



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
UNIVERSITY OF BANJA LUKA
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
FACULTY OF MEDICINE



Biljana Lakić

**UTICAJ URSODEOKSIHOLNE KISELINE NA PARAMETRE
OKSIDATIVNOG STRESA, INFLAMACIJE I ENDOTELNE
DISFUNKCIJE KOD PACIJENATA SA DIJABETES
MELITUSOM TIPA 2**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2025



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
UNIVERSITY OF BANJA LUKA
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
FACULTY OF MEDICINE



Biljana Lakić

**THE EFFECTS OF URSODEOXYCHOLIC ACID ON
PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION
AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH
TYPE 2 DIABETES**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2025

Mentor: Prof. dr Momir Mikov, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Komentor: Prof. Dr Ranko Škrbić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci

Naslov doktorske disertacije: Uticaj ursodeoksiholne kiseline na parametre oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne disfunkcije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2

Rezime: Oksidativni stres i inflamacija su blisko povezani patofiziološki procesi koji se javljaju kod dijabetes melitusa tipa 2 (DMT2) uz endotelnu disfunkciju posljedično uzrokovanu hroničnom hiperglikemijom. Pored standardnog liječenja DMT2 potencijalna strategija je usmjerena na upotrebu žučnih kiselina kao dodatnog vida liječenja. Ursodeoksiholna kiselina (UDCA), prirodna žučna kiselina, kao prva koja se koristi kod ljudi, poboljšava metabolizam glukoze i lipida i ublažava oksidativni stres. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj UDCA na parametre oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne disfunkcije kod pacijenata sa DMT2 koji su liječeni samo jednim oralnim antidijabetikom (metforminom).

Istraživanje je provedeno kao randomizovana, dvostruko slijepa, placebo kontrolisana klinička studija, koja je obuhvatila 60 pacijenata sa DMT2, nasumično raspoređenih da primaju UDCA (n=30) ili placebo (n=30). Ispitanici su liječeni tabletama UDCA od 250 mg ili placebo tri puta dnevno po dvije tablete (ukupna doza od 1500 mg/dan) tokom osam nedelja. Tri studijske posjete, na početku (F0), nakon četiri nedelje (F1) i na kraju studije (F2), uključivale su intervju, antropometrijska i klinička mjerenja kao i laboratorijske analize krvi.

Tretman sa UDCA je pokazao značajno smanjenje prooksidativnih parametara (indeksa lipidne peroksidacije, nitrita, vodonik peroksida) i značajno povećanje antioksidativnih parametara (superoksid dismutaze, redukovano glutatona i katalaze). Parametri inflamacije i endotelne disfunkcije se nisu značajno mijenjali između grupa. Nadalje, u UDCA grupi utvrđeno je značajno smanjenje indeksa tjelesne mase i dijastolnog krvnog pritiska, te gotovo statistički značajna razlika u obimu struka u poređenju sa placebo. Tokom osmonedelnog praćenja u UDCA grupi je došlo do značajnog smanjenja aktivnosti enzima jetre te je uočen trend smanjenja prosječnog nivoa glukoze, ali bez statističke značajnosti. S obzirom na sve utvrđene nalaze, UDCA bi mogla da ublaži progresiju dijabetesnih komplikacija i trebalo bi je smatrati dodatnom opcijom drugim modalitetima liječenja DMT2.

Ključne riječi: dijabetes melitus tipa 2, ursodeoksiholna kiselina, oksidativni stres, inflamacija, endotelna disfunkcija

Naučna oblast: Porodična medicina/Dijabetologija

Naučno polje: Medicina

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrarniku: B720/B480

Tip odabrane licence Kreativne zajednice (Creative Common) za način korištenja sadržaja disertacije: Autorstvo – nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima

Mentor: Momir Mikov, MD, PhD, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad

Co-mentor: Ranko Škrbić, MD, PhD, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka

Title of the doctoral dissertation: The effects of ursodeoxycholic acid on parameters of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes

Summary: Oxidative stress and inflammation are closely related pathophysiological processes that occur in type 2 diabetes mellitus (DMT2) with endothelial dysfunction resulting from chronic hyperglycemia. In addition to the standard treatment of DMT2, a potential strategy is focused on the use of bile acids as an additional form of treatment. Ursodeoxycholic acid (UDCA), a natural bile acid, the first to be used in humans, improves glucose and lipid metabolism and alleviates oxidative stress. The aim of this study was to examine the effect of UDCA on the parameters of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction in patients with T2DM who were treated with only one oral antidiabetic (metformin).

The research was conducted as a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study, which included 60 patients with DMT2, randomly assigned to receive UDCA (n=30) or placebo (n=30). Subjects were treated with 250 mg UDCA tablets or placebo, two tablets three times a day (total dose of 1500 mg/day) for eight weeks.. Three study visits, at the beginning (F0), after four weeks (F1) and at the end (F2) of the study, included an interview, anthropometric and clinical measurements and laboratory blood analyses.

Treatment with UDCA showed a significant decrease in pro-oxidative parameters (lipid peroxidation index, nitrite, hydrogen peroxide) and a significant increase in antioxidant parameters (superoxide dismutase, reduced glutathione and catalase). The parameters of inflammation and endothelial dysfunction did not change significantly between the groups. Furthermore, in the UDCA group, a significant reduction in body mass index and diastolic blood pressure, as well as an almost statistically significant difference in waist circumference compared to placebo, were found. During the eight-week follow-up in the UDCA group, there was a significant decrease in the activity of liver enzymes, and a trend of a decrease in the average glucose level was observed, but without statistical significance. Considering all the findings, UDCA could alleviate the progression of diabetes complications and should be considered as an additional option to other DMT2 treatment modalities.

Key words: diabetes melitus type 2, ursodeoxycholic acid, oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction

Scientific area: Family medicine/Diabetology

Scientific field: Medicine

Classification code for the scientific area by CERIF codebook: B720/B480

Type of the selected license (Creative Commons) how to use the content of doctoral dissertation: Attribution – Noncommercial – Share like

Zahvalnica

Ovu stranicu koristim da izrazim svoju zahvalnost osobama koje su me pratile i podržavale na dugom i zahtjevnom putu izrade ove doktorske disertacije.

Iskrenu i duboku zahvalnost dugujem svojim mentorima:

Prof. dr Momiru Mikovu, koji je, tamo daleko, pristao da bude mentor kandidatu kojeg nije poznavao. Njegovo izuzetno znanje u oblasti kojom se ova disertacija bavi, kao i nesebična spremnost da mi pruži savjet kada sam tražila, bili su mi od neprocjenjivog značaja.

Prof. dr Ranku Škrbiću, koji je bio tu, tokom čitavog procesa — uvijek spreman da svojim znanjem, strpljenjem i razumijevanjem pruži vjetar u leđa, naročito u trenucima kada bih posustala. Za njega ne postoji nemoguće, naprotiv sve je moguće uz trud i rad, ako se želi uspjeh...

Hvala vam što ste bili mentori u pravom smislu te riječi — mentori kakve bi svaki student poželio na svom akademskom putu.

Veliku zahvalnost dugujem i svojim kolegama i prijateljima iz Doma zdravlja Banja Luka, kao i sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, na nesebičnoj pomoći, podršci i svim zajedničkim trenucima koji su ovaj proces učinili smislenijim, bogatijim i lakšim, te omogućili da ova disertacija ugleda svjetlost dana.

Na kraju, beskrajno hvala mojoj porodici, suprugu Dragoljubu i našem sinu Aleksi, koji su bili uz mene i strpljivo podnosili sve moje „dobre“ i „loše“ trenutke. Vaša ljubav, podrška i snaga vraćali su me na pravi put uvijek kada bih sa njega skrenula. Bez vas, ovaj rad ne bi bio samo nezavršen — bio bi nezamisliv.

Svima vama — od srca hvala.

Biljana Lakić

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PREDMET ISTRAŽIVANJA I DIJABETES MELITUS	1
1.1.1. Epidemiološki podaci o DMT2	2
1.1.2. Patogenetski mehanizmi nastanka DMT2.....	2
1.1.3. Glukoregulacija u DMT2	6
1.2. Oksidativni stres, infamacija i endotelna disfunkcija.....	6
1.2.1. Oksidativni stres i DMT2	6
1.2.2. Inflamacija i DMT2.....	9
1.2.3. Endotelna disfunkcija i DMT2	10
1.3. Terapijski pristup DMT2.....	12
1.4. Homocistein i folati – veza sa dijabetesom i povišenim KV rizikom.....	13
1.5. Uloga žučnih kiselina u metabolizmu glukoze	14
1.5.1. Klasifikacija žučnih kiselina	16
1.5.2. Biosinteza žučnih kiselina i enterohepatička cirkulacija.....	16
1.5.3. Ursodeoksiholna kiselina	18
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	22
2.1. Ciljevi istraživanja.....	22
2.2. Hipoteze istraživanja	22
3. MATERIJAL I METOD RADA.....	23
3.1. Dizajn istraživanja.....	23
3.2. Ispitanici – selekcija i randomizacija ispitanika.....	23
3.3. Primjenjeni lijekovi u istraživanju	25
3.4. Protokol istraživanja i metode.....	25
3.4.1. Antropometrijska mjerenja.....	26
3.4.2. Mjerenje krvnog pritiska	27
3.4.3. Laboratorijska ispitivanja krvi - Uzorkovanje i sakupljanje uzoraka krvi	27

3.5. Etički aspekt u istraživanju	30
3.6. Statistička analiza.....	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Socio-demografske karakteristike ispitanika u istraživanju.....	32
4.2. Antropometrijska i klinička mjerenja kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom	34
4.3. Parametri oksidativnog stresa (prooksidativni i antioksidativni parametri) kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom	37
4.4. Parametri inflamacije kod pacijenata sa DMT2.....	47
4.5. Parametri endotelne disfunkcije kod pacijenata sa DMT2.....	48
4.6. Glukoregulacija i stepen insulinske rezistencije kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom	51
4.7. Lipidni status (ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL) kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom	53
4.8. Faktori životnog stila kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom	55
4.9. Parametri jetrene funkcije kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom.....	56
5. DISKUSIJA.....	61
5.1. Uticaj UDCA na gojaznost kod pacijenata sa DMT2	61
5.2. Uticaj UDCA na krvni pritisak kod pacijenata sa DMT2	62
5.3. Uloga UDCA u oksidativnom stresu kod pacijenata sa DMT2	63
5.4. Uloga UDCA u inflamaciji kod pacijenata sa DMT2	64
5.5. Uloga UDCA u endotelnoj disfunkciji kod pacijenata sa DMT2	65
5.6. Uticaj UDCA na glukoregulaciju i insulinsku rezistenciju u DMT2	66
5.7. Uticaj UDCA na dislipidemiju u DMT2	68
5.8. Uticaj UDCA na parametre jetrene funkcije u DMT2	68
5.9. Prednosti i ograničenja istraživanja.....	70
6. ZAKLJUČCI	71
7. LITERATURA.....	72

LISTA SKRAĆENICA	88
PRILOZI.....	91
PRILOG 1.	92
SERTIFIKAT ANALIZE UDCA 250 mg film obložene tablete	93
SERTIFIKAT ANALIZE PLACEBO UDCA 250 mg film obložene tablete	94
PRILOG 2.	95
UPITNIK (UDCADMT2) ZA ISPITANIKE.....	95
PRILOG 3.	97
DNEVNIK ZA PACIJENTE	97
PRILOG 4.	98
OBRADA ERITROCITA	98
PRILOG 5.	99
Research Article - Beneficial Effects of Ursodeoxycholic Acid on Metabolic Parameters and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study.....	99
PRILOG 6. BIOGRAFIJA	110
IZJAVE	111
Izjava 1 – Izjava o autorstvu	112
Izjava 2 – Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom	113
Izjava 3 – Izjava o autentičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije .	114

1. UVOD

1.1. PREDMET ISTRAŽIVANJA I DIJABETES MELITUS

Dijabetes melitus (DM) kao heterogena grupa metaboličkih poremećaja glukoze, masti i proteina, sa prevalencijom koja se povećava decenijama, je ozbiljan zdravstveni problem širom svijeta i s pravom se naziva epidemijom XXI vijeka.

Pored epidemioloških podataka u svijetu i kod nas o DM, u ovom istraživanju predstavljeni su i detaljno opisani patogenetski mehanizmi nastanka najčešćeg oblika DM, dijabetes melitusa tipa 2 (DMT2), glukoregulacija i terapijski pristup u liječenju DMT2, kao i drugi parametri u vezi sa ovom bolešću i kardiovaskularnim rizikom.

Danas je poznato da oksidativni stres, inflamacija i endotelna disfunkcija imaju ulogu u razvoju samog DMT2 kao i dijabetesnih komplikacija. Takođe praćenje parametara oksidativnog stresa, inflamatornog odgovora i endotelne disfunkcije kod pacijenata sa DMT2 od suštinske je važnosti, ne samo u kontekstu praćenja toka bolesti, već i radi prevencije i odlaganja nastanka hroničnih komplikacija. Ovi biomarkeri mogu u budućnosti poslužiti kao osnova za uvođenje efikasnijih terapijskih pristupa.

Krajem XX vijeka žučne kiseline su zainteresovale naučnike da počnu da rade istraživanja ne samo zbog njihovog djelovanja na solubilizaciju holesterola i bolje varenje već i mogućeg efekta na metabolizam glukoze. Iako su žučne kiseline prepoznate kao ljekovita sredstva koja imaju svoju medicinsku primjenu godinama unazad, tek sa otkrićem receptora za koje se vežu i koje aktiviraju dobijaju na značaju, posebno za istraživanja u oblasti dijabetesa i mehanizama dejstva savremenih terapijskih procedura. Iz tog razloga, predmet ovog istraživanja je jedna od žučnih kiselina koja se već koristi u liječenju bolesti gastrointestinalnog trakta, s ciljem ispitivanja njenog uticaja na oksidativni stres, inflamaciju i endotelnu disfunkciju i kod DMT2.

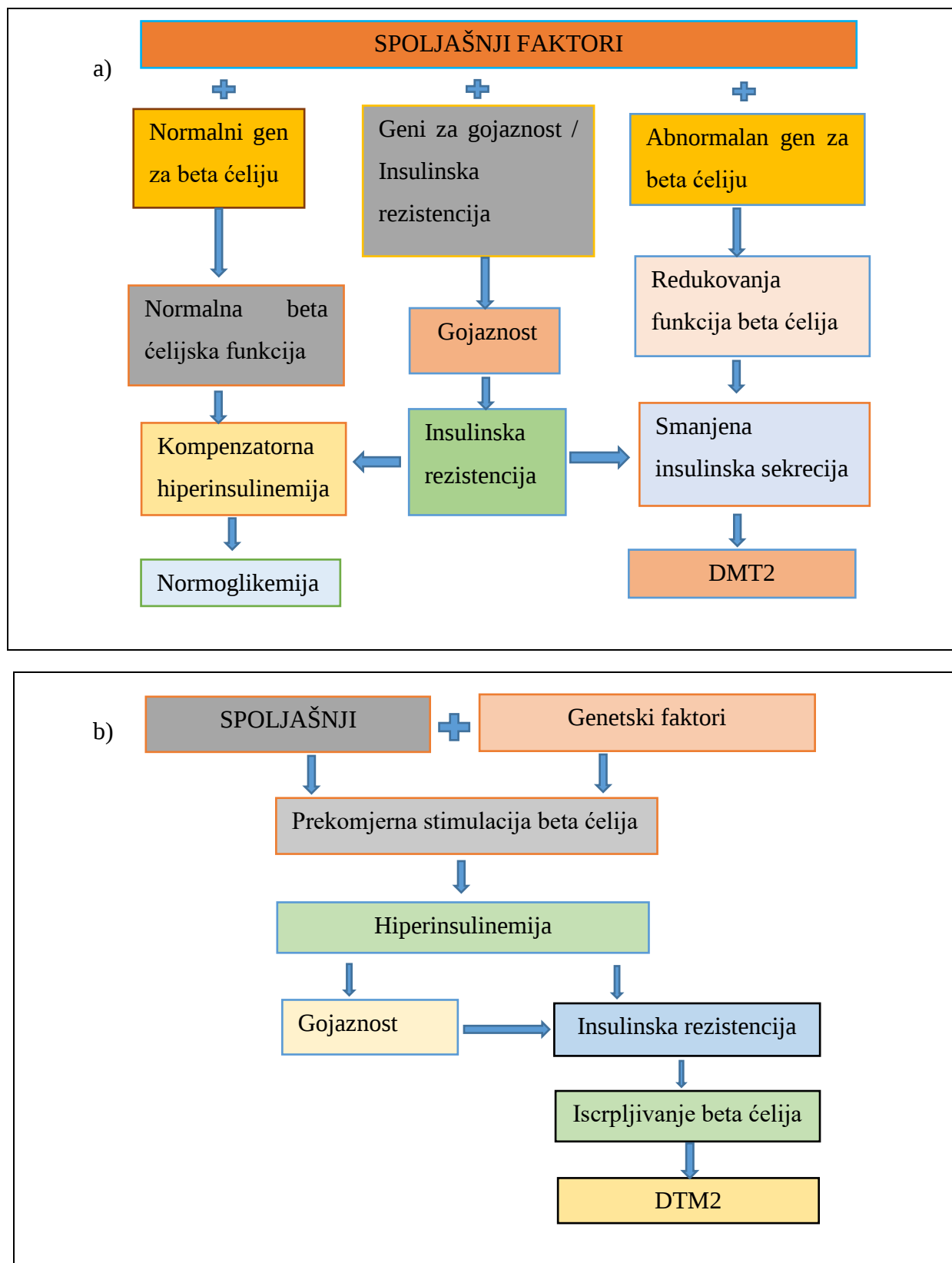
1.1.1. Epidemiološki podaci o DMT2

Prema podacima Međunarodne federacije za dijabetes (*International Diabetes Federation – IDF*) tokom 2021. godine 537 miliona (10,5%) odraslih osoba životne dobi od 20 do 79 godina su imali dijabetes, a procjenjuje se da će do 2045. godine preko 783 miliona (12,2%) odraslih (svaki osmi stanovnik) živjeti sa dijabetesom [1]. Među 10 zemalja sa najvećom prevalencijom dijabetesa u Evropskom regionu u 2015. godini, Bosna i Hercegovina se nalazi na četvrtom mjestu (9,9%), poslije Srbije koja zauzima treće mjesto (10,3%) [1,2,3]. Prema podacima Instituta za javno zdravstvo Republike Srpske, a na osnovu dostavljenih prijava od strane zdravstvenih ustanova, ukupan broj prijavljenih od DM oba tipa do 31.12.2022. godine je bio 71429. Analizom podataka o tipu DM, od ukupnog broja prijavljenih, 54436 (76%) čini dijabetes melitus tip 2 (DMT2) [4].

1.1.2. Patogenetski mehanizmi nastanka DMT2

Najčešći oblik dijabetesa (90-95%) je DMT2, ranije poznat kao „insulin nezavisni dijabetes“ [5] koji se prije liječio samo dijetom i tabletama. DMT2 je bolest koja dugo vremena može ostati nedijagnostikovana, jer se hiperglikemija razvija postepeno, često bez dovoljno ozbiljnih primjetnih simptoma za pacijenta. Danas je poznato da pored uticaja faktora spoljašnje sredine, veliki broj gena (preko 20 gena) ima potencijalnu ulogu u nastanku DMT2.

