

Dugoročni učinak ekstrakta američkog ginsenga (*Panax quinquefolius* L.) na regulaciju glikemije u bolesnika s tipom 2 šećerne bolesti

Mucalo, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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:163:397149>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

IVA MUCALO

**DUGOROČNI UČINAK EKSTRAKTA AMERIČKOG
GINSENGA (*PANAX QUINQUEFOLIUS* L.) NA
REGULACIJU GLIKEMIJE U BOLESNIKA S TIPOM 2
ŠEĆERNE BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

IVA MUCALO

**LONGTERM EFFECT OF AMERICAN GINSENG
EXTRACT (*PANAX QUINQUEFOLIUS* L.) ON
GLYCEMIC CONTROL IN TYPE 2 DIABETIC
PATIENTS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

IVA MUCALO

**DUGOROČNI UČINAK EKSTRAKTA AMERIČKOG
GINSENGA (*PANAX QUINQUEFOLIUS* L.) NA
REGULACIJU GLIKEMIJE U BOLESNIKA S TIPOM 2
ŠEĆERNE BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Velimir Božikov

Doc. dr. sc. Dario Rahelić

Zagreb, 2014.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

IVA MUCALO

**LONGTERM EFFECT OF AMERICAN GINSENG
EXTRACT (*PANAX QUINQUEFOLIUS* L.) ON
GLYCEMIC CONTROL IN TYPE 2 DIABETIC
PATIENTS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Professor Velimir Božikov, Ph.D.
Assistant Professor Dario Rahelić, Ph.D.

Zagreb, 2014

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

Rad je izrađen na Zavodu za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničke bolnice Dubrava, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u sklopu projekta “ Učinci mediteranske (dalmatinske) prehrane na tijek metaboličkog sindroma” Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske (006-0000000-3521).

Zahvale:

Zahvaljujem mentorima prof. dr. sc. Velimiru Božikovu i doc. dr. sc. Dariu Raheliću na stručnoj pomoći, podršci i poticaju pri izradi ove doktorske disertacije.

Najiskrenije zahvale prof. dr. sc. Vladimiru Vuksanu i mr. sc. Eleni Jovanovski na svim savjetima, idejama, znanstvenim raspravama i znanju koje su mi prenijeli.

Najiskrenije zahvaljujem prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na savjetima pri pisanju te na nesebičnoj potpori i podršci.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Jerki Dumić i doc. dr. sc. Lidiji Bach-Royecki na savjetima pri pisanju ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Dariu Raheliću i med. sestri Olgi Cvetko na nesebičnoj pomoći prilikom kliničke obrade ispitanika.

Svim djelatnicima Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma te Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava zahvaljujem se na pomoći i susretljivosti.

Zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno svom suprugu na bezrezervnoj ljubavi i podršci.

SAŽETAK

Pandemijski razmjeri šećerne bolesti u kombinaciji s učestalim neuspjehom primarne terapije, uvjerljivi su razlozi za uvođenje boljih strategija prevencije i liječenja. Regulacija glikemije u bolesnika sa šećernom bolešću usprkos terapiji s vremenom se pogoršava te je potrebno uvođenje dodatne terapije da bi se barem spriječio daljnji napredak bolesti. Stoga su danas brojna istraživanja usmjerena na pronalaženje učinkovitije terapije za liječenje šećerne bolesti tipa 2 (ŠBT2), što uključuje ne samo ispitivanje farmakoterapijskih mogućnosti, već i dodataka prehrani koji bi mogli služiti kao dopuna konvencionalnoj terapiji. Dosadašnja klinička istraživanja upućuju na zaključak da američki ginseng (AG) pridonosi regulaciji glikemije na način da, slično djelovanju derivata sulfonilureje, povećava postprandijalnu koncentraciju inzulina u serumu. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati učinkovitost i sigurnost odabranog ekstrakta američkog ginsenga kao dopune uobičajenoj terapiji ŠBT2 (prehrana i/ili lijekovi), koristeći randomizirani, dvostruko-slijepi, placebo-kontrolirani, paralelni dizajn studije i posljedično pridonijeti razumijevanju predloženog mehanizma djelovanja ekstrakta američkog ginsenga u regulaciji glikemije u bolesnika sa ŠBT2. Sedamdeset četiri ispitanika s kontroliranom ŠBT2 (spol: 28 M i 46 Ž; dob: $62,9 \pm 9,49$ godina; ITM: $32 \pm 5,3$ kg/m²; HbA1c: $7,0 \pm 1,3\%$), randomiziranih u intervencijsku (n = 35) ili kontrolnu skupinu (n = 39), završilo je studiju. Svakom je ispitaniku bio dodijeljen ili odabrani preparat AG-a (etanolni ekstrakt korijena) ili placebo koji sadrži pšenične mekinje (2 kapsule od 500 mg po obroku = 3 g dnevno) u razdoblju od 12 tjedana. Ishodi mjerenja uključivali su učinkovitost (hemoglobin A1c (HbA1c)-primarni, koncentracija glukoze u plazmi natašte (GUP-NT), koncentracija inzulina u serumu natašte i model procjene homeostaze (HOMA-IR)); sigurnost primijenjene terapije (jetrena i bubrežna funkcija, koagulacijski parametri, arterijski tlak i arterijska elastičnost) i suradljivost (broj vraćenih kapsula). Među ispitanim skupinama nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima hemoglobina A1c kao primarnog ishoda istraživanja. Ipak, u usporedbi s placeboom, u skupini koja je uzimala AG uočen je silazni trend vrijednosti hemoglobina A1c za 0,84% (P = 0,836) te su ispitanici za vrijeme studije ostali dobro kontrolirani (HbA1c = 7,12%). Odabrani pripravak AG-a također je smanjio koncentraciju GUP-a u plazmi natašte za 4,42%, koncentraciju inzulina u serumu natašte za 11,54% i vrijednosti HOMA-IR indeksa za 18,84%, bez statistički značajne razlike među uspoređivanim skupinama (P = 0,947, P = 0,373, P = 0,489, za svaki pojedinačno). Razlika početnih i krajnjih vrijednosti vaskularnih pokazatelja između dviju skupina, i to sistoličkog arterijskog tlaka (SAT) i augmentacijskog

indeksa (AI), bila je statistički značajna. U usporedbi s placebo, AG u primijenjenoj dozi značajno je smanjio radijalni AI za 5,25% ($P = 0,041$) i SAT za 11,72% ($P < 0,001$), dok je izostao učinak na dijastolički arterijski tlak. Ishodi sigurnosti i suradljivosti ostali su također nepromijenjeni. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da nakon 12 tjedana suplementacije ekstrakt AG-a, iako ne smanjuje vrijednost HbA1c, održava zadovoljavajuću kontrolu glikemije u bolesnika s reguliranom ŠBT2, bez nuspojava.

Ključne riječi: američki ginseng, šećerna bolest tipa 2, kontrola glikemije, inzulinska osjetljivost

SUMMARY

A growing worldwide epidemic of diabetes combined with the frequent failure of primary drug treatment in the majority of patients, make a compelling argument for better prevention and treatment strategies. Since glycemic control tends to worsen over time and additional medications are required to maintain the status quo, new, safe and effective treatments are of a great interest. Therefore, numerous research studies are by and large focused on finding more efficient therapy, both new medicines for treating type 2 diabetes, as well as supplements that could serve as an addition to conventional treatment modalities. According to previous clinical studies it has been suggested that American ginseng (AG) is effective in improving glycemic control in type 2 diabetes through increasing post-prandial insulin levels, much like the conventional therapy sulphonylurea. The aim of the present study was to test the efficacy and safety of 12 weeks of supplementation with the selected AG extract as an adjunct to usual therapy in people with type 2 diabetes (diet and/or conventional diabetes therapy), using a randomized, double-blind, placebo-controlled design, and subsequently to elucidate the proposed mechanism of action of the American ginseng extract in glucose regulation in type 2 diabetes. Seventy-four participants with well-controlled type 2 diabetes (sex: 28 M and 46 F, age: 62.9 ± 9.49 , BMI: 32 ± 5.3 , HbA1c: 7.0 ± 1.3), randomized to either intervention ($n = 35$) or control ($n = 39$) group, completed the study. Participants were randomly assigned to one of the two interventions and received, prior to each of the main meals, three times daily two 500 mg capsules (total 3g/ day), of either American ginseng extract or identical-appearing placebo capsules containing wheat bran. Outcomes included measures of efficacy (glycated hemoglobin (HbA1c)-primary, fasting plasma glucose (FPG), fasting plasma insulin (FPI), homeostasis model assessment (HOMA-IR)); safety (liver and kidney function, haemostatic function, blood pressure and arterial stiffness); and compliance (returned capsules). There was no change in the primary endpoint, HbA1c, between the treatment and placebo groups. Nevertheless, there was a trend toward lower HbA1c by 0.84% ($P = 0.836$) compared to placebo. Furthermore, the participants remained well-controlled (HbA1c = 7.12%) throughout. The selected AG treatment also decreased FPG, FPI and HOMA-IR by 4.42%, 11.54% and 18.84%, respectively, with no significant between-treatment difference ($P = 0.947$, $P = 0.373$, $P = 0.489$, respectively). Between-treatment end differences of vascular parameters, namely systolic blood pressure (SBP) and augmentation index (AI) were statistically significant. Compared to placebo, 3 g of AG significantly lowered radial AI by 5.3% ($P = 0.041$) and systolic BP by 11.7% ($P < 0.001$)

at 12 weeks. No effect was observed with diastolic BP. Safety and compliance outcomes remained unchanged. The study results indicate that after 12-weeks of supplementation, even though the AG extract did not decrease HbA1c levels, it maintained good glycemic control in patients with well-controlled type 2 diabetes without adverse effects.

Keywords: American ginseng, type 2 diabetes, glycemic control, insulin sensitivity

OBJAŠNJENJA KRATICA, AKRONIMA I TUDICA

AG	američki ginseng
AH	arterijska hipertenzija
AI	augmentacijski indeks
ALT	alanin aminotransferaza
AMPK	adenozin- monofosfat-aktivirana protein kinaza
AST	aspartat aminotransferaza
AT	arterijski tlak
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>Adenosine triphosphate</i>)
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>Area under the curve</i>)
CDA	Kanadsko dijabetološko društvo (engl. <i>Canadian Diabetes Association</i>)
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat
CIGMA	kontinuirana infuzija glukoze s procjenom modela (engl. <i>Continuous infusion of glucose with model assessment</i>)
CRP	C reaktivni protein
DAD	detektor s diodnim nizom (engl. <i>Diode array detector</i>)
DAT	dijastolički arterijski tlak
FSIVGTT	intravenski test tolerancije na glukozu sa sustavnim prikupljanjem uzorka (engl. <i>Frequently sampled intravenous glucose tolerance test</i>)
GLUT	prijenosnik glukoze
GUP	koncentracija glukoze u plazmi
GUP-NT	koncentracija glukoze u plazmi natašte
HbA1c	hemoglobin A1c
HDL	lipoproteini velike gustoće (engl. <i>High-density lipoprotein</i>)
HL	hiperlipidemija
HOMA	model procjene homeostaze (engl. <i>Homeostasis model assessment</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High performance liquid chromatography</i>)
IDF	Međunarodna dijabetička federacija (engl. <i>International Diabetes</i>

	<i>Federation)</i>
IKK β	I κ B kinaza- β
INR	međunarodni normalizirani omjer (engl. <i>International normalized ratio</i>)
IR	inzulinska rezistencija
ITM	indeks tjelesne mase
IVGTT	intravenozni test tolerancije na glukozu (engl. <i>Intravenous glucose tolerance test</i>)
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
KAM	komplementarna i alternativna medicina
Kr	kreatinin
KRG	crvenokorejski ginseng (engl. <i>Korean red ginseng</i>)
LDL	lipoproteini male gustoće (engl. <i>Low-density lipoprotein</i>)
MAP kinaza	mitogenom aktivirana proteinska kinaza
NF- κ B	nuklearni faktor κ B
NMDA	N-metil-D-aspartična kiselina
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitrate-oxide</i>)
NOS	NO-sintaza
oGTT	test oralnog opterećenja glukozom (engl. <i>Oral glucose tolerance test</i>)
OH	oralni hipoglikemici
OS	opseg struka
PI3K	fosfatidil-inozitol-3-kinaza (engl. <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PKA	protein kinaza A
PPAR- γ	receptor za aktivator proliferacije peroksioma-gama (engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
PPD	protopanaksadiol
PPT	protopanaksatriol
PV	protrombinsko vrijeme
QUICKI	kvantitativni indeks inzulinske osjetljivosti (engl. <i>Quantitative insulin sensitivity check index</i>)
SD	standardna devijacija
SAT	sistolčki arterijski tlak

STZ	streptozotocin
SŽB	srčano-žilne bolesti
ŠBT2	šećerna bolest tipa 2
% TM	postotak tjelesne masti
TG	trigliceridi
TP	tlak pulsa (engl. <i>Pulse pressure</i>)

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	ŠEĆERNA BOLEST TIP 2	2
1.1.1	Glukoza kao glavno stanično gorivo	2
1.1.2	Definicija i klasifikacija šećerne bolesti	2
1.1.3	Epidemiologija i značaj šećerne bolesti tipa 2	3
1.1.4	Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2	4
1.1.4.1	Oštećenje funkcije β -stanica gušterače	5
1.1.4.2	Inzulinska rezistencija	8
1.1.4.3	Uloga jetre u homeostazi glukoze u plazmi	13
1.1.4.4	Poremećena funkcija inkretina	14
1.1.5	Ciljne vrijednosti glikemije i pristup liječenju šećerne bolesti tipa 2	15
1.1.6	Komplementarna i alternativna medicina	18
1.2	AMERIČKI GINSENG - <i>PANAX QUINQUEFOLIUS</i> L.	19
1.2.1	Povijesni podaci i farmakoetimologija naziva ginseng	19
1.2.2	Morfološka obilježja vrste <i>Panax quinquefolius</i> L.	20
1.2.3	Biološki aktivne tvari	23
1.2.3.1	Ginsenozidi	23
1.3	TERAPIJSKI POTENCIJAL AMERIČKOG GINSENGA	29
1.3.1	Američki ginseng (<i>Panax quinquefolius</i> L.)	29
1.3.2	Hipoglikemijski učinak američkog ginsenga	30
1.3.2.1	Preklinička istraživanja	30
1.3.2.2	Klinička istraživanja	36
1.3.3	Vaskularni učinci ginsenga	38
1.3.3.1	Preklinička istraživanja	39
1.3.3.2	Klinička istraživanja	40
1.3.4	Nuspojave	41
2	OBRAZLOŽENJE TEME	43
3	MATERIJALI I METODE	46
3.1	MATERIJALI	47
3.1.1	Izrada ekstrakta korijena američkog ginsenga	47
3.1.2	HPLC analiza ginsenozida u korijenu američkog ginsenga	47
3.1.3	Zdravstvena ispravnost biljnog materijala	48
3.2	METODE	49
3.2.1	Dizajn studije	49
3.2.2	Ispitanici	49
3.2.3	Intervencija i tijek istraživanja	52
3.2.4	Laboratorijska mjerenja	53
3.2.5	Procjena vaskularne funkcije	55
3.2.6	Suradljivost pri uzimanju terapije	55
3.2.7	Statistička analiza	56

4	REZULTATI	58
4.1	DEMOGRAFSKA, ANTROPOMETRIJSKA I KLINIČKA OBILJEŽJA ISPITANIKA NA POČETKU STUDIJE	59
4.2	UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA POKAZATELJE GLIKEMIJE	62
4.2.1	Učinak američkog ginsenga na hemoglobin A1c- primarni cilj istraživanja	62
4.2.2	Učinak američkog ginsenga na sekundarne ciljeve istraživanja	66
4.3	UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA LIPIDNI PROFIL.....	69
4.4	UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA SERUMSKU KONCENTRACIJU C- REAKTIVNOG PROTEINA	71
4.5	UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA VASKULARNU FUNKCIJU	72
4.5.1	Učinak američkog ginsenga na arterijski tlak	73
4.5.2	Učinak američkog ginsenga na elastičnost arterijske stijenke mjereno analizom valne refleksije	75
4.6	SIGURNOST	76
4.7	SURADLJIVOST.....	77
5	RASPRAVA.....	79
5.1	UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA POKAZATELJE GLIKEMIJE	80
5.2	UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA LIPIDNI PROFIL.....	85
5.3	UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA VASKULARNU FUNKCIJU	86
5.4	FORMULACIJA GINSENOZIDA.....	88
5.5	OGRANIČENJA STUDIJE	91
6	ZAKLJUČCI	93
7	LITERATURA	96
8	PRILOZI	112
9	ŽIVOTOPIS.....	141
10	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	142

1 UVOD

1.1 ŠEĆERNA BOLEST TIP 2

1.1.1 Glukoza kao glavno stanično gorivo

Među apsorbiranim monosaharidima najobilnija je *glukoza*, koja obično daje 80% energije što potječe od apsorbiranih ugljikohidrata, a nastaje enzimatskim cijepanjem škroba i manje količine glikogena. Pošto se apsorbira u stanice, glukoza se odmah može upotrijebiti za oslobađanje energije ili se može pohraniti u obliku glikogena pri čemu glavna dva skladišna mjesta čine jetrene i mišićne stanice. Prijenos glukoze kroz membrane većine tkivnih stanica odvija se mehanizmom olakšane difuzije, dok se kroz membrane probavnog sustava ili kroz epitel bubrežnih kanalića prenosi aktivno, u kotransportu s natrijem. U sisavaca glukoza je jedino metaboličko gorivo kojim se mozak koristi i jedino gorivo kojim se mogu koristiti eritrociti. Posebno je svojstvo dopreme glukoze neuronima to što njezin prijenos u neurone kroz staničnu membranu ne ovisi o inzulinu. Dva hormona koja su od ključne važnosti u regulaciji metabolizma glukoze su inzulin i glukagon. Inzulin pospešuje prijenos glukoze kroz membranu mišićnih stanica i njezin metabolizam u mišićima te unos pohranu i iskorištavanje glukoze u jetrima, dok je najvažnija funkcija glukagona povećanje koncentracije glukoze u krvi. Normalna koncentracija glukoze u krvi natašte iznosi od 4,4 do 6,4 mmol/L, a inzulina od 6 do 25 μ IU/mL.

1.1.2 Definicija i klasifikacija šećerne bolesti

Šećerna bolest jest heterogena skupina bolesti koja je karakterizirana različitim stupnjevima inzulinske rezistencije, poremećenim djelovanjem i/ili lučenjem inzulina uz povećano stvaranje glukoze u jetri procesom glukoneogeneze te poremećajem inkretina. Prema etiološkoj klasifikaciji razlikujemo: tip 1, tip 2, druge specifične tipove i gestacijsku šećernu bolest (1). Više od 90% bolesnika ima šećernu bolest tipa 2 (ŠBT2), znatno manje njih šećernu bolest tipa 1 (oko 7%), a drugi su tipovi bolesti (uzrokovani genskim poremećajem funkcije β -stanica gušterače i/ili inzulinskog djelovanja, bolestima egzokrinog dijela gušterače, lijekovima, kemikalijama itd.) relativno rijetki i pojavljuju se tek u malog udjela oboljelih (manje od 2%) (1).

1.1.3 Epidemiologija i značaj šećerne bolesti tipa 2

Prevalencija ŠBT2 u cijelom svijetu bilježi dramatičan i neočekivan porast. Prema procjenama Međunarodne dijabetičke federacije (engl. *International Diabetes Federation*) učestalost šećerne bolesti u svijetu 2013. godine iznosila je 8,3%, a u Europi 8,5% u dobnoj skupini 20-79 godina. Krajem 20. stoljeća u svijetu je bilo registrirano oko 150 milijuna bolesnika sa šećernom bolešću, danas ima već 382 milijuna, a do 2035. godine očekuje se da će više od 592 milijuna ljudi imati šećernu bolest (2).

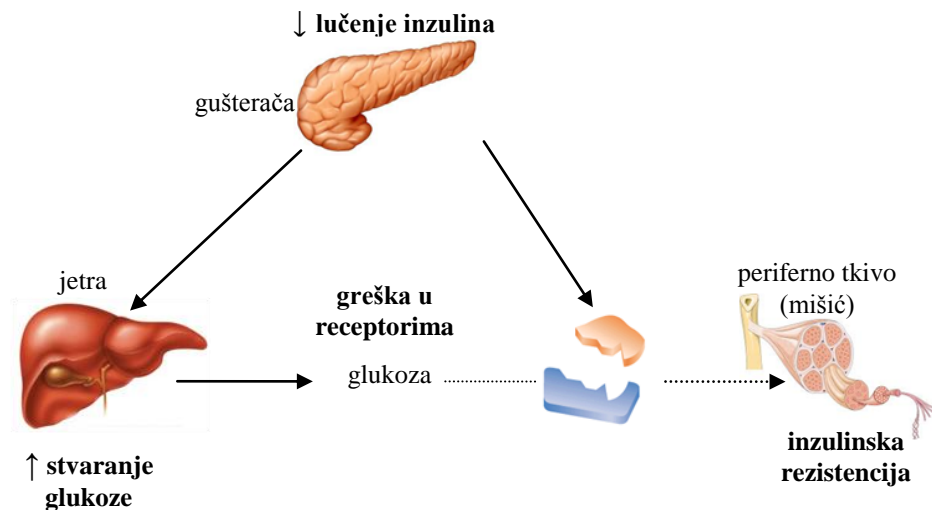
U populacijama bijelaca sa šećernom bolešću udio ŠBT2 iznosi između 85% i 95%, a u populacijama drugih rasa gotovo svi oboljeli imaju ŠBT2. Bolest je najčešća u nekim posebnim populacijama kao što su Indijanci Pima u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i stanovnici mikronezijskog otoka Nauru, gdje oko 35% odraslih starijih od 45 godina boluje od šećerne bolesti (3).

Najveći broj bolesnika sa šećernom bolešću (80%) živi u zemljama u razvoju (uglavnom Indija i Kina) u kojima je dostupnost zdravstvene zaštite i liječenja te skrb općenito puno slabija (4). Sjevernoamerički kontinent bilježi najveću učestalost šećerne bolesti s 11% ili 36,7 milijuna oboljelih u 2013. godini, a do 2035. godine predviđa se porast za 37%, odnosno do 50,4 milijuna oboljelih (2). Epidemiologiju šećerne bolesti posljednjih je desetljeća u Europi obilježio izrazit porast prevalencije uzrokovan ponajprije promjenom načina života većine stanovništva, porastom broja prehranjenih i pretilih osoba te fizičkom neaktivnošću populacije. Europa je tako područje s vrlo visokom prevalencijom šećerne bolesti, a do 2035. godine predviđa se daljnji porast prevalencije od 22% (4). U Republici Hrvatskoj (RH), prema podacima Centralnog zdravstvenog informacijskog sustava (CEZIH), u 2012. godini registrirano je 234.457 punoljetnih osoba s dijagnozom šećerne bolesti (5), dok se procjenjuje da bi još i do 130.000 bolesnika moglo biti neprepoznato.

Velik broj oboljelih i tijek šećerne bolesti obilježen razvojem kroničnih komplikacija razlog su velikog opterećenja zdravstvenog proračuna neposrednim i posrednim troškovima bolesti. Procjenjuje se da je u 2013. godini 11% svjetskog zdravstvenog proračuna utrošeno na liječenje osoba sa šećernom bolešću (2), a do 2030. očekuje se daljnji porast troškova liječenja otprilike za 30-35% (6).

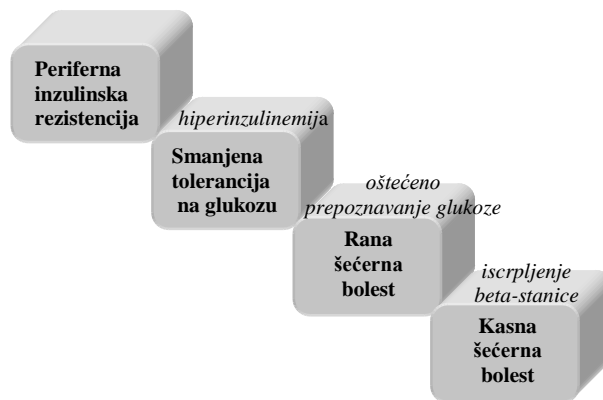
1.1.4 Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2

Šećerna bolest tipa 2 poremećaj je s višestrukom etiološkom pozadinom te nastaje zbog različitih genetskih i vanjskih utjecaja. U patofiziologiji ŠBT2 razlikuje se nekoliko čimbenika odgovornih za nastanak bolesti koju karakterizira relativni nedostatak inzulina, za razliku od tipa 1 koji nastaje zbog apsolutnog nedostatka inzulina. Ti čimbenici su oslabljena funkcija β -stanica, povećano stvaranje i oslobađanje glukoze (glukoneogeneza i glikogenoliza) te smanjena osjetljivost inzulinskih receptora u perifernim tkivima (Slika 1) (7-9). ŠBT2 karakterizirana je i poremećajem funkcije crijevnih hormona inkretina o čemu će kasnije biti riječi.



Slika 1. Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2. Prilagođeno po Vrhovac B. i suradnici. Interna medicina. Četvrto promijenjeno i dopunjeno izdanje. Naklada Ljevak, Zagreb, 2008.

Smanjena mogućnost perifernih tkiva da odgovore na normalnu koncentraciju inzulina stimulira β -stanice Langerhansovih otočića na povećanu proizvodnju inzulina, što rezultira hiperinzulinemijom (7). Stoga, u početku bolesti postoji normalna tolerancija glukoze budući da postoji povećana proizvodnja i lučenje inzulina. Kronična hipersekrecija inzulina može se odvijati sve dok funkcija β -stanica u potpunosti ne zakaže (8-10). S vremenom β -stanice više nisu u mogućnosti održati normalnu sekreciju inzulina (Slika 2). Konačno, kako bolest napreduje β -stanice više nisu u mogućnosti kompenzirati inzulinsku neosjetljivost.



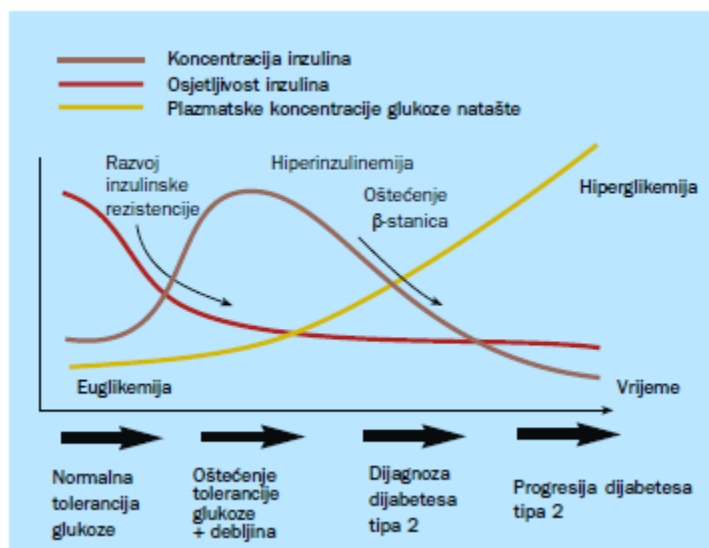
Slika 2. Metaboličke stepenice u tipu 2 šećerne bolesti. Prilagođeno po Vrhovac B. i suradnici. Interna medicina. Četvrto promijenjeno i dopunjeno izdanje. Naklada Ljevak, Zagreb, 2008.

Premda se većina istraživanja slaže da inzulinska rezistencija prethodi poremećaju inzulinske sekrecije i dalje se raspravlja o tome što je primarni poremećaj, inzulinska rezistencija ili disfunkcija β -stanica (11). Longitudinalne studije na određenim populacijama, poput Pima Indijanaca i Meksikanaca, upućuju na činjenicu da je inzulinska rezistencija inicijalni, predominantni poremećaj u nastanku ŠBT2 (12), dok se u nekim drugim populacijama, primarnim poremećajem smatra nedostatak inzulina (13). Dakle, ŠBT2 je heterogeni poremećaj, gdje je u nekih bolesnika primarni poremećaj inzulinska rezistencija, dok je u drugih smanjena inzulinska sekrecija.

1.1.4.1 Oštećenje funkcije β -stanica gušterače

Disfunkcija β -stanica od primarnog je značenja u postupnom nastanku hiperglikemije koja se pojavljuje kada β -stanice gušterače više ne mogu kompenzirati inzulinsku rezistenciju (Slika 3). ŠBT2 dovodi do oštećenja β -stanica endokrinog tkiva gušterače čija je primarna uloga sinteza i lučenje inzulina-anaboličkog hormona odgovornog za stanični utok glukoze i sprečavanje jetrene produkcije glukoze (14). Izlučivanje inzulina najčešće se odvija bazalnom brzinom, no povećava se kao odgovor na porast koncentracije glukoze u krvi (9;15;16). U ŠBT2 razlikuju se dvije vrste oštećenja izlučivanja inzulina iz β -stanica gušterače; u početku bolesti pojavljuje se oštećenje *rane faze inzulinskog odgovora*. Zdrav čovjek u β -stanicama gušterače ima zalihe inzulina koje, neposredno po uzimanju hrane, procesom egzocitoze izlučuju inzulin u krvotok. Rana faza inzulinskog odgovora, koja traje do tridesetak minuta, nužna je za prevladavanje početnog porasta glukoze u plazmi (GUP) i to ponajprije supresijom glukoneogeneze u jetri (9;16). *Kasna faza inzulinskog odgovora* je *de novo* sinteza inzulina. Taj

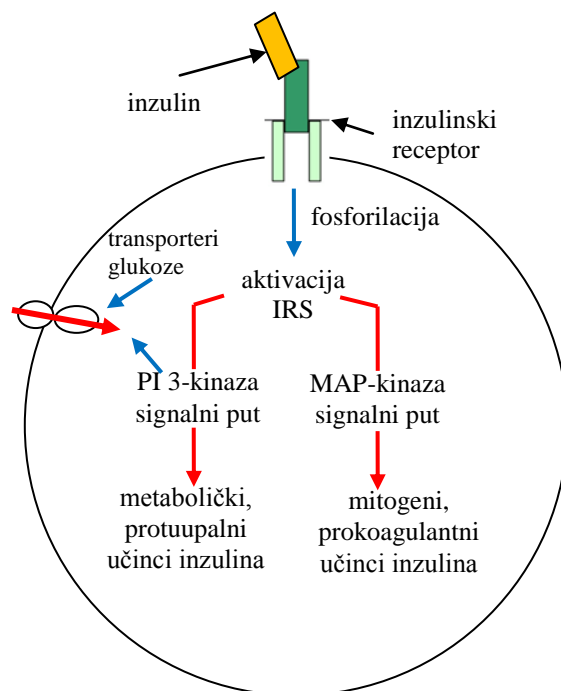
proces traje nekoliko sati. Glavna uloga inzulina u kasnoj fazi je regulacija postprandijalne glikemije. U procesu nastanka ŠBT2 najranije nestane rana faza lučenja inzulina, a potom i kasna faza inzulinskog odgovora. Osobe sa ŠBT2 često imaju hiperinzulinemiju zbog prekomjerne stimulacije β -stanica kao kompenzacije za porast inzulinske rezistencije u perifernim tkivima. Konačno, napredovanje ŠBT2 može dovesti do *glukotoksičnosti* i *lipotoksičnosti* od kojih oboje mogu dodatno oštetiti β -stanice i inducirati apoptozu, vodeći do smanjenja broja β -stanica kao i proizvodnje i izlučivanja inzulina (15;17;18).



Slika 3. Razvoj inzulinske rezistencije i relativno oštećenje sekrecije inzulina vodi u progresiju šećerne bolesti tipa 2. Prilagođeno po DeFronzo i sur. *Diabetes care* 1992 (15) 318-68. Preuzeto iz Zjačić-Rotkvić V. *Racionalno liječenje dijabetesa tipa 2. Medicus*, 2002 (11) 79-85.

Mehanizam djelovanja inzulina

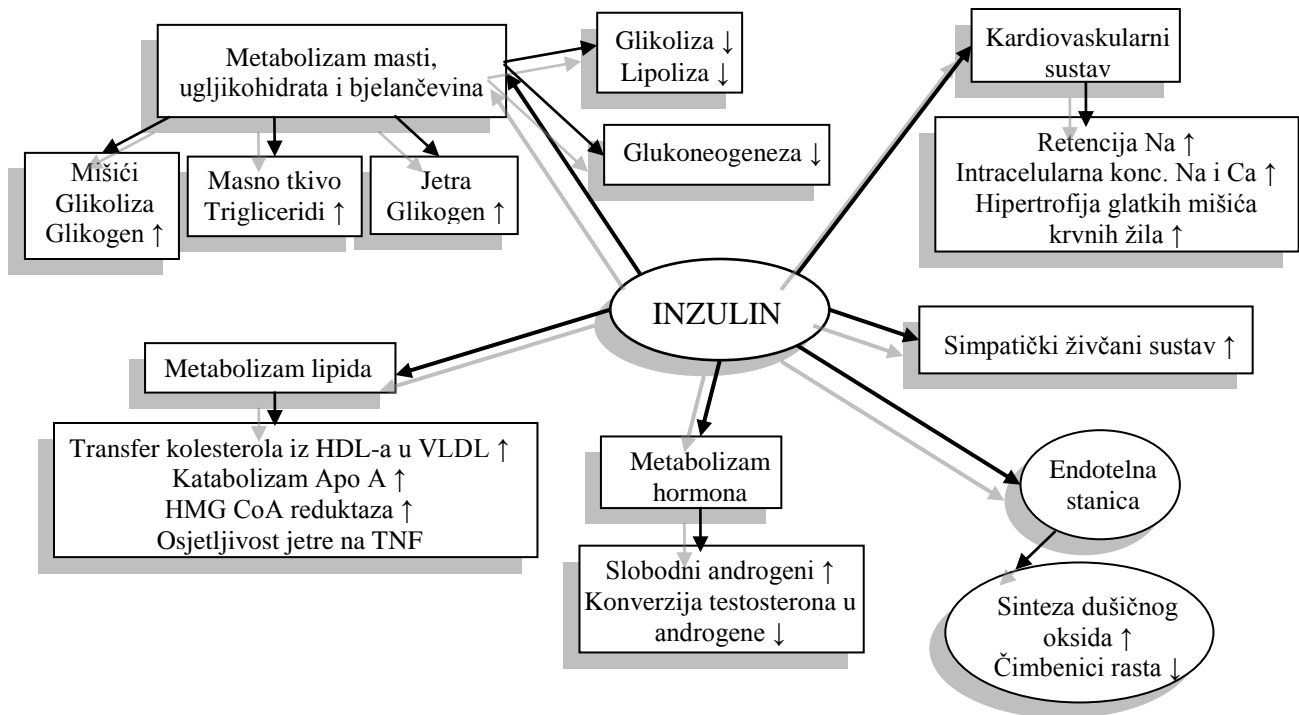
Inzulin se veže na inzulinske receptore koji pripadaju porodici membranskih tirozin-kinaznih receptora na površini stanice te aktivira mrežu višestrukog prijenosa signala uključujući efektorne sustave odgovorne za specifične biološke funkcije. Inzulinski je receptor izgrađen od dvije α i β podjedinice povezane disulfidnim mostom, a nakon aktivacije inzulinom aktivira se kinazna aktivnost citosolnog dijela receptora uslijed čega dolazi do aktivacije kaskade unutarstaničnih proteina (Slika 4). Vežanje inzulina na α -podjedinicu uzrokuje autofosforilaciju β -podjedinica koje imaju tirozin kinaznu aktivnost i odgovorne su za katalitičko djelovanje receptora. Aktivacija receptora uzrokuje fosforilaciju brojnih unutarstaničnih proteina, među kojima su najbolje istraženi inzulinski receptorski supstrati (IRS) 1-4 koji posreduju specifične učinke inzulina u pojedinim tkivima. Sposobnost autofosforilacije inzulinskog receptora i fosforilacije unutarstaničnih supstrata ključan je čimbenik koji generira kompleksne stanične odgovore na inzulin. Fosforilacija inzulinskih receptorskih supstrata u daljnjem slijedu aktivira signalne putove koji posreduju u metaboličkim i mitogenim učincima inzulina (19). Dva su glavna postreceptorska signalna puta. Prvi, koji uključuje fosforilaciju IRS 1 i IRS 2 i aktivaciju fosfatidilinozitol (PI) 3-kinaze, nužan je za nastanak metaboličkih učinaka inzulina te pridonosi i mitogenom učinku. Signalni put PI 3-kinaza regulira glukozne prijenosnike ovisne o inzulinu, putem kojih glukoza ulazi u tkiva (GLUT). Ulazak glukoze u periferna tkiva osjetljiva na inzulin određen je brojem i aktivnošću glukoznih prijenosnika. Prijenosnici su strukturno slični, ali su kodirani različitim genima, pa im je i ekspresija različita ovisno o tkivima i uvjetima. GLUT 2 posreduje utok glukoze u β -stanice gušterače i jetru. GLUT 4 je glavni prijenosnik glukoze u mišiće i masno tkivo, a nalazi se na membrani i u unutarstaničnim vezikulama. Vežanje inzulina na inzulinski receptor na membrani aktivira niz unutarstaničnih signala koji uzrokuju pomak vezikula što sadržavaju GLUT 4, njihovu fuziju s membranom, povećani broj prijenosnika na membrani, a time i povećan ulazak glukoze u stanice. Drugi signalni put uključuje aktivaciju protein kinaze aktivirane mitogenom (MAP) i posreduje samo mitogeni učinak inzulina, rast i proliferaciju stanica i prokoagulantno djelovanje (19;20).



