

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"CAROL DAVILA" BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL FARMACIE**

**Evaluarea potențialului antidiabetic și hipolipemiant al  
principiilor active conținute în Raphanus sativus și Ficus  
elastica**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător doctorat:  
PROF. UNIV. DR. NEGREȘ SIMONA**

**Student-doctorand:  
AL HILFI ZAID ABDULRIDHA FLAYYIH**

## Cuprins

<b>INTRODUCERE</b>	1
<b>PARTEA GENERALĂ</b>	
<b>1. Aspecte generale privind diabetul zaharat</b>	14
<b>1.1. Date epidemiologice și factori de susceptibilitate pentru diabetul zaharat</b>	14
1.1.1. Epidemiologie	14
1.1.2. Factori de risc	15
<b>1.2. Mecanisme moleculare de instalare a diabetului zaharat</b>	17
1.2.1. Diabet zaharat de tip 1	17
1.2.2. Diabet zaharat de tip 2	18
<b>1.3. Complicațiile diabetului zaharat</b>	19
1.3.1. Complicații acute	19
1.3.2. Complicații cronice	20
1.3.2.1. Complicații microvasculare	20
1.3.2.2. Complicații macrovasculare	22
1.3.3. Alte complicații	23
<b>1.4. Controlul glicemiei în diabet zaharat – abordare terapeutică</b>	24
1.4.1. Optimizarea stilului de viață	25
1.4.2. Farmacoterapia antidiabetică	27
1.4.2.1. Insulinoterapia	27
1.4.2.2. Alte clase terapeutice utilizate în terapia diabetului zaharat	29
<b>2. Plante medicinale cu acțiune antidiabetică</b>	34
<b>2.1. Specii vegetale cu potențial antidiabetic</b>	34
<b>2.2. Dovezi non clinice privind efectul hipoglicemiant al principiilor active conținute în plante</b>	36
2.2.1. Aegle marmelos	36
2.2.2. Allium cepa	37
2.2.3. Allium sativum	37
2.2.4. Alangium lamarekii	37
2.2.5. Albizia odoratissima	38
2.2.6. Aloe vera	39
2.2.7. Brassica juncea	39
2.2.8. Caesalpinia bonducella	39
2.2.9. Capparis decidua	40
2.2.10. Coccinia indica	40
2.2.11. Friobotrya japonica	41
2.2.12. Eugenia jambolana	41
2.2.13. Specii de ginseng	42
2.2.14. Coccina grandis	43
2.2.15. Specii de Artemisia	44
2.2.16. Axonopus compressus	45
2.2.17. Berberis vulgaris	45
2.2.18. Caesalpinia digyna	46
2.2.19. Catharanthus roseus	46
2.2.20. Centaurea citraea	47

2.2.21, Curcuma longa	47
2.2.22, Stevia rebaudina	47
2.2.23, Specii de Ficus	48
<b>3. Date generale privind speciile Raphanus sativus și Ficus elastica</b>	<b>54</b>
<b>3.1. Raphanus sativus L.</b>	<b>54</b>
<b>3.2. Ficus elastica</b>	<b>59</b>
<b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	
<b>4. Analiza microscopică a frunzelor speciei de Ficus elastica L. și Raphanus sativus L.</b>	<b>63</b>
<b>4.1. Analiza microscopică a frunzelor speciei Ficus elastica L.</b>	<b>63</b>
4.1.1. Introducere	63
4.1.2. Material și metodă	65
4.1.3. Rezultate și discuții	65
4.1.4. Concluzii	67
<b>4.2. Analiza microscopică a frunzelor speciei Raphanus sativus L.</b>	<b>67</b>
4.2.1. Introducere	67
4.2.2. Material și metodă	67
4.2.3. Rezultate și discuții	68
4.2.4. Concluzii	70
<b>5. Determinarea conținutului de principia active din compoziția produselor vegetale Raphanus sativus L. și Ficus elastica L.</b>	<b>71</b>
<b>5.1. Determinarea conținutului de flavone din compoziția produselor vegetale Raphanus sativus L. și Ficus elastica L.</b>	<b>71</b>
5.1.1. Ipoteza de lucru	71
5.1.2. Tehnica de lucru	71
5.1.3. Rezultate și discuții	72
<b>5.2. Determinarea conținutului de acizi fenol-carboxilici (AFC)</b>	<b>73</b>
5.2.1. Ipoteza de lucru	73
5.2.2. Tehnica de lucru	73
5.2.3. Rezultate și discuții	74
<b>5.3. Determinarea conținutului de polifenoli totali (PT)</b>	<b>75</b>
5.3.1. Ipoteza de lucru	75
5.3.2. Tehnica de lucru	75
5.3.3. Rezultate și discuții	76
<b>5.4. Determinarea constituenților chimici activi din extracte prin metoda HPLC</b>	<b>76</b>
5.4.1. Principiul metodei	76
5.4.2. Tehnică de lucru	76
5.4.3. Rezultate și discuții	77
<b>5.5. Concluzii</b>	<b>80</b>
<b>6. Determinarea acțiunii antioxidante in vitro a principiilor active din compoziția produselor vegetale Raphanus sativus L. și Ficus elastica L.</b>	<b>81</b>
<b>6.1. Determinarea acțiunii antiradicalare</b>	<b>81</b>
<b>6.2. Stabilirea activității de scavenger față de radicalul DPPH (1,1-Difenil-2-Picril-hidrazil)</b>	<b>82</b>
6.2.1. Principiul metodei	82

6.2.2. Tehnica de lucru	83
6.2.3. Rezultate și discuții	83
<b>6.3. Stabilirea activității de scavenger față de radicalul ABTS*</b>	84
6.3.1. Principiul metodei	85
6.3.2. Tehnica de lucru	85
6.3.3. Rezultate și discuții	86
<b>6.4. Capacitatea de reducere a ferului</b>	88
6.4.1. Principiul metodei	88
6.4.2. Tehnică de lucru	89
6.4.3. Rezultate și discuții	89
<b>6.5. Concluzii</b>	91
<b>7. Studii de toxicitate după administrare orală</b>	92
<b>7.1. Toxicitatea orală după doză unică</b>	92
7.1.1. Principiul metodei	92
7.1.2. Mod de lucru	93
7.1.3. Rezultate și discuții	94
7.1.4. Concluzii	95
<b>7.2. Toxicitatea orală după doze repetate</b>	95
7.2.1. Principiul metodei	95
7.2.2. Material și metodă	95
7.2.3. Analiză statistică	96
7.2.4. Rezultate și discuții privind evoluția greutateii corporale	99
7.2.5. Rezultate și discuții privind modificarea parametrilor sanguini după administrări repetate	103
7.2.6. Rezultate și discuții privind modificările anatomopatologice după administrări repetate	109
7.2.7. Concluzii	117
<b>8. Evaluarea acțiunii antidiabetice și hipolipemiante a extractelor vegetale obținute din frunzele speciilor de <i>Ficus elastica</i> L. și <i>Raphanus sativus</i> L.</b>	120
8.1. Ipoteza de lucru	120
8.2. Material și metode	122
8.3. Protocol experimental	125
8.4. Analiza statistică	126
8.5. Rezultate și discuții privind variația glicemiei evaluată prin puncționare din venele cozii și prin determinare pe sângele total	126
8.6. Rezultate și discuții privind influența asupra profilului lipidic al extractelor de <i>Raphanus sativus</i> și <i>Ficus elastica</i>	139
8.7. Rezultate privind evoluția greutateii corporale a animalelor la care s-a indus diabet aloxanic	149
8.8. Concluzii	151
<b>9. Determinarea efectului asupra capacității antioxidante tisulare pe probe de țesut hepatic</b>	153
9.1. Ipoteza de lucru	153
9.2. Material și metode	153
9.3. Rezultate și discuții	154
9.4. Concluzii	158