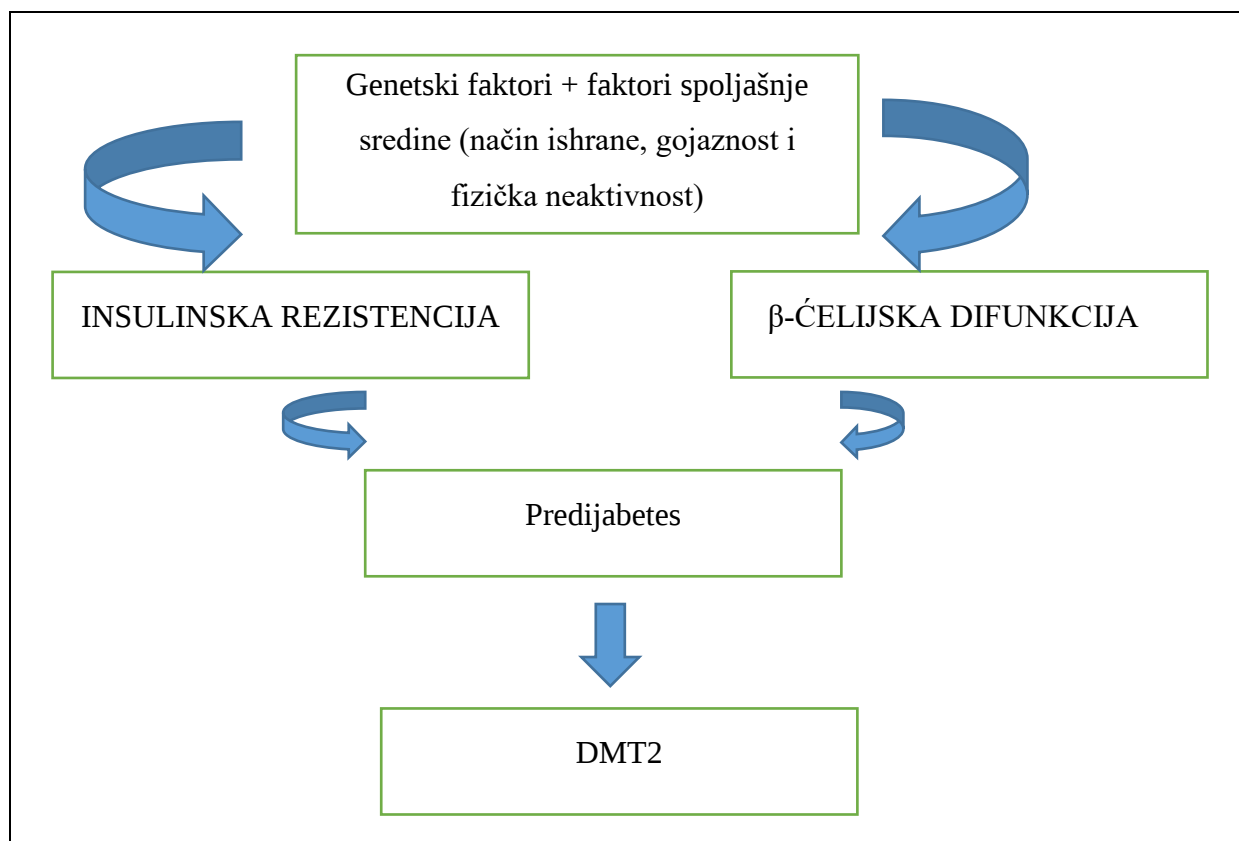
Veći broj utvrđenih gena je odgovoran za funkciju beta ćelija pankreasa, a njihova oslabljena sekretorna sposobnost predstavlja primarni predisponirajući faktor za nastanak DMT2. Kao posljedica svega javlja se smanjenje insulinske sekrecije i DMT2 (Slika 1a) [6]. Međutim, prema drugom modelu, u sadejstvu opet spoljnih faktora i genetske predispozicije, dolazi do prekomjerne stimulacije beta ćelija pankreasa i hiperinsulinemije, te danas često pominjanog termina insulinske rezistencije. Takođe poznato je da hiperinsulinemiju imamo i u gojaznosti koji opet zajedno dovode do insulinske rezistencije. Posljedica svega navedenog je iscrpljivanje beta ćelija pankreasa i nastanak DMT2 (Slika 1b) [6].



Slika 1. Modeli primarne disfunkcije beta ćelija (a) i primarne hipersekrecije insulina (b) u patogenezi DMT2

Preuzeto i prilagođeno iz: Esser N, Utzschneider KM, Kahn SE. Early beta cell dysfunction vs insulin hypersecretion as the primary event in the pathogenesis of dysglycaemia. Diabetologia. 2020;63(10):2007-2021.

DMT2 je, kao što je već poznato, povezan sa prekomjernim unosom hrane, gojaznošću i sedetarnim načinom života. Studije su pokazale da je rizik za nastanak DMT2 deset puta veći kod osoba sa indeksom tjelesne mase (ITM) većim od 30kg/m^2 . Iako su danas pacijenti sa DMT2 uglavnom sa prekomjernom tjelesnom masom ili gojazni, samo mali broj gojaznih osoba razvije dijabetes [7].



Slika 2. Stadiji u patogenezi DMT2

Naime, bolest je progresivna i razvija se u fazama (Slika 2). Prava istorija bolesti vjerovatno započinje 10 do 20 godina prije kliničkog početka, kao pretkliničko razdoblje s insulinskom rezistencijom, neosjetljivošću mišićnog, masnog i jetrenog tkiva na insulin [8,9]. Kako insulinska rezistencija nastaje zbog smanjene sposobnosti insulina da djeluje na periferna ciljna tkiva, dolazi do neadekvatnog iskorištavanja glukoze i to 30-60% manje nego kod zdravih.

Pored insulinske rezistencije, u etiopatogenezi DMT2 bitni su poremećaji u sekreciji insulina i neodgovarajuća sinteza glukoze u jetri. Međutim, danas se sve više koristi izraz “zlokobni” oktet koji čine: povećana produkcija glukoze u jetri, insulinska rezistencija na nivou jetre i perifernih tkiva, poremećena insulinska sekrecija, ubrzana lipoliza na nivou masnog tkiva, nedovoljna sekrecija inkretina ili izostanak inkretinskog efekta,

hiperglukagonemija, povećana reapsorpcija glukoze na nivou bubrega i poremećaj neurotransmitera na nivou centralnog nervnog sistema [6,10]. Stoga se može reći da DMT2, kao klinički entitet i jedna od četiri grupe hroničnih nezaraznih bolesti, ima multifaktorijalan patofiziološki mehanizam. Bolje razumijevanje patogenetskog mehanizma koji leži u osnovi disfunkcije beta ćelije i nastanka DMT2 bi trebalo da omogući bolje preventivne i terapijske intervencije za ovu bolest [6].

U trenutku postavljanja dijagnoze DMT2 kod oko 40% oboljelih se utvrđuju uznapredovala i klinički manifestna oštećenja arterijskih krvnih sudova. Ona nastaju usljed metaboličke abnormalnosti odnosno kompenzatorne hiperinsulinemije, koja ima snažan aterogeni potencijal, posebno u fazi maksimalne hipersekretorne aktivnosti, u periodu prije manifestno izmjenjene glukoregulacije. Hiperinsulinemija je u početku sposobna održavati normalne glikemije natašte i postprandijalno. Progresijom bolesti dolazi do opadanja insulinske sekrecije i manifestnog dijabetesa. Naime, može se reći da postoji dvojni defekt, oštećenje insulinske sekrecije i insulinska rezistencija. Kao posljedica navedenog javlja se hiperglikemija uz progresivan razvoj komplikacija, kroz proces ateroskleroze i mikroangiopatije [5,11]. Većina pacijenata sa DMT2 ima i prekomjernu tjelesnu masu i gojaznost, dislipidemiju i hipertenziju kao prateće faktore. S tim u vezi, uz DMT2 bitan je i pojam metaboličkog sindroma koga čine hiperglikemija, hipertenzija, dislipidemija i centralna gojaznost, sa promjenama definicije od prve definicije koju je dala Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) iz 1998.godine do danas kada imamo jasno definisane kriterijume za svaki parametar [12]. Metabolički sindrom je povezan sa DMT2 i kardiovaskularnim bolestima (KVB). Centralno mjesto u ovom sindromu zauzima insulinska rezistencija, a smatra se i da je gojaznost njen snažan pojačivač. Insulinska rezistencija se dovodi u vezu sa povećanjem kardiovaskularnog rizika i smrtnosti kod grupe bolesti ne samo dijabetesa nego i hipertenzije, gojaznosti, metaboličkog sindroma i srčane insuficijencije [13].

U dijabetesu postoje značajni lipidni poremećaji, kvalitativne promjene lipoproteina. Stoga se hiperlipoproteinemija i dislipoproteinemija kod oboljelih od dijabetesa nazivaju dijabetesna dislipidemija. Dijabetesna dislipidemija je predstavljena hipertrigliceridemijom i hiperholesterolemijom sa niskom koncentracijom frakcije lipoproteina velike gustine (*High-Density Lipoprotein*; HDL) [14,15]. Dislipidemija u DMT2 karakteriše se i promjenama u sastavu svih lipoproteina. Posebno značajne su partikule lipoproteina male gustine (*Low-Density Lipoprotein*; LDL) koje ga čine osjetljivim na oksidaciju i zauzimaju centralno mjesto za nastanak ateroma zida krvnog suda te je i rizik za pojavu ateroskleroze povišen [16]. Inače

od ranije je poznato da prisustvo dislipidemije dva puta povećava rizik za nastanak KVB u odnosu na osobe sa normalnim lipidnim statusom [17].

Imajući u vidu ova saznanja, DMT2 predstavlja ekvivalent koronarne bolesti zbog čega je i ciljna vrijednost LDL holesterola u ovih pacijenata izuzetno niska [18].

1.1.3. Glukoregulacija u DMT2

Od ranije je poznat značaj dobre metaboličke kontrole u DMT2 za redukciju dijabetesnih komplikacija [19-21]. Za praćenje glikemijske kontrole u kliničkoj praksi se obično koristi glikozilirani hemoglobin (HbA1c) koji mjeri vrijednost prosječne glukoze u plazmi tokom prethodnih 8 do 12 nedelja. Vrijednosti prosječne glikemije bliže normalnim znatno smanjuju rizik naročito od mikrovaskularnih komplikacija. Loša strana striktno glukoregulacije je potencijalno opasan neželjeni efekat liječenja odnosno hipoglikemija [22].

Smjernice Američkog udruženja za dijabetes (*American Diabetes Association*; ADA) iz 2023. godine ističu važnost laboratorijskih procjena u liječenju DMT2 sa posebnim naglaskom na HbA1c [23]. Ističe se precizna medicina, pozivajući se na kategorizaciju pacijenata u tačne specifične podgrupe dijabetesa za personalizovano liječenje ove bolesti [24]. Smjernice takođe naglašavaju složenost u razlikovanju tipova dijabetesa i pojave hibridnih oblika što zahtijeva prilagođeni pristup liječenju [23].

Ciljne vrijednosti u DMT2 za kontrolu glikemije su:

1. HbA1c < 7,0% (53 mmol/mol);
2. HbA1c < 8% (64 mmol/mol) kod osoba s čestim teškim hipoglikemijama, uznapređovalim komplikacijama ili kratkim očekivanim životnim vijekom;
3. glikemija natašte $\leq 7,2$ mmol/l i glikemija 2h nakon jela $\leq 10,0$ mmol/l.

Stoga, individualni glikemijski ciljevi se preporučuju kao najbolji način liječenja u DMT2 [22,25,26]. Danas se sve više, s obzirom na prisustvo hipoglikemije, preporučuje i kod DMT2 kontinuirano glukozno mjerenje [26]. Takođe, naglasak se stavlja i na kontrolu drugih udruženih bolesti kao što su KVB, hronična bubrežna bolest i kardiovaskularni renalni metabolički sindrom, zagovarajući sveobuhvatni model liječenja [23].

1.2. Oksidativni stres, infamacija i endotelna disfunkcija

1.2.1. Oksidativni stres i DMT2

DMT2 je metabolički poremećaj koji se manifestuje sa hiperglikemijom i insulinskom rezistencijom, za koji se smatra da je oksidativni stres primarni uzrok. Oksidativni stres je

široko prepoznat kao glavni akter u razvoju bolesti i pokretač dijabetesnih komplikacija (Slika 3). Dakle, oksidativni stres nije samo posljedica bolesti, već ima i ulogu u njenom nastanku [27]. S obzirom na oksidativni stres i ćelijski metabolizam, istraživanja su pokazala da su mitohondrije i endoplazmatski retikulum dvije ćelijske organele koje imaju ključnu ulogu u razvoju oksidativnog stresa. Mitohondriji su glavni izvor reaktivnih vrsta kiseonika, slobodnih radikala kiseonika (*Reactive Oxygen Species*; ROS) i učestvuju u ćelijskoj apoptozi i metabolizmu kalcijuma kao i produkciji adenozin trifosfata (ATP). ROS su međuproizvodi u metabolizmu kiseonika sa jednim ili više slobodnih elektrona, uključujući hidroksilni radikal (*OH), superoksidni anjonski radikal (O_2^-) i peroksinitrit ($ONOO^-$), kao i reaktivni neradikalni oblik ROS poput vodonik peroksida (H_2O_2) koji imaju ulogu u nastanku oksidativnog stresa. Kada dva slobodna radikala dijele svoje nesparene elektrone, nastaju neradikalni oblici. Oksidativni stres se definiše kao disbalans između stvaranja i uklanjanja ROS u korist njihovog povećanog stvaranja [28]. Sa biološkog aspekta su pored ROS značajne i reaktivne vrste azota (*Reactive Nitrogen Species*; RNS), od kojih je svakako najvažniji azot oksid ($NO\bullet$) [29]. U malim koncentracijama ROS ima značajnu ulogu u ćelijskoj homeostazi, u suprotnom višak ROS dovodi do ireverzibilnog oštećenja i smrti ćelije što se dovodi u vezu sa mnogim hroničnim bolestima.

Istraživanje Al-Gadi i saradnika je potvrdilo vezu mitohondrijalne disfunkcije i veće incidencije endokrinih bolesti uključujući i DMT2 [30]. Naime, produkcija ROS, mitohondrijalna disfunkcija, entitet označen kao “stres endoplazmatskog retikuluma” [31], ključni su za funkcionisanje β-ćelija pankreasa odnosno ključni su posrednici za apoptozu β-ćelija pankreasa [32,33]. Shodno tome pacijenti oboljeli od DMT2 su izloženi oksidativnom stresu i povećanom generisanju ROS i RNS. Upravo to povećanje nivoa slobodnih radikala kiseonika i azota je povezano sa lipidnom peroksidacijom, neenzimskom glikacijom proteina i oksidacijom glukoze što sve doprinosi samom dijabetesu kao i razvoju hroničnih dijabetesnih komplikacija [34].

Lipidna peroksidacija predstavlja koristan marker oksidativnog stresa jer je hidroksilni radikal najreaktivniji oblik ROS koji oksidira polinezasićene masne kiseline. Mjeri se u biološkim tečnostima (krv, plazma, serum i urin) putem koncentracije samih lipidnih peroksida ili krajnjih produkata lipidne peroksidacije, od kojih je najznačajniji malonildialdehid (MDA). Povećana lipidna peroksidacija je udružena sa povećanim rizikom od tromboze u DMT2 [35].

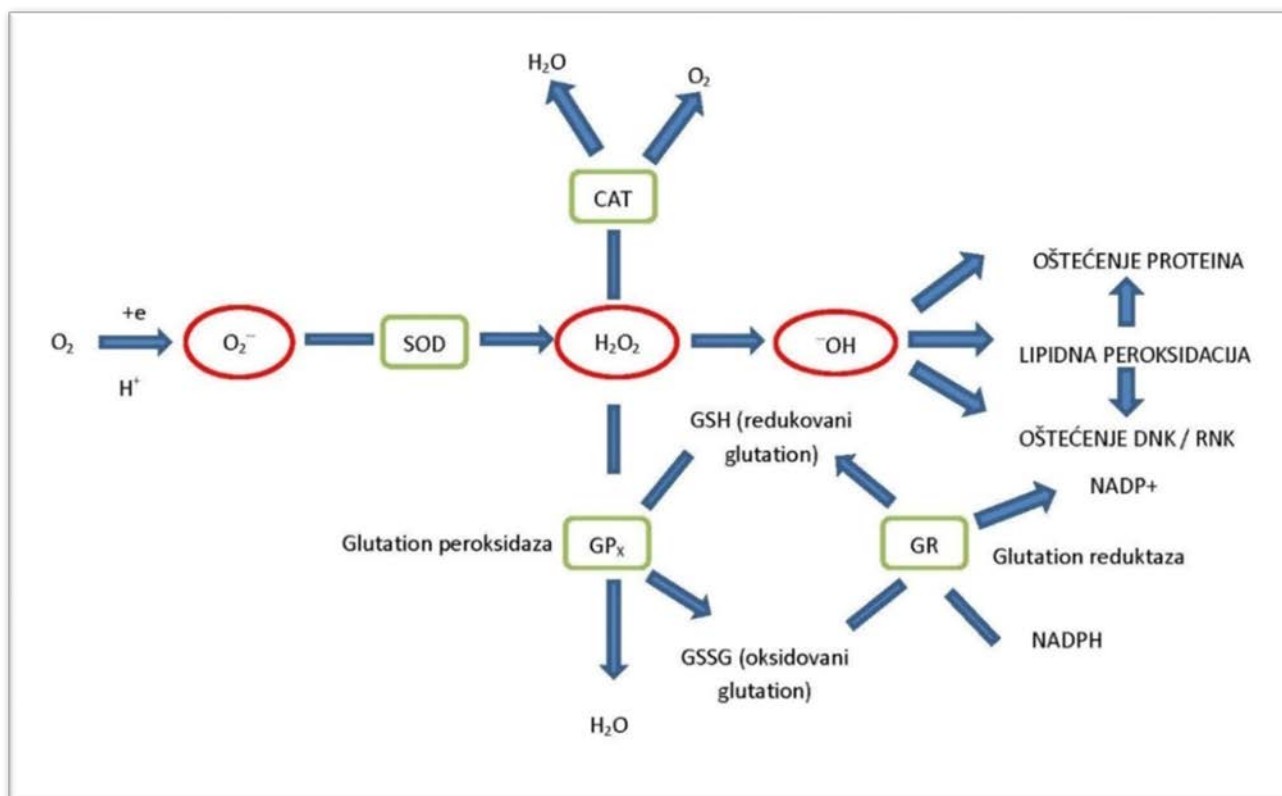
Iz tog razloga oksidativni stres se čini kao entitet koji zabrinjava kod metaboličkih poremećaja posebno kod DMT2. S ciljem sprečavanja oksidativnog stresa i prekomjernog

stvaranja ROS, ljudski organizam ima i mehanizme antioksidativne zaštite i to: enzimske, koji čine prvu liniju antioksidativne zaštite (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza) i neenzimske, koji predstavljaju sekundarnu liniju odbrane (glutathion /GSH/, vitamini E i C, polifenoli) [36,37].

Superoksid dismutaza (SOD) inače pripada porodici enzima koji katalizuje konverziju O_2^- do H_2O_2 i molekuskog kiseonika. Postoje tri oblika: SOD1, SOD2 i SOD3. Hiperglikemija uključena u mitohondrijsko stvaranje superoksidnog anjona doprinosi dijabetesnoj endotelnoj disfunkciji [38]. Zabilježeno je da metabolički poremećaji koje karakteriše prekomjerna proizvodnja ROS, kao što je dijabetes, mogu promijeniti aktivnost SOD2, izazivajući endotelnu disfunkciju. Kao što je već utvrđeno, prekomjerno stvaranje ROS događa se poliolnim putem, povećanom proizvodnjom naprednih krajnjih produkata glikacije (*Advanced Glycation End Products*; AGEs), heksozaminskim putem i aktivacijom protein kinaze C, što sve za posljedicu može imati nastanak dijabetesnih komplikacija [39-41]. Na kraju, kao što hiperglikemija doprinosi povećanom stvaranju ROS, tako i povećanje ROS može da vodi smanjenju SOD, CAT, GSH odnosno antioksidativne zaštite te zajedno pojačavaju oksidativni stres i dalje napredovanje bolesti.

Katalaza (CAT) je enzim koji je prisutan u peroksizomima i mitohondrijama većine tkiva sisara, sa posebno visokom aktivnošću u jetri i eritrocitima. CAT uklanja toksični vodonikov peroksid te ga redukuje do vode i molekuskog kiseonika.

Najznačajniji neenzimski mehanizam antioksidativne zaštite je peptid sa SH grupom ili GSH, koji se sintetise uglavnom u jetri. On takođe efikasno redukuje i neutrališe slobodne radikale [37].



Slika 3. Shematski prikaz reakcija u oksidativnom stresu i uloga enzima antioksidativnoj zaštiti

1.2.2. Inflamacija i DMT2

Upalni odgovor organizma je zajedno s oksidativnim stresom odlika ateroskleroze, insulinske rezistencije i DMT2, te se ateroskleroza može pojaviti godinama prije kliničke manifestacije dijabetesa [42]. Adipociti i makrofazi koji se nalaze u masnom tkivu luče proinflamatorne citokine, za koje se zna da nisu samo markeri inflamatornog procesa već njegovi aktivni učesnici i na različite načine doprinose patogenezi insulinske rezistencije, metaboličkog sindroma i DMT2 [42,43].

Dijabetes se smatra stanjem hronične inflamacije niskog stepena u kome medijatori zapaljenja kao što su faktor nekroze tumora - alfa (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), visoko senzitivni C-reaktivni protein (*high sensitive*; hsCRP) i fibrinogen učestvuju iznova u ponavljanju inflamacije [44-47]. TNF- α je plejotropni citokin kojeg proizvode makrofazi i monociti, a koji je uključen u sistemsku inflamaciju. IL-6 je proinflamatorni citokin kojeg proizvode leukociti, adipociti, endotelne i mezangijalne ćelije.