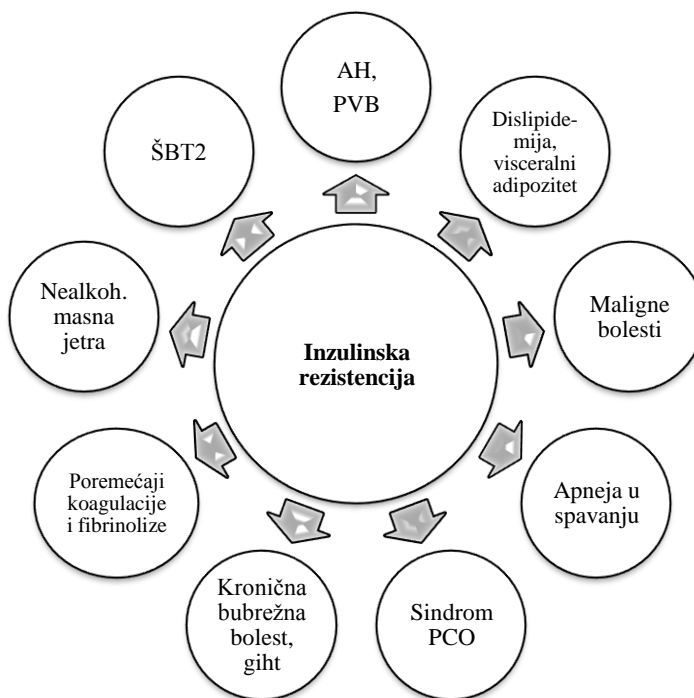
Slika 4. Unutarstanični put inzulina. Prilagođeno po Flakoll PJ i sur. *Physiological action of insulin*. U: LeRoith D, Taylor SI, Olefasky JM, (ur.) *Diabetes Mellitus: A fundamental and clinical text*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2004, p. 165-81.

1.1.4.2 Inzulinska rezistencija

Inzulinska rezistencija (IR) označava stanje u kojem inzulin u fiziološkim koncentracijama ne može ostvariti svoje metaboličke učinke (21;22). On je najsnažniji anabolički hormon u ljudskom organizmu koji regulira metabolizam ugljikohidrata, masti, proteina te koji djeluje na rast (Slika 5), pa iz raznovrsnih učinaka inzulina proizlazi heterogenost patoloških stanja povezanih s inzulinskom rezistencijom (Slika 6). Obvezatno popratno obilježje inzulinske rezistencije je kompenzacijska hiperinzulinemija zbog pojačanog lučenja inzulina iz β -stanica. Glavne značajke inzulinske rezistencije su slabo inhibirana glukoneogeneza u jetri, poremećen utok glukoze u mišiće i slabo inhibirana lipoliza u masnom tkivu (21).



Slika 5. Učinci inzulina u organizmu. Prilagođeno po Smirčić-Duvnjak L. Patofiziologija metaboličkog sindroma. *Medicus*, 2004 (13) 15-25.
 ↑ = stimulira; ↓ = suprimira



Slika 6. Klinička stanja povezana s inzulinskom rezistencijom.
 PCO = policistični jajnici; PVB = periferna vaskularna bolest; AH = arterijska hipertenzija

Uzroci inzulinske rezistencije

Prirođeni ili stečeni čimbenici, ili njihova kombinacija, koji remete bilo koji dio navedenoga fiziološkog procesa, od vezanja inzulina za stanični receptor, preko kompleksne kaskade signalnih putova koji posreduju učinke inzulina u temeljnim metaboličkim procesima, mogu uzrokovati inzulinsku rezistenciju (22). Prirođeni čimbenici uključuju mutacije gena za inzulinski receptor, prijenosnike glukoze i signalne proteine, protutijela na inzulinski receptor, kao i brojna druga, do sada neidentificirana stanja. Među stečenim čimbenicima prepoznati su tjelesna neaktivnost, nezdrava prehrana, starija životna dob, utjecaj nekih lijekova, glukotoksičnost i lipotoksičnost. Osim rijetkih slučajeva postojanja protutijela ili mutacija gena za inzulinski receptor koji uzrokuju poremećaj sinteze, razgradnje i funkcije receptora i uzrok su rijetkih sindroma, inzulinska rezistencija posljedica je poremećaja koji nastaju nakon vezanja inzulina na receptor (20;22;23).

Do sada nije identificiran jedinstveni poremećaj na molekularnoj razini koji bi mogao objasniti sve posljedice inzulinske rezistencije. Opisani su poremećaji aktivnosti tirozin kinaze stimulirane inzulinom i signalnih putova, uključujući inzulinski receptorski supstrat, fosforilaciju i aktivaciju fosfatidilinozitol (PI) 3-kinaze. Delecije u genima koji kodiraju za IRS-1 i IRS-2 uzrokuju inzulinsku rezistenciju na razini skeletnih mišića i jetre te hiperplaziju β -stanica gušterače. Inzulinska rezistencija u mišićima i masnom tkivu posljedica je poremećaja signalnih putova koji reguliraju translokaciju glukoznog prijenosnika ovisnog o inzulinu putem kojeg glukoza ulazi u mišiće (GLUT 4) (20). Glukotoksičnost označava učinak povišene koncentracije glukoze na različita tkiva, poglavito jetru, mišiće i gušteraču. Stanični su mehanizmi dijelom razjašnjeni (24), pa su tako istraživanja na kulturama mišićnih i masnih stanica pokazala da izloženost tih stanica visokoj koncentraciji glukoze uzrokuje smanjenje prijenosa glukoze ovisne o inzulinu u stanice i obrnuto, da niska koncentracija glukoze povećava utok glukoze u stanice. To znači da kronična izloženost hiperglikemiji, neovisno o inzulinu, remeti utok glukoze u stanice. Hiperglikemija aktivira glukozamin 6-fosfatni put, relativno inaktivan put razgradnje glukoze do glukozamin 6-fosfata, u kojem nastaju glikoproteini, glikolipidi i proteoglikani. Ovaj put u normalnim uvjetima čini neznatni dio staničnog metabolizma glukoze, a njegova pojačana aktivacija, zbog sniženja razine ATP-a u stanicama, inhibira prijenos inzulinskog signala, od inzulinskog receptora do prijenosnika glukoze (19). Osim poremećaja djelovanja inzulina, glukozamin može poremetiti i sekreciju inzulina iz β -stanica.

Lipotoksičnost označava učinak povišene koncentracije slobodnih masnih kiselina (SMK) ili povećanog unutarstaničnog sadržaja masti na različita tkiva, poglavito jetru, mišiće i gušteraču. Povećana količina masnih kiselina remeti utok glukoze u stanice inhibicijom signalnih putova inzulina na više razina. SMK inhibiraju ekspresiju gena za GLUT 4 u mišićima i masnom tkivu i pomak vezikula koje sadržavaju GLUT 4 do stanične membrane. Uz to, masne kiseline sprječavaju ugradnju glukoze u glikogen i stimuliraju oslobađanje glukoze iz jetre. Očito je postojanje fiziološke kompeticije između iskorištavanja glukoze i masti kao staničnoga goriva. Oksidacija masti remeti utok i metabolizam glukoze u stanicama, a glukoza inhibira iskorištavanje masti. Metabolizmom glukoze nastaje acetyl CoA, koji se razgrađuje do ugljičnog dioksida i vode i generira nastanak ATP-a oksidativnom fosforilacijom. U stanjima povećane raspoloživosti energijskih supstrata, acetyl CoA se konvertira u malonil CoA, koji predstavlja prvi korak u sintezi masti, a ujedno je i snažan inhibitor unosa masnih kiselina u mitohondrije posredovan nosačima (23-25).

Praćenje prisutnosti i stupnja inzulinske rezistencije

Na prisutnost inzulinske rezistencije može se posumnjati u osoba s obiteljskom anamnezom šećerne bolesti u bliskih rođaka, bolesnica s gestacijskom šećernom bolešću ili sindromom policističnih jajnika, u osoba s oštećenom tolerancijom glukoze, arterijskom hipertenzijom, dislipidemijom, povišenim vrijednostima jetrenih enzima te u pretilih osoba, poglavito onih s abdominalnim tipom pretilosti. S obzirom na to da se inzulinska rezistencija često javlja značajno prije nego što se pojavi ili ustanovi neko od gore spomenutih stanja, identifikacija i liječenje inzulinske rezistencije u općoj populaciji ima veliko preventivno značenje. Postoji nekoliko metoda za praćenje prisutnosti i stupnja inzulinske rezistencije: hiperinzulinemijski euglikemijski klamp (engl. *clamp*), intravenski test tolerancije na glukozu sa sustavnim prikupljanjem uzorka (engl. *frequently sampled intravenous glucose tolerance test-FSIGTT*), kontinuirana infuzija glukoze s procjenom modela (engl. *continuous infusion of glucose with model assessment-CIGMA*) te procjena HOMA-IR modela (engl. *homeostasis model assessment-HOMA*) izvedena iz koncentracija inzulina i glukoze u plazmi natašte. Ipak, klamp tehnika (hiperinzulinemijski euglikemijski klamp i hiperglikemijski klamp) smatra se referentnom tehnikom za određivanje inzulinske osjetljivosti jer se njome direktno mjeri metabolički učinak inzulina u točno zadanim uvjetima. Može se provoditi u euglikemijskim,

hipoglikemijskim i hiperglikemijskim uvjetima. Dok referentne tehnike procjenjuju osjetljivost čitavog organizma na inzulin, inzulinska osjetljivost može se izraziti i alatima koji procjenjuju koliko glukoze mogu prihvatiti i iskoristiti jetra ili periferno tkivo. Matematički modeli poput procjene modela homeostaze i kvantitativnog indeksa provjere inzulinske osjetljivosti (engl. *quantitative insulin sensitivity check index*- QUICKI) koriste serumsku koncentraciju inzulina i koncentraciju glukoze u plazmi natašte za procjenu inzulinske osjetljivosti (26).

HOMA je jednostavna metoda za procjenu funkcije β -stanica gušterače i stupnja inzulinske rezistencije izvedena iz koncentracija inzulina u serumu i koncentracije glukoze u plazmi natašte. Iako se hiperinzulinemijski euglikemijski klamp i hiperglikemijski klamp smatraju „zlatnim standardom“, studije su pokazale odličnu korelaciju između HOMA-indeksa i euglikemijskog klampa. Umnožak bazalne koncentracije glukoze i inzulina podijeljen s 22,5 je HOMA-IR indeks inzulinske rezistencije (26). Povišene vrijednosti HOMA-indeksa biljeg su inzulinske rezistencije i oštećene tolerancije glukoze u bolesnika te pretkazatelj povećanog rizika od nastanka ŠBT2.

$$\text{HOMA - IR} = (\text{FPI (mIU/L)} \times \text{FPG (mM)}) / 22,5$$

FPI – koncentracija inzulina u serumu natašte (engl. *fasting plasma insulin*)

FPG – koncentracija glukoze u plazmi natašte (engl. *fasting plasma glucose*)

Vrijednost 22,5 u nazivniku je normalizirajući faktor; to jest, umnožak normalne vrijednosti inzulina u plazmi natašte od 5 $\mu\text{U/mL}$ i normalne vrijednosti glukoze u plazmi natašte od 4,5 mmol/L koje su tipične za zdravog „normalnog“ pojedinca. Stoga, vrijednosti HOMA-IR indeksa za pojedinca koji ima „normalnu“ inzulinsku osjetljivost iznosi 1.

HOMA model koristi se i za određivanje stupnja funkcionalnosti β -stanica gušterače (27;28):

$$\text{HOMA-IR} - \%B = (20 \times \text{FPI}) / (\text{FPG} - 3,5)$$

$$\%B = \text{HOMA-IR} - (20 \times \text{FPI}) / (\text{FPG} - 3,5)$$

$\%B = \% \text{ funkcionalnih } \beta\text{-stanica gušterače}$

HOMA-B% je mjera aktivnosti β -stanica, a ne pokazatelj koji govori o zdravlju ili bolesti tih stanica.

Stupanj bazalne glikemije određen je kombinacijom inzulinske rezistencije i funkcije beta-stanica. Odnosno, u ŠBT2 bazalna hiperglikemija ovisna je o zatvorenom sustavu povratne sprege između jetre i β -stanica, s posljedičnim održavanjem učinka inzulina u jetri i u perifernim tkivima (27). Na tim pretpostavkama razvijen je matematički model interakcije glukoze i inzulina iz kojeg se može odrediti u kojem stupnju se oni kombiniraju pri malim, srednjim i visokim dozama inzulina. Iz izmjerene koncentracije inzulina i glukoze može se računski ili iz grafikona ustanoviti indeks inzulinske rezistencije i stupanj (%) disfunkcije β -stanica.

Također, česte su i biokemijske metode koje procijenjuju koliko periferno tkivo može prihvatiti i iskoristiti glukoze, poput testa oralnog opterećenja glukozom (engl. *oral glucose tolerance test*-oGTT) (7). Njegova jednostavnost, fiziološka važnost i klinička korist u svrhu određivanja oslabljene tolerancije glukoze i tipa 2 šećerne bolesti razlozi su korištenja ovog testa (7;26;29). oGTT podrazumijeva određivanje koncentracije glukoze u plazmi natašte i glikemijski odgovor na oralnu primjenu 75 g glukoze nakon 2 sata, od kojih su obje dijagnostički kritične točke za procjenu koncentracije glukoze i postavljanju dijagnoze šećerne bolesti (30).

1.1.4.3 Uloga jetre u homeostazi glukoze u plazmi

Koncentracija glukoze u plazmi natašte uvjetovana je stvaranjem i iskorištenjem glukoze (7). U zdravih osoba između obroka, u stanju normoglikemije, jetra su odgovorna za 90% opskrbe glukozom inzulin-osjetljivih i inzulin-neosjetljivih tkiva putem glukoneogeneze i glikogenolize (7;31). Inače, bazalno lučenje inzulina može potisnuti jetreno oslobađanje glukoze za 60-90%, te porast lučenja inzulina provociran obrokom (tzv. postprandijalno lučenje inzulina) dodatno inhibira jetreno oslobađanje glukoze (7;32). Međutim, kod smanjene koncentracije inzulina i inzulinske neosjetljivosti jetreno oslobađanje glukoze se nastavlja rezultirajući hiperglikemijom (7;16). Jetrena proizvodnja glukoze regulirana je ne samo direktnim djelovanjem inzulina na jetru, nego i slobodnim masnim kiselinama i glukagonom-posredovanog djelovanja inzulina (33;34). Što je veći stupanj inzulinske rezistencije, to je viša koncentracija glukoze u plazmi budući da kompenzatorna hiperinzulinemija ne može dugo održavati normalni metabolizam glukoze. Kako se inzulinska sekrecija smanjuje, dolazi do rasta koncentracije SMK u plazmi (35). U pojedinaca s inzulinskom rezistencijom hiperglikemija se javlja kada serumska koncentracija inzulina nije dovoljno visoka da spriječi značajni rast koncentracije SMK (36).

Glukagon, hormon kojeg luče α -stanice gušterače, suzbija učinak inzulina povećavajući koncentraciju glukoze (33). Sprečavanje izlučivanja glukagona i niža koncentracija neesterificiranih masnih kiselina potiskuju jetreno izlučivanje glukoze (33;34;37-39). Zatajivanje normalne funkcije β -stanica pridonosi i poremećaju funkcije α -stanica gušterače što ima za posljedicu hipersekreciju glukagona (normalno je isti inhibiran inzulinom) što uzrokuje prekomjernu jetrenu glukoneogenezu s posljedičnim porastom glikemije natašte i postprandijalne glikemije (14;16;33;34;37-39).

1.1.4.4 Poremećena funkcija inkretina

Nakon unosa hrane iz probavnog sustava oslobađaju se hormoni inkretini. Najviše objavljenih istraživanja upućuje na važnost dva glavna inkretinska hormona, glukagonu sličan peptid-1 (engl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1) i želučani inhibicijski polipeptid (engl. *gastric inhibitory polypeptide*, GIP, poslije nazvan *glucose inhibitory polypeptide*) koji su zajedno odgovorni za tzv. inkretinski učinak (40). U zdravih osoba nakon oralnog unosa glukoze dolazi do značajno većeg lučenja inzulina u odnosu na intravenozno primijenjenu otopinu glukoze. Za razliku od GIP-a, GLP-1 osim što stimulira lučenje inzulina iz β -stanica, povećava biosintezu inzulina, stimulira rast i proliferaciju β -stanica, inhibira sekreciju glukagona, inhibira jetreno stvaranje glukagona, usporava motilitet želuca i utječe na osjećaj sitosti. Djelovanje inkretina ovisi o glikemiji, tako da se u stanju hiperglikemije pojačava njihovo djelovanje, a pri uspostavljanju normoglikemije njihova koncentracija u plazmi se smanjuje, sprječavajući na taj način nastanak hipoglikemije. GLP-1 i GIP imaju važnu ulogu u patogenezi ŠBT2. Inkretinski učinak je značajno smanjen u osoba oboljelih od ŠBT2; u ranoj postprandijalnoj fazi (0-20 min) lučenje inzulina uzrokuju GLP-1 i GIP podjednako, u kasnoj postprandijalnoj fazi (20-120 min) lučenje inzulina uzrokuje samo GLP-1 dok je utjecaj GIP-a oslabljen zbog postreceptorskog poremećaja (41). Za osobe sa ŠBT2 nedostaju dokazi koji bi podržali tvrdnju da je smanjeno lučenje inkretina glavni čimbenik u patofiziologiji nastanka ŠBT2. Umjesto toga, poremećaji u signalnim putovima inkretina te ukupni pad funkcije β -stanica gušterače mogu imati glavni utjecaj na smanjeno djelovanje inkretina kako na β -stanice gušterače tako i na drugim mjestima (40).

1.1.5 Ciljne vrijednosti glikemije i pristup liječenju šećerne bolesti tipa 2

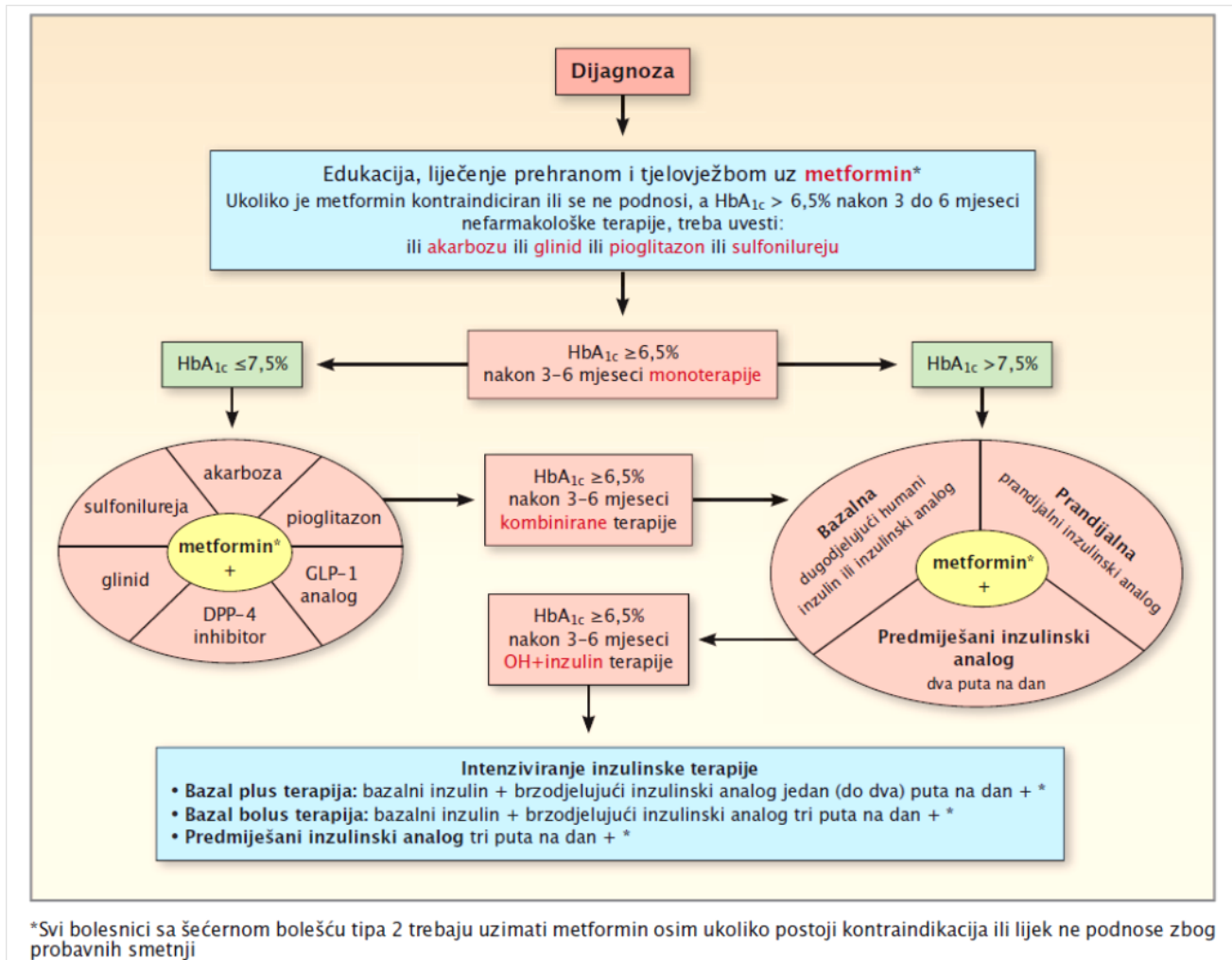
UKPDS studija (engl. *United Kingdom Prospective Diabetes Study*) (42), najveća epidemiološka studija u dijabetologiji koja se provodila između 1977. i 1991. godine, potvrdila je da je smanjenje vrijednosti hemoglobina A1c povezano sa smanjenim rizikom od mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija, pri čemu je najmanji rizik bio u onih s vrijednošću HbA1c manjom od 6,0%. Također, dokazano je da najveći dio troškova medicinske skrbi bolesnika sa ŠBT2 nije povezan s farmakološkom kontrolom glikemije, nego s liječenjem kroničnih komplikacija, tj. dijabetičke nefropatije, retinopatije, neuropatije i ubrzane ateroskleroze (43). Stoga se kao ciljevi liječenja šećerne bolesti sve više ističu postizanje gotovo normalnog glikemijskog profila, tzv. „glukotrijade” (GUP natašte $\leq 6,6$ mmol/L; GUP postprandijalno $\leq 7,8$ mmol/L, HbA1c $\leq 6,5\%$) (44;45). Prema smjernicama Međunarodne dijabetičke federacije, Američkog dijabetološkog društva (engl. *American Diabetes Association*) i Europskog udruženja za istraživanje dijabetesa (engl. *European Association for the Study of Diabetes*) kriteriji za dijagnosticiranje ŠBT2 obuhvaćaju vrijednosti HbA1c $\geq 6,5\%$ ili GUP-NT $\geq 7,0$ mmol/L ili GUP postprandijalno tijekom oGTT-a $\geq 11,1$ mmol/L ili GUP nasumce $\geq 11,1$ mmol/L u bolesnika s klasičnim simptomima hiperglikemije ili hiperglikemijske krize (43).

Osnovni principi liječenja šećerne bolesti jesu pravilna prehrana, svakodnevna tjelovježba i edukacija o terapiji, a za farmakološkim liječenjem poseže se kad osnovni principi ne daju željene rezultate (46). Terapijske mogućnosti u liječenju ŠBT2 su prilagodba životnih navika (tjelovježba i prehrana), oralni hipoglikemici (OH) i inzulini. Otkako su se u posljednje vrijeme pojavili neinzulinski injekcijski lijekovi (analozi i mimetici GLP-1) bolje je govoriti o neinzulinskim lijekovima i inzulinima (47). Shematski prikaz hrvatskih smjernica za liječenje ŠBT2 prikazan je na slici 7. U nastojanjima za postizanjem dobre regulacije šećerne bolesti bolesnici trebaju postupno sve intenzivnije liječenje kako bi se u duljem vremenu održala zadovoljavajuća kontrola glikemije. Nažalost, samo manji broj bolesnika može održati normalnu razinu hemoglobina A1c dijetom i kontroliranom fizičkom aktivnošću; u ostalih se moraju primijeniti neinzulinski lijekovi ili inzulini (46). Neinzulinski lijekovi dostupni za liječenje ŠBT2 uključuju: 1) bigvanide, 2) derivate sulfonilureje, 3) derivate benzojeve kiseline (glinide), 4) inhibitore α -glukozidaze, 5) tiazolidindione, 6) inkretinske mimetike (GLP-1 agonisti i analozi),

7) inhibitore dipeptidilpeptidaze 4 (DPP-4) i 8) inhibitore natrij-glukoza transportera-2 (SGLT2 inhibitore) (47).

Metformin je jedini lijek iz skupine bigvanida. Cjelokupni mehanizam djelovanja bigvanida i dalje je nerazjašnjen, ali njegov primarni učinak smanjuje proizvodnju glukoze u jetri aktivacijom enzima protein-kinaze koju aktivira AMP (engl. *AMP-activated protein kinase*-AMPK). Mogući manje važni mehanizmi djelovanja uključuju smanjenje glukoneogeneze u bubrezima, usporavanje apsorpcije glukoze iz probavnog trakta s povećanom pretvorbom glukoze u laktate u enterocitima, izravnu stimulaciju glikolize u tkivima, povećano uklanjanje glukoze iz krvi i smanjenje razine glukagona u plazmi. Učinkovitost u glukoregulaciji slična je kao i u derivata sulfonilureje (smanjuju HbA1c za 1-2%), bez sklonosti porastu tjelesne mase i s malim rizikom uzrokovanja hipoglikemije (47). Derivati sulfonilureje najstariji su oralni lijekovi za regulaciju glikemije. Primarni način djelovanja derivata sulfonilureja je stimulacija sekrecije inzulina iz β -stanica gušterače, pa se, zajedno s glinidima, svrstavaju u skupinu inzulinskih sekretagoga. Djeluju vezivanjem na receptor koji otvara o ATP-u ovisni K-kanal, što uzrokuje povećanu depolarizaciju stanične membrane i ulaz kalcijevih iona, čime se potiče degranulacija inzulinskih vezikula. Dvije su osnovne nuspojave: hipoglikemija i porast tjelesne težine. Prema kemijskoj strukturi glinidi (u RH registriran repaglinid) vrlo su slični derivatima sulfonilureja, ali se zbog kratkog djelovanja i brze eliminacije primjenjuju ponajprije za sniženje postprandijalne glikemije. Inhibitori α -glukozidaza (u RH registriran akarboza) su pseudooligosaharidi koji se kompetitivno vežu na glukozidaze u tankom crijevu i usporavaju apsorpciju ugljikohidrata. Primarno utječu na smanjenje glikemije nakon obroka. Oni inhibiraju hidrolizu disaharida i oligosaharida u proksimalnom dijelu tankog crijeva, a budući da se ugljikohidrati apsorbiraju više distalno, dolazi do malapsorpcije i smanjenja tjelesne mase, dok porast oslobađanja ugljikohidrata u debelom crijevu dovodi do porasta stvaranja plinova i gastrointestinalnih simptoma. Tiazolidindioni (na tržištu samo pioglitazon), ligandi unutarstaničnog receptora za aktivator proliferacije peroksioma-gama (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR- γ), prvi su lijekovi koji su utjecali na povećanje osjetljivosti na inzulin, ponajprije masnog tkiva. Ne izazivaju hipoglikemiju, a za puni učinak trebaju više vremena (do 6 mjeseci). Dvije su terapijske mogućnosti bazirane na inkretinima: inkretinski analozi i agonisti te inkretinski pojačivači, tvari koje sprječavaju razgradnju endogenih inkretina inhibirajući enzim dipeptidil-peptidazu-4 (DPP-4). Od inkretinskih mimetika u Republici Hrvatskoj su registrirani

eksenatid, liraglutid i liksisenatid koji se primijenjuju subkutano. Inhibicija DPP-4-enzima, kojom se produžuje djelovanje endogenog GLP-1, drugi je princip liječenja temeljen na inkretinskom učinku. Razvijeni su peroralni pripravci inhibitora enzima DPP-4 - gliptini (u RH dostupni sitagliptin, linagliptin, saksagliptin i vildagliptin). Selektivni inhibitori SGLT-2 pokazuju svoju aktivnost u proksimalnom dijelu bubrežnih tubula i odgovorni su za većinu reapsorpcije filtrirane glukoze iz tubularnog lumena. Inhibitori SGLT-2 (u RH registrirani canagliflozin i dapagliflozin) smanjuju razinu reapsorpcije glukoze čime se povećava izlučivanje glukoze urinom. Usprkos brojnih terapijskih mogućnosti niti jedna nije bez svojih ograničenja. Upravo stoga bolesnici se sve više okreću komplementarnoj i alternativnoj medicini (KAM), uglavnom bez prethodnog konzultiranja s liječnikom (48).



Slika 7. Shematski prikaz hrvatskih smjernica za liječenje šećerne bolesti tipa 2. Izvor: Kokić S, Prašek M, Pavlič Renar et.al. Hrvatske smjernice za liječenje šećerne bolesti tipa 2, Medix 2011, Suppl.2.

1.1.6 Komplementarna i alternativna medicina

S obzirom na progresivni tijek šećerne bolesti tipa 2 regulacija glikemije se pogoršava usprkos redovitom uzimanju terapije. Stoga su brojna istraživanja usmjerena na učinkovitije liječenje ŠBT2, kako na nove farmakoterapijske mogućnosti, tako i na primjenu dodataka prehrani. Komplementarna i alternativna medicina obuhvaća širok raspon sustava zdravstvene skrbi i praksi usmjerenih na sprečavanje ili liječenje bolesti. Prema definiciji Nacionalnog centra za komplementarnu i alternativnu medicinu (engl. *National Center for Complementary and Alternative Medicine*), KAM terapije su one terapije koje se ne smatraju dijelom konvencionalne medicine prakticirane od strane liječnika te srodnih zdravstvenih djelatnika (49). Premda ne postoji formalna klasifikacijska shema, KAM prakse mogu se podijeliti u pet glavnih kategorija: prirodni proizvodi (*dodaci prehrani*); medicina duha-tijela (meditacija, akupunktura); manipulativne i tjelesno orjentirane prakse (masaža, kiropraktička manipulacija kralježnice); alternativni medicinski sustavi (homeopatija, naturopatija, tradicionalna kineska medicina); te energetsko liječenje (magnetska terapija, Reiki) (50). Komplementarna medicina označava korištenje ovih praksi zajedno s konvencionalnim metodama liječenja, dok alternativna medicina označava njihovo korištenje umjesto konvencionalne medicine. Integrativna medicina kombinira konvencionalnu medicinu s KAM terapijama dokazane sigurnosti i učinkovitosti.

Proizvodi prirodnog podrijetla uključuju čitav niz pripravaka, poput biljnih pripravaka, vitamina, minerala i probiotika te su često dostupni kao dodaci prehrani. Prema *Pravilniku o dodacima prehrani* Ministarstva zdravlja RH iz 2013. godine dodacima prehrani smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja. Hranjivim tvarima smatraju se vitamini i minerali dok se drugim tvarima smatraju aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, biljne vrste, ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom (51).

Uporaba i interes za dodacima prehrani zadnjih su se desetljeća značajno povećali u općoj populaciji (48;52). U SAD-u je u razdoblju od 1990.-1997. godine zabilježen porast od 68%, s četverostrukim porastom uporabe biljnih pripravaka (48). Nadalje, 2007. godine gotovo 4 od 10 odraslih stanovnika SAD-a koristilo je bar neki od oblika komplementarne i alternativne

medicine u posljednjih 12 mjeseci, pri čemu su najčešće korišteni nevitaminski, nemineralni dodaci prehrani (17,7%), od kojih je ginseng bio peti najčešće korišten biljni pripravak (14,1%) (50). Istraživanjem uporabe pripravaka komplementarne i alternativne medicine među bolesnicima sa ŠBT2 utvrđeno je da jedna trećina sudionika koristi pripravke komplementarne i alternativne medicine (53). Zbog rastuće popularnosti i nedostatka dokaza o sigurnosti i učinkovitosti navedenih pripravaka, istraživanja u ovom području su neophodna (30;48). Temeljem sustavnog pregleda 45 različitih vrsta komplementarne i alternativne medicine korištenih u terapiji ŠBT2 smatra se da su dokazi o učinkovitosti američkog ginsenga najjači (54).

1.2 AMERIČKI GINSENG - *Panax quinquefolius* L.

1.2.1 Povijesni podaci i farmakoetimologija naziva ginseng

Korijen ginsenga (*Panax ginseng* C.A. Meyer), za kojeg se vjeruje da se prvotno koristio u prehranbene svrhe, a koji je cijenjen i zbog svojih ljekovitih svojstava, otkiven je u planinskom području Mandžurije u Kini, gdje se koristi već više od 5000 godina (55). Pouzdani pisani podaci potječu iz 2743. godine prije Krista od legendarnog cara Shen-nunga koji je napisao najstariju farmakopeju Dalekog istoka. U knjizi je opisao 365 lijekova, od kojih je 240 bilo biljnog podrijetla. Ljekovite su biljke svrstane prema svom djelovanju, a u prvoj se skupini i na prvom mjestu navodi upravo ginseng. U vrijeme cara Huang-tija (221. godine prije Krista) počelo se tražiti biljku besmrtnosti, pa su brojne ekspedicije bile razaslane po cijeloj Kini kako bi je pronašle. Među biljkama u koje se polagala velika nada na prvome mjestu bio je ginseng, moguće i zbog izraženog antropomorfog izgleda korijena. Iz 1075. godine potječu podaci da je znameniti liječnik i farmakolog Tung Chi rabio „jen-sheng“ u terapiji dismenoreje, dakle poznao je hormonalno djelovanje ginsenga (56).

