlika nije uvijek bila statistički značajna. U etanolnim ekstraktima sadržaj polifenola varira od 54,51 mg GE/g do 423,51 mg GE/g, dok se u vodenim ekstraktima te vrijednosti kreću od 27,59 mg GE/g do 170,69 mg GE/g. Najveću količinu polifenola u etanolnim ekstraktima sadrže SN-E i VM-E. Najmanji sadržaj polifenola imao je PV-E. Među vodenim ekstraktima najviše polifenola sadržavali su VM-V te SO-V, dok je najmanje polifenola pronađeno, kao i kod etanolnih ekstrakata, u ekstraktu PV-V.

Tablica 6. Količina ukupnih polifenola (UP), ukupnih flavonoida (UF) i ukupnih fenolnih kiselina (UFK) u etanolnim i vodenim ekstraktima

Uzorak	UP (mg GE/g)	UF (mg QE/g)	UFK (mg CAE/g)
AA-E	154,37 ± 18,95 <sup>CDE</sup>	63,67 ± 2,74 <sup>BCD</sup>	13,46 ± 0,74 <sup>IJ</sup>
AA-V	68,62 ± 8,33 <sup>DE</sup>	17,25 ± 1,09 <sup>DE</sup>	42,77 ± 0,8 <sup>F</sup>
AM-E	362,58 ± 36,06 <sup>AB</sup>	43,43 ± 1,6 <sup>CDE</sup>	54,41 ± 2,23 <sup>E</sup>
AM-V	116,67 ± 3,73 <sup>DE</sup>	38,4 ± 0,39 <sup>CDE</sup>	74,7 ± 1,35 <sup>C</sup>
BP-E	160,42 ± 10,59 <sup>CDE</sup>	22,51 ± 1,37 <sup>CDE</sup>	22,28 ± 0,47 <sup>H</sup>
BP-V	80,64 ± 12,1 <sup>DE</sup>	20,12 ± 1,61 <sup>DE</sup>	35,9 ± 1,44 <sup>G</sup>
CE-E	111,92 ± 20,24 <sup>DE</sup>	17,43 ± 0,57 <sup>DE</sup>	9,08 ± 0,6 <sup>JK</sup>
CE-V	44,6 ± 4,99 <sup>DE</sup>	13,29 ± 0,85 <sup>DE</sup>	13,04 ± 0,19 <sup>IJ</sup>
MA-E	281,29 ± 6,75 <sup>BC</sup>	154,51 ± 22,64 <sup>A</sup>	14,37 ± 0,64 <sup>IJ</sup>
MA-V	89,74 ± 7,36 <sup>DE</sup>	31,51 ± 4,25 <sup>CDE</sup>	16,37 ± 1,15 <sup>I</sup>
PV-E	54,51 ± 7,87 <sup>DE</sup>	34,07 ± 5,17 <sup>CDE</sup>	3,8 ± 0,51 <sup>KL</sup>
PV-V	27,59 ± 1,89 <sup>E</sup>	6,22 ± 1,23 <sup>E</sup>	1,54 ± 0,00 <sup>L</sup>
SN-E	423,51 ± 13,88 <sup>A</sup>	105,55 ± 3,24 <sup>AB</sup>	35,87 ± 1,06 <sup>G</sup>
SN-V	87,08 ± 5,56 <sup>DE</sup>	21,39 ± 1,03 <sup>CDE</sup>	31,78 ± 2,59 <sup>G</sup>
SO-E	271,99 ± 10,66 <sup>BC</sup>	140,03 ± 21,35 <sup>A</sup>	65,67 ± 2,97 <sup>D</sup>
SO-V	147,78 ± 14,85 <sup>CDE</sup>	47,85 ± 4,6 <sup>CDE</sup>	77,47 ± 3,76 <sup>C</sup>
VM-E	393,36 ± 20,65 <sup>AB</sup>	77,69 ± 2,94 <sup>BC</sup>	82,92 ± 3,3 <sup>B</sup>
VM-V	170,69 ± 5,47 <sup>CD</sup>	31,47 ± 1,32 <sup>CDE</sup>	125,81 ± 1,32 <sup>A</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).

<sup>A-E</sup> razlike između ekstrakata unutar istog stupca (uzorci koji nisu povezani istim velikim slovom statistički su različiti, Tukey post-test,  $P < 0,05$ ).

Količina polifenola nadzemnog dijela biljke *A. millefolium* u etanolnom ekstraktu trostruko je veća od količine dobivene u vodenom ekstraktu. To je znatno veća razlika u odnosu na ispitivanje (Keser i sur., 2013) provedeno odvojeno na listovima i cvjetovima etanolnih i vodenih ekstrakata *A. millefolium* u Turskoj, koje je također pokazalo gotovo dvostruko veću količinu polifenola u etanolnim ekstraktima. U literaturi su zabilježene znatno manje količine polifenola u vodenim ekstraktima nego što pokazuje rezultat u ovom radu, poput uzoraka

sakupljenih u Hrvatskoj i Brazilu gdje je dobiveno trostruko manje polifenola (Belščak-Cvitanović i sur., 2014; Düsman i sur., 2013), a još manji sadržaj dobiven je u Bugarskoj (Georgieva i sur., 2015), odnosno 2,77 mg GE/g u infuzu i 7,92 mg GE/g u dekoktu. Slični niski rezultati opaženi su u ispitivanjima 70-postotnog etanolnog ekstrakta cvijeta *A. millefolium* (Benedec i sur., 2015), gdje je dobivena količina 38,12 mg GE/g.

Sadržaj polifenola u AA-E iznosio je 154,37 mg GE/g. U prijašnjim studijama zabilježen je za trećinu veći sadržaj polifenola (Mahmoudi i sur., 2009) te isto toliko manji (Stanković i sur., 2016) od količine polifenola AA-E u ovom radu. Ghafoori i sur. (2014) dobili su u *A. absinthium* vrlo nisku količinu polifenola 6,59 mg GE/g u 75-postotnom etanolnom ekstraktu. Usporedbom sadržaja polifenola etanolnih ekstrakata *A. millefolium* i *A. absinthium* (Mekinic i sur., 2013) opažena je veća količina polifenola u *A. millefolium*, što je slično rezultatima prikazanim u ovom radu. Ipak, može se uočiti da je u ovom radu sadržaj u uzorku *A. millefolium* dvostruko veći, dok je u Mekinic i sur. (2013) razlika neznatna. Suprotno tomu, Moldovan i sur. (2011) pronašli su znatno veću količinu polifenola u etanolnim ekstraktima *A. absinthium* nego u *A. millefolium*.

Količina polifenola u MA-E trostruko je veća nego u MA-V. Slični su rezultati objavljeni i od Wang i sur. (2012), koji su uspoređivali sadržaj polifenola vodenih i etanolnih ekstrakata lista, stabljike i ploda *M. alba*. Količina ukupnih polifenola bila je znatno veća u etanolnim nego u vodenim ekstraktima. Zanimljivo je i da je sadržaj polifenola među svim ispitanim organima bio najviši u listovima. Suprotno tomu, u provedenom ispitivanju na vodenim i 95-postotnim etanolnim ekstraktima trinaest biljaka, među kojima je *M. alba* (Diaz i sur., 2012), dobivena je veća količina polifenola u vodenim nego u etanolnim ekstraktima. Anwar i sur. (2015) ekstrakcijom su apsolutnim i 80-postotnim etanolom *M. alba* dobili nešto veće količine polifenola u 80-postotnom etanolnom ekstraktu, što upućuje na blago polarni karakter polifenolnih komponenti u listu bijelog duda. Sadržaj polifenola je pritom bio znatno manji nego kod MA-V.

Sadržaj polifenola u SO-E gotovo je dvostruko veći nego u SO-V. Ukupni polifenoli u etanolnim i vodenim ekstraktima istraživani su prije u radu Neagu i sur. (2014) te su zabilježene više vrijednosti polifenola u etanolnim ekstraktima, no sami rezultati nisu usporedivi s obzirom na to da je korišten drugi standard. Suprotno su zabilježili Kwon i sur. (2006) pri ispitivanju sadržaja polifenola u vodenom i 12-postotnom etanolnom ekstraktu *S. officinalis*, gdje je dobivena količina polifenola 20,91 mg GE/g u vodenom i 11,88 mg GE/g u etanolnom ekstraktu.

U istraživanju ukupnih polifenola u infuzima cvjetova i plodova biljke *S. nigra* uzetih iz 24 čaja u Poljskoj i Srbiji dobivene su vrijednosti za cvjetove iznosile od 15,23 mg GE/g do 35,57 mg GE/g te se pokazalo da su cvjetovi bili bogatiji polifenolima od plodova (Viapiana i Wesolowski, 2017).

Količina polifenola u ljuskama graha ispitana je u dva rada koja su pokazala značajne razlike u rezultatima. U prvom je radu u 80-postotnom etanolnom ekstraktu ljuski *P. vulgaris* (Nagesh, 2012) određeno čak 294 mg GE/g. Suprotno tomu, u radu Fidrianny i sur. (2014) u etanolnom ekstraktu zabilježena je niska količina od 21,3 mg GE/g, što je bliže vrijednostima određenima u ovom radu.

Vučić i sur. (2013) ispitivali su vodene i etanolne ekstrakte listova i plodova *V. myrtillus* i pritom ekstrahirali neznatno više polifenola u vodenom ekstraktu listova (119,17 mg GE/g) u odnosu na etanolni (107,79 mg GE/g), za razliku od rezultata u ovom radu, gdje je dobiveno dvostruko više polifenola u etanolnom ekstraktu, a zanimljivo je da su zabilježili trostruko veći sadržaj polifenola u listovima nego u plodovima.

Katalinic i sur. (2006) u Hrvatskoj su istraživali vodene ekstrakte 70 biljnih vrsta među kojima je ispitivano i 7 biljnih vrsta iz ovog rada. Rezultati nisu izravno usporedivi jer su korišteni različiti standardi kao ekvivalenti, no poredak biljnih ekstrakata po količini fenola gotovo je identičan. Tako *S. officinalis* ima najviše polifenola, zatim slijede *S. nigra*, *B. pendula* i *A. millefolium*, dok najmanje polifenola imaju *A. absinthium*, *C. erythraea* i *P. vulgaris*.

Izbor ekstrakcijske metode određuje se prema sastavnicama koje se namjeravaju ekstrahirati. Budući da krajnji produkt sadrži tragove preostalog otapala, otapalo bi trebalo biti biorazgradivo i netoksično. Nadalje, ljekovite biljne vrste u kućanstvima se najčešće pripremaju kao infuzi, dekoti ili macerati, iz čega proizlazi da je potreban sveobuhvatniji i temeljitiji pregled sastava takvih biljnih ekstrakata (Belščak-Cvitanovic i sur., 2014). Stoga su u ovom radu upotrebljena otapala voda i relativno netoksičan etanol. Upotrebljena ultrazvučna ekstrakcija rezultirala je visokim varijacijama sadržaja ukupnih polifenola. Kao što se može vidjeti na Slici 11., učinkovitost ekstrakcije svake biljne vrste ovisi o kemijskoj prirodi biljke te korištenom ekstrakcijskom otapalu. Iako su provedena brojna određivanja sadržaja polifenola i pritom su većinom izražena na standard galnu kiselinu, mogu se uočiti značajne razlike između rezultata. Tomu pridonose vjerojatno genotipske i ekološke razlike (klima, stanište, temperatura) unutar vrste te vrijeme sakupljanja uzoraka (Lee i Choi, 2012; Raal i sur., 2015; Wojdyło i sur., 2007). Također se u literaturi uočavaju razlike u korištenim metodama ekstrakcije poput odabira otapala, temperature i trajanja ekstrakcije. Primjerice, rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na to da se ultrazvučnom ekstrakcijom dobiju nešto više

vrijednosti ukupnih polifenola nego u studijama gdje su korišteni maceracija ili priprava infuza. Viša temperatura, također je pridonijela učinkovitosti ekstrakcije.

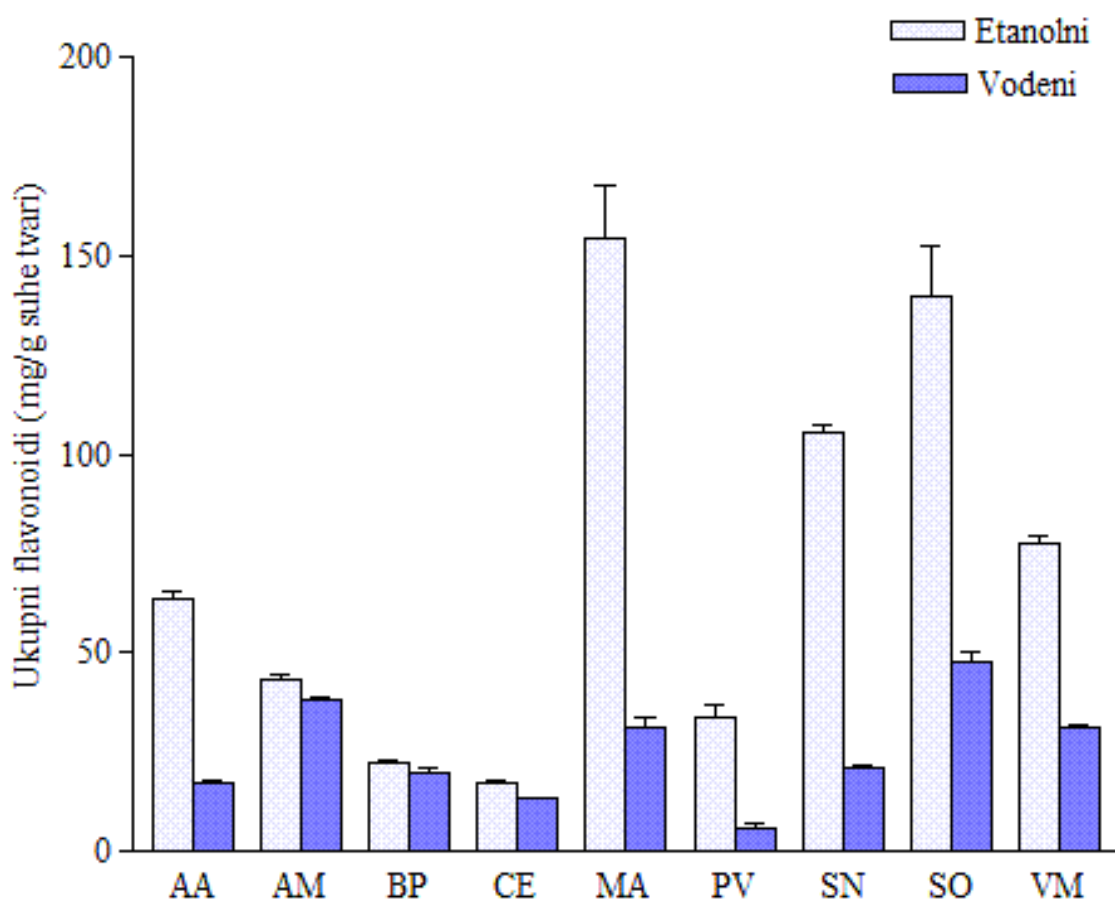
#### **4.5. Određivanje ukupnih flavonoida**

Flavonoidi se prirodno pojavljuju u bilju i smatra se da imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Izvori flavonoida su hrana (voće, povrće), pića (crveno vino, čaj) i različiti biljni lijekovi. Dosad je identificirano više od 4000 flavonoida, a broj i dalje raste (Singh S. i sur., 2013). Podijeljeni su u šest grupa: flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, flavanole i anthocijanidine (Solayman i sur., 2016). Sintetizirani su u bilju kao rezultat prilagodbe na stresne uvjete poput infekcija, ranjavanja, stresa na hladnoću i vidljivu svjetlost. Mnoge studije potvrđuju neuroprotektivno, kardioprotektivno i kemopreventivno djelovanje flavonoida (Singh S. i sur., 2013). Brojna biološka djelovanja pripisuju se mogućnostima flavonoida da sprječavaju stvaranje reaktivnoga kisika inhibicijom enzima, keliranjem elemenata u tragovima uključenima u proizvodnju slobodnih radikala, uklanjanjem reaktivnih spojeva i sudjelovanjem u dopunjavanju i zaštiti antioksidacijske obrane (Williams i sur., 2004).

Određivanje ukupnih flavonoida temelji se na reakciji flavona i flavonola s ionima aluminijskim iz reakcijske smjese. Dolazi do formiranja kelata i obojenja reakcijske smjese u žuto, koje se može pratiti mjerenjem apsorbancije na 405 nm (Kumazawa i sur., 2004; Woisky i Salatino, 1998). Količina ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima prikazana je na Slici 12., a detaljna statistička analiza u Tablici 6.

Iz Slike 12. vidljivo je da, poput količine polifenola, više flavonoida sadrže etanolni nego vodeni ekstrakti. To je u skladu s lipofilnosti flavonoida koja ih čini bolje topljivima u relativno nepolarnom otapalu etanolu. Slično kao kod ukupnih polifenola, razlike među ekstraktima dobivenima pomoću različitih otapala nisu uvijek bile statistički značajne (Tablica 6). U etanolnim ekstraktima količina flavonoida kreće se od 17,43 mg QE/g do 154,51 mg QE/g, dok se u vodenim ekstraktima kreće od 6,22 mg QE/g do 47,85 mg QE/g. Najveću količinu flavonoida od svih ekstrakata sadrže etanolni ekstrakti MA-E i SO-E te SN-E, dok od etanolnih ekstrakata najmanje flavonoida sadržavaju BP-E i CE-E. Od vodenih ekstrakata najveću količinu flavonoida sadrže SO-V i AM-V, a najmanju CE-V i PV-V, što je uočeno i u sadržaju polifenola.

Slično rezultatima dobivenima u ovom radu, i druge usporedbe količine flavonoida pokazuju nešto veću topljivost istih u organskim otapalima. Tako je usporedba sadržaja flavonoida u vodenom i metanolnom ekstraktu *A. millefolium* (Eghdami i sur., 2011) pokazala veću količinu flavonoida u alkoholnom otapalu. S druge strane, Moldovan i sur. (2011) utvrdili su, ispitujući etanolne ekstrakte biljnih vrsta *A. absinthium* i *A. millefolium*, veću količinu flavonoida u *A. absinthium* (52,43 mg QE/g) nego u *A. millefolium* (46,59 mg QE/g), što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu. K tomu su količine flavonoida bile slične.



Slika 12. Količina ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Ispitivanje vodenih i etanolnih ekstrakata lista, stabljike i ploda *M. alba* (Wang i sur., 2012) pokazalo je veći sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu, pri čemu je sadržaj bio najviši u listovima. Za razliku od toga, Diaz i sur. (2012) zabilježili su nekoliko puta veći sadržaj polifenola u vodenom nego u 95-postotnom etanolnom ekstraktu. U istraživanju na raznim

organima *M. alba* ispitivani su flavonoli u metanolnim ekstraktima (Khan i sur., 2013) i dobivena je količina 185,48 mg QE/g u listovima, što je slično količini određenoj u MA-E.