IL-6 i TNF- α stimulišu hepatičnu produkciju C - reaktivnog proteina (CRP), inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1), serumskog amiloida A i fibrinogena, a nalaze se u

pozitivnoj korelaciji sa povišenim nivoom glikemije, gojaznošću i insulinskom rezistencijom [44]. Skorašnje istraživanje u Brazilu je pokazalo da TNFR1, TNF- α , IL-4, adipokini i hemokini u serumu igraju važnu ulogu u zapaljenskom procesu kod DMT2 i doprinose smanjenju bubrežne funkcije [48].

Pretpostavlja se da su upala niskog stepena i pojačana regulacija inflamatornih medijatora vrlo bitni u patogenetskom mehanizmu nastanka DMT2, te još jednom potvrđujući pozitivnu korelaciju TNF- α i IL-6 sa T2DM i insulinskom osetljivošću [49]. Prema Schwartz i saradnicima [50] hiperglikemija i DMT2 mogu imati tri uzroka: sistemsku inflamaciju, patološke promjene crijevne mikroflore i poremećaj sinteze amilina.

1.2.3. Endotelna disfunkcija i DMT2

Endotel igra važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa putem uravnoteženog otpuštanja faktora relaksacije i kontrakcije koji se oslobađaju iz endotela. Ta ravnoteža je u DMT2 promijenjena [51]. Naime, hronična hiperglikemija dovodi do endotelne disfunkcije kroz različite mehanizme kao što su smanjenje vazodilatacije, povećanje vazokonstrikcije i oštećenje endotelne ćelijske funkcije [52].

Endotelnu disfunkciju karakteriše redukovana bioraspoloživost azot oksida (NO), a time se remeti endotel zavisna vazodilatatorna sposobnost krvnog suda. S obzirom na zaštitnu ulogu NO, endotelna disfunkcija podrazumjeva i određeni stepen aktivacije endotelnih ćelija mijenjajući inertni endotelni fenotip u proinflamatorni, proliferativni i prokoagulantni. Posljedica ovih aktivnosti je sinteza proinflamatornih citokina i adhezivnih molekula [53].

Endotelna disfunkcija može se otkriti mjerenjem povišenog nivoa ćelijskih adhezionih molekula (*Cellular Adhesion Molecules*; CAMs), kao što su E-selektin, molekul međućelijske adhezije 1 (*Intercellular adhesion molecule 1*; ICAM-1), te molekul vaskularne ćelijske adhezije 1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*; VCAM-1). TNF- α , koji je takođe mjerljiv proinflamatorni citokin, indukuje ekspresiju ICAM, VCAM od strane endotelnih ćelija. Prethodne studije su pokazale da su rastvorljivi oblici ovih adhezivnih molekula prisutni u serumu pacijenata sa DMT2, ukazujući da aktivacija endotela može imati ulogu u DMT2 [53-55].

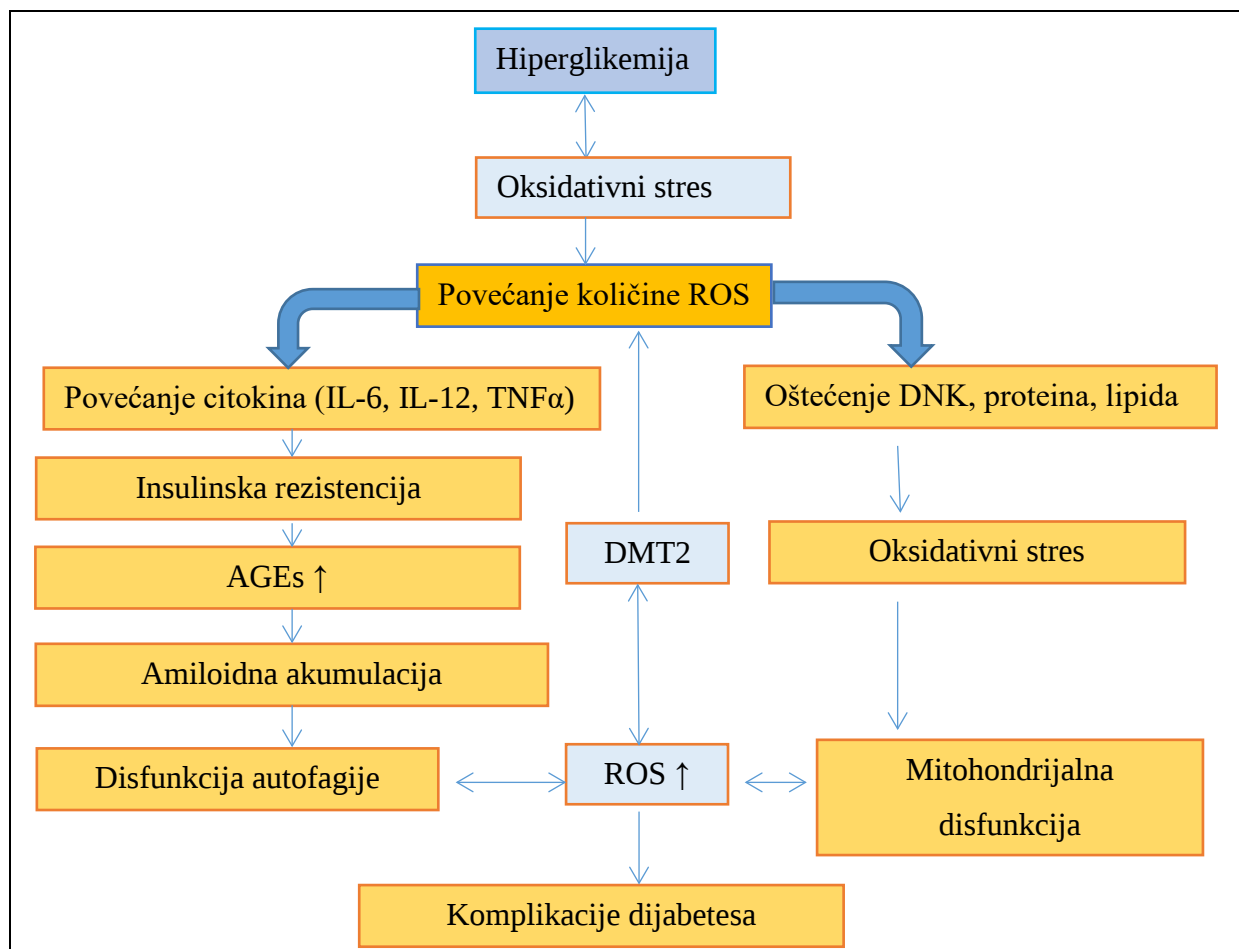
Takođe, rezultati desetogodišnje multicentrične CARDIA studije [54] kod mlađe populacije koja nije imala dijabetes su potvrdili pozitivnu vezu biomarkera inflamacije i endotelne disfunkcije sa pojavom DMT2. Meta-analiza koja je analizirala 15 studija

uključujući i prethodnu je utvrdila da povišeni CAMs u cirkulaciji, posebno ICAM-1 i E-selektin, dovode do povećanog rizika od DMT2 na način zavisao o koncentraciji, podržavajući pretpostavku da endotelna disfunkcija pridonosi razvoju DMT2 [56]. *Domingueti* i saradnici su ukazali da postoji veza oksidativnog stresa, inflamacije, hiperkoagulabilnosti sa mikro i makrovaskularnim komplikacijama u DMT2 kroz povišene parametre kao što su *Von Willebrand* faktor (vWF), IL-6, TNF- α , d-dimer i inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) [57].

vWF je veliki glikoprotein koji se stvara se u endotelnim ćelijama i megakariocitima, a prisutan je u subendotelijalnom matriksu, trombocitima i krvnoj plazmi. Ima ulogu posrednika u procesima koji su važni za hemostazu i trombozu, kao i u adheziji i agregaciji trombocita na mjestima vaskularnih povreda. Povećani nivoi vWF u plazmi koji odražavaju oštećenje endotelnih ćelija i stanje hiperkoagulabilnosti utvrđeni su kod ateroskleroze i dijabetesa [58]. Ovi prokoagulantni biomarkeri mogu biti povećani i kod pacijenata sa DMT2 koji su razvili mikrovaskularne i makrovaskularne komplikacije, uključujući dijabetesnu nefropatiju ili KVB [58].

Ovi procesi ne samo da utiču na vaskularni endotel, već doprinose i razvoju komplikacija kod pacijenata sa DMT2. Naime, kod pacijenata sa DMT2, vaskularne endotelne ćelije su obično oštećene oksidativnim stresom koji uništava endotelne spojeve, povećava intravaskularnu permeabilnost i na kraju doprinosi razvoju mikro i makrovaskularnih komplikacija bolesti [59-61].

Većina istraživanja su uglavnom pratila vezu parametara oksidativnog stresa, inflamatornog odgovora i endotelne disfunkcije sa incidencijom DMT2, potvrdivši njihove uloge prediktora za nastanak DMT2, a time i njihov značaj za praćenje u prevenciji DMT2. Međutim, praćenje parametara oksidativnog stresa, inflamatornog odgovora i endotelne disfunkcije u DMT2 je bitno i tokom liječenja pacijenata sa DMT2, s obzirom na sprečavanje i odgađanje svih komplikacija bolesti kao i eventualne primjene nekih efikasnijih terapijskih procedura u skoroj budućnosti (Slika 4)



Slika 4. Hiperglikemijom indukovani oksidativni stres i inflamacija u DMT2 i dijabetesnim komplikacijama.

Preuzeto i prilagođeno iz: DeFronzo RA, Reeves WB, Awad AS. Pathophysiology of diabetic kidney disease: Impact of SGLT2 inhibitors. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(5):319-334.

1.3. Terapijski pristup DMT2

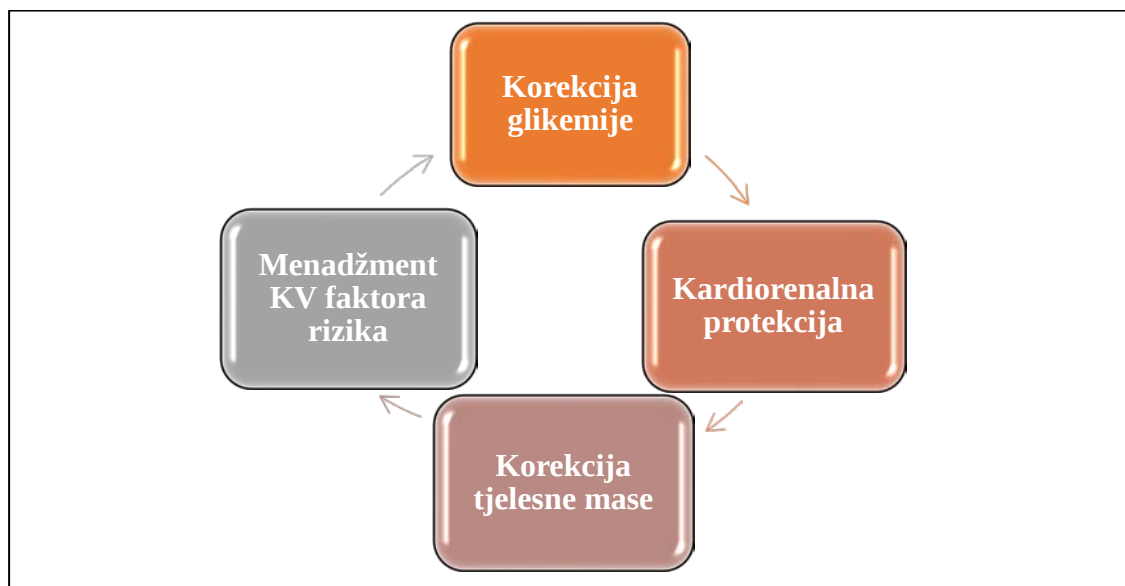
Primarni cilj liječenja oboljelih od DMT2 je sprečavanje komplikacija kroz efikasno i savremeno liječenje. U terapiji DMT2 se danas primjenjuje nefarmakološka i farmakološka terapija. Naime, savremena terapija podrazumijeva korekciju glikemije, nivoa lipoproteina, prekomjerne tjelesne mase i gojaznosti, kao i arterijskog pritiska, te je usmjerena prema sveobuhvatnom sniženju kardiovaskularnog rizika (Slika 5) [62].

Medicinska nutritivna terapija (MNT), uz adekvatnu fizičku aktivnost, je osnovna mjera nefarmakološkog liječenja DMT2. U farmakološkom tretmanu, prema svim aktuelnim smjernicama, lijek prvog izbora je metformin, a koji može da se kombinuje i sa ostalom terapijom DMT2.

Metformin kao pripadnik grupe bigvanida predstavlja zlatni standard u liječenju DMT2. To je lijek koji ima dobar sigurnosni profil, minimalan rizik od hipoglikemije u

monoterapiji i jeftin je (zadovoljavajući odnos rizik - korist i trošak - korist) [63]. Njegova efikasnost se ogleda u sniženju HbA1c (1%) poboljšanjem insulinske senzitivnosti i inhibicijom glukoneogeneze, kao i u mogućem uticaju na skromni gubitak u tjelesnoj masi. Osim toga ima dobre kardiovaskularne osobine i to: umjereno sniženje nivoa LDL holesterola, značajno sniženje triglicerida, smanjenje oksidativnog stresa i smanjenje markera inflamacije, posebno hsCRP [64].

Metformin je kontraindikovano jedino kod teškog otećenja bubrega ili kada je stopa glomerulske filtracije niža od 30ml/min/1,73m². Ukoliko se tokom progresije bolesti ne mogu postići glikemijski ciljevi, a zavisno i od specifične kliničke slike individualno za svakog pacijenta, potrebno je dodatno uključivanje lijekova na terapiju metforminom.



Slika 5. Menadžment DMT2 s osvrtnom na prevenciju komplikacija

Preuzeto i prilagođeno iz: Davies MJ, Aroda VR, Collins BS, Gabbay RA, Green J, Maruthur NM, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Care 2022;45(11):2753-2786.

1.4. Homocistein i folati – veza sa dijabetesom i povišenim KV rizikom

Kako se u liječenju DMT2 koristi individualni pristup sa pacijentom u centru, te je potrebno uvijek uzeti u obzir sniženje KV rizika, jedan od nezavisnih parametara koji može da posluži je određivanje nivoa homocisteina. Studije su pokazale da homocistein dovodi do mitohondrijalne disfunkcije te povećane produkcije ROS i oksidativnog stresa. Naime, povišene vrijenosti homocisteina koreliraju sa hiperinsulinizmom i insulinskom rezistencijom, što dovodi do povećanja oksidativnog stresa, endotelne disfunkcije i ateroskleroze [65,66].

Homocistein je aminokiselina, koja nastaje iz esencijalne aminokiseline metionina. Posebnim hemijskim procesima, uz prisustvo dovoljnih koncentracija vitamina B12 (kobalamin), vitamina B9 (folna kiselina) i vitamina B6 (piridoksin), homocistein se ponovo metaboliše u metionin i cistein.

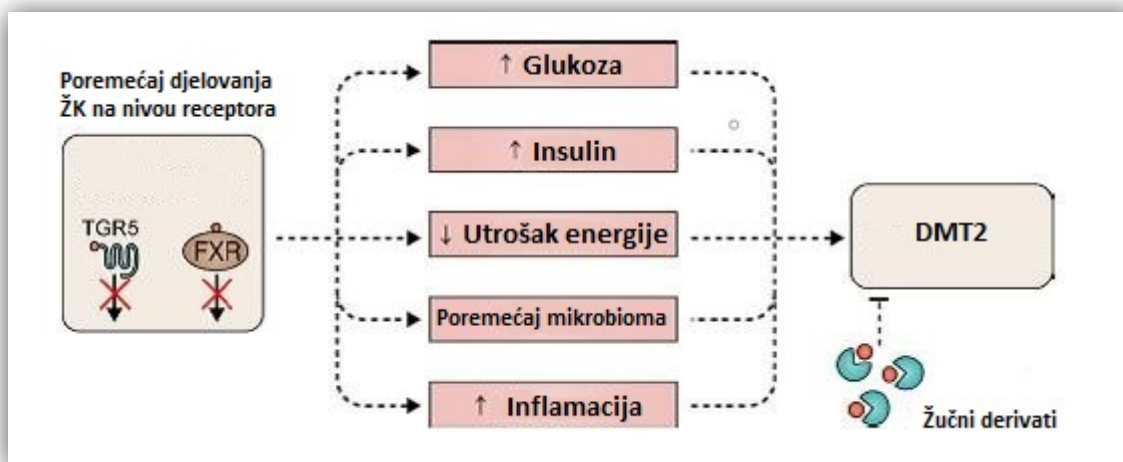
Vitamini B grupe su takođe bitni i u DMT2. Ukoliko su snižene koncentracije jednog i/ili više vitamina dolazi do povećane produkcije i akumulacije homocisteina [67]. Naime folati, vitamini B, imaju istu strukturu i funkciju kao i folna kiselina koja se sintetski dobija i služi kao suplement i za obogaćivanje hrane. Istraživanja pokazuju da folna kiselina može biti neophodna za normalnu funkciju vaskularnog endotela [68]. Metabolizam folata je usko povezan sa metabolizmom homocisteina i nalaze se u inverznom odnosu. Stoga se može reći da visoki folati dovode do sniženja homocisteina u plazmi što ima pozitivan uticaj na KV bolesti koje su neizbježan pratilac DMT2[68].

1.5. Uloga žučnih kiselina u metabolizmu glukoze

Krajem XX vijeka žučne kiseline su postale predmet interesovanja naučnika zbog spoznaje da, osim efekta u solubilizaciji holesterola u žuči, mogu da imaju ulogu u ćelijskoj homeostazi, metaboličkim procesima, ćelijskoj smrti kao i sposobnosti aktivacije različitih receptora [69,70]. Nakon otkrića nuklearnih i membranskih receptora kao što je farnezoid X receptor (FXR) 1995.godine, te drugih membranskih receptora, žučne kiseline su prepoznate kao parakrini i endokrini signalni molekuli koji aktiviraju ove receptore i tako učestvuju u regulaciji ekspresije gena uključenih u integrativni metabolizam [71-73]. Aktivacijom navedenih receptora žučnih kiselina regulišu metabolizam glukoze, lipoproteina, ćelijske proliferacije i apoptoze, inflamacije i karcinogeneze [74].

Žučne kiseline djeluju kao crijevni hormoni u ileumu. Naime, aktiviranjem G-protein vezanog receptora žučnih kiselina ili još znanog kao Takeda G-protein vezanog receptora 5 (*GPBAR1*, *TGR5*) u enteroendokrinim L ćelijama, žučne kiseline poboljšavaju glukozom-indukovanu sekreciju insulina i postprandijalnu glikemiju posredstvom glukagonu-sličnog peptida-1 (*Glucagon like peptid*; *GLP-1*). Ovim svojim mehanizmom se prepoznaju kao metabolički regulatori, koji aktivacijom određenih signalnih puteva mogu da imaju ulogu i u samoj patogenezi DMT2 [75,76]. U skladu s tim, promjene metabolizma žučnih kiselina i signalnih puteva u kojima učestvuju su udružene sa metaboličkim poremećajima, DMT2 i gojaznošću. Suprotno tome, tretman DMT2 sa derivatima žučnih kiselina ili barijatrijskom hirurgijom kod gojaznih rezultuje boljom glukoregulacijom. Stoga se može reći da žučne

kiseline s obzirom na metabolizam glukoze, imaju svoju ulogu i u zdravlju i u bolesti (Slika 6) [77].



Slika 6. Uloga žučnih kiselina u metabolizmu glukoze, nastanku i liječenju DMT2
Preuzeto i prilagođeno iz: Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D, Elinav EJ. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J Exp Med.*2018;215(2):383-396. TGR5- Takeda G receptor 5; FXR- Farnezoid X receptor; DMT2- Dijabetes melitus tip 2

TGR5 su prvi transmembranski receptori na koje reaguju žučne kiseline. Oni su široko rasprostranjeni u gastrontestinalnom traktu, pankreasu, jetri, žučnom mjehuru i masnom tkivu. Ove naučne činjenice mogu imati značaj u liječenju DMT2 preko receptorskog mehanizma djelovanja i upotrebe TGR5 agonista (još uvijek nisu dosegli kliničku primjenu) kako bi se redukovao HbA1c i dugoročne komplikacije ove bolesti [75]. Takođe, aktivacija TGR5 pokazuje antiinflamatorno dejstvo i pomaže u prevenciji hroničnih upala [78].

S obzirom da i vitamin D receptor učestvuje u procesima ćelijske diferencijacije i proliferacije, imunomodulacije, utvrđena je njegova uloga i u metabolizmu žučnih kiselina. Niski nivoi vitamina D nalaze se i u β -ćelijama pankreasa, adipocitima i vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, a kod ljudi i u hepatocitima [79]. Klinički, utvrđeno je da vitamin D može biti povezan sa metabolizmom glukoze i insulinskom homeostazom te rizikom za pojavu različitih oboljenja, prvenstveno DMT2 i kardiovaskularnih oboljenja [80]. Nedostatnost i deficit vitamina D se dovodi u vezu sa povišenim proinflamatornim markerima kod pacijenata sa novootkrivenim DMT2 i predijabetesom [81].