Ginseng je dospio na dvor Luja XIV. koji je u Kinu poslao jezuitske misionare da upoznaju tamošnje metode liječenja. Godine 1711. Pariška je akademija od jednog redovnika dobila opširan opis biljke *Panax ginseng*, kao i podatke o načinu pripreme i primjeni ginsengova korijena. Europljani su i američki i kineski ginseng upoznali u 18. stoljeću, ali im sve do sredine

20. stoljeća nisu pridavali veću važnost. Međutim, korijen ginsenga već odavna u kineskoj medicini ima vrlo važnu ulogu i poznat je kao univerzalno sredstvo, afrodisijak i životni eliksir. Smatra se da pojačava sposobnost reakcije i radnu sposobnost (adaptogeno djelovanje), stimulira izmjenu tvari, jača i oporavlja kod umora i nemoći te pomaže kod smanjene radne sposobnosti i koncentracije (56).

Kako sama biljka, tako i ginsengov korijen (*Ginseng radix*) na Dalekom istoku ima različite nazive. U Koreji se ta biljka, odnosno njezin korijen, naziva „korijen života“, a na tržište dolazi pod nazivom „sam“. Kineski nazivi za ginseng su „jen-sheng“ (nebeski korijen), „huang-sheng“ (žuti ginseng/korijen), „hsüeh-shên“ (krvavi/crveni ginseng/korijen), „t'u-ching“ (duh zemlje), „yü-ching“ (duh dragoga kamena). Japanski naziv za ginseng je „ze mind-sin“ ili „nind-sin“, pri čemu drugi naziv u prijevodu znači *prva od biljaka* ili *čudo doline svijeta*. Tibetski je naziv „yung-chin“, a tatarski „orhata“.

Ginseng je biljka koja pripada rodu *Panax* iz porodice Araliaceae, unutar kojeg je do danas identificirano 13 različitih vrsta (57-60). Najpoznatije i najčešće korištene vrste su *Panax ginseng* C.A. Meyer (azijski ili kineski ginseng) i *Panax quinquefolius* L. (američki ginseng) (61). Svaka vrsta ima karakteristična morfološka obilježja i kemijski sastav prema kojima se provodi identifikacija (58). Ruski botaničar Carl Anton von Meyer tim je vrstama dao ime „*Panax*“ 1843. godine u radu objavljenom u časopisu *Bulletin of Physics and Mathematics* (55). Na grčkom „pan“ znači *sve* i „axos“ znači *lijek*, što u cjelini znači „sve-liječiti“. Carl Linnaeus, švedski znanstvenik koji je uveo binomnu nomenklaturu za biljke i životinje, dodijelio je ovom rodu naziv *Panax* jer je bio svjestan njegove široke upotrebe u kineskoj medicini.

1.2.2 Morfološka obilježja vrste *Panax quinquefolius* L.

Vrsta *Panax quinquefolius* je višegodišnja biljka koja može narasti i više od 1 m. Ima uspravnu, tanku i često ispruganu stabljiku. Peteljke listova su tanke i 10 (rjeđe 15) cm duge. Listovi su dlanasto razdijeljeni na 3 do 4 ili 5 (rjeđe 7) liski koje su tanke, do 16 cm duge i 8,5 cm široke, eliptične do naopako jajaste (pri osnovici lista manje i često jajaste), sa šiljastom do zaobljenom osnovicom i zašiljenim vrhom, izrazito i često dvostruko pilastim rubom te peteljčicama dugim do 4,5 cm. Na svakoj lisci vidljiva je glavna žila i 5-9 postranih (Slike 8 i 9). Cvatne stapke su tanke i uspravne, do 10 (rjeđe 30) cm duge, nose štitasti cvat s 15-40

cvjetova. Brakteje su deltaste do suličaste, zašiljene i 2-5 mm duge. Čaške su mesnate, zašiljenih lapova, u vrijeme cvjetanja 2 mm duge i 2 m široke. Latice su duguljaste, bjelkastozelene, kožaste, oko 1,5 mm duge i 1 mm široke. Zreli plodovi su svijetlocrvene, bočno spljoštene koštunice, poprijeko duguljaste, do 7 mm duge i 10 mm široke, uzdužno izbrazdane, sadrže dvije duguljaste sjemenke (Slika 9). Korijen je vretenast, cilindričan ili čunjast, 1-12 cm dug (ponekad i do 20 cm). Izvana je tamno do zlatnožut, s vidljivim poprečnim prugama i mrljama te korjenčićima (Slika 10) (71).



Slika 8. *Panax quinquefolius* L. Izvor: Voss, E. 1985. Michigan flora. Part II. Dicots (Saururaceae-Cornaceae). Bulletin 59. Cranbrook Institute of Science and University of Michigan Herbarium, Ann Arbor, Michigan. 724 pp.



Slika 9. Listovi i plodovi američkog ginsenga (Panax quinquefolius L.). Izvor: Kew Royal Botanical Gardens. Panax quinquefolius (American ginseng). Dostupno na: <http://www.kew.org/plants-fungi/Panax-quinquefolius.htm> (4.12.2013.)



Slika 10. Korijen američkog ginsenga. Izvor: Northeast School of Botanical Medicine. American ginseng. Dostupno na: <http://www.7song.com/photo?photo=768&q=plant&l=Panax-quinquefolius&g=Araliaceae> (4.12.2013.)

1.2.3 Biološki aktivne tvari

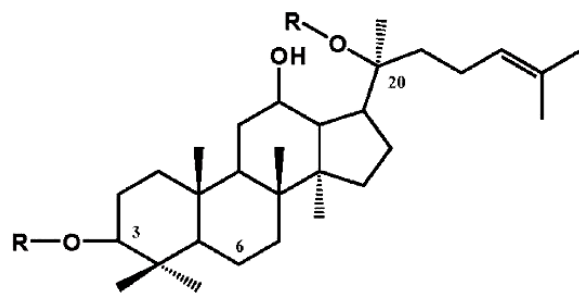
Američki ginseng sadrži brojne biološki aktivne tvari različite kemijske strukture. Osnovne sastavnice su triterpenski saponini nazvani *ginsenosidi*. Kao i u slučaju azijskog/kineskog ginsenga, ginsenosidi iz američkog ginsenga derivati su protopanaksadiola ili protopanaksatriola. Od ostalih izoliranih sastavnica valja spomenuti polisaharide kvinkvefolane, poliacetilene, fenole, flavonoide, aminokiseline, eterično ulje, vitamine i minerale (57).

1.2.3.1 Ginsenosidi

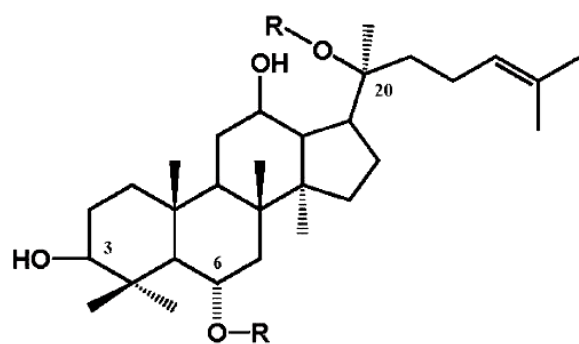
Struktura i nomenklatura ginsenosida

Iz korijena, stabljike, listova i cvjetova ginsenga izolirano je više od 150 ginsenosida (59). To su triterpenski glikozidi koji se klasificiraju prema svojoj aglikonskoj strukturi, sapogeninu, na damaranski ili oleananski tip (55;59). Aglikoni tih glikozida su pretežno damarol, a rjeđe oleanolna kiselina. Ginsenosidi tipa damarana se nadalje dijele na protopanaksadiole (PPD), protopanaksatriole (PPT) ili okotilolne ginsenoside (59). Usprkos velikog broja ginsenosida, samo njih šest iz skupina PPD-a i PPT-a su u središtu istraživanja budući da čine više od 90% ukupnih ginsenosida (62;63). Većina ginsenosida (npr. ginsenosidi Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 i Ro) zajednička je i američkom i azijskom ginsengu, no uz kvantitativne i kvalitativne razlike. Ukupni sadržaj ginsenosida u američkom ginsengu veći je od onog u azijskom ginsengu, dok ginsenosidi Rf i Rg2 nisu prisutni u američkom ginsengu. S druge strane, 24(R)-pseudoginsenosid F11 pronađen je samo u američkom ginsengu (64). Veliki broj ginsenosida proizlazi iz varijabilnosti različitog tipa, broja i mjesta vezivanja šećernih skupina za hidroksilnu grupu aglikonske strukture na ugljiku 3, 6 i 20 (Slika 11) (59;65). Od šećera su dokazane glukoza, arabinoza, ksiloza i ramnoza. Strukture ginsenosida američkog ginsenga - Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 i pseudoginsenosida F11 prikazane su na slici 12. Ginsenosidi se označavaju s Rx, pri čemu „x“ služi razlikovanju ginsenosida putem različitih slova abecede koja mogu biti popraćena i brojčanom oznakom (59). Na početku su bili imenovani ovisno o svojoj polarnosti koja se određivala tankoslojnom kromatografijom. Vrijednosti faktora retencije odgovarale su slijedu na kromatogramu od starta prema frontu, što je označeno abecednim slijedom od a do h (66;67). Međutim, zbog velikog broja do danas otkrivenih ginsenosida, ovaj

način nomenklature je napušten (59). Novije strategije imenovanja ginsenzida mogu uključivati i referiranje na vrstu i dio biljke iz koje su izolirani. Nadalje, nomenklatura se može temeljiti na nizu identifikacije ginsenzida i derivaciji iz ginsenzida sličnih po strukturi, no s razlikama u prepoznatim funkcionalnim skupinama (59;68).

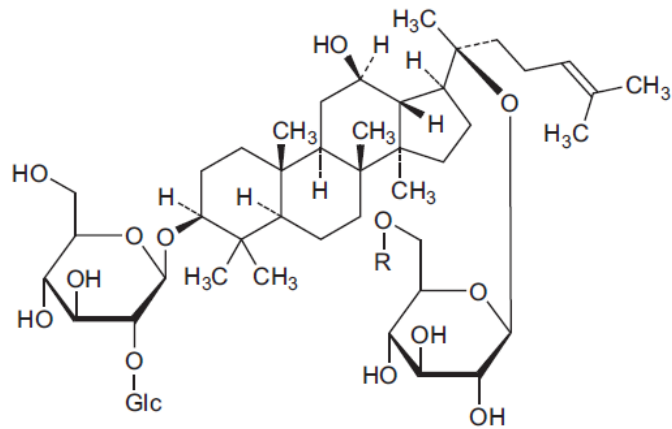
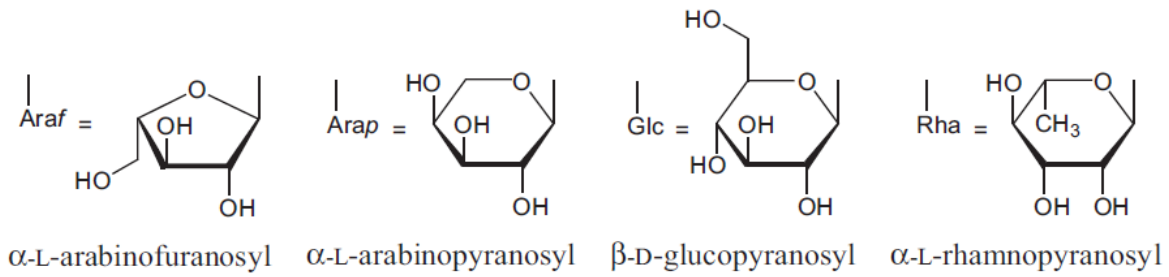


Protopanaksadioli (PPD)



Protopanaksatrioli (PPT)

Slika 11. Dvije glavne vrste ginsenzida u američkom ginsengu. Izvor: World Health Organisation. Radix Panacis Quinquefolii. WHO monographs on selected medicinal plants Volume 4, 2009.

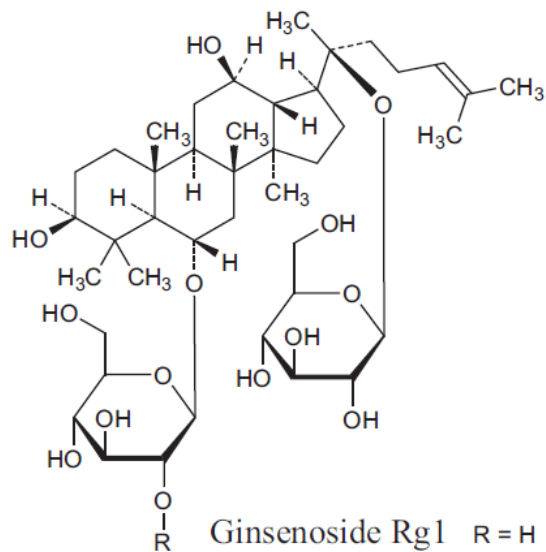


Ginsenoside Rb1 R = Glc

Ginsenoside Rb2 R = Arap

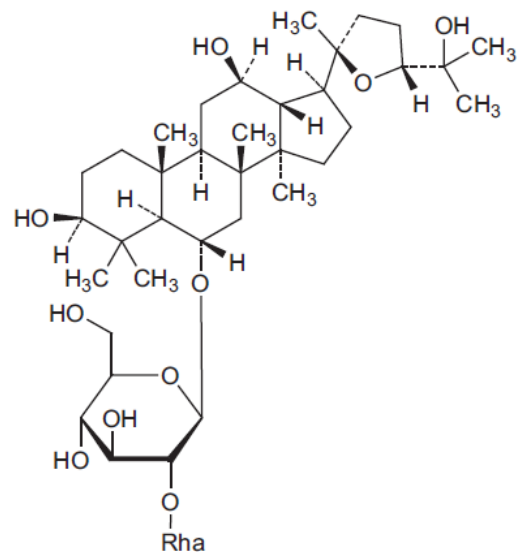
Ginsenoside Rc R = Araf

Ginsenoside Rd R = H



Ginsenoside Rg1 R = H

Ginsenoside Re R = Rha



Pseudoginsenoside F11

Slika 12. Struktura ginsenozida Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 i pseudoginsenozida F11. Izvor: World Health Organisation. Radix Panacis Quinquefolii. WHO monographs on selected medicinal plants Volume 4. 2009.

Biosinteza, metabolizam i produkti razgradnje ginsenožida

Ginsenožidi se sintetiziraju u citosolu biljne stanice izoprenoidnim putem s mevalonskom kiselinom kao prekursorom koja vodi do stvaranja 2,3-oksidoskvalena. Ciklizacijom 2,3-oksidoskvalena stvara se triterpenska osnovica te naknadne reakcije hidroksilacije, oksidacije, supstitucije i glikozilacije vode do stvaranja više od 150 poznatih ginsenožida (59).

Premda nema mnogo studija koje istražuju farmakokinetička i farmakodinamička svojstva ginsenožida, pokazalo se da se ginsenožidi iz PPT skupine najprije hidroliziraju pod utjecajem želučanog pH, dok ginsenožidi iz PPD skupine zaobilaze želučanu probavu (69). Daljnji metabolizam PPD i PPT ginsenožida odvija se putem crijevne mikroflore koja metabolizira ginsenožide do njihovog monoglikoliziranog oblika i hidriranih produkata (69). Na primjer, PPT ginsenožidi mogu se hidrolizom šećernih skupina modificirati ili u Rh₁ i Rg₂ ginsenožide i njihove hidrirane oblike u blago kiselim želučanim uvjetima ili u F₁ ili Rg₁ u slučaju Re ginsenožida pod utjecajem crijevnih bakterija (69;70). S druge strane, čini se da PPD ginsenožidi prolaze vrlo malo promjena u želucu. No, ovi se ginsenožidi mogu stupnjevitom hidrolizom šećernih skupina transformirati u Rd, Rg₃, PPD, ili spoj K pod utjecajem crijevnih bakterija (71).

Vrijeme potrebno za metabolizam ginsenožida varira ovisno o ispitivanom ginsenožidu, što se i pokazalo analizom krvne plazme nakon peroralne primjene kapsule ginsenga. Protopanaksatrioli i njihovi metaboliti počeli su se pojavljivati u plazmi nakon 1-3 sata, dok su se protopanaksadioli i njihovi metaboliti pojavili tek nakon 5,5-8 sati (69). Ginsenožidi se u plazmi nisu mogli detektirati nakon 12 sati i bioraspoloživost mono- i deglikoliziranih ginsenožida bila je veća od bioraspoloživosti intaktnih ginsenožida (59;69). Analizom urina je otkriveno da su se PPD-i i PPT-i, koji nakon nekoliko prvih sati nisu bili identificirani u krvnoj plazmi, počeli pojavljivati u urinu 0 do 3 sata nakon što je uzeta kapsula, što ukazuje da su se apsorbirali, metabolizirali, distribuirali i izlučili relativno brzo. Cjelokupna eliminacija metabolita ginsenožida dogodila se unutar jednog dana budući da se metaboliti ginsenožida nisu mogli detektirati u urinu 24 sata nakon uzimanja kapsule (69). Ipak, u obzir se moraju uzeti veličina uzorka, ograničenja instrumenata koji su se koristili u analizama kao i ograničenja studije te u skladu s time interpretirani rezultati.

*Varijabilnost sastava ginsenzida u vrstama roda *Panax**

Varijabilnost u sastavu ginsenzida utvrđena je između i unutar različitih vrsta ginsenga te ima važnu ulogu u njihovoj identifikaciji. Razlike među vrstama ginsenga uključuju: sastav ginsenzida (72); izostanak nekih vrsta ginsenzida u pojedinim vrstama, primjerice američki ginseng ne sadrži ginsenzid Rf (73;74) i Rg₂ (73); omjere udjela pojedinih ginsenzida (75); prisutnost specifičnih ginsenzida koji su svojstveni samo određenim vrstama ginsenga (76). Razlike u sastavu ginsenzida unutar iste biljne vrste moguće su između samoniklih i uzgojenih uzoraka (77), uzoraka s različitih staništa, pojedinih organa iste biljke (78), različitih dijelova korijena (79) ili uzoraka različite starosti, a najveće su razlike ustanovljene između četvrte i šeste godine uzgoja (80).

Razlike između i unutar različitih vrsta ginsenga pridonose visokom stupnju varijabilnosti ginsenzida te posljedično i farmakoloških učinaka komercijalnih proizvoda ginsenga (81). Neodgovarajuća standardizacija ginsenzida ključan je problem i predstavlja prepreku učinkovitoj i sigurnoj primjeni tih proizvoda (81-87).

1.3 TERAPIJSKI POTENCIJAL AMERIČKOG GINSENGA

1.3.1 Američki ginseng (*Panax quinquefolius* L.)

Od ukupno 13 poznatih vrsta ginsenga, *Panax quinquefolius* L. poznat kao američki ginseng (AG) i *Panax ginseng* C.A. Meyer, poznat kao azijski ginseng dvije su najpopularnije vrste ginsenga za koje postoji najviše dokaza o kliničkoj učinkovitosti. U tradicionalnoj medicini američki ginseng se koristio kao diuretik, digestiv, tonik i stimulans. Koristio se za povećavanje odgovora na stres, liječenje kašlja, gubitak apetita, liječenje kolika, povraćanje, nesanicu, neuralgije, reumatizam i glavobolju (64). Nadalje, smatra se da pripravci američkog ginsenga povećavaju oslabljenu koncentraciju i memoriju te sposobnost učenja, podižu imunitet i usporavaju starenje (88). Sustavnim pregledom randomiziranih kontroliranih kliničkih ispitivanja koji je procjenjivao učinkovitost i sigurnost ginsenga ustanovljen je snažan pozitivan učinak ginsenga na metabolizam glukoze, psihomotornu funkciju i plućnu funkciju te umjeren pozitivan učinak na poboljšanje erektilne disfunkcije, srčane funkcije i cerebrovaskularne funkcije, dok učinak na poboljšanje fizičke učinkovitosti nije pronađen (89). Prema monografiji Svjetske zdravstvene organizacije potrebna su daljnja randomizirana klinička ispitivanja na većem uzorku bolesnika sa ŠBT2 i s boljom metodologijom prije donošenja bilo kakvih terapijskih preporuka. Premda su kliničke studije načelno usmjerene na učinke preparata ginsenga cijelog korijena ili specifičnih dijelova korijena, kako se primjenjuju u Tradicionalnoj kineskoj medicini (engl. *Traditional Chinese Medicine*), preklinička istraživanja nastoje razjasniti ulogu pojedinačnih ginsenozida u odnosu na njihovu terapijsku učinkovitost. Ustanovljeni omjeri ginsenozida u američkom ginsengu iznose: Rb1:Rg1 > 3, Rg1:Re <1 i Rb2:Rc <1 (55;90).

1.3.2 Hipoglikemijski učinak američkog ginsenga

1.3.2.1 *Preklinička istraživanja*

Pored svojih protektivnih, adaptogenih i imunogenih karakteristika smatra se da ginseng utječe na šećernu bolest i na metabolizam ugljikohidrata. Dokazi o hipoglikemijskom potencijalu ginsenzida i njihovih metabolita potječu iz *in vitro* istraživanja i *in vivo* istraživanja provedenih na životinjama. Neka od najaktualnijih istraživanja navedena su u tablici 1 i tablici 2.

Ginsenzidi i njihovi metaboliti, poput spoja K i metabolita protopanaksadiola, aplicirani su u različitim dozama u stanične kulture i životinjske modele korištene u svrhe istraživanja ŠBT2, što je dovelo do značajnog sniženja glikemije natašte i postprandijalne glikemije. To se poboljšanje glikemije manifestiralo ili kroz povećanu inzulinsku osjetljivost ili kroz povećanu inzulinsku sekreciju što upućuje na činjenicu da ginseng posjeduje terapijski potencijal u liječenju ŠBT2. Navedene su studije pružile uvid u moguća ciljna mjesta djelovanja pojedinačnih ginsenzida u inzulinskim sekretornim i signalnim putovima čime se mogu objasniti ova uočena hipoglikemijska svojstva.

Tablica 1. Učinci ekstrakata ginsenga, pojedinačnih ginsenozida i njihovih metabolita na kontrolu glikemije u staničnim kulturama korištenim u istraživanju šećerne bolesti tipa 2.

POSTUPAK (ginsenozid, doza i stanični tip)	REZULTAT	PREDLOŽENI MEHANIZAM DJELOVANJA	AUTOR
Rg1, 0,01-0,1 μ M, Caco-2	↓ apsorpcija glukoze kroz crijevni epitel na 70% prvotne brzine	smanjena ekspresija Na-glukoza kotransportera	Chang i sur., 2007 (91)
Spoj K (PPD), 8 μ M, HIT-T15, Langerhansovi otočići gušterače izolirani iz muških Sprague-Dawley štakora	↑ inzulinska sekrecija	inhibicija ATP osjetljivih K ⁺ -kanala	Han i sur., 2007 (92)
20(S)-Rg3, 5 μ M, HIT T15	↑ glukozom-stimulirana inzulinska sekrecija	aktivira put AMP-aktivirane protein kinaze koja stimulira translokaciju glukoznih prijenosnika	Park i sur., 2008 (93)
Re, 10 μ M, 3T3 L1	↑ utok glukoze	potpomaže translokaciju GLUT4 aktivirajući IRS1 neovisnu o aktivaciji IR-a, inhibira JNK i NF κ B, aktivira signalni put PI3K	Zhang i sur., 2008 (94)
Rb1, 0,01-10 μ M, 3T3 L1	↑ inzulinom-stimuliran utok glukoze	potpomaže translokaciju GLUT1 i GLUT4 aktivirajući PI3K	Shang i sur., 2008 (95)
Rg1, Rb1, 20 μ M, MIN 6	↑ glukozom-stimulirana inzulinska sekrecija	aktivacija PKA puta koja dovodi do povećanja mRNA i ekspresije proteina IRS 2	Park i sur., 2008 (96)
ekstrakt korijena ginsenga, 50 μ g/mL, Langerhansovi otočići gušterače izolirani iz muških štakora	↑ glukozom-stimulirana inzulinska sekrecija	↑ mRNA ekspresija glukokinaze (ponaša se kao senzor za glukozu)	Park i sur., 2008 (97)
CKG, 0,1-1.0 mg/mL, Langerhansovi otočići gušterače izolirani iz muških Sprague-Dawley štakora	↑ inzulinska sekrecija	inhibicija ATP osjetljivih K ⁺ -kanala	Kim i Kim, 2008 (98)
ekstrakt ploda AG, Re, 0,1-1.0 mg/mL, MIN 6	↑ inzulinska sekrecija	↓ oksidativni stres koji može dovesti do inzulinske rezistencije	Lin i sur., 2008 (99)
Rg3, 0,1-5.0 μ M, MIN 6N8	↓ apoptoza β -stanica	prevencija palmitatom-inducirane apoptoze	Kim i sur., 2010 (100)
saponini AG-a iz stabljike i lišća, 0,05 mg/ml i 0,1 mg/ml, HUVEC stanice	↓ oksidativno oštećenje inducirano glukozom	aktivira signalni put PI3K/Akt/GSK3 β	Wang i sur., 2013 (101)

Rg1, Rg3, Re, Rb1- uobičajena nomenklatura ginsenzida; spoj K- metabolit protopanaksadiola; PPD- protopanaksadioli; CKG- crvenokorejski ginseng (engl. *Korean red ginseng*-KRG); AG- američki ginseng; ATP- adenzin trifosfat; AMPK- adenzin- monofosfat-aktivirana protein kinaza; GLUT4- prijenosnik glukoze (izoforna 4); IRS1- inzulinski receptorski supstrat 1; IR- inzulinski receptor; JNK- c-Jun N-terminalna kinaza; NFκB- nuklearni faktor kappa B; PI3K- fosfatidil-inozitol-3-kinaza; GLUT1- prijenosnik glukoze (izoforna 1); PKA- protein kinaza A; IRS2- inzulinski receptorski supstrat 2; HUVEC- endotelne stanice umbilikalne vene (engl. *Human umbilical vein endothelial cells*- HUVEC); Akt- protein kinaza B (engl. *Protein kinase B or Akt*); GSK3β- kinaza 3 glikogen sintaze (engl. *Glycogen synthase kinase 3 beta*)

Preklinička *in vitro* istraživanja su pokazala da ginsenzidi mogu povećati inzulinsku sekreciju kroz povećanu proizvodnju ATP na način da povećavaju aktivnost glikolitičkih enzima što onda dovodi do povećane proizvodnje ATP (66). Smatra se da ginsenzidi inhibiraju ATP-osjetljive K⁺ kanale smještene u staničnoj membrani na način da se vežu na receptore za sulfonilureju (SUR-1) koji čine dio ATP-osjetljivih K⁺ kanala čime dolazi do depolarizacije stanice, otvaranja kalcijjskih kanala i utoka kalcija te egzocitoze inzulina iz granula (92;96;98). Time bi se djelovanje ginsenzida moglo usporediti s derivatima sulfonilureja koji imaju inzulintropni učinak na β-stanice gušterače (sekretagogno djelovanje) (98;102). Istraživanja su također pokazala da ginsenzidi smanjuju apoptozu β-stanica gušterače čime omogućavaju nastavak proizvodnje i izlučivanja inzulina (66;100). Ovo opažanje je potkrijepljeno dokazima koji pokazuju da ginsenzidi mogu inhibirati apoptozu posredovanu slobodnim masnim kiselinama te regulirati aktivnost i ekspresiju pro- i anti-apoptoznih čimbenika, poput kaspaze 9 i Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) proteina (100;103).

Vezano uz unutarstanični put inzulina (Slika 4), preklinička istraživanja su pokazala da ginsenzidi mogu inhibirati enzim c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK) koji potiče fosforilaciju supstrata inzulinskog receptora 1 (IRS-1) na mjestu serina čime se inhibira normalni prijenos signala preko inzulinskog receptora putem tirozin kinaze (94). Dodatno, ginsenzid Re inhibira aktivaciju IκB kinaza-β (IKKβ) koja dovodi do translokacije nuklearnog faktora κB (NF-κB) u jezgru čime se potiče ekspresija brojnih gena čiji produkti mogu uzrokovati inzulinsku rezistenciju (94). Ginsenzid Rb1 stimulira transport glukoze poticanjem translokacije prijenosnika GLUT 1 i GLUT 4 tako što djelomično aktivira čimbenike signalnog puta inzulina. Naime, pronađeno je da je Rb1 povećao fosforilaciju supstrata inzulinskog receptora 1 i protein kinaze B te stimulirao aktivnost PI3-kinaze u odsutnosti aktivacije inzulinskog receptora (95). Dodatno, ginsenzidi reguliraju i inzulinske učinke; mogu povećati ekspresiju i translokaciju glukoznog prijenosnika GLUT4 na staničnoj membrani koji će omogućiti utok glukoze u stanicu

(95). Ne samo da su pretkliničke studije pokazale senzitivirajuće i sekretagogno djelovanje ginsenosida, već su upozorile i na njegov utjecaj na apsorpciju glukoze. Studija iz 2007. godine pokazala je da ginseng može smanjiti koncentraciju glukoze tako što smanjuje ekspresiju i aktivnost Na⁺-glukoza kotransportera, proteina odgovornog za transport glukoze kroz crijevni epitel (91). Nakon tretiranja Caco-2 staničnog monosloja (*in vitro* model crijevnog epitela) s 0,01 ili 0,1 μM Rg1 (PPT ginsenosida) u trajanju od 24 sata opaženo je značajno smanjenje transporta glukoze u usporedbi s kontrolom (91). Rg1 ginsenosid smanjio je postprandijalnu glikemiju djelujući na crijevnu apsorpciju glukoze na način da je mijenjao razinu ekspresije primarnog transportnog proteina glukoze u crijevnom epitelu (91). Istraživanja provedena na životinjama s induciranom hiperglikemijom pokazuju značajno hipoglikemijsko djelovanje korijena ili određenih ekstrakata korijena različitih vrsta ginsenga (američkog, sibirskog, azijskog itd.) (104-107). U studiji provedenoj na štakorima oralno primijenjen korijen ginsenga smanjio je koncentraciju glukoze i inhibirao inzulinsku rezistenciju ometajući fruktozom-induciranu inzulinsku rezistenciju nakon razdoblja od mjesec dana (108). Intraperitonejske injekcije ukupnih ginsenosida iz kineskog ginsenga ili njihova oralna primjena u razdoblju od 12 dana značajno su smanjili koncentraciju glukoze natašte u dijabetičkog ob/ob modela miša što upućuje na pretpostavku da ukupni ginsenosidi u kineskom ginsengu posjeduju značajna hipoglikemijska svojstva (109). Ginsenosid Re snizio je koncentraciju glukoze u plazmi, smanjio koncentraciju kolesterola i triglicerida te smanjio oksidativni stres u dijabetičkih štakora (104).

In vitro i *in vivo* pretklinička istraživanja ukazala su na različite mehanizme hipoglikemijskih učinaka ginsenosida te dokazala da ginsenosidi mogu poboljšati kontrolu glikemije.

Tablica 2. Učinci ekstrakata ginsenga, pojedinačnih ginsenozida i njihovih metabolita provedeni na dijabetičkim modelima glodavaca.

POSTUPAK (ginsenozid, doza i životinjski model)	REZULTAT	PREDLOŽENI MEHANIZAM DJELOVANJA	AUTOR
ekstrakt ploda bobice, Re, 150 mg/kg ip, ob/ob miševi	↓ glikemija natašte i postprandijalna glikemija	↑ inzulinom-stimulirano uklanjanje glukoze	Attele i sur., 2002 (65)
ekstrakt lista AG, 50, 150 mg/kg ip, ob/ob miševi	↓ glikemija natašte	↑ inzulinom-stimulirano uklanjanje glukoze	Xie i sur., 2004 (110)
ekstrakt bobica AG, 50, 150 mg/kg ip, ob/ob miševi	↓ glikemija natašte	nije specificirano	Xie i sur., 2004
Re, 20 mg/kg i.p., ob/ob miševi	↓ glikemija natašte i postprandijalna glikemija	↑ inzulinska osjetljivost	Xie i sur., 2005 (109)
korijen azijskog ginsenga, 125 mg/kg oralno, dijabetički štakori soja Wistar	↓ glukoze u plazmi (AUC) i inzulinski indeksi	↑ inzulinska osjetljivost	Liu i sur., 2005 (108)
Re, 5, 10, 20 mg/kg oralno, STZ-om tretirani štakori soja Sprague–Dawley	↓ glikemija natašte	nije specificiran	Cho i sur., 2006 (104)
Rh2, 1.0 mg/kg iv, štakori soja Wistar	↓ glikemija natašte	↑ inzulinska sekrecija	Lee at al, 2006 (111)
spoj K (PPD), 10/20 mg/kg oralno, ICR i db/db miševi	↓ glikemija natašte i postprandijalna glikemija	↑ inzulinska osjetljivost	Han i sur., 2007 (92)
spoj K, 20 mg/kg, db/db miševi	↓ glikemija natašte	↑ inzulinska sekrecija	Yoon i sur., 2007 (112)
Rh2, 1.0 mg/kg iv, štakori soja Wistar, STZ-om tretirani štakori	↓ glikemija natašte	↑ inzulinska osjetljivost	Lee at al, 2007 (113)
ekstrakt korijena, 10 g/kg, ZDF štakori	↓ postprandijalna glikemija	↑ inzulinska osjetljivost	Banz i sur. 2007 (114)
sok iz bobica AG, 0,6 ml/mg, ob/ob miševi	↓ postprandijalna glikemija	nije specificiran	Xie i sur., 2007 (115)
Rg1, Rb1, Rd, Re, 50/200 mg/kg, KK-Ay muški miševi	↓ glikemija natašte i postprandijalna glikemija	↑ inzulinska osjetljivost	Chen i sur., 2008 (116)
Rg3, 12.5, 25 mg/kg oralno, miševi soja ICR	↓ postprandijalna glikemija	↑ inzulinska sekrecija	Park i sur., 2008 (93)
Re, 40 mg/kg ip, štakori soja Wistar	↓ glikemija natašte	↑ inzulinska osjetljivost	Zhang i sur., 2008 (94)
Rg3, 5, 10, 20 mg/kg oralno, STZ-om tretirani štakori	↓ glukoza i glikolizirani proteini u serumu	inhibira nitrozativni stres posredovan NMDA-receptorom	Kang i sur., 2008 (117)
malonil-ginsenozidi,	↓ glikemija natašte	nije specificiran	Liu i sur., 2009 (118)

120 mg/kg, STZ- dijabetički miševi			
ekstrakt ploda bobice AG-a Rg, 150 mg/kg ip, ob/ob miševi	↓ glikemija natašte	↑ inzulinska osjetljivost i homeostaza glukoze	Yuan i sur., 2011 (119)
korijen AG-a, doza, db/db miševi	↓ glikemija natašte	nije specificiran	Yoo i sur., 2012 (120)
Re, Rh2, Rg1, Rb1, Rd, Re, Rg3- uobičajena nomenklatura ginsenzida; spoj K- metabolit protopanaksadiola; PPD- protopanaksadioli; AG- američki ginseng; ip- intraperitonjski; iv- intravenozno; ZDF- štakori soja Zucker (engl. Zucker diabetic fatty); ICR- engl. <i>Imprinting Control Region</i> ; STZ- streptozotocin; NMDA- N-metil-D-aspartična kiselina;			

1.3.2.2 Klinička istraživanja

Od ograničenog broja provedenih kratkotrajnih i dugotrajnih kliničkih istraživanja velik dio njih je potvrdio hipoglikemijski učinak AG-a.