<b>10. Eficacitatea extractelor uscate din frunze de <i>Raphanus Sativus L.</i> și <i>Ficus Elastica L.</i> în neuropatia indusă de paclitaxel la șobolan</b>	160
<b>10.1. Ipoteza de lucru</b>	160
<b>10.2. Materiale și metode</b>	161
<b>10.3. Protocol experimental</b>	165
<b>10.4. Rezultate experimentale și calcul statistic</b>	168
10.4.1. Rezultatele experimentale privind hiperalgezia tactilă (4g/s)	168
10.4.2. Rezultate experimentale privind statusul redox	175
10.4.2.1. Determinarea capacității antioxidante tisulare, a tiolilor totali tisulari cu reactivului Ellman (exprimați prin echivalent de GSH) și a nivelurilor tisulare de oxid nitric la nivelul țesutului cerebral	175
10.4.2.2. Determinarea capacității antioxidante tisulare și a tiolilor totali tisulari cu reactivului Ellman (exprimați prin echivalent de GSH) la nivelul țesutului hepatic	179
<b>10.5. Concluzii</b>	184
<b>11. Cercetări privind obținerea unui produs farmaceutic solid dozat cu extractele vegetale obținute din frunzele de <i>Raphanus sativus</i> și <i>Ficus elastica</i></b>	186
<b>11.1. Material și metodă</b>	186
<b>11.2. Determinarea caracteristicilor fizice ale materialului de umplere a capsulelor</b>	188
11.2.1. Aspectul	189
11.2.2. Stabilirea caracteristicilor fizice de curgere ale amestecurilor de pulberi ce urmează a fi incluse în capsule gelatinoase tari	189
11.2.3. Determinarea timpului de curgere, a unghiului de repaus și a vitezei de curgere	190
11.2.4. Determinarea caracteristicilor volumetrică	192
11.2.5. Determinarea masei de umplere și selectarea mărimii capsulelor	195
<b>11.3. Obținerea capsulelor la scară de laborator</b>	195
11.3.1. Controlul produsului finit	196
<b>11.4. Concluzii</b>	198
<b>13. Concluzii și contribuții personale</b>	199
<b>Bibliografie</b>	204
<b>Anexe</b>	225

## REZUMAT

Diabetul zaharat, boală metabolică datorată hiposecreției sau unui deficit de utilizare a insulinei, se caracterizează prin hiperglicemie cronică ce poate induce tulburări în metabolismul carbohidraților, grăsimilor și proteinelor. Patologia reprezintă un factor de risc pentru bolile cerebrovasculare și netratată poate duce la insuficiență renală, amputări de membre sau orbire.

Terapia antidiabetică include o paletă largă de substanțe active administrate singure sau în asocieri: insulina, sulfoniluree, biguanide, oze, tiazolidine, gliptine, glinide, incretinomimetice și glifozine. Cu toate că medicația de substituție hormonală și tratamentul de sinteză antidiabetic includ o gamă largă de substanțe active, atenția cercetătorilor se îndreaptă și către *plantele medicinale, bogate în principii active care scad hiperglicemia prin diverse mecanisme. O căutare pe PubMed, utilizând ca și cuvinte cheie "plante antidiabetice" a evidențiat 8793 de publicații, dintre care 7396 (84%) în ultimele două decenii și 5165 (58,73%) în perioada 2010-2019.*

Un studiu publicat de Bilal și colab. (2018) a arătat că mai mult de 800 de plante medicinale (studii care au utilizat diverse părți componente ale unei plante) din întreaga lume sunt considerate remedii tradiționale pentru tratamentul diabetului zaharat. Mergând pe aceeași idee, Bai și colab. (2019) prezintă o sinteză a principiilor active antidiabetice conținute în plantele utilizate de Medicina tradițională chineză. Autorii subliniază rezultatele publicate pentru flavonoide în bazele de date PubMed, Springer Link, Web of Science și CNKI:

- apigenina, baicaleina și catehina scad glicemia datorită proprietăților antioxidante, hesperidina este eficace în neuropatia diabetică;
- flavonoidele glicirizinică au efect semnificativ în diabetul zaharat gestational;
- quercetina trece bariera hematoencefalică prevenind complicațiile cerebro-vasculare și îmbunătățește funcția renală,
- kampterolul și puerarinul previn complicațiile cardiovasculare,
- miricetina are potențial terapeutic în tratamentul neuropatiei diabetice.

În prezent, există pe piața farmaceutică o multitudine de suplimente comercializate atât pentru tratamentul cât și pentru prevenția diabetului zaharat și a complicațiilor acestuia. Regulile de autorizare impuse pentru suplimentele nutritive pe bază de plante nu sunt la fel de stricte ca acelea pentru autorizarea medicamentelor alocate și de aici apar raportări de reacții adverse, interacțiuni medicamentoase și de contaminare a produselor.

Într-un studiu publicat în 2018, Yeung și colab. au arătat că utilizarea la nivel mondial a produselor farmaceutice complementare și alternative pentru gestionarea diverselor patologii cronice (inclusiv diabet zaharat) a crescut foarte mult în ultimul deceniu. Astfel Hu (2001) arăta că s-a raportat un procent de 72,8% persoane cu diabet zaharat care au utilizat medicamente pe bază de plante, suplimente alimentare și alte terapii alternative.

Pentru unele suplimente alimentare pe bază de plante medicinale s-au publicat rezultate promițătoare pentru corectarea tulburărilor întâlnite în diabetul zaharat de tip 2, dar multe dintre studiile publicate au infirmat aceste efecte. O mare parte a produselor vegetale conținute în suplimentele alimentare pe bază de plante nu sunt susținute de cercetări farmacologice non clinice și clinice, prezentând exclusiv "potențiale efecte antidiabetice" pe baza unor informații sumare referitoare la principiile active conținute în acestea.