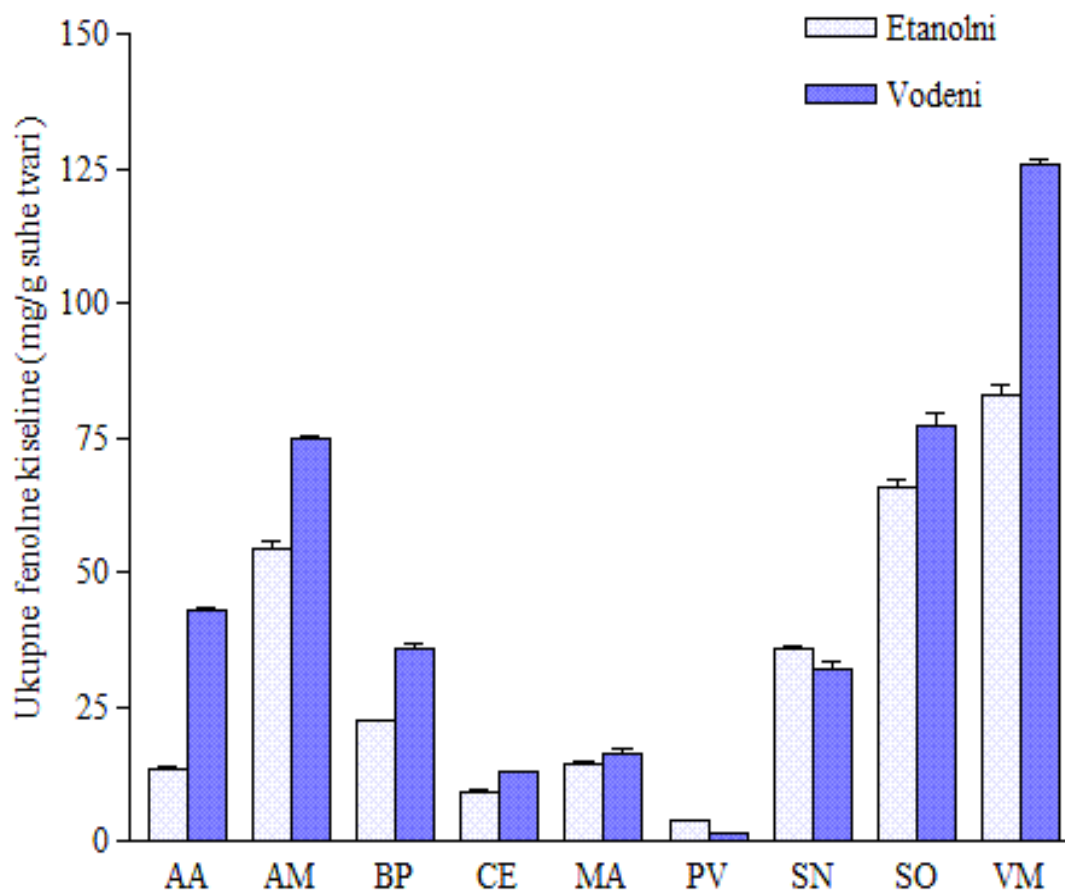
I druga istraživanja, iako rijetka, djelomično su u skladu s rezultatima dobivenima u ovom radu. Tako SO-E sadržava trostruko više flavonoida nego SO-V, što odgovara rezultatima koje su objavili Neagu i sur. (2014), koji su pronašli znatno veći sadržaj u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Provedeno je i ispitivanje vodenih i etanolnih ekstrakata listova *V. myrtillus* (Vučić i sur., 2013) te je dobiveno, u skladu s rezultatima objavljenima u ovom radu, dvostruko više flavonoida u etanolnom ekstraktu. S druge strane, ispitivanje etanolnog ekstrakta ljuski *P. vulgaris* (Fidrianny i sur., 2014) pokazalo je 2,26 mg QE/100 g, što je višestruko niži sadržaj flavonoida od onoga prikazanog u Tablici 6. Ispitivanje etanolnog ekstrakta latica *S. nigra* u Italiji, u radu autora Loizzo i sur. (2016), pokazalo je za približno trećinu manji sadržaj flavonoida od SN-E.

Iako se može očekivati da će količina flavonoida pratiti sadržaj ukupnih polifenola, u Tablici 6. može se vidjeti da se to nije dogodilo. Uz varijacije koje su posljedica individualnoga karaktera svakoga biljnog uzorka, može se uočiti da sadržaj ovisi i o ekstrakcijskom otapalu. Stoga rezultate uglavnom karakterizira veći sadržaj flavonoida dobiven u nepolarnijem otapalu, etanolu. U literaturi se mogu pronaći mnogobrojna istraživanja sadržaja flavonoida, no istodobno su brojni rezultati izraženi prema drugim standardima te zato nisu usporedivi s rezultatima u ovom radu.

#### **4.6. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina**

Hidroksicimetne kiseline imaju zaštitnu i preventivnu ulogu protiv oksidativnih oštećenja prouzročenih povišenom razinom ROS-a, a često su uključene u reakcije između slobodnih radikala i molekula visoke biološke važnosti kao što su lipidi, proteini i DNA. U ovom radu ispitana je količina fenolnih kiselina korištenjem fosfomolibdatnog reagensa. Primjenom te metode može se odrediti sadržaj hidroksicimetnih, no ne i hidroksibenzojevih kiselina. No, s obzirom na to da su hidroksicimetne kiseline najzastupljenije fenolne kiseline u prirodi i imaju snažno antioksidativno djelovanje (Maurya i Devasagayam, 2010), prvi put je provedeno određivanje njihova sadržaja kod većine ekstrakata. Među fenolnim kiselinama u biljnome materijalu najzastupljenije su hidroksicimetne kiseline. One se međusobno razlikuju po metilaciji i hidroksilaciji aromatskog prstena. Određivanje sadržaja hidroksicimetnih

kiselina temelji se na prisutnosti *o*-dihidroksifenolne skupine u njihovoj strukturi. Dodatkom nitrit-molibdat reagensa nastaju kompleksi žute boje. Zaluživanjem otopine žuta boja prelazi u narančasto-crvenu s maksimumom apsorpcije na 492 nm (Eur. Ph. 5,0, 2004). Količina ukupnih fenolnih kiselina u ispitivanim ekstraktima prikazana je na Slici 13., a detaljna statistička analiza u Tablici 6.



Slika 13. Količina ukupnih fenolnih kiselina u ispitivanim ekstraktima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Iz Slike 13. vidljivo je da kod pojedinih biljnih uzoraka vodeni ekstrakti sadrže više fenolnih kiselina od etanolnih, što je u skladu s njihovom većom topljivošću u polarnim otapalima. Razlika u sadržaju fenolnih kiselina među ekstraktima koji su imali malu količinu ovih sastavnica u pravilu nije bila statistički značajna (Tablica 6). Sadržaj fenolnih kiselina u etanolnim ekstraktima kretao se od 3,8 mg CAE/g do 82,92 mg CAE/g, dok se u vodenim ekstraktima kretao od 1,54 mg CAE/g do 125,81 mg CAE/g. Najveći sadržaj fenolnih kiselina



sadrže ekstrakti *V. myrtillus* i *S. officinalis*, dok najmanje fenolnih kiselina sadrže *C. erythraea* i *P. vulgaris*, koji također sadrže najmanju količinu polifenola.

U literaturi je pronađen manji broj radova u kojima se određivao ukupan sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na određivanja polifenola i flavonoida, pri čemu rezultat nije izražen u odnosu na kavenu kiselinu, što rezultate nije činilo usporedivima s rezultatima u ovom radu. U jednom istraživanju ukupnih fenolnih kiselina u infuzima *S. nigra*, s 24 izvora, dobivene vrijednosti bile su u rasponu 1,19 mg CAE/g do 6,52 mg CAE/g, odnosno oko pet puta manje od vrijednosti za SN-V (Viapiana i Wesolowski, 2017).

#### **4.7. HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida**

Za identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva korištena je tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti obrnutih faza (RP-HPLC). HPLC je tehnika pogodna za analizu zbog brojnih čimbenika koji uključuju: izvrsno razlučivanje koje se može postići u širokom rasponu kromatografskih uvjeta za strukturno slične spojeve, kao i strukturno sasvim različite spojeve; veliku selektivnost koju se može mijenjati kroz promjene sastava mobilne faze; visoku sposobnost oporavka i stoga visoku produktivnost te izvrsnu ponovljivost analiza provedenih tijekom dugog razdoblja, što je prouzročeno stabilnošću materijala stacionarne faze (Aguilar, 2004).

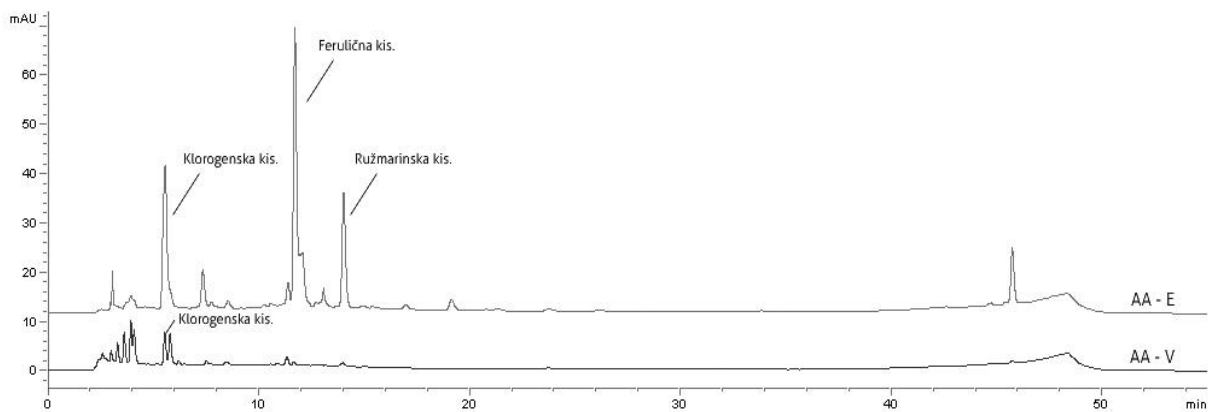
Različiti čimbenici utječu na HPLC analizu fenola, uključujući pripremu uzoraka, mobilnu fazu, vrstu kolone i detektor (Khoddami i sur., 2013). Analiza uključuje odvajanje molekula na temelju njihove polarnosti. Primijenjen je sustav gradijentnog eluiranja korištenjem kolone C18. Razdvajanje ovisi o vezanju molekula uzorka iz polarne mobilne faze na hidrofobne liganade stacionarne faze (Aguilar, 2004). Korišteni su metanol, voda i mravlja kiselina, pri čemu se povećavanjem udjela metanola tijekom analize skraćuje tijek postupka uz istodobno zadržavanje potrebnog razlučivanja. Analiza se provela na temperaturi kolone od 40 °C, dok je na trajanje analize utjecalo trajanje eluiranja standarada.

Parametri kalibracijskih krivulja za standarde flavonoide i fenolne kiseline uočene na kromatogramima nalaze se u Tablici 7. Rezultati HPLC analize prikazani u Tablici 8. i 9. prikazuju prisutne flavonoide i fenolne kiseline u ekstraktima izražene u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta.

Tablica 7. Parametri kalibracijskih krivulja za standarde flavonoide i fenolne kiseline uočene na kromatogramima

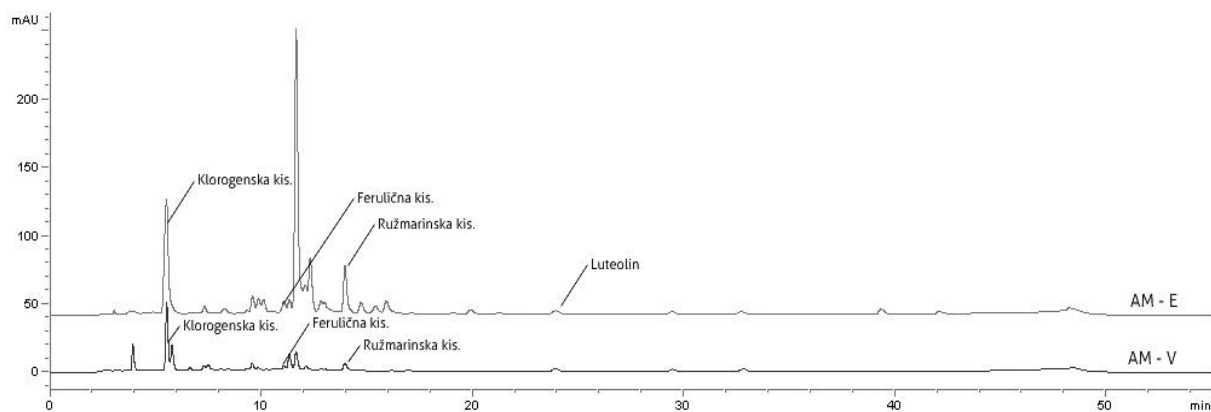
Standard	Jednadžba kalibracijske krivulje	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ferulična kiselina	$y = 5045,4x - 45,1$	0,99977	0,026	0,088
Galna kiselina	$y = 4808,1x + 12,88$	0,9998	0,026	0,087
Hiperozid	$y = 1426,2x + 15,4$	0,9999	0,013	0,040
Kavena kiselina	$y = 5335x - 19,45$	0,99995	0,012	0,041
Klorogenska kiselina	$y = 2587,3x + 73,42$	0,99964	0,036	0,110
Krizin	$y = 6321,7x + 36,22$	0,99987	0,022	0,066
Kvercetin	$y = 2200,2x - 36,75$	0,9998	0,027	0,083
Luteolin	$y = 3205,25x - 46,6$	0,99982	0,025	0,077
Miricetin	$y = 4341,8x - 691,78$	0,97848	0,315	1,049
<i>P</i> -kumarna kiselina	$y = 6214,63x - 137,38$	0,99733	0,090	0,299
Rutin	$y = 3197,7x - 478,76$	0,98183	0,289	0,962
Ružmarinska kiselina	$y = 2518,9x + 21,44$	1	0,003	0,010
Vanilinska kiselina	$y = 2079,2x + 20,29$	0,99973	0,028	0,095

Analiza ekstrakata *A. absinthium* pokazala je u najvećoj količini prisutnost rutina, zatim klorogenske kiseline (Slika 14). Kavena kiselina pronađena je u hidroliziranim ekstraktima, pri čemu u većoj količini u etanolnom ekstraktu. To je očekivano s obzirom na pronađene količine klorogenske i ružmarinske kiseline čiji je kavena kiselina sastavni dio. Prije je objavljeno da *A. absinthium* sadrži klorogensku, feruličnu i kavenu kiselinu (Zengin i sur., 2017). U toj studiji nije utvrđena prisutnost ružmarinske kiseline, dok su je Sahin i sur. (2013) potvrdili. U ispitivanju etanolnih ekstrakata *A. absinthium* (Craciunescu i sur., 2012) pronađen je rutin, zatim kavena kiselina koja je ujedno najzastupljenija fenolna kiselina u navedenom radu, zatim ferulična i klorogenska kiselina, no ukupne su vrijednosti znatno manje od naših vrijednosti. U navedenom radu pronađen je flavonoid kvercetin koji nije potvrđen u našim uzorcima.



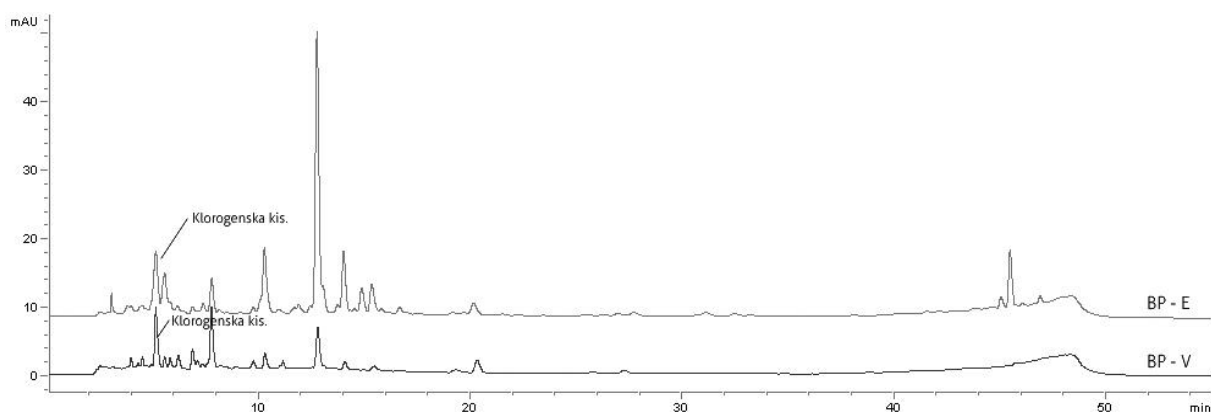
Slika 14. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *A. absinthium* na 320 nm

Analiza ekstrakata *A. millefolium* (Slika 15) pokazala je u najvećoj količini prisutnost klorogenske kiseline nakon koje slijedi rutin. Dominaciju klorogenske kiseline i prisutnost rutina potvrđuju prije objavljena istraživanja (Benedec i sur., 2015; Benetis i sur., 2008; Georgieva i sur., 2015). Nadalje, Dias i sur. (2013) objavili su da su fenolne kiseline glavni fenolni spojevi prisutni u uzorcima *A. millefolium* s ispitivanih uzgojenih i prirodnih staništa, pri čemu su najzastupljenije kiseline derivati klorogenske kiseline. Prijašnja literatura navodi prisutnost flavonoida luteolina (Benedec i sur., 2015; Trumbeckaite i sur., 2011) koji je jedini flavonoid otkriven u ovom radu te ferulične kiseline (Georgieva i sur., 2015; Wojdyło i sur., 2007) koja je pronađena u ovom radu, ali u manjoj količini. Iako su zabilježene u literaturi (Georgieva i sur., 2015), prisutnost ispitivane kavene, *p*-kumarne i sinapične kiseline nije potvrđena u uzorcima, kao ni prisutnost flavonoida kvercetina, kemferola i miricetina (Benedec i sur., 2015; Georgieva i sur., 2015).



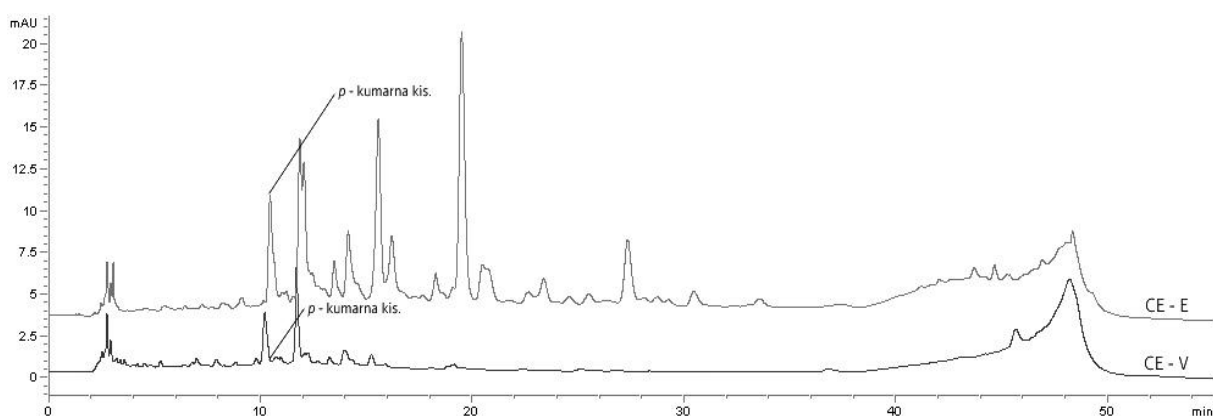
Slika 15. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *A. millefolium* na 320 nm

Analiza ekstrakata *B. pendula* potvrdila je u najvećoj količini prisutan kvercetin, zatim flavonoid hiperozid. U literaturi je navedeno da su kvercetin i hiperozid glavni flavonoidi u listovima *B. pendula* (Evans i Bahng, 2000). Slično kao i ukupni flavonoidi, sadržaj hiperozida dvostruko je veći u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Među fenolnim kiselinama otkrivena je samo klorogenska kiselina (Slika 16). U prijašnjim istraživanjima navedena je prisutnost kvercetina, hiperozida i klorogenske kiseline (Millet i sur., 2010; Raal i sur., 2015; Wichtl, 2004). Nadalje, studije su pokazale da su flavonoidi u listovima *B. pendula* derivati miricetina, kvercetina, kempferola, apigenina i luteolina. U tim su studijama najčešći derivati kvercetina, dok je od fenolnih kiselina klorogenska kiselina bila prisutna u najvišoj koncentraciji zajedno s derivatima *p*-kumarine kiseline (Keinänen i Julkunen-Tiitto, 1998).



Slika 16. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *B. pendula* na 320 nm

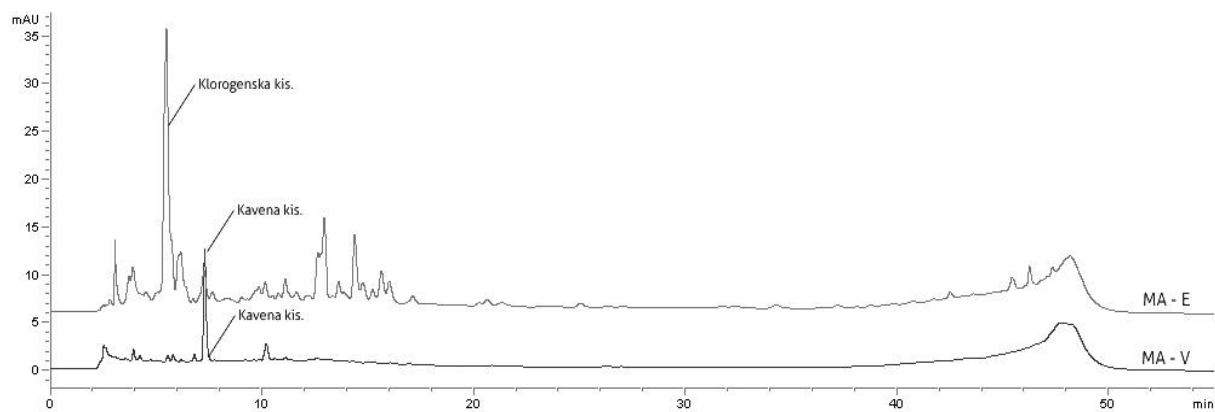
Ekstrakti *C. erythraea* podvrgnuti HPLC analizi pokazali su dominaciju galne kiseline te *p*-kumarne kiseline (Slika 17). Prije je u literaturi navedena moguća prisutnost *p*-kumarne kiseline (Wichtl, 2004) te je potvrđen sadržaj galne kiseline u *C. erythraea* (Dogan i sur., 2010), iako u znatno manjoj količini nego u našim ekstraktima. Galna kiselina, koja ima antifungalni, antioksidativni i antivirusni učinak, dobivena hidrolizom tanina, organska je kiselina koja se koristi u vrlo širokom području za razne svrhe, od medicinske i farmaceutske do kemijske i prehrambene industrije (Dogan i sur., 2010). Antioksidativni učinak galne kiseline čini biljke koje ga sadrže potencijalno korisnima u liječenju bolesti izazvanih oksidativnim stresom. Rezultati ispitivanja zaštitnog učinka *C. erythraea* (Sefi i sur., 2011) pokazali su zaštitnu prirodu kod dijabetesa, smanjujući oksidativni stres i oštećenja  $\beta$ -stanica pankreasa koji se mogu pripisati njezinu antioksidacijskom potencijalu, a taj se učinak pripisuje upravo galnoj kiselini.