1.5.1. Klasifikacija žučnih kiselina

Žučne kiseline se mogu klasifikovati na više načina. Prema porijeklu se se dijele na: primarne, sekundarne i tercijarne žučne kiseline. Prema strukturi se mogu podijeliti na slobodne i konjugovane, dok se prema molekularnim grupama mogu klasifikovati kao hidrofilne i hidrofobne žučne kiseline.

1.5.2. Biosinteza žučnih kiselina i enterohepatička cirkulacija

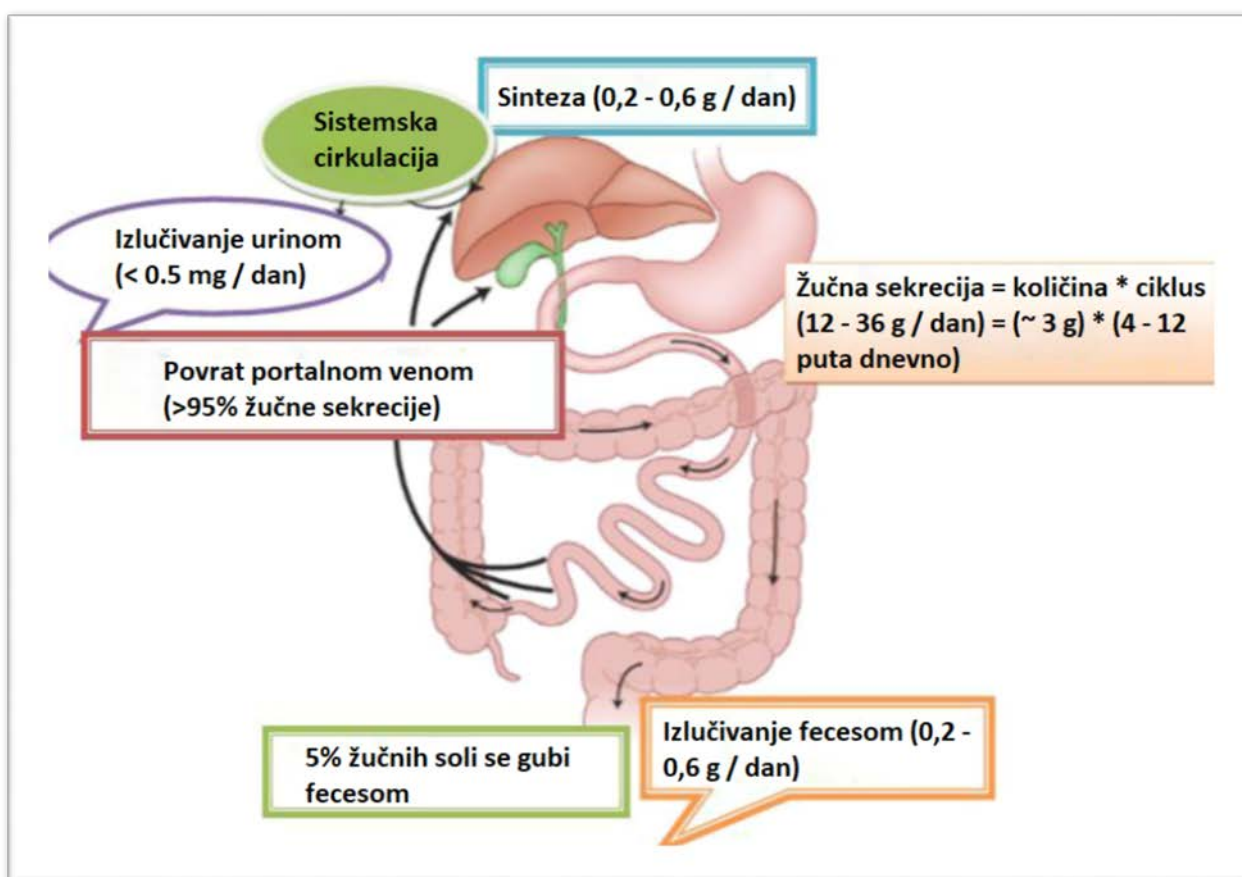
Žučne kiseline su amfifilne molekule sa 24 atoma ugljenika koje se s obzirom na svoju polarnost sastoje iz hidrofobnog i rigidnog steroidnog jezgra na koje su vezane hidrofilne hidroksilne grupe kao i fleksibilni kiseli alifatični bočni lanac. Sinteza se odvija u hepatocitima iz holesterola u nekoliko faza [82-84]. Žučne kiseline su grupa derivata holesterola koje nastaju tokom njegovog katabolizma kada se holesterol (~500mg/dan) pretvara preko 7 α -hidroksilaze, mikrozomalnog citohrom P450 enzima (CYP7A1), te u manjoj mjeri 27 α -hidroksilaze (CYP27A1) i 24-hidroksilaza (CYP46A1), prvo do primarnih žučnih kiselina. Naime, žučne kiseline se sintetišu uglavnom kroz dva puta i to: klasični (neutralni) i alternativni (kiseli) put. Klasičnim putem se odvija sinteza primarnih žučnih kiselina (90%), a alternativni put može da se promijeni pod uticajem crijevne flore koju kontroliše ranije pomenuti enzim CYP27A1, pretvarajući oksisterole u sekundarne žučne kiseline [82].

Prvobitno nastale žučne kiseline se nazivaju primarnim kiselinama i to su holna (*Cholic acid; CA*) i henodeoksiholna kiselina (*Chenodeoxycholic acid; CDCA*) koje se konjuguju sa aminokiselinama, glicinom (75%) i taurinom (25%) [85-87]. Proizvodi koji nastaju u klasičnom putu biosinteze su glicin/taurin konjugati CA i CDCA. Nastali konjugati (lakše se rastvaraju u vodi, a žučne kiseline postaju manje toksične) se često nazivaju i žučnim solima, koje se deponuju u žuči odnosno žučnoj kesi, a nakon unosa hrane dospijevaju u crijeva. Zapravo, uzimanje hrane je glavni okidač za žučnu sekreciju u intestinalni trakt. Ovaj proces je posredovan crijevnim hormonom, holecistokininom koji promovise hepatičku sekreciju žučnih kiselina i kontrakciju žučnog mjehura. Kada dospiju u dvanaestopalačno crijevo, amfifilne žučne kiseline djeluju kao deterdženti koji tvore micle sa lipidima unesenim hranom i liposolubilnim vitaminima. Na taj način se omogućava i olakšava lipidna apsorpcija u crijevima [88].

Primarne konjugovane žučne kiseline dalje u crijevima podliježu procesima dekonjugacije, dihidroksilacije, dehidrogenacije i epimerizacije do sekundarnih žučnih

kiselina. U crijevima, uz pomoć bakterija i bakterijskih enzima (hidroksilaza), dolazi do dehidroksilacije te tako iz CA nastaje deoksiholna (*Deoxycholic acid; DCA*), a iz CDCA nastaje litholna kiselina (*Lithocholic acid; LCA*) [88]. Većina žučnih kiselina (95%) se resorbuje u terminalnom ileumu pomoću apikalnog natrijum-zavisnog transportera (*Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter; ASBT*), a mali dio ide u kolon i izbacuje putem fecesa. Kod ljudi, cirkulišući bazen žučnih kiselina je visoko hidrofoban i uglavnom se sastoji od CA, CDCA i DCA koje su zastupljene u odnosu 40:40:20 [89,90].

Inače, smjesa primarnih i sekundarnih žučnih kiselina i soli se apsorbira u ileumu, zatim vraća u jetru gdje se opet konjuguju, pa putem žuči izlučuju u žučnu kesu u kontinualnom putu (4-12 puta u toku dana) koji se zove enterohepatički ciklus (Slika 7). Količina žučnih kiselina u žučnom bazenu kod ljudi u prosjeku iznosi oko 3 grama. Dok se oko 0,6 grama na dan žučnih kiselina gubi isto toliko se *de novo* sintezom ponovo nadoknadi u jetri [87,88,91,92].



Slika 7. Metabolizam žučnih kiselina i enterohepatička cirkulacija

Preuzeto i prilagođeno iz: Šarenac TM, Mikov M. Bile Acid Synthesis: From Nature to the Chemical Modification and Synthesis and Their Applications as Drugs and Nutrients. Front Pharmacol. 2018;9:939-961.

1.5.3. Ursodeoksiholna kiselina

Kao što je već rečeno, sa svakim enterohepatičkim ciklusom mali dio pula žučnih kiselina ulazi u debelo crijevo gdje nailazi na mikrobiotu, koja brzo metabolizuje žučne kiseline, procesima dekonjugacije, dehidroksilacije i epimerizacije. Stoga druge promjene u strukturi žučnih kiselina obuhvataju oksidaciju hidroksilnih grupa i nastanak epimera, ursodeoksiholne kiseline (*Ursodeoxycholic acid*; UDCA) (Slika 8). Ovo se dešava uz pomoć bakterijskih sojeva klostridija (*Clostridium baratii* i druge) koji omogućavaju epimerizaciju 7 α -hidroksilne grupe CDCA u 7 β epimer, UDCA (3 α ,7 β -dihidroksi-5 β -holan-24-oičnu kiselinu). Na taj način primarna konjugovana CDCA sa taurinom (TCDCA) je pretvorena u UDCA, koja može zatim dalje da se metabolizuje u LCA.

UDCA ima svojstva povoljna kako za organizam domaćina tako i za intestinalne bakterije [93,94]. Ranije studije su pokazale potencijalne mehanizme koji objašnjavaju kako poremećaji u crijevnom mikrobiomu utiču na veličinu i sastav bazena žučnih kiselina. Naime, žučne kiseline se pojavljuju kao regulatori crijevnog mikrobioma na najvišim taksonomskim nivoima [94,95]. Takođe, utvrđeno je da su koncentracija i kompozicija žučnih kiselina promijenjene i kod pacijenata sa DMT2 i na animalnim modelima. Naime, CA, CDCA, DCA i UDCA su više u plazmi kod pacijenata sa DMT2 nego kod onih bez DMT2 [96]. Postoje jaki dokazi koji podržavaju uticaj crijevne mikrobiote na ljudski metabolizam. Promijenjena homeostaza glukoze povezana je sa promijenjenom crijevnom mikrobiotom, što sve predstavlja jasnu vezu sa razvojem DMT2 i dijabetesnih komplikacija [97].

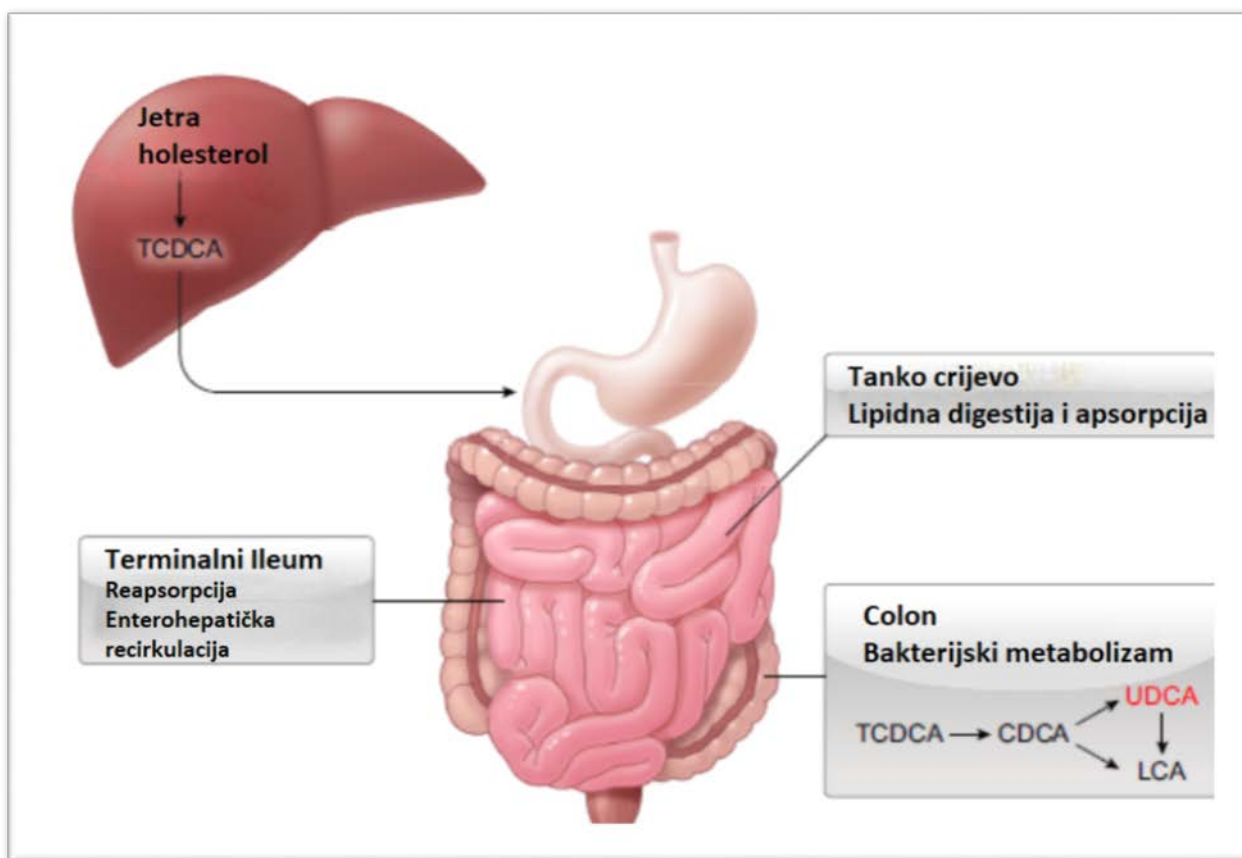
UDCA je žučna kiselina sa najvećom hidrofilnošću i najnižom toksičnošću koja se metaboliše u crijevima pomoću crijevne mikrobiote. Prvi put je otkrivena u žuči medvjeda, a hiljadama godina se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za liječenje raznih upalnih stanja [98]. Kod ljudi se nalazi kao sekundarna ili čak tercijarna žučna kiselina, čineći 1 do 3% ukupne proizvedene žuči u ljudskom organizmu. UDCA je prvi lijek odobren od strane Agencije za hranu i lijekove američke vlade (*Food and Drug Administration*; FDA) u liječenju holecistitisa i primarne bilijarne ciroze i u upotrebi je već duži niz godina [99,100].

Smatra se da su korisni efekti UDCA posljedica njenog dobro utvrđenog citoprotektivnog i antiinflamatornog dejstva. Osim svoje utvrđene uloge u liječenju bolesti jetre, UDCA se sada ispituje za brojna stanja povezana sa upalom i apoptozom, uključujući neurološke, očne, metaboličke i kardiovaskularne bolesti [94].

Jedna od osnovnih fizioloških funkcija žučnih kiselina je eliminacija holesterola iz organizma. Decenijama su samo smatrane isključivo biološkim surfaktantima, koji vrše

solubilizaciju masti iz hrane i na taj način omogućavaju njihovu dalju razgradnju i apsorpciju. Danas je poznato da su žučne kiseline, kao signalni molekuli, uključeni u regulaciju metabolizma glukoze i lipida, termogeneze, inflamatornih i imunomodulatornih procesa, antibakterijske zaštite intestinalnog trakta i u druge fiziološke funkcije [101].

Istraživanja pokazuju da UDCA poboljšava metabolizam glukoze [102-104], mijenja sastav žučnih kiselina [105], ublažava oksidativni stres ili imuni odgovor i pokazuje antiinflamatorna svojstva koja su posebno važna kod metaboličkih bolesti povezanih sa gojaznošću [106-109].



Slika 8. Biosinteza UDCA

Preuzeto i prilagođeno iz: Keely SJ, Steer CJ, Lajczak-McGinley NK. Ursodeoxycholic acid: a promising therapeutic target for inflammatory bowel diseases? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2019;317(6): G872–G881. TCDCA, taurohenodeoksiholna kiselina; CDCA, chenodeoksiholna kiselina; UDCA, ursodeoksiholna kiselina; LCA, litholna kiselina

U svijetu se danas rade randomizovana klinička istraživanja koja ispituju terapijske efekte žučnih kiselina i njihovih derivata, posebno njihovo modulatorno dejstvo na nivou FXR, kod raznih bolesti, pa tako i kod DMT2. Ranije istraživanje koje su proveli Mikov i saradnici je pokazalo da nosintetisane žučne kiseline nakon nazalne, supkutane i intravenske primjene kod pacova snižavaju glukozu u krvi [91]. Poznato je da derivati žučnih

kiselina mogu da poboljšaju glikemiju kod oboljelih od DMT2, ali sam mehanizam njihovog djelovanja je podložan daljim raspravama. Skorašnje studije su pokazale da međuodnos crijevne mikrobiote i žučnih kiselina igra ključnu ulogu u insulinskoj rezistenciji u DMT2 [110,111]. Takođe s obzirom na sinergistički efekat žučnih kiselina, probiotika i aktuelne antidijabetesne terapije, Mikov i saradnici [112] su ukazali na potencijalnu primjenu ove kombinacije kod metaboličkih poremećaja sa posebnim akcentom na dijabetes melitus.

Kineski naučnici u Šangaju su postavili hipotezu da se inhibicijom stresa endoplazmatskog retikuluma (ER), može ublažiti dijabetesna nefropatija kroz antioksidativne efekte. Svoje istraživanje su proveli *in vivo* i *in vitro* na dijabetesnim miševima i potvrdili da UDCA ublažava ER stresom indukovanu apoptozu ćelija bubrežnih tubula (podocita), kao i oksidativni stres, produkciju ROS, te da ima renoprotektivni efekat [113]. Naime, UDCA za razliku od drugih hidrofobnih žučnih kiselina koje su toksične i dovode do apoptoze ćelija, djeluje kao plejotropni agens i sprečava apoptozu različitih tipova ćelija.

Prema Osorio i saradnicima, hiperglikemija u DMT2 indukcijom oksidativnog stresa je odgovorna za oštećenje bubrega, a primjena UDCA je smanjila hiperglikemiju i ekspresiju transportera glukoze na membrani tubularnih ćelija bubrega. Tokom njihovog istraživanja upotreba UDCA je uspjela normalizovati vrijednosti katalaze i glutacion peroksidaze, te tako poboljšati mehanizam antioksidativne zaštite [114].

Studije rađene na modelu aloksanskog dijabetesa su pokazale da je UDCA korigovala morfologiju endokrinog pankreasa, povećala nivo insulina, normalizovala vrijednosti glikemije i sadržaj produkata lipidne peroksidacije te redukovala oštećenje mitohondrija što sugerise snažno antioksidativno dejstvo [115,116].

Ranija eksperimentalna studija iz 2020.godine na miševima sa dijabetesom je ispitivala biološke efekte upotrebe kombinacije antilipemika probukola i UDCA (mikrokapsule) dovodeći do hipoglikemijskog i antiinflamatornog efekta na ovim životinjama [117].

Primjena UDCA na ovakav način je potpomogla povoljno terapijsko dejstvo osnovnog lijeka i njegovu bioraspoloživost. Druge studije su takođe koristile pristup putem nano i mikro čestica za bolju peroralnu isporuku lijeka u kombinaciji sa žučnim kiselinama [118-121]. Poznato je da tauro-UDCA (konjugat sa taurinom), koja se vijekovima koristila u kineskoj medicini, redukuje stres endoplazmatskog retikuluma što je praćeno poboljšanjem regulacije glikemije i insulinske senzitivnosti, te gojaznosti i hipertenzije [122]. Xie i saradnici [82] ističu da pošto postoje temeljni mehanizmi, sada su opravdane studije koje se provode da bi se utvrdilo da li postoje uzročne veze između profila žučnih kiselina i metaboličkih ishoda.

Naime, prema njima bilo bi od interesa istražiti da li žučne kiseline imaju aditivne ili sinergističke efekte sa drugim (nefarmakološkim ili farmakološkim) intervencijama za smanjenje tjelesne mase i kontrole glikemije.

Vječiti izazov su istraživanja koja nastoje da ispituju koja su to stanja kod ljudi koja mogu imati uticaj na koncentraciju i sastav žučnih kiselina. Pacijenti sa DMT2 imaju povećane koncentracije tauro konjugata žučnih kiselina. Dodatno, neke studije su utvrdile da pacijenti sa DMT2 imaju povećanu sintezu žučnih kiselina, posebno CA [123,124]. Nema sumnje da su one izuzetno značajne u metabolizmu glukoze. Naime, za pacijente sa DMT2 ukupni nivoi žučnih kiselina su bili u pozitivnoj korelaciji i sa trigliceridima, indeksom insulinske rezistencije, krvnim pritiskom te indeksom tjelesne mase. Shodno tome, današnja istraživanja ističu značaj žučnih kiselina kao ključnih regulatora i novih terapijskih ciljeva u liječenju DMT2 [125].