Ținând cont de faptul că potențialul terapeutic al extractelor din produse vegetale poate constitui o alternativă de tratament și/sau prevenție a unor boli cronice așa cum este diabetul zaharat, *obiectivul tezei de doctorat a fost investigarea acțiunii hipoglicemizante și hipolipemizante a principiilor active extrase din Raphanus sativus și Ficus elastica*, pe un model de diabet aloxanic indus la animale de laborator.

Întrucât datele din literatură au menționat pentru alte specii de Ficus (*Ficus exasperata*) un potențial antinociceptiv în teste de inflamație induse cu carraghen și formalină [Woode, 2009], iar pentru *Raphanus sativus* Linn. acțiune antinociceptivă în durerea neuropată în diabetul indus experimental cu streptozotocin [Sahoo, 2019], am extins cercetarea la determinarea efectului antialodinic și antihiperalgezie în durerea neuropată indusă de paclitaxel.

Teza de doctorat este structurată în două părți: partea generală și partea de contribuții personale privind cercetarea non clinică efectuată asupra extractelor vegetale obținute din frunzele de *Raphanus sativus* și *Ficus elastica*.

Partea generală este formată din 3 capitole, și cuprinde următoarele aspecte:

- Patogenia și terapia diabetului zaharat;
- Potențialul antidiabetic al produselor fitoterapeutice utilizate ca adjuvante în tratamentul diabetului zaharat;
- Cercetări farmacologice efectuate asupra diverselor produse vegetale conținând extracte de *Raphanus* spp. și *Ficus* spp.

*În capitolul 1* al tezei de doctorat sunt prezentate informații care arată că în conformitate cu datele publicate în raportul Atlas al Federației Internaționale a Diabetului există în prezent aproximativ 352 milioane de adulți cu toleranță la glucoză modificată și care au un risc ridicat de apariție a diabetului zaharat. S-a estimat că în 2017, 425 milioane de persoane cu vârsta cuprinsă între 20 și 79 de ani sufereau de diabet zaharat și se consideră că numărul persoanelor diabetice va crește la 629 milioane până în anul 2045 [\*\*\*Centers for Disease Control and Prevention, National Diabetes Statistics Report, 2017].

Se pare că această tendință de creștere a apariției diabetului zaharat va fi predominantă în țările cu venituri mici și medii, deși concepția globală este că această patologie este "o boală a celor bine pregătiți". Din acest motiv, se estimează că țările în curs de dezvoltare în care stilul de viață este necorespunzător (dietă nesănătoasă, obezitate, sedentarism) vor suporta aproximativ 77% din această povară globală a epidemiei în secolul XXI.

Conform datelor furnizate de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) prevenția apariției diabetului zaharat se poate face prin optimizarea stilului de viață care include: exercițiul fizic (minim 30 minute pe zi) controlul greutateii corporale, evitarea consumului de zahăr, carbohidrați și grăsimi nesaturate, renunțarea la fumat [\*\*\*<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>]. Diagnosticarea precoce și menținerea glicemiei la valori normale cu medicamente antidiabetice și cu un stil de viață sănătos poate opri progresia bolii și evita apariția complicațiilor.

*Capitolul 2* prezintă o revizuire a plantelor medicinale antidiabetice, care poate fi utilă specialiștilor din domeniul sănătății, oamenilor de știință și cercetătorilor care lucrează în domeniul farmacologiei și farmacoterapiei, pentru a dezvolta noi terapii antidiabetice.

*În capitolul 3* sunt prezentate datele din literatură privind compoziția în principii active conținute în produsele vegetale alese pentru studiu: *Raphanus sativus* și *Ficus elastica*.

Astfel, pentru diverse specii de *Ficus*, cercetările *in vitro* și *in vivo* au demonstrat o intensă capacitate antioxidantă prin conținutul în:

- flavone, alcaloizi, saponozide, cumarine, taninuri și triterpene (acid oleanolic, acid ursolic, acid  $\alpha$  hidroxiursolic, acid protocatehic);
- compuși ai fenolului: acid galic și acid elagic;
- vitamina C;
- ascorbat oxidază, ascorbat peroxidază;

- furanocumarine: psoralen și bergapten.

Pentru extractul de *Raphanus sativus* s-a arătat că mai multe tipuri de compuși bioactivi conduc la scăderea glicemiei prin diverse mecanisme:

- glucozinolați: glucoraphanin, 4-hidroxi-glucobrasicină, glucoerucin, glucoraphasatin, glucobrassicin, 4-metoxi-glucobrasicină, neoglucobrasicină;
- izotiocianați: sulforafen, sulforafan, indol-3-carbinol;
- antociani și flavone;
- polifenoli;
- substanțe inhibitoare de glucozidază;
- coenzima Q10.

Partea experimentală este structurată în 8 capitole care au vizat următoarele aspecte:

În *capitolul 4* s-a realizat analiza microscopică a frunzelor speciei de *Ficus elastica* L. și *Raphanus sativus* L. Pentru plantele din genul *Ficus* caracterele florale sunt destul de uniforme, considerându-se o eficiență redusă în distingerea speciilor. Utilă taxonomic este forma inflorescetei (siconiului) [Al Hilfi, 2019].

Pentru identificarea corectă a speciei și verificarea calității produsului vegetal am realizat analize anatomice care furnizează date suplimentare și ajută la diferențierea speciilor apropiate.

Din analiza microfotografiilor preparatelor microscopice de *Ficus elastica* s-au observat următoarele particularități:

- frunze cu cu structura heterogen asimetrică a limbului, țesutul palisadic bistratificat;
- epiderma feței adaxiale cu cuticulă groasă (formă de adaptare pentru plantele xerofitice);
- hipoderma cu celule mari, unele conținând cistoliji gri cu formă oblongă sau rotundă;
- nervura mediană cu formă caracteristică (curbura mai proeminentă pe fața abaxială);
- fasciculele conducătoare de tip colateral dispuse sub forma unui arc abaxial;
- epiderma de pe fața abaxială cu numeroase stomate scufundate în cuticulă (cu cameră suprastomatică);

În această cercetare au fost evidențiați cistoliji de culoare gri, formă rotundă, oblongă dispuși în hipodermă, adaxial, neidentificați până în prezent în cercetări anterioare.

Pentru *Raphanus sativus* a fost confirmată identitatea produsului vegetal, rezultatele fiind în concordanță cu date publicate în cercetările anterioare.

Pentru ambele produse vegetale au fost identificate mici diferențe care pot fi explicate prin condițiile de mediu diferite (expoziție solară) în care au fost crescute plantele.

În capitolul 5 ale lucrării am determinat conținutul în principii active din compoziția produselor vegetale *Raphanus sativus* L. și *Ficus elastica* L. (capitolul 5) [Al Hilfi, 2019].

S-a determinat conținutul în flavone utilizând metoda metoda bazată pe formarea chelaților de aluminiu în prezența quercetolului liber și heterozidat și a kempferolului din compoziția acestor specii.