Slika 17. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *C. erythraea* na 320 nm

Analizom ekstrakata *M. alba* (Slika 18) pronađena je u najvećoj količini klorogenska kiselina, zatim rutin i kvercetin. Slično tomu, dominaciju klorogenske kiseline te sadržaj rutina i kvercetina objavila su prijašnja istraživanja etanolnih ekstrakata lista *M. alba* (Lee i Choi, 2012) dok je u ispitivanju etanolnog ekstrakta lista *M. alba* u Srbiji (Radojković i sur., 2012) pronađena klorogenska kiselina i rutin, no kvercetinu nije potvrđena prisutnost u listu. Chauhan i sur. (2013) ispitivali su nekoliko *Morus* vrsta te u svima potvrdili kvercetin. Smatra se da je kvercetin jedan od glavnih učinkovitih spojeva listova duda s mogućnosti kontroliranja povećanja masti u serumu i nastajanja arterioskleroznih promjena (Chauhan i sur., 2013). Pronađen je veći sadržaj kavene kiseline, u skladu s njezinom polarnosti, u nehidroliziranome vodenom nego etanolnom ekstraktu. U hidroliziranim ekstraktima pronađeno je više kavene

kiseline u etanolnom jer je djelom nastala hidrolizom klorogenske kiseline potvrđene u MA-E.



Slika 18. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *M. alba* na 320 nm

Tablica 8. Rezultati HPLC analize fenolnih sastavnica ekstrakata (mg/g)

	AA-E	AA-V	AM-E	AM-V	BP-E	BP-V	CE-E	CE-V	MA-E	MA-V
Galna kiselina							1,22	3,67		
Klorogenska kiselina	12,73		39,72	11,07	1,81				15,16	
Kavena kiselina									0,53	2,68
Ružmarinska kiselina	9,32									
<i>P</i> -kumarna kiselina							3,55	2,82		
Luteolin			3,19							
Rutin	15,53		30,24						14,74	
Ferulična kiselina	12,07		2,34	1,20						
Miricetin										
Hiperozid	1,62	0,89			5,23	2,08				

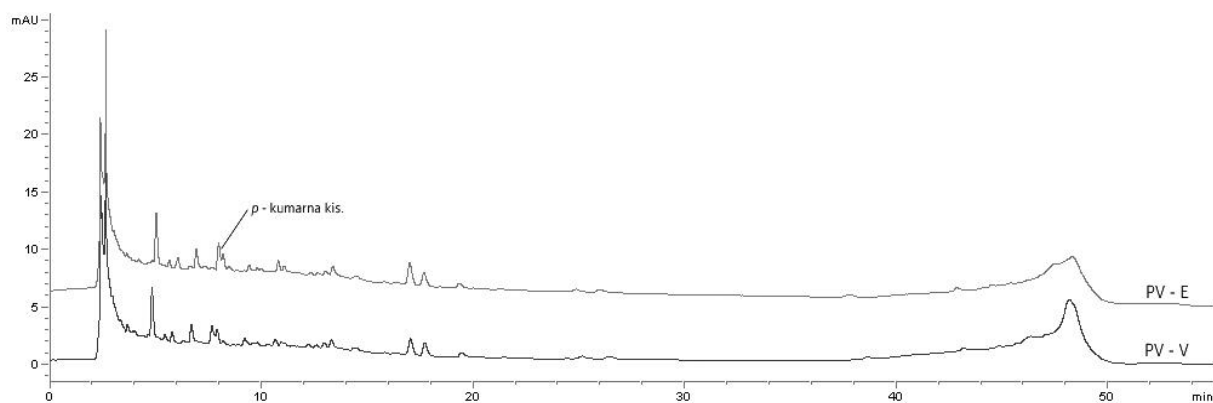
	PV-E	PV-V	SN-E	SN-V	SO-E	SO-V	VM-E	VM-V
Galna kiselina								
Klorogenska kiselina			25,83	10,27			3,54	0,17
Kavena kiselina			0,95	0,45				
Ružmarinska kiselina					39,20	0,45		
<i>P</i> -kumarna kiselina	ispod LOD						0,77	4,17
Luteolin								
Rutin			41,90	16,31	22,62	14,20		
Ferulična kiselina			9,38	1,67	5,11	1,19		
Miricetin			16,79	14,79				
Hiperozid							1,10	0,47

Tablica 9. Rezultati HPLC analize fenolnih sastavnica ekstrakata nakon hidrolize (mg/g)

	AA-E	AA-V	AM-E	AM-V	BP-E	BP-V	CE-E	CE-V	MA-E	MA-V
Kavena kiselina	7,23	4,74	16,68	ispod LOD					3,22	1,89
Kvercetin					5,76	2,05			13,03	
<i>P</i> -kumarna kiselina							1,93	1,42		
	PV-E	PV-V	SN-E	SN-V	SO-E	SO-V	VM-E	VM-V		
Kavena kiselina			10,52	4,74	8,96		4,47			
Kvercetin							18,61	1,93		
<i>P</i> -kumarna kiselina							6,55			
Ferulična kiselina					1,99					

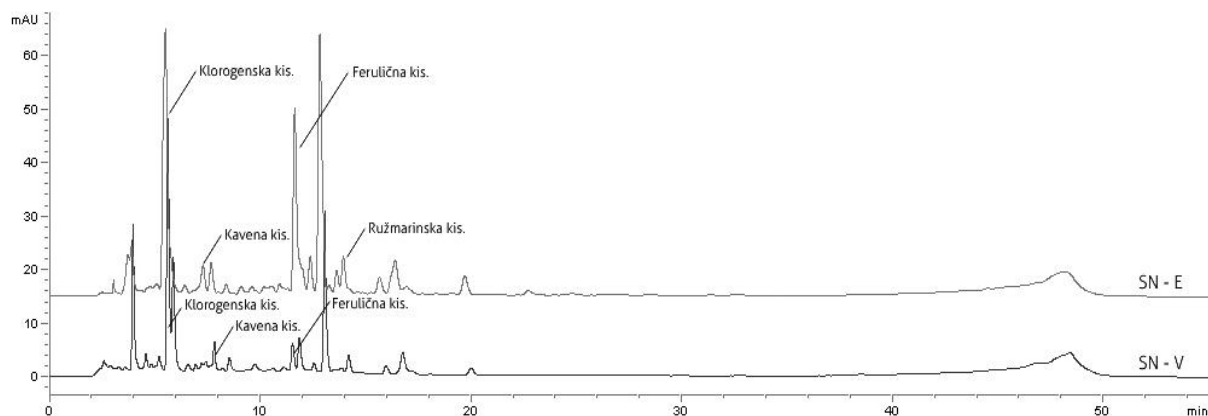


Analiza ekstrakta *P. vulgaris* pokazala je prisutnost *p*-kumarne kiseline u nehidroliziranome etanolnom ekstraktu, no pronađena količina je ispod granice kvantifikacije (Slika 19). U prijašnjim istraživanjima ljuski *P. vulgaris* također je zabilježena prisutnost *p*-kumarne kiseline (Chen i sur., 2015; Mojica i sur., 2015). HPLC analiza potvrdila je najmanje sastavnica kod *P. vulgaris*, kao što su prethodna ispitivanja sadržaja fenolnih sastavnica pokazala najniži sadržaj kod ove biljne vrste.



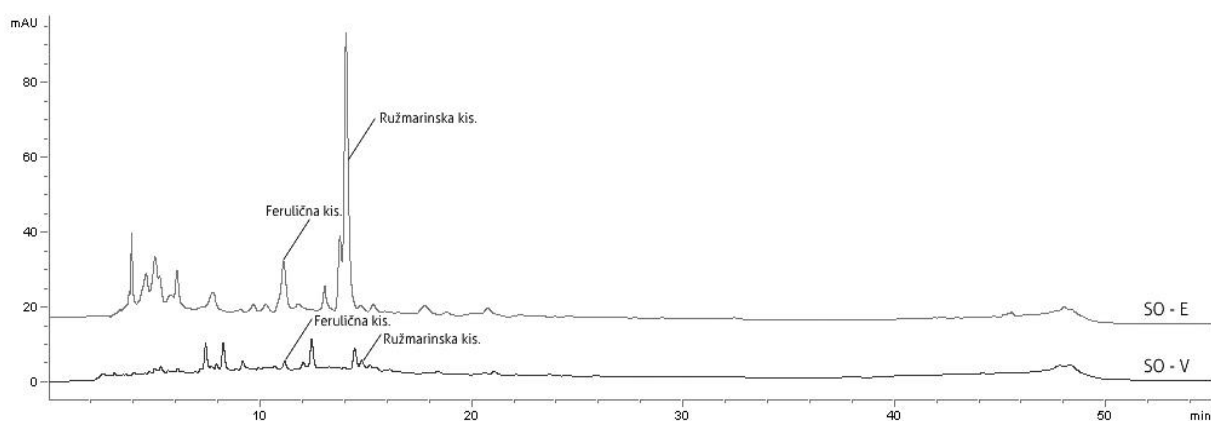
Slika 19. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *P. vulgaris* na 320 nm

Analiza ekstrakata *S. nigra* pokazala je prisutnost rutina u najvećoj količini, zatim slijedi klorogenska kiselina (Slika 20). U hidroliziranim ekstraktima pronađeno je više kavene kiseline nego u nehidroliziranim, što je očekivano s obzirom na to da je u nehidroliziranim potvrđena, uz kavenu kiselinu, i klorogenska kiselina. U prijašnjoj literaturi zabilježena je prisutnost klorogenske kiseline, iako je zabilježena dominacija rutina, kavene kiseline i miricetina (Loizzo i sur., 2016; López-García i sur., 2013; Viapiana i Wesolowski, 2017). Također je zabilježena prisutnost ferulične kiseline (Viapiana i Wesolowski, 2017).



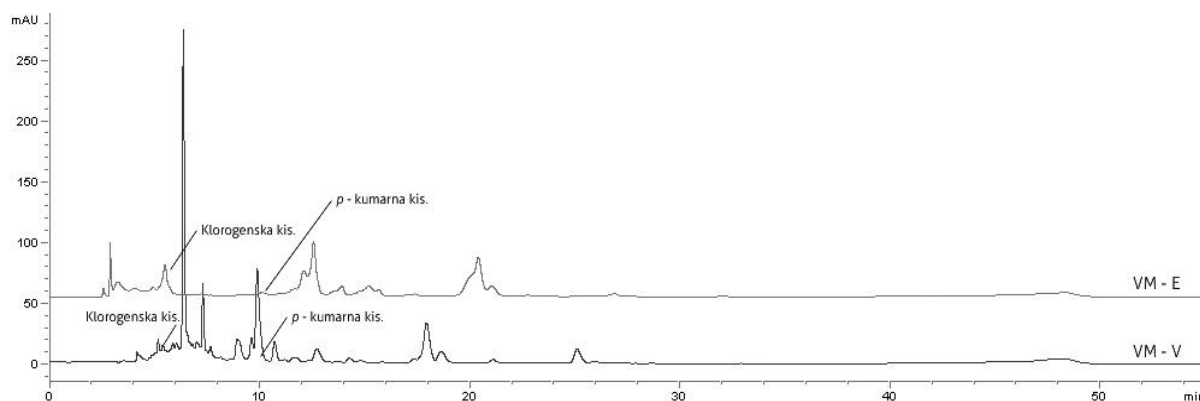
Slika 20. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *S. nigra* na 320 nm

Analiza ekstrakta *S. officinalis* (Slika 21) pokazala je da su u ekstraktu prisutne u najvećoj količini ružmarinska kiselina, zatim flavonoid rutin. U odnosu na sve ispitivane uzorke, ružmarinska kiselina pronađena je u najvećoj količini u *S. officinalis*. Tijekom njezine hidrolize dolazi dijelom do nastanka kavene kiseline koja je posljedično pronađena u većoj količini u hidroliziranom etanolnom ekstraktu. Porodica Lamiaceae ističe se visokim sadržajem ružmarinske kiseline kao glavnom fenolnom sastavnicom (Dent i sur., 2015; Kwon i sur., 2006; Neagu i sur., 2014) kao i brojnim flavonoidnim glikozidima, stoga ne iznenađuje visoki sadržaj ružmarinske i kavene kiseline u ekstraktima. U radu Atoui i sur. (2005), iako očekivana, nije pronađena ružmarinska kiselina, što se pripisuje korištenju srednje polarnog otapala etil acetata za ekstrahiranje polifenola. Prijašnje studije pokazale su također da ekstrakti *S. officinalis* sadrže ružmarinsku kiselinu, kavenu kiselinu, feruličnu i klorogensku kiselinu (Neagu i sur., 2014) te dominaciju fenolnih sastavnica (Dent i sur., 2015) ružmarinske kiseline i luteolina koji nije potvrđen u ovim ekstraktima.



Slika 21. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *S. officinalis* na 320 nm

U nehidroliziranim ekstraktima *V. myrtillus* (Slika 22) najzastupljenija je *p*-kumarna kiselina, nakon koje slijedi klorogenska kiselina i hiperozid (kvercetin-3-*O*-galaktozid). U prijašnjim istraživanjima objavljena je prisutnost hiperozida, *p*-kumarne i klorogenske kiseline (Ieri, 2013) te *p*-kumarne i klorogenske kiseline (Ferrier i sur., 2015) u listu *V. myrtillus* koji se ujedno smatra vrijednim izvorom klorogenske kiseline. Prema očekivanjima, kavena kiselina pronađena je u hidroliziranome etanolnom ekstraktu jer nastaje hidrolizom klorogenske kiseline koja je bila dominantna sastavnica nehidrolizirana etanolnog ekstrakta. Kao što se i očekivalo, kvercetin je glavna komponenta hidroliziranih ekstrakata. Njegova količina, u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima (Stefkov i sur., 2014), sugerira da osim pronađenoga postoje i drugi derivati kvercetina u uzorcima.



Slika 22. Kromatogram ispitivanih ekstrakata *V. myrtillus* na 320 nm

HPLC analiza pokazala je da su pojedinačni polifenolni spojevi raspoređeni među različitim biljnim vrstama u različitim količinama. U analiziranim biljnim vrstama u najvećoj su količini u ekstraktima pojedinačno pronađeni rutin i klorogenska kiselina. Oni su i najzastupljeniji fenolni spojevi kad se promatra udio u ukupnom sadržaju pronađenih sastavnica. Promatranjem hidroliziranih ekstrakata uočava se najveća pojedinačna zastupljenost kvercetina, dok kavena kiselina ima najveći udio među pronađenim sastavnicama. To ne iznenađuje s obzirom na to da su u nehidroliziranim ekstraktima dominantni njihovi derivati rutin i klorogenska kiselina. Nadalje, u literaturi su zabilježeni brojni drugi derivati kavene kiseline i kvercetina koji nisu ispitivani u ovom radu, stoga možemo pretpostaviti njihovu prisutnost u uzorcima.

#### 4.8. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Smatra se da antioksidativna obrana i stanični redoks status imaju središnju ulogu u razvoju šećerne bolesti tipa 2 i njezinih komplikacija. Doprinos oksidacijskog stresa u razvoju mikrovaskularnih komplikacija specifičan je za pojedina tkiva dijabetičara (Singh R. i sur., 2013). Molekularna osnova za antioksidativno djelovanje fenolnih spojeva prepoznata je u četiri glavna mehanizma. Izravni prijenos vodikova atoma smatra se glavnim mehanizmom djelovanja. Za transfer elektrona smatra se da je najznačajniji mehanizam djelovanja s radikalima u vodenoj fazi. Osim toga, do neutralizacije slobodnih radikala može doći i uslijed neposredne reakcije sa slobodnim radikalima te uslijed sekvencijalnog prijenosa elektrona s

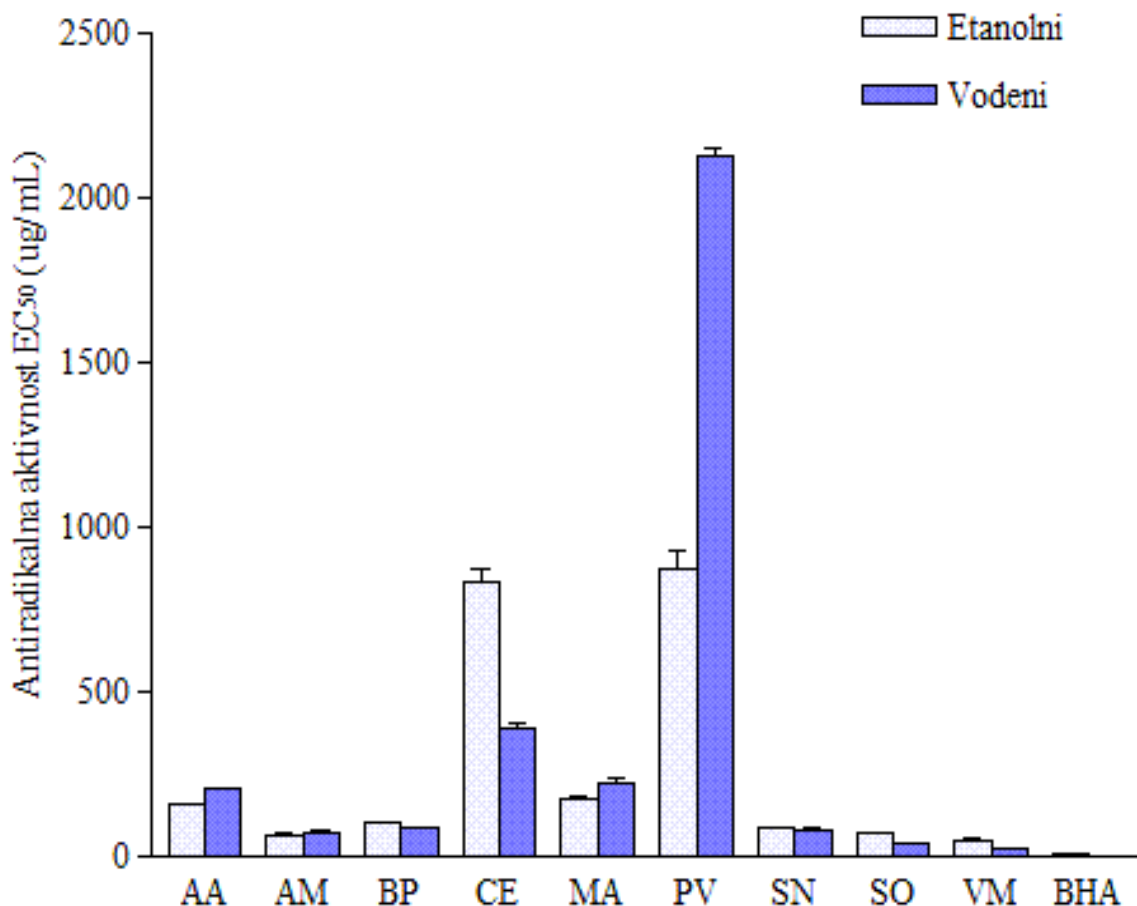
gubitkom protona. Stoga je aktivnost uklanjanja slobodnih radikala jedna od najuočljivijih osobina fenolnih spojeva (Shang i sur., 2015). Ona se temelji se na redoks svojstvima njihovih hidroksi skupina i strukturnih odnosa između različitih dijelova njihove kemijske strukture (Singh S. i sur., 2013).