Ono što je bitno naglasiti postoji jedna povratna sprega. Naime, da insulinska rezistencija, gojaznost ili dijabetes mogu uticati na promjenu koncentracije i sastava žučnih kiselina, a s druge strane, koncentracija i sastav žučnih kiselina, mogu uticati na energetske metabolizam.

Isto tako je već poznato da mnogi pacijenti koji imaju DMT2 imaju i masnu bolest jetre. Ranije se koristio termin nealkoholna masna bolest jetre (*Non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) dok je danas sve više u upotrebi metabolička disfunkcija udružena sa masnom bolesti jetre (*Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*, MASLD) koja se može liječiti terapijom za dijabetes i dislipidemiju. S obzirom da je MASLD čitav spektar stanja, određeni procenat ovih pacijenata sa DMT2 može da razvije metaboličku disfunkciju udruženu sa steatohepatitisom (*Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*, MASH), cirozu jetre pa čak i hepatocelularni karcinom [126]. To je još jedan razlog zbog čega se danas razmatraju dodatne terapijske opcije, koje uzimaju u obzir istovremeno liječenje i ovih drugih bolesti u sklopu liječenja DMT2.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Prateći ranija saznanja i relevantne stavove iz literature u domenu istraživanja, definisan je osnovni cilj istraživanja da se ispita uticaj UDCA na parametre oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne disfunkcije kod pacijenata sa DMT2 koji su liječeni samo jednim oralnim antidijabetikom (metforminom). U sklopu ovoga predloženi su i specifični ciljevi istraživanja.

1. Ispitati ulogu UDCA u oksidativnom stresu kroz određivanje vrijednosti prooksidativnih parametara i parametara antioksidativnog kapaciteta kod pacijenata sa DMT2.
2. Ispitati ulogu UDCA u inflamatornom odgovoru kroz praćenje parametara inflamacije kao što su: IL-6, TNF- α , CRP, te homocisteina, folne kiseline i vitamina D.
3. Ispitati ulogu UDCA u endotelnoj disfunkciji kroz praćenje relevantnih parametara kao što su: *Von Willebrand* faktor (vWF), ICAM-1, VCAM-1, fibrinogen.
4. Ispitati ulogu UDCA u glukoregulaciji i stepenu insulinske rezistencije kroz praćenje parametara kao što su: glikemija i insulin natašte, HbA1c, homeostatski model procjene insulinske rezistencije (HOMA-IR).
5. Ispitati uticaj UDCA na lipidni status (ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL), kao i na indeks tjelesne mase (ITM) i obim struka, te krvni pritisak.

2.2. Hipoteze istraživanja

S obzirom na prethodno formirane ciljeve istraživanja, postavljene su hipoteze istraživanja:

- Primjena UDCA kod pacijenata sa DMT2 u dozi od 1,500 mg/dan tokom osam nedelja značajno popravlja parametre oksidativnog stresa, inflamatornog odgovora i endotelne disfunkcije.
- UDCA u dozi od 1,500 mg/dan, povoljno djeluje na i parametre glukoregulacije i lipidnog statusa, te dovodi do sniženja osnovnih antropometrijskih parametara za procjenu stanja uhranjenosti i krvnog pritiska kod pacijenata sa DMT2.

3. MATERIJAL I METOD RADA

3.1. Dizajn istraživanja

Istraživanje je randomizovana, dvostruko slijepa, placebo kontrolisana klinička studija kojom su obuhvaćeni pacijenti oboljeli od dijabetesa tipa 2, registrovani u ambulantama porodične medicine (APM) u Javno zdravstvenoj ustanovi Dom zdravlja Banja Luka (JZU DZ BL).

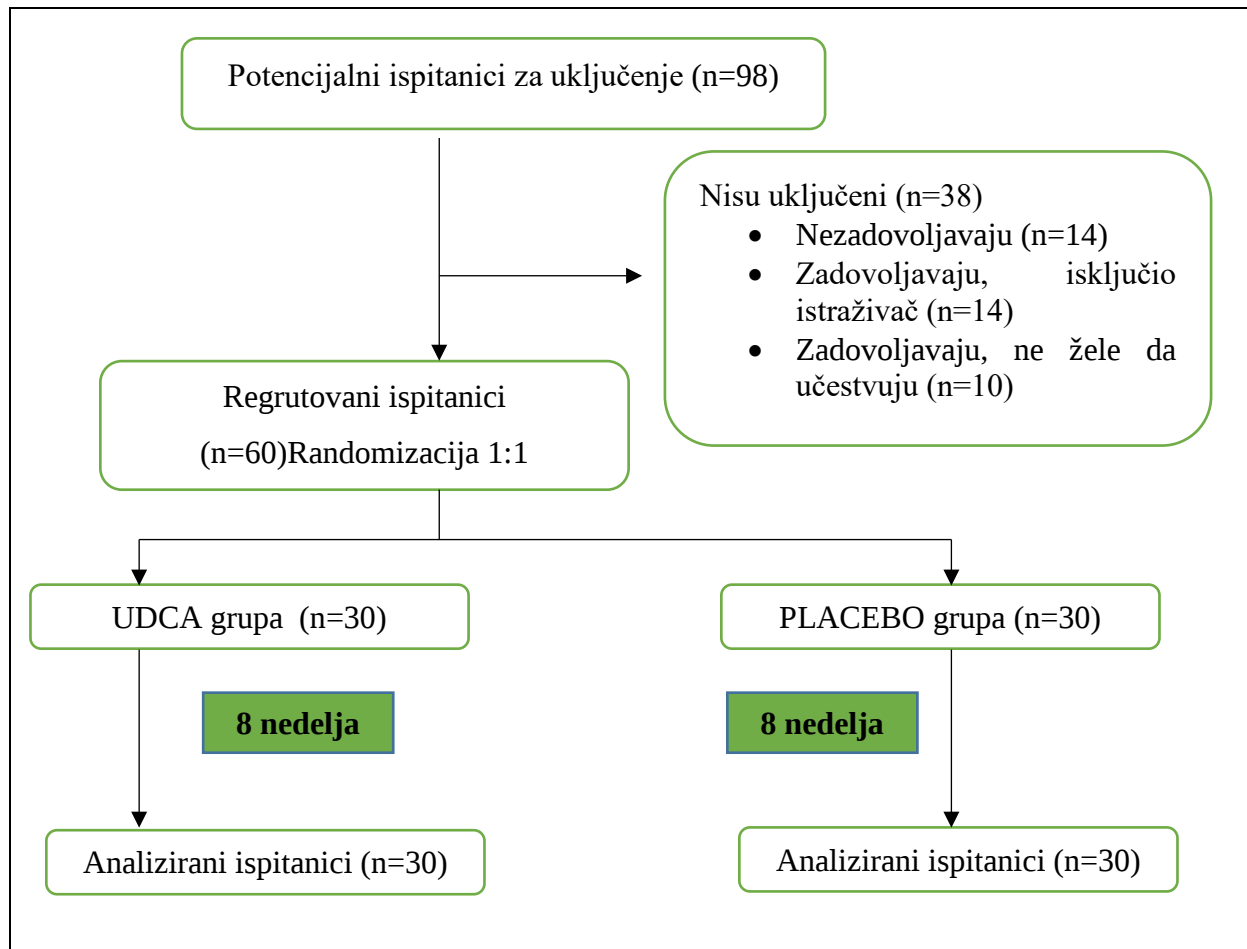
3.2. Ispitanici – selekcija i randomizacija ispitanika

Ispitanici su regrutovani na nivou primarne zdravstvene zaštite u APM navedene ustanove u periodu od jula do septembra 2022.godine. Za potrebe studije su korišteni Registri pacijenata sa DM timova porodične medicine u JZU DZ BL i izdvojeni su potencijalni ispitanici sa DMT2, uz preporuku svog porodičnog doktora za uključanje u studiju (Slika 10). Studijski protokol sa detaljnim informacijama je prezentovan odabranim pacijentima (n=98) sa DMT2, oba pola, životne dobi od 40 do 65 godina, koji imaju trajanje DMT2 najmanje godinu dana sa potvrđenom dijagnozom na osnovu kriterijuma SZO i Američkog udruženja za dijabetes (*American Diabetes Association; ADA*) te Evropske asocijacije za proučavanje dijabetesa (*European Association for the Study of Diabetes; EASD*), a koji su na terapiji metforminom [16]. Prema trenutno važećim smjernicama za liječenje DMT2 u Republici Srpskoj iz 2021. godine [127], uključujući ADA i EASD preporukama, postavljene su individualne ciljne vrijednosti strožije glikoregulacije ($HbA1c \leq 6,5\%$). Stoga im se prema stepenastom modelu preporučuje kombinovana terapija sa drugim lijekovima u terapiji DMT2 (neinsulinski lijekovi i insulini). Međutim, današnji lijekovi imaju dosta neželjenih efekata, u prvom redu zbog hipoglikemije, ili su skupi pa ih pacijenti nerijetko odbijaju. Prije prelaska na naredni nivo u terapiji DMT2, našim ispitanicima je bio ponuđen studijski lijek – UDCA u dozi od 1,500 mg (preporučena dnevna doza, zavisna od tjelesne mase i trajanja liječenja) koji je u skladu sa uputstvom za UDCA ($14 \pm 2 \text{ mg/kg}$), uz indeks tjelesne mase $\geq 25 \text{ kg/m}^2$.

Metodom randomizacije, u odnosu 1:1, ispitanici su podijeljeni u dvije grupe, usklađene po polnoj i dobnoj strukturi i to:

- Eksperimentalna/UDCA grupa (n=30 ispitanika) koji su uzimali peroralno dvije tablete po 250 mg UDCA, tri puta dnevno, pola sata prije obroka, u trajanju od osam nedelja.

- Placebo grupa (n=30 ispitanika) koji su uzimali peroralno dvije tablete po 250 mg placeba, tri puta dnevno u trajanju od osam nedelja.



Slika 9. Dijagram kliničke studije i odabir pacijenata u studiji

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u istraživanje su bili slijedeći:

- Potpisan informisani pristanak za saglasnost u istraživanju,
- Životna dob od 40 do 65 godina,
- Postavljena dijagnoza DMT2, najkraće godinu dana od početka interventnog perioda,
- Terapija oralnim hipoglikemikom metforminom (maksimalno podnošljiva dnevna doza), sa HbA1c $\geq 6,5\%$,
- Predgojaznost ili gojaznost (indeks tjelesne mase $\geq 25 \text{ kg/m}^2$).

Kriterijumi za neuključivanje pacijenata u istraživanje su bili:

- Insulinska terapija u posljednja tri mjeseca prije početka interventnog perioda,
- Primjena neinsulinske injektibilne terapije u posljednja tri mjeseca (GLP-1 analozi) prije početka interventnog perioda,

- Primjena sistemskih kortikosteroida u posljednja tri mjeseca prije početka interventnog perioda kontinuirano duže od 10 dana,
- Primjena imunosupresiva,
- Infarkt miokarda ili moždani udar u posljednja 3 mjeseca od interventnog perioda,
- Maligna oboljenja ,
- Akutna infektivna bolest,
- Trudnoća.

Kriterijumi koji su se preduzimali za isključivanje pacijenata iz studije su bili:

- Nepoštovanje protokola istraživanja (propušteno više od 10% doze lijeka),
- Uvođenje nove terapije u liječenju DMT2 u toku interventnog perioda,
- Lični zahtjev pacijenta,
- Neželjene reakcije/događaji kao što su dekompenzacijska ciroze jetre, akutni holecistitis, česte epizode bilijarnih kolika, alergijska reakcija, dugotrajne dijareje (duže od 3 dana).

3.3. Primjenjeni lijekovi u istraživanju

U kliničkoj studiji su korištene:

1. tablete od 250 mg ursodeoksiholne kiseline proizvođača „Bosnalijek“, d.o.o, Sarajevo, BiH. *Product code and name: 1003510 UDCA 250 mg film-coated tablets, Batch number:4291* (sertifikat analize u prilogu 1),
2. tablete od 250 mg placebo proizvođača „Bosnalijek“, d.o.o. Sarajevo, BiH. *Product code and name: PLACEBO UDCA 250 mg film-coated tablets, Batch number:0083* (sertifikat analize u prilogu 1).

*Napomena: UDCA (registrovan lijek na recept stavljen u promet od 31.01.2020. sa slijedećim terapijskim indikacijama u BiH: primarna bilijarna ciroze (PBC), otapanje holesterolskih kamenaca u žučnoj kesi, tretman žučnog refluksnog gastritisa te kod pedijatrijske populacije za terapiju hepatobilijarnog poremećaja koji je povezan sa cističnom fibrozom kod djece uzrasta od 6 do 18 godina).

3.4. Protokol istraživanja i metode

Svi potencijalni ispitanici su pozvani da ispune upitnik sa osnovnim socio-demografskim podacima, trajanjem dijabetesa, prisutnim udruženim hroničnim bolestima,

kontinuiranom terapijom, faktorima rizika (fizička aktivnost/neaktivnost, pušenje, konzumacija alkohola), te prisutnim alergijama (Prilog 2, UDCADMT2 upitnik). Nakon toga su urađena antropometrijska i mjerenja krvnog pritiska, kao i potrebne laboratorijske analize krvi.

Uzimanje uzoraka pune venske krvi (15 ml) za određivanje potrebnih parametara za analizu je rađeno na početku istraživanja (F0), nakon četiri nedelje (F1) i osam nedelja nakon početka istraživanja (F2). Svim ispitanicima su se radila antropometrijska i klinička mjerenja na početku (F0) i na kraju istraživanja (F2). Na početku interventnog perioda, svaki ispitanik je dobio kutiju sa tabletama UDCA/placeba u količini dovoljnoj za četiri nedelje. Nakon prve četiri nedelje, pacijenti su dolazili na kontrolni pregled. Tom prilikom su im se ponovo uzimali uzorci krvi i davala druga kutiju sa terapijom za naredne četiri nedelje. Svima je savjetovano da nastave sa svojim dosadašnjim stilom života, ne mijenjajući navike koje su dotad imali, kao i tokom istraživanja. Takođe, ispitanici su vodili dnevnik u koji su redovno unosili tačno vrijeme uzimanja tableta, kao i eventualne tegobe koje se mogu javiti u toku interventnog perioda uz obavezno obaveštenje glavnog istraživača (Prilog 3).

Tokom studije svi ispitanici su bili pod nadzorom, te su im se pored predviđenih istraživačkih analiza radile i dodatne analize krvi za procjenu lične sigurnosti. Ukoliko bi se javila neka neželjena reakcija/događaj koja bi remetila normalne dnevne životne aktivnosti duže od tri dana (npr. dijareja), ispitanik je bio isključen iz studije, prema procjeni glavnog istraživača. Takođe, ženskim ispitanicama je bila skrenuta pažnja da ukoliko bi se desila trudnoća, prekida se davanje studijskog lijeka.

3.4.1. Antropometrijska mjerenja

Svakom ispitaniku je izmjerena tjelesna visina (TV), tjelesna masa (TM), obim struka (OS) i na osnovu tih parametara se izračunavao indeks tjelesne mase (ITM).

TV se mjerila u stojećem stavu sastavljenih peta i odmaknutih prstiju, ruku opuštenih uz tijelo, bez obuće, sa vrijednostima izraženim u centimetrima (cm). Mjerenje se vršilo do najbližih 0.1 cm.

TM je mjerena tako da ispitanik stoji na srednjem dijelu vage sa sastavljenim petama, i sa skinutim „težim“ dijelom odjeće. Vrijednosti su izražene u kilogramima (kg). Mjerenje je bilo do najbližih 100 grama [128].

Za mjerenje TV i TM je korištena vaga sa pomičnim tegom „seca-GIMA“M-3-385, uz visinometar sa pokretnom glavom.

OS se mjerio u horizontalnoj poziciji, u fazi ekspirija, na sredini između donje granice rebarnog luka i ilijačnog grebena pomoću nerastezljive trake. Mjerenje OS je bilo do najbližih 0.1 cm [129].

ITM se izračunavao iz izmjerenih vrijednosti za tjelesnu masu (kg) i tjelesnu visinu (m) tako što se tjelesna masa podijeli sa kvadratom tjelesne visine i izražava se u kg/m^2 . Dobijene vrijednosti su interpretirane prema klasifikaciji stanja uhranjenosti SZO [130]. Sva antropometrijska mjerenja su se radila u dvije tačke mjerenja (F0 i F2).

3.4.2. Mjerenje krvnog pritiska

Vrijednosti krvnog pritiska (KP) su mjerene sfingomanometrom sa živom firme GIMA, CE 0476, Italia. Svakom ispitaniku se nakon odmora od 10 minuta mjerio tri puta arterijski krvni pritisak u vremenskom razmaku od 5 minuta, a korištena je srednja vrijednost mjerenja u skladu sa preporukama Američkog udruženja za srce (*American Heart Association; AHA* [131]). Za vrijeme mjerenja ispitanik je u sjedećem položaju, manžeta manometra je bila obavijena oko lijeve ruke, a njena donja ivica se nalazila 2,5 cm iznad sredine lakatne jame. Dobijene vrijednosti izražene su u milimetrima živinog stuba (mmHg). KP je mjereno tokom F0 i F2.

3.4.3. Laboratorijska ispitivanja krvi - Uzorkovanje i sakupljanje uzoraka krvi

U Centralnoj laboratoriji JZU DZ Banja Luka, svakom ispitaniku se uzimala venska krv (F0, F1, F2) nakon dvanaestočasovnog gladovanja ujutro, od 07:00 do 09:00 časova, a pacijent je bio predhodno obaviješten radi pripreme. Identifikacija pacijenta i uzorka je rađena automatski, korištenjem laboratorijskog informacionog sistema sa kodiranjem uzoraka. Za uzimanje uzoraka venske krvi korištene su vakum epruvete sa dodatkom (antikoagulansa ili konzervansa), a vrsta dodatka se razlikovala prema boji čepa na epruveti.

Jedan dio analiza je odrađen odmah iz svježeg uzorka venske krvi, uz prethodno centrifugiranje 15 minuta na 3500 obrtaja. Drugi dio analiza je odrađen naknadno, uz prethodno centrifugiranje, alikvotiranje i zamrzavanje na -20°C prije laboratorijske analize. Uzorci pune venske krvi od svakog ispitanika su se sakupljali u po dvije epruvete sa plavim čepom (antikoagulans 3,2% Na citrat) tokom sve tri posjete (F0, F1, F2). Za parametre oksidativnog stresa iz plazme se radila obrada eritrocita, kako bi se dobio lizat, a sve to prije zamrzavanja uzetih uzoraka (Prilog 4, obrada eritrocita).

3.4.3.1. Osnovne hematološke i biohemijske analize krvi

- a) Vrijednosti kompletne krvne slike su mjerene iz pune krvi, prema DIN 58931 standardu na hematološkom analizatoru XN 1000-Sysmex.
- b) Vrijednosti fibrinogena su dobijene (vakum epruveta plavi čep, sa antikoagulansom 3,2% Na citrat) korištenjem koagulometrijske metode (Automatski koagulometar CA 600 – Sysmex). Referentni interval je bio od 2,0-4,0 g/l.
- c) Na biohemijskom analizatoru Abbot Alinity c su se određivali enzimi jetre, glikemijski markeri i lipidni status.
- Parametri jetrene funkcije aspartat aminotransferaza (AST, ref.interval: 5-31 IU/l), alanin aminotransferaza (ALT, ref. interval: 5-31 IU/l), gama-glutamil transferaza (GGT, ref.inteval:3-38 IU/l), alkalna fosfataza (AP, ref.interval:53-141 IU/l) su mjereni metodom IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) sa piridoksal fosfatom.
 - Vrijednosti glukoze u serumu su mjerene korištenjem enzimatske metode sa heksokinaza glukozo-6-fosfat dehidrogenazom (Referentni interval od 4,2-6,10 mmol/l).
 - Vrijednosti HbA1c(%) iz pune krvi (vakum epruveta ljubičast čep, s antikoagulansom K2EDTA) su mjereni korištenjem enzimске metode (Referentni interval od 4,0-6,0%).
 - Lipidni status je mjeren slijedećim metodama i to:
 - ukupni holesterol (enzimska metoda fotometrije pomoću holesterol oksidaze - CHOD-PAP metoda. Referentni interval je bio od 3.11-5.20 μ mol/l);
 - trigliceridi (enzimska metoda fotometrije sa ultravioletnim svjetlom i glicerol-fostaf oksidazom- GPO-PAP metoda. Referentni interval je bio od 0.2-1.7 mmol/l);
 - HDL holesterol (direktna HDL – holesterol metoda. Referentni interval je bio 0.91-2.06 mmol/l);
 - LDL holesterol (Friedewald-ova formula: $LDLh = ukupni\ holesterol - HDLh - trigliceridi/2,2$. Referentni interval je bio od 0 - 3.4 mmol/l).
- d) Insulin je određen upotrebom imunohemijske metoda elektrohemioluminiscencije „ECLIA” na analizatoru imunohemijske metode cobas e 801. Referentni interval za insulin je bio od 2,6-24,9 μ IU/ml.