Rezultatele cercetării au evidențiat un conținut de flavone de  $3,614 \pm 0,40$  g% pentru extractul de *Ficus elastica* și de  $6,7313 \pm 0,66$  g pentru extractul de *Raphanus sativus*.

Cercetările au vizat și determinarea conținutului în acizi fenol-carboxilici (AFC): acidul cafeic (*Ficus elastica* și *Raphanus sativus*) și acizii p-coumaric, ferulic, hidroxicinamic, p-hidroxibenzoic, vanilic, gentisic (în frunzele de *Raphanus sativus*) utilizând metoda compendială înscrisă în monografia produsului *Fraxini folium*. Această metodă se bazează pe reacția acizilor fenolici cu acidul azotos și formarea de nitrozoderivați care izomerizează spontan la izonitrozoderivați. Aceștia se solubilizează în mediu alcalin cu formarea de oxime de culoare roșie.

Rezultatele cercetării au evidențiat un conținut de  $5,9507 \pm 0,38$  g% AFC pentru *Fici extractum* și de  $3,1263 \pm 0,15$  g% AFC pentru *Raphani extractum*.

Plecând de la datele din literatură am determinat și conținutul în polifenoli totali (PT) în care sunt incluși: AFC, flavone, proantociani, taninuri. Aceștia au fost determinați spectrofotometric prin metoda Folin-Ciocalteu. Reacția se bazează pe reducerea derivaților de molibden  $Mo^{VI}$  (colorație galbenă) în prezența grupărilor fenolice la  $Mo^{IV}$  și  $Mo^{V}$ , colorate în albastru și a căror intensitate este direct proporțională cu concentrația.

Rezultatele cercetării au evidențiat un conținutul total de PI exprimat în g% acid tanic de  $13,3299 \pm 0,1583$  pentru *Fici extractum* și de  $21,4175 \pm 0,9454$  pentru *Raphani extractum*.

Am determinat constituenții chimiei activi din cele două extracte prin metoda HPLC.

Prin analiză cromatografică a fost identificată în extractul de *Raphanus sativus* apigenin-7-glucozida.

În extractul de *Ficus elastica* a fost pus în evidență un compus principal care, pe baza similitudinii spectrului de absorbție cu cel al etaloanelor existente în metodă (catechol, epigalocatechol, epigalocatechin-galat) poate aparține grupului derivaților de catechol.

*Capitolul 6* al tezei a urmărit determinarea acțiunii antioxidante in vitro pentru extractele obținute din frunzele de *Raphanus sativus* și *Ficus elastica*. Rezultatele cercetării au arătat următoarele aspecte:

➤ În testul privind stabilirea activității de scavenger față de radicalul DPPH (1,1-Difenil-2-Picril-hidrazil) pentru extractul de *Ficus elastica* activitatea inhibitorie s-a încadrat între 10,82% (0,8 mg/ml. extract) și 65,85% (10 mg/ml. extract), rezultate concordante cu alte date din literatură obținute pentru specii diferite de *Ficus*. Pentru extractul de *Raphanus sativus* activitatea inhibitorie s-a încadrat între 19,16% (2,5 mg/ml. extract) și 86% (15 mg/ml. extract), responsabili de acțiune antioxidantă fiind: flavonele, acizii fenol carboxilici dar și alți derivați din compoziția chimică a extractului care nu au fost identificați.

➤ În testul privind stabilirea activității de scavenger față de radicalul ABTS activitatea antioxidantă a fost exprimată pe baza valorii IC<sub>50</sub> (mg/ml), care reprezintă concentrația de extract care inhibă cu 50% activitatea radicalului liber. Pentru extractul de *Ficus*, capacitatea de scavenger a radicalului liber ABTS a variat între 39,35% și 97,87%, fiind superioară extractului de *Raphanus*. Pentru extractul de *Raphanus sativus* capacitatea de scavenger a radicalului liber ABTS a variat între 43,12% și 82,41%.

➤ Capacitatea de reducere a Fe<sup>3+</sup> a demonstrat activitate antioxidantă pentru ambele extracte analizate, capacitatea antioxidantă a extractului de *Ficus* fiind superioară extractului de *Raphanus*.

În *capitolul 7* am evaluat toxicitatea după doză unică și după doze repetate a animalelor tratate cu extract de *Ficus elastica* și *Raphanus sativus*.

Toxicitatea orală după doză unică a fost determinată conform Ghidului OECD 425 prin metoda "up-and-down", care permite utilizarea unui număr restrâns de animale de laborator.

Rezultatele experimentale au evidențiat faptul că nu a apărut efect letal pentru cele 2 extracte testate în doză de 2000 mg/kg corp, administrate p.o și că pentru ambele extracte nu au apărut modificări ale greutateii corporale, aspectului exterior și ale comportamentului motor al animalelor de laborator. Cele două extracte, conform ghidului OECD 425 pentru determinarea toxicității orale a substanțelor chimice după doză unică, au avut o DL<sub>50</sub> după administrare p.o. > 2000 mg/kg.

Determinarea toxicității subacute s-a realizat conform ghidului OECD 407/2008, iar extractele de testat s-au administrat oral, zilnic, timp de 28 de zile în 3 doze: 200-300-400 mg/kg.

Rezultatele au arătat că nu a apărut efect letal la nici unul dintre extractele testate și nu s-au înregistrat modificări semnificative statistice ale greutății sau ale comportamentului animalelor.

Probele de sânge recoltate după sacrificarea animalelor în ziua 28 a experimentului au relevat următoarele modificări:

Pentru loturile tratate cu extract de *Raphanus* a crescut semnificativ statistic, la doza de 400 mg/kg corp numărul de leucocite și procentul de monocite. O relație doză-dependentă s-a înregistrat în creșterea numărului de trombocite și în scăderea numărului de granulocite. Procentul de limfocite s-a redus semnificativ statistic la doza de 400 mg/kg.

Pentru loturile tratate cu *Ficus elastica* s-a înregistrat o creștere semnificativă a numărului de leucocite (200 mg/kg) și a procentului de limfocite și de monocite (400 mg/kg). Chiar dacă variațiile acestor parametri au fost semnificative statistic, aceștia au rămas înscrși în limite normale, atât pentru loturile tratate cu *Raphanus sativus* cât și pentru loturile tratate cu *Ficus elastica*.

Examenul anatomopatologic al organelor a relevat în cazul animalelor tratate cu doze diferite de *Ficus elastica* modificări de tip degenerativ mai intense comparativ cu loturile tratate cu *Raphanus sativus*. Studiul histopatologic al rinichilor a relevat în cazul tuturor animalelor tratate cu extractele de testat modificări de tip degenerativ discret. Nu au fost observate modificări histopatologice la nivelul creierului.

Am efectuat un screening farmacologic privind activitatea antidiabetică și hipolipemiantă a două extracte vegetale obținute din speciile de *Raphanus sativus* și *Ficus elastica* (capitolul 8).