DPPH slobodni je radikal koji je vrlo pogodan za *in vitro* ispitivanja antiradikalne aktivnosti. Na njega ne utječu sporedne reakcije poput kelacije metalnih iona i enzimske inhibicije, za razliku od hidroksilnog radikala i superoksid aniona. Otopina DPPH-a ima intenzivnu ljubičastu boju s apsorpcijskim maksimumom na 517 nm. Antioksidansi koji ulaze u reakciju s DPPH-om doniraju mu vodik ili elektron i pritom ga prevode u bezbojni produkt 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin ili slične supstituirane hidrazine. Tako nestaje intenzivna ljubičasta boja, što dovodi do pada apsorbancije. Veći pad apsorbancije odgovara većoj antiradikalnoj aktivnosti (Amarowicz i sur., 2004). Prednost je DPPH metode brzina i jednostavnost. Nedostatak joj je što je DPPH topiv u alkoholnom otapalu, tako da lipofilni spojevi ne mogu dobro reagirati s otopinom DPPH-a (Fidrianny i sur., 2014). Fenolni spojevi smatraju se glavnim sastavnicama koje pridonose antioksidativnim aktivnostima biljnih ekstrakata (Giacometti i sur., 2016; Plaza i sur., 2016).

Antiradikalna aktivnost ispitivanih ekstrakata prikazana je na Slici 23., a detaljna statistička analiza u Tablici 10. Kako je prikazano na Slici 23., pozitivna kontrola BHA imala je najveću antiradikalnu aktivnost. Od etanolnih ekstrakata najbolju antiradikalnu aktivnost pokazuju *V. myrtillus* i *A. millefolium*, a najmanju *C. erythraea* i *P. vulgaris*. Kod vodenih ekstrakata najbolju aktivnost pokazuju biljke *V. myrtillus* i *S. officinalis*, dok ekstrakti *C. erythraea* i *P. vulgaris* imaju najmanju aktivnost. Slaba antiradikalna aktivnost biljaka *C. erythraea* i *P. vulgaris* ne iznenađuje jer su imali i najniži sadržaj polifenola u oba otapala. U prosjeku je antiradikalna aktivnost etanolnih ekstrakata nešto bolja od vodenih, ali u većini slučajeva te razlike nisu statistički značajne. Uočena je negativna korelacija između  $EC_{50}$  vrijednosti antiradikalne aktivnosti i količine fenolnih kiselina u ekstraktima ( $r^2 = 0,2717$ ,  $P < 0,05$ ). To upućuje na važnu ulogu ovih sastavnica u antiradikalnoj aktivnosti ekstrakata. Zanimljivo je da je, iako primijećena u brojnim drugim istraživanjima (Kremer i sur., 2015; Lugasi i Hóvári, 2003), korelacija antiradikalne vrijednosti s količinom ukupnih polifenola izostala.

Ekstrakti *A. absinthium* međusobno statistički nisu pokazali razliku u djelovanju. Prije su zabilježena ispitivanja metanolnih ekstrakata s vrlo različitim rezultatima. Sličan  $EC_{50}$  kao AA-E s vrijednošću od 121  $\mu\text{g/mL}$  zabilježili su u istraživanju 45 biljaka medicinskog

djelovanja na Kubi Ramos i sur. (2003), dok su Mahmoudi i sur. (2009) iz Irana dobili vrijednost 612  $\mu\text{g/mL}$ , odnosno značajno slabiju aktivnost od AA-E.



Slika 23. Antiradikalna aktivnost ispitivanih ekstrakata u usporedbi s BHA-om kao pozitivnom kontrolom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Ekstrakti *A. millefolium* nisu se međusobno statistički razlikovali u promatranoj aktivnosti. U literaturi su također zabilježene relativno slične  $EC_{50}$  vrijednosti antiradikalne aktivnosti, čak i ako je ekstrakt priređen pomoću različitih otapala poput 90-postotnog etanola (49,43  $\mu\text{g/mL}$ ) (Nickavar i sur., 2006) i metanola (54,50  $\mu\text{g/mL}$ ) (Kumar i sur., 2010). Zanimljivo je da su autori koji su koristili slično otapalo, 70-postotni etanol zabilježili znatno niže vrijednosti za  $EC_{50}$  antiradikalne aktivnosti za cvjetove (Benedec i sur., 2015) i nadzemne dijelove ove biljne vrste (Alexandru i sur., 2015). Te su vrijednosti prelazile 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Vodeni ekstrakt lista biljne vrste *B. pendula* pokazao je bolju antiradikalnu aktivnost od etanolnog, što je u suprotnosti sa sadržajem polifenola koji je veći dvostruko u etanolnom ekstraktu. Može se pretpostaviti da su se u vodenom ekstraktu *B. pendula* našle dodatne

sastavnice koje imaju dobru antiradikalnu aktivnost. Ipak, važno je napomenuti da navedene razlike nisu statistički značajne. Približnu antiradikalnu aktivnost (137,22 µg/mL) našem etanolnom ekstraktu pokazao je ekstrakt *B. pendula* u radu Germanò i sur. (2012) u Italiji, koji je pripremljen također 80-postotnim etanolom.

Rezultati su pokazali da CE-V ima značajno bolju antiradikalnu aktivnost od CE-E, iako se usporedbom s ostalim ekstraktima može uočiti slaba promatrana aktivnost ekstrakata *C. erythraea*. U literaturi nije pronađeno ispitivanje antiradikalne aktivnosti usporedivo s rezultatima u ovom radu.

Etanolni ekstrakt lista biljne vrste *M. alba* pokazao je bolju aktivnost od vodenoga, što je u skladu sa sadržajem polifenola. To su potvrdili Wang i sur. (2012) pri ispitivanju etanolnog i vodenog ekstrakta, gdje je etanolni pokazao dvostruko bolju aktivnost, a u kojem je ujedno potvrđen i veći sadržaj polifenola. Suprotno tomu objavljeno je u radu Diaz i sur. (2012) pri ispitivanju vodenog i 95-postotnoga etanolnog ekstrakta, gdje je dobivena bolja antiradikalna aktivnost vodenog ekstrakta. Moguće je da se i u jednom i u drugom slučaju radi o manjim razlikama s obzirom na to da ni u ovom radu razlike nisu bile statistički značajne. Dvije studije koje su proučavale antiradikalnu aktivnost metanolnih ekstrakata pokazale su slične EC<sub>50</sub> vrijednosti (Khan i sur., 2013; Kim i sur., 2014) kao u ovom radu. No, te su vrijednosti znatno varirale ovisno o lokalitetu (Kim i sur., 2014).

Antiradikalne aktivnosti SO-V i SO-E nisu se statistički razlikovale, ali je aktivnost prvog ipak bila nešto bolja od drugog, što potvrđuje rezultate koje su objavili Kwon i sur. (2006). U Indiji je pak zabilježena gotovo dvostruko bolja aktivnost 70-postotnog etanolnog ekstrakta u iznosu od 107,21 µg/mL (Ramu i Krishnamohan, 2015). Uspoređivanje antiradikalne aktivnosti metanolnih ekstrakata *A. millefolium* i *S. officinalis* u radu Kintzios i sur. (2010) pokazalo je aktivnost sličnu aktivnosti etanolnih ekstrakata u ovom radu. Istraživanje deset vodenih ekstrakata biljnih vrsta koje se koriste kao antidijabetici u tradicionalnoj medicini Turske (Büyükbalci i El, 2008) pokazalo je bolju antiradikalnu aktivnost *A. absinthium* od *S. officinalis*.

Tablica 10. Antiradikalna i kelirajuća aktivnost ekstrakata te inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze

Ekstrakt	Antiradikalna aktivnost (EC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL)	Kelirajuća aktivnost (EC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL)	Inhibicija $\alpha$ -glukozidaze (EC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL)
AA-E	156,85 $\pm$ 8,37 <sup>DEF</sup>	56,04 $\pm$ 1,40 <sup>FGY</sup>	2,68 $\pm$ 0,15 <sup>FG</sup>
AA-V	206,27 $\pm$ 2,32 <sup>D</sup>	18,26 $\pm$ 1,50 <sup>GY</sup>	8,76 $\pm$ 0,30 <sup>BC</sup>
AM-E	68,78 $\pm$ 7,63 <sup>FGX</sup>	334,37 $\pm$ 17,87 <sup>BCDE</sup>	0,66 $\pm$ 0,03 <sup>GHZ</sup>
AM-V	75,24 $\pm$ 4,10 <sup>FGX</sup>	223,59 $\pm$ 14,35 <sup>CDEFG</sup>	6,63 $\pm$ 0,5 <sup>CDE</sup>
BP-E	102,33 $\pm$ 2,95 <sup>EFG</sup>	260,20 $\pm$ 26,50 <sup>CDEF</sup>	0,60 $\pm$ 0,03 <sup>GHZ</sup>
BP-V	87,54 $\pm$ 2,38 <sup>FG</sup>	108,67 $\pm$ 18,36 <sup>EFGY</sup>	2,23 $\pm$ 0,18 <sup>GH</sup>
CE-E	835,86 $\pm$ 64,59 <sup>B</sup>	272,88 $\pm$ 7,01 <sup>CDEF</sup>	5,09 $\pm$ 0,09 <sup>DE</sup>
CE-V	388,75 $\pm$ 32,79 <sup>C</sup>	230,41 $\pm$ 30,42 <sup>CDEFG</sup>	7,01 $\pm$ 0,22 <sup>CD</sup>
MA-E	177,79 $\pm$ 10,87 <sup>DE</sup>	399,40 $\pm$ 39,02 <sup>BC</sup>	0,36 $\pm$ 0,01 <sup>HZ</sup>
MA-V	225,50 $\pm$ 19,05 <sup>D</sup>	277,29 $\pm$ 12,97 <sup>CDEF</sup>	0,58 $\pm$ 0,02 <sup>GHZ</sup>
PV-E	876,82 $\pm$ 87,35 <sup>B</sup>	392,19 $\pm$ 7,43 <sup>BC</sup>	6,58 $\pm$ 0,62 <sup>DE</sup>
PV-V	2127,86 $\pm$ 35,89 <sup>A</sup>	142,99 $\pm$ 3,72 <sup>DEFGY</sup>	10,30 $\pm$ 0,63 <sup>B</sup>
SN-E	85,91 $\pm$ 9,86 <sup>FG</sup>	541,13 $\pm$ 61,51 <sup>B</sup>	5,42 $\pm$ 0,49 <sup>DE</sup>
SN-V	84,07 $\pm$ 2,41 <sup>FG</sup>	364,11 $\pm$ 30,72 <sup>BCD</sup>	13,85 $\pm$ 2,72 <sup>A</sup>
SO-E	68,86 $\pm$ 6,15 <sup>FGX</sup>	900,74 $\pm$ 265,24 <sup>A</sup>	0,63 $\pm$ 0,11 <sup>GHZ</sup>
SO-V	40,70 $\pm$ 0,84 <sup>GX</sup>	217,45 $\pm$ 12,26 <sup>CDEFG</sup>	4,67 $\pm$ 0,19 <sup>EF</sup>
VM-E	53,00 $\pm$ 4,87 <sup>GX</sup>	558,35 $\pm$ 144,84 <sup>B</sup>	0,29 $\pm$ 0,02 <sup>HZ</sup>
VM-V	27,48 $\pm$ 0,52 <sup>GX</sup>	267,34 $\pm$ 29,82 <sup>CDEF</sup>	2,53 $\pm$ 0,21 <sup>FG</sup>
Standard	<sup>a</sup> 8,40 $\pm$ 0,19 <sup>X</sup>	<sup>b</sup> 17,76 $\pm$ 3,90 <sup>Y</sup>	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>Z</sup>

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

Standardi: <sup>a</sup> BHA, <sup>b</sup> EDTA, <sup>c</sup> akarboza

<sup>A-G</sup> razlike između ekstrakata unutar stupca (uzorci koji nisu povezani istim velikim slovom statistički su različiti, Tukey *post-test*,  $P < 0,05$ ).

<sup>X,Y,Z</sup> razlike s pozitivnom kontrolom unutar stupca (uzorci koji nisu povezani istim velikim slovom statistički su različiti, Dunnet *post-test*,  $P < 0,05$ ).

Etanolni i vodeni ekstrakti cvjetova biljne vrste *S. nigra* pokazali su podjednaku aktivnost. U radu Loizzo i sur. (2016) etanolni ekstrakt latica *S. nigra* pokazao je odličnu

antiradikalnu aktivnost s EC<sub>50</sub> vrijednosti 1,4 µg/mL koja se pokazala boljom i od njihove pozitivne kontrole askorbinske kiseline. To je značajno manja vrijednost od one dobivene u ovom radu. Čini se da na antiradikalnu aktivnost ekstrakata biljne vrste značajno utječe temperatura ekstrakcije. Primjerice ekstrakti cvijeta *S. nigra* priređeni su tako da je droga prvo ekstrahirana diklormetanom te zatim etanolom i vodom (Ho i sur., 2017). Najbolji učinak pokazao je 96-postotni etanolni ekstrakt, zatim 50-postotni etanolni, dok su vodeni djelovali slabije pri čemu je vodeni ekstrahiran na 100 °C bio učinkovitiji od vodenoga ekstrahiranog na 50 °C.

Antiradikalna aktivnost etanolnog ekstrakta *P. vulgaris* (Fidrianny i sur., 2014) ispitana u usporedbi s pozitivnom kontrolom askorbinskom kiselinom pokazala se neznatno slabijom od askorbinske kiseline, za razliku od rezultata u ovom radu, gdje je *P. vulgaris* pokazao ekstremno visoku EC<sub>50</sub> vrijednost.

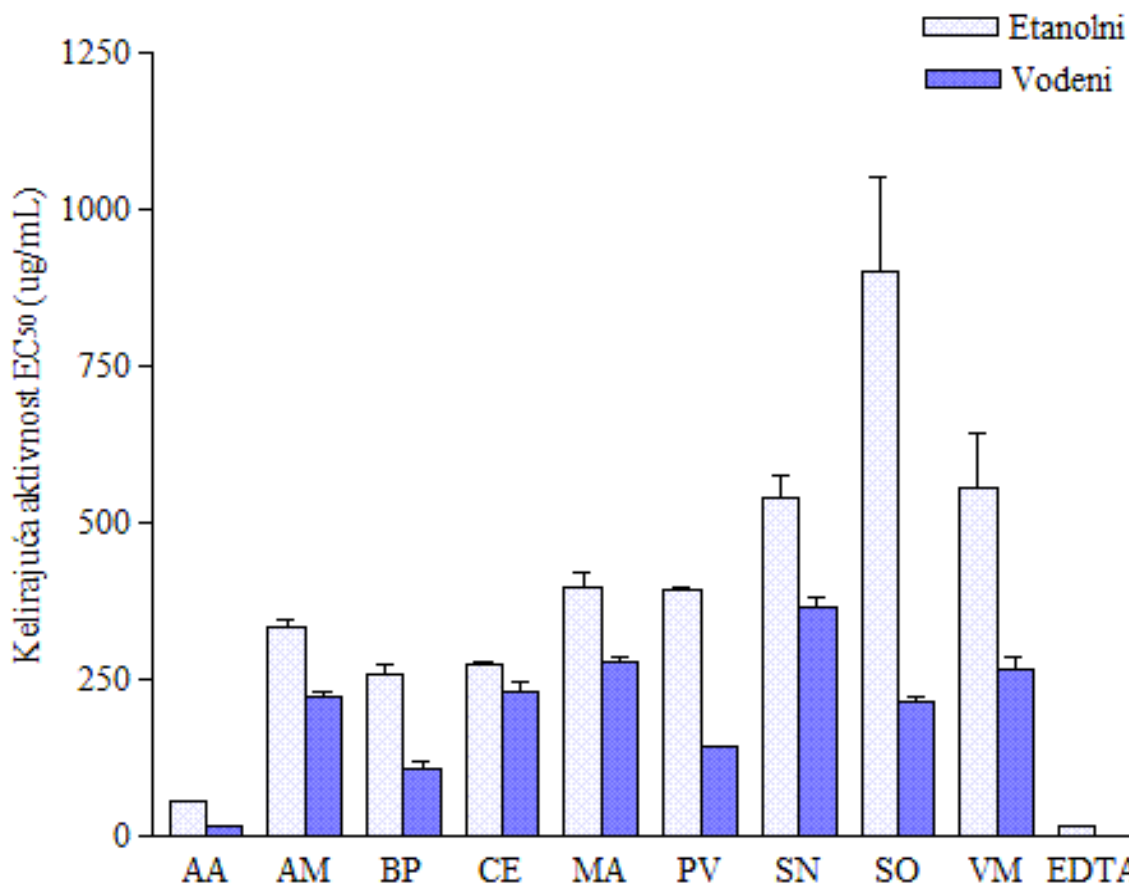
U ispitivanju vodenog i etanolnog ekstrakata *V. myrtillus* (Vučić i sur., 2013) dobivena je bolja aktivnost vodenog ekstrakta, dok su u ovom istraživanju one statistički jednake. U literaturi je zabilježeno ispitivanje antiradikalne aktivnosti etanolnih ekstrakata 16 uzoraka biljaka (Trouillas i sur., 2003), pri čemu je dobiven poredak u kojem je najaktivnija *A. millefolium*, zatim *B. pendula* te najmanje *V. myrtillus*. Zanimljivo je napomenuti da je navedeni redoslijed bio u skladu s količinom polifenola objavljenom u njihovom radu. Iako u ovom ispitivanju nije pokazana statistički značajna korelacija između količine fenolnih sastavnica, najbolju aktivnost ima *V. myrtillus* zatim *A. millefolium* i *B. pendula*, što je također u skladu sa sadržajem polifenola.

DPPH metoda široko je primjenjivana za procjenu antioksidacijske aktivnosti posljednjih godina. Pregledom brojnih studija može se uočiti da se koriste različiti protokoli metode. Objavljeni rezultati uspoređeni s prikazanim u ovom radu pokazuju da razni faktori utječu na konačan ishod ispitivanja, što dovodi do razlika u procjeni antioksidativne aktivnosti. Primjerice, može se uočiti korelacija određivana sadržaja sastavnica sa antiradikalnom aktivnosti. U ovom radu postoji korelacija promatrane aktivnosti sa sadržajem fenolnih kiselina, dok je u drugim studijama ona uočena sa sadržajem ukupnih polifenola. Također, uočava se da razlike u rezultatima aktivnosti ekstrakata iste biljne vrste dobivenih različitim otapalima nisu bile statistički značajne u slučaju dobrih antiradikalnih aktivnosti. Slično je opaženo usporedbom rezultata drugih studija dobivenih različitim otapalima, primjerice kod etanolnih i metanolnih, da su veličine promatrane aktivnosti slične.



## 4.9. Određivanje kelirajuće aktivnosti

Određivanje kelirajuće aktivnosti bilja važno je jer metali mogu pokrenuti razne oksidacijske procese u organizmu. Polifenoli imaju sposobnost keliranja prijelaznih metalnih iona, što dovodi do nastanka stabilnih kompleksa (Leopoldini i sur., 2011). Divalentni ioni željeza ( $Fe^{2+}$ ) imaju sposobnost pokrenuti lipidnu peroksidaciju kroz Fentonovu reakciju ili ubrzavanjem disocijacije lipidnih hidroperoksida na njihove peroksi i alkoksi radikale (Diaz i sur., 2012; Giotti i sur., 2009). Flavonoidi s višestrukim hidroksilnim skupinama i karbonilnom skupinom na položaju 4 prstena C mogu ponuditi nekoliko dostupnih mjesta za keliranje metala (Leopoldini i sur., 2011). Određivanje se temelji na keliranju iona  $Fe^{2+}$  iz kompleksa s ferozinom u otopini u kompleks s biljnim kelatorom koji ne apsorbira na 562 nm. Sposobnost kelacije izražava se u postotcima smanjenja apsorbancije u odnosu na negativnu kontrolu koja sadrži sve osim ekstrakta i stoga ima maksimalnu apsorbanciju s obzirom na to da je cijela količina  $Fe^{2+}$  ušla u kompleks s ferozinom (Decker i Welch, 1990). Rezultati su prikazani na Slici 24. kao  $EC_{50}$  vrijednost, odnosno koncentracija koja izaziva uklanjanje 50 % iona  $Fe^{2+}$  iz kompleksa s ferozinom i uzrokuje smanjenje apsorbancije otopine za polovinu. Detaljna statistička analiza prikazana je u Tablici 10.



Slika 24. Kelirajuća aktivnost ispitivanih ekstrakata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Prema Slici 24. svi ispitivani uzorci imaju značajno slabije kelirajuće djelovanje od pozitivne kontrole, EDTA. Najbolje kelirajuće djelovanje od vodenih ekstrakata pokazali su ekstrakti uzoraka *A. absinthium* i *B. pendula*, dok su najslabije imali *S. nigra* i *M. alba*. Od etanolnih ekstrakata najbolji su se pokazali *A. absinthium* i *B. pendula*, dok su najslabiji bili *S. officinalis* i *V. myrtillus*. Biljke *M. alba*, *S. nigra* i *S. officinalis* u ovom su ispitivanju pokazale najmanju aktivnost unatoč većem sadržaju polifenola u odnosu na druge, u ovom ispitivanju uspješnije ekstrakte, iz čega bi se dalo zaključiti da antioksidativnu moć temelje na drugim mehanizmima. To potvrđuje i detaljnija statistička analiza koja je pokazala da postoji pozitivna korelacija  $EC_{50}$  vrijednosti kelirajuće aktivnosti s količinom ukupnih polifenola ( $r^2 = 0,3876$ ,  $P < 0,05$ ) i flavonoida ( $r^2 = 0,4873$ ,  $P < 0,05$ ).