Za procjenu insulinske rezistencije se izračunavao homeostatski model insulinske rezistencije (HOMA-IR) po formuli:

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{Insulin natašte} \times \text{Glikemija natašte}}{22.5}$$

Insulinska rezistencija je definisana kao vrijednost indeksa insulinske rezistencije, HOMA-IR $\geq 2,5$ [132].

Za skoriranje metaboličkog sindroma se izračunavao i siMS skor (*Simple Method for Quantifying Metabolic Syndrome*). siMS skor je kvantifikacija metaboličkog statusa [133]. Izračunava se po formuli:

$$\text{siMS skor} = \frac{2 \times OS}{TV} + \frac{GUK}{5.6} + \frac{Tg}{1.7} + \frac{SKP}{130} - \frac{HDL}{1.02/1.28 (M/\check{Z})}$$

gdje je: OS – obim struka (cm), TV-tjelesna visina (cm), GUK- glukoza u krvi (mmol/l), Tg- trigliceridi (mmol/l), SKP- sistolni krvni pritisak (mmHg), HDL- lipoprotein velike gustine (mmol/l, ciljna vrijednost za muškarce i žene 1.02/1,28 mmol/l).

3.4.3.2. Parametri oksidativnog stresa

- Za određivanje indeksa lipidne peroksidacije koristio se TBARS (*Thiobarbituric acid reactive species*) metod upotrebom 1% tiobarbiturne kiseline i 0,05 NaOH, a mjerenje je vršeno na 530nm [134].
- Za određivanje superoksid anjon radikala (O_2^-), vodonik peroksida (H_2O_2) i nitrita (NO_2^-) korišteni su *Nitro Blue Tetrazolium* (NTB) metod redukcije [135], metoda po *Pick i Keisari* [136] i *Green* metoda [137].
- Antioksidativni parametri: glutation SH (GSH), te enzimi katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD) su mjereni spektrofotometrijski u lizatu eritrocita, a korišten je metod po *Beutler* [138-142].

3.4.3.3. Parametri inflamacije

- Za kvantitativno imunoturbidimetrijsko određivanje C-reaktivnog proteina u humanom serumu pomoću različitih metoda [CRP16 i CRP48] na analizatoru *Alinity c* je korišten *Alinity c CRP Vario Reagent Kit* test. Referentni interval je bio od 0-5mg/l.
- Određivanje vrijednosti medijatora zapaljenja u krvnom serumu IL-6(*Elecsys* IL-6) i TNF-alfa ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) tehnikom, komercijalnim

kitovima; te folne kiseline (*Elecsys Folate III*) na analizatoru imunoloških eseja Cobas e 801 (2018, *Roche Diagnostics*). Referentni interval za IL-6 je bio od 0-7,7pg/ml. Referentni interval za folnu kiselinu od 4,5 - 32,2 ng/ml.

- Određivanje homocisteina (*Alinity i Homocysteine Reagent Kit* 2018) i vitamina D (*Alinity i 25-OH Vitamin D Reagent Kit*) korištenjem hemiluminiscentnog imunohemijskog testa (*CMIA, chemiluminescent microparticle immunoassay*) na analizatoru *Alinity* i prema uputstvu proizvođača (*Abott, USA*). Referentne vrijednosti za homocistein su bile 5,08 - 15,39 μ mol/L. Referentni interval za vitamin D je bio od 6,8-49,9ng/ml, poželjna vrijednost je >30 ng/ml.

3.4.3.4. Parametri endotelne disfunkcije

- Za kvantitativno imunoturbidimetrijsko određivanje antigena *von Willebrand*-ovog faktora (vWF) korištena je citratna plazma, a mjerenje je vršeno na koagulacionom analizatoru *Siemens Healthcare Diagnostics*, Njemačka. Referentni interval za vWF u plazmi je bio od 50-172%.
- Za određivanje ICAM-1 (*Human sICAM-1/CD54 (Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1)*) i VCAM-1(*Human sVCAM- Vascular cell adhesion protein 1*) su korišteni ELISA kitovi (*Wuhan Fine Biotech Co., Ltd*). Referentni interval za ICAM-1 je bio na 0,781-50 ng/ml, a za VCAM-1 je bio 0,156 -10 ng/ml.

3.5. Etički aspekt u istraživanju

Istraživanje je sprovedeno u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije, iz 1964.godine, najvišim etičkim i humanim standardima. Preliminarni projekat istraživanja je odobren prvo od strane Etičkog odbora za istraživanja na ljudima i biološkom materijalu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci (Br. 18/4. 92/22) potom Etičkog odbora JZU DZ Banja Luka (Br.01-3721-1). Za ispitanike, uključene u istraživanje, je kreiran obrazac – Informisani pristanak ispitanika, koji su svi ispitanici potpisali kao znak razumijevanja kliničke studije i njihovog dobrovoljnog učešća u istraživanju.

Takođe, istraživanje je sprovedeno u skladu sa principima Dobre kliničke prakse (*Good Clinical practice, GCP*) prema smjernicama *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use;ICH*. Istraživanje je registrovano i na www.clinicaltrial.gov pod slijedećom šifrom NCT05416580.

3.6. Statistička analiza

Tokom trajanja istraživanja, prikupljeni podaci su unošeni u elektronsku bazu podataka u programu *Microsoft Excel 2010* za svakog ispitanika. U ovom istraživanju korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode.

Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su: apsolutni i relativni brojevi (n,%), mjere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana), mjere disperzije (standardna devijacija, percentili).

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike:

- parametarski (t test), te
- neparametarski (Pirsonov hi-kvadrat test, Fišerov test tačne vjerovatnoće, *Mann-Whitney U* test, *Wilcoxon Signed Rank* test).

Izbor testa za testiranje razlike zavisio je od tipa podataka i raspodjele. Parametarski metodi korišćeni su u situaciji gde je raspodjela bila normalna (Student-ov t test za nezavisne uzorke za poređenje srednjih vrijednosti između grupa, t test za vezane uzorke u različitom vremenskom intervalu, unutar grupa). Neparametarski testovi razlike su korišćeni u situaciji gdje raspodjela nije bila normalna (*Mann-Whitney U* test između grupa, *Wilcoxon Signed Rank* test unutar grupe). Normalnost raspodjele ispitivana je na osnovu deskriptivnih parametara, testova normalnosti raspodjele (Kolmogorov-Smirnov i *Shapiro-Wilks* testa) i grafičkim metodama (boxplot). Nivo značajnosti manji od 0,05 ($p < 0,05$) se smatrao statistički značajnim. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Svi podaci obrađeni su u SPSS 29.0 (*IBM Corp. Released 2022. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. Armonk, NY: IBM Corp.*) softverskom paketu i R 3.4.2 (*R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*).

4. REZULTATI

4.1. Socio-demografske karakteristike ispitanika u istraživanju

Prosječna dob ispitanika u obe grupe bila je 56,3 godine, najmlađi ispitanik imao je 43, a najstariji 65 godina. Od ukupnog uzorka, 33 ispitanika su bili muškarci (55%). Većina ispitanika u obe grupe su bili u bračnoj zajednici (86,7% UDCA vs. 73,3% placebo; $p=0,197$), zaposlenih (66,7% UDCA vs 56,7% placebo; $p=0,426$), a visoko obrazovanih ispitanika je bilo 7 (23,3%) u obe grupe ($p=1,000$), s obzirom na nivo obrazovanja.

Prosječna starosna i polna distribucija su bile vrlo slične u obe grupe, što je u skladu sa prethodnim kriterijumima uključenja u studiju (Tabele 1 i 2).

Tabela 1. Distribucija ispitanika sa DMT2 po starosti u obe grupe

		M	SD	Med	P25	P75	p
Starost	UDCA	56.43	6.57	57.00	50.00	62.00	0.842
	Placebo	56.10	6.33	56.50	51.00	62.00	

DMT2-dijabetes mellitus tipa 2; UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; Med- medijana; P25- 25% percentil; P75- 75% percentil; p-statistička značajnost, t test nezavisnih uzoraka

Tabela 2. Distribucija ispitanika sa DMT2 po polu u obe grupe

		UDCA		Placebo		p
		N=30	%	N=30	%	
Pol	muški	17	56.7%	16	53.3%	0.795
	ženski	13	43.3%	14	46.7%	

DMT2-dijabetes mellitus tipa 2; UDCA-ursodeoksiholna kiselina; p-statistička značajnost, Pirsonov hi-kvadrat test ($\chi^2=0,067$)

Deskriptivnom statistikom s obzirom na trajanje dijabetesa je utvrđeno da je najviše ispitanika u obe grupe imalo trajanje DMT2 manje od 5 godina (86,7%), a najmanje ispitanika je imalo trajanje DMT2 više od 15 godina (10%). Analizom podataka za utvrđivanje razlike, utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike između ispitanika u obe grupe u pogledu dijabetesnog staža kategorisanog u 4 kategorije ($p=0,181$) (Tabela 3).

Tabela 3. Kategorije trajanja DMT2 kod ispitanika u obe grupe

DMT2 trajanje (god.)	UDCA N %	Placebo N %	p
<5	11 (36.7%)	15 (50%)	0.181
5-9.9	12 (40%)	12 (40%)	
10-14.9	5 (16.7%)	2 (6.7%)	
15+	2 (6.7%)	1 (3.3%)	

DMT2-dijabetes mellitus tipa 2; UDCA-ursodeoksiholna kiselina; p-statistička značajnost, *Mann-Whitney U* test;

Analizom prosječnog trajanja DMT2 utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike kod ispitanika u obe grupe (6(5) vs.4.5(5), $p=0,069$) (Tabela 4).

Tabela 4. Prosječno trajanje DMT2 kod ispitanika u obe grupe

		M	SD	Med	P25	P75	p
DMT2	UDCA	6.90	4.47	6.00	4.00	9.00	0.069
trajanje	Placebo	4.90	3.28	4.50	2.00	7.00	

DMT2-dijabetes mellitus tipa 2; UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; Med- medijana; P25- 25% percentil; P75- 75% percentil; p- statistička značajnost, *Mann-Whitney U* test;

Od udruženih bolesti pored DMT2, koje su imali ispitanici u obe grupe najčešća je bila kardiovaskularna bolest odnosno hipertenzija. Ispitanici u Placebo grupi su u nešto većem procentu imali hipertenziju u poređenju sa ispitanicima u UDCA grupi, bez statistički značajne razlike između grupa ($p=0,260$). Druge udružene bolesti (bubrežna bolest, bolesti štitne žlijezde, artitis, očne i kožne bolesti) su bile minimalno zastupljene kod manjeg broja pacijenata. Shodno tome, statističkom analizom za utvrđivanje razlike, nije bilo statistički značajne razlike po grupama s obzirom na udružene bolesti ($p=1,000$; Tabela 5).

Od drugih lijekova u kontinuiranoj terapiji (pored metformina za DMT2), ispitanici su najviše koristili antihipertenzive, podjednako zastupljene u obe grupe, bez statistički značajne razlike između grupa ($p=0,573$). Pored antihipertenziva, mali broj ispitanika je uzimao statine koje su opet više koristili ispitanici u Placebo grupi nego oni u UDCA grupi bez statistički značajne razlike između obe ispitivane grupe ($p=0,347$; Tabela 6).

Tabela 5. Prisustvo udruženih bolesti /komorbiditeta kod ispitanika u obe grupe

Komorbiditeti		UDCA		Placebo		p
		N	%	N	%	
KVB	ne	11	36.7%	7	23.3%	0.260 ^a
	da	19	63.3%	23	76.7%	
Bolesti kože	ne	29	96.7%	28	93.3%	1.000 ^b
	da	1	3.3%	2	6.7%	
Bolesti bubrega	ne	29	96.7%	30	100.0%	1.000 ^b
	da	1	3.3%	0	0.0%	
Bolesti kostiju i zglobova	ne	29	96.7%	28	93.3%	1.000 ^b
	da	1	3.3%	2	6.7%	
Bolesti štitne žl.	ne	29	96.7%	30	100.0%	1.000 ^b
	da	1	3.3%	0	0.0%	
Očne bolesti	ne	29	96.7%	30	100.0%	1.000 ^b
	da	1	3.3%	0	0.0%	

UDCA-ursodeoksiholna kiselina; KVB-kardiovaskularna bolest; p- statistička značajnost,^a Pirsonov hi-kvadrat test; ^b Fišerov test tačne vjerovatnoće

Tabela 6. Kontinuirana terapija kod ispitanika u UDCA i Placebo grupi

Kontinuirana terapija		UDCA		Placebo		p
		N	%	N	%	
Antihipertenzivi	ne	10	33.3%	8	26.7%	0.573
	da	20	66.7%	22	73.3%	
Statini	ne	25	83.3%	22	73.3%	0.347
	da	5	16.7%	8	26.7%	

UDCA-ursodeoksiholna kiselina ; p- statistička značajnost, Pirsonov hi-kvadrat test

4.2. Antropometrijska i klinička mjerenja kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom

Na početku studije svim ispitanicima je mjerena tjelesna visina (TV) i tjelesna masa (TM) u dvije tačke, prije i poslije tretmana sa UDCA/placebom. Nije bilo statistički značajne razlike između grupa po TV(p=0,479), niti po TM između grupa na početku

istraživanja($p=0,221$), kao niti nakon završenog istraživanja ($p=0,323$). Ono što je evidentno je t testom za nezavisne uzorke dobijena statistička značajnost u razlici ispitivanog parametra TM odnosno ΔTM ($-1,50 \pm 1,95$ vs. $-0,45 \pm 1,40$; $p=0,019$) između grupa. U UDCA grupi nastupio veći gubitak u TM nego što je to bilo u Placebo grupi. Rezultati su prikazani u Tabeli 7.

Tabela 7. Antropometrijski parametri (TV i TM) ispitanika na početku i na kraju istraživanja u obe grupe

TV/TM m/kg		M	SD	Med	P25	P75	p
TV	UDCA	1.73	.10	1.73	1.67	1.78	0.479
	Placebo	1.71	.10	1.71	1.64	1.81	
TM F0	UDCA	96.25	16.04	97.00	85.00	105.50	0.221
	Placebo	91.08	16.30	93.50	77.00	101.50	
TM F2	UDCA	94.75	15.72	93.75	84.00	104.50	0.323
	Placebo	90.63	16.24	92.25	76.50	101.00	
$\Delta TM(F2-F0)$	UDCA	-1.50	1.95	-1.00	-2.50	-.50	0.019
	Placebo	-.45	1.40	-.50	-1.50	.50	

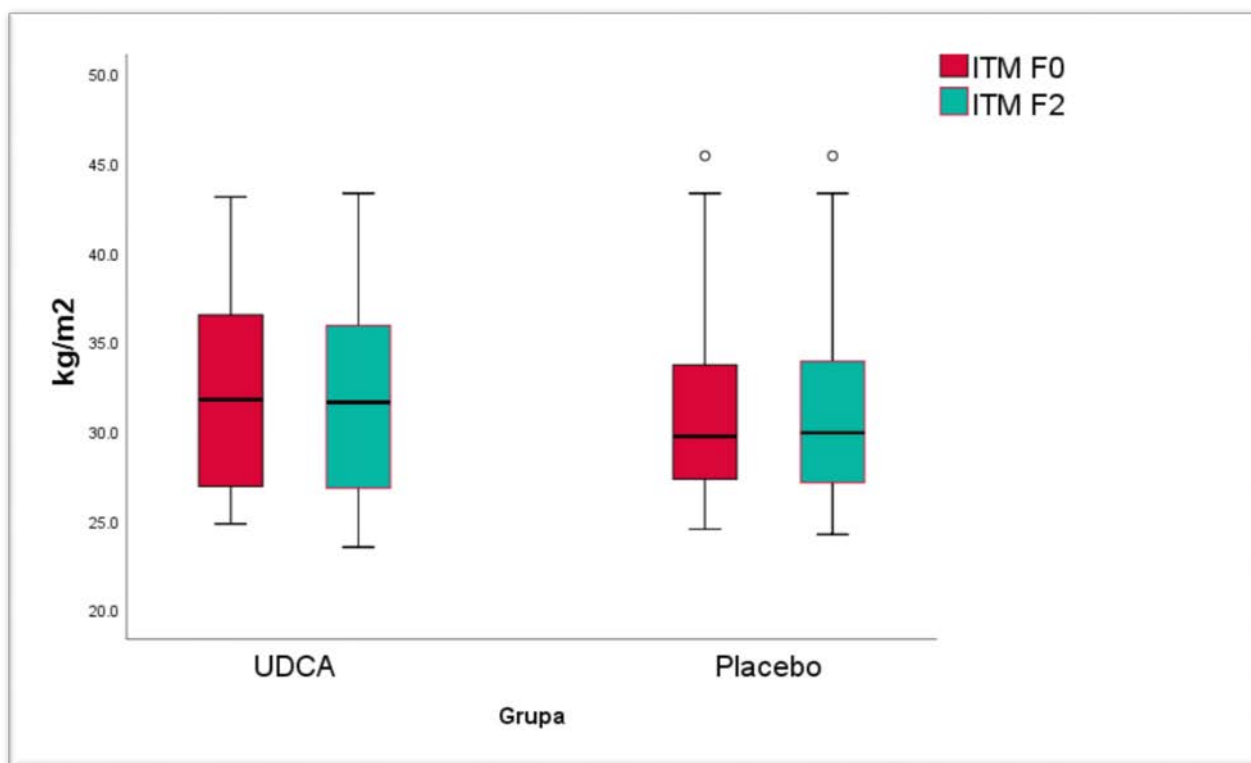
TV- tjelesna visina; TM- tjelesna masa; F0-početak istraživanja,F2-nakon 8 nedelja; Δ -promjena ispitivanog parametra (razlika u vrijednostima između F2 i F0);UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina;SD-standardna devijacija;Med- medijana; P25- 25% percentil; P75- 75% percentil; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

Početna antropometrijska mjerenja (ITM i OS) su bila vrlo slična u obe grupe, čak za nekoliko jedinica viša u UDCA grupi. Poredeći ITM nije bilo statistički značajne razlike prije tretmana između grupa. S obzirom na ITM, t testom za nezavisne uzorke utvrđena je značajnost u promjeni (Δ). Naime, značajno veće prosječno smanjenje primijećeno je u grupi UDCA, poredeći s Placebo grupom ($-0,50 \pm 0,66$ vs. $-0,15 \pm 0,49$; $p=0,024$), kao i na granici značajnosti za OS ($-4,70 \pm 4,48$ vs. $-2,47 \pm 4,42$; $p=0,057$) između grupa (Tabela 8).

Tabela 8. Antropometrijske karakteristike ispitanika na početku i na kraju istraživanja u obe grupe

ITM/OS (kg/m ²)/cm		M	SD	Med	P25	P75	p
ITM F0	UDCA	32.43	5.85	31.75	26.90	36.50	0.408
	Placebo	31.22	5.33	29.70	27.30	33.70	
ITM F2	UDCA	31.92	5.74	31.60	26.80	35.90	0.555
	Placebo	31.07	5.40	29.90	27.10	33.90	
Δ ITM(F2-F0)	UDCA	-.50*	.66	-.30	-1.00	-.20	0.024
	Placebo	-.15	.49	-.20	-.60	.10	
OS F0	UDCA	106.67	11.15	107.50	100.00	114.00	0.077
	Placebo	100.97	13.27	101.50	91.00	109.00	
OS F2	UDCA	101.97	10.96	103.00	96.00	111.00	0.241
	Placebo	98.50	11.69	100.00	91.00	106.00	
Δ OS(F2-F0)	UDCA	-4.70*	4.48	-3.00	-7.00	-2.00	0.057
	Placebo	-2.47*	4.42	-2.50	-4.00	.00	

ITM- indeks tjelesne mase; OS-obim struka;p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke; *p-statistička značajnost, t test za vezane uzorke za poređenje F0 i F2 u UDCA ili u Placebo grupi



Slika 10. Indeks tjelesne mase kod pacijenata sa DMT2 prije i poslije tretmana sa UDCA/placebom

Takođe, značajno intragrupno sniženje je utvrđeno opet u UDCA grupi poredeći sa početnim vrijednostima ITM ($31,92 \pm 5,74$ vs. $32,43 \pm 5,85$; $p < 0,001$). Rezultati za utvrđivanje intragrupne razlike u UDCA grupi su testirani t testom za vezane uzorke. Inače svi rezultati su i radi bolje vidljivosti prikazani na Slici 10.