Pentru demonstrarea acțiunii hipoglicemizante și hipolipemizante a extractelor de *Raphanus sativus* și *Ficus elastica* administrate singure sau în asociere cu metformin s-a utilizat un model de diabet indus de aloxan [Al Hilfi, 2018].

Rezultatele cercetării privind variația glicemiei determinată prin puncționare din venele cozii, au evidențiat următoarele aspecte:

- ❖ Valoarea glicemiei pentru lotul martor non diabetic nu a variat semnificativ statistic pe tot parcursul experimentului;
- ❖ Pentru lotul martor diabetic valoarea glicemiei a scăzut nesemnificativ statistic pe parcursul cercetării, valorile acesteia rămânând etescute peste 480 mg/dl ;
- ❖ Metforminul, substanța de referință, a redus semnificativ statistic glicemia animalelor începând cu ziua a patra a experimentului;

- ❖ Pentru lotul tratat cu *Raphanus sativus* valoarea glicemiei a scăzut pe tot parcursul testării, devenind înalt semnificativă statistic din ziua a șasea a experimentului;
- ❖ Pentru lotul tratat cu *Ficus elastica* s-a observat același efect de reducere a glicemiei, dar mai slab comparativ cu loturile tratate cu extractul de *Raphanus sativus*;
- ❖ Asocierea dintre cele două extracte de testat și metformin a dus la o potențare a efectului hipoglicemiant, mai intensă în cazul asocierii cu *Raphanus sativus*.

Evaluarea efectelor asupra glicemiei determinate pe sângele total au arătat o scădere semnificativă a glicemiei pentru loturile tratate cu substanța de referință, extractele de testat și pentru asocierea dintre acestea și metformin. Aceste rezultate sunt concordante cu datele din literatură care au arătat că pentru diferite extracte de *Raphanus*, reducerea glicemiei pe diverse modele experimentale a fost doză dependentă. Efectul hipoglicemiant a fost evidențiat pentru alte specii de *Ficus*, cercetările din teza de doctorat evidențind pentru prima dată acțiunea antidiabetică a speciei *Ficus elastica*.

Extractele de testat au redus semnificativ statistic colesterolul total, cercetarea evidențind un efect de potențare între asocierea *Raphanus sativus*-metformin. *Ficus elastica* a redus cel mai intens valoarea colesterolului total (-31,78%). Pentru toate loturile din experiment tratate cu extractele de testat s-au obținut reduceri semnificative statistic ale LDL colesterolului, o potențare de efect fiind observată la asocierea dintre *Ficus elastica* și metformin. Extractul de *Ficus elastica* a produs cea mai mare creștere a HDL colesterol ( $p < 0,0001$ ). Efect intens de creștere a HDL colesterol a fost observat și pentru lotul tratat cu extract de *Raphanus sativus*. Toate substanțele de testat au redus semnificativ statistic concentrația trigliceridelor serice, cel mai intens efect fiind observat la lotul tratat cu extract de *Raphanus sativus* (-43,89%) și la lotul tratat cu asocierea *Raphanus sativus*-metformin.

Greutatea animalelor tratate cu metformin, extractele de testat singure sau în asociere cu substanța de referință au indus scăderi ale greutateii corporale, dar nesemnificative statistic.

S-a observat o capacitate antioxidantă semnificativă statistic pentru asocierea dintre *Ficus elastica* și metformin pe probele de țesut hepatic recoltate de la animalele diabetice (capitolul 9).

Evaluarea efectului extractelor de testat asupra neuropatiei induse de paclitaxel (capitolul 10) a arătat că acestea produc o creștere a parametrilor hipersensibilității dureroase tactile induse de paclitaxel, efectele fiind înalt semnificative statistic pentru extractul de *Ficus elastica*.

Evaluarea statusului *redox la nivel cerebral* pe animalul cu neuropatie indusă de paclitaxel a arătat:

- tratamentul cu gabapentin (300 mg/kg corp) a crescut capacitatea antioxidantă a țesutului cerebral;
- extractul de *Raphanus sativus L.* (400 mg/kg corp, 11 zile) a crescut cantitatea de tioli totali și de oxid nitric, prezentând proprietăți antioxidante la nivel cerebral.

Statusul *redox la nivel hepatic* la animale cu neuropatie indusă de paclitaxel, a evidențiat faptul că tratamentul cu extract din frunze de *Raphanus sativus L.* (400 mg/kg corp, 11 zile) a crescut capacitatea antioxidantă a țesutului hepatic.

Am realizat dezvoltarea farmaceutică (*capitolul 11*) a unui nou podus de natură vegetală, conținând un amestec de extracte vegetale standardizate în principii active cu acțiune hipoglicemiantă și hipolipemiantă (400 mg/capsulă). Am formulat două variante experimentale de amestecuri de umplere a capsulelor, prin amestecarea extractelor vegetale cu excipienții selectați, în diferite proporții și am determinat următoarele caracteristici fizice ale amestecurilor de umplere: aspect, curgere, mase volumice înainte și după tasare și compresibilitatea. Am obținut capsule cu concentrația de 400 mg extracte/unitate și am efectuat controlul calității acestora.

*Originalitatea subiectului* ales pentru cercetare în această teză de doctorat constă în următoarele aspecte:

- ❖ pentru *Ficus elastica* nu sunt publicate în literatura de specialitate date privind acțiunea antidiabetică a acestei specii (cele mai multe cercetări fac referire la alte specii de *Ficus*: *F. benghalensis*, *F. carica*, *F. glomerata*, *F. glumosa*, *F. racemosa* și *F. religiosa*);
- ❖ pentru *Raphanus sativus* există date experimentale, *in vitro* și *in vivo*, care evidențiază efectul hipoglicemiant, dar nu sunt date suficiente care să susțină acțiunea hipolipemiantă pe modele animale cu diabet zaharat și dislipidemie;
- ❖ cercetarea prezintă efectele hipoglicemiante și hipolipemiante ale asocierii dintre cele două extracte obținute din *Ficus elastica* și *Raphanus sativus* și metformin, un antidiabetic biguanidic, larg utilizat în tratamentul diabetului zaharat de tip 2;
- ❖ evidențierea efectului antialodinic și antihiperalgic al principiilor active conținute în extractele obținute din frunzele de *Ficus elastica* și *Raphanus sativus*;

❖ evidențierea efectului antioxidant in vivo al extractelor obținute din *Ficus elastica* și *Raphanus sativus*, pe modelul de animal diabetic și pe modelul animal de neuropatie indusă de paclitaxel.