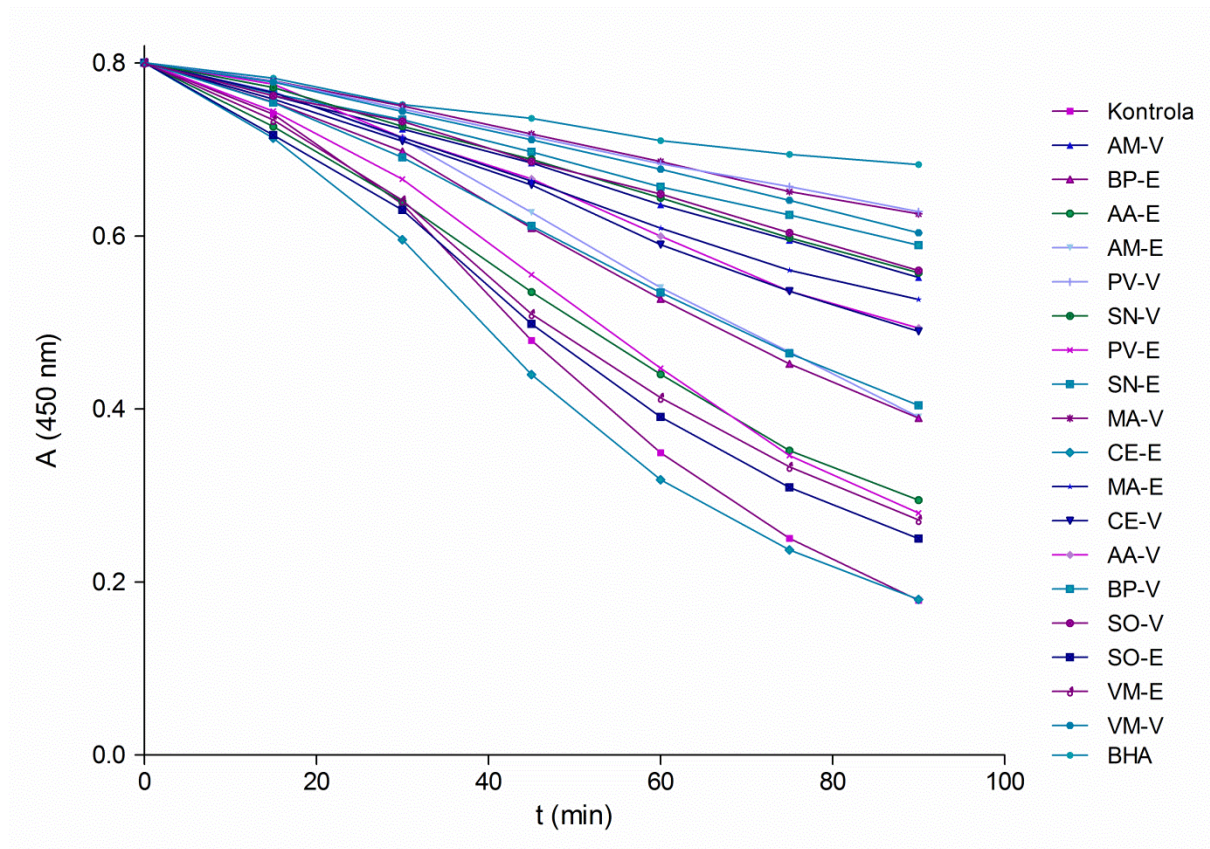
Kelirajuća aktivnost ekstrakata biljnih vrsta ispitivanih u ovom radu nije bila predmetom brojnih znanstvenih istraživanja. Među rijetkim studijama je ona koju su objavili Mahmoudi i sur. (2009) na uzorcima prikupljenima u Iranu. Zabilježili su slabu kelirajuću sposobnost

metanolnog ekstrakta *A. absinthium* s EC<sub>50</sub> vrijednosti 419 µg/mL. Nadalje, usporedba vodenih i 95-postotnih etanolnih ekstrakata *M. alba* (Diaz i sur., 2012) pokazala je bolju sposobnost keliranja vodenog ekstrakta, što je suprotno rezultatima objavljenima u ovom radu. Ispitivanje 80-postotnog etanolnog ekstrakta *B. pendula* u radu Germanò i sur. (2012) pokazalo je vrlo dobru sposobnost keliranja pri EC<sub>50</sub> vrijednosti 35,80 µg/mL.

Usporedbom rezultata može se uočiti razlika u kelirajućoj aktivnosti ekstrakata iste biljne vrsta dobivenih različitim otapalima, iako je važno naglasiti da ona u većine biljnih vrsta nije statistički značajna. Zanimljivo je da je pronađena negativna korelacija sadržaja ukupnih fenolnih sastavnica i promatrane aktivnosti. Ona navodi na zaključak da fenolne sastavnice prisutne u pojedinim ekstraktima djeluju snažnije antioksidativno nekim drugim mehanizmima. Budući da su biljke mješavine brojnih sastavnica, doprinos dobroj aktivnosti ekstrakata koji su imali niski sadržaj fenola mogu dati i sastavnice koje nisu ispitivane u ovom radu.

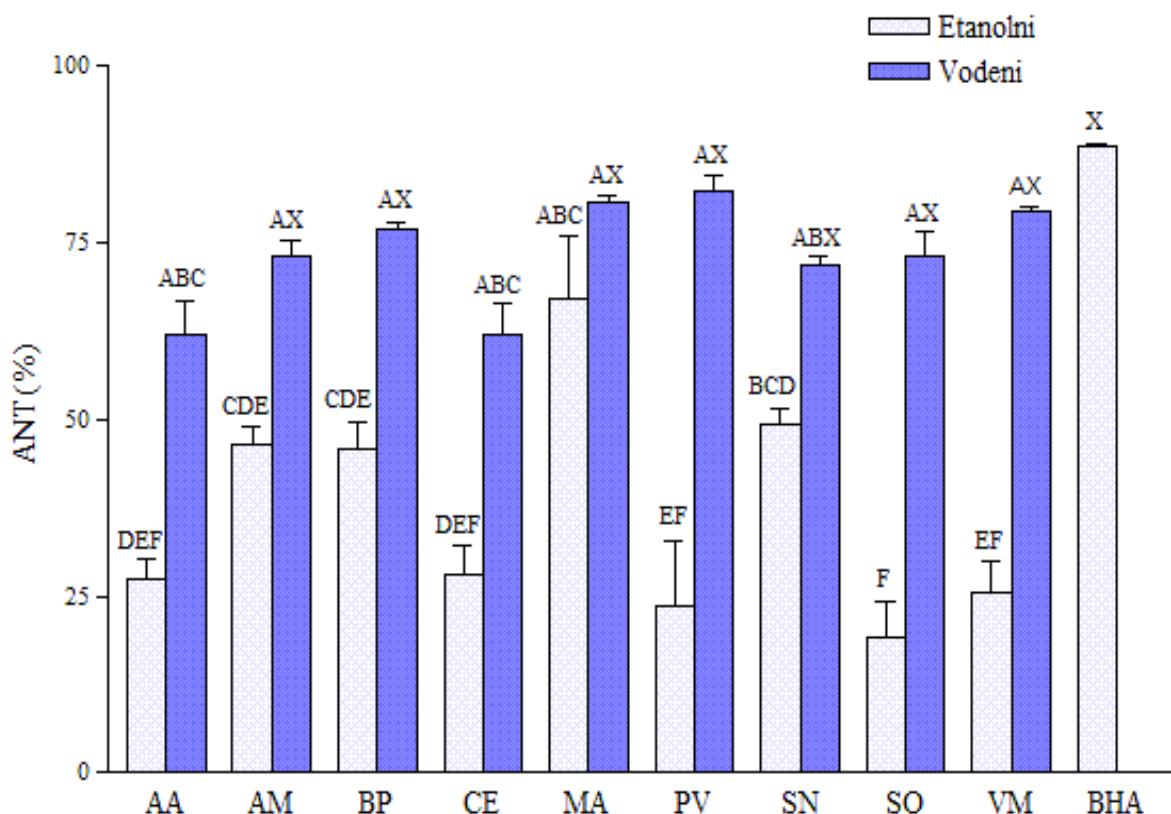
#### **4.10. β-karoten linoleatna analiza**

Analiza antioksidativne aktivnosti pomoću β-karotena i linoleinske kiseline je emulzijski test antioksidativne aktivnosti koji se temelji na toplinom induciranoj oksidativnoj razgradnji β-karotena i linoleinske kiseline (Miller, 1996). Pritom najprije dolazi do nastajanja pentadienil slobodnog radikala odcjepljenjem vodika iz aktivne bis-alicil metilenske skupine između dvije dvostruke veze na C-11 linoleinske kiseline. Tako nastali aktivni radikal napada visoko nezasićene molekule β-karotena, koje gube svoje konjugirane dvostruke veze, a time i specifičnu narančastu boju. Oksidacija karotenoida rezultira njihovim obezbojenjem. Fenolni antioksidansi mogu neutralizirati stvoren slobodni radikal, u ovom slučaju linoleatni radikal, te posljedično odgoditi obezbojenje emulzije. Izbjeljivanje β-karotena može se pratiti spektrofotometrijski na 470 nm, što služi kao mjera antioksidativne aktivnosti. Što je narančasta boja postojanija, antioksidativna je aktivnost jače izražena (Amarowicz i sur., 2004).



Slika 25. Smanjenje apsorbancije u otopini  $\beta$ -karotena, linoleinske kiseline u prisutnosti ispitivanih ekstrakata ili BHA.

Kao što se može uočiti na Slici 25. ekstrakti su pokazali različite sposobnosti inhibicije degradacije  $\beta$ -karotena. Najbolju aktivnost pokazao je BHA, dok je apsorbancija otopine CE-E bila niža čak i od kontrole koja nije sadržavala antioksidans. Važno je primijetiti da je u posljednje dvije vremenske točke došlo je do naglog povećanja apsorbancije u otopini CE-E. To bi se moglo pripisati pojavi taloga u navedenoj jažici koja se s vremenom intenzivirala. Statistička analiza pokazala je da, ako se u analizu uključe sve vremenske točke, navedeni ekstrakt odstupa od kinetike pseudoprvo reda. Kako bi se svi ekstrakti statistički analizirali pri jednakim uvjetima, posljednje dvije točke ( $t = 105$  min i  $t = 120$  min) isključene su iz analize brzine reakcije. Time su se brzine reakcija degradacije  $\beta$ -karotena za sve reakcije uklopile u kinetiku pseudoprvo reda s koeficijentom determinacije  $r^2 > 0,939$ . Rezultati određivanja ANT vrijednosti prikazani su na Slici 26.



Slika 26. ANT vrijednost ispitivanih ekstrakata i BHA. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

<sup>A-F</sup> razlike između ekstrakata unutar stupca (uzorci koji nisu povezani istim velikim slovom statistički su različiti, Tukey *post-test*,  $P < 0,05$ ).

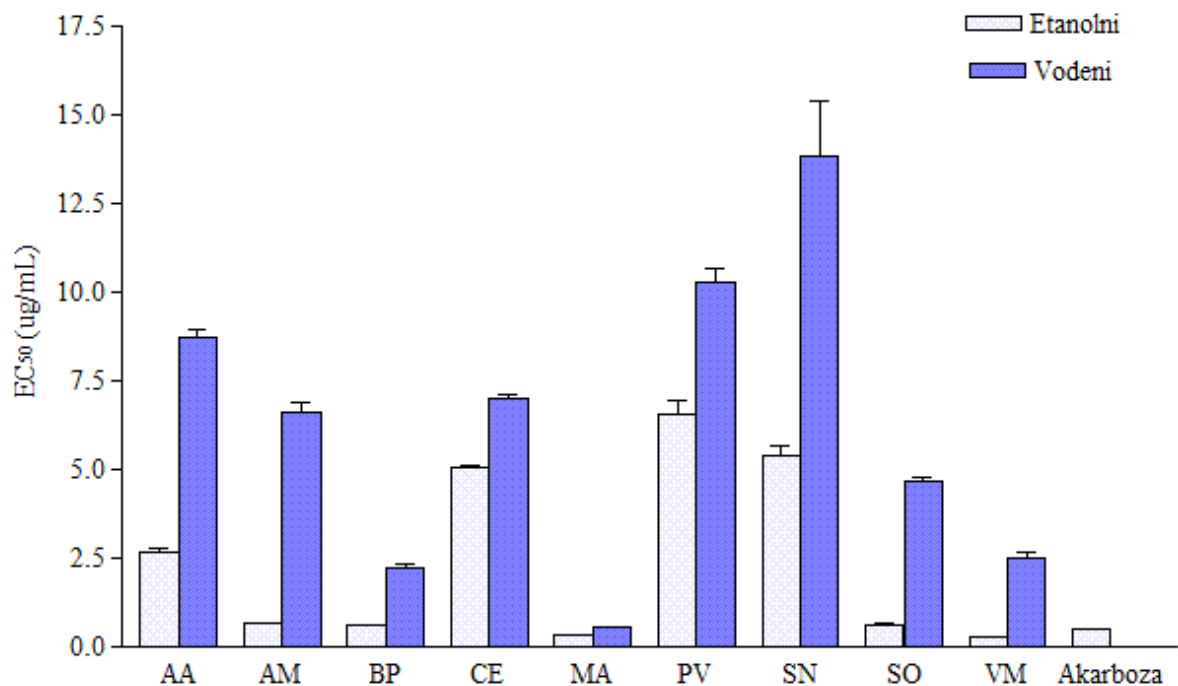
<sup>X</sup>razlike s pozitivnom kontrolom (BHA) (uzorci koji nisu povezani istim velikim slovom statistički su različiti, Dunnet *post-test*,  $P < 0,05$ ).

Iz Slike 26. vidljivo je da najveću antioksidativnu aktivnost, očekivano, pokazuje BHA. Međutim, i drugi ekstrakti pokazali su značajan učinak. Primjerice, gotovo svi vodeni ekstrakti (s izuzetkom AA-V i CE-V) bili su jednako aktivni kao BHA. Bolja antioksidativna aktivnost vodenih ekstrakata mogla bi se dovesti u vezu s time da se pokus izvodi u vodenom mediju pa vodotopljive sastavnice, koje su zastupljenije u vodenim ekstraktima, mogu u većoj mjeri pridonijeti učinku.

#### 4.11. Ispitivanje inhibitornog učinka ekstrakata na $\alpha$ -glukozidazu

Važan je pristup u liječenju dijabetesa kontroliranje postprandijalne hiperglikemije, poglavito u ranoj fazi dijabetesa. Jedan je od glavnih enzima koji sudjeluju u njezinoj kontroli  $\alpha$ -glukozidaza (Ho i sur., 2017). Taj je membranski enzim prisutan u epitelu tankog crijeva i djeluje na olakšavanje apsorpcije glukoze katalizirajući hidrolizu oligosaharida na monosaharide. Inhibicijom  $\alpha$ -glukozidaze u crijevima smanjuje se brzina hidrolitičkog cijepanja oligosaharida, a probava ugljikohidrata širi se u donji dio tankog crijeva. Ovo širenje probavnog procesa odgađa ukupnu brzinu apsorpcije glukoze u krv. Inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze pokazala se jednim od najboljih načina za smanjenje postprandijalnog porasta glukoze u krvi i ima za posljedicu smanjenje pojave kasnih dijabetičkih komplikacija (Kumar i sur., 2011).

Svi ispitivani uzorci pokazali su inhibitorni učinak na  $\alpha$ -glukozidazu (Slika 27). Najbolji učinak pokazao je VM-E, dok je odmah iza njega MA-E koji su ujedno pokazali bolji učinak od standarda akarboze. Po učinkovitosti slijedi MA-V, koji je i najučinkovitiji vodeni ekstrakt. Vrlo učinkoviti bili su i BP-E i SO-E. Od vodenih ekstrakata još su bili učinkoviti BP-V i VM-V. Najslabiju učinkovitost imali su PV-V i SN-V. Statistička analiza pokazala je da postoji negativna, iako slaba korelacija između  $EC_{50}$  inhibitornog učinka ekstrakata na  $\alpha$ -glukozidazu i količine ukupnih polifenola ( $r^2 = 0,2890$ ,  $P < 0,05$ ) i flavonoida ( $r^2 = 0,2308$ ,  $P < 0,05$ ). Budući da su  $EC_{50}$  vrijednost i inhibitorna aktivnost inverzno povezane, ovaj rezultat upućuje na važnu ulogu koju flavonoidi i drugi polifenoli imaju u inhibiciji ovog enzima.



Slika 27. Inhibitorni učinak ispitivanih ekstrakata na  $\alpha$ -glukozidazu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Ekstrakti *A. absinthium* pokazali su inhibicijsko djelovanje na  $\alpha$ -glukozidazu, iako značajno slabije u odnosu na akarbozu. Glavne pronađene sastavnice u AA-E, rutin i klorogenska kiselina, u prijašnjim su studijama pokazale snažnije inhibitorско djelovanje od akarboze (Everette i sur., 2013), što pridonosi boljoj inhibicijskoj učinkovitosti od AA-V. Nadalje, pojedina istraživanja upućuju da bi inhibicijsko djelovanje moglo biti posljedica usklađena djelovanja nekoliko fenolnih spojeva umjesto jedne sastavnice (Zengin i sur., 2017). U istraživanju provedenom na 60-postotnim etanolnim ekstraktima 23 biljne vrste (Ramirez i sur., 2012) koje su poznati antidijabetici u meksičkoj tradicionalnoj medicini, ispitane su *A. millefolium* i *A. absinthium* te su rezultati pokazali, suprotno rezultatima u ovom radu, veću učinkovitost *A. absinthium*, na što su mogli utjecati drukčiji klimatski uvjeti staništa koji pridonose raznolikosti biljnih sastavnica, a što je objašnjeno prije u ovom radu.

Etanolni ekstrakt *A. millefolium* imao je statistički jednaku učinkovitost kao akarboza, dok je vodeni djelovao značajno slabije. Promatranjem sastavnica u Tablici 8. uočava se da su dominantne sastavnice AA-E klorogenska kiselina i rutin pronađene u znatno većoj količini u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Stoga ne iznenađuje značajno bolja učinkovitost etanolnog ekstrakta. Kvantifikacija klorogenske kiseline i njezinih derivata iz ekstrakta *A. millefolium* te provjera njihove aktivnosti (Noda i sur., 2017) sugerira da su oni glavni čimbenici

za inhibiciju, no istodobno rezultat upućuje na prisutnost dodatnoga manjeg, ali moćnog inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze. To sugeriraju prije objavljene studije, da klorogenska kiselina može suzbiti postprandijalnu hiperglikemiju u štakora inhibiranjem  $\alpha$ -glukozidaze (Meng i sur., 2013) te da rutin ima snažnije inhibicijsko djelovanje na  $\alpha$ -glukozidazu od akarboze (Everette i sur., 2013; Jiménez-Aspee i sur., 2017).

U ovom radu prvi je put ispitana aktivnost lista *B. pendula* na  $\alpha$ -glukozidazu. Posebno je aktivan etanolni ekstrakt čija vrijednost  $EC_{50}$  nije statistički različita od akarboze. Prije je spomenuto da klorogenska kiselina inhibicijom  $\alpha$ -glukozidaze može suzbiti postprandijalnu hiperglikemiju kod štakora. No usporedbom rezultata dobivenih u ovom ispitivanju s  $EC_{50}$  vrijednosti klorogenske kiseline potrebne za inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze u prethodno objavljenim radovima (Li i sur., 2009; Oboh i sur., 2014), možemo primijetiti da koncentracija tog fenola u ovoj studiji ne može biti dovoljna za postizanje značajna inhibitornog potencijala. Osim fenolnih supstanci, list *B. pendula* također sadrži triterpenske spojeve, betulini, betulinsku kiselinu, oleanolnu kiselinu i lupeol (Duric i sur., 2013). Pokazano je da oleanolna kiselina i srodni pentaciklički triterpeni mogu inhibirati  $\alpha$ -glukozidazu *in vitro* u nekompetitivnom i o dozi ovisnom načinu s mikromolarnim  $EC_{50}$  vrijednostima (Castellano i sur., 2013). Stoga je moguće da ti triterpeni značajno pridonose promatranj inihibicijskoj aktivnosti.