Prosječne vrijednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska (SKP, DKP), bile su slične u obe grupe na početku istraživanja, kao i na kraju istraživanja bez statistički značajne razlike između grupa. Iako je primjetno je da je veći pad SKP i DKP bio u UDCA gupi, statistički značajna razlika je dokazana samo u Δ DKP odnosno razlici u vrijednostima DKP između F2 i F0 između grupa ($-1,5 \pm 4,9$ vs. $2 \pm 7,26$; $p = 0,033$). Rezultati su prikazani u Tabeli 9.

Tabela 9. Vrijednosti arterijskog krvnog pritiska na početku i na kraju istraživanja u obe grupe

SKP/DKP (mmHg)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	134.83	17.39	130.00	120.00	155.00	0.269
	Placebo	130.00	16.14	130.00	120.00	140.00	
F2	UDCA	131.67	14.16	135.00	115.00	140.00	0.494
	Placebo	128.67	19.25	130.00	115.00	140.00	
Δ SKP(F2-F0)	UDCA	-3.17	14.59	.00	-15.00	5.00	0.647
	Placebo	-1.33	16.24	-5.00	-10.00	10.00	
F0	UDCA	83.83	7.39	80.00	80.00	90.00	0.407
	Placebo	82.17	8.06	80.00	80.00	90.00	
F2	UDCA	82.33	6.91	80.00	80.00	90.00	0.367
	Placebo	84.17	8.62	80.00	80.00	90.00	
Δ DKP(F2-F0)	UDCA	-1.50	4.94	.00	-5.00	.00	0.033
	Placebo	2.00	7.26	.00	.00	10.00	

SKP- sistolni KP; DKP-dijastolni KP;p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

4.3. Parametri oksidativnog stresa (prooksidativni i antioksidativni parametri) kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom

Prooksidativni parametri (superoksid anjon, O_2^- ; vodonik peroksid, H_2O_2 ; nitriti, NO_2^- i indeks lipidne peroksidacije, TBARS metoda) su se određivali iz plazme. Prvo je mjereno

indeks lipidne peroksidacije (TBARS) u tri vremenske tačke (F0,F1,F2) kod ispitanika u obe grupe.

Početne vrijednosti TBARS, H_2O_2 , O_2^- i NO_2^- , bile su vrlo su slične, gotovo identične na početku istraživanja u obe ispitivane grupe. Nakon upotrebe UDCA, došlo je do smanjenja TBARS i H_2O_2 već nakon četiri nedelje, te još nakon osam nedelja korišćenja UDCA, sa visoko statistički značajnom razlikom između grupa ($p < 0,001$; Tabele 10 i 11).

Tabela 10. Indeks lipidne peroksidacije (TBARS metoda) mjeran u tri vremenske tačke po grupama

TBARS ($\mu\text{mol/ml}$ plazme)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	1.21	.18	1.19	1.07	1.33	0.761
	Placebo	1.20	.19	1.11	1.07	1.28	
F1	UDCA	1.02	.18	1.01	.90	1.08	<0.001
	Placebo	1.25	.15	1.28	1.12	1.34	
F2	UDCA	1.01	.09	1.00	.97	1.07	<0.001
	Placebo	1.14	.15	1.13	1.04	1.22	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	-.20*	.23	-.16	-.32	-.06	0.021
	Placebo	-.06	.23	-.04	-.28	.12	

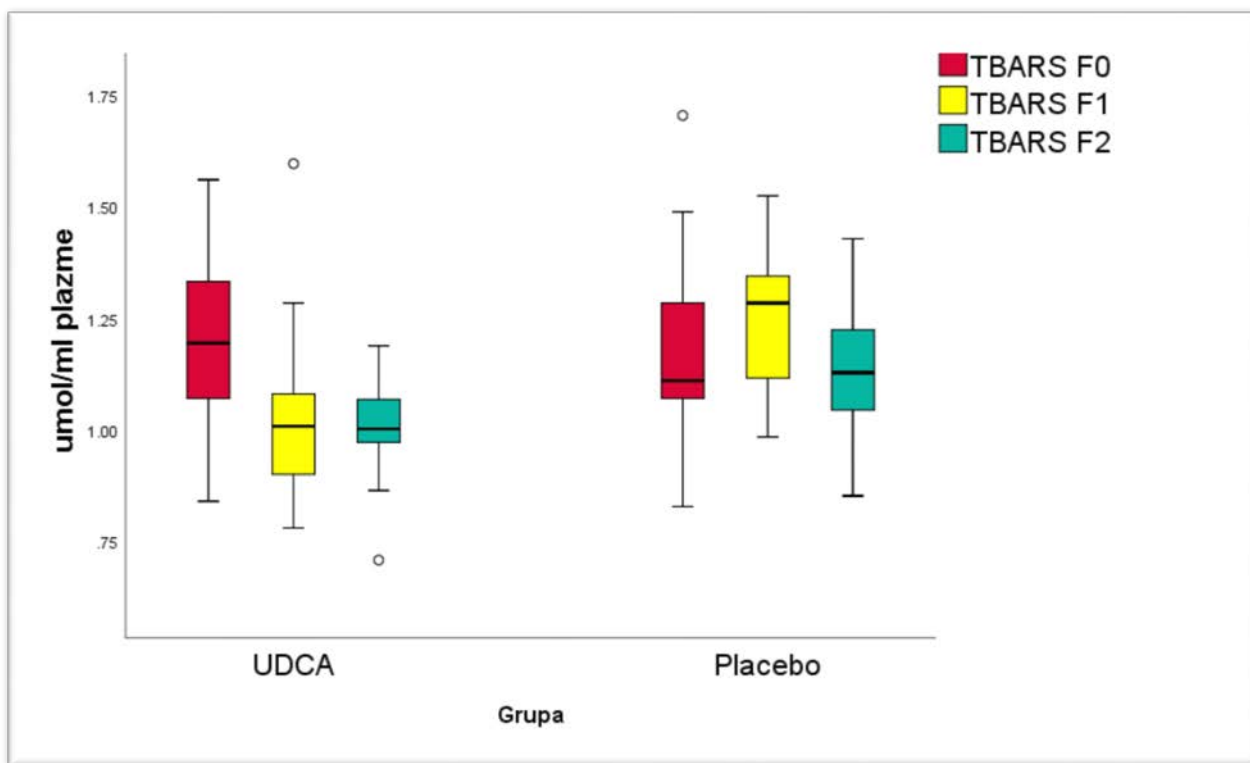
TBARS-produkti reakcije tiobarbiturne kiseline; F0-početak istraživanja, F1-nakon 4 nedelje; F2-nakon 8 nedelja; Δ - promjena TBARS (razlika u vrijednostima između F2 i F0); UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija; Med-medijana; P25-25%percentil; P75-75% percentil; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke; *p-statistička značajnost, t test vezanih uzoraka unutar grupe

Tabela 11. Vrijednosti H₂O₂ u tri vremenske tačke po grupama

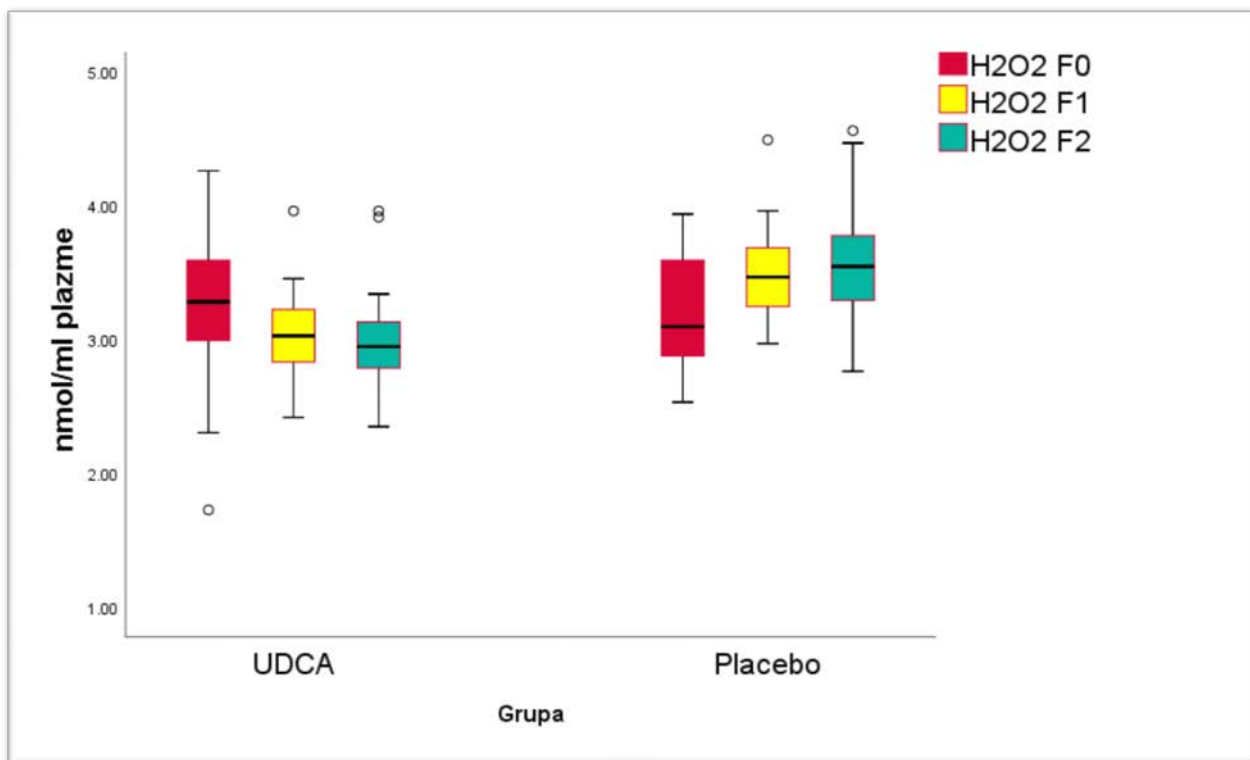
H ₂ O ₂ (nmol/ml plazme)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	3.25	.57	3.28	2.99	3.59	0.841
	Placebo	3.23	.43	3.10	2.88	3.59	
F1	UDCA	3.04	.30	3.03	2.83	3.22	<0.001
	Placebo	3.50	.34	3.47	3.25	3.68	
F2	UDCA	2.99	.34	2.95	2.79	3.13	<0.001
	Placebo	3.54	.43	3.55	3.29	3.78	
Δ(F2-F0)	UDCA	-.26	.76	-.30	-.67	.02	0.001
	Placebo	.32*	.56	.23	-.07	.58	

H₂O₂-vodonik peroksid; F0-početak istraživanja, F1-nakon 4 nedelje;F2-nakon 8 nedelja; Δ- promjena H₂O₂ (razlika u vrijednostima između F2 i F0)UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina;SD-standardna devijacija;Med- medijana; P25-25% percentil; P75-75% percentil; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke; *p-statistička značajnost, t test vezanih uzoraka unutar grupe

Shodno prethodnome, statistička značajnost je dostignuta i u promjenama (Δ) TBARS (p=0,021) i H₂O₂ (p=0,001) između ispitivanih grupa. Takođe, rezultati koji su dobijeni t testom vezanih uzoraka koji je rađen unutar UDCA grupe su potvrdili statistički značajnu intragrupnu razliku za TBARS u UDCA (p<0,001) i u Placebo grupi za H₂O₂ (p=0,004) Naime, došlo je do značajnog sniženja TBARS i H₂O₂, nakon upotrebe UDCA, dok je kod ispitanika u Placebo grupi došlo do povećanja prooksidativnog markera H₂O₂ (Slike 11 i 12).



Slika 11. Uticaj UDCA/placeba na TBARS kroz tri vremenske tačke (F0, F1, F2) po grupama



Slika 12. Uticaj UDCA/placeba na vrijednost H₂O₂ kroz tri vremenske tačke (F0,F1,F2) po grupama

S obzirom na prethodne prooksidanse, isti nalazi se nisu dobili za O₂⁻. Iako je na kontroli poslije četiri nedelje upotrebe UDCA vidno sniženje ovog parametra, ono nije

dostiglo statističku značajnost ($p=0,391$), kao niti poslije osam nedelja, u odnosu na Placebo grupu ($p=0,891$) što je prikazano u Tabeli 12.

Tabela 12. Vrijednosti superoksid anjona (O_2^-) u tri vremenske tačke po grupama

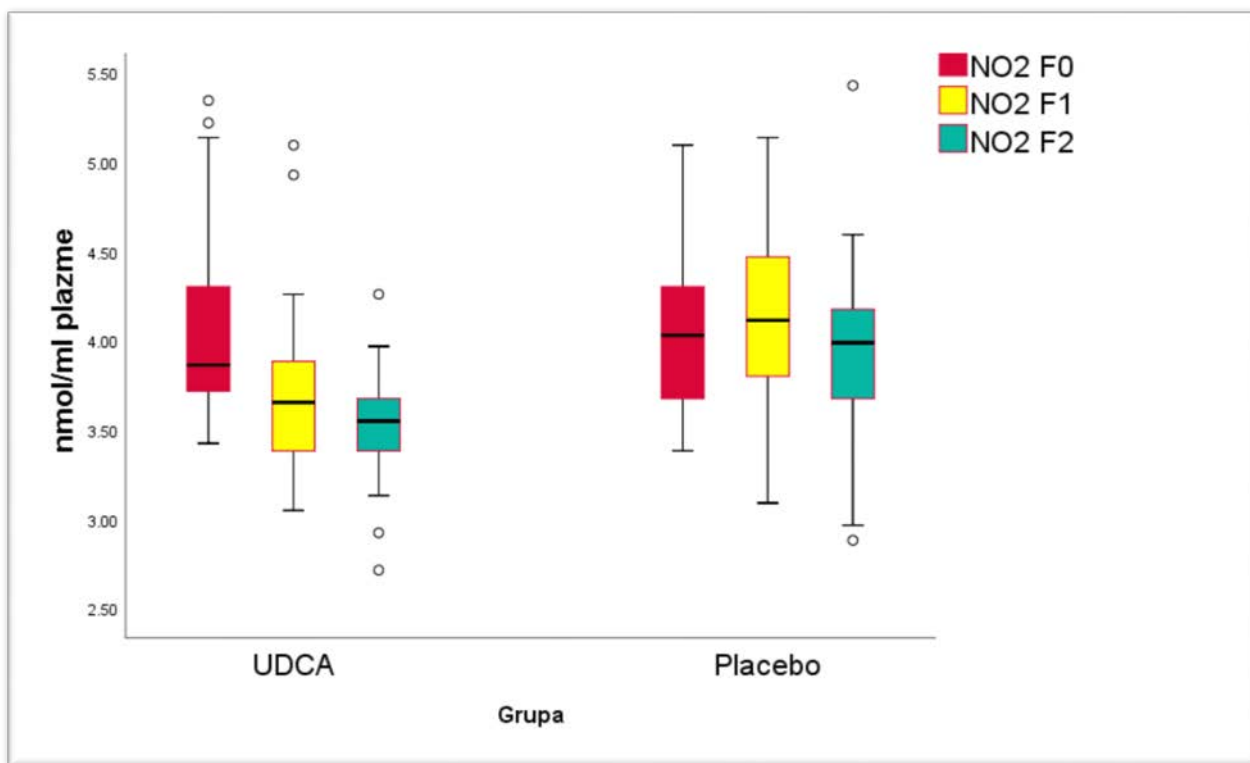
O_2^- (nmol/ml plazme)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	4.71	2.69	4.12	2.97	5.93	0.771
	Placebo	4.51	2.55	4.61	2.64	6.59	
F1	UDCA	3.81	1.29	3.63	2.97	4.61	0.391
	Placebo	4.25	2.46	4.28	1.98	6.26	
F2	UDCA	4.22	1.60	4.12	2.97	5.60	0.891
	Placebo	4.27	1.47	4.28	3.30	4.94	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	-.49	2.97	-.33	-1.98	1.32	0.743
	Placebo	-.24	2.95	.00	-1.98	2.31	

F0-početak istraživanja, F1-nakon 4 nedelje;F2-nakon 8 nedelja; ΔO_2^- - promjena O_2^- (razlika u vrijednostima između F2 i F0);UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina;SD-standardna devijacija;Med-medijana; P25- 25% percentil; P75- 75% percentil; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

Tabela 13. Vrijednosti nitrita (NO_2^-) u tri vremenske tačke po grupama

NO_2^- (nmol/ml plazme)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	4.04	.50	3.86	3.72	4.30	0.973
	Placebo	4.04	.46	4.03	3.67	4.30	
F1	UDCA	3.71	.47	3.65	3.38	3.88	0.003
	Placebo	4.12	.54	4.11	3.80	4.47	
F2	UDCA	3.49	.30	3.55	3.38	3.67	<0.001
	Placebo	3.93	.50	3.99	3.67	4.18	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	-.55*	.58	-.50	-.92	-.08	0.008
	Placebo	-.10	.66	-.06	-.63	.42	

F0-početak istraživanja, F1-nakon 4 nedelje;F2-nakon 8 nedelja; Δ - promjena NO_2^- (razlika u vrijednostima između F2 i F0);UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina;SD-standardna devijacija;Med-medijana; P25- 25% percentil; P75- 75% percentil; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke; *p statistička značajnost t test vezanih uzoraka unutar grupe



Slika 13. Dejstvo UDCA/placeba na vrijednosti NO_2^- kroz tri vremenske tačke(F0,F1,F2) po grupama

Ispitanici u UDCA grupi su nakon upotrebe lijeka imali dokazano sniženje proksidativnog markera NO_2^- ($p < 0,001$; Slika 13).

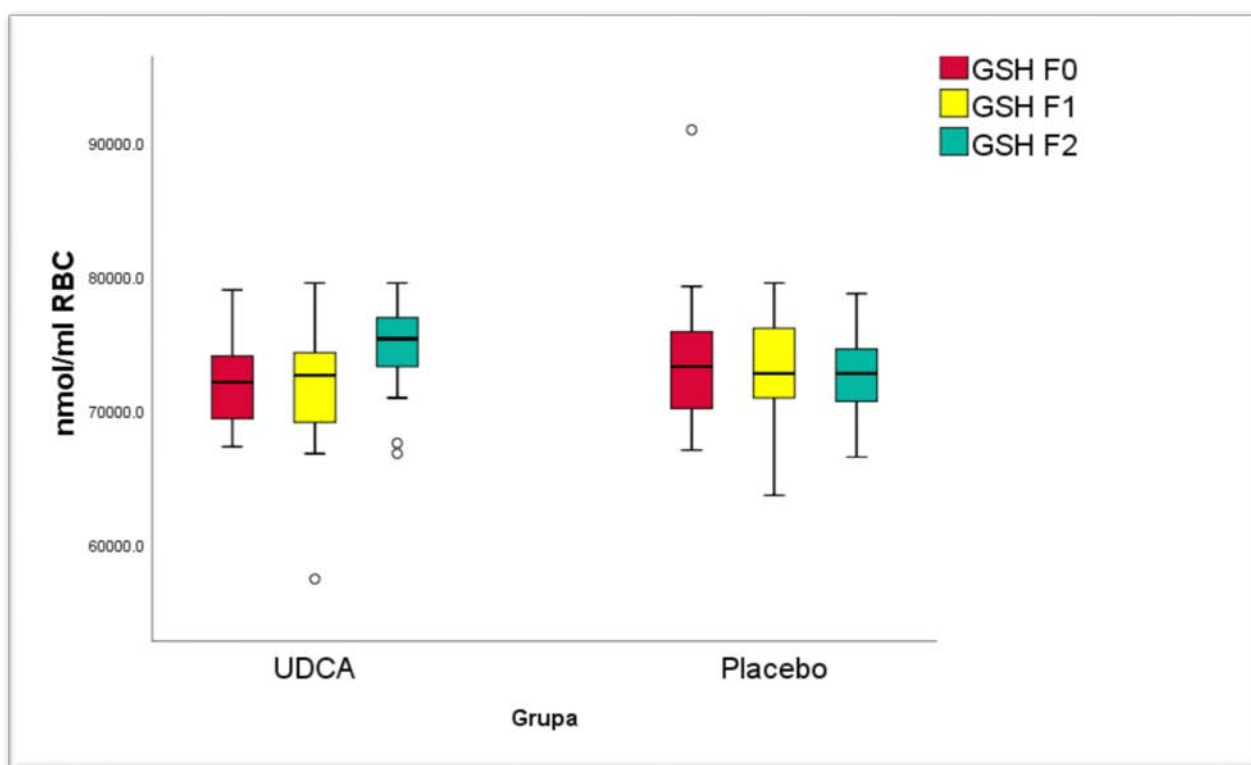
Antioksidativni parametri: glutation (GSH), te enzimi katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD) su mjereni na početku istraživanja, nakon četiri i osam nedelja iz lizata eritrocita.

U Tabeli 14 su prikazani rezultati za redukovani glutation (GSH), gdje je došlo do porasta nivoa GSH u F2 kao i u ΔGSH sa statističkom značajnošću između grupa, utvrđeno t testom za nezavisne uzorke ($p = 0,004$; $p = 0,007$).