Kako bi se odredio protokol liječenja (doziranje, vrijeme, i način uzimanja) određene serije korijena AG-a (dobavljač Chai-Na-Ta Corp., BC, Canada), proveden je niz od 5 kratkotrajnih, randomiziranih, jednostruko prikrivenih, placebo kontroliranih kliničkih istraživanja (*American Ginseng Clinical Testing Program*) u zdravih ispitanika i u bolesnika sa ŠBT2 nakon testa oralnog opterećenja glukozom s 25 g glukoze. *Prve dvije* kratkotrajne studije procjenjivale su učinkovitost odabrane serije korijena AG-a u dozi od 3 g, primijenjenog zajedno ili 40 min prije oGTT-a s 25 g glukoze u 10 normoglikemičnih ispitanika i 9 bolesnika sa ŠBT2 (121;122). Rezultati studija su pokazali da je ekstrakt korijena AG-a smanjio postprandijalnu glikemiju za 9,1-38,5% kada je bio uzet 30-40 min prije ili istovremeno s oGTT-om u ispitanika oboljelih od ŠBT2 te samo 30-40 min prije oGTT-a u zdravih ispitanika (121). *Treća i četvrta* kratkotrajna studija ispitivale su učinke različitih doza (0g [placebo], 3, 6, 9 g) i različitih vremena uzimanja (0, -40, -80, -120 min u bolesnika sa ŠBT2 te -40, -80, -120 min u normoglikemičnih ispitanika) odabrane serije korijena AG-a u 10 bolesnika sa ŠBT2 i 10 normoglikemičnih ispitanika (88;123). Rezultati studija su pokazali da je odabrana serija korijena AG-a nakon oGTT-a s 25 g glukoze podjednako smanjila glikemijski odgovor, i to neovisno o dozi i vremenu uzimanja pripravka (88;123). *Peta* kratkotrajna studija procjenjivala je utjecaj odabrane serije korijena AG-a na pojedinačne, niže doze (0g [placebo], 1, 2, 3 g) i proksimalnije vrijeme uzimanja (0, -10, -20, -40 min) u 12 normoglikemičnih ispitanika te je pronađeno da su doze od 1-3 g podjednako učinkovite, dok se vrijeme uzimanja intervencije pokazalo učinkovitim samo kada je pripravak AG-a uzet 40 min prije obroka (88).

Rezultati ovih pet kratkotrajnih istraživanja pokazali su da su doze od 1-9 g podjednako učinkovite te da je vrijeme primjene od 0-120 min prije oGTT-a podjednako učinkovito u bolesnika sa ŠBT2 bez interakcija s njihovom temeljnom hipoglikemijskom terapijom (85;88;121-123). Budući da je učinak ginsenga bio isti neovisno o tome je li bio primjenjen istovremeno ili 40, 80, odnosno 120 min prije obroka u bolesnika sa ŠBT2, zaključeno je da bi ginseng mogao djelovati povećanjem *glukoza-ovisnog* inzulinskog odgovora. Nadalje, može se zaključiti da je odabrana serija AG-a uzeta u dozi od 1 g oralno 40 min prije obroka dovoljna za

smanjenje akutne postprandijalne glikemije u zdravih ispitanika i bolesnika sa ŠBT2. Odabrana serija AG-a je imala ginsenozični profil koji je uključivao 3,21% ukupnih ginsenozida te omjer PPD:PPT 2,44 (85;88;121-123).

Kako bi otkrili najučinkovitiji pripravak AG-a provedena je kratkotrajna, križna studija koja je proučavala niz različitih ekstrakata AG-a (124). Trinaestero zdravih ispitanika uzimalo je jedan od sljedećih pripravaka: čitav korijen AG-a, 30%, 50% ili 70%-tni etanolni ekstrakt AG-a. Studija nije pokazala učinak AG-a na površinu ispod krivulje za glukozu i inzulin; međutim, inzulinska osjetljivost mjerena indeksom inzulinske osjetljivosti (engl. *Insulin Sensitivity Indeks*) značajno se poboljšala s 50%-tnim etanolnim ekstraktom (124).

Nadalje, kratkotrajnim križnim istraživanjem provedenim na 8 ispitanika s normoglikemijom prikazan je ukupni učinak ginsenozida na glikemiju. Uočeno je kako je primjena AG-a u dozi od 6 g dvostruko povećala sekreciju inzulina u prvih 45 min nakon oGTT-a s 25 g glukoze (181). Budući da se prvih 60 min od provođenja oGTT-a s 25 g glukoze smatra reprezentativnim za ranu fazu izlučivanja inzulina, ovi podaci upućuju na činjenicu da bi AG mogao utjecati na tu fazu, gubitak koje je primarni nedostatak ŠBT2.

Dugoročna klinička istraživanja koja bi mogla podržati upotrebu ginsenga u liječenju ŠBT2 do nedavno su bila ograničena. Od dvije dugotrajne kliničke studije prva je pokazala da je primjena nespecifične vrste ekstrakta ginsenga u dozi od 100 ili 200 mg/dan u trajanju od 8 tjedana rezultirala sniženjem hemoglobina A1c (125). Međutim, zbog značajnih razlika u gubitku tjelesne mase između dviju skupina te slabo opisane statističke obrade podataka, rezultati studije smatraju se višeznačnim. Druga studija bila je osmotjedni, dvostruko prikriveni, križni pokus u kojem je u 24 ispitanika sa ŠBT2 bio primijenjen ekstrakt AG-a ili placebo u dozi od 3 g dnevno prije obroka (86;126;127). Nakon 8 tjedana intervencije pronađeno je značajno poboljšanje regulacije glikemije u usporedbi s placebom (snižena glukozna natašte i HbA1c). Nadalje, došlo je do 25%-tnog povećanja koncentracije inzulina u serumu natašte što daje naslutiti moguće poboljšanje funkcije β -stanica. Trend povećanja koncentracije inzulina, premda statistički nesigantan, bio je sličan onome u nizu od pet kratkotrajnih istraživanja (*American Ginseng Clinical Testing Program*).

1.3.3 Vaskularni učinci ginsenga

Šećerna bolest tipa 2 u 65% slučajeva udružena je s hipertenzijom, a gotovo 50% bolesnika sa ŠBT2 ima i pridruženi poremećaj lipida (45). Hipertenzija je najvažniji komorbiditet šećerne bolesti i jedan od rizičnih čimbenika za razvoj srčano-žilnih (SŽ) bolesti. Prema podacima smjernica za dijagnosticiranje i liječenje arterijske hipertenzije iz 2013. godine (ESH/ESC smjernice) koje objavljuju Europsko društvo za hipertenziju (engl. *European Society of Hypertension* - ESH) i Europsko kardiološko društvo (engl. *European Society of Cardiology* - ESC), oboljelima od ŠBT2 preporučaju se vrijednosti arterijskog tlaka (AT) manje od 140/85 mmHg budući da ne postoje jasni dokazi o prednostima intenzivnijeg snižavanja arterijskog tlaka (< 130/80 mmHg) (128). ŠBT2 može oštetiti endotel i glatke mišiće arterijske stjenke što dovodi do vazokonstrikcije i smanjene elastičnosti arterijske stjenke (129-132). Premda se AT dogovorno mjeri na brahijalnoj arteriji, ostale odrednice srčano-žilnog rizika poput 24-satnog mjerenja arterijskog tlaka, centralnog arterijskog tlaka i arterijske elastičnosti također imaju prognostičku vrijednost te pružaju dodatne informacije o srčano-žilnom sustavu (129;133).

Zbog učinka valne refleksije na vrh aortalnog sistoličkog tlaka duž arterijskoga stabla, aortni sistolički tlak i tlak pulsa mogu biti različiti od konvencionalno izmjerenih vrijednosti arterijskog tlaka (134). Iz toga je proizašla potreba za istraživanjem invazivnog mjerenja centralnog tlaka. Također, opisana je i metoda neinvazivne procjene aortalnog tlaka-arterijske elastičnosti računanjem augmentacijskog indeksa (AI) iz obrisa pulsog vala zabilježenog u perifernoj arteriji (135). Aortalni pulsni val sadržava početni (sistolički) i reflektirani val. Augmentacijski indeks ustvari predstavlja razliku tlakova između sistoličkog (P1) i reflektiranog vala (P2) u odnosu na tlak pulsa (PP) te se izračunava prema sljedećoj formuli: $Aix (\%) = [(P2 - P1)/PP] \times 100$.

Ovi prognostički parametri djelomično su reverzibilni te njihovim poboljšanjem dolazi do smanjenja srčano-žilnog rizika. Dok se pouzdano zna da određene prehrambene i farmakološke tvari utječu na vaskularnu funkciju, dokazi za ostale često korištene terapijske mogućnosti još uvijek nedostaju. Jedna od tih terapijskih mogućnosti su dodaci prehrani kod kojih je zabilježen velik porast uporabe. Usprkos visokoj učestalosti korištenja dodataka prehrani, većina zdravstvenih tvrdnji nema kliničkih dokaza te se nameće potreba za procjenom zdravstvenih tvrdnji uz pomoć randomiziranih, kontroliranih istraživanja. Prema podacima iz nacionalne

zdravstvene ankete provedene putem intervjua (engl. *National Health Interview Survey*) koju je proveo Nacionalni centar za zdravstvenu statistiku (engl. *National Center for Health Statistics*) Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control and Prevention*), među nevitaminskim, nemineralnim dodacima prehrani ginseng je bio peti najčešće korišten biljni pripravak (136). Postoje brojna *in vitro* i *in vivo* pretklinička istraživanja te mnogo manje kliničkih istraživanja koja ispituju utjecaj ginsenga na vaskularne učinke.

1.3.3.1 Pretklinička istraživanja

Studije na životinjama su pokazale o dozi ovisno sniženje srednjeg arterijskog tlaka kada su se anestetiziranim štakorima primijenili ginsenozi iz crvenokorejskog ginsenga (CKG) (137). Opaženi hipotenzivni učinci dovedeni su u vezu s oslobađanjem dušikovog oksida (NO) iz endotelnih stanica što rezultira stvaranjem cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP) i posljedičnom relaksacijom glatkih mišića (137;138). Druga studija je pronašla značajno sniženje sistoličkog AT-a nakon uzimanja CKG-a u normotenzivnih i hipertenzivnih štakora (119).

Uspirkos činjenici što je sastav CKG-a složen, protopanaksatrioli se smatraju odgovornim za poboljšanje vaskularnog tonusa (139). U usporedbi s protopanaksadiolima pokazali su veće nakupljanje cGMP-a u prstenovima aorte štakora (139). Nadalje, pokazalo se da između svih poznatih PPT, Rg3 ima najjači vazodilatacijski učinak (140). Istraživanja su pokazala da Rg3 inducira endotelnu relaksaciju torakalnih aorti štakora na način da povećava otpuštanje dušikovog oksida povećavajući ekspresiju NO-sintaze (NOS) (141). Kwan i suradnici su pronašli da ukupna ginsenzidna frakcija iz američkog ginsenga nije imala vazoaktivni učinak u studiji provedenoj na prstenovima aorte štakora koja je koristila istu metodologiju kao i prethodno opisana studija s crvenokorejskim ginsengom (142). Međutim, nije bilo jasno navedeno u kojoj se dozi američki ginseng primjenjivao.

In vitro studije koje su proučavale utjecaj ginsenga na vaskularne učinke upućuju na činjenicu da CKG posjeduje snažno vazodilatacijsko djelovanje (140;141;143), dok isto nije pronađeno za AG (142). Dodatno, doza ginsenzida može također imati promjenjive učinke na vazoaktivnost pri čemu niže doze mogu dovesti do vazodilatacije, a više doze do ravnoteže između vazodilatacije i vazokonstrukcije (144). Također, različite vrste ekstrakata ginsenga kao i

metabolički i probavni produkti mogu imati različite učinke na *in vitro* vazoaktivnost, ponekad uzrokujući i poništavajuće učinke (145;146).

U cjelini, prethodne studije ukazuju da ekstrakti CKG-a mogu sniziti arterijski tlak. Nadalje, studije su pokazale da je *Panax ginseng* ima učinak na krvni tlak te da su jedina frakcija koja doprinosi tom antihipertenzivnom učinku ginsenosidi (147). Studije su također pokazale da niske doze ginsenosida (manje od 60 mg/kg tjelesne mase) dovode do akutnog snižavanja arterijskog tlaka, dok visoke doze (više od 100 mg/kg tjelesne mase) ili ne utječu na arterijski tlak ili ga podižu (148). Moguće je da pri niskim dozama ginsenosidi induciraju ili stabiliziraju aktivnu konformaciju receptora, dok pri visokim dozama isto nije moguće.

1.3.3.2 Klinička istraživanja

Sve veća potrošnja ginsenga u različite terapijske svrhe podiže zabrinutosti oko njegove učinkovitosti, sigurnosti i interakcija u koje stupa s lijekovima (149). Premda je ginseng već dugo vremena široko rasprostranjen u azijskim kliničkim okruženjima, potrebna je rigoroznija znanstvena procjena kako bi se ustanovila njegova odgovarajuća klinička uporaba. Stoga se provodi sve više randomiziranih kliničkih ispitivanja kojima bi se utvrdila njegova klinička učinkovitost i sigurnost za bolesnike sa specifičnim bolestima i stanjima.

Kako bi procijenili hemodinamički učinak najčešće korištenih vrsta AG-a proveden je niz kliničkih istraživanja. U trideset hipertenzivnih ispitanika istraživao se kratkotrajni učinak ekstrakta AG-a u dozi od 3 g te su rezultati pokazali neutralni akutni učinak na AT (150). Nadalje, kako bi procijenili dugotrajni učinak ekstrakta AG-a na 24-satni AT i bubrežnu funkciju, provedeno je randomizirano, placebo kontrolirano, dvostruko prikriveno križno istraživanje na 52 hipertenzivna ispitanika u razdoblju od 12 tjedana (151). Rezultati studije su pokazali da dugotrajna uporaba ginsenga u dozi od 3 g dnevno ima neutralan učinak na 24-satni AT i bubrežnu funkciju (151). Ova dva istraživanja ukazuju da bi AG mogao biti siguran za upotrebu u bolesnika s hipertenzijom.

S druge strane, osmotjedna primjena odabranog ekstrakta američkog ginsenga serije CNT 2000 u dozi od 1 g primijenjena 3 puta dnevno (3 g dnevno) 40 min prije obroka značajno je smanjila sistolički i dijastolički AT u usporedbi s placebo u 24 bolesnika sa ŠBT2 (152). Dodatno, Xu i sur. su pokazali da AG u dozi od 3 g dnevno smanjuje sistolički AT za 5,6 mmHg

u bolesnika sa ŠBT2 nakon razdoblja od 8 tjedana (153). Nadalje, kako bi ispitali učinak korijena CKG-a i njegovih komponenata (ginsenozida i polisaharida) na periferni AT i augmentacijski indeks, mjeru arterijske elastičnosti, provedeno je randomizirano, kontrolirano, dvostruko-prikriveno, kratkotrajno križno istraživanje (154). Tri sata nakon primjene korijena CKG-a i njegovih ginsenozida došlo je do značajnog poboljšanja AI-a u usporedbi s placebom. Slična kratkotrajna studija pokazala je značajan učinak 3 sata nakon uzimanja Rg3-obogaćenog ekstrakta CKG-a na brahijalni AT, centralni AT i centralni AI u zdravih ispitanika (155).

1.3.4 Nuspojave

Istraživanja koja su na pet različitih životinjskih modela provodila toksikološke analize ekstrakata korijena ginsenga nisu pronašla znakove akutne ili kronične toksičnosti (156;157). Zbog dugotrajne upotrebe korijena ginsenga i razmjerno rijetke pojave značajnih nuspojava, smatra se da ukoliko se uzima u preporučenim dozama korijen ginsenga ne dovodi do značajnih nuspojava (156;157). Međutim, u istraživanju koje je uključivalo 133 ispitanika koji su uzimali velike količine ginsenga zabilježene su nuspojave poput hipertenzije, nerveze, razdražljivosti, proljeva, kožnih ulceracija i nesаницe koje se zajedničkim imenom nazivaju "sindrom zloupotrebe ginsenga" (engl. "*ginseng abuse syndrome*") (158). Analizom ovog istraživanja pokazalo se da studija nije imala kontrolnu skupinu, da nije utvrđena vrsta ginsenga niti ostali sastojci u pripravku te da su neki ispitanici prekoračili dozvoljenu dozu (15 g dnevno umjesto preporučenih 0,5-2 g) (157-159). Nakon smanjenja doze na 1,7 g dnevno simptomi "sindroma" su se značajno smanjili te jedini valjani zaključak koji možemo izvući iz Siegelove studije je da prekomjerni i nekontrolirani unos ginsenga treba izbjegavati (157). Međutim, temeljem ove opservacijske studije ginsengu se pripisivalo potencijalno hipertenzivno djelovanje te su brojni pregledni članci kontraindicirali njegovo korištenje u hipertenzivnih bolesnika. Suprotno tome, klinička ispitivanja provedena u zadnjem desetljeću pokazala su neutralan ili povoljan učinak ginsenga na arterijski tlak (150;151). Unatoč tomu, dva ispitanika prijavila su glavobolju i proljev (151). Slična studija koja je proučavala kratkotrajne učinke AG-a također nije pronašla nikakav utjecaj na arterijski tlak (150). Osim navedenog, prijavljen je jedan slučaj cerebralnog arteritisa u bolesnika koji je konzumirao visoke doze etanolnog ekstrakta korijena ginsenga (otprilike 6 g u jednoj dozi) (160). No ipak, vrsta i količina ekstrakta ginsenga nisu bili

prijavljeni. Dva slučaja midrijaze i poremećaja u prilagodbi, kao i vrtoglavice prijavljena su nakon korištenja visokih doza (3-9 g) nespecifične vrste ginsenga (161). Estrogenske nuspojave su prijavljene u pre- i postmenopauzalnih žena nakon upotrebe ginsenga. Sedam slučajeva bolova u dojka (162-164) i jedan slučaj vaginalnog krvarenja (165) bili su prijavljeni u postmenopauzalnih žena nakon uzimanja nespecifičnih preparata ginsenga. Studije koje su istraživale utjecaj standardiziranog ekstrakta ginsenga na estrogenskim receptorima izoliranim iz maternica zrelih štakora ili na progesteronskim receptorima humanog miometrija zaključile su da ginseng ne dovodi do hormonskih nuspojava (166).

Sustavni pregled 146 kliničkih istraživanja iz 2002. godine pronašao je da je učestalost nuspojava u eksperimentalnoj skupini koja je uzimala ginseng sličan onoj u kontrolnoj skupini koja je uzimala placebo (149). Najčešće prijavljene nuspojave uključivale su glavobolju, poteškoće pri spavanju i gastrointestinalne smetnje. Istraživanje je istaknulo da je teško utvrditi uzročno-posljedičnu vezu između primjene ginsenga i pojave nuspojava te da je korištenje ginsenga najvećim dijelom bilo dobro tolerirano i da su njegovi štetni učinci bili blagi i reverzibilni. Nakon primjene kombiniranih pripravaka (ginseng s nekom drugom tvari) došlo je do nuspojava, no nejasno je u kojoj su mjeri bile posljedica primjene ginsenga (149). Svjetska zdravstvena organizacija proglasila je ginseng lijekom bez kontraindikacija i ozbiljnih nuspojava (64), dok Kanadsko dijabetološko društvo (engl. *Canadian Diabetes Association*) ne preporuča upotrebu komplementarne i alternativne medicine u liječenju ŠBT2 zbog nedovoljnih dokaza o njegovoj sigurnosti i učinkovitosti (30).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Usprkos redovitom uzimanju propisane terapije, bolesnici sa ŠBT2 često ne postižu ciljeve regulacije glikemije. Nadalje, vrlo često nakon određenog vremena postojeća terapija nije dovoljna za održavanje zadovoljavajuće glikemije zbog progresivnog tijeka šećerne bolesti tipa 2. Kako bi se postigla zadovoljavajuća kontrola ŠBT2 sve se češće primjenjuje kombinirana terapija čija se prednost temelji na činjenici da komplementarni mehanizmi pojedinih lijekova mogu djelovati aditivno ili sinergistički u snižavanju hemoglobina A1c. S obzirom na rastuću popularnost komplementarne i alternativne medicine, kombinacija konvencionalne terapije i dodataka prehrani mogla bi poboljšati učinkovitost terapije. Pretkliničke *in vitro* studije i studije provedene na životinjama upućuju na zaključak da ginseng povećava inzulinsku sekreciju, inzulinsku osjetljivost, smanjuje apsorpciju ugljikohidrata te da povećava odstranjivanje glukoze iz krvi. Ginseng bi mogao posredovati u inzulinom-stimuliranom utoku glukoze u mišićne stanice i masno tkivo, kao i u o glukozno-ovisnoj sekreciji inzulina iz β -stanica Langerhansovih otočića. Dosadašnja klinička istraživanja upućuju da bi američki ginseng mogao biti djelotvoran u regulaciji glikemije u bolesnika sa ŠBT2 na način da, slično kao i derivati sulfonilureje, povećava postprandijalnu koncentraciju inzulina u serumu. Međutim, mali je broj dugoročnih kliničkih studija te stoga nemamo dovoljno dokaza koji bi potvrđivali ovaj zaključak.

Stoga je *svrha* ovog istraživanja bila procijeniti primjenjivost ekstrakta američkog ginsenga u liječenju bolesnika sa stabilnom šećernom bolešću tipa 2 te pridonijeti boljem razumijevanju predloženog mehanizma njegovog djelovanja u dugoročnoj regulaciji glikemije u bolesnika sa ŠBT2.

U ovom istraživanju postavljena je *hipoteza* da će primjena ekstrakta AG-a rezultirati boljom regulacijom glikemije i ostalih čimbenika rizika za razvoj srčano-žilnih bolesti od one već postignute konvencionalnim liječenjem te da neće imati neželjenih učinaka na sigurnost bolesnika.

Glavni cilj istraživanja bio je ispitati učinak ekstrakta korijena AG-a, u usporedbi s placeboom, na liječenje ŠBT2 mjereći učinkovitost, sigurnost i suradljivost. Provedena klinička studija trajala je 12 tjedana.

1. Učinkovitost

Primarni cilj bio je procijeniti učinak ekstrakta AG-a na regulaciju glikemije mjerenjem vrijednosti hemoglobina A1c (HbA1c).

Sekundarni cilj bio je procijeniti učinak ekstrakta AG-a na regulaciju glikemije (koncentracija glukoze u plazmi natašte, koncentracija inzulina u serumu natašte i indeks inzulinske rezistencije, HOMA-IR) i na ostale čimbenike rizika za nastanak srčano-žilnih bolesti uključujući lipide (LDL, HDL, TG, ukupni kolesterol), vaskularnu funkciju (arterijski tlak i augmentacijski indeks) i C-reaktivni protein.

Krajnji je cilj bio na temelju rezultata učinkovitosti pridonijeti razumijevanju mehanizma djelovanja kojim ekstrakt američkog ginsenga postiže regulaciju glikemije.

2. Sigurnost

Cilj je bio ispitati sigurnost primjene ekstrakta AG što je postignuto praćenjem bubrežne funkcije (serumske koncentracije kreatinina i urata), jetrene funkcije (katalitička koncentracija aspartat aminotransferaze - AST i alanin aminotrasferaze - ALT), vremena krvarenja (protrombinsko vrijeme - PV (% i INR)) te pripadajućih simptoma.

3. Suradljivost

Cilj rada bio je pratiti suradljivost bolesnika, što je postignuto brojanjem vraćenih kapsula biljnog pripravka.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Izrada ekstrakta korijena američkog ginsenga

Udruga Uzgajivača ontarijskog ginsenga (engl. *Ontario Ginseng Growers Association*; Simcoe, Ontario, Canada) pribavila je reprezentativne uzorke korijena američkog ginsenga (AG) četiri i više godina starosti uzgojenih na pet različitih lokacija. Navedeni uzorci osušenog korijena pomiješani su u jednakim omjerima i samljeveni u prašak, kako bi se dobio jednoličan biljni materijal, prikladan za ekstrakciju ginsenosida.

Biljni materijal prelijevan je 70%-tnim etanolom (EtOH : AG = 1:1) i podvrgnut trosatnoj ekstrakciji (> 80 °C), uz povratno hladilo. Nakon filtriranja, udio otapala reduciran je uparavanjem ekstrakta na 50 °C, uz primjenu vakuuma. Ugušćeni ekstrakt osušen je postupkom raspršivanja, a dobiveni suhi ekstrakt praškaste konzistencije čuvan u staklenim spremnicima pri 4 °C. Suhi je ekstrakt kapsuliran, a svaka kapsula sadržavala je 500 mg ekstrakta u kojem je ukupni udio ginsenosida iznosio 10%.

Uzorak završne šarže podvrgnut je kontroli kvalitete i testiranju stabilnosti. Djelatna tvar je kapsulirana u bijele neprozirne kapsule kapaciteta ~ 500 mg (proizvođač Capsugel, IL, SAD) na mjestu gdje se proizvodio ekstrakt američkog ginsenga (Phytopharmaceuticals Corp). Završni kapsulirani proizvod je pakiran u bijele neprozirne bočice veličine 225 cm³ u koje stane 90 kapsula, a zatim zbrinut u skladu sa sanitarnim zahtjevima. Bočice su zapečaćene i čuvane u kartonskim kutijama na sobnoj temperaturi.

3.1.2 HPLC analiza ginsenosida u korijenu američkog ginsenga

Fitokemijski profil ginsenosida u korijenu američkog ginsenga analiziran je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s 'Diode array' UV detektorom (Hewlett Packard 1100 HPLC) na Sveučilištu Ottawa. Srednje vrijednosti udjela ginsenosida u pet različitih biljnih uzoraka prikazane su u tablici 3, a pojedinačni rezultati nalaze se u prilogu 1. Prosječni maseni udio ginsenosida iznosio je 4,09%, od čega je 0,92% protopanaxadiol, a 3,17% protopanaxatriol (Tablica 3). Ustanovljeni međusobni omjeri udjela ginsenosida odgovarali su

literaturnim podacima (73;167-169), te još jednom potvrdili identitet biljne vrste *Panax quinquefolius* L.

Tablica 3. Sažetak analize završne serije AG-a dobivene miješanjem pet pojedinačnih serija u jednakim omjerima

Ginsenozi	Prosje% w/w
Rg1	0,086
Re	0,834
Rf	0
Ukupno PPT	0,92
Rb1	2,558
Rc	0,18
Rb2	0,032
Rd	0,402
Ukupno PPD	3,172
UKUPNO	4,092
PPD:PPT	3,448
Rb ₁ :Rg ₁ *	29,74
Rb ₂ :Rc*	0,17
Rg ₁ :Re*	0,10

*Omjer Rb₁:Rg₁ > 3 (73;168) te omjeri Rb₂:Rc i Rg₁:Re <1 indikativni su za *Panax quinquefolius* L. (167;169)

3.1.3 Zdravstvena ispravnost biljnog materijala

Svih 5 uzoraka korijena ginsenga korištenih za pripremu ekstrakta podvrgnuto je ispitavanju na mikrobiološka onečišćenja, teške metale i pesticide na Sveučilištu Ottawa. Pesticidi su se određivali plinskom kromatografijom, teški metali atomskom apsorpcijskom spektroskopijom, a mikrobiološka onečišćenja prema postupcima koje propisuje farmakopeja za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofila te kvasaca i plijesni (Eu Pharm poglavlje 5.4.1). Rezultati svih analiza potvrdili su da odgovaraju zahtjevima kanadske državne agencije za zdravlje Health Canada (Prilog 2).

3.2 METODE

3.2.1 Dizajn studije

Istraživanje je bilo dizajnirano kao randomizirani, dvostruko prikriveni, placebo kontrolirani pokus s paralelnim skupinama. Clinical Nutrition and Risk Factor Modification Centre St. Michael's bolnice bio je odgovoran za obučavanje, dokumentaciju, istraživačke materijale (ekstrakt suhog korijena AG-a) i ostalu opremu potrebnu istraživačkom centru u Kliničkoj bolnici Dubrava (KBD). Kliničko praćenje bolesnika odvijalo se u istraživačkom centru koji je bio smješten u tercijarnoj zdravstvenoj ustanovi, Zavodu za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb, Hrvatska.

3.2.2 Ispitanici

Probir i regrutiranje ispitanika

Od bolesnika sa ŠBT2 koji redovito posjećuju ambulantu Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KBD odabrani su oni koji su bili podobni za uključivanje u studiju u razdoblju od 15.05.2008. do 04.04.2012. godine. Zainteresirani bolesnici bili su upućeni u detalje protokola studije te su na uvid dobili Informirani pristanak. Nakon što su im objašnjeni ciljevi te moguće koristi i rizici istraživanja svoje dobrovoljno sudjelovanje potvrdili su potpisivanjem Informiranog pristanka. Liječnik istraživač također je potpisao Informirani pristanak te je jedan primjerak dobio bolesnik, a drugi primjerak je pohranjen u arhivu u istraživačkom centru KBD. Nakon toga je provedena vizita probira na koju su potencijalni ispitanici došli ujutro natašte nakon 10-satnog prekonocnog gladovanja, kada su ispunili upitnike te im je izvađena krv da bi se utvrdilo zadovoljavaju li kriterije za uključivanje u studiju. Učinjena su im antropometrijska mjerenja, uzet uzorak krvi iz periferne vene podlaktice te im je izmjeren arterijski tlak i elastičnost arterijske stjenke. Ispitanicima je uzeta detaljna povijest bolesti uključujući medikamentoznu terapiju, OTC pripravke, ostale dodatke prehrani (biljne pripravke, vitamine i minerale) i navike (pušenje cigareta, konzumiranje alkohola, tjelesna aktivnosti i prehrambene navike). Preporučeno im je da tijekom istraživanja nastave uzimati dosadašnju terapiju za ŠBT2 budući da je pripravak AG-a samo dopuna konvencionalnoj

hipoglikemijskoj terapiji. Zamoljeni su da o svakoj promjeni stanja, uzimanju dodatnih lijekova ili biljnih pripravaka na svakoj posjeti obavijeste liječnika i farmaceuta koji provode istraživanje. Također su bili zamoljeni da zadrže isti stupanj tjelesne aktivnosti, pridržavaju se propisane dijeta i uobičajenog stila života tijekom trajanja istraživanja.

Podobnost za sudjelovanje u studiji bila je određena sljedećim kriterijima:

Kriteriji za uključivanje:

- ŠBT2 prisutna najmanje godinu dana te definirana vrijednošću hemoglobina A1c između 6,5% i 8,1%
- terapija dijabetičkom dijetom i/ili neinzulinskim lijekovima koja nije mijenjana najmanje tri mjeseca prije uključivanja u istraživanje
- dob između 40 i 80 godina
- kontroliran arterijski tlak
- uredna funkcija štitnjače
- uredna jetrena i bubrežna funkcija
- pristanak na provođenje protokola istraživanja i potpisan Informirani pristanak
- žene u postmenopauzi (ženama u postmenopauzi smatraju se žene bez menstruacije unatrag najmanje godine dana).

Isključujući kriteriji:

- poremećaji koagulacije
- klinički značajne dijabetičke komplikacije (retinopatija, nefropatija i polineuropatija)
- serumske koncentracije triglicerida od 4,5 mmol/L ili više od toga
- porast HbA1c više od 2% od početne vrijednosti tijekom trajanja studije
- anamnestički podaci o angini pectoris ili preboljelom srčanom infarktu unatrag šest mjeseci od uključivanja u istraživanje
- uzimanje ginsenga ili drugih biljnih pripravaka unatrag 3 mjeseca od uključivanja u istraživanje

- indeks tjelesne mase veći od 35 kg/m^2 uključujući promjene tjelesne mase od dva ili više kg tijekom terapijskog razdoblja
- pušenje cigareta
- unos alkohola veći od dva alkoholna pića na dan
- prisutnost bilo kojeg stanja koje bi moglo, prema mišljenju istraživača, štetiti zdravlju ili sigurnosti bolesnika odnosno negativno utjecati na rezultate istraživanja
- terapija varfarinom, selektivnim inhibitorima ponovne pohrane serotonina i inhibitorima monoamino-oksidge, simpatomimeticima ili lijekovima koji utječu na koncentraciju dušičnog oksida
- poznata ili suspektna neželjena reakcija na bilo koji sastojak ginsenga ili placeba

Uprava za prirodne proizvode Kanade (engl. *Natural Health Products Directorate of Health Canada*) odobrila je istraživačke materijale, a Etičko povjerenstvo St. Michael's bolnice, Etičko povjerenstvo KBD i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dali su pozitivno mišljenje o predloženom protokolu studije. Randomizacija je bila izvršena nasumičnim odabirom brojeva. Ispitanicima su nakon potpisivanja Informiranog pristanka dodijeljeni uzastopni brojevi.

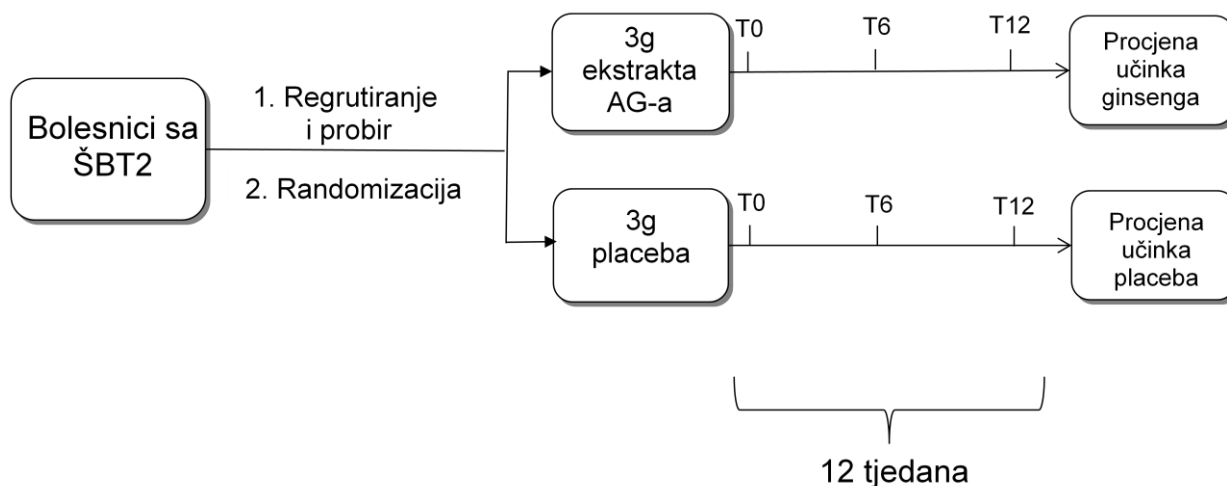
Određivanje potrebnog broja ispitanika

Potrebna veličina uzorka određena je na temelju analize snage testa za faktorsku analizu varijance (Two-way ANOVA) kojom su se testirali rezultati paralelno dizajnirane studije. Pretpostavljena razlika u terapiji u HbA1c (SD = 1,2%) iznosila je 0,75%. Statističko testiranje je provedeno za grešku I vrste $\alpha = 0,05$ i grešku II vrste $\beta = 0,20$, odnosno snagu testa 0,80 (1- β). Na osnovi tih ulaznih pokazatelja određena je potrebna veličina uzorka koja je iznosila 40 ispitanika po skupini. Pretpostavljena standardna devijacija temeljila se na prethodnim opažanjima naše istraživačke skupine kao i na onima drugih istraživača.

3.2.3 Intervencija i tijek istraživanja

Ispitanici su na svakoj viziti dobili nove kapsule AG-a ili placebo s uputom da uzimaju po 2 kapsule od 500 mg prije svakog obroka (6 kapsula dnevno) što odgovara količini od 3 g AG-a ili 3 g placebo dnevno. Kapsule AG-a služile su samo kao dopuna konvencionalnoj hipoglikemijskoj terapiji, dijeti i životnom stilu. Ispitanici su dobili kapsule u količini dovoljnoj za razdoblje do iduće posjete i 3-7 dana nakon posjete zbog eventualnog kašnjenja sljedeće posjete. Kapsule AG-a i placebo podudarale su se po izgledu i sastavu makronutrijenata. Šifriranje terapija radile su osobe koje nisu bile uključene u studiju kako bi postupak liječenja bio prikriven i za ispitanike i za istraživače. Tijekom razdoblja od 12 tjedana bolesnici su posjećivali ambulantu Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma 3 puta; na početku (nulti tjedan) te nakon 6 i 12 tjedana. Prilikom svake posjete bolesnicima su uzimani uzorci krvi natašte, izvršena su antropometrijska mjerenja, mjeren je arterijski tlak i elastičnost arterijske stjenke, izvršena je nadopuna kapsula (druga vizita) te su ispitanici ispunjavali upitnik IQOLA SF-36v2 Standard. Prilikom svake posjete liječnik-istraživač je napravio cjelokupnu kliničku procjenu ispitanika. Ispitanici su također bili zamoljeni da na svaku vizitu vrate prazne i otvorene bočice studijskog biljnog pripravka kako bi se mogla procijeniti suradljivost, nakon čega su bili opskrbljeni novom bočicom studijskog biljnog pripravka. Tijek istraživanja prikazan je na slici 13.