Iako slabije u odnosu na ostale ekstrakte, *C. erythraea* pokazala je djelovanje na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze. Uspoređujući sadržaj fenolnih sastavnica među uzorcima, također se može uočiti nizak ukupni sadržaj polifenola i flavonoida. Sastavnice ekstrakata *C. erythraea* galna i *p*-kumarna kiselina pokazale su se snažnim inhibitorima  $\alpha$ -glukozidaze (Adisakwattana i sur., 2004; Yin i sur., 2014), no njihove količine nisu bile dovoljne za snažnije inhibitorско djelovanje ekstrakata. Slično je objavljeno u ispitivanju devet biljaka koje se tradicionalno koriste u Libanonu za liječenje dijabetesa, među kojima je metanolni ekstrakt *C. erythraea* (Loizzo i sur., 2008) pokazao značajno slabije djelovanje na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze u skladu s niskim sadržajem ukupnih polifenola.

Ekstrakti *M. alba* pokazali su visoku učinkovitost na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze, pri čemu se vrijednost  $EC_{50}$  nije statistički razlikovala od akarboze. Uz polifenole listovi *M. alba* sadrže 1-deoksinojirimicin, koji je poznat kao jedan od najpotentnijih inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze (Miyahara i sur., 2004; Nuengchamngong i sur., 2007) stoga se može pretpostaviti da 1-deoksinojirimicin znatno pridonosi izvrsnoj inhibicijskoj aktivnosti. Navedeno podupiru prethodna istraživanja na zdravim i od dijabetesa oboljelima životinjama, pokazujući da ekstrakt lišća *M. alba* značajno smanjuje postprandijalnu hiperglikemiju (Park i sur., 2009).



Ekstrakti *P. vulgaris* pokazali su nisku mogućnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na ostale ispitane ekstrakte. Ispitivanja na metanolnim ekstraktima ljuski 15 sorti *P. vulgaris* (Mojica i sur., 2015) pokazala su da nekoliko sorti ima učinkovitost na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze otprilike 80 % u odnosu na akarbozu kojoj je učinkovitost definirana kao 100-postotna iako ti ekstrakti među svim ispitivanima nisu imali najveći sadržaj polifenola, što upućuje na to da su možda prisutne druge sastavnice koje inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu. Nadalje, na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze ekstrakata s fenolnim sastavnicama može utjecati vrsta ekstrakta, koncentracija te obrada i sastav uzorka (Mojica i sur., 2015), što bi moglo biti uzrok slabije inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze ekstrakta *P. vulgaris* i u drugim istraživanjima (Ranilla i sur., 2010).

Etanolni ekstrakt *S. nigra* pokazao je inhibicijsku aktivnost statistički jednaku trećini ekstrakata, dok je vodeni imao najslabije djelovanje među ekstraktima. Suprotno tomu, prijašnja ispitivanja cvjetova i latica (Ho i sur., 2017; Loizzo i sur., 2016) pokazala su bolju učinkovitost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze od akarboze.

Etanolni ekstrakt *S. officinalis* pokazao je izvrsno djelovanje koje se nije statistički razlikovalo od akarboze. Poznato je da sastavnice ružmarinska kiselina, rutin i ferulična kiselina imaju inhibicijski učinak na  $\alpha$ -glukozidazu (Everette i sur., 2013; Kwon i sur., 2006). Budući da je sadržaj navedenih sastavnica te ukupnih polifenola i fenolnih kiselina znatno veći u etanolnom nego vodenom ekstraktu, ne iznenađuje značajno snažnija inhibicija etanolnog ekstrakta. Slično tomu, Khacheba i sur. (2016) potvrdili su potencijalno inhibicijsko djelovanje *S. officinalis* na  $\alpha$ -glukozidazu *in vitro*, dok je prije, u istraživanju provedenom na štakorima, potvrđeno da metanolni ekstrakt *S. officinalis* u inhibiciji  $\alpha$ -glukozidaze ima učinak sličan akarbozi (Moradabadi i sur., 2013).

U ovom je radu prvi put istraživano djelovanje lista *V. myrtillus* na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze. Ekstrakt VM-E pokazao je izvrsno djelovanje na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze čija se EC<sub>50</sub> vrijednost nije razlikovala od akarboze. Prije je objavljeno da glavne fenolne sastavnice ekstrakta VM-E hiperozid i klorogenska kiselina mogu spriječiti postprandijalnu hiperglikemiju snažno inhibirajući  $\alpha$ -glukozidazu (Fan i sur., 2010; Oboh i sur., 2014). Objavljene studije pokazuju da kombinacija biljnih fenola, kao što je kombinacija pronađena u ovim ekstraktima, može imati dodatni učinak na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze (Adisakwattana i sur., 2012). Nadalje, kvercetin i kavena kiselina, aglikoni nastali hidrolizom hiperozida i klorogenske kiseline, također posjeduju mogućnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze (Li i sur., 2009; Oboh i sur., 2014).

Ispitivani ekstrakti pokazali su sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Izvrsnim djelovanjem, koje se statistički nije razlikovalo od akarboze, istaknula se trećina ekstrakata. Kod većine njih HPLC analiza potvrdila je u sastavu klorogensku kiselinu kao dominantnu

sastavnicu, što upućuje na njezinu važnu ulogu u inhibiciji  $\alpha$ -glukozidaze. Nadalje, flavonoidi rutin i hiperozid također su sastavnice pronađene u većoj količini u iznimno aktivnim ekstraktima. Utvrđeno je da kombinacija biljnih tvari može imati snažnije djelovanje na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze od pojedinih sastavnica (Adisakwattana i sur., 2012; Zengin i sur., 2017). Stoga možemo zaključiti da derivati kvercetina i drugi fenolni spojevi koji su otkriveni u ispitivanim ekstraktima mogu imati važnu aditivnu ili čak sinergističku ulogu u promatranj aktivnosti inhibiranja  $\alpha$ -glukozidaze.

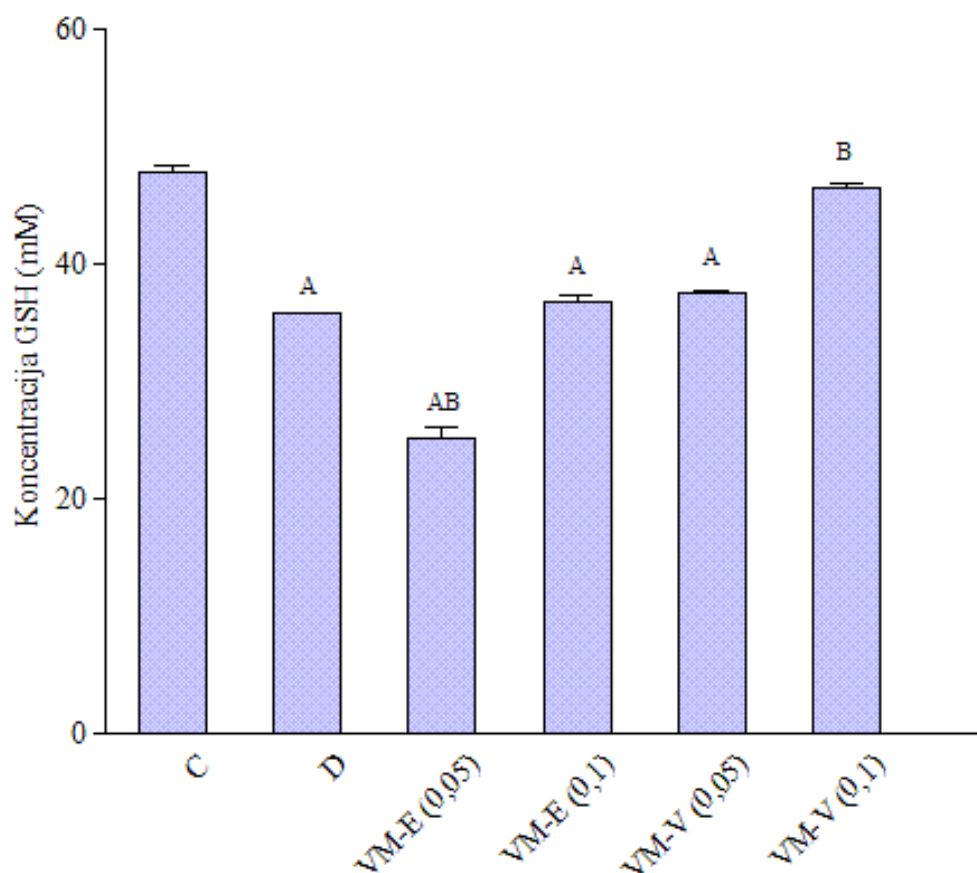
#### 4.12. Utjecaj na koncentraciju reducirana glutaciona

Pokazano je da akutna izloženost visokoj koncentraciji glukoze uzrokuje oksidacijski stres u jetrenim stanicama, što se očituje povećanom razinom ROS-a, peroksidacijom lipida, promijenjenom morfologijom, formiranjem proteina karbonila i 3-nitrotirozina u Hep G2 stanicama. Te promjene mogu nepovratno oštetiti hepatocite, što dovodi do apoptoze. Prirodni metaboliti i ekstrakti mogu spriječiti oksidacijske promjene, normalizirati koncentraciju unutarstaničnih antioksidansa i time spriječiti ili čak obnoviti oštećenja stanica *in vivo* i *in vitro* (Chandrasekaran i sur., 2010). Stoga je za proučavanje potencijalnog učinka pripremljena ekstrakta na oksidativni stres izazvan glukozom u jetri odabran model kulture stanica hepatocita humana karcinoma jetre Hep G2.

Osim izravnog stupanja u reakciju s ROS-om, prirodni fenoli i drugi antioksidansi brojnim drugim mehanizmima mogu reagirati s raznim molekulama u organizmu (Saso i Firuzi, 2014). Jedna je od posljedica dijabetičke hiperglikemije povišena proizvodnja ROS-a koja dovodi do smanjene razine jednog od najvažnijih antioksidansa u tijelu, GSH-a (Lash, 2015). Sukladno tomu, jedan od mehanizama kojima antioksidansi mogu zaštititi stanice i tkiva od oksidativnog stresa obnavljanje je antioksidansa niske molekulske mase, kao što je GSH (Saso i Firuzi, 2014).

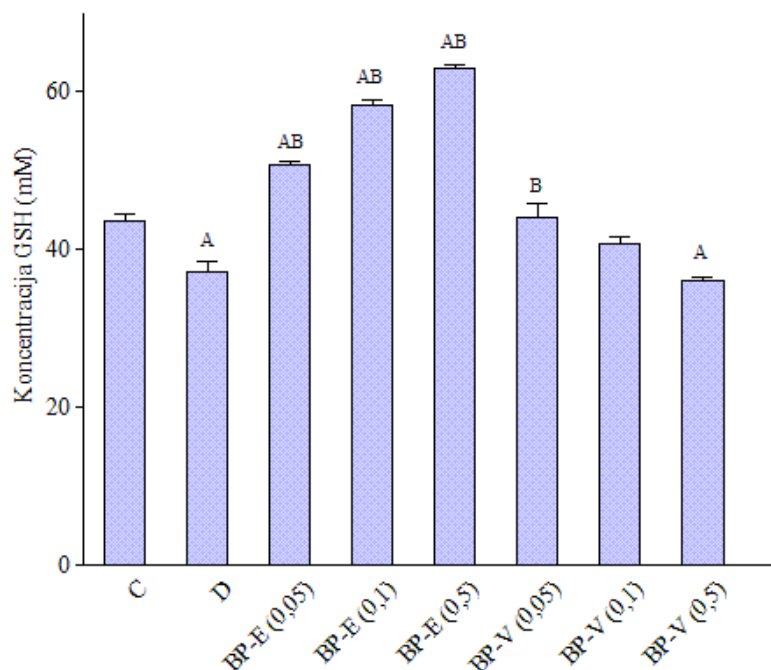
U ovom radu ispitan je utjecaj odabranih ekstrakata na razinu GSH-a u hiperglikemijskim uvjetima. Ispitivanje je provedeno u odvojenim pokusima i rezultati su prikazani na slikama 28. i 29. Utjecaj ekstrakta *V. myrtillus* i *B. pendula* na razine GSH-a u jetrenim stanicama podvrgnutih visokoj koncentraciji glukoze dosad nije zabilježen u literaturi.

Osim toga, ekstrakti ovih biljnih vrsta pokazali su izrazito dobro antioksidativno djelovanje te su znatno inhibirali  $\alpha$ -glukozidazu.



Slika 28. Koncentracija reducirana glutationa (GSH) u Hep G2 stanicama. C: netretirane stanice; D: stanice u mediju kojem je dodano 20 mM glukoze; VM-E i VM-V: stanice u mediju kojem je dodano 20 mM glukoze i odgovarajući *V. myrtillus* ekstrakt (brojevi u zagradi predstavljaju koncentraciju ekstrakta u mg/mL); A i B: statistički različito od C odnosno D, ( $P < 0.05$ , Dunnett's test). Prikazana je srednja vrijednost triju ponavljanja  $\pm$  SD.

Kao što se može primijetiti na slici 28., VM-V u koncentraciji 0,1 mg/mL pokazao je izvanrednu aktivnost i vratio koncentraciju GSH-a na razine koje su zapažene u stanicama koje nisu tretirane visokim razinama glukoze (C).



Slika 29. Koncentracija reducirana glutationa (GSH) u Hep G2 stanicama. C: netretirane stanice; D: stanice u mediju kojem je dodano 20 mM glukoze; BP-E i BP-V: stanice u mediju kojem je dodano 20 mM glukoze i odgovarajući *B. pendula* ekstrakt (brojevi u zagradi predstavljaju koncentraciju ekstrakta u mg/mL); A i B: statistički različito od C odnosno D, ( $P < 0.05$ , Dunnett's test). Prikazana je srednja vrijednost triju ponavljanja  $\pm$  SD.

Ispitivana je sposobnost vodenog i etanolnog ekstrakta *B. pendula* na smanjenje oksidacijskog stresa kod Hep G2 stanica tretiranih glukozom. Razina glutationa u stanicama tretiranim glukozom (negativna kontrola) bila je znatno niža nego u netretiranim stanicama koje su služile kao potvrda da je glukoza izazvala oksidacijski stres. U koncentracijama koje su korištene u eksperimentu, oba ekstrakta smanjuju oksidacijski stres, što se vidi u znatno povišenim razinama glutationa u usporedbi s negativnom kontrolom. Osim toga, etanolni ekstrakt bio je u stanju povećati koncentraciju GSH-a u usporedbi s pozitivnom kontrolom.

Činjenica da ekstrakti priređeni od biljnih vrsta *B. pendula* i *V. myrtillus* mogu povisiti koncentraciju GSH-a u stanicama izloženima oksidacijskom stresu ukazuje na potencijal slična djelovanja i u višim organizmima, što bi posljedično vodilo usporavanju ili sprječavanju razvoja dijabetičkih komplikacija. Glavni sastojci ekstrakata, klorogenska kiselina te derivati kvercetina pokazuju važan *in vitro* antioksidacijski potencijal (Chobot i sur., 2014). K tomu,

hiperozid, njegov aglikon kvercetin te klorogenska kiselina mogu povisiti razine GSH-a u stanicama, što je zabilježeno u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama (Bagdas i sur., 2014; Myhrstad i sur., 2002). Stoga se može zaključiti da se znatan dio promatrane aktivnosti može pripisati prisutnosti tih antioksidansa. Kliničke studije potvrđuju djelovanje namirnica bogatih klorogenskom kiselinom na antioksidativni kapacitet plazme zdravih pojedinaca, što daje nadu da bi mogla slično djelovati i u pacijenata oboljelih od dijabetesa (Agudelo-Ochoa i sur., 2016).

## **5. ZAKLJUČAK**

U radu se prvi put provela detaljna analiza strukture profesionalnih travara u urbanim sredinama te utvrdilo koje se sve biljne vrste koriste kao komplementarna terapija dijabetesa. Najčešće spomenuta porodica bila je Asteraceae, zatim je slijedila Lamiaceae, dok su najčešće spomenute ljekovite biljke bile *U. dioica*, *P. vulgaris*, *C. intybus*, *A. absinthium* i *V. myrtillus*.

Odabrano je devet biljnih vrsta koje su upućene u daljnje istraživanje: zeleni stolisnika (*Achillea millefolium*), pelina (*Artemisia absinthium*) i kičice (*Centaurium erythraea*), zatim listovi breze (*Betula pendula*), bijelog duda (*Morus alba*), kadulje (*Salvia officinalis*) i borovnice (*Vaccinium myrtillus*). U daljnje istraživanje uključene su i ljuske graha (*Phaseolus vulgaris*) te cvijet bazge (*Sambucus nigra*). Biljni uzorci nisu imali povišen sadržaj teških metala koji bi ih činio neprikladnima za upotrebu. K tomu, u zeleni pelina pronađen je krom, metal čiji se manjak u organizmu povezuje s rezistencijom na inzulin. Od navedenih biljnih vrsta / organa priređeni su etanolni i vodeni ekstrakti.

U ispitivanim ekstraktima određen je sadržaj fenolnih sastavnica. U pravilu su etanolni ekstrakti bili bogatiji fenolnim spojevima nego vodeni. Tako su najviše polifenola sadržavali etanolni ekstrakti lista borovnice ( $423,51 \pm 13,88$  mg GE/g), zeleni stolisnika ( $393,36 \pm 20,65$  mg GE/g) i cvijeta bazge ( $362,58 \pm 36,06$  mg GE/g). Najmanji sadržaj ukupnih polifenola zabilježen je u vodenom ekstraktu ljuski graha ( $27,59 \pm 1,89$  mg GE/g).

Sadržaj flavonoida u ekstraktima također je bio veći u etanolnim ekstraktima nego u vodenima. Najveća količina ukupnih flavonoida određena je u etanolnim ekstraktima lista duda ( $154,51 \pm 22,64$  mg QE/g) te lista kadulje ( $140,03 \pm 21,35$  mg QE/g), dok je najmanje ukupnih flavonoida imao vodeni ekstrakt ljuske graha ( $6,22 \pm 1,23$  mg QE/g). Isti ekstrakt sadržavao je najmanju količinu fenolnih kiselina ( $1,54 \pm 0,00$  mg CAE/g), dok je najveća količina pronađena u vodenom ekstraktu lista borovnice ( $125,81 \pm 1,32$  mg CAE/g).

HPLC analiza pokazala je da su rutin i klorogenska kiselina najzastupljeniji fenolni spojevi u ekstraktima. To je potvrdila i analiza ekstrakata podvrgnutih kiseloj hidrolizi jer je najzastupljeniji flavonoid bio kvercetin, aglikon rutina, te kavena kiselina, produkt hidrolize klorogenske kiseline.

Ekstrakti su pokazali izvrsnu antiradikalnu aktivnost jer je trećina ekstrakata imala rezultat koji se nije statistički razlikovao od pozitivne kontrole, BHA-e. Od etanolnih ekstrakata najbolju antiradikalnu aktivnost pokazali su list borovnice te zeleni stolisnika dok su najaktivniji vodeni ekstrakti bili oni priređeni od lista kadulje i borovnice. Kelirajuća aktivnost ekstrakata bila je u pravilu vrlo niska. Iznimka je bio vodeni ekstrakt zeleni pelina čija je aktivnost bila statistički jednaka pozitivnoj kontroli, EDTA-i.

Ispitana je inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze od ispitivanih ekstrakata te uspoređena s aktivnošću akarboze. Utvrđeno je izvrsno djelovanje pojedinih ekstrakata, pri čemu se inhibicijska aktivnost obaju ekstrakata lista borovnice, lista bijelog duda, te etanolnih ekstrakata lista breze i zeleni stolisnika statistički nije razlikovala od aktivnosti akarboze.

Ispitan je utjecaj ekstrakata lista breze i lista borovnice na koncentraciju GSH-a u Hep G2 stanicama izloženim hiperglikemijom prouzročenom oksidacijskom stresu. Pokazalo se da oba ekstrakta mogu povisiti koncentraciju reducirana glutaciona do razine zabilježene u stanicama u normoglikemijskim uvjetima.

Visoki udio fenolnih spojeva u ekstraktima, izvrsna antiradikalna aktivnost te sposobnost da inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu u jednakoj mjeri kao registrirani lijek akarboza čini ispitivane ekstrakte potencijalno korisnima za komplementarnu terapiju dijabetesa. Među ispitivanim uzorcima posebno se ističu list breze i list borovnice zbog svoje sposobnosti regeneracije staničnih razina reducirana glutaciona. Sve navedeno govori u prilog upotrebi ispitivanih biljnih droga kao komplementarne terapije dijabetesa.