### Bibliografie selectivă

1. \*\*\* Legea nr. 199/2018 pentru modificarea și completarea Legii nr. 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. <https://lege5.ro/>. Accesat 9 iunie 2018.
2. \*\*\* OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 24, Guidance document on acute oral toxicity testing, Adoptat iunie 2001. Accesat 22 septembrie 2018.
3. \*\*\* OECD Guideline 407, Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, Adoptat 3 octombrie 2008. Accesat 18 septembrie 2018.
4. \*\*\* OECD Guideline for the testing of chemicals 425, Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP), Adoptat 3 octombrie 2008. Accesat 16 septembrie 2018.
5. \*\*\* OECD guidelines for the testing of chemicals 407, Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, Adoptat 3 octombrie 2008. Accesat 16 septembrie 2018.
6. \*\*\* American Diabetes Association. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018;41 (Suppl 1):S1-S2. Accesat 7 septembrie 2018.
7. \*\*\* Centers for Disease Control and Prevention, National Diabetes Statistics Report, 2017, Atlanta, GA, USA, Centers for Disease Control and Prevention, US Dept. of Health and Human Services, 2017. Accesat 1 decembrie 2018.
8. \*\*\* Farmacopeea Română ediția a X a Supliment 2004. <https://www.academia.edu/9679681>. Accesat 1 aprilie 2018.
9. \*\* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> Accesat 9 mai 2018.
10. *Al Hilfi ZFA*, Neneu I, Costea T, Gîrd CI, Stoicescu CS, Anghel AI, Aneucanu RV, Dinu M, Ionică HE, Șeremet OC, Negreș S. Chemical composition and antioxidant activity of *Ficus elastica* roxb. ex hornem and *Raphanus sativus* L. selective dry extracts with potential antidiabetic activity. *Farmacia* 2019, 67(5); in press.
11. *Al Hilfi ZFA*, Șeremet OC, Moroșan I, Ștefănescu E, Zanfirescu A, Aneucanu RV, Stoicescu CS, Dinu M, Negreș S. The Antidiabetic Potential of the Hydroethanolic Dry Extracts Obtained from the Leaves of *Raphanus sativus* and *Ficus elastica* Proceedings of The Romanian National Congress of Pharmacy 17th Edition, Filodiritto Editore, 2018;15-19.
12. [Bai L, Li X, He L, Zheng Y, Lu H, Li J, Zhong L, Tong R, Jiang Z, Shi J, Li J](#) Antidiabetic Potential of Flavonoids from Traditional Chinese Medicine: A Review. [\[Am. J. Chin. Med.\]](#) 2019 Jun 27;1-25.
13. [Bilal M, Iqbal MS, Shah SB, Rasheed T, Iqbal HMN](#). Diabetic Complications and Insight into Antidiabetic Potentialities of Ethno-Medicinal Plants: A Review. [\[Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.\]](#) 2018;12(1):7-23.
14. Bischoff KL. Glucosinolates. *Nutraceuticals, Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press, 2016;551-554.
15. Castro-López C, Ventura-Sobrevilla JM, González-Hernández MD, Rojas R, Ascacio-Valdés J, Aguilar CN, Martínez-Ávila GCG. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts, *Food Chem.*, 2017;237:1139-1148.

16. Castro-Torres RG1, De la O-Arciniega M, Gallegos-Istudillo J, Naranjo-Rodriguez TB, Dominguez-Ortiz MA. *Raphanus sativus* L. var *niger* as a source of phytochemicals for the prevention of cholesterol gallstones. *Phytother. Res.*, 2014 Feb;28(2):167-71.
17. Chan FWC, Tangah J, Inoue T, Kainuma M, Baba K, Oshiro N, Kezuka M, Kimura N. Botany, uses, chemistry and pharmacology of *Ficus microcarpa*: a short review. *Syst. Rev. Pharm.*, 2017; 8(1):103-111.
18. Chan JC, Malik V, Jia W, Kadowaki T, Yajnik CS, Yoon KH, Hu FB. Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA*, 2019;301(20):2129-2140.
19. Chmelova H, Cohrs CM, Chouinard JA, Petzold C, Kuhn M, Chen C, Speier S. Distinct roles of  $\beta$ -cell mass and function during type 1 diabetes onset and remission. *Diabetes*, 2015;64(6):2148-2160.
20. Choi KC, Cho SW, Kook SH, Chun SR, Bhattarai G, Poudel SB, Kim MK, Lee KY, Lee JC. Intestinal anti-inflammatory activity of the seeds of *Raphanus sativus* L. in experimental ulcerative colitis models. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016;179:55-65.
21. Dabe NI, Kefale AT. Antidiabetic Effects of Artemisia Species: A Systematic Review. *Anc. Sci. Life.*, 2017;36(4):175-181.
22. De Marco R, Locatelli F, Zoppini G, Verlato G, Bonora F, Muggeo M. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care*, 1999;22(5):756-761.
23. Deepa P, Sowndhararajan K, Kim S, Park SJ. A role of *Ficus* species in the management of diabetes mellitus: a review. *J. Ethnopharmacol.*, 2018;215:210-232.
24. Diniz Vilela D, Gomes Peixoto L, Teixeira RR, Bebele Baptista N, Carvalho Caixeta D, Vieira de Souza A, Machado III, Pereira MN, Sabino Silva R, Espindola FS. The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016;1-9.
25. Dinu M, Ancuceanu R, Hovaneț M, Anghel AI, Crețu O, Rebegea OC, Olaru OI. Botanică farmaceutică Baze teoretice și practice. Citologie, histologie, organografie. Ed a III-a revizuită. Editura Universitară, București, 2013;77-89:161-201.
26. El-Hawary SS, Wassel GM, El-Menshawī BS, Ibrahim NA, Mahmoud K, Ayoub MM. Antitumor and antioxidant activity of *Ficus elastica* Roxb. and *Ficus bengalensis* Linn. Family Moraceae. *World Applied Sciences Journal*, 2012;19(11):1532-1539.
27. Elshazly MO, Morgan AM, Ali MI, Abdel-Mawla E, Abd El-Rahman SS. The mitigative effect of *Raphanus sativus* oil on chromium-induced geno- and hepatotoxicity in male rats. *J. Adv. Res.*, 2016;7(3):413-21.
28. El-Shobaki FA, El-Bohay AM, Esmail, RSA. Effect of figs fruit (*Ficus carica* L.) And its leaves on hypoglycemia in alloxan diabetic rats. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 2010; 5(1): 47-57.
29. Gastaldelli A, Baldi S, Pettiti M, Toschi E, Camastra S, Natali A, Ferrannini E. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes*, 2000;49(8):1367-1373.
30. Geerlings SJ, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 1999;26(3-4): 259-265.
31. Genuth S, Eastman R, Kahn R. Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Diabetes Care*, 2003;26(1):S28-32.
32. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000 Dec;29(11):1106-14.
33. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World J. Diabetes*, 2015;6:151.

34. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2010;60(4):207-221.
35. Girard J, Lafontan M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes & Metabolism*, 2008;34(5):439-445.
36. González FM, Johansson S, Wallander MA, Rodríguez IG. Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996-2005. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 2009;63(4): 332-336.
37. Gorwadiya SRM, Vachhani KV, Desai IR, Pandya DJ. Pharmacognostic Study and Establishment of Quality Parameters of Leaves of *Ficus racemosa* Linn. *Pharmacognosy Journal*, 2010; 2(15):15-20.
38. Govindarajan M, Sivakumar R, Amsath A, Niraimathi S. Mosquito larvicidal properties of *Ficus benghalensis* L. (Family: Moraceae) against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2011; 4(7):505-509.
39. Goyeneche R, Roura S, Ponce A, Vega-Galvez A, Quispe-Fuentes I, Uribe L, Di Scala K. Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *J. Funct. Foods*, 2015;16:256-264.
40. Grassi D, Desideri G, Ferri C. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*, 2010;2:889-902.
41. Gutiérrez RM, Perez RL. *Raphanus sativus* (Radish): Their Chemistry and Biology. *The Scientific World Journal*, 2004;4:811-837.
42. Handelsman Y, Bloomgarden ZI, Grunberger G, Umpierrez G, Zimmerman RS, Bailey TS, Davidson JA. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan-2015. *Endocrine Practice*, 2015;21(s1):1-87.
43. Hanlon PR, Barnes DM. Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts and mature taproots. *Journal of Food Science*, 2011;76(1):C185-192.
44. Heinrich M, Barnes J, Prieto-García J, Gibbons S, Williamson T. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Elsevier Health Sciences, 2017;30-31.
45. Hemminki K, Li X, Sundquist K, Sundquist J. Familial risks for type 2 diabetes in Sweden. *Diabetes Care*, 2010;33(2):293-297.
46. Ibeh BO, Ezeaja MI. Preliminary study of antidiabetic activity of the methanolic leaf extract of *Axonopus compressus* (P.Beauv) in alloxan induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 2011;138(3):713-716.
47. Iqbal D, Khan MS, Khan MS, Ahmad S, Hussain MS, Ali M. Bioactivity guided fractionation and hypolipidemic property of a novel HMG-CoA reductase inhibitor from *Ficus virens* Ait. *Lipids Health Dis.*, 2015 Mar 4;14:15.
48. Ishida M, Nagata M, Ohara I, Kakizaki T, Hatakeyama K, Nishio T. Small variation of glucosinolate composition in Japanese cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.) requires simple quantitative analysis for breeding of glucosinolate component. *Breeding Science*, 2012;62(1):63-70.
49. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nature Reviews Endocrinology*, 2016;12(3):144.

50. Jusufbegovic D, Mugavin MO, Schaal S. Evolution of controlling diabetic retinopathy: changing trends in the management of diabetic macular edema at a single institution over the past decade. *Retina*, 2015;35(5):929-934.
51. Karłowicz-Bodalska K, Han S, Freier J, Smolenski M, Bodalska A. Curcuma longa as medicinal herb in the treatment of diabetic complications. *Acta Pol. Pharm.*, 2017;74(2):605-610.
52. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, 2016;37(3):278-316.
53. Keumoe R, Nguembou MS, Tsouh FP, Donkeng DV, Dize D, Tchokouaha YI, Jiatsa MC, Youmsi IR, Ngameni B, Fekam BF. Antimycobacterial activity of medicinal plants against the causative agent of buruli ulcer: *Mycobacterium ulcerans*. *International Journal of Mycobacteriology*, 2016;5:S105.
54. Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai KK. A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 2012; 4(1):27-42.
55. Kiem PV, Minh CV, Nhiem NX, Tai BH, Quang TH, Anh HL, Cuong NX, Hai TN, Kim SH, Kim JK, Jung HD. Chemical constituents of the *Ficus elastica* leaves and their antioxidant activities. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2012;33(10):3461-3464.
56. Kim KH, Kim CS, Park YJ, Moon F, Choi SU, Lee JH, Kim SY, Lee KR. Anti-inflammatory and antitumor phenylpropanoid sucrosides from the seeds of *Raphanus sativus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015a;25(1):96-99.
57. Kim KH, Moon F, Kim SY, Choi SU, Lee JH, Lee KR. 4-Methylthio-butanyl derivatives from the seeds of *Raphanus sativus* and their biological evaluation on anti-inflammatory and antitumor activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014;151(1):503-508.
58. Kim KH, Moon F, Lee SR, Park KJ, Kim SY, Choi SU, Lee KR. Chemical Constituents of the Seeds of *Raphanus sativus* and their Biological Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2015b;26(11):2307-2312.
59. Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 2016;12(3):154.
60. Kodisehek I.K, Umbreit WW: Principle method for the determination of triglycerides. *J. Bacteriol.*, 1969;98:1063-1068.
61. Lind M, Svensson AM, Kosiborod M. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 2014;371:1972-82.
62. Lopez Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA: Cholesterol determination in highdensity lipoproteins separated by three different methods. *Clinical Chemistry*, 1977;23: 882.
63. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951;193, 265-75.
64. Luo X, Zhang H, Duan Y, Chen G. Protective effects of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves extract against hydrogen peroxide induced oxidative damage in human fetal lung fibroblast (MRC-5) cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018;103:406-414.
65. Macharla SP, Goli V, Sattla SR. Antidiabetic activity of *Rephanus Sativus* L. leaves extracts on alloxan induced diabetic rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2012;4(3):1519-1522.
66. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2005;202(3):654-662.

67. Maedler K, Carr RD, Bosco D, Zuellig RA, Berney T, Donath MY. Sulfonylurea induced  $\beta$ -cell apoptosis in cultured human islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005;90(1):501-506.
68. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Acta Chemica*, 2008;613(1): 1-19.
69. Mahmood SH, Hussein BS. Anatomical study of some characters in certain species of genus *Ficus* L. growing in Iraq. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 2016;6(12):98.
70. Mahomoodally MF, Profah K, Aumeeruddy MZ. Medicinal plants brought by Indian indentured immigrants: A comparative review of ethnopharmacological uses between Mauritius and India. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019;234:245-289.
71. Malgaard P. Caffeic acid as a taxonomic marker in dicotyledons. *Nord. J. Bot.*, 1985;5(3):14.
72. Mallik C, De D, Ghosh D. Correction of protein metabolic disorders by composite extract of *Musa paradisiaca* and *Coccinia indica* in streptozotocin induced diabetic albino rat: An approach through the pancreas. *Pancreas*, 2009; 38:322-9.
73. Manjunath K, Bhanu Prakash G, Subash KR, Ladvi NA, Manikanta M, Umamaheswara Rao K. Effect of Aloe vera leaf extract on blood glucose levels in alloxan induced diabetic rats. *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol.*, 2016;6(5):471-474.
74. Mao X, Xing X, Xu R, Gong Q, He Y, Li S, Liu Z. Folic acid and vitamins D and B12 correlate with homocysteine in Chinese patients with type-2 diabetes mellitus, hypertension, or cardiovascular disease. *Medicine*, 2016;95(6).
75. Marie-Magdeleine C, Udino L, Philibert L, Bocage B, Archimede H. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, 2010 Oct 11;173(1-2):85-92.
76. Marín-Peñalve, JJ, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, del Cañizo-Gómez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 2016;7(17):354.
77. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2013;17(1):24-38.
78. Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze R, Ruser A, Hansen UP. Determination of DPPH Radical oxidation caused by methanolic extracts of some Macroalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, 2007;7:2080-2095.
79. Misra H, Soni M, Silawat N, Mehta D, Mehta BK, Jain DC. Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2011;3(2):242-248.
80. Miyake H, Matsumura H, Fujinuma Y, Totsuka I. Effects of low concentrations of ozone on the fine structure of radish leaves. *New Phytologist*, 1989;111(2):187-195.
81. Molyneux P. The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Songklanakaraj. J. Sci. Technol.*, 2004;26 (2):211-219.
82. Monami, M, Dicembrini I, Mannucci L. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and pancreatitis risk: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2014;16(1):48-57.
83. Mooradian AD, Bernbaum M, Albert SG. Narrative review: a rational approach to starting insulin therapy. *Annals of Internal Medicine*, 2006;145(2):125-134.
84. Moore PA, Weyant RJ, Mongelluzzo MB, Myers DL, Rossie K, Guggenheimer J, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 1999;70(4):409-417.

85. Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 2010;16(4):347-363.
86. Mudaliar U, Zabetian A, Goodman M, Echouffo-Tcheugui JB, Albright AL, Gregg EW, Ali MK. Cardiometabolic risk factor changes observed in diabetes prevention programs in US settings: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine*, 2016;13(7):e1002095.
87. Negreş S, Chiriţă C, Moroşan I, Arsene AL. Experimental pharmacological model of diabetes induction with alloxan in rat. *Farmacia*, 2013;61(2):313-323.
88. Nencu I, Popescu ML, Istudor V, Costea T, Duţu LE, Gîrd CE. The selection of technological parameters in order to obtain an extract with important antioxidant activity from stinging nettle leaves. *Farmacia*, 2017;65 (2):295-300.
89. Niki E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch. Biochem. Biophys.*, 2016;595:19-24.
90. Panday DR, Rauniar GP. Effect of root-extracts of *Ficus benghalensis* (Banyan) in pain in animal models. *J. Neurosci. Rural Pract.*, 2016;7(2):210-215.
91. Park HJ, Song M. Leaves of *Raphanus sativus* L. shows anti-inflammatory activity in LPS-stimulated macrophages via suppression of COX-2 and iNOS expression. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2017;22(1):50-55.
92. Park HJ, Song M. Leaves of *Raphanus sativus* L. Shows Anti-Inflammatory Activity in LPS-Stimulated Macrophages via Suppression of COX-2 and iNOS Expression. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 2017;22(1):50-55.
93. Park JH, Shin KK, Hwang CW. New antimicrobial activity from Korean radish seeds (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001;11(2):337-341.
94. Pastors JG, Warshaw H, Daly A, Franz M, Kulkarni K. The evidence for the effectiveness of medical nutrition therapy in diabetes management. *Diabetes Care*, 2002;25(3):608-613.
95. Patent JG, Allert M. Histological changes in the pancreatic islets of alloxan-treated mice, with comments on beta-cell regeneration. *Acta Anat. (Basel)*, 1967;66:504-19.
96. Patterson F, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal*, 2016;92(1087):286-300.
97. Peng Y, Bishop KS, Quek SY. Extraction Optimization, Antioxidant Capacity and Phenolic Profiling of Extracts from Flesh, Peel and Whole Fruit of New Zealand Grown Feijoa Cultivars. *Antioxidants (Basel)*. 2019 May 21;8(5), pii: F141.
98. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Ziegler D. Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 2017;40(1):136-154.
99. Popescu ML, Costea T, Gîrd CE, Fierascu I, Balaci TD, Fierăscu RC. Antioxidant Activity of Romanian *Agaricus blazei* Murrill, and *Agaricus bisporus* JF Lange mushrooms. *Farmacia*, 2017;65(3):329-335.
100. Sahoo KS, Panda S. Raphanus sativus linn. a new antinociceptive for diabetic neuropathy in rats determined by Randall Selitto approach. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2019;12(3):529-534.
101. Thomson M, Al-Qattan KK, Jis D, Ali M. Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2016;16:17.
102. Ullah A, Khan A, Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise Review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2016;24:547-553.

103. Vafeiadi M, Roumeliotaki T, Chalkiadaki G, Rantakokko P, Kiviranta H, Fthenou E, Chatzi L. Persistent organic pollutants in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. *Environment International*, 2017;98:89-95.
104. Wang C, Wang B. Ginkgo biloba extract attenuates oxidative stress and apoptosis in mouse cochlear neural stem cells. *Phytother. Res.*, 2016;30:774-780.
105. Weir MR. The kidney and type 2 diabetes mellitus: therapeutic implications of SGLT2 inhibitors. *Postgraduate Medicine*, 2016;128(3):290-298.
106. Widhiantara G, Arunngam P, Siswanto FM. Ethanolic Extract of *Caesalpinia bonducella* f. Seed Ameliorates Diabetes Phenotype of Streptozotocin- Nicotinamide-Induced Type 2 Diabetes Rat. *Biomedical and Pharmacology Journal* 2018;11(2):1127-1133.
107. Woode E, Poku RA, Ainooson GK, Boakye-Gyasi E, Abotsi WKM, Mensah TI, Amoh-Barimah AK. An Evaluation of the Anti-inflammatory, Antipyretic and Antinociceptive Effects of *Ficus exasperata* (Vahl) Leaf Extract. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2009;4(4):138-151.
108. Wu S, Lu Q, Ding Y, Wu Y, Qiu Y, Wang P, Zou MH. Hyperglycemia-Driven Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase  $\alpha 2$  Induces Diabetic Cardiomyopathy by Promoting Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in vivo. *Circulation*, 2019 Apr 16;139(16):1913-1936.
109. Yeung S, Šoljternik J, Mazzola N. Nutritional supplements for the prevention of diabetes mellitus and its complications. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism* 2018;14:16-21.
110. Zbârcea CE, Negreş S, Chiriță C. Gabapentin, alone and associated with tramadol reduces peripheral paclitaxel-induced neuropathy in rats. *Farmacologia*, 2011;59(3):414-423.
111. Zhang H, Birch J, Xie C, Yang H, El-Din Bekhit A. Optimization of ultrasound assisted extraction method for phytochemical compounds and in-vitro antioxidant activity of New Zealand and China *Asparagus cultivars (officinalis L.)* roots extracts. *Food Chem.*, 2019;294:276-284.
112. Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine*, 2017;49(2):106-116.