U studiji je još sudjelovalo osposobljeno osoblje za uzimanje krvi, osoblje u medicinsko-biokemijskom laboratoriju koje je provodilo laboratorijska određivanja, liječnik koji je mjerio arterijski tlak i arterijsku elastičnost te vršio cjelokupnu kliničku procjenu te glavni istraživač-farmaceut koji je vršio antropometrijska mjerenja, uzimao detaljnu medikacijsku povijest i životne navike, educirao ispitanike o protoku studije (zamoljeni da zadrže isti stupanj tjelesne aktivnosti, pridržavaju se propisane dijeta i uobičajenog stila života tijekom trajanja istraživanja) te telefonskim pozivima provjeravao suradljivost.



Slika 13. Shematski prikaz tijeka istraživanja

3.2.4 Laboratorijska mjerenja

Uzorci krvi su prilikom svake posjete uzeti iz periferne vene podlaktice nakon 10-satnog prekonocnog gladovanja u ambulanti Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KBD te su analizirani standardnim laboratorijskim metodama u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBD. Uzorci za dobivanje seruma i plazme odmah su po dolasku u laboratorij centrifugirani 10 min na 1370 x g u 35 R Rotina Hettich centrifugi (Tuttlingen, Njemačka), dok su uzorci za koagulacijske pretrage centrifugirani 15 minuta na 1789 x g.

Određivanje glikemijskih pokazatelja

Hemoglobin A1c (HbA_{1c}) je određen imunoinhibicijskim testom (Olympus AU 2700 plus, Beckman-Coulter, Tokyo, Japan), dok je glukoza natašte određena UV spektrometrijskom metodom s heksokinazom (Olympus AU 2700 plus, Beckman-Coulter, Tokyo, Japan). Koncentracija serumskog inzulina određena je enzimskim imunotestom na mikročesticama (engl. *Microparticle Enzyme Immunoassay-MEIA*) (Abbott AxSym, Chicago, IL, USA)

Određivanje ostalih pokazatelja

Ukupni kolesterol (UK) određen je spektrofotometrijskom metodom s kolesterol oksidazom, HDL-kolesterol (engl. *high density lipoproteins*- HDL) homogenom enzimskom metodom, a trigliceridi (TG) UV spektrometrijom na Olympus AU 2700 plus, Beckman-Coulter (Tokyo, Japan).

Serumski LDL-kolesterol (engl. *low density lipoproteins*- LDL) izračunat je pomoću Friedewaldove formule:

LDL kolesterol = ukupni kolesterol - (HDL-kolesterol + trigliceridi/2.2) (170;171).

Ova jednadžba je valjana samo kada su trigliceridi prisutni u koncentraciji manjoj od 4,6 mmol/L (171). Stoga, LDL-kolesterol ne bi mogao biti izračunat za vrijednosti triglicerida veće od 4,6 mmol/L, nego enzimskim testom bojanja.

C-reaktivni protein određen je imunoturbidimetrijskom metodom (Olympus AU 2700 plus, Beckman-Coulter, Tokyo, Japan). Za određivanje protrombinskog vremena (PV) (% i INR) krv je vađena na citratni antikoagulans, nakon čega je određeno vrijeme zgrušavanja (BCS XP, Siemens, Meinheim, Germany). Aspartat transaminaza (AST) određena je UV spektrometrijom, a kreatinin spektrofotometrijom s alkalnim pikratom (Jaffeova metoda) (Olympus AU 2700 plus, Beckman-Coulter, Tokyo, Japan). Alanin aminotransferaza određena je kinetičkim UV testom (Olympus AU 2700 plus, Beckman-Coulter, Tokyo, Japan), a urati spektrofotometrijskom metodom s urikazom (Olympus AU 2700 plus, Beckman-Coulter, Tokyo, Japan).

Određivanje HOMA-IR indeksa

HOMA 1 – originalni HOMA model koristi se vrijednostima glukoze i inzulina natašte za izračunavanje eventualne prisutnosti i stupnja inzulinske rezistencije te za određivanje stupnja funkcionalnosti β -stanica gušterače. HOMA je matematički model interakcije glukoze i inzulina iz kojeg se može odrediti u kojem stupnju se oni kombiniraju pri malim, srednjim i visokim dozama inzulina.

HOMA-IR indeks izračunat je pomoću sljedeće formule:

HOMA - IR = (FPI (mIU/L) x FPG (mM))/ 22,5 (26)

FPI – koncentracija inzulina u serumu natašte (engl. *fasting plasma insulin*)

FPG – koncentracija glukoze u plazmi natašte (engl. *fasting plasma glucose*)

3.2.5 Procjena vaskularne funkcije

Mjerenje arterijskog tlaka

Prilikom svake vizite brahijalni arterijski tlak određivao se oscilometrijski pomoću Omron Digital Automatic Blood Pressure Monitor HEM-9000AI (Healthcare, Kyoto, Japan). Prije mjerenja bolesnici su mirno sjedili 5-10 minuta. Na brahijalnoj arteriji lijeve podlaktice izvršena su tri uzastopna mjerenja s razmakom od 5 minuta između mjerenja (172). Za potrebe analiza koristila se aritmetička sredina triju vrijednosti arterijskog tlaka.

Procjena arterijske elastičnosti analizom valne refleksije

Prilikom prve (nulti tjedan) i zadnje posjete (12. tjedan) određivala se elastičnost arterijske stjenke neinvazivnom tehnikom aplanacijske tonometrije (HEM-9000AI; Omron Healthcare). Na radijalnu arteriju prislonio se tonometar, senzor koji radi na principu pritiska te se odredio augmentacijski indeks temeljem tri uzastopna mjerenja, svaki put kroz razdoblje od 30 sekundi. Za potrebe analiza koristila se aritmetička sredina triju vrijednosti augmentacijskog indeksa.

3.2.6 Suradljivost pri uzimanju terapije

Potrošnja kapsula

Suradljivost bolesnika bila je određena brojanjem vraćenih kapsula studijskog biljnog pripravka. Suradljivost pri uzimanju propisane terapije izračunali smo pomoću sljedeće formule:

Suradljivost (%) = (broj kapsula koje je ispitanik uzeo/broj kapsula koje je trebao uzeti) x100

Antropometrijska mjerenja

Na svakoj viziti bolesnicima je određena visina, tjelesna masa, opseg struka i bokova te je izračunat indeks tjelesne mase (ITM) i načinjena analiza sastava tjelesne mase standardnom opremom i postupcima. Tjelesna masa je mjerena bez cipela te je zaokružena na 0,5 kg, a visina Harpenderovim stadiometrom i zaokružena na 0,5 cm. ITM izračunat je na način da se tjelesna masa u kilogramima (kg) podijelila s kvadratom visine u metrima (m^2). Analiza sastava tjelesne mase određena je bioimpedancijskom metodom na analizatoru sastava tjelesne mase (Genius 220 PLUS)

3.2.7 Statistička analiza

Za određivanje razdiobe podataka i osnovnih statističkih pokazatelja korištena je opisna statistika. Razdioba podataka u odnosu na normalnu razdiobu analizirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom, zasebno za intervencijsku i kontrolnu skupinu. Kao mjere središnje tendencije i varijabilnosti korišteni su prosjek i standardna devijacija u slučajevima normalne razdiobe ili medijan i interkvartilni raspon u slučajevima kada je razdioba odstupala od normalne. Kategorijski podaci prikazani su kao apsolutni i relativni broj (postotak). Za testiranje razlika između intervencijske i kontrolne skupine u odnosu na početne vrijednosti izmjerenih pokazatelja korišten je t-test za neovisne uzorke. U slučaju kada su parametri slijedili normalnu distribuciju, za testiranje razlika između intervencijske i kontrolne skupine i razlika između serijskih mjerenja unutar iste skupine u odnosu na mjerene parametre bila je korištena faktorska analiza varijance (Factorial two-way ANOVA) i Fisher LSD test u okviru analize varijance. Ukoliko su parametri odstupali od normalne distribucije, za testiranje razlike između kontrolne i intervencijske skupine bio je korišten Mann-Whitneyev test, a za testiranje razlike između početnih i krajnjih vrijednosti unutar iste skupine Wicoxonov test. Kategorijski podaci analizirani su hi-kvadrat testom ili Fisherovim egzaktnim testom (u slučaju da je u više od 20% polja tablice kontingencije imalo očekivanu frekvenciju manju od 5). Provedena je analiza po realiziranom protokolu (engl. *per protocol analysis*) gdje su u obradu bili uključeni svi bolesnici koji su ispunili istraživački protokol te čiji su rezultati bili dostupni. Kako bi predrasude bile izbjegnute, aproksimacija konačnih rezultata koji nedostaju nije rađena (2 bolesnika) te su podaci

koji nedostaju automatski isključeni statističkom obradom. Analiza je provedena korištenjem programskog paketa STATISTICA verzije 6.1 (StatSoft Inc, SAD). Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazani su grafički i numerički (tabelarno). Statističko testiranje provedeno je na razini značajnosti od 95% ($\alpha=0,05$).

4 REZULTATI

4.1 DEMOGRAFSKA, ANTROPOMETRIJSKA I KLINIČKA OBILJEŽJA ISPITANIKA NA POČETKU STUDIJE

U istraživanje je prvotno bio uključen 81 bolesnik od kojih je 40 dobivalo AG, a preostalih 41 placebo. Dva sudionika iz intervencijske skupine odustala su na drugoj viziti; jedna bolesnica je bila hospitalizirana zbog mreene oka, a drugoj kapsule nisu odgovarale te je kao razlog navela manjak slobodnog vremena za pridržavanje terapije. Zbog promjene terapije tijekom istraživanja od strane liječnika opće prakse iz statističke obrade isključeno je 5 bolesnika; tri bolesnika iz intervencijske skupine, i dva bolesnika iz kontrolne skupine. Konačno je 74 ispitanika završilo istraživanje od kojih je 35 (47,3%) bilo randomizirano u intervencijsku skupinu, a 39 (52,7%) u kontrolnu skupinu. Budući da su u konačnu obradu uključena 74 ispitanika naknadno je provedena post hoc analiza snage testa. Rezultati su pokazali da je dovoljno 34 ispitanika u intervencijskoj skupini i 38 ispitanika u kontrolnoj skupini kako bi snaga testa i dalje iznosila 0,80 uz $\alpha = 0,05$.

Demografski, antropometrijski i klinički pokazatelji nisu statistički značajno odstupali od normalne razdiobe, pa su vrijednosti tih pokazatelja statistički opisane prosjekom i standardnom devijacijom. Početne vrijednosti demografskih, antropometrijskih i kliničkih pokazatelja prikazane su u tablici 4. Među uspoređivanim skupinama nije bilo statistički značajne razlike u demografskim podacima.

Antropometrijske mjere tjelesna masa, postotak tjelesne masti i opseg struka također se nisu statistički značajno razlikovale između dviju skupina. Međutim, indeks tjelesne mase (ITM) bio je veći u intervencijskoj skupini za 3 kg/m^2 ($P = 0,017$), dok je od kliničkih pokazatelja koncentracija glukoze u plazmi natašte bila veća za 1 mmol/L ($P = 0,043$) u intervencijskoj skupini. S obzirom da nakon 12 tjedana između dviju skupina nije pronađena statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju glukoze u plazmi natašte i ITM, spomenute početne razlike nisu utjecale na daljnje rezultate te korekcija početnih vrijednosti pokazatelja indeksa tjelesne mase i koncentracije glukoze natašte nije bila potrebna.

Tablica 4. Demografski, antropometrijski i klinički pokazatelji u intervencijskoj i kontrolnoj skupini na početku studije.

Karakteristike bolesnika	Skupine		P	
	Intervencijska	Kontrolna		
Veličina uzorka (n)	35	39		
Spol Muški/Ženski	13/22	15/24	0,907	
Dob (godine)	61,97 ± 8,59 42-81	63,67 ± 10,28 43-85	0,447	
Tjelesna masa (kg)	88,07 ± 17,22 62-129	80,96 ± 15,91 58-113	0,071	
ITM (kg/m²)	33,03 ± 5,53 24,91-44,00	30,11 ± 4,68 20,55-44,14	0,017	
%TM	36,81 ± 6,42 22,3 – 48,3	35,35 ± 7,07 2,8 – 43,3	0,530	
OS	105,2 ± 10,07	101,3 ± 11,47	0,131	
Korištenje lijekova (n)	ŠBT2	35	30	0,092*
	AH	35	39	1,000*
	HL	27	34	0,265*
HbA1c (%)	7,18 ± 1,31	6,98 ± 1,21	0,466	
GUP-NT (mmol/L)	8,83 ± 2,64	7,71 ± 1,97	0,043	

ITM- indeks tjelesne mase;%TM- postotak tjelesne masti; OS- opseg struka; ŠBT2- šećerna bolest tipa 2; AH- hipertenzija; HL- hiperlipidemija; HbA1c- hemoglobin A1c; GUP-NT- koncentracija glukoze u plazmi natašte. Razlike između dviju skupina određene su Studentovim-t testom za neovisne uzorke i Hi-kvadrat testom* za kategorijske varijable.

Između uspoređivanih skupina nije bilo statistički značajne razlike u broju lijekova za liječenje ŠBT2, hipertenzije i hiperlipidemije (Tablica 5). Broj bolesnika koji je uzimao monoterapiju u odnosu na tvornički priređene fiksne kombinacije ili kombinacije dvaju i više neinzulinskih lijekova nije se značajno razlikovao između skupina. Također, broj bolesnika koji je uzimao monoterapiju u odnosu na tvornički priređene fiksne kombinacije ili kombinacije dvaju i više antihipertenziva nije se značajno razlikovao između skupina. Oralni hipoglikemici uključivali su sljedeće lijekove: metformin, derivate sulfonilureje, inhibitore dipeptidil peptidaze 4 (DPP-4 inhibitore), akarbozu i tiazolidindione. Osim oralnih hipoglikemika dio bolesnika je liječen agonistima humanog glukagonu sličnog peptida-1 (GLP-1 agonisti). Antihipertenzivi su uključivali ACE-inhibitore, β -blokatore, antagoniste kalcijevih receptora, tiazidne diuretike, blokatore angiotenzinskih receptora, α -blokatore, centralne agoniste α -receptora (moksonidin) te fiksne kombinacije ovih lijekova. Hipolipemici su uključivali statine, fibrate, ezetimib te fiksnu kombinaciju statina i ezetimiba.

Na drugoj posjeti trima bolesnicima iz intervencijske skupine promijenjena je terapija od strane obiteljskih liječnika; dvojici je promijenjena antihipertenzivna terapija (u terapiju uveden moksonidin 0,4 mg dnevno; u terapiju uveden lercapidin 10 mg dnevno), a jednome terapija za ŠBT2 (uveden metformin 850 mg jednom dnevno). Dvoje bolesnika iz kontrolne skupine su promijenili terapiju četiri tjedna nakon početka studije; jednom je terapija irbesartanom 75 mg dnevno zamijenjena za ramipril 5 mg dnevno, a drugom je u terapiju uveden glimepirid 1,5 mg jednom dnevno. Stoga su spomenuti bolesnici isključeni iz analiza na odgovarajući način.

Tablica 5. Početna terapija bolesnika randomiziranih u intervencijsku i kontrolnu skupinu

Terapija	Intervencijska (n)	Kontrolna (n)	P*
Terapija ŠBT2	35	30	
Broj bolesnika koji uzima 1 lijek/ ≥ 2 lijeka	10/25	16/14	0,076
Broj bolesnika koji uzima određene lijekove	MET(25); SU(27); DPP-4 inh(6); GLP-1 ana(1); AKA(3); MET+TZD(1)	MET(23); SU(16); DPP-4 inh(5); GLP-1 ana(0); AKA(1); MET+TZD(0)	
Antihipertenzivi	35	39	
Broj bolesnika koji uzima 1 lijek/ ≥ 2 lijeka**	20/15	21/18	0,960
Broj bolesnika koji uzima određene lijekove	BB (8); CCB (9); ACEi (16); ARB (0); TD (1); α -B (1); ACEi+TD (11); ARB+TD (6); ACEi+CCB (2); moks (2)	BB(5); CCB(9); ACE i (24); ARB(2); TD(3); α -B (1); ACEi+TD(8); ARB+TD(6); ACEi+CCB (3); moks(2)	
Hipolipemici	27	34	
Broj bolesnika koji uzima 1 lijek/ ≥ 2 lijeka**	22/5	30/4	0,707
Broj bolesnika koji uzima određene lijekove	STAT(24); FIB(7); EZE(0); STAT+EZE(1)	STAT(32); FIB(4); EZE (1); STAT+EZE(1)	

* χ^2 test

**tvornički priređene fiksne kombinacije ili kombinacije dvaju i više antihipertenziva

ŠBT2- šećerna bolest tipa 2; MET- metformin; SU- sulfonilureja; DPP-4 inh- DPP-4 inhibitor (inhibitor dipeptidil peptidaze 4); GLP-1 ana- GLP-1 analog (analog humanog glukagonu sličnog peptida-1); AKA- akarboza; TZD- tiazolidindioni; BB- β -blokator; CCB- blokator kalcijevih kanala; ACE i- inhibitori konvertaze angiotenzina; TD- tijazidni diuretici; ARB- blokatori angiotenzin II receptora; α -B- α blokatori; ACEi+TD- fiksna kombinacija inhibitora konvertaze angiotenzina i tijazidnog diuretika; ARB+TD- fiksna kombinacija blokatora angiotenzin II receptora i tijazidnog diuretika; ACEi+CCB- fiksna kombinacija inhibitora konvertaze angiotenzina i blokatora kalcijevih kanala; moks- moksonidin (lijekovi koji djeluju na središnji živčani sustav); STAT- statini; FIB- fibrati; EZE- ezetimib; STAT+EZE- fiksna kombinacija statina i ezetimiba

4.2 UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA POKAZATELJE GLIKEMIJE

4.2.1 Učinak američkog ginsenga na hemoglobin A1c- primarni cilj istraživanja

Razdioba vrijednosti hemoglobina A1c odgovarala je normalnoj razdiobi, što je analizirano Kolmogorov-Smirnovljevim testom, zasebno za intervencijsku skupinu i kontrolnu skupinu ispitanika te smo u njihovoj analizi koristili parametrijske testove. Razlike početnih i krajnjih vrijednosti između dviju skupina usporedili smo koristeći faktorsku analizu varijance. Premda se vrijednost hemoglobina A1c u intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana smanjila za 0,84%, a u kontrolnoj skupini povećala za 2,87%, razlika između vrijednosti HbA1c u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana ipak nije bila statistički značajna ($P = 0,867$) (Tablica 6 i Tablica 7). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje vrijednosti unutar bilo koje skupine, kao ni između početnih vrijednosti HbA1c u kontrolnoj i intervencijskoj skupini. Međutim, razlika vrijednosti HbA1c u intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana bila je veća od pretpostavljene (0,75%). Usporedba učinka AG-a i placeba na HbA1c nakon razdoblja od 12 tjedana prikazana je na slici 14.

No ipak, linearna regresija je pokazala da sniženje vrijednosti hemoglobina A1c u intervencijskoj skupini signifikantno korelira s početnim vrijednostima hemoglobina A1c ($P = 0,008$) (Slika 15), dok isto nije postignuto u kontrolnoj skupini ($P = 0,078$) (Slika 16). U intervencijskoj je skupini u bolesnika s nezadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 ($HbA1c > 7,5\%$) došlo do značajnog sniženja vrijednosti HbA1c u usporedbi s bolesnicima s relativno zadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 ($HbA1c \leq 7,5\%$) ($t = -2,186$; $P = 0,036$) (Slika 17). T-test je pokazao da je u skupini 1 ($HbA1c > 7,5\%$) u prosjeku došlo do sniženja vrijednosti (-0,491), dok je u skupini 2 ($HbA1c \leq 7,5\%$) u prosjeku došlo do porasta vrijednosti (0,245).

Statistički značajne razlike između dviju skupina nije bilo zbog veće varijabilnosti HbA1c vrijednosti nego što je pretpostavljeno kod određivanja potrebnog broja ispitanika. Očekivana SD bila je 1,2%, a SD izmjerenih HbA1c vrijednosti na ovom uzorku iznosila je između 1,3% i 1,4%.

Tablica 6. Promjena vrijednosti HbA1c, koncentracije glukoze u plazmi natašte, koncentracije inzulina u serumu natašte i HOMA-IR indeksa nakon primjene američkog ginsenga i placebo unutar intervencijske i kontrolne skupine

Pokazatelj	KS (n=39)			IS (n=35)		
	T0	T12	Δ (%)	T0	T12	Δ (%)
HbA1c (%)	6,9 ± 1,24	7,2 ± 1,40	-0,20 (2,87)	7,2 ± 1,29	7,1 ± 1,16	0,06 (0,84)
GUP-NT (mmol/L)	7,7 ± 1,97	8,4 ± 2,59	-0,70 (9,08)	8,8 ± 2,64	8,4 ± 1,92	0,39 (4,42)
Inzulin natašte (uIU/ml)	13,3 ± 4,52	16,9 ± 5,67	-3,54 (26,56)	16,4 ± 7,87	14,5 ± 7,99	1,89 (11,54)
HOMA-IR	4,6 ± 1,59	6,4 ± 2,52	-1,78 (-38,44)	6,7 ± 4,90	5,5 ± 3,27	1,27 (18,84)

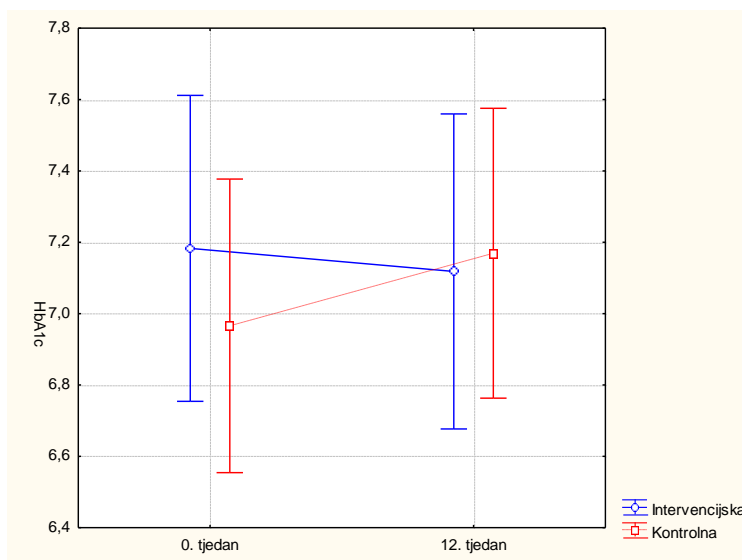
Rezultati izraženi kao srednja vrijednost ± SD; Δ = prosjek T0 – prosjek T12, (%) = Δ / prosjek T0 * 100%
 KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

Tablica 7. Razlika između vrijednosti HbA1c, koncentracije glukoze u plazmi natašte, koncentracije inzulina u serumu natašte i HOMA-IR indeksa u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana

Pokazatelj	KS	IS	T0	T12
	T0 vs T12 [#]	T0 vs T12 [#]	KS vs IS [#]	KS vs IS [#]
HbA1c (%)	0,488	0,836	0,471	0,867
GUP-NT (mmol/L)	0,189	0,490	0,043	0,947
Inzulin natašte (uIU/ml)	0,276	0,289	0,240	0,373
HOMA-IR	0,285	0,174	0,114	0,489

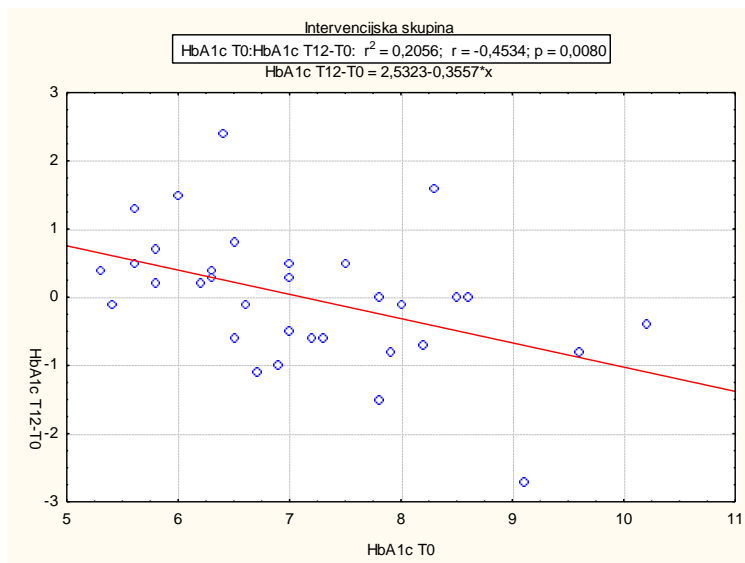
[#] Fisher LSD

KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

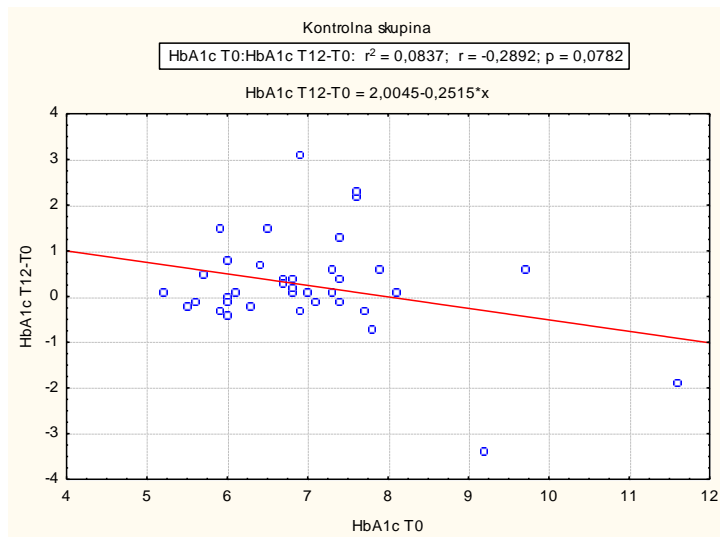


Slika 14. Usporedba učinka američkog ginsenga i placebo na vrijednost hemoglobina A1c (HbA1c)¹

¹ Okomiti rasponi na grafovima predstavljaju 95% intervale pouzdanosti oko prosječne vrijednosti.



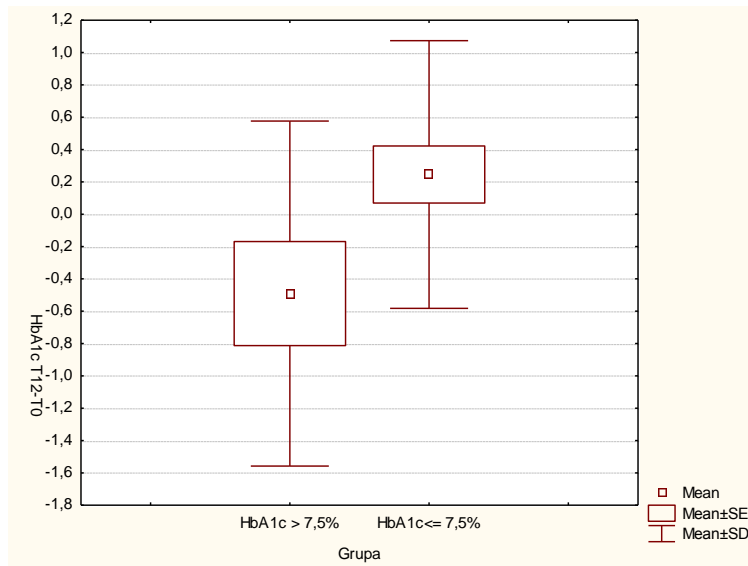
Slika 15. Povezanost između početnih vrijednosti hemoglobina A1c i razlike u vrijednostima nakon 12 tjedana HbA1c T12-T0 u intervencijskoj skupini



Slika 16. Povezanost između početnih vrijednosti hemoglobina A1c i razlike u vrijednostima nakon 12 tjedana HbA1c T12-T0 u kontrolnoj skupini

T-test; grupiranje: Skupina 1: HbA1c > 7,5% Skupina 2: HbA1c ≤ 7,5%

	Srednja vrijednost Skupina 1	Srednja vrijednost Skupina 2	t-value	df	P	N Skupina 1	N Skupina 2	Std.Dev Skupina 1	Std.Dev Skupina 2
HbA1c T12-T0	-0,491	0,245	-2,186	31	0,036	11	22	1,067	0,828



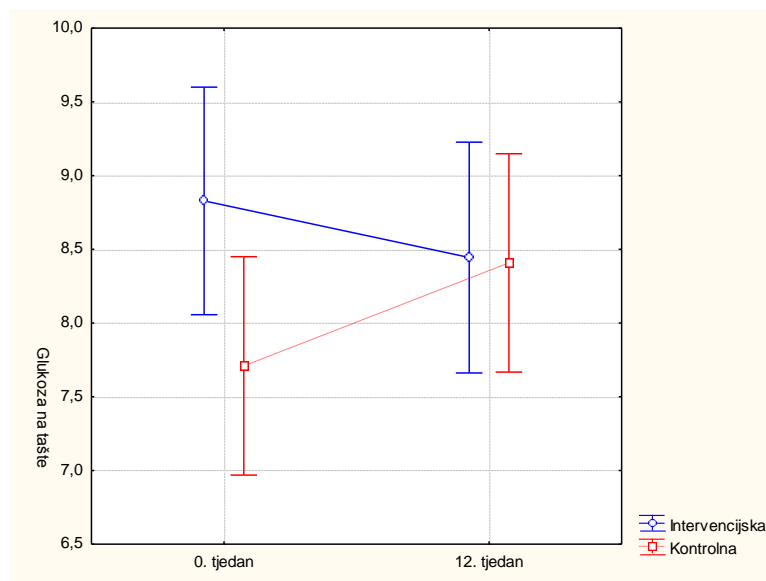
Slika 17. Razlika između skupina HbA1c > 7,5% i HbA1c ≤ 7,5% u odnosu na razliku HbA1c T12 – T0

4.2.2 Učinak američkog ginsenga na sekundarne ciljeve istraživanja

Varijable GUP-NT, inzulina natašte i HOMA-IR indeks bile su normalno raspodijeljene te smo u njihovoj analizi koristili parametrijske testove. Razlike početnih i krajnjih vrijednosti spomenutih varijabli između dviju skupina usporedili smo koristeći faktorsku analizu varijance.

Koncentracija glukoze u plazmi natašte

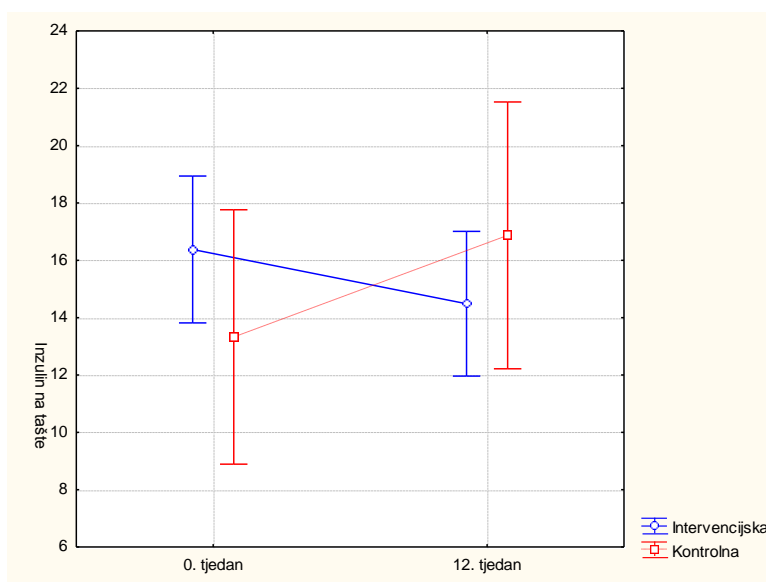
Koncentracija glukoze u plazmi natašte nakon 12 tjedana u kontrolnoj se skupini povećala za 9,08% u odnosu na početne vrijednosti, dok se u intervencijskog skupini smanjila za 4,42%. No ipak, razlika između vrijednosti GUP-NT u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana nije bila statistički značajna ($P = 0,947$) (Tablica 6 i Tablica 7). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje vrijednosti unutar bilo koje skupine, dok je između početnih vrijednosti GUP-NT u kontrolnoj i intervencijskoj skupini pronađena granična statistička značajnost ($P = 0,043$). Usporedba učinka AG-a i placeba na koncentraciju glukoze u plazmi natašte prikazana je na slici 18.



Slika 18. Usporedba učinka američkog ginsenga i placeba na koncentraciju glukoze u plazmi natašte

Koncentracija inzulina u serumu natašte

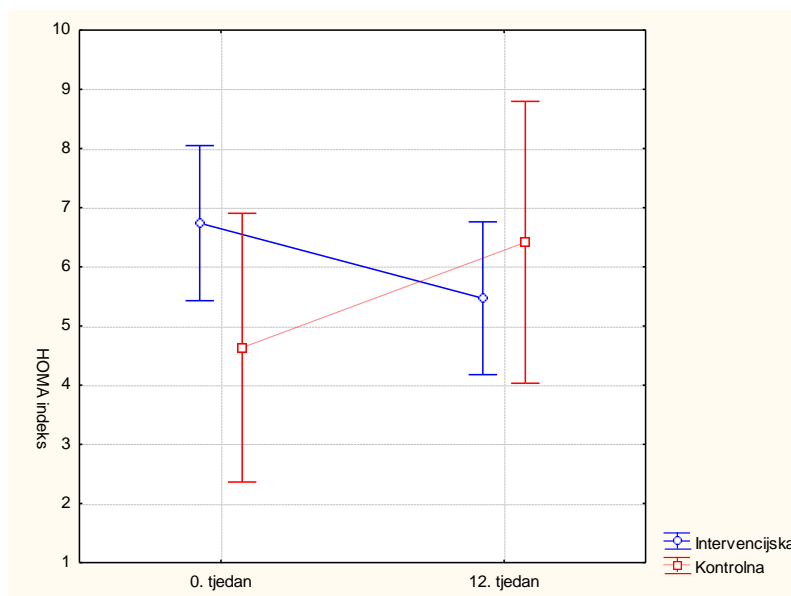
Koncentracija inzulina u serumu natašte nakon 12 tjedana u kontrolnoj se skupini povećala za 26,56% u odnosu na početne vrijednosti, dok se u intervencijskog skupini smanjila za 11,54%. No ipak, razlika između koncentracije inzulina u serumu natašte u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana nije bila statistički značajna ($P = 0,373$) (Tablica 6 i Tablica 7). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje vrijednosti koncentracije inzulina unutar bilo koje skupine, kao ni između početnih vrijednosti koncentracija inzulina u kontrolnoj i intervencijskoj skupini. Usporedba učinka AG-a i placebo na koncentraciju inzulina u serumu natašte prikazana je na slici 19.



Slika 19. Usporedba učinka američkog ginsenga i placebo na koncentraciju inzulina u serumu natašte

Vrijednost HOMA-IR indeksa

Vrijednosti HOMA-IR indeksa nakon 12 tjedana u kontrolnoj su se skupini povećale za 38,44% u odnosu na početne vrijednosti, dok su se u intervencijskog skupini smanjile za 18,84%. No ipak, razlika između vrijednosti HOMA-IR indeksa u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana nije bila statistički značajna ($P = 0,489$) (Tablica 6 i Tablica 7). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje vrijednosti unutar bilo koje skupine, kao ni između početnih vrijednosti HOMA-IR indeksa u kontrolnoj i intervencijskoj skupini. Usporedba učinka AG-a i placeba na vrijednosti HOMA-IR indeksa prikazana je na slici 20.