## **6. LITERATURA**

- Abbasi AM, Khan MA, Khan N, Shah MH. Ethnobotanical survey of medicinally important wild edible fruits species used by tribal communities of Lesser Himalayas-Pakistan. *J. Ethnopharmacol* (2013)148: 528–536.
- Abdul-Ghani MA, Norton L, Defronzo RA. Renal sodium-glucose cotransporter inhibition in the management of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Physiol. – Ren. Physiol* (2015) 309: 889–900.
- Adisakwattana S, Ruengsamran T, Kampa P, Sompong W, In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase. *BMC Complement. Altern. Med* (2012) 12.
- Adisakwattana S, Sookkongwaree K, Roengsumran S, Petsom A, Ngamrojnavanich N, Chavasiri W, Deesamer S, Yibchok-anun S. Structure–activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett* (2004) 14: 2893–2896.
- Agbor G, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet* (2014) 147–156.
- Agudelo-Ochoa GM, Pulgarín-Zapata IC, Velásquez-Rodríguez CM, Duque-Ramírez M, Naranjo-Cano M, Quintero-Ortiz MM, Lara-Guzmán OJ, Muñoz-Durango K. Coffee consumption increases the antioxidant capacity of plasma and has no effect on the lipid profile or vascular function in healthy adults in a randomized controlled trial. *J. Nutr* (2016) 146: 524–531.
- Aguilar M-I. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, in: *HPLC of Peptides and Proteins, Methods in Molecular Biology TM*. Springer, Totowa, NJ (2014) str. 9–22.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc* (1998) 15: 539–553.
- Alexandru V, Gaspar A, Savin S, Toma A, Tatia R, Gille E. Phenolic content, antioxidant activity and effect on collagen synthesis of a traditional wound healing polyherbal formula. *Stud. Univ. Vasile Goldis Arad Ser. Stiintele Vietii* (2015) 25: 41–46.

- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* (2004) 84: 551–562.
- Anwar F, Anwar F, Anwar F, Kanwal S, Shabir G, Alkharfy KM, Gilani AH. Antioxidant and antimicrobial attributes of different solvent extracts from leaves of four species of mulberry. *Int. J. Pharmacol* (2015) 11: 757–765.
- Applequist WL, Moerman DE. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research<sup>1</sup>. *Econ. Bot* (2011) 65: 209–225.
- Arulselvan P, Ghofar HAA, Karthivashan G, Halim MFA, Ghafar MSA, Fakurazi S. Antidiabetic therapeutics from natural source: A systematic review. *Biomed. Prev. Nutr* (2014) 4: 607–617.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* (2005) 89: 27–36.
- Bagdas D, Cam Etoz B, Inan Ozturkoglu S, Cinkilic N, Ozyigit MO, Gul Z, Isbil Buyukcoskun N, Ozluk K, Gurun MS. Effects of systemic chlorogenic acid on random-pattern dorsal skin flap survival in diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull* (2014) 37: 361–370.
- Belščak-Cvitanovic A, Durgo K, Bušić A, Franekić J, Komes D. Phytochemical attributes of four conventionally extracted medicinal plants and cytotoxic evaluation of their extracts on human laryngeal carcinoma (HEp2) Cells. *J. Med. Food* (2014) 17: 206–217.
- Benedec D, Popica I-E, Oniga I, Hanganu D, Duma M, Silaghi-Dumitrescu R, Bischin C, Vlase L. Comparative HPLC-MS analysis of phenolics from *achillea distans* and *achillea millefolium* and their bioactivity. *Stud. Univ. Babes-Bolyai Chem* (2015) 60: 257–266.
- Benetis R, Radusiene J, Jakstas V, Janulis V, Puodziuniene G, Milasius A. Quantitative HPLC determination of phenolic compounds in yarrow. *Pharm. Chem. J* (2008) 42: 153–156.
- Brudzińska-Kosior A, Kosior G, Samecka-Cymerman A, Kolon K, Mróz L, Kempers AJ. Metal contents in *Centaurium erythraea* and its biometry at various levels of environmental pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf* (2012) 80: 349–354.
- Büyükbacı A, El SN. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods Hum. Nutr* (2008) 63: 27–33.

- Castellano JM, Guinda A, Delgado T, Rada M, Cayuela JA. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes* (2013) 62: 1791–799.
- Catarino MD, Alves-Silva JM, Pereira OR, Cardoso SM. Antioxidant Capacities of Flavones and Benefits in Oxidative-Stress Related Diseases. *Curr. Top. Med. Chem* (2014) 49: 2774–2779.
- Ceriello A. Postprandial Hyperglycemia and Diabetes Complications. *Diabetes* (2005) 54: 1–7.
- Chandrasekaran K, Swaminathan K, Chatterjee S, Dey A. Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. *Toxicol. In Vitro* (2010) 24: 387–396.
- Chauhan S, Verma SC, Kumar RV. Evaluation of phytochemical and anti-oxidant activity in different mulberry varieties. *Asian J. Chem* (2013) 25: 8010–8014.
- Chen PX, Bozzo GG, Freixas-Coutin JA, Marcone MF, Pauls PK, Tang Y, Zhang B, Liu R, Tsao R. Free and conjugated phenolic compounds and their antioxidant activities in regular and non-darkening cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. *J. Funct. Foods* (2015) 18: 1047–1056.
- Chiasson JL, Gomis R, Hanefeld M, Josse RG, Karasik A, Laakso M. The STOP-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. *Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Diabetes Care* (1998) 21: 1720–1725.
- Chobot V, Hadacek F, Kubicova L. Effects of Selected Dietary Secondary Metabolites on Reactive Oxygen Species Production Caused by Iron (II) Autoxidation. *Mol. Basel Switz* (2014) 19: 20023–20033.
- Clark AM. Natural Products as a Resource for New Drugs. *Pharm. Res*, 1996, 13, 1133–1141.
- Cnop M, Welsh N, Jonas J-C, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl (2005) 2: S97–107.
- Cornell S. Continual evolution of type 2 diabetes: An update on pathophysiology and emerging treatment options. *Ther. Clin. Risk Manag* (2015) 11: 62–632.

- Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem. Cent. J* (2012) 6: 97.
- Decker EA, Welch B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food†. *J. Agric. Food Chem* (1990) 38: 674–677.
- Dent M, Dragovic-Uzelac V, Garofulic IE, Bosiljkov T, Ježek D, Brncic M. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem. Biochem. Eng. Q* (2015) 29: 475–484.
- Dghaim R, Al K, Rasool H, Khan MA. Determination of heavy metals concentration in traditional herbs commonly consumed in the United Arab Emirates. *J. Environ. Public Health* (2015) 2015.
- Diabetes, (2017), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, pristupljeno 30.11.2017.
- Diabetes in Croatia, (2015), <http://www.idf.org/membership/eur/croatia>, pristupljeno 24.07.2016.
- Dias MI, Barros L, Dueñas M, Pereira E, Carvalho AM, Alves RC, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chem* (2013) 141: 4152–4160.
- Diaz P, Jeong SC, Lee S, Khoo C, Koyyalamudi SR. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chin. Med* (2012) 7: 26.
- Dietary Reference Values for nutrients Summary report, (2017), [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu), pristupljeno 30.12.2017.
- Dogan S, Diken ME, Dogan M. Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *J. Med. Plants Res* (2010) 4: 2566–2572.
- Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJA, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Korányi L, Laakso M, Mokán M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Scherthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J, PROactive Investigators. Secondary prevention of macrovascular events in patients with

- type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl* (2005) 366: 1279–1289.
- Duric K, Kovac-Besovic E, Niksic H, Sofic E. Antibacterial Activity of Methanolic Extracts, Decoction and Isolated Triterpene Products from Different Parts of Birch, *Betula pendula*, Roth. *J. Plant Stud* (2013) 2: 61.
- Düsmann E, de Almeida IV, Coelho AC, Balbi TJ, Düsmann Tonin LT, Vicentini VEP. Antimutagenic Effect of Medicinal Plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* In Vivo. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* (2013) 2013: 893050.
- Eghdami A, Fateh V, Asli DE, Houshmandfar A. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea millefolium* L. *Adv. Environ. Biol* (2011) 5: 929–932.
- El-Abhar HS, Schaalán MF. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World J. Diabetes*, (2014) 5: 17–197.
- Ermer J, McB Miller JH (Eds.). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG (2005) str. 101.
- European Pharmacopoeia, Fifth Edition (Eur.Ph. 5,0), Council of Europe, Strasbourg Cedex (2004) Vol. 1, str.222.
- European Pharmacopoeia, Eighth Edition (Eur. Ph. 8,0), Council of Europe, Strasbourg Cedex (2013) Vol. 1, str. 1424 – 1425, 1139 – 1140, 1173 – 1174, 1204 – 1205, 1373, 1232 – 1233.
- Evans JL, Bahng M. Non-pharmaceutical intervention options for type 2 diabetes: Diets and Dietary Supplements (Botanicals, Antioxidants, and Minerals), in: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA) (2000) 1–34.
- Everette, JD, Walker RB, Islam S. Inhibitory Activity of Naturally Occurring Compounds Towards Rat Intestinal  $\alpha$ -glucosidase using p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNP-G) as a Substrate. *Am. J. Food Technol* (2013) 8: 65–73.
- Ezuruike UF, Prieto JM. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. *J. Ethnopharmacol* (2014) 155: 857–924.

- Fan P, Terrier L, Hay A-E, Marston A, Hostettmann K. Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of *Polygonum sachalinensis* F.Schmidt ex Maxim (Polygonaceae). *Fitoterapia* (2010) 81: 12–131.
- Farnsworth NR. The role of ethnopharmacology in drug development. *Ciba Found. Symp* (1990) 154: 2–11.
- Ferrier J, Saciragic L, Trakić S, Chen ECH, Gendron RL, Cuerrier A, Balick MJ, Redžić S, Alikadić E, Arnason JT. An ethnobotany of the Lukomir Highlanders of Bosnia & Herzegovina. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* (2015) 11: 81.
- Fidrianny I, Puspitasari N, Marlia S. Antioxidant activities, Total flavonoid, Phenolic, Carotenoid of various shells extracts from four species of legumes. *Asian J. Pharm. Clin. Res* (2014) 7: 42–46.
- Nikolić T. ur. (2013), *Flora Croatica Database*, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Georgieva L, Gadjalova A, Mihaylova D, Pavlov A. *Achillea millefolium* L. - Phytochemical profile and in vitro antioxidant activity. *Int. Food Res. J* (2015) 22: 1347–1352.
- Germanò MP, Cacciola F, Donato P, Dugo P, Certo G, D'Angelo V, Mondello L, Rapisarda A. *Betula pendula* leaves: Polyphenolic characterization and potential innovative use in skin whitening products. *Fitoterapia* (2012) 83: 877–882.
- Ghafoori H, Sariri R, Naghavi MR. Study of effect of extraction conditions on the biochemical composition and antioxidant activity of *artemisia absinthium* by HPLC and TLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol* (2014) 37: 1558–1567.
- Ghorbani A. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran: (Part 1): General results. *J. Ethnopharmacol* (2005) 102: 58–68.
- Giacometti J, Muhvić D, Pavletić A, Đudarić L. Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, and anti-necrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *J. Funct. Foods* (2016) 23: 177–187.
- Gioti EM, Fiamegos YC, Skalkos DC, Stalikas CD. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem* (2009) 117: 398–404.

- Hamidpour M, Hamidpour R, Hamidpour S, Shahlari M. Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. *J. Tradit. Complement. Med* (2014) 4: 82–88.
- Heinrich M. Ethnopharmacology and drug discovery. *Compr. Nat. Prod. II Chem. Biol* (2010) 351–381.
- Ho GTT, Kase ET, Wangensteen H, Barsett H. Effect of phenolic compounds from elderflowers on glucose– and fatty acid uptake in human myotubes and HepG2-Cells. *Molecules* (2017) 22.
- Holst JJ, Vilsbøll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, Special Issue: Endocrine Aspects of Type II Diabetes Free access is supported by an educational grant from NovoNordisk (2009) 297: 127–136.
- Hosein F, Rahimi R, Farzaei F, Abdollahi M. Traditional medicinal herbs for the management of diabetes and its complications: An evidence-based review. *Int. J. Pharmaco* (2015) 11: 874–887.
- Hosseinzadeh S, Jafarikukhdan A, Hosseini A, Armand R. The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *Int. J. Clin. Med* (2015) 06: 635–642.
- Ieri F, Martini S, Innocenti M, Mulinacci N. Phenolic distribution in liquid preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L. *Phytochem. Anal. PCA* (2013) 24: 467–475.
- Imbrea IM, Radulov I, Nicolin AL, Imbrea F. Analysis of macroelements content of some medicinal and aromatic plants using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *Romanian Biotechnol. Lett* (2016) 21: 11642–11651.
- Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Soriano MDPC, Ugalde-Arbizu M, Alberto MR, Zampini IC, Isla MI, Simirigiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G. The Native Fruit *Geoffroea decorticans* from Arid Northern Chile: Phenolic Composition, Antioxidant Activities and In Vitro Inhibition of Pro-Inflammatory and Metabolic Syndrome-Associated Enzymes. *Mol. Basel Switz.* (2017) 22.



- Kandziora-Ciupa M, Ciepał R, Nadgórska-Socha A, Barczyk G. A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Vaccinium myrtillus* L. leaves in polluted and non-polluted areas. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int* (2013) 20: 4920–4932.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* (2006) 94: 550–557.
- Keinänen M, Julkunen-Tiitto R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *J. Chromatogr. A* (1998) 793: 370–377.
- Keser S, Celik S, Turkoglu S, Yilmaz Ö, Turkoglu I. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from *Achillea millefolium* l. *Turk. J. Pharm. Sci* (2013) 10: 385–391.
- Khacheba I, Boussoussa H, Djeridane A, Bekhaoua A, Bensayah N, Yousfi M.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect and antioxidant activity of the extracts of eighteen plant traditionally used in Algeria for diabetes. *Curr. Enzyme Inhib* (2016) 12: 1–1.
- Khamkar AD, Motghare VM, Deshpande R. Ethnopharmacology- A Novel Approach for Drug Discovery. *Indian J. Pharm. Pharmacol* (2015) 2: 2393–9087.
- Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, Hossain M, Rashid M, Sadik G, Nasrin S, Mollah MNH, Alam AK. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res. Notes* (2013) 6: 24.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Mol. Basel Switz* (2013) 18: 2328–2375.
- Kim D-S, Kang YM, Jin WY, Sung Y-Y, Choi G, Kim HK. Antioxidant activities and polyphenol content of *Morus alba* leaf extracts collected from varying regions. *Biomed. Rep* (2014) 2: 675.
- Kimura G. Importance of inhibiting sodium-glucose cotransporter and its compelling indication in type 2 diabetes: pathophysiological hypothesis. *J. Am. Soc. Hypertens* (2016) 10: 271–278.
- Kintzios S, Papageorgiou K, Yiakoumettis I, Baričević D, Kušar A. Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *J. Pharm. Biomed. Anal* (2010) 53: 773–776.

- Kokić S. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix* (2009) 80/81, 90–98.
- Kosiorek M, Modrzewska B, Wyszowski M. Levels of selected trace elements in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), silver birch (*Betula pendula* L.), and Norway maple (*Acer platanoides* L.) in an urbanized environment. *Environ. Monit. Assess* (2016) 188: 598.
- Krejpcio Z, Król E, Sionkowski S. Evaluation of heavy metals contents in spices and herbs available on the Polish market. *Pol. J. Environ. Stud* (2007) 16: 97–100.
- Kremer D, Košir IJ, Končić MZ, Čerenak A, Potočnik T, Srečec S, Randić M, Kosalec I. Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (Lamiaceae). *Curr. Drug Targets* (2015) 16: 1623–1633.
- Król E, Jeszka-Skowron M, Krejpcio Z, Flaczyk E, Wójciak RW. The Effects of Supplementary Mulberry Leaf (*Morus alba*) Extracts on the Trace Element Status (Fe, Zn and Cu) in Relation to Diabetes Management and Antioxidant Indices in Diabetic Rats. *Biol. Trace Elem. Res* (2016) 174: 158–165.
- Kumar G, Kumar R, Badere R, Singh SB. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extracts from trans Himalayan medicinal plants. *Pharmacogn. J* (2010) 2: 66–69.
- Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn. Rev* (2011) 5: 19–29.
- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* (2004) 84: 329–339.
- Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacije. Zagreb, Tehnička knjiga (2005) str. 270, 341–342, 343, 379–380, 399.
- Kwon Y-II, Vatter DA, Shetty K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pac. J. Clin. Nutr* (2006) 15: 107–118.
- Lachenmeier DW. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.)—A curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? *J. Ethnopharmacol* (2010) 131: 224–227.
- Lash LH. Mitochondrial Glutathione in Diabetic Nephropathy. *J. Clin. Med* (2015) 4: 1428–1447.
- Lee WJ, Choi SW. Quantitative changes of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves in relation to varieties, harvest period, and heat processing. *Prev. Nutr. Food Sci* (2012) 17: 280–285.

- Leitão F, Leitão SG, de Almeida MZ, Cantos J, Coelho T, da Silva PEA. Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. *J. Ethnopharmacol* (2013) 149: 513–521.
- Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem* (2011) 125: 288–306.
- Lewicki S, Zdanowski R, Krzyżowska M, Lewicka A, Dębski B, Niemcewicz M, Goniewicz M. The role of Chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* (2014) 21: 331–335.
- Li YQ, Zhou FC, Gao F, Bian JS, Shan F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase. *J. Agric. Food Chem* (2009) 57: 11463–11468.
- Liu G, Sun L, Pan A, Zhu M, Li Z, Zhenzhen WZ, Liu X, Ye X, Li H, Zheng H, Ong CN, Yin H, Lin X, Chen Y. Nickel exposure is associated with the prevalence of type 2 diabetes in Chinese adults. *Int. J. Epidemiol* (2015) 44: 240–248.
- Loizzo MR, Pugliese A, Bonesi M, Tenuta MC, Menichini F, Xiao J, Tundis R. Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties. *J. Agric. Food Chem* (2016) 64: 2467–2474.
- Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Piccolo V, Statti GA, De Cindio B, Houghton PJ, Menichini F. In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J. Ethnopharmacol* (2008) 119: 109–116.
- López-García J, Kuceková Z, Humpolíček P, Mlček J, Sába P. Polyphenolic extracts of edible flowers incorporated onto atelocollagen matrices and their effect on cell viability. *Mol. Basel Switz* (2013) 18: 13435–13445.
- Lugasi A, Hóvári J. Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahr* (2003) 47: 79–86.
- Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Ansaroudi F, Nabavi SF, Nabavi SM. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *Afr. J. Biotechnol* (2009) 8: 7170–7175.
- Malinowska E, Jankowski K. Copper and zinc concentrations of medicinal herbs and soil surrounding ponds on agricultural land. *Landsc. Ecol. Eng* (2007) 13: 183–188.

- Malviya N, Jain S, Malviya S. Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta Pol. Pharm* (2010) 67: 113–118.
- Maurya DK, Devasagayam TPA. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem. Toxicol* (2010) 48: 3369–3373.
- Mekinic IG, Burčul F, Blažević I, Skroza D, Kerum D, Katalinic V. Antioxidative / acetylcholinesterase inhibitory activity of some asteraceae plants. *Nat. Prod. Commun* (2013) 8: 471–474.
- Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* (2013) 2013: 801457.
- Menković N, Šavikin K, Tasić S, Zdunić G, Stešević D, Milosavljević S, Vincek D. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J. Ethnopharmacol* (2011) 133: 97–107.
- Miller AL. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. *Altern Med Rev* (1996) 1: 3–6.
- Millet A, Stintzing F, Merfort I. Flavonol quantification and stability of phenolics in fermented extracts from fresh *Betula pendula* leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal* (2010) 53: 137–144.
- Miyahara C, Miyazawa M, Satoh S, Sakai A, Mizusaki S. Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* (2004) 50: 161–164.
- Mojica L, Meyer A, Berhow MA, De Mejía EG. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Res. Int* (2015) 69: 38–48.
- Moldovan L, Gaspar A, Toma L, Craciunescu O, Saviuc C. Comparison of polyphenolic content and antioxidant capacity of five romanian traditional medicinal plants. *Rev. Chim* (2011) 62: 299–303.
- Moradabadi L, Montasser Kouhsari S, Fehrest Sani M. Hypoglycemic Effects of Three Medicinal Plants in Experimental Diabetes: Inhibition of Rat Intestinal  $\alpha$ -glucosidase and Enhanced Pancreatic Insulin and Cardiac Glut-4 mRNAs Expression. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* (2013) 12: 387–397.

- Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med* (2002) 32: 386–393.
- Nagesh BR. Antioxidant activity of pterocarpin (*Phaseolus vulgaris*) a preliminary assesment of crude extracts. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci* (2012) 3: 271–276.
- Neagu E, Paun G, Radu GL. Chemical composition and antioxidant activity of *Salvia officinalis* concentrated by ultrafiltration. *Romanian Biotechnol. Lett* (2014) 19: 9203–9211.
- Nickavar B, Kamalinejad M, Haj-Yahya M, Shafaghi B. Comparison of the Free Radical Scavenging Activity of Six Iranian *Achillea*. *Species. Pharm. Biol* (2006) 44: 208–212.
- Noda K, Kato E, Kawabata J. Intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in *Achillea millefolium*. *Nat. Prod. Commun* (2017) 12: 1259–1261.
- Nuengchamnong N, Ingkaninan K, Kaewruang W, Wongareonwanakij S, Hongthongdaeng B. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal* (2007) 44: 853–858.
- Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol* (2014) 26: 165–170.
- Park JM, Bong HY, Jeong HI, Kim YK, Kim JY, Kwon O. Postprandial hypoglycemic effect of mulberry leaf in Goto-Kakizaki rats and counterpart control Wistar rats. *Nutr. Res. Pract* (2009) 3: 272–278.
- Pavlić Renar I. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 1. *Medix* (2009) 80/81, 100–106.
- Pieroni A, Giusti ME, Münz H, Lenzarini C, Turković G, Turković A. Ethnobotanical knowledge of the Istro-Romanians of Zejane in Croatia. *Fitoterapia* (2003) 74: 710–719.
- Piljac A, Metelko Ž. Inzulinska terapija u liječenju šećerne bolesti. *Medix* (2009) 80/81, 116–121.
- Plaza M, Batista ÂG, Cazarin CBB, Sandahl M, Turner C, Östman E, Maróstica Júnior MR. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. *Food Chem* (2016) 211: 185–197.

- Poljičanin T, Metelko Ž. Epidemiologija šećerne bolesti u Hrvatskoj i svijetu. *Medix* (2009) 80/81, 82–88.
- Ponikierska A, Gugnacka-Fiedor W, Piwczyński M. Morphological characteristics of *Vaccinium x intermedium* Ruthe. *Dendrobiology* (2004) 51: 59–65.
- Quave CL, Pardo-de-Santayana M, Pieroni A. Medical Ethnobotany in Europe: From Field Ethnography to a More Culturally Sensitive Evidence-Based CAM? *Evid. Based Complement. Alternat. Med* (2012) 2012: 156846.
- Raal A, Boikova T, Püssa T. Content and dynamics of polyphenols in *Betula* spp. Leaves naturally growing in Estonia. *Rec. Nat. Prod* (2015) 9: 41–48.
- Radojković MM, Zeković ZP, Vidović SS, Kočar DD, Mašković PZ. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. *Hem. Ind* (2012) 66: 547–552.
- Rahelić D, Altabas V, Bakula M, Balić S, Balint I, Marković BB, Bičanić N, Bjelinski I, Božikov V, Varžić SC, Car N, Berković MC, Orlić ŽC, Deškin M, Šunić ED, Tomić NG, Goldoni V, Gradišer M, Mahečić DH, Balen MJ, Eržen DJ, Majanović SK, Kokić S, Krnić M, Kruljac I, Liberati-Čižmek A-M, Lukšić M, Marušić S, Matić T, Metelko Ž, Mirošević G, Vrbica SM, Renar IP, Petric D, Prašer M, Prpić-Križevac I, Radman M, Soldo D, Šarić T, Tešanović S, Kurir TT, Wensveen TT, Botica MV, Vrkljan M, Rotkvić VZ, Zorić Č, Krznarić Ž. Croatian guidelines for the pharmacotherapy of type 2 diabetes. *Lijec. Vjesn* (2016) 138: 1–21.
- Rahimi-Madiseh M, Malekpour-Tehrani A, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M2. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pac. J. Trop. Med* (2016) 9: 825–831.
- Ramirez G, Zavala M, Perez J, Zamilpa A. In Vitro Screening of Medicinal Plants Used in Mexico as Antidiabetics with Glucosidase and Lipase Inhibitory Activities. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* (2012) 2012: 701261.
- Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J. Ethnopharmacol* (2003) 87: 241–246.
- Ramu G, Krishnamohan G. Antibacterial and antioxidant activities of two plants from Nilgiris of India. *Int. J. Pharma Bio Sci* (2015) 6: 416–421.

- Ranilla LG, Kwon Y-I, Genovese MI, Lajolo FM, Shetty K. Effect of thermal treatment on phenolic compounds and functionality linked to type 2 diabetes and hypertension management of peruvian and brazilian bean cultivars (*Phaseolus Vulgaris* L.) using In Vitro methods. *J. Food Biochem* (2010) 34: 329–355.
- Ražić S, Onjia A, Đogo S, Slavković L, Popović A. Determination of metal content in some herbal drugs—Empirical and chemometric approach. *Talanta* (2005) 67: 233–239.
- Reimann C, Koller F, Frengstad B, Kashulina G, Niskavaara H, Englmaier P. Comparison of the element composition in several plant species and their substrate from a 1 500 000-km<sup>2</sup> area in Northern Europe. *Sci. Total Environ* (2001) 278: 87–112.
- Rizvi SMD, Shaikh S, Waseem SMA, Shakil S, Abuzenadah AM, Biswas D, Tabrez S, Ashraf GM, Kamal MA. Role of anti-diabetic drugs as therapeutic agents in alzheimer's disease. *EXCLI J* (2015) 14: 684–696.
- Sahin S, Aybastier O, Işık E. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. *Food Chem* (2013) 141: 1361–1368.
- Salamon I, Labun P, Petruska P. Occurrence of heavy metals, radioactivity, and pesticide residues in raw materials of elderberry and other herbs and fruits in Slovak Republic. *Acta Horti* (2015) 1061: 259–266.
- Saleem ZM, Salman A, Mohtasheem. *Phaseolus vulgaris* linn.: botany, medicinal uses, phytochemistry and pharmacology. *World Journal of Pharmaceutical Research* (2016) 5.
- Sažetak opisa svojstva lijeka (Aglurab), (2017), <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>, pristupljeno 17.06.2017
- Saso L, Firuzi O. Pharmacological applications of antioxidants: Lights and shadows. *Curr. Drug Targets* (2014) 15: 1177–1199.
- Schafner W, Hofelfinger B, Ernest B. *Ljekovito bilje - kompendij*. Rijeka, Leo commerce d.o.o. (1999) str. 10, 42, 50, 62, 192, 250, 588.
- Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water, 2015, <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4002>, preuzeto 30.12.2017.

- Sefi M, Fetoui H, Lachkar N, Tahraoui A, Lyoussi B, Boudawara T, Zeghal N. Centaureum erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *J. Ethnopharmacol* (2011) 135: 243–250.
- Shang Y-J, Liu B-Y, Zhao M-M. Details of the antioxidant mechanism of hydroxycinnamic acids. *Czech J. Food Sci* (2015) 33: 210–216.
- Siddiqui K, Bawazeer N, Joy SS. Variation in macro and trace elements in progression of type 2 diabetes. *Scientific World Journal* (2014) 2014: 461591.
- Singh R, Kaur N, Kishore L, Kumar G. Management of diabetic complications: A chemical constituents based approach. *J. Ethnopharmacol* (2013) 150: 51–70.
- Singh S, Gupta AK, Verma A. Review on-natural compounds used for antioxidant activity. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci* (2013) 4: 936–949.
- Singh T, Singh AP. A review on natural products as wood protectant. *Wood Sci. Technol* (2012) 46: 851–870.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* (1998) 299: 152–178.
- Solayman M, Ali Y, Alam F, Islam MA, Alam N, Khalil MI, Gan SH. Polyphenols: Potential future arsenals in the treatment of Diabetes. *Curr. Pharm. Des* (2016) 22: 549–565.
- Soni S, Sahu KR, Dewagan S, Soni Y, Katre S. Medicinal value of [Morus alba] mulberry plant. *Int. Res. J* (2009) II, 449–450.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat. Res* (2005) 579: 200–213.
- Srivastava S, Kapoor R, Thathola A, Srivastava RP. Mulberry (Moms alba) leaves as human food: a new dimension of sericulture. *Int. J. Food Sci. Nutr* (2003) 54: 411–416.
- Stanković N, Mihajilov-Krstev T, Zlatković B, Stankov-Jovanović V, Mitić V, Jović J, Čomić L, Kocić B, Bernstein N. Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula. *NJAS - Wagening. J. Life Sci* (2016) 78: 21–28.



- Stefkov G, Hristovski S, Petreska Stanoeva J, Stefova M, Melovski L, Kulevanova S. Resource assessment and economic potential of bilberries (*Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium uliginosum*) on Osogovo Mtn., R. Macedonia. *Ind. Crops Prod* (2014) 61: 145–150.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, Van H. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* (2005) 365: 1333–1346.
- Sung T-C, Huang J-W, Guo H-R. Association between Arsenic Exposure and Diabetes: A Meta-Analysis. *BioMed Res. Int* (2015) 2015: 368087.
- Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatt-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol* (2011) 133: 1051–1076.
- The Diabetes Atlas 7th ed., (2015), International Diabetes Federation, <http://www.diabetesatlas.org/>, pristupljeno 25. 5. 16.
- The ISE Code of Ethics. *Int. Soc. Ethnobiol*, <http://www.ethnobiology.net/what-we-do/core-programs/ise-ethics-program/code-of-ethics/>, pristupljeno 12. 11. 17.
- Thornberry NA, Gallwitz B. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., Incretins* (2009) 23: 479–486.
- Tibaut M, Petrovič D. Oxidative Stress Genes, Antioxidants and Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem* (2016) 14: 23–38.
- Tiwari AK, Swapna M, Ayesha SB, Zehra A, Agawane SB, Madhusudana K. Identification of proglycemic and antihyperglycemic activity in antioxidant rich fraction of some common food grains. *Int. Food Res. J* (2011) 18: 915–923.
- Trouillas P, Calliste C-A, Allais D-P, Simon A, Marfak A, Delage C, Duroux J-L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem* (2003) 80: 399–407.
- Trumbeckaite S, Benetis R, Bumblauskiene L, Burdulis D, Janulis V, Toleikis A, Viškelis P, Jakštas V. *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. *Food Chem* (2011) 127: 1540–1548.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33), *Lancet Lond. Engl* (1998) 352: 837–853.

- Viapiana A, Wesolowski M. The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Foods Hum. Nutr* (2017) 72: 82–87.
- Vinayagam R, Jayachandran M, Xu B. Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review. *Phytother. Res. PTR* (2016) 30: 184–199.
- Vučić DM, Petković MR, Rodić-Grabovac BB, Stefanović OD, Vasić SM, Čomić LR. Antibacterial and antioxidant activities of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro. *Afr. J. Microbiol. Res* (2013) 7: 5130–5136.
- Wang W, Zu Y, Fu Y, Efferth T. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Extracts from *Morus alba* L. Leaves, Stems and Fruits. *Am. J. Chin. Med.* (2012) 40: 349–356.
- What is diabetes, (2017), <https://www.idf.org/about-diabetes/what-is-diabetes.html>, pristupljeno 15.06.2017.
- WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues, (2007), <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14878e/s14878e.pdf>, pristupljeno 15.06.2017.
- WHO Traditional Medicine Strategy 2014–2023, (2013), [http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm\\_strategy14\\_23/en/](http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/), pristupljeno 15. 06. 2017.
- Wichtl M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, 3rd ed. Medpharm Stuttgart: Boca Raton, FL,USA (2004) str. 61, 87–89, 125, 400–401, 407–408, 451–452, 539–541, 546–547.
- Willfort R. *Ljekovito bilje i njegova upotreba*. Zagreb, Izdavačko knjižarsko poduzeće Mladost (1974) str. 27, 75, 98–99, 124–125, 341–342, 344–345, 396.
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med* (2004) 36: 838–849.
- Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res* (1998) 37: 99–105.
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* (2007) 105: 940–949.
- Yen G-C, Chen H-Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem* (1995) 43: 27–32.

Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci. Hum. Wellness* (2014) 3: 136–174.

Zengin G, Mollica A, Aktumsek A, Marie Nancy Picot C, Fawzi Mahomoodally M. In vitro and in silico insights of *Cupressus sempervirens*, *Artemisia absinthium* and *Lippia triphylla*: Bridging traditional knowledge and scientific validation. *Eur. J. Integr. Med* (2017) 12: 135–141.

## **7. ŽIVOTOPIS**

Kristina Bljajić rođena je 6. travnja, 1980. u Slavonskom Brodu. Nakon završene osnovne škole upisuje matematičku gimnaziju te maturira 1998. godine. Iste godine upisuje studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Diplomirala je 2003. godine. Odradila je staž u ljekarni te 2005. g. položila stručni ispit za magistre farmacije pred stručnim povjerenstvom Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH. Nakon položenoga državnog ispita, nastavlja rad u ZU Ljekarnama Dvoržak do 2010. Godine, kada prelazi u ljekarnički sustav Atlantic grupe.

Bila je članica Izvršnog odbora Sekcije farmaceuta juniora Hrvatskog farmaceutskog društva od njezina ponovnog aktiviranja 2005. godine, dok 2008. godine postaje predsjednikom sekcije čiji rad vodi do 2014. S posterima i usmenim priopćenjima sudjelovala je na pet kongresa te objavila dva znanstvena i dva stručna rada.

Objavljeni znanstveni radovi u međunarodnim časopisima indeksiranim u CC-u

Bljajić K, Petlevski R, Vujić L, Čačić A, Šoštarić N, Jablan J, Saraiva de Carvalho I, Zovko Končić M. Chemical Composition, Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibiting Activities of the Aqueous and Hydroethanolic Extracts of *Vaccinium myrtillus* Leaves. *Molecules*, 2017, 5; 703 – 717.

Bljajić K, Šoštarić N, Petlevski R, Vujić L, Brajković A, Fumić B, Saraiva de Carvalho I, Zovko Končić M. Effect of *Betula pendula* Leaf Extract on alpha-Glucosidase and Glutathione Level in Glucose-Induced Oxidative Stress. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*, 2016, 2016, 8429398-1.

Objavljeni stručni radovi

Sertić, M., Buhač, T., Gašpar. K. Prehlada i gripa – simptomi, prevencija i liječenje. *Farm. glasnik*, 2012, 68: 17-30.

Sertić, M., Buhač, T., Gašpar. K. Peludne alergije. *Farm. glasnik*, 2012, 68: 467-482.

## **8. PRILOG**

PRILOG 1. Pitanja korištena u razgovorima s travarima

DOB ISPITANIKA	
SPOL ISPITANIKA	
KOLIKO SE DUGO BAVI PRODAJOM BILJA	
KOLIKO DANA U TJEDNU PRODAJE	
KOLIKO DUGO OSTAJE NA TRŽNICI	
KOLIKO IMA VRSTA U PONUDI KOJE SU a) uzgojene _____% b) ubrane u prirodi od strane prodavača _____% c) ubrane u prirodi od strane pomagača _____%	
KOLIKO ČESTO SE BILJKE SKUPLJAJU S ISTIH LOKACIJA Uvijek 5            4            3            2            1 Ne vodim računa o lokaciji	
U PROSJEKU KOLIKO DUGO PROĐE OD NABAVE DO PRODAJE BILJA Do 1 tjedan _____% Između tjedan i mjesec dana _____% Više od mjesec dana _____% Više od 6 mjeseci _____% Više od godinu dana _____%	
IZVOR ZNANJA O BILJU (za svaku kategoriju ocijeniti iz skale od 10 (sve) 1 (ništa)) a) Drugog travara b) Člana obitelji c) Iskustva prijatelja / poznanika d) Knjige e) Internet f) ostalo (upisati) _____	
PREVLADAVAJU LI U RADU VIŠE a) tradicionalna saznanja b) neka nova c) tradicionalna i nova saznanja	
TKO SU KUPCI (približno u postocima)	
0-20 godina _____% 20-40 godina _____% 40-60 godina _____% Više od 60 godina _____%	

Muškarci _____% Žene _____%	
Dolaze najmanje 1 mjesečno _____% Dolaze najmanje jednom u godini dana _____% Novi kupci koje ne poznaje _____%	
<b>UZIMAJU LI KUPCI I TABLETE PROPISANE OD LIJEČNIKA</b> a) od njega traže proizvode za koje uzimaju i redovitu terapiju _____%  b) od njega traže proizvode za bolesti za koje ne uzimaju nikakvu terapiju iako su zbog nje bili kod liječnika i imaju dijagnozu _____%  c) od njega traže proizvode za oboljenja za koja još nisu posjetili liječnika _____%	



## BILJNE VRSTE S ANTIDIJABETIČKIM UČINKOM

Lokacija

Datum

Naziv biljke (narodni ili / i latinski)	Organ biljke	Uzgoj (U) ili priroda (P)	Kombinira se s kojim biljkama	Upute za pripremu čaja	Način uzimanja Koliko puta dnevno Koliko pripravka Koliko dugo

Biljke koje koriste, ali sada nema u ponudi:

Naziv biljke (narodni ili / i latinski)	Organ biljke	Uzgoj (U) ili priroda (P)	Kombinira se s kojim biljkama	Upute za pripremu čaja	Način uzimanja Koliko puta dnevno Koliko pripravka Koliko dugo

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmakognoziju  
Marulićev trg 20, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

### FITOKEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI UČINCI BILJNIH ANTIDIJABETIKA HRVATSKE ETNOMEDICINE

Kristina Bljajić

#### SAŽETAK

Dijabetes je rastući zdravstveni problem u razvijenom svijetu. Brojni oboljeli uz konvencionalne lijekove koji učinkovito snižavaju razinu šećera u krvi koriste i fitoterapijske pripravke. Njih, osim u ljekarni, nerijetko nabavljaju na tržnicama. U ovom radu je provedeno istraživanje biljnih vrsta koji se koriste kao antidijabetici u hrvatskoj etnomedicini: zelen stolisnika (*Achillea millefolium*), pelina (*Artemisia absinthium*) i kičice (*Centaureum erythraea*), zatim listovi breze (*Betula pendula*), bijelog duda (*Morus alba*), kadulje (*Salvia officinalis*) i borovnice (*Vaccinium myrtillus*), ljuski graha (*Phaseolus vulgaris*) te cvijeta bazge (*Sambucus nigra*). U biljnom materijalu je određena količina metala koji bi mogli pozitivno utjecati na tijek dijabetičkih promjena kao i teških metala. Određena je i uspoređena količina različitih skupina biljnih polifenola u vodenim i etanolnim ekstraktima, njihova antioksidativna aktivnost te inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Istraživanja su pokazala da su ispitivani ekstrakti bogati različitim vrstama polifenolnih spojeva, pri čemu su najzastupljeniji bili derivati kvercetina i kavene kiseline. Ekstrakti lista breze i lista borovnice inhibirali su enzim  $\alpha$ -glukozidazu u jednakoj mjeri kao akarboza. Navedeni su ekstrakti pokazali i potencijal da u hiperglikemijskim uvjetima vrate koncentraciju reduciranog glutaciona na onu koja je u Hep G2 stanicama prisutna u normoglikemijskim uvjetima. Navedeno ukazuje na značajan antidijabetički potencijal odabranih biljnih vrsta koje se u hrvatskoj etnomedicini koriste kao komplementarna terapija dijabetesa.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 123 stranica, 29 grafičkih prikaza, 10 tablica i 190 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: antioksidativna aktivnost, inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze, glutation, polifenoli, teški metali

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Miranda Sertić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Mirko Hadžija**, znanstveni savjetnik, Institut „Ruđer Bošković“.

Rad prihvaćen: veljača 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

### PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CROATIAN ETHNOMEDICINE ANTIDIABETICS

**Kristina Bljajić**

#### SUMMARY

Diabetes is a chronic disease with growing prevalence worldwide. In addition to conventional therapy, many patients use phytotherapeutic preparations for the management of diabetes. Besides in pharmacies, those products are often purchased in city markets. In this work, a comprehensive study of the herbal drugs used as antidiabetics in Croatian ethnomedicine was performed. The study included areal parts of yarrow (*Achillea millefolium*), wormwood (*Artemisia absinthium*) and common centaury (*Centaureum erythraea*), leaves of silver birch (*Betula pendula*), white mulberry (*Morus alba*), sage (*Salvia officinalis*) and bilberry (*Vaccinium myrtillus*), as well as hulls of beans (*Phaseolus vulgaris*) and elder flower (*Sambucus nigra*). The content of metals potentially useful in therapy of diabetes, as well the content of heavy metals was assessed. Plant material was extracted by ultrasonication using water and 80% ethanol as solvent. The content of different plant phenolics in the extracts, their antioxidant activity, as well as their ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase, was assessed. The results have shown that the extracts are rich in different plant polyphenols, especially in derivatives of quercetine and caffeic acid. The extracts of birch and bilberry leaf inhibited  $\alpha$ -glucosidase statistically equal to acarbose. Furthermore, they were able to normalize the reduced glutathione concentration in Hep G2 cells subjected to glucose-induced oxidative stress. All the above indicates a significant potential of the selected plant species as complementary therapy of diabetes.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 123 pages, 29 figures, 10 tables and 190 references. Original is in Croatian language.

Keywords:  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, antioxidant activity, glutathione, polyphenols, heavy metals

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Miranda Sertić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mirko Hadžija, Ph.D.** senior research scientist Institut „Ruđer Bošković“

The thesis was accepted: February 2018.