Slika 20. Usporedba učinka američkog ginsenga i placebo na vrijednost HOMA-IR indeksa

4.3 UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA LIPIDNI PROFIL

Varijable lipidnih pokazatelja bile su normalno raspodijeljene te smo u njihovoj analizi koristili parametrijske testove. Usporedili smo razlike početnih i krajnjih vrijednosti lipidnih varijabli između dvaju skupina faktorskom analizom varijance. Ukupni kolesterol i LDL-kolesterol su se statistički značajno razlikovali među uspoređivanim skupinama, dok kod HDL-kolesterola i triglicerida nije bilo statistički značajne razlike između uspoređivanih skupina (Tablica 8 i Tablica 9).

Tablica 8. Promjena koncentracije ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida nakon uzimanja američkog ginsenga i placeba unutar intervencijske i kontrolne skupine

Pokazatelj	KS (n=39)			IS (n=35)		
	T0	T12	Δ (%)	T0	T12	Δ (%)
UK (mmol/L)	4,7 ± 1,04	4,6 ± 0,99	0,03 (0,64)	5,2 ± 1,36	5,3 ± 1,56	-0,1 (-1,93)
HDL (mmol/L)	1,4 ± 0,38	1,4 ± 0,41	-0,01 (-0,71)	1,3 ± 0,33	1,3 ± 0,29	0,0 (0,00)
LDL (mmol/L)	2,6 ± 0,82	2,5 ± 0,69	0,09 (3,47)	3,0 ± 1,12	3,2 ± 1,23	-0,15 (-4,95)
TG (mmol/L)	1,6 ± 0,91	1,7 ± 1,24	-0,09 (-5,66)	1,9 ± 1,46	1,9 ± 1,17	0,06 (3,06)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD; Δ = prosjek T0 – prosjek T12, (%) = Δ / prosjek T0 * 100%
KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

Tablica 9. Razlika između koncentracija ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana

Pokazatelj	KS	IS	T0	T12
	T0 vs T12 [#]	T0 vs T12 [#]	KS vs IS [#]	KS vs IS [#]
UK (mmol/L)	0,826	0,759	0,103	0,035
HDL (mmol/L)	0,881	0,925	0,436	0,417
LDL (mmol/L)	0,727	0,519	0,062	0,005
TG (mmol/L)	0,819	0,828	0,198	0,412

[#] Fisher LSD

KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

Serumska koncentracija ukupnog kolesterola

Serumske koncentracije ukupnog kolesterola nakon 12 tjedana u kontrolnoj su se skupini smanjile za 0,65% u odnosu na početne vrijednosti, dok su se u intervencijskoj skupini povećale za 1,93%. Razlika između vrijednosti ukupnog kolesterola u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana bila je statistički značajna (P = 0,035) (Tablica 8 i Tablica 9). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje vrijednosti unutar bilo koje skupine, kao ni između početnih koncentracija ukupnog kolesterola u kontrolnoj i intervencijskoj skupini.

Serumska koncentracija HDL-kolesterola

Serumske koncentracije HDL-kolesterola nakon 12 tjedana su u kontrolnoj i intervencijskoj skupini ostale gotovo nepromijenjene te razlika između koncentracija HDL-kolesterola u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana nije bila statistički značajna ($P = 0,417$) (Tablica 8 i Tablica 9). Nije bilo statistički značajne razlike između početnih koncentracija HDL-kolesterola u kontrolnoj i intervencijskoj skupini.

Serumska koncentracija LDL-kolesterola

Serumske koncentracije LDL-kolesterola nakon 12 tjedana u kontrolnoj su se skupini smanjile za 3,47% u odnosu na početne vrijednosti, dok su se u intervencijskoj skupini povećale za 4,95%. Razlika između vrijednosti LDL-kolesterola u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana bila je statistički značajna ($P = 0,005$) (Tablica 8 i Tablica 9). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje koncentracije unutar bilo koje skupine, kao ni između početnih koncentracija LDL-kolesterola u kontrolnoj i intervencijskoj skupini.

Serumska koncentracija triglicerida

Serumske koncentracije triglicerida nakon 12 tjedana u kontrolnoj su se skupini povećale za 5,66% u odnosu na početne vrijednosti, dok su se u intervencijskoj skupini smanjile za 3,06%. Razlika između koncentracija triglicerida u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana nije bila statistički značajna ($P = 0,412$) (Tablica 8 i Tablica 9). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje koncentracije unutar bilo koje skupine, kao ni između početnih koncentracija LDL-kolesterola u kontrolnoj i intervencijskoj skupini.

4.4 UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA SERUMSKU KONCENTRACIJU C-REAKTIVNOG PROTEINA

Varijabla C-reaktivni protein (CRP) nije bila normalno raspodijeljena te se za testiranje koristila neparametrijska statistika. Za testiranje razlike između kontrolne i intervencijske skupine korišten je Mann-Whitneyev test, a za testiranje razlike između početnih i krajnjih vrijednosti unutar iste skupine korišten je Wilcoxonov test. Serumske koncentracije CRP-a nakon 12 tjedana u kontrolnoj su se skupini povećale za 22,2% u odnosu na početne vrijednosti, dok su se u intervencijskoj skupini povećale za 21,8%. Razlika između koncentracija C-reaktivnog proteina u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana nije bila statistički značajna ($P = 0,363$) (Tablica 10 i Tablica 11). Razlika između početnih i krajnjih koncentracija unutar kontrolne skupine nije bila statistički značajna ($P = 0,948$), dok je ista unutar intervencijske skupine bila statistički značajna ($P = 0,011$). Razlika između početnih koncentracija CRP u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nije bila statistički značajna.

Tablica 10. Promjena koncentracije CRP-a nakon uzimanja američkog ginsenga i placebo unutar intervencijske i kontrolne skupine

Pokazatelj	KS (39)			IS (35)		
	T0	T12	Δ (%)	T0	T12	Δ (%)
CRP (mg/L)	1,8	2,2	-0,4 (-22,2)	2,3	2,8	-0,5 (-21,7)
	1,1 – 4,1	1,2 – 4,1		1,2 – 3,6	1,4 – 6,0	

Rezultati su izraženi kao medijan i interkvartilni raspon; Δ = medijan T0 – medijan T12, (%) = Δ / medijan T0 * 100%

KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

Tablica 11. Razlika između koncentracija CRP-a u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana

Pokazatelj	KS	IS	T0	T12
	T0 vs T12 [#]	T0 vs T12 [#]	KS vs IS ^{##}	KS vs IS ^{##}
CRP (mg/L)	0,948	0,011	0,588	0,363

[#] Wilcoxonov test; ^{##} Mann-Whitneyev test

KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

4.5 UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA VASKULARNU FUNKCIJU

Od ukupnog broja bolesnika koji su završili istraživanje (N = 74), 10 bolesnika s neodgovarajuće kontroliranim arterijskim tlakom (SAT > 160 mmHg i DAT > 100 mmHg) dodatno su bili isključeni iz statističke obrade. Konačno je 64 ispitanika bilo uključeno u statističku obradu pokazatelja vaskularne funkcije od kojih ih je 30 (46,8%) bilo randomizirano u intervencijsku skupinu, a 34 (53,1%) u kontrolnu skupinu.

Razdioba podataka sistoličkog i dijastoličkog AT-a, augmentacijskog indeksa (AI), tlaka pulsa i frekvencije srca odgovarala je normalnoj razdiobi te smo u njihovoj analizi koristili parametrijske testove. Usporedili smo razlike početnih i krajnjih vrijednosti vaskularnih pokazatelja između dviju skupina faktorskom analizom varijance.

4.5.1 Učinak američkog ginsenga na arterijski tlak

Sistolički arterijski tlak

Vrijednosti sistoličkog AT-a nakon 12 tjedana su se u kontrolnoj skupini povećale za 0,45% u odnosu na početne vrijednosti, dok su se u intervencijskog skupini smanjile za 11,72% što je bilo statistički značajno ($P < 0,001$). Razlika između vrijednosti sistoličkog AT-a u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana bila je statistički značajna ($P < 0,001$) (Tablica 12 i Tablica 13). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje vrijednosti unutar kontrolne skupine, kao ni između početnih vrijednosti sistoličkog AT-a u kontrolnoj i intervencijskoj skupini. Usporedba učinka AG-a i placeba na sistolički AT prikazana je na slici 21.

Dijastolički arterijski tlak

Vrijednosti dijastoličkog AT-a nakon 12 tjedana značajno su se smanjile u kontrolnoj ($P = 0,003$) i intervencijskoj skupini ($P = 0,002$). Budući da su početne vrijednosti dijastoličkog AT-a približno jednake u obje skupine, ne postoji statistički značajna razlika niti u odnosu na početne vrijednosti, niti u odnosu na vrijednosti nakon 12 tjedana (Tablica 12 i Tablica 13). Usporedba učinka AG-a i placeba na dijastolički AT prikazana je na slici 22.

Tablica 12. Promjena augmentacijskog indeksa, sistoličkog AT-a, dijastoličkog AT-a, tlaka pulsa i srčane frekvencije nakon uzimanja terapije unutar intervencijske i kontrolne skupine

Pokazatelj	KS (34)			IS (30)		
	T0	T12	Δ (%)	T0	T12	Δ (%)
AI (%)	89,5 \pm 13,80	86,9 \pm 9,22	2,59 (2,89)	85,2 \pm 12,53	80,7 \pm 12,36	4,47 (5,25)
SAT (mmHg)	142,6 \pm 11,15	143,2 \pm 16,23	-0,64 (-0,45)	148,5 \pm 9,65	131,1 \pm 13,13	17,40 (11,72)
DAT (mmHg)	84,6 \pm 6,99	78,3 \pm 8,09	6,32 (7,47)	84,9 \pm 9,19	77,8 \pm 10,05	7,16 (8,43)
TP (mmHg)	64,8 \pm 17,59	64,1 \pm 12,61	0,70 (1,08)	62,5 \pm 13,27	56,1 \pm 12,43	6,42 (10,27)
SF (otk/min)	76,7 \pm 10,33	76,8 \pm 9,60	-0,08(-0,1)	80,9 \pm 12,99	81,8 \pm 13,11	-0,84 (-1,04)

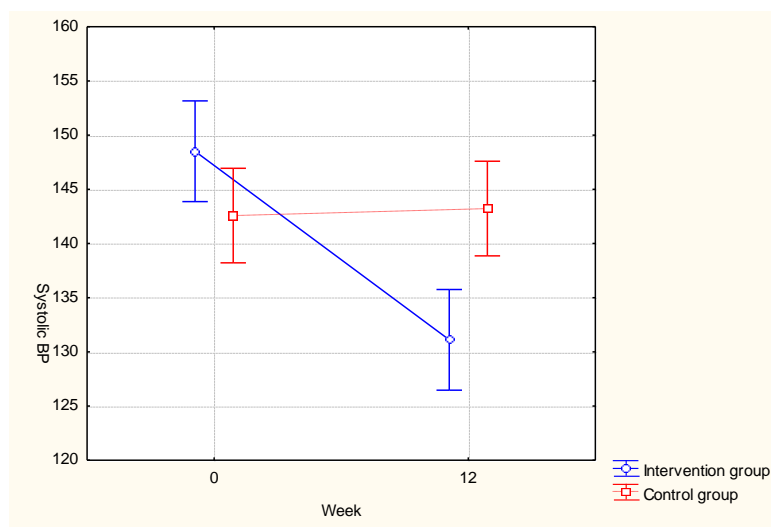
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD; Δ = prosjek T0 – prosjek T12, (%) = Δ / prosjek T0 * 100%
KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan; SAT- sistolički arterijski tlak; DAT- dijastolički arterijski tlak; TP- tlak pulsa; SF- srčana frekvencija

Tablica 13. Razlika između vrijednosti augmentacijskog indeksa, sistoličkog AT-a, dijastoličkog AT-a, tlaka pulsa i srčane frekvencije u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana

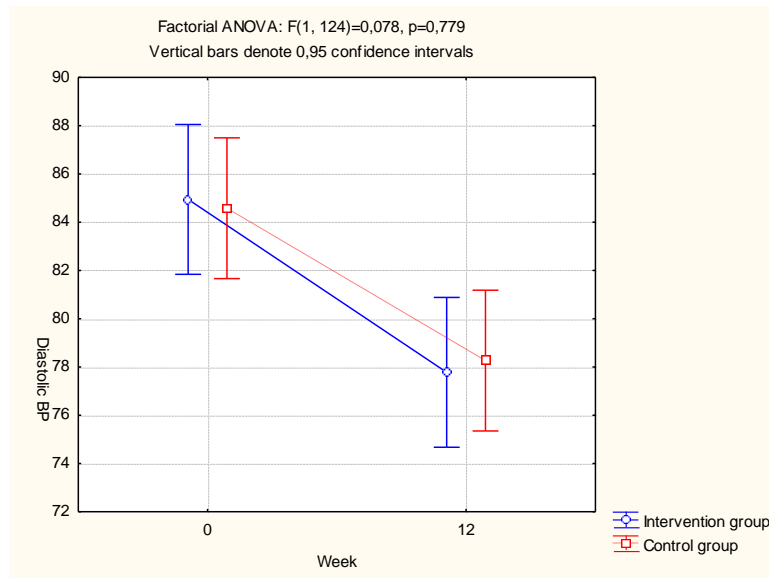
Pokazatelj	KS	IS	T 0	T 12
	T0 vs T12 [#]	T0 vs T12 [#]	KS vs. IS [#]	KS vs. IS [#]
AI (%)	0,378	0,154	0,152	0,041
SAT (mmHg)	0,863	<0,001	0,068	<0,001
DAT (mmHg)	0,003	0,002	0,865	0,821
TP (mmHg)	0,110	0,066	0,689	0,018
SF (otk/min)	0,974	0,780	0,145	0,087

[#] Fisher LSD

KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan



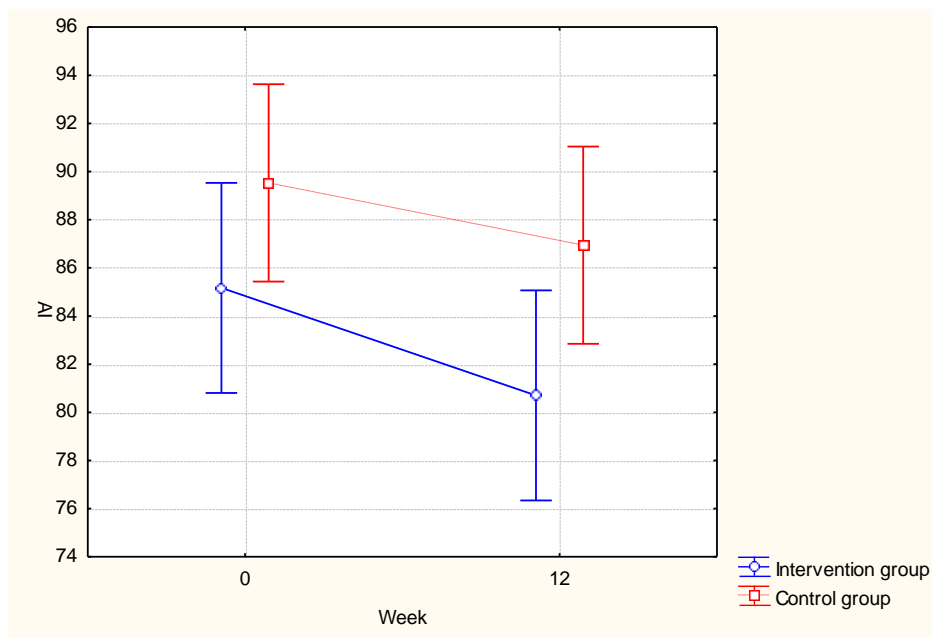
Slika 21. Usporedba učinka američkog ginsenga i placebo na sistolički arterijski tlak



Slika 22. Usporedba učinka američkog ginsenga i placebo na dijastolički arterijski tlak

4.5.2 Učinak američkog ginsenga na elastičnost arterijske stijenke mjereno analizom valne refleksije

Vrijednosti augmentacijskog indeksa nakon 12 tjedana u kontrolnoj su se skupini smanjile za 2,89% u odnosu na početne vrijednosti, dok su se u intervencijskog skupini smanjile za 5,25% što predstavlja gotovo dvostruko veće sniženje nego u kontrolnoj skupini. Razlika između vrijednosti AI u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana bila je statistički značajna ($P = 0,041$) (Tablica 12 i Tablica 13). Nije bilo statistički značajne razlike između početne i krajnje vrijednosti unutar bilo koje skupine, kao ni između početnih vrijednosti varijable AI u kontrolnoj i intervencijskoj skupini. Usporedba učinka AG-a i placebo na AI prikazana je na slici 23.



Slika 23. Usporedba učinka američkog ginsenga i placebo na augmentacijski indeks

4.6 SIGURNOST

Izveštaj o simptomima

Tijekom istraživanja samo je jedan bolesnik iz intervencijske skupine prijavio simptome osjećaja „težine u želucu“. Ostali bolesnici nisu prijavili nuspojave prilikom uzimanja AG-a.

Biokemijske pretrage

Varijable aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, kreatinin, urati i protrombinsko vrijeme mjereno u postotku i međunarodnom normaliziranom omjeru (engl. *international normalized ratio*-INR) bile su normalno raspodijeljene te smo u njihovoj analizi koristili parametrijske testove. Faktorskom analizom varijance utvrdili smo da u biokemijskim pokazateljima sigurnosti nema razlike između početne i krajnje vrijednosti te da je učinak AG na bubrežnu i jetrenu funkciju, kao i na protrombinsko vrijeme siguran (Tablica 14 i Tablica 15).

Tablica 14. Promjena AST-a, ALT-a, kreatinina, urata, PV-a (% i INR) nakon uzimanja američkog ginsenga i placeba unutar intervencijske i kontrolne skupine

Pokazatelj	KS (39)			IS (35)		
	T0	T12	Δ (%)	T0	T12	Δ (%)
AST (U/L)	21,1 ± 7,46	20,9 ± 7,02	0,26 (1,23)	19,6 ± 6,73	18,3 ± 4,17	1,32 (6,74)
ALT (U/L)	24,7 ± 10,95	24,7 ± 11,66	-0,04 (-0,16)	25,5 ± 12,67	23,9 ± 10,25	1,65 (6,47)
Kreatinin (μmol/L)	83,78 ± 18,97	85,0 ± 15,47	-1,28 (-1,49)	82,3 ± 15,85	84,1 ± 15,49	-1,74 (-2,11)
Urati (μmol/L)	309,7 ± 68,21	294,8 ± 79,26	14,9 (4,8)	314,1 ± 82,27	311,9 ± 87,49	2,2 (0,7)
PV (%)	100,3 ± 11,53	101,2 ± 10,78	-0,93 (-0,93)	98,1 ± 8,54	98,7 ± 9,35	-0,58 (-0,59)
INR	0,9 ± 0,08	1,0 ± 0,07	-0,01 (-1,01)	1,0 ± 0,08	0,9 ± 0,05	0,04 (3,96)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD; Δ = prosjek T0 – prosjek T12, (%) = Δ / prosjek T0 * 100%
KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

Tablica 15. Razlika između vrijednosti AST-a, ALT-a, kreatinina, urata, PV-a (% i INR) u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana

Pokazatelj	KS	IS	T0	T12
	T0 vs T12 [#]	T0 vs T12 [#]	KS vs IS [#]	KS vs IS [#]
AST (U/L)	0,868	0,409	0,331	0,107
ALT (U/L)	0,989	0,555	0,760	0,763
Kreatinin (μmol/L)	0,753	0,665	0,726	0,808
Urati (μmol/L)	0,596	0,913	0,853	0,498
PV (%)	0,824	0,804	0,523	0,469
INR	0,918	0,168	0,520	0,413

[#] Fisher LSD

KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

4.7 SURADLJIVOST

Ispitanici nisu mijenjali dozu, vrstu ili oblik pripravaka komplementarne i alternativne medicine koji bi mogli utjecati na kontrolu ŠBT2. Potrošnja ispitivanih studijskih kapsula bila je > 80% za sve ispitanike.

Praćenje antropometrijskih pokazatelja

Pomoću rutinskih antropometrijskih mjerenja (tjelesna masa, opseg struka, indeks tjelesne mase, postotak masti u tijelu) određivali smo podobnost za sudjelovanjem u studiji.

Nije bilo značajnih promjena u prehrani i antropometrijskim pokazateljima od početka do kraja studije (Tablica 16 i Tablica 17). Za ITM se pokazalo da postoji statistički značajna razlika između početne i krajnje vrijednosti u kontrolnoj skupini ($P = 0,014$) s povećanjem od 1,69%. Također, statistički značajna razlika postoji i između kontrolne i intervencijske skupine u odnosu na početne i krajnje vrijednosti indeksa tjelesne mase ($P = 0,039$), s razlikom od oko 3 kg/m^2 .

Tablica 16. Promjena tjelesne mase, indeksa tjelesne mase, % tjelesne masti i opsega struka nakon uzimanja američkog ginsenga i placeba unutar intervencijske i kontrolne skupine

Pokazatelj	KS (39)			IS (35)		
	T0	T12	Δ (%)	T0	T12	Δ (%)
TM (kg)	80,9 ± 15,91	82,1 ± 15,09	-1,12 (-1,38)	88,1 ± 17,22	88,3 ± 17,66	-0,2 (-0,23)
ITM (kg/m²)	30,1 ± 4,69	30,6 ± 4,55	-0,51 (-1,69)	33,0 ± 5,59	33,1 ± 5,59	-0,06 (-0,18)
%TM (%)	35,4 ± 7,08	36,7 ± 5,64	-1,32 (-3,73)	36,8 ± 6,43	37,2 ± 6,09	-0,35 (-0,95)
OS (cm)	101,3 ± 11,47	101,1 ± 11,16	0,24 (0,24)	105,2 ± 10,07	103,9 ± 9,91	1,32 (1,25)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD; Δ = prosjek T0 – prosjek T12, (%) = Δ / prosjek T0 * 100%
KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan; TM- tjelesna masa

Tablica 17. Razlika između vrijednosti tjelesne mase, indeksa tjelesne mase, % tjelesne masti i opsega struka u kontrolnoj i intervencijskoj skupini nakon 12 tjedana

Pokazatelj	KS	IS	T0	T12
	T0 vs T12 [#]	T0 vs T12 [#]	KS vs IS [#]	KS vs IS [#]
TM (kg)	0,766	0,958	0,067	0,108
ITM (kg/m²)	0,014	0,963	0,015	0,039
%TM (%)	0,634	0,816	0,509	0,828
OS (cm)	0,926	0,607	0,131	0,272

[#] Fisher LSD

KS-kontrolna skupina; IS-intervencijska skupina; T-tjedan

Statističkom analizom je utvrđeno da nema razlike između početne i krajnje vrijednosti u antropometrijskim parametrima masa, postotak tjelesne masti i opseg struka te da je učinak američkog ginsenga na antropometrijske parametre zanemariv.

5 RASPRAVA

5.1 UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA POKAZATELJE GLIKEMIJE

Upotreba ekstrakta američkog ginsenga u ovom istraživanju se pokazala sigurnom, ali u usporedbi s placeboom nije imala statistički značajan učinak na parametre glikemije. Međutim, potencijalni klinički značaj rezultata zavređuje pozornost.

Učinak američkog ginsenga na vrijednost hemoglobina A1c-primarni cilj istraživanja

Dodatkom odabranog ekstrakta AG-a konvencionalnoj hipoglikemijskoj terapiji nije povećana klinička učinkovitost u ispitanika s relativno zadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 nakon 12 tjedana intervencije, što je procijenjeno primarnim ishodom mjerenja- hemoglobinom A1c. Premda nije došlo do statistički značajnog sniženja vrijednosti HbA1c, njegova vrijednost se u intervencijskoj skupini smanjila za 0,84% što je više od smanjenja pretpostavljenog prilikom određivanja potrebnog broja ispitanika (0,75%) (Slika 24). Također, spomenuto sniženje usporedivo je s učinkom derivata sulfonilureje (glibenklamid i glimepirid) čije sniženje hemoglobina A1c iznosi oko 0,83% i 0,85% (početna prosječna vrijednost hemoglobina A1c 8,5%) (173).

Nadalje, usporedimo li prosječnu završnu vrijednosti hemoglobina A1c u našoj studiji (HbA1c = 7,12%) s epidemiološkim podacima prosječnih vrijednosti bolesnika te dobi (HbA1c = 7,0% - 8,0%) (174), možemo zaključiti da su ispitanici za vrijeme studije ostali dobro kontrolirani. U tom pogledu, vjerojatnije je da bi u bolesnika s nezadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 moglo doći do statistički značajnog sniženja vrijednosti HbA1c što je i potvrđeno daljnjim analizama. Naime, linearna regresija je pokazala da sniženje vrijednosti HbA1c u intervencijskoj skupini signifikantno korelira s početnim vrijednostima HbA1c; u intervencijskoj skupini je u bolesnika s nezadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 (HbA1c > 7,5%) došlo do značajnog sniženja vrijednosti HbA1c dok isto nije postignuto u bolesnika s relativno zadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 (HbA1c ≤ 7,5%). T-test je pokazao da je u bolesnika s nezadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 u prosjeku došlo do sniženja vrijednosti, dok je u bolesnika s relativno zadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 došlo do porasta vrijednosti.

S druge strane, u kontrolnoj skupini primijećen je uzlazni trend vrijednosti HbA1c za 2,87% koji se dijelom može objasniti progresivnom prirodom same bolesti (175), no može biti i posljedica normalnih fluktuacija te je potrebno dulje praćenje bolesnika. U bolesnika u

intervencijskoj skupini uspjeli smo postići obustavljanje postupnog porasta vrijednosti hemoglobina A1c, dok isto nije postignuto u kontrolnoj skupini. Međutim, budući da se radi o bolesnicima s relativno dobro reguliranom ŠBT2 s obzirom na svoju dob i ostale komorbiditete, i ovo, iako statistički nesignifikantno sniženje hemoglobina A1c smatramo ohrabrujućim i potencijalno klinički značajnim. Važno je napomenuti da su svi ispitanici u obje skupine nastavili s redovitim uzimanjem neinzulinske terapije, prilagođenom prehranom, tjelesnom aktivnošću i/ili ostalom propisanom terapijom tijekom istraživanja.

Jasno je, također, da neke od zadanih ciljeva, kao što su ciljne vrijednosti HbA1c od 6,5% (45;46), neće uvijek biti moguće postići. Starijim i težim bolesnicima s dugogodišnjom ŠBT2 i srčano-žilnim bolestima tako niska regulacija neće pomoći te bi se za tu skupinu bolesnika trebale uzeti u obzir nešto više ciljne vrijednosti HbA1c (174). Tri velika multicentrična istraživanja, provedena na starijim bolesnicima (dob 60-66 godina) s dijagnosticiranom ŠBT2 i bilo kojim od brojnih rizičnih čimbenika ili prijašnjim srčano-žilnim događajem, ispitivala su hoće li intenzivnija kontrola glikemije smanjiti rizik od SŽ-ih bolesti (176-178). Rezultati istraživanja nisu pokazali povoljan učinak intenzivne kontrole glikemije na kombinirane makrovaskularne ishode istraživanja. Povrh toga, intenzivna kontrola glikemije bila je povezana s dobitkom na tjelesnoj masi i 2-3 puta većom stopom ozbiljnih hipoglikemija.

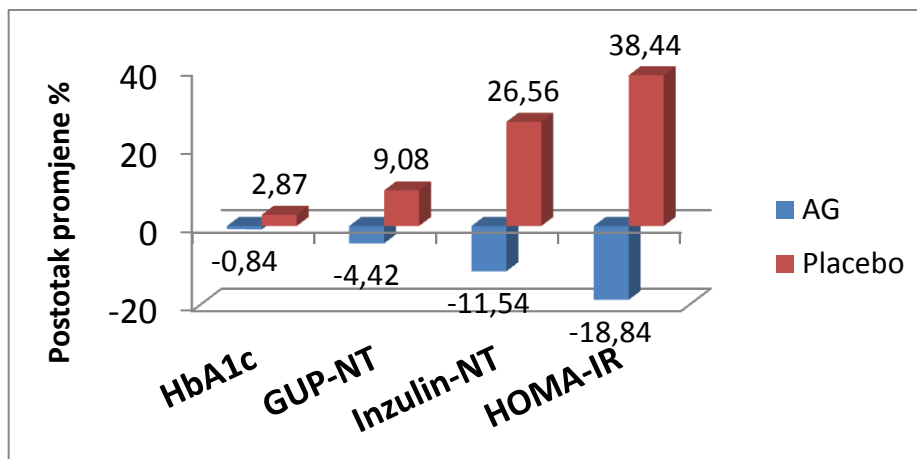
Istraživanja koja su ispitivala dugoročni učinak ginsenga na glikemijske pokazatelje polučila su oprečne rezultate te su djelomično u skladu s rezultatima naše studije. Dugoročno, dvostruko prikriveno, placebo-kontrolirano, križno istraživanje provedeno na 24 ispitanika s dobro kontroliranom ŠBT2 ispitivalo je utjecaj 1 g ekstrakta američkog ginsenga vrste CNT 2000 uzetog 3 puta dnevno na glikemiju u razdoblju od 8 tjedana (126). Primarni ishod studije, vrijednost HbA1c, bio je statistički značajno niži za $4,2 \pm 1,4\%$ u intervencijskoj skupini te su autori zaključili da ekstrakt AG-a u dozi od 3 g dnevno može učinkovito i sigurno poboljšati kontrolu ŠBT2. Povrh toga, u kontrolnoj skupini došlo je do statistički neznačajnog porasta vrijednosti HbA1c (126), što je u skladu s rezultatom dobivenim u našoj studiji. Suprotno spomenutom istraživanju, križna studija koja je ispitivala utjecaj crvenokorejskog ginsenga u dozi od 6 g dnevno u 19 bolesnika sa ŠBT2 pokazala je da nema statistički značajnog učinka na HbA1c, ni unutar intervencijske skupine niti između dvaju skupina nakon 12 tjedana terapije. Međutim, ŠBT2 ostala je dobro kontrolirana u obje skupine (HbA1c = 6,5%) (179). Rezultati ovih studija upućuju na ograničene i proturječne pronalaskе u literaturi, ali upućuju na činjenicu

da bi AG i CKG mogli posjedovati potencijal u poboljšanju glikemije. Daljnja istraživanja su stoga neophodna upravo kod lošije reguliranih bolesnika.

Premda klinička učinkovitost, procijenjena prema hemoglobinu A1c, nije dokazana, dopuna osnovne antihiperглиkemijske terapije odabranim ekstraktom AG-a u trajanju od 12 tjedana nije pogoršala kontrolu glikemije u bolesnika s prethodno uspostavljenom dobrom regulacijom ŠBT2. Međutim, opažena značajna redukcija vrijednosti HbA1c u maloj subpopulaciji slabije reguliranih bolesnika (N = 11, HbA1c > 7,5%), upućuje na moguću učinkovitost ginsenga u poboljšavanju glikemijske kontrole u usporedbi s placeboom, što tek treba potvrditi u nastavku istraživanja.

Učinak američkog ginsenga na sekundarne ciljeve istraživanja

Odabrani ekstrakt AG-a smanjio je koncentraciju glukoze u plazmi natašte za 4,42%, koncentraciju inzulina u serumu natašte za 11,54% i vrijednost HOMA-IR indeksa za 18,84%, bez statistički značajne razlike između uspoređivanih skupina (Slika 24). S druge strane, u kontrolnoj skupini primijećen je uzlazni trend koncentracije glukoze u plazmi natašte za 9,08%, koncentracije inzulina u serumu natašte za 26,56% te HOMA-IR indeksa za 38,44% (Slika 24). Premda između uspoređivanih skupina nakon 12 tjedana nije bilo statistički značajne razlike, u bolesnika u intervencijskoj skupini primijećeno je postupno snižavanje glikemijskih pokazatelja, dok isto nije postignuto u kontrolnoj skupini. Takav rezultat može se objasniti s jedne strane progresivnom prirodom same bolesti, a s druge strane velikom biološkom varijabilnošću glukoze i inzulina.



Slika 24. Usporedba učinka AG-a i placeba na vrijednosti HbA1c, koncentraciju GUP-a u plazmi natašte, koncentraciju inzulina u serumu natašte i HOMA-IR indeks.

Rezultati naše studije djelomično su u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja. Suprotno rezultatima Vuksana i suradnika (180) koji su u akutnoj studiji provedenoj na 8 zdravih ispitanika primijetili da je primjena 6 g AG-a dovela do dvostrukog povećanja inzulinske sekrecije unutar prvih 45 min nakon 75 g oGTT-a, mi smo primijetili diskretno snižavanje koncentracije inzulina usprkos kojeg se regulacija glikemije zadržala, odnosno koncentracija glukoze u plazmi snižavala. To znači da se koncentracija glukoze u plazmi nije smanjila zbog porasta koncentracije inzulina, nego usprkos sniženja njegove koncentracije. Istovremeno snižavanje koncentracije inzulina i GUP-a natašte upućuje na mogući utjecaj AG-a na inzulinsku rezistenciju, budući da s manje inzulina možemo postići bolju regulaciju glikemije što se i potvrdilo snižavanjem HOMA-IR indeksa za 18,84%. Smanjenje inzulinske rezistencije smanjuje i potrebu za inzulinom u bazalnim uvjetima, što je klinički iznimno značajno u bolesnika s tipom 2 šećerne bolesti s hiperinzulinemijom. Ista studija (180) je pokazala da je 6 g pripravka originalne serije AG-a, korištene u prethodnih 5 istraživanja (86;88;121;122;127;180), dovelo do sniženja koncentracije GUP-NT nakon 75 g oGTT-a ($P < 0,05$). Ovi rezultati su u skladu sa sniženjem pronađenim u studijama gdje su zdravi ispitanici (86;88) kao i oni sa ŠBT2 (121;122) dobivali originalne serije AG-a u dozi od 1-9 g. Trend porasta koncentracije inzulina u serumu primijećen je i u istraživanju gdje je dopuna ekstraktom američkog ginsenga vrste CNT2000 u dozi od 3 g u razdoblju od 8 tjedana dovela do povećanja koncentracije inzulina u serumu za 25,41% ($P = 0,12$) uz istovremeno snižavanje koncentracije glukoze u plazmi natašte u usporedbi s placebom ($P = 0,008$) (126). Za pretpostaviti je da je snižavanje koncentracije

inzulina u serumu primijećeno u našoj studiji dugoročni povoljan učinak AG-a. U skladu s pronalaskom naše studije, dvostruko-prikriveno, randomizirano, križno istraživanje koje je ispitalo učinak 6 g CKG-a na regulaciju glikemije (2g po obroku= 6g dnevno) u razdoblju od 12 tjedana na 19 ispitanika pronašlo je sniženje koncentracije inzulina u serumu natašte i inzulina nakon 75 g oGTT-a za 33-38% u usporedbi s placebom (179). No, za razliku od našeg istraživanja, spomenuto sniženje bilo je statistički značajno. Nadalje, kratkoročno, randomizirano, jednostruko prikriveno istraživanje koji je ispitalo utjecaj druge serije AG-a u dozi od 6 g, s različitim ginsenoziidnim profilom, nije pronašlo značajan učinak AG-a ni na koncentraciju GUP-NT niti koncentraciju inzulina natašte kao ni na indeks inzulinske osjetljivosti u 12 zdravih ispitanika nakon 75 g oGTT-a (180). Ispitivana serija AG-a nije uspjela reproducirati postprandijalne hipoglikemijske učinke opažene u prethodnim studijama. Moguće objašnjenje nepodudarnosti između studija leži u smanjenom udjelu ukupnih ginsenozida i glavnih omjera PPD:PPT, Rb₁:Rg₁, i Rb₂:Rc. Temeljem rezultata ove studije možemo pretpostaviti da je ginsenoziidni profil AG-a jedan od čimbenika zaslužnih za hipoglikemijske učinke.

Rezultati naše studije mogli bi se objasniti s jednim ili više predloženih mehanizama djelovanja ginsenga. Mehanizmi kojima različiti izvori ginsenga i njihove biloški aktivne tvari imaju učinak na glukozu i regulaciju metabolizma nisu u potpunosti jasni. Temeljem rastućeg broja informacija dobivenih iz *in vitro* i istraživanja na životinjama, smatra se da bi ginseng mogao djelovati na 4 moguća načina: I) smanjenjem apsorpcije ugljikohidrata (181); II) povećavanjem inzulinske sekrecije i njegovog vezivanja za membranske receptore (182); III) povećavanjem utoka glukoze u različite stanice (primjerice stanice jetara hiperglikemičnih miševa (183), eritrocite ovaca (184), stanice mozga zečeva (185) itd.); te IV) preraspodjelom glukoze (povećavanjem njenog odstranjivanja) (65;110). Zajedno, ova temeljna istraživanja mehanizama u *in vitro* i na životinjskim modelima ŠBT2 pružaju biološku plauzibilnost za različite vrste, ekstrakte i pripravke ginsenga kod kojih se na različitim kliničkim modelima pokazalo da poboljšavaju glikemijsku i metaboličku regulaciju. Navedena istraživanja pružaju također izravan dokaz uloge ginsenozida i panaksana kao posrednika u ovim poboljšanjima. Ovi podaci upućuju na potrebu za boljim razjašnjenjem razlika glikemijskih učinaka i mehanizama djelovanja između različitih komponenata ginsenga.

Dosadašnji ograničeni broj istraživanja upućuje da bi američki ginseng mogao biti djelotvoran u regulaciji glikemije u bolesnika sa ŠBT2 na način da, slično kao i derivati sulfonilureje, povećava postprandijalnu koncentraciju inzulina u serumu. Naše istraživanje nije pratilo postprandijalnu koncentraciju inzulina, nego koncentraciju inzulina natašte te su rezultati pokazali da ju snižava. Za pretpostaviti je da je snižavanje koncentracije inzulina u serumu natašte primijećeno u našoj studiji dugoročni učinak američkog ginsenga.

5.2 UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA LIPIDNI PROFIL

Odabrani ekstrakt AG-a smanjio je serumsku koncentraciju triglicerida za 3,06%, dok je u kontrolnoj skupini primijećeno povećanje za 5,66%, bez statistički značajne razlike između uspoređivanih skupina. Serumaska koncentracija HDL-kolesterola nakon 12 tjedana ostala je gotovo nepromijenjena. Nadalje, odabrani ekstrakt AG-a doveo je do povećanja serumske koncentracije ukupnog kolesterola za 1,93% i LDL-kolesterola za 4,95%, dok je u kontrolnoj skupini došlo do smanjenja serumske koncentracije ukupnog kolesterola za 0,65% i LDL-kolesterola za 3,47%. Rezultati naše studije, iako neočekivani, djelomično su u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja.

Ograničen broj istraživanja koja su ispitivala učinak ginsenga na lipidne pokazatelje pokazala su da različiti izvori ginsenga (vrste, šarže), kao i njihove kombinacije s viskoznim, topljivim prehrambenim vlaknima mogu imati hipolipemički učinak u odabranim skupinama ispitanika. U dugoročnom, randomiziranom, dvostruko prikrivenom, križnom istraživanju, odabrani ekstrakt AG-a primijenjen u dozi od 1 g tri puta dnevno 40 minuta prije obroka (3 g dnevno) smanjio je serumsku koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola kao i omjer ukupnog kolesterola i HDL kolesterola te doveo do diskretnog, neznačajnog porasta serumske koncentracije HDL kolesterola u bolesnika sa ŠBT2 (186). Slični rezultati dobiveni su i dugoročnim, randomiziranim, dvostruko prikrivenim, križnim istraživanjem koje je ispitivalo učinkovitost i sigurnost uporabe kombinacije odabrane serije ekstrakta američkog ginsenga i proizvoda na bazi gela biljke Konjac mannan bogatih prehrambenim vlaknima (187). Nakon 12 tjedana kombinirane terapije došlo je sniženja serumske koncentracije ukupnog kolesterola za 7%, LDL-kolesterola za 10% i apolipoproteina B100 (apoB100) za 9,9% u usporedbi s placebom u 30 bolesnika s dobro reguliranom ŠBT2 (187). Suprotno spomenutom istraživanju, križna

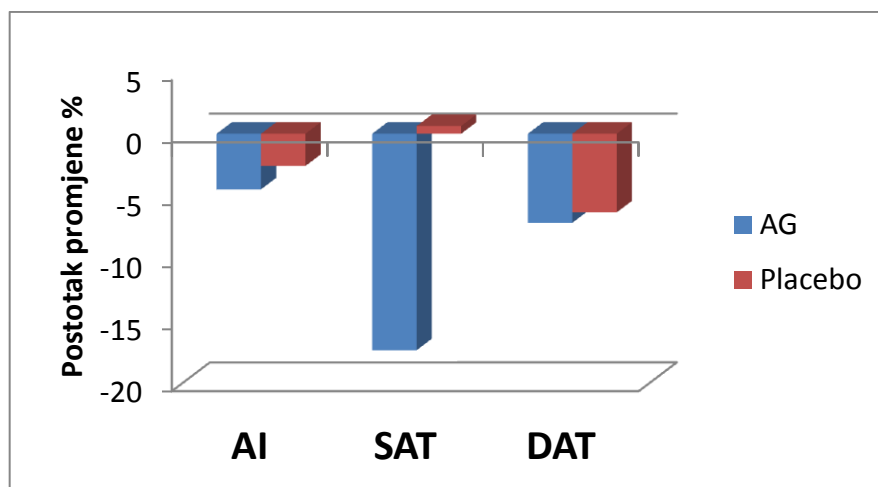
studija koja je ispitala utjecaj crvenokorejskog ginsenga u dozi od 6 g dnevno u 19 bolesnika sa ŠBT2 pokazala je da nema statistički značajnog učinka na ukupni kolesterol, kao ni na ostale lipidne pokazatelje nakon 12 tjedana terapije. Primijećen je samo silazni trend koncentracije LDL-kolesterola nakon 12 tjedana terapije (179). Nadalje, sustavni pregled učinaka ginsenga na srčano-žilne rizične čimbenike polučio je nedosljedne rezultate s obzirom na lipidne pokazatelje (188). Od ukupno 9 studija koje su ispitivale učinak ginsenga na lipidne pokazatelje (3 randomizirana klinička ispitivanja, 6 nerandomiziranih studija), njih pet je našlo statistički značajno poboljšanje jednog ili više lipidnih pokazatelja u usporedbi s početnim vrijednostima ili s placebom (188). Autori su zaključili da trenutni dokazi ne podržavaju upotrebu ginsenga u liječenju srčano-žilnih rizičnih čimbenika, premda je moguće da su neke relevantne studije izostavljene iz analize.

Bolesnici sa ŠBT2 često imaju pridružene i ostale srčano-žilne rizične čimbenike, poput pretilosti, dislipidemije i hipertenzije te su pod povećanim rizikom za nastanak srčano-žilnih događaja (43). Prema standardima medicinske skrbi u ŠBT2 Američkog dijabetološkog društva iz 2014. godine, ciljne vrijednosti LDL-kolesterola iznose manje od 2,6 mmol/L, triglicerida manje od 1,7 mmol/L te HDL-kolesterola više od 1,0 mmol/L u muškaraca i 1,3 mmol/L u žena (43). S obzirom da u našoj studiji prosječna vrijednost LDL-kolesterola iznosi 2,8 mmol/L, triglicerida 1,75 mmol/L te HDL-kolesterola 1,35 mmol/L, možemo zaključiti da su ispitanici za vrijeme studije ostali relativno dobro kontrolirani, odnosno da se radi o bolesnicima s relativno zadovoljavajuće reguliranim lipidnim pokazateljima.

5.3 UČINAK AMERIČKOG GINSENGA NA VASKULARNU FUNKCIJU

Odabrani ekstrakt AG-a doveo je do statistički značajnog sniženja sistoličkog AT-a za 11,72% i augmentacijskog indeksa za 5,25% nakon 12 tjedana intervencije (Slika 25). S druge strane, u kontrolnoj skupini primijećen je diskretni uzlazni trend sistoličkog AT-a za 0,45%, te silazni trend AI-a za 2,89% (Slika 25). Ovi rezultati upućuju na činjenicu da je raniji povratak reflektiranog vala, što je karakteristika manje elastičnih arterijskih stjenki u hipertenziji, povezan s porastom sistoličkog AT-a. Stoga je do uočenih promjena u AI-u došlo ovisno o učincima na sistolički AT (154). Prijašnja istraživanja koja su procjenjivala vazodilatacijski potencijal čitavog korijena AG-a (150-153), demonstrirala su ili povoljne (152;153) ili neutralne učinke (150;151)

na AT u bolesnika s hipertenzijom ili ŠBT2. U studiji koja je koristila ekstrakt AG-a vrste CNT2000 u dozi od 3 g dnevno došlo je do statistički značajnog sniženja sistoličkog i dijastoličkog AT-a u 24 bolesnika sa ŠBT2 (152). Dodatno, Xu i suradnici su pronašli sniženje sistoličkog AT-a za 5,6 mm Hg u bolesnika sa ŠBT2 koji su konzumirali AG (153).



Slika 25. Usporedba učinka AG-a i placeba na AI, SAT i DAT.

Usprkos značajnom utjecaju na SAT, u dijastoličkom AT-u nije bilo promjene niti u jednoj od skupina. U starijih bolesnika s pratećim srčano-žilnim rizikom, hipertenziju karakterizira visok sistolički AT i visok tlak pulsa (189). Viši SAT, ukoliko se ne liječi, može dovesti do ubrzanog smanjenja arterijske elastičnosti velikih arterija i na taj način ovjekovječiti začarani krug (189). Ove karakteristike su u skladu s našim uzorkom u kojem je prosječna dob 63 godine. Stoga je i bilo za očekivati da će najveća promjena biti u sistoličkom arterijskom tlaku, što je i dodatno potvrđeno smanjenjem vrijednosti augmentacijskog indeksa.

Nadalje, skupina ispitanika uključena u naše istraživanje imala je i hipertenziju i ŠBT2. Stoga, kako bi bolje razumjeli utjecaj veze doza-učinak na bolesnike s oba komorbiditeta, potrebna su daljnja istraživanja.

5.4 FORMULACIJA GINSENOZIDA

Međusobni omjer ginsenozida u ispitivanom fitopreparatu zaštićen je kao ekstrakt komercijalnog proizvoda te se kao takav nije mogao mijenjati. Predložena formulacija i izbor biljnog materijala temeljio se na rezultatima prethodnih studija, zbog čega su se i očekivali pozitivni rezultati. Stoga je ključna usporedba fitokemijskog sastava ispitivanog pripravka s pripravcima iz prethodnih istraživanja, da bi se mogla bolje razjasniti učinkovitost pojedinih bioaktivnih sastavnica.

Klinička ispitivanja provedena u Clinical Nutrition and Risk Factor Modification Centre St. Michael's bolnice otkrila su ginsenzoidne profile AG-a povezane s njegovom učinkovitošću, a odnose se na ukupni sadržaj ginsenozida i omjer PPD:PPT (87). Prethodno je pronađeno da korijen AG-a za izradu učinkovite formulacije ima 3,54% ukupnih ginsenozida i PPD/PPT omjer 2,4. Ukupni sastav ginsenozida u našoj studiji iznosi 4,09%, a omjer PPD:PPT 3,45, iz čega je razvidno da ukupni sastav ginsenozida i omjer PPD:PPT prekoračuje prethodno navedeni (Tablica 18).

Razmatrajući sastav ginsenozida naše serije ekstrakta AG-a i serija iz drugih studija vidljivo je da postoje razlike i da zapravo nisu definirani ginsenzoidi zaslužni za hipoglikemijsko djelovanje. Različite rezultate moguće je objasniti izraženom varijabilnošću sastava ginsenozida između serija AG-a, pa iz navedenog proizlazi zaključak da je potrebna bolja standardizacija ekstrakata na udio ginsenozida.

Tablica 18. Usporedba ginsenzoidnih profila pripravka iz naše studije s profilom drugih pripravaka dokazane učinkovitosti.

Ginsenzoidi	Prosjeak % w/w	
	Sadašnje	Prijašnje
Rg1	0,086	0,13
Re	0,834	0,91
Ukupno PPT	0,92	1,04
Rb1	2,558	1,34
Rc	0,18	0,46
Rb2	0,032	0,08
Rd	0,402	0,62
Ukupno PPD	3,172	2,50
UKUPNO	4,092	3,54
PPD:PPT	3,448	2,40

Nadalje, premda se ginsenzoidi smatraju aktivnim komponentama ginsenga, moguće je da je učinkovitost ginsenga povezana s ostalim komponentama. Te bi komponente mogle djelovati na glikemiju neovisno ili u interakciji s ginsenzoidima.

Alternativno, cjelokupnost sastavnih djelova ginsenga mogla bi biti odgovorna za njegova povoljna svojstva. Potencijalne interakcije sastavnih djelova ginsenga do danas nisu istražene; međutim, cjelokupnost korijena istraživala se u studijama u kojima je primjenjivan neprerađen korijen ginsenga, poput akutnih studija koje je provela naša suradna istraživačka skupina u Clinical Nutrition and Risk Factor Modification Centre u St. Michael's bolnici (*American Ginseng Clinical Testing Program*) (88;121-123;190). To se razlikuje od sadašnjeg istraživanja koje je koristilo etanolni ekstrakt ginsenga.

Varijabilnost sastava ginsenga i analitičkih metoda

Varijabilnost sastava ginsenga možete biti rezultat uzgoja i metoda obrade biljnog materijala te analitičkih metoda za određivanje sastava. Može se ustanoviti između različitih djelova biljke te čak različitih djelova korijena unutar iste biljke (189;191;192). U pokušaju kvantificiranja količine varijabilnosti aktivnih komponenata iz ginsenga, provedena je meta-analiza koeficijenta-varijacije ginsenzoida za vrstu ginsenga, analitičku metodu i vrstu ginsenzoida koja je u spomenutim parametrima pokazala veliku varijabilnost sastava ginsenzoida

(84;87). Koeficijent varijacije različitih vrsta ginsenga bio je u širokom rasponu 26-103%, ginsenozidnih profila 36-112%, a analitičkih metoda kojima su ginsenozidi bili određeni 31-81% (84). Ovi izvori odstupanja smanjuju mogućnost usporedbi istraživanja o ginsengu. Etanolni ekstrakt AG-a korišten u našoj studiji drugačiji je od onih ranije korištenih, s različitim bioaktivnim komponentama i višim udjelom ukupnih ginsenozida. Zbog razlika u sastavu, rezultati dobiveni od jedne vrste ginsenga ne mogu se primijeniti na druge ili čak iste vrste ginsenga.

Metode uzgoja, proizvodnje i obrade biljnog materijala također pridonose varijabilnosti gotovih proizvoda, za što je dokaze pružila akutna studija koja je ispitala pet različitih izvora AG-a s ontarijskih farmi (194). Studija je pronašla značajnu redukciju postprandijalne glikemije nakon akutne primjene ginsenga s dvije od pet farmi, dok za ginseng s preostalih farmi nije pronašla nikakav učinak (194). Razlike u raspoloživosti nutrijenata, poput sastava tla i sadržaja vlage, mogu utjecati na sastav ginsenga te mogu poslužiti za objašnjenje tih rezultata (55). Slično, metode obrade također pridonose varijabilnosti te uključuju razlike u metodama ekstrakcije, od korištene tehnike do izbora otapala (191).

Regulatorna tijela pokušavaju smanjiti takve izvore varijacija, a time i potencijal varijabilne djelotvornosti, uvodeći dobre poljoprivredne i proizvodne postupke (195;196). Health Canada je uvela proizvodna pravila, dok je Udruga Uzgajivača ontarijskog ginsenga (engl. *Ontario Ginseng Growers Association*) implementirala strategije za dobru poljoprivrednu praksu (195;196). Nadalje, 1993. godine je od strane Američkog botaničkog vijeća (engl. *American Botanical Council*) pokrenut Program za evaluaciju ginsenga (engl. *Ginseng Evaluation Program*), u kojem su HPLC-UV tehnikom analize profilirani komercijalni ginseng proizvodi. Rezultati su pokazali značajnu varijaciju između ginsenozidnih profila navedenih na oznakama proizvoda i onih otkrivenih unutar programa (55). Nalazi Programa za evaluaciju ginsenga vode ka standardizaciji HPLC-a kao analitičke metode za profiliranje komercijalnih proizvoda ginsenga. Ipak, i dalje postoje razlike u analizi korištenoj unutar te metodologije (84).

Rastuća popularnost prirodnih proizvoda poput ginsenga te manjak dokaza o njihovoj sigurnosti i učinkovitosti, zahtijevaju daljnja istraživanja iz ovog područja. Rezultati ovog istraživanja naglašavaju potrebu za strožom standardizacijom i regulacijom pripravaka ginsenga.

5.5 OGRANIČENJA STUDIJE

Studija je imala nekoliko ograničenja koja pri interpretaciji rezultata moramo uzeti u obzir.

1) Veličina uzorka

Premda je potrebna veličina uzorka određena na temelju analize snage testa za faktorsku analizu varijance, mogući uzrok nepokazivanja statističke signifikantnosti parametra HbA1c je veća varijabilnost HbA1c vrijednosti nego što se pretpostavilo kod određivanja potrebnog broja ispitanika. Za pretpostaviti je da bi se kod većeg uzorka mogla pokazati statistički značajna razlika u glikemijskim pokazateljima jer veći uzorak smanjuje standardnu pogrešku o kojoj ovisi hoće li razlika biti statistički signifikantna.

2) Utjecaj antihipertenziva na arterijski tlak

Premda su ispitanici bili upućeni da ne uzimaju antihipertenzive u jutro prije uzimanja ekstrakta AG-a, svakako su ih uzeli 12-24 sata prije što je moglo imati rezidualan utjecaj na arterijski tlak. No ipak, ispitanici su dobili detaljne upute o pridržavanju propisanog lijeka, doze i vremena uzimanja svojih antihipertenziva te se spomenuto nije razlikovalo između dvaju skupina.

3) Varijabilnost ginsenzida

Rezultate nije moguće generalizirati u odnosu na druge izvore AG-a ili druge vrste ekstrakata ginsenga. Velika varijabilnost ginsenzida, detektirana u različitim izvorima ginsenga i različitim metodama ekstrakcije (84), može rezultirati s jednako velikom varijabilnošću učinkovitosti i sigurnosti između različitih serija AG-a. Nadalje, potrebno je izvršiti dodatne uvide u potencijalne vazoaktivne razlike između korijena i ekstrakta. U nedostatku učinkovitosti koja se temelji na standardizaciji, oprezno treba pristupiti upotrebi ginsenga s ciljem poboljšanja glikemijskih i endotelnih pokazatelja. Unatoč tomu, AG s usklađenim omjerom PPD:PPT ginsenzida mogao bi pokazati sličnu učinkovitost.

4) Ograničenje kliničkog modela

U ovo istraživanje uključeni su bolesnici s prethodno uspostavljenom zadovoljavajućom kontrolom šećerne bolesti tipa 2, kod kojih se održavanje stabilne prosječne glikemije, mjerene preko HbA1c, smatra željenim ciljem u liječenju. Pozitivan trend sniženja HbA1c u intervencijskoj skupini u ovom istraživanju, kao i značajan učinak na malom broju ispitanika s relativno lošijom kontrolom glikemije ($\text{HbA1c} > 7,5\%$) su ohrabrujući, ali preliminarni rezultati te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo utječu li ginsenosidi te koja vrsta i u kojoj dozi, na regulaciju glikemije u bolesnika s nezadovoljavajuće reguliranom ŠBT2.

6 ZAKLJUČCI

U okviru ovog doktorskog rada ispitana je učinkovitost i sigurnost etanolnog ekstrakta korijena američkog ginsenga (AG) kao dopune uobičajenoj terapiji ŠBT2 (prehrana i/ili lijekovi), koristeći randomizirani, dvostruko-slijepi, placebo-kontrolirani, paralelni dizajn studije. Uz to, dobiveni su rezultati pridonijeli razumijevanju mehanizma djelovanja ekstrakta korijena AG-a u regulaciji glikemije u bolesnika sa ŠTB2.

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Ekstrakt američkog ginsenga nije pokazao pozitivan klinički utjecaj na regulaciju glikemije u bolesnika sa zadovoljavajuće reguliranom šećernom bolešću tipa 2 i pratećom hipertenzijom.
 - Primjenom ekstrakta američkog ginsenga u bolesnika s lošije reguliranom ŠBT2 ($HbA1c > 7,5\%$) postignuta je bolja regulaciju glikemije nego u bolesnika s relativno zadovoljavajuće reguliranom ŠBT2 ($HbA1c \leq 7,5\%$).
 - Ekstrakt američkog ginsenga posjeduje potencijal za održavanje homeostaze glukoze u krvi u bolesnika sa ŠBT2, liječenih neinzulinskim lijekovima.
 - S obzirom na trend promjena vrijednosti hemoglobina A1c, koncentracije glukoze u plazmi natašte, koncentracije inzulina u serumu natašte te vrijednosti HOMA-IR indeksa, bez statističke značajnosti u odabranoj skupini bolesnika (glikemijski relativno zadovoljavajuće reguliranih bolesnika bez hiperinzulinemije), istraživanje bi imalo smisla proširiti na bolesnike s lošije reguliranom ŠBT2.
- Primjena ekstrakta američkog ginsenga pridonosi smanjenju inzulinske rezistencije na što upućuje relativno sniženje vrijednosti HOMA-IR indeksa. Istovremeno snižavanje koncentracije inzulina natašte i glukoze natašte upućuje na mogući utjecaj AG-a na inzulinsku rezistenciju budući da s manje inzulina možemo postići bolju regulaciju glikemije.
- Uporaba ekstrakta američkog ginsenga smanjuje augmentacijski indeks, čime povećava elastičnost arterijske stijenke u bolesnika sa ŠBT2 i pratećom hipertenzijom.
- Ekstrakt američkog ginsenga ima potencijalnu preventivnu, dugoročnu kliničku učinkovitost kao dopuna uobičajenoj antihipertenzivnoj terapiji u bolesnika sa ŠBT2 jer je pokazano da smanjuje sistolički arterijski tlak u ovih bolesnika.

- Uporaba ekstrakta američkog ginsenga pokazala se sigurnom u bolesnika sa ŠBT2 budući da primjena ekstrakta korijena AG-a nije utjecala na čimbenike koagulacije, jetrenu i bubrežnu funkciju.
- Uporaba ekstrakta američkog ginsenga ima pozitivan klinički utjecaj na C-reaktivni protein.
- Provedeno istraživanje upućuje na važnost odabira biljnog materijala i varijabilnost fitokemijskog sastava AG kako bi se osigurao očekivani terapijski učinak. Sastav ginsenzida ispitivane serije ekstrakta AG (ukupni sastav ginsenzida 4,09%, a PPD/PPT omjer 3,45) različit je od sastava serija iz drugih studija, pa moguće objašnjenje različitih rezultata između studija leži u različitom sastavu ginsenzida između različitih serija AG-a iz čega proizlazi zaključak da je potrebna bolja standardizacija ginsenzida.
- Provedena studija je potvrdila da je primjena prethodno određenog najučinkovitijeg ginsenzidnog profila korijena američkog ginsenga (udio ukupnih ginsenzida $\geq 3,21\%$; omjer PPD:PPT ginsenzida $\geq 2,44$), vremena primjene i doze ekstrakta učinkovita u održavanju glikemije u bolesnika sa ŠBT2.
- Temeljem rezultata rada predloženi hipotetski mehanizam djelovanja u bolesnika sa ŠBT2 i pratećom hipertenzijom, kojeg do danas podržavaju prekliničke studije, mogao bi biti povećanje inzulinske osjetljivosti.
- Potrebne su daljnje dugoročne studije s ekstraktima različitog profila ginsenzida, širokim rasponom doza i većim ispitivanim uzorkom prije formiranja konačnih preporuka za uporabu američkog ginsenga u liječenju šećerne bolesti tipa 2.

7 LITERATURA

- (1) Poljičanin T. Epidemiologija i klasifikacija šećerna bolesti. In: Vrca Botica M, Pavlić-Renar I, editors. Šećerna bolest u odraslih. Zagreb: Školska knjiga, d.d.; 2012. p. 2-7.
- (2) International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2013. Report No.: 6th edn.
- (3) Khambalia A, Phongsavan P, Smith BJ, Keke K, Dan L, Fitzhardinge A, et al. Prevalence and risk factors of diabetes and impaired fasting glucose in Nauru. *BMC Public Health* 2011;11:719.
- (4) Poljičanin T. Epidemiologija i klasifikacija šećerne bolesti. In: Vrca Botica M, Pavlić-Renar I, editors. Šećerna bolest u odraslih. Zagreb: Školska knjiga, d.d.; 2012. p. 9-17.
- (5) Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Izvješće za 2012. Nacionalni registar osoba sa šećernom bolešću CroDiab. 2013.
- (6) Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, et al. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87(3):293-301.
- (7) Home PD, Pacini G. Hepatic dysfunction and insulin insensitivity in type 2 diabetes mellitus: a critical target for insulin-sensitizing agents. *Diabetes Obes Metab* 2008;10(9):699-718.
- (8) Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005;365(9467):1333-46.
- (9) Tibaldi J. Preserving Insulin Secretion in Type 2 Diabetes Mellitus. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* 2008;3(2):147-59.
- (10) Langin D. Diabetes, insulin secretion, and the pancreatic beta-cell mitochondrion. *N Engl J Med* 2001;345(24):1772-4.
- (11) Pratley RE, Weyer C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44(8):929-45.
- (12) Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 1993;329(27):1988-92.
- (13) Pimenta W, Korytkowski M, Mitrakou A, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Evron W, et al. Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion in NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative. *JAMA* 1995;273(23):1855-61.
- (14) Wing SS. The UPS in diabetes and obesity. *BMC Biochem* 2008;9 Suppl 1:S6.
- (15) Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology* 2010;204(1):1-11.

- (16) Tibaldi J. Importance of postprandial glucose levels as a target for glycemic control in type 2 diabetes. *South Med J* 2009;102(1):60-6.
- (17) Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 2004;47(3):581-9.
- (18) Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(8):1595-608.
- (19) Flakoll PJ, Jensen MD, Cherrington AD. Physiologic action of insulin. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. 3rd ed. Lippincott, Williams & Wilkins; 2004. p. 165-81.
- (20) Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes* 2004 Nov;53(11):2735-40.
- (21) Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med* 2003;4 Suppl 6:S11-S18.
- (22) Reaven GM. Insulin resistance and its consequences. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. In: LeRoith D, Olefsky JM, Taylor SI, editors. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2004. p. 899-915.
- (23) Reaven GM. Insulin resistance, compensatory hyperinsulinemia, and coronary heart disease: syndrome X revisited. In: Jefferson LS, Cherrington AD, editors. *Handbook of Physiology, The Endocrine System, The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*. New York: Oxford University Press; 2001. p. 1169-97.
- (24) Sivitz WI. Lipotoxicity and glucotoxicity in type 2 diabetes. Effects on development and progression. *Postgrad Med* 2001;109(4):55-4.
- (25) Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106(2):171-6.
- (26) Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294(1):E15-E26.
- (27) Pinkney J. Clinical research methods in diabetes. In: Pickup J, Williams G, editors. *Textbook of Diabetes*. 3rd ed. Masden, Mass:Blackwell Science; 2003. p. 1-20.
- (28) Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27(6):1487-95.
- (29) Cobelli C, Toffolo GM, Dalla MC, Campioni M, Denti P, Caumo A, et al. Assessment of beta-cell function in humans, simultaneously with insulin sensitivity and hepatic

- extraction, from intravenous and oral glucose tests. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(1):E1-E15.
- (30) Canadian Diabetes Association. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Canadian Journal of Diabetes* 2008;32:S1-S201.
- (31) Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H, et al. Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* 1999;48(2):292-8.
- (32) Moore MC, Connolly CC, Cherrington AD. Autoregulation of hepatic glucose production. *Eur J Endocrinol* 1998;138(3):240-8.
- (33) Lewis GF, Vranic M, Giacca A. Glucagon enhances the direct suppressive effect of insulin on hepatic glucose production in humans. *Am J Physiol* 1997;272(3 Pt 1):E371-E378.
- (34) Lewis GF, Vranic M, Harley P, Giacca A. Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans. *Diabetes* 1997;46(7):1111-9.
- (35) Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(23):10878-82.
- (36) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365(9468):1415-28.
- (37) Bergman RN. Pathogenesis and prediction of diabetes mellitus: lessons from integrative physiology. *Mt Sinai J Med* 2002;69(5):280-90.
- (38) Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van de WG, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284(5):E863-E873.
- (39) Lewis GF, Zinman B, Groenewoud Y, Vranic M, Giacca A. Hepatic glucose production is regulated both by direct hepatic and extrahepatic effects of insulin in humans. *Diabetes* 1996;45(4):454-62.
- (40) Kokic S. Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2. In: Kurir Tičinović T, editor. *Patofiziologija endokrinopatija – odabrana poglavlja*. Split: Redak; 2013. p. 61-75.
- (41) Kokic S. Patofiziologija šećerne bolesti tipa 2. In: Tičinović Kurir T, editor. *Patofiziologija Endokrinopatija odabrana poglavlja*. Split: Redak; 2013. p. 61-75.
- (42) Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000;321(7258):405-12.

- (43) American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes- 2013. *Diabetes Care* 2013;36(Supplement 1):S11-S66.
- (44) International Diabetes Federation, Clinical Guideline Taskforce. *Global Guideline for Type 2 Diabetes*. 2012.
- (45) Kokić S, Prašek M, Pavlić Renar I, Rahelić D, Pavić E, Jandrić Balen M, et al. Hrvatske smjernice za liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix* 2011;(Suplement 2):8-34.
- (46) Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012;35(6):1364-79.
- (47) Pavlić-Renar I. Kontrola hiperglikemije, praćenje i liječenje. In: Vrca Botica M, Pavlić-Renar I, editors. *Šećerna bolest u odraslih*. Zagreb: Školska knjiga, d.d.; 2012. p. 40-111.
- (48) Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van RM, et al. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA* 1998;280(18):1569-75.
- (49) National Center for Complementary and Alternative Medicine. *CAM basics*. U.S. Department of Health and Human Services; 2013.
- (50) Barnes PM, Bloom B, Nahin RL. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. *National Health Statistics Reports* 2008;(12):1-23.
- (51) Pravilnik o dodacima prehrani (Narodne novine br. 126/2013). 2013.
- (52) Payne C. Complementary and Integrative Medicine: Emerging Therapies for Diabetes, Part 1. *Diabetes Spectrum* 2001;14:129-31.
- (53) Yeh GY, Eisenberg DM, Davis RB, Phillips RS. Use of complementary and alternative medicine among persons with diabetes mellitus: results of a national survey. *Am J Public Health* 2002;92(10):1648-52.
- (54) Yeh GY, Eisenberg DM, Kaptchuk TJ, Phillips RS. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(4):1277-94.
- (55) Jia L, Zhao Y. Current evaluation of the millennium phytomedicine--ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations. *Curr Med Chem* 2009;16(19):2475-84.
- (56) Kuštrak D. Ginseng radix - ginsengov korijen. *Farmakognozija, Fitofarmacija*. Zagreb: Golden markering-Tehnička knjiga; 2005. p. 512-518.

- (57) Choi H, Wen J. A phylogenetic analysis of *Panax* (Araliaceae): Integrating cpDNA restriction site and nuclear rDNA ITS sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 2000;224(1-2):109-20.
- (58) Choi KT. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C A Meyer. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29(9):1109-18.
- (59) Christensen LP. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv Food Nutr Res* 2009;55:1-99.
- (60) Yun TK. Brief introduction of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J Korean Med Sci* 2001;16 Suppl:S3-S5.
- (61) Vogler BK, Pittler MH, Ernst E. The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1999;55(8):567-75.
- (62) Christensen LP, Jensen M, Kidmose U. Simultaneous determination of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng root (*Panax quinquefolium* L.) by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 2006;54(24):8995-9003.
- (63) Fuzzati N. Analysis methods of ginsenosides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;812(1-2):119-33.
- (64) World Health Organization. *Radix Panacis Quinquefolii*. WHO monograph on selected medicinal plants. Volume 4. 2009. p. 226-257.
- (65) Attele AS, Zhou YP, Xie JT, Wu JA, Zhang L, Dey L, et al. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes* 2002;51(6):1851-8.
- (66) Luo JZ, Luo L. Ginseng on hyperglycemia: effects and mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009;6(4):423-7.
- (67) Angelova N, Kong HW, van der Heijden R, Yang SY, Choi YH, Kim HK, et al. Recent methodology in the phytochemical analysis of ginseng. *Phytochem Anal* 2008;19(1):2-16.
- (68) Park IH, Han SB, Kim JM, Piao L, Kwon SW, Kim NY, et al. Four new acetylated ginsenosides from processed ginseng (sun ginseng). *Arch Pharm Res* 2002;25(6):837-41.
- (69) Tawab MA, Bahr U, Karas M, Wurglics M, Schubert-Zsilavec M. Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. *Drug Metab Dispos* 2003;31(8):1065-71.
- (70) Han BH, Park MH, Han YN, Woo LK, Sankawa U, Yahara S, et al. Degradation of ginseng saponins under mild acidic conditions. *Planta Med* 1982;44(3):146-9.

- (71) Hasegawa H, Sung JH, Matsumiya S, Uchiyama M. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Med* 1996;62(5):453-7.
- (72) Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 1999;58(11):1685-93.
- (73) Awang D. The Neglected Ginsenosides of North American Ginseng (*Panax guiquefolius* L.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 2000;7(2):103-9.
- (74) Li W, Gu C, Zhang H, Awang DV, Fitzloff JF, Fong HH, et al. Use of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to distinguish *Panax ginseng* C. A. Meyer (Asian ginseng) and *Panax quinquefolius* L. (North American ginseng). *Anal Chem* 2000;72(21):5417-22.
- (75) Chan TW, But PP, Cheng SW, Kwok IM, Lau FW, Xu HX. Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and ginseng products by using HPLC/MS. *Anal Chem* 2000;72(6):1281-7.
- (76) Nguyen MD, Kasai R, Ohtani K, Ito A, Nguyen TN, Yamasaki K, et al. Saponins from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* HA et Grushv. Collected in central Vietnam. II. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1994;42(1):115-22.
- (77) Yamaguchi H, Kasai R, Matsuura H, Tanaka O, Fuwa T. High-performance liquid chromatographic analysis of acidic saponins of ginseng and related plants. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1988;36(9):3468-73.
- (78) Li T, Mazza G, Cottrell AC, Gao L. Ginsenosides in roots and leaves of American ginseng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996;44:717-20.
- (79) Yamaguchi H, Matsuura H, Kasai R, Tanaka O, Satake M, Kohda H, et al. Analysis of saponins of wild *Panax ginseng*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1988;36(10):4177-81.
- (80) Soldati F, Tanaka O. *Panax ginseng*: Relation between Age of Plant and Content of Ginsenosides. *Planta Med* 1984;50(4):351-2.
- (81) Harkey MR, Henderson GL, Gershwin ME, Stern JS, Hackman RM. Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6):1101-6.
- (82) Cui J. Identification and quantification of ginsenosides in various commercial ginseng preparations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1995;3(2):77-85.
- (83) Fitzloff JF, Yat P, Lu ZZ, Awang D, Arnason JT, van Breeman RB, et al. Perspectives on the quality control assurance of ginseng products in North America. In: *Advances in Ginseng Research – Proceedings of the 7th International Symposium on Ginseng*. Huh H, Choi KJ, Kim YC, editors. Seoul, Korea: The Korean Society of Ginseng, 1998. p. 138-145.

- (84) Sievenpiper JL, Arnason JT, Vidgen E, Leiter LA, Vuksan V. A systematic quantitative analysis of the literature of the high variability in ginseng (*Panax* spp.): should ginseng be trusted in diabetes? *Diabetes Care* 2004;27(3):839-40.
- (85) Vuksan V, Sievenpiper JL, Wong J, Xu Z, Beljan-Zdravkovic U, Arnason JT, et al. American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) attenuates postprandial glycemia in a time-dependent but not dose-dependent manner in healthy individuals. *Am J Clin Nutr* 2001;73(4):753-8.
- (86) Vuksan V, Sievenpiper J, Xu Z, Beljan-Zdravkovic U, Jenkins AL, Arnason JT, et al. Ginseng and diabetes: a new way to use an old medicine. *Canadian Journal of Diabetes Care* 2001;25(Supplement 2):111-20.
- (87) Vuksan V, Sievenpiper JL. Herbal remedies in the management of diabetes: lessons learned from the study of ginseng. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2005;15(3):149-60.
- (88) Vuksan V, Stavro MP, Sievenpiper JL, Koo VY, Wong E, Beljan-Zdravkovic U, et al. American ginseng improves glycemia in individuals with normal glucose tolerance: effect of dose and time escalation. *Journal of the American College of Nutrition* 2000;19(6):738-44.
- (89) Lee NH, Son CG. Systematic review of randomized controlled trials evaluating the efficacy and safety of ginseng. *J Acupunct Meridian Stud* 2011;4(2):85-97.
- (90) Qu C, Bai Y, Jin X, Wang Y, Zhang K, You J, et al. Study on ginsenosides in different parts and ages of *Panax quinquefolius* L. *Food Chemistry* 2009;115(1):340-6.
- (91) Chang TC, Huang SF, Yang TC, Chan FN, Lin HC, Chang WL. Effect of ginsenosides on glucose uptake in human Caco-2 cells is mediated through altered Na⁺/glucose cotransporter 1 expression. *J Agric Food Chem* 2007;55(5):1993-8.
- (92) Han GC, Ko SK, Sung JH, Chung SH. Compound K enhances insulin secretion with beneficial metabolic effects in db/db mice. *J Agric Food Chem* 2007;55(26):10641-8.
- (93) Park MW, Ha J, Chung SH. 20(S)-ginsenoside Rg3 enhances glucose-stimulated insulin secretion and activates AMPK. *Biol Pharm Bull* 2008;31(4):748-51.
- (94) Zhang Z, Li X, Lv W, Yang Y, Gao H, Yang J, et al. Ginsenoside Re reduces insulin resistance through inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase and nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 2008;22(1):186-95.
- (95) Shang W, Yang Y, Zhou L, Jiang B, Jin H, Chen M. Ginsenoside Rb1 stimulates glucose uptake through insulin-like signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 2008;198(3):561-9.
- (96) Park S, Ahn IS, Kwon DY, Ko BS, Jun WK. Ginsenosides Rb1 and Rg1 suppress triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes and enhance beta-cell insulin secretion

- and viability in Min6 cells via PKA-dependent pathways. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72(11):2815-23.
- (97) Park SM, Hong SM, Sung SR, Lee JE, Kwon DY. Extracts of *Rehmanniae radix*, *Ginseng radix* and *Scutellariae radix* improve glucose-stimulated insulin secretion and beta-cell proliferation through IRS2 induction. *Genes Nutr* 2008;2(4):347-51.
- (98) Kim K, Kim HY. Korean red ginseng stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *J Ethnopharmacol* 2008;120(2):190-5.
- (99) Lin E, Wang Y, Mehendale S, Sun S, Wang CZ, Xie JT, et al. Antioxidant protection by American ginseng in pancreatic beta-cells. *Am J Chin Med* 2008;36(5):981-8.
- (100) Kim K, Park M, Young KH. Ginsenoside Rg3 Suppresses Palmitate-Induced Apoptosis in MIN6N8 Pancreatic beta-Cells. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46(1):30-5.
- (101) Wang J, Yin H, Huang Y, Guo C, Xia C, Liu Q, et al. *Panax Quinquefolius* Saponin of Stem and Leaf Attenuates Intermittent High Glucose-Induced Oxidative Stress Injury in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells via PI3K/Akt/GSK-3 beta Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:196283.
- (102) Charpentier G. Oral combination therapy for type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18 Suppl 3:S70-S76.
- (103) Luo JZ, Luo L. American ginseng stimulates insulin production and prevents apoptosis through regulation of uncoupling protein-2 in cultured beta cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006;3(3):365-72.
- (104) Cho WC, Chung WS, Lee SK, Leung AW, Cheng CH, Yue KK. Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2006;550(1-3):173-9.
- (105) Martinez B, Staba EJ. The physiological effects of *Aralia*, *Panax* and *Eleutherococcus* on exercised rats. *Jpn J Pharmacol* 1984;35(2):79-85.
- (106) Oshima Y, Sato K, Hikino H. Isolation and hypoglycemic activity of quinquefolans A, B, and C, glycans of *Panax quinquefolium* roots. *J Nat Prod* 1987;50(2):188-90.
- (107) Yun SN, Moon SJ, Ko SK, Im BO, Chung SH. Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. *Arch Pharm Res* 2004;27(7):790-6.
- (108) Liu TP, Liu IM, Cheng JT. Improvement of insulin resistance by panax ginseng in fructose-rich chow-fed rats. *Horm Metab Res* 2005;37(3):146-51.
- (109) Xie JT, Wang CZ, Wang AB, Wu J, Basila D, Yuan CS. Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of *Panax ginseng*. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(9):1104-10.

- (110) Xie JT, Mehendale SR, Wang A, Han AH, Wu JA, Osinski J, et al. American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity. *Pharmacol Res* 2004;49(2):113-7.
- (111) Lee WK, Kao ST, Liu IM, Cheng JT. Increase of insulin secretion by ginsenoside Rh2 to lower plasma glucose in Wistar rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(1-2):27-32.
- (112) Yoon SH, Han EJ, Sung JH, Chung SH. Anti-diabetic effects of compound K versus metformin versus compound K-metformin combination therapy in diabetic db/db mice. *Biol Pharm Bull* 2007;30(11):2196-200.
- (113) Lee WK, Kao ST, Liu IM, Cheng JT. Ginsenoside Rh2 is one of the active principles of *Panax ginseng* root to improve insulin sensitivity in fructose-rich chow-fed rats. *Horm Metab Res* 2007;39(5):347-54.
- (114) Banz WJ, Iqbal MJ, Bollaert M, Chickris N, James B, Higginbotham DA, et al. Ginseng modifies the diabetic phenotype and genes associated with diabetes in the male ZDF rat. *Phytomedicine* 2007;14(10):681-9.
- (115) Xie JT, Wang CZ, Ni M, Wu JA, Mehendale SR, Aung HH, et al. American ginseng berry juice intake reduces blood glucose and body weight in ob/ob mice. *J Food Sci* 2007;72(8):S590-S594.
- (116) Chen ZH, Li J, Liu J, Zhao Y, Zhang P, Zhang MX, et al. Saponins isolated from the root of *Panax notoginseng* showed significant anti-diabetic effects in KK-Ay mice. *Am J Chin Med* 2008;36(5):939-51.
- (117) Kang KS, Yamabe N, Kim HY, Park JH, Yokozawa T. Therapeutic potential of 20(S)-ginsenoside Rg(3) against streptozotocin-induced diabetic renal damage in rats. *Eur J Pharmacol* 2008;591(1-3):266-72.
- (118) Liu Z, Wang LJ, Li X, Hu JN, Chen Y, Ruan CC, et al. Hypoglycemic effects of malonyl-ginsenosides extracted from roots of *Panax ginseng* on streptozotocin-induced diabetic mice. *Phytother Res* 2009;23(10):1426-30.
- (119) Yuan CS, Tanaka H. Bioactivity of American ginseng by knockout extract preparation using monoclonal antibody. *Curr Drug Discov Technol* 2011;8(1):32-41.
- (120) Yoo KM, Lee C, Lo YM, Moon B. The hypoglycemic effects of American red ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on a diabetic mouse model. *J Food Sci* 2012;77(7):H147-H152.
- (121) Vuksan V, Sievenpiper JL, Koo VY, Francis T, Beljan-Zdravkovic U, Xu Z, et al. American ginseng (*Panax quinquefolius* L) reduces postprandial glycemia in nondiabetic subjects and subjects with type 2 diabetes mellitus. *Archives of Internal Medicine* 2000;160(7):1009-13.
- (122) Vuksan V, Sievenpiper JL. The variable effects of whole-leaf digitalis is a paradigm of the glycemic effects of ginseng-Reply. *Archives of Internal Medicine* 2000;160:3330-1.

- (123) Vuksan V, Stavro MP, Sievenpiper JL, Beljan-Zdravkovic U, Leiter LA, Josse RG, et al. Similar postprandial glyceemic reductions with escalation of dose and administration time of American ginseng in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000;23(9):1221-6.
- (124) De Souza LR. The Effect of Root Parts of Korean Red Ginseng (*Panax Ginseng* C.A. Meyer) and Alcohol Extracts of American Ginseng (*Panax Quinquefolius* L.) and Korean Red Ginseng on Glyceemic Parameters. Thesis (M. Sc.)- University of Toronto. 2008.
- (125) Sotaniemi EA, Haapakoski E, Rautio A. Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 1995;18(10):1373-5.
- (126) Vuksan V, Xu Z, Jenkins AL, Beljan-Zdravkovic U, Sievenpiper J, Leiter LA, et al. American Ginseng (*Panax Quinquefolius* L.) Improves Long Term Glyceemic Control in Type 2 Diabetes: A Double-blind Placebo-controlled Crossover Trial. American Diabetes Association Annual Meeting, A384. 2000. Ref Type: Abstract
- (127) Vuksan V, Sievenpiper JL, Xu Z, Wong EY, Jenkins AL, Beljan-Zdravkovic U, et al. Konjac-Mannan and American ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 2001;20(5 Suppl):370S-80S.
- (128) Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2013;31(7):1281-357.
- (129) Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension* 1999;33(5):1111-7.
- (130) Goodfellow J, Ramsey MW, Luddington LA, Jones CJ, Coates PA, Dunstan F, et al. Endothelium and inelastic arteries: an early marker of vascular dysfunction in non-insulin dependent diabetes. *BMJ* 1996;312(7033):744-5.
- (131) Hirata Y, Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Suzuki J, Nagai R. Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease. *Int Heart J* 2010;51(1):1-6.
- (132) Lim HS, Lip GY. Arterial stiffness in diabetes and hypertension. *J Hum Hypertens* 2004;18(7):467-8.
- (133) Clement DL, De Buyzere ML, De Bacquer DA, de Leeuw PW, Duprez DA, Fagard RH, et al. Prognostic value of ambulatory blood-pressure recordings in patients with treated hypertension. *N Engl J Med* 2003;348(24):2407-15.
- (134) Safar M, O'Rourke M. Principles and definitions of arterial stiffness, wave reflections and pulse pressure amplification. In: O'Rourke M, editor. *Arterial Stiffness in Hypertension. Handbook of Hypertension Series*. Elsevier; 2006. p. 3-19.

- (135) Laurent S, Cockcroft J, Van BL, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European Heart Journal* 2006;27(21):2588-605.
- (136) Barnes PM, Bloom B, Nahin RL. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. *National Health Statistics Reports* 2008;(12):1-23.
- (137) Kim ND, Kang SY, Schini VB. Ginsenosides evoke endothelium-dependent vascular relaxation in rat aorta. *Gen Pharmacol* 1994;25(6):1071-7.
- (138) Jeon BH, Kim CS, Kim HS, Park JB, Nam KY, Chang SJ. Effect of Korean red ginseng on blood pressure and nitric oxide production. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21(12):1095-100.
- (139) Kang SY, Schini-Kerth VB, Kim ND. Ginsenosides of the protopanaxatriol group cause endothelium-dependent relaxation in the rat aorta. *Life Sciences* 1995;56(19):1577-86.
- (140) Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB. Ginsenoside Rg3 mediates endothelium-dependent relaxation in response to ginsenosides in rat aorta: role of K⁺ channels. *European Journal of Pharmacology* 1999;367(1):41-9.
- (141) Kim ND, Kim EM, Kang KW, Cho MK, Choi SY, Kim SG. Ginsenoside Rg3 inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 2003;140(4):661-70.
- (142) Kwan CY. The effects of different ginseng extracts on vascular contraction in vitro: evidence for yin-yang principle. *Acta Phytother* 1999;2:73-7.
- (143) Kim WY, Kim JM, Han SB, Lee SK, Kim ND, Park MK, et al. Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J Nat Prod* 2000;63(12):1702-4.
- (144) Chen X, Gillis CN, Moalli R. Vascular effects of ginsenosides in vitro. *Br J Pharmacol* 1984;82(2):485-91.
- (145) Park EK, Shin YW, Lee HU, Kim SS, Lee YC, Lee BY, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull* 2005;28(4):652-6.
- (146) Park YC, Lee CH, Kang HS, Kim KW, Chung HT, Kim HD. Ginsenoside-Rh1 and Rh2 inhibit the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Biochem Mol Biol Int* 1996;40(4):751-7.
- (147) Jeon BH, Kim CS, Kim HS, Park JB, Nam KY, Chang SJ. Effect of Korean red ginseng on blood pressure and nitric oxide production. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21(12):1095-100.

- (148) Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A. Chemico-pharmacological studies on saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer. II. Pharmacological part. *Arzneimittelforschung* 1975;25(4):539-47.
- (149) Coon JT, Ernst E. *Panax ginseng*: a systematic review of adverse effects and drug interactions. *Drug Saf* 2002;25(5):323-44.
- (150) Stavro PM, Woo M, Heim TF, Leiter LA, Vuksan V. North American ginseng exerts a neutral effect on blood pressure in individuals with hypertension. *Hypertension* 2005;46(2):406-11.
- (151) Stavro PM, Woo M, Leiter LA, Heim TF, Sievenpiper JL, Vuksan V. Long-term intake of North American ginseng has no effect on 24-hour blood pressure and renal function. *Hypertension* 2006;47(4):791-6.
- (152) Stavro PM, Xu Z, Beljan-Zdravkovic U, Jenkins AL, Sievenpiper JL, Vuksan V. American ginseng improves blood pressure in type 2 diabetes. *Circulation* 102[II], 417. 2000. Ref Type: Abstract
- (153) Xu Z, Beljan-Zdravkovic U, Bateman RM, Jenkins AL, Sievenpiper JL, Stavro MP, et al. American ginseng increases plasma nitric oxide concentration in type 2 diabetes. *CJDC* 2000;24:38.
- (154) Jovanovski E, Jenkins A, Dias AG, Peeva V, Sievenpiper J, Arnason JT, et al. Effects of Korean red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mayer) and its isolated ginsenosides and polysaccharides on arterial stiffness in healthy individuals. *American Journal of Hypertension* 2010;23(5):469-72.
- (155) Bhradway J, Bateman E, Sam C, Jovanovski E, Fairgrieve C, Jenkins A, et al. Efficacy of Rg3-Enriched Korean Red Ginseng (Steamed *Panax Ginseng* C.A. Meyer) Extract on Arterial Stiffness and Blood Pressure in Healthy Volunteers. *FASEB J* 739.5. 2010. Ref Type: Abstract
- (156) Soldati F. Toxicological studies on ginseng. Proceedings of the fourth International Ginseng Symposium. Daejeon, Republic of Korea, Korean Ginseng and Tobacco Research Institute, 1984.
- (157) Sonnenborn U, Hansel R. *Panax ginseng*. In: De Smet PAGM et al., editors. Adverse reactions of herbal drugs. Berlin: Springer-Verlag; 1992. p. 179-92.
- (158) Siegel RK. Ginseng abuse syndrome. Problems with the panacea. *JAMA* 1979;241(15):1614-5.
- (159) Tyler VE. Performance and immune deficiencies. In: Herbs of choice: the therapeutic use of phytomedicinals. New York, Pharmaceutical Products Press, 1994:155–157.
- (160) Ryu SJ, Chien YY. Ginseng-associated cerebral arteritis. *Neurology* 1995;45(4):829-30.

- (161) Lou BY, Li CF, Li PY, Ruan JP. [Eye symptoms due to ginseng poisoning]. *Yan Ke Xue Bao* 1989;5(3-4):96-7.
- (162) Koriech OM. Ginseng and mastalgia. *British Medical Journal* 1978;297:1556.
- (163) Palmer BV, Montgomery AC, Monteiro JC. Ginseng and mastalgia. *British Medical Journal* 1978;279:1284.
- (164) Punnonen R, Lukola A. Oestrogen-like effect of ginseng. *Br Med J* 1980 25;281(6248):1110.
- (165) Hopkins MP, Androff L, Benninghoff AS. Ginseng face cream and unexplained vaginal bleeding. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159(5):1121-2.
- (166) Buchi K, Jenny E. On the interference of the standardized ginseng extract G115 and pure ginsenosides with agonists of the progesterone receptor of the human myometrium. *Phytopharm* 1984;1-6.
- (167) Chan TWD, But PPH, Cheng SW, Kwok IMY, Lau FW, Xu HX. Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and ginseng products by using HPLC/MS. *Anal Chem* 2000;72(6):1281-1287.
- (168) Yuanchun M, Mai L, Malley L, Doucet M. Distribution and Proportion of Major Ginsenosides and Quality Control of Ginseng Products. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry* 1996;1:11-20.
- (169) Wang X, Sakuma T, Asafu-Adjaye E, Shiu GK Determination of ginsenosides in plant extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS. *Anal Chem* 1999;71(8):1579-1584
- (170) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499-502.
- (171) Sniderman AD, Blank D, Zakarian R, Bergeron J, Frohlich J. Triglycerides and small dense LDL: the twin Achilles heels of the Friedewald formula. *Clin Biochem* 2003;36(7):499-504.
- (172) U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health NHLBI. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. 2003. Report No.: 03-5233.
- (173) Dills DG, Schneider J. Clinical evaluation of glimepiride versus glyburide in NIDDM in a double-blind comparative study. Glimepiride/Glyburide Research Group. *Horm Metab Res* 1996;28(9):426-9.

- (174) Ismail-Beigi F, Moghissi E, Tiktin M, Hirsch IB, Inzucchi SE, Genuth S. Individualizing glycemic targets in type 2 diabetes mellitus: implications of recent clinical trials. *Ann Intern Med* 2011;154(8):554-9.
- (175) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352(9131):837-53.
- (176) Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, Buse JB, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358(24):2545-59.
- (177) Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358(24):2560-72.
- (178) Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009;360(2):129-39.
- (179) Vuksan V, Sung MK, Sievenpiper JL, Stavro PM, Jenkins AL, Di BM, et al. Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves glucose and insulin regulation in well-controlled, type 2 diabetes: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18(1):46-56.
- (180) Sievenpiper JL. Variable effects of American ginseng: a batch of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) with a depressed ginsenoside profile does not affect postprandial glycemia. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(2):243-8.
- (181) Onomura M, Tsukada H, Fukuda K, Hosokawa M, Nakamura H, Kodama M, et al. Effects of ginseng radix on sugar absorption in the small intestine. *Am J Chin Med* 1999;27(3-4):347-54.
- (182) Suzuki Y, Hikino H. Mechanisms of hypoglycaemic activity of panaxans A and B, glycans of *Panax ginseng* roots: effects on plasma level, secretion, sensitivity and binding of insulin in mice. *Phytother res* 1989;3:20-4.
- (183) Ohnishi Y, Takagi S, Miura T, Usami M, Kako M, Ishihara E, et al. Effect of ginseng radix on GLUT2 protein content in mouse liver in normal and epinephrine-induced hyperglycemic mice. *Biol Pharm Bull* 1996;19(9):1238-40.
- (184) Hasegawa H, Matsumiya S, Murakami C, Kurokawa T, Kasai R, Ishibashi S, et al. Interactions of ginseng extract, ginseng separated fractions, and some triterpenoid saponins with glucose transporters in sheep erythrocytes. *Planta Med* 1994;60(2):153-7.
- (185) Samira MM, Attia MA, Allam M, Elwan O. Effect of the standardized Ginseng Extract G115 on the metabolism and electrical activity of the rabbit's brain. *J Int Med Res* 1985;13(6):342-8.

- (186) Vuksan V, Sievenpiper JL, Beljan-Zdravkovic U, Di BM, Stavro MP. American ginseng improves lipid control in patients with type 2 diabetes . FASEB J 15, A632. 2001. Ref Type: Abstract
- (187) Jenkins AL, Morgan L, Zdravkovic U, Naeem A, Sievenpiper JL, Vuksan V. Improved Metabolic Control after Long Term Treatment with American Ginseng and Konjac mannan fiber in type 2 diabetes. Can J Diabetes 2014;27:357.
- (188) Buettner C, Yeh GY, Phillips RS, Mittleman MA, Kaptchuk TJ. Systematic review of the effects of ginseng on cardiovascular risk factors. Ann Pharmacother 2006;40(1):83-95.
- (189) Franklin SS, Gustin W, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, et al. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. Circulation 1997;96(1):308-15.
- (190) Vuksan V, Sievenpiper JL, Wong J, Xu Z, Beljan-Zdravkovic U, Arnason JT, et al. American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) attenuates postprandial glycemia in a time-dependent but not dose-dependent manner in healthy individuals. Journal of the American College of Nutrition 2001;73(4):753-8.
- (191) Qu C, Yang L, Yu S, Wang S, Bai Y, Zhang H. Investigation of the interactions between ginsenosides and amino acids by mass spectrometry and theoretical chemistry. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2009;74(2):478-83.
- (192) Sievenpiper JL, Sung MK, Di BM, Seung-Lee K, Nam KY, Arnason JT, et al. Korean red ginseng rootlets decrease acute postprandial glycemia: results from sequential preparation- and dose-finding studies. J Am Coll Nutr 2006;25(2):100-7.
- (193) Sievenpiper JL, Arnason JT, Leiter LA, Vuksan V. Decreasing, null and increasing effects of eight popular types of ginseng on acute postprandial glycemic indices in healthy humans: the role of ginsenosides. J Am Coll Nutr 2004;23(3):248-58.
- (194) Dascalu A, Sievenpiper JL, Jenkins AL, Stavro MP, Leiter LA, Arnason JT, et al. Five batches representative of Ontario-grown American ginseng root produce comparable reductions of postprandial glycemia in healthy individuals. Can J Physiol Pharmacol 2007;85(9):856-64.
- (195) Health Canada. About Natural Health Product Regulation in Canada. <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/prodnatur/about-apropos/index-eng.php>. 2012. 5-2-2014. Ref Type: Online Source
- (196) Agriculture and Agri-food Canada. Canada's North American Ginseng. <http://www.marquecanadabrand.agr.gc.ca/fact-fiche/5270-eng.htm> . 2011. 5-2-2014. Ref Type: Online Source

8 PRILOZI

Prilog 1 sadrži tri znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenima u bazi Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom radu:

1. **Mucalo I.**, Jovanovski E., Rahelić D., Božikov V., Romić Ž., Vuksan V. Effect of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on arterial stiffness in subjects with type-2 diabetes and concomitant hypertension. J Ethnopharmacol 2013; 150:148-153.
2. **Mucalo I.**, Jovanovski E., Rahelić D., Božikov V., Romić Ž., Vuksan V. American ginseng extract (*Panax quinquefolius* L.) is safe in longterm use in type 2 diabetic patients. Evid-Based Compl Alt 2014;2014:1-6.
3. **Mucalo I.**, Rahelić D., Jovanovski E., Božikov V., Romić Ž., Vuksan V. Effect of American Ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on Glycemic Control in Type 2 Diabetes. Coll Antropol 2012;36(4):1435-1440.

Prilog 2 sadrži rezultate ispitivanja udjela ginsenozida u pet različitih biljnih uzoraka.

9 ŽIVOTOPIS

Iva Mucalo rođena je 4. siječnja 1980, godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i VII gimnaziju. Godine 1998. upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet, smjer Farmacija, kojeg završava 2003.godine. Tijekom dodiplomskog studija boravila je na School of Pharmacy, University of London, gdje je izradila svoj diplomski rad ("*Adverse Drug Events and Desire for Information – A Multi-method Approach*"). Za vrijeme studija primala je stipendiju Grada Zagreba. Nakon završenog pripravničkog staža (2003.-2004. godina) postaje suradnik na TEMPUS JEP 18028-2003 međunarodnom projektu „Razvoj i implementacija novog novog nastavnog programa studija farmacije“ u razdoblju od 2004.-2007. godine. U okviru istog projekta 2006. završava poslijediplomski specijalistički studij iz kliničke farmacije i farmaceutske prakse na School of Pharmacy, University of London (*Diploma in Pharmacy Practice*). Od 2006. godine zaposlena je u Centru za primijenjenu farmaciju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao znanstveni novak, a 2008. godine upisuje doktorski studij "Farmaceutske znanosti". Uz znanstveni rad sudjeluje u izvođenju nastave na kolegijima Farmakoterapija, Klinička farmacija i Komunikacijske vještine. Članica je Hrvatske ljekarničke komore te Povjerenstva za razvoj kompetencija. Članica je ispitne komisije na stručnom dijelu stručnog ispita za magistre farmacije (Farmakoterapija). Kautor je šest znanstvenih radova u časopisima citiranima u bazi Current Contents, jednog znanstvenog rada citiranog u ostalim bazama, pet stručnih radova te jednog kongresnog priopćenja zastupljenog u bazi Current Contents. Aktivno je sudjelovala na 9 domaćih i 15 međunarodnih skupova s 35 posterskih i usmenih priopćenja. Održala je 3 pozvana predavanja na međunarodnim znanstvenim skupovima. Aktivno sudjeluje u edukaciji magistara farmacije u sklopu njihovog poslijediplomskog stručnog usavršavanja.

Objavljeni znanstveni radovi citirani u bazi Current Contents:

Mucalo I., Jovanovski E., Vuksan V., Božikov V., Romić Ž., Rahelić D. American ginseng extract (*Panax quinquefolius* L.) is safe in longterm use in type 2 diabetic patients. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014;2014:1-6.

Mucalo I., Jovanovski E., Rahelić D., Božikov V., Romić Ž., Vuksan V. Effect of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on arterial stiffness in subjects with type-2 diabetes and concomitant hypertension. J Ethnopharmacol 2013;150:148-153.

Mucalo I., Rahelić D, Božikov V, Jovanovski E, Romić Ž, Vuksan V. Effect of American Ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on Glycemic Control in Type 2 Diabetes. Coll Antropol 2012;36(4):1435-1440.

Meštrović A., Staničić Ž., Ortner Hadžiabdić M., **Mucalo I.**, Bates I., Duggan C., Carter S., Bruno A., Košiček M. Individualized Education and Competency Development of Croatian Community Pharmacists Using the General Level Framework. Am J Pharm Educ 2012;76(2):1-8.

Mirošević Skvrce, Nikica; Macolić Šarinić, Viola; **Mucalo, Iva**; Krnić, Darko; Tomić, Siniša. Adverse drug reactions caused by drug-drug interactions reported to Croatian Agency for Medicinal Products and Medical Devices: a retrospective observational study. CMJ 2011;52(5):604-614.

Meštrović A., Staničić Ž., Ortner Hadžiabdić M., **Mucalo I.**, Bates I., Duggan C., Carter S., Bruno A. Evaluation of Croatian Community Pharmacists' Patient Care Competencies Using the General Level Framework. Am J Pharm Educ 2011;75(2):1-8.

Znanstveni radovi citirani u ostalim bazama:

Jovanovski E., Bateman EA., Bhradway J., Fairgrieve C., **Mucalo I.**, Jenkins AL., Vuksan V. Effect of Rg3-enriched Korean red ginseng (*Panax ginseng*) on arterial stiffness and blood pressure in healthy individuals: a randomized controlled trial. J Am Soc Hypertens 2014. In Press.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu:

Macolic Sarinic V, Mirosevic N, Lovrek M, Krnic D, **Jankovic I**, Tomic S. Evidence of clinically significant cyclosporine - fluvastatine interaction. BCPT 2007;101(1):115.

**10 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASIC DOCUMENTATION CARD**

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Centar za primijenjenu farmaciju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

DUGOROČNI UČINAK EKSTRAKTA AMERIČKOG GINSENGA (*PANAX QUINQUEFOLIUS* L.) NA REGULACIJU GLIKEMIJE U BOLESNIKA S TIPOM 2 ŠEĆERNE BOLESTI

Iva Mucalo

SAŽETAK

Dosadašnja klinička istraživanja upućuju na zaključak da američki ginseng (AG) pridonosi regulaciji glikemije na način da, slično djelovanju derivata sulfonilureje, povećava postprandijalnu koncentraciju inzulina u serumu. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati učinkovitost i sigurnost odabranog ekstrakta američkog ginsenga kao dopune uobičajenoj terapiji ŠBT2 (prehrana i/ili lijekovi), koristeći randomizirani, dvostruko-slijepi, placebo-kontrolirani, paralelni dizajn studije i posljedično pridonijeti razumijevanju predloženog mehanizma djelovanja ekstrakta američkog ginsenga u regulaciji glikemije u bolesnika sa ŠBT2. Sedamdeset četiri ispitanika s kontroliranom ŠBT2 (spol: 28 M i 46 Ž; dob: $62,9 \pm 9,49$ godina; ITM: $32 \pm 5,3$ kg/m²; HbA1c: $7,0 \pm 1,3\%$), randomiziranih u intervencijsku (n = 35) ili kontrolnu skupinu (n = 39), završilo je studiju. Svakom je ispitaniku bio dodijeljen ili odabrani preparat AG-a (etanolni ekstrakt korijena) ili placebo koji sadrži pšenične mekinje (2 kapsule od 500 mg po obroku = 3 g dnevno) u razdoblju od 12 tjedana. Ishodi mjerenja uključivali su mjere učinkovitosti (hemoglobin A1c (HbA1c)-primarni, koncentracija glukoze u plazmi natašte (GUP-NT), koncentracija inzulina u serumu natašte i model procjene homeostaze (HOMA-IR)); sigurnosti primijenjene terapije (jetrena i bubrežna funkcija, koagulacijski parametri, arterijski tlak i arterijska elastičnost) i suradljivosti (broj vraćenih kapsula). Među ispitanim skupinama nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima hemoglobina A1c kao primarnog ishoda istraživanja. Ipak, u usporedbi s placebo, u skupini koja je uzimala AG uočen je silazni trend vrijednosti hemoglobina A1c za 0,84% (P = 0,836) te su ispitanici za vrijeme studije ostali dobro kontrolirani (HbA1c = 7,12%). Odabrani pripravak AG-a također je smanjio koncentraciju GUP-a u plazmi natašte za 4,42%, koncentraciju inzulina u serumu natašte za 11,54% i vrijednosti HOMA-IR indeksa za 18,84%, bez statistički značajne razlike među uspoređivanim skupinama (P = 0,947, P = 0,373, P = 0,489, za svaki pojedinačno). Razlika početnih i krajnjih vrijednosti vaskularnih pokazatelja između dviju skupina, i to sistoličkog arterijskog tlaka (SAT) i augmentacijskog indeksa (AI), bila je statistički značajna. U usporedbi s placebo, AG u primijenjenoj dozi značajno je smanjio radijalni AI za 5,25% (P = 0,041) i SAT za 11,72% (P < 0,001), dok je izostao učinak na dijastolički arterijski tlak. Ishodi sigurnosti i suradljivosti ostali su također nepromijenjeni. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da nakon 12 tjedana suplementacije ekstrakt AG-a, iako ne smanjuje vrijednost HbA1c, održava zadovoljavajuću kontrolu glikemije u bolesnika s reguliranom ŠBT2, bez nuspojava.

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

Rad sadrži: 146 stranica, 25 slika, 18 tablica i 196 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: američki ginseng, šećerna bolest tipa 2, kontrola glikemije, inzulinska osjetljivost,

Mentori: Dr. sc. Velimir Božikov, *redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*; Dr. sc. Dario Rahelić, *docent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku*

Povjerenstvo:

Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević, *redovita profesorica, FBF Sveučilišta Zagrebu*

Dr. sc. Jerka Dumić, *redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagreb*

Dr.sc. Lidija Bach-Royecki, *docentica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagreb*

Dr. sc. Ivana Pavlič-Renar, *redovita profesorica, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

Dr.sc. Marijana Vučić Lovrenčić, *znanstvena savjetnica, Klinička bolnica Merkur*

Rad prihvaćen: 01.07.2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Centre for Applied Pharmacy
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Ph.D. Thesis

LONGTERM EFFECT OF AMERICAN GINSENG EXTRACT (*PANAX QUINQUEFOLIUS* L.) ON GLYCEMIC CONTROL IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

Iva Mucalo

SUMMARY

According to previous clinical studies it has been suggested that American ginseng (AG) is effective in improving glycemic control in type 2 diabetes through increasing post-prandial insulin levels, much like the conventional therapy sulphonylurea. The aim of the present study was to test the efficacy and safety of 12 weeks of supplementation with the selected AG extract as an adjunct to usual therapy in people with type 2 diabetes (diet and/or conventional diabetes therapy), using a randomized, double-blind, placebo-controlled design, and subsequently to contribute to better understanding of the proposed mechanism of action of the American ginseng extract in glucose regulation in type 2 diabetes. Seventy-four participants with well-controlled type 2 diabetes (sex: 28 M and 46 F, age: 62.9 ± 9.49 , BMI: 32 ± 5.3 , HbA1c: 7.0 ± 1.3), randomized to either intervention ($n = 35$) or control ($n = 39$) group, completed the study. Participants were randomly assigned to one of the two interventions and received, prior to each of the main meals, three times daily two 500 mg capsules (total 3g/ day), of either American ginseng extract or identical-appearing placebo capsules containing wheat bran. Outcomes included measures of efficacy (glycated hemoglobin (HbA1c)-primary, fasting plasma glucose (FPG), fasting plasma insulin (FPI), homeostasis model assessment (HOMA-IR)); safety (liver and kidney function, haemostatic function, blood pressure and arterial stiffness); and compliance (returned capsules). There was no change in the primary endpoint, HbA1c, between the treatment and placebo groups. Nevertheless, there was a trend toward lower HbA1c by 0.84% ($P = 0.836$) compared to placebo. Furthermore, the participants remained well-controlled (HbA1c = 7.12%) throughout. The selected AG treatment also decreased FPG, FPI and HOMA by 4.42%, 11.54% and 18.84%, respectively, with no significant between-treatment difference ($P = 0.947$, $P = 0.373$, $P = 0.489$, respectively). Between-treatment end differences of vascular parameters, namely systolic blood pressure (SBP) and augmentation index (AI) were statistically significant. Compared to placebo, 3 g of AG significantly lowered radial AI by 5.3% ($P = 0.041$) and systolic BP by 11.7% ($P < 0.001$) at 12 weeks. No effect was observed with diastolic BP. Safety and compliance outcomes remained unchanged. The study results indicate that after 12-weeks of supplementation, even though the AG extract did not decrease HbA1c levels, it maintained good glycemic control in patients with well-controlled type 2 diabetes without adverse effects.

This thesis is deposited in the Central library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

This thesis includes: 146 pages, 25 figures, 18 tables and 196 references. Original is in Croatian language.

Keywords: American ginseng, type 2 diabetes, glycemic control, insulin sensitivity

Mentors: Velimir Božikov, Ph.D., *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*; Dario Rahelić, Ph.D., *Assistant Professor, Faculty of Medicine, University of Zagreb, Faculty of Medicine, University of Osijek*

Reviewers:

Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D., *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*

Jerka Dumić, Ph.D., *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*

Lidija Bach-Royecki, Ph.D., *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*

Ivana Pavlič-Renar, Ph.D., *Full Professor, Faculty of Medicine, University of Zagreb*

Marijana Vučić Lovrenčić, Ph.D., *Senior Research Associate, Klinička bolnica Merkur*

The thesis accepted: 1. July 2014.