Tabela 14. Izmjeren redukovani glutation (GSH) u tri vremenske tačke po grupama

GSH(nmol/ml erit)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	72,135.97	2,953.47	72,118.64	69,389.83	74,067.80	0.151
	Placebo	73,600.00	4,658.71	73,288.14	70,169.49	75,887.01	
F1	UDCA	71,737.48	4,129.24	72,638.42	69,129.94	74,327.68	0.232
	Placebo	72,976.27	3,800.23	72,768.36	70,949.15	76,146.89	
F2	UDCA	75,012.05	3,057.92	75,367.23	73,288.14	76,926.55	0.004
	Placebo	72,664.41	3,040.44	72,768.36	70,689.27	74,587.57	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	2,876.08*	3,691.12	3,248.59	259.89	5,197.74	0.007
	Placebo	-935.59	6,468.11	.00	-5,197.74	3,118.65	

F0-početak istraživanja, F1-nakon 4 nedelje;F2-nakon 8 nedelja; Δ - promjena GSH (razlika u vrijednostima između F2 i F0);UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina;SD-standardna devijacija;Med-medijana; P25- 25% percentil; P75- 75% percentil; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke; *p- statistička značajnost, t test vezanih uzoraka



Slika 14. Dejstvo UDCA/placeba na GSH kroz tri vremenske tačke (F0,F1,F2) po grupama

Kao i za prethodne proksidativne parametre, t test vezanih uzoraka korišćen je za testiranje promjena unutar grupe i opet je utvrđena značajna intragrupna razlika u vrijednostima GSH na kraju studije u odnosu na njen početak ($p<0,001$) u UDCA grupi.

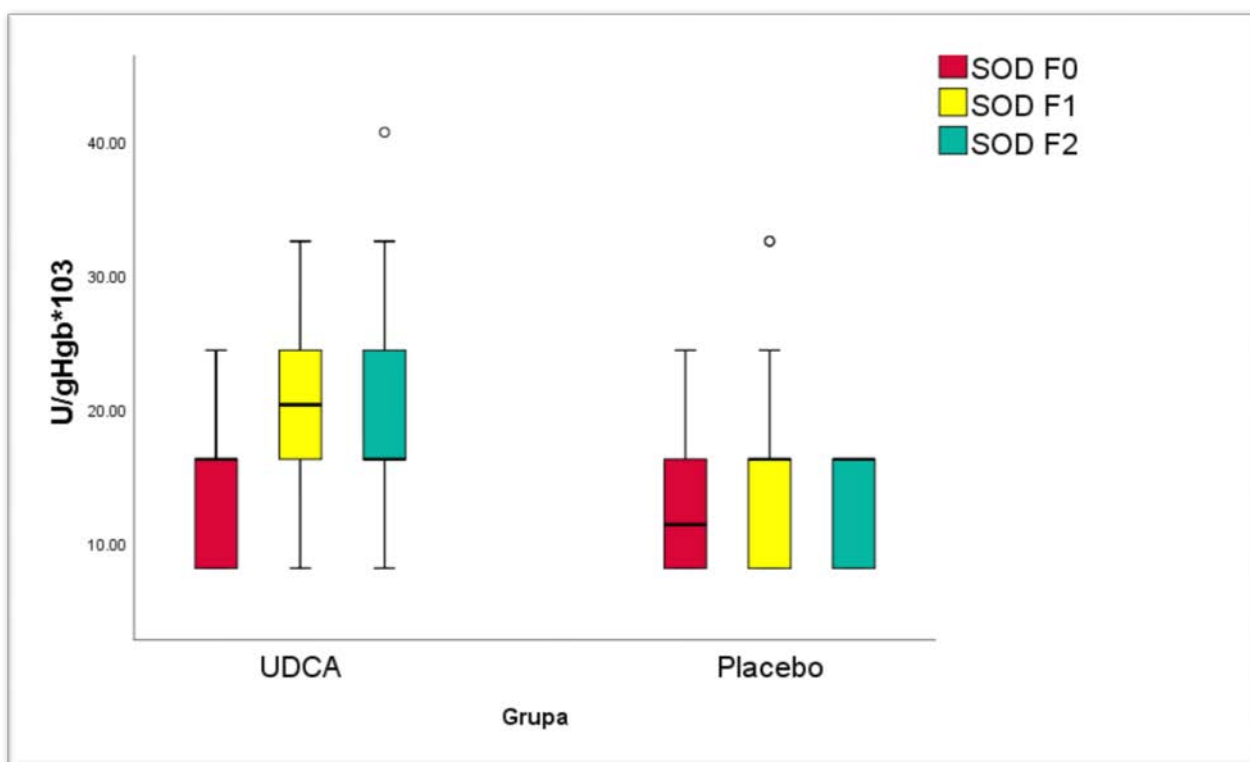
Naime, ovdje je došlo do značajnog povećanja antioksidativnog markera, GSH nakon upotrebe UDCA (Slika 14).

Isto, čak i bolji rezultat je dobijen i za SOD, gdje je utvrđen porast nivoa SOD već nakon četiri nedelje upotrebe UDCA u toj grupi, potom na kraju istraživanja i opet u Δ SOD sa statistički značajnom razlikom između grupa ($p=0,003$; $p<0,001$; $p=0,006$; Tabela 15).

Tabela 15. Vrijednosti superoksid dismutaza (SOD) u tri vremenske tačke po grupama

	SOD	M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	14.52	5.39	16.28	8.14	16.28	0.167
	Placebo	12.67	5.05	11.40	8.14	16.28	
F1	UDCA	20.89	6.65	20.35	16.28	24.42	0.003
	Placebo	15.74	6.74	16.28	8.14	16.28	
F2	UDCA	20.89	7.31	16.28	16.28	24.42	<0.001
	Placebo	13.02	4.06	16.28	8.14	16.28	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	6.38	8.70	8.14*	.00	9.77	0.006
	Placebo	.35	6.16	.00	.00	8.14	

F0-početak istraživanja; F1-nakon 4 nedelje; F2-nakon 8 nedelja; Δ - promjena SOD (razlika u vrijednostima između F2 i F0); UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; Med-medijana; P25- 25% percentil; P75- 75% percentil; p- statistička značajnost, *Mann-Whitney U* test; *p-statistička značajnost, Wilcoxon test



Slika 15. Dejstvo UDCA/placeba na SOD kroz tri vremenske tačke(F0,F1,F2) po grupama

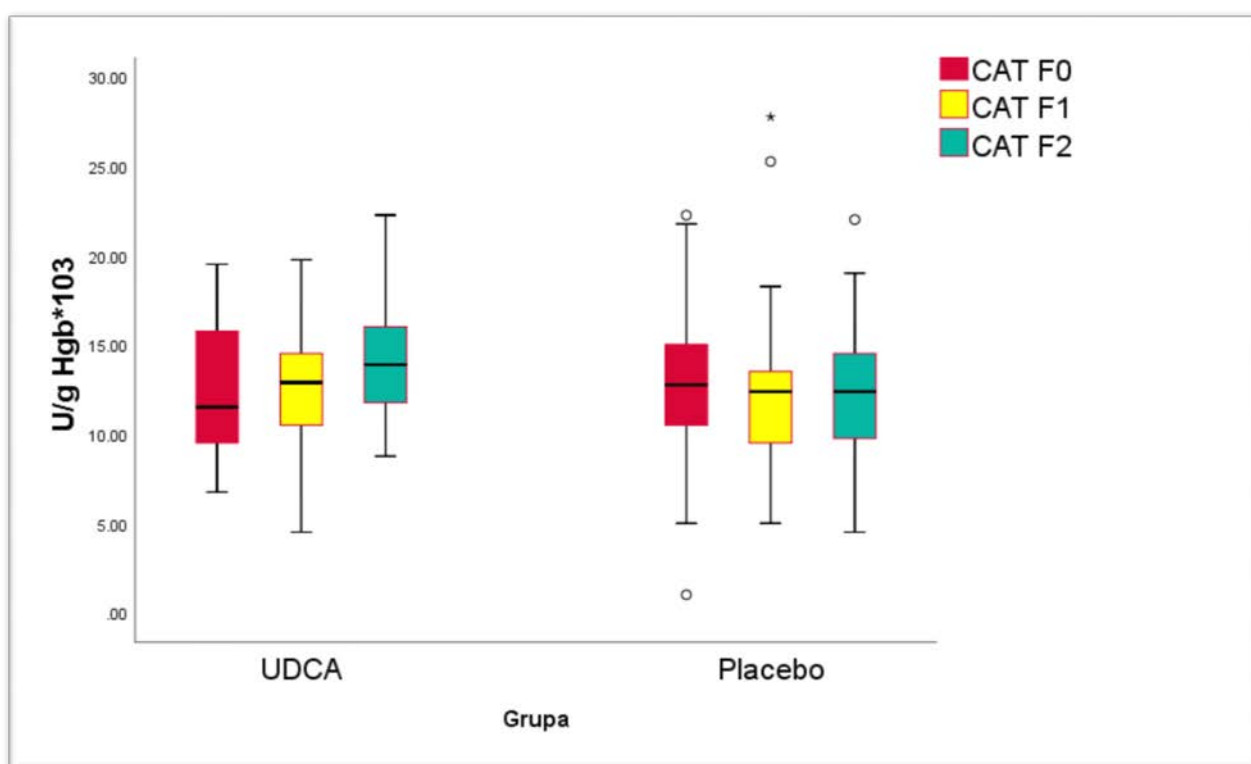
I za SOD, je rađena statistička analiza unutar grupa, a utvrđena je ponovo značajna intragrupna razlika za vrijednosti SOD na kraju studije u odnosu na njen početak ($p < 0,001$). Uočeno je značajno povećanje SOD nakon upotrebe UDCA (Slika 15).

S obzirom na CAT, početne vrijednosti su bile slične u obe grupe dok je utvrđena statistički značajna razlika na kraju istraživanja između obe ispitivane grupe ($p=0,048$). Za Δ CAT, nije primjećena značajnost ($p=0,137$) između grupa. Rezultati su dobijeni Student-ovim t testom za nezavisne uzorke (Tabela 16).

Tabela 16. Vrijednosti katalaze (CAT) u tri vremenske tačke po grupama

	CAT	M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	12.34	3.73	11.50	9.50	15.75	0.751
	Placebo	12.67	4.33	12.75	10.50	15.00	
F1	UDCA	12.90	3.98	12.88	10.50	14.50	0.524
	Placebo	12.14	5.12	12.38	9.50	13.50	
F2	UDCA	14.10	3.25	13.88	11.75	16.00	0.048
	Placebo	12.20	4.00	12.38	9.75	14.50	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	1.76	5.00	2.13	-1.25	4.25	0.137
	Placebo	-.48	6.38	-.50	-3.25	3.25	

F0-početak istraživanja, F1-nakon 4 nedelje;F2-nakon 8 nedelja; Δ - promjena CAT (razlika u vrijednostima između F2 i F0);UDCA-ursodeoksiholna kiselina; M-aritmetička sredina;SD-standardna devijacija;Med-medijana; P25-25% percentil; P75- 75% percentil; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke



Slika 16. Dejstvo UDCA/placeba na CAT kroz tri vremenske tačke (F0,F1,F2) po grupama

Na slici 16 je prikazan enzim antioksidativne zaštite CAT koji je s obzirom na prosječnu vrijednost imao mnogo veći porast tokom svih faza upotrebe UDCA (pogotovo F2), dok je u Placebo grupi čak došlo do smanjenja vrijednosti CAT na kraju istraživanja ($14,1 \pm 3,25$ vs. $12,2 \pm 4$), sa statističkom značajnošću među grupama.

4.4. Parametri inflamacije kod pacijenata sa DMT2

U toku istraživanja analizirani su parametri inflamacije kao što su C-reaktivni protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), mjereni u tačkama F0, F1, F2 i faktor nekroze tumora - alfa (TNF- α) koji je mjeran samo u tačkama F0 i F2 (Tabele 17,18 i 19). Pored ovoga mjerene su i vrijednosti homocisteina, folne kiseline i vitamin D kao prateći parametri koji mogu doprinijeti inflamaciji, te razvoju DMT2 i dijabetesnih komplikacija.

Inflamatorni parametri se nisu značajno razlikovali između grupa. Značajno sniženje je utvrđeno u intragrupnoj promjeni (Δ) poređenjem krajnjih i početnih vrijednosti CRP (1,4 (2,3) vs.1,9 (2,4); $p < 0.013$) u UDCA grupi (Tabela 17).

Tabela 17. Vrijednost CRP mjeran u tri vremenske tačke u obe ispitivane grupe

CRP (mg/l)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	3.56	4.46	1.85	1.00	3.40	0.375
	Placebo	4.22	5.92	2.50	1.60	4.30	
F1	UDCA	4.25	6.60	1.75	.80	4.50	0.599
	Placebo	3.72	5.31	2.30	1.20	3.80	
F2	UDCA	3.28	5.76	1.40	.80	3.10	0.153
	Placebo	3.28	3.62	2.60	1.20	3.70	
Δ (F2-F0)	UDCA	-.28	6.39	-.40*	-.80	-.10	0.446
	Placebo	-.94	4.14	-.15	-.90	.30	

CRP-C reaktivni protein; p- statistička značajnost, *Mann-Whitney U test*; *p-statistička značajnost, *Wilcoxon test*

Ispitanici u UDCA grupi su započeli istraživanje sa manjim vrijednostima IL-6 u odnosu na ispitanike u Placebo grupi. Analizirajući podatke statističkim testovima, značajna razlika je uvrđena samo u F0 (medijana, IQR:2,4 (2,11) vs.3,3 (4,34), $p = 0,024$) po IL-6 između grupa. Dalje nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima IL-6 između grupa niti u jednoj od dvije mjerne tačke (F1, F2). Isto važi i za TNF- α kod kojeg su analizirani podaci na početku i na kraju istraživanja ($p > 0,05$ za sve). Rezultati su prikazani u Tabeli 18 i 19.

Tabela 18. Vrijednosti IL-6 mjerene u tri vremenske tačke u obe ispitivane grupe

IL-6 pg/ml		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	2.83	1.47	2.41	1.50	3.61	0.024
	Placebo	5.04	4.69	3.30	2.33	6.67	
F1	UDCA	3.26	2.23	2.34	1.50	4.35	0.130
	Placebo	5.13	5.27	3.06	1.92	5.80	
F2	UDCA	9.63	31.54	2.05	1.64	3.55	0.094
	Placebo	4.35	4.43	2.74	2.12	3.90	
Δ (F2-F0)	UDCA	6.80	31.76	.00	-1.02	.76	0.579
	Placebo	-.69	3.67	-.49	-1.22	.76	

IL-6: Interleukin-6 ; p- statistička značajnost, *Mann-Whitney U test*

Tabela 19. Vrijednosti TNF- α mjereno na početku (F0) i na kraju istraživanja (F2) u obe ispitivane grupe

TNF- α (pg/ml)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	43.62	9.83	43.57	40.92	46.30	0.201
	Placebo	40.71	7.47	41.53	37.33	46.30	
F2	UDCA	34.86	5.43	33.73	30.76	39.02	0.326
	Placebo	33.59	4.46	33.65	29.70	37.67	
Δ (F2-F0)	UDCA	-8.76	12.35	-9.80	-14.13	-2.96	0.582
	Placebo	-7.12	10.55	-7.87	-14.32	-2.52	

TNF- α : faktor nekroze tumora – alfa; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

Za homocistein, folnu kiselinu i vitamin D je rađena statistička analiza upotrebom t testa za nezavisne uzorke. Bazalne vrijednosti za sva tri parametra su bile identične, a nije dostignuta statistička značajnost ni za jedan parametar nakon četiri (Homocistein: p=0,477; Folna kiselina: p=0,818; Vitamin D: p=0,295) i osam nedelja (Homocistein: p=0,185; Folna kiselina: p=0,496; Vitamin D: p=0,120) kao niti u razlici u svakom ispitivanom parametru (Homocistein: p=0,948; Folna kiselina: p=0,974; Vitamin D: p=0,253) između grupa.

4.5. Parametri endotelne disfunkcije kod pacijenata sa DMT2

Analizom parametara endotelne disfunkcije se ispitivao uticaj UDCA kod pacijenata sa DMT2, a praćene su vrijednosti *von Willebrand*-ovog faktora (vWF), ćelijskih adhezionih

molekula ICAM-1 i VCAM-1, fibrinogena i trombocita. U Tabeli 20 su prvo prikazane vrijednosti vWF, koji je mjeren bazalno i nakon osam nedelja po završetku interventnog perioda. Kod ispitanika iz UDCA grupe u odnosu na ispitanike iz Placebo grupe, nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima vWF između ove dvije ispitivane grupe u obe vremenske tačke, niti u Δ vWF ($p > 0,05$, za sve).

Tabela 20. Vrijednost vWF mjeren na početku (F0) i na kraju istraživanja (F2) u obe ispitivane grupe

vWF(%)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	115.23	37.25	134.00	86.00	150.00	0.832
	Placebo	116.30	39.00	127.50	87.00	150.00	
F2	UDCA	118.97	33.73	134.50	90.00	150.00	0.489
	Placebo	123.93	32.32	137.50	104.00	150.00	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	3.73	21.25	.00	-4.00	10.00	0.490
	Placebo	7.63	27.76	.00	-1.00	13.00	

vWF - von Willebrand-ov faktor; p- statistička značajnost, *Mann-Whitney* U test

U analizi adhezivnih molekula, nije bilo statistički značajnih razlika u bazalnim vrijednostima ICAM-1 i VCAM-1, između UDCA i Placebo grupe, kao niti nakon osam nedelja praćenja ($p > 0,05$; za sve ispitivane parametre). Iako je vidno sniženje nakon perioda praćenja, nije dostignuta statistička značajnost ni u Δ ICAM-1/ Δ VCAM-1 ($p=0,793$; $p=0,117$) između ispitivanih grupa. Ova statistička analiza je dobijena t testom za nezavisne uzorke, a rezultati su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21. Vrijednosti ICAM-1 i VCAM-1 mjereni na početku (F0) i na kraju istraživanja (F2) u obe ispitivane grupe

ICAM-1/VCAM-1							
ng/ml		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	148.21	35.32	147.20	127.90	174.50	0.454
	Placebo	154.69	31.09	148.55	136.30	179.70	
F2	UDCA	78.21	33.87	68.95	56.41	110.00	0.312
	Placebo	88.21	41.64	67.69	56.08	134.30	
Δ ICAM-1(F2-F0)	UDCA	-70.00	51.92	-70.17	-99.30	-36.20	0.793
	Placebo	-66.48	51.55	-61.02	-109.69	-29.30	
F0	UDCA	345.71	117.59	327.65	273.50	416.50	0.175
	Placebo	386.18	110.64	342.40	293.40	455.00	
F2	UDCA	251.33	82.02	261.65	217.30	298.90	0.385
	Placebo	233.81	72.70	265.00	179.80	279.90	
Δ VCAM-1(F2-F0)	UDCA	-94.38	159.28	-63.05	-142.10	8.90	0.117
	Placebo	-152.37	120.65	-158.35	-250.20	-39.40	

ICAM-1: molekul međućelijske adhezije 1 (*Intercellular adhesion molecule 1*); VCAM-1: molekul vaskularne ćelijske adhezije 1, *Vascular cell adhesion molecule 1*; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

Faktori kao što su fibrinogen i trombociti, koji mogu doprinijeti endotelnoj disfunkciji praćeni su u tri vremenske tačke (F0, F1 i F2), što je prikazano u Tabeli 22 i 23. Analiza t testom za nezavisne uzorke je utvrdila da nije bilo statistički značajne razlike u vrijednosti fibrinogena i trombocita između ispitivanih grupa, niti bazalno, niti nakon četiri i osam nedelja ($p > 0,05$ za sve ispitivane parametre). Takođe, u mjerenoj Δ FIB/ Δ Tr, nije dostignuta statistička značajna razlika ($p = 0,710$; $p = 0,215$) između UDCA i Placebo grupe.

Tabela 22. Vrijednost fibrinogena mjeren u tri vremenske tačke po grupama

Fibrinogen (g/l)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	2.78	.59	2.80	2.30	3.10	0.298
	Placebo	2.93	.49	2.95	2.70	3.20	
F1	UDCA	3.13	.79	3.15	2.60	3.50	0.147
	Placebo	2.87	.57	2.75	2.40	3.20	
F2	UDCA	2.95	.66	2.80	2.60	3.20	0.499
	Placebo	3.05	.51	3.05	2.70	3.30	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	.16	.50	.10	-.10	.40	0.710
	Placebo	.12	.40	.10	-.20	.40	

p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

Tabela 23. Trombociti mjereni u tri vremenske tačke po grupama

Trombociti		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	232.20	68.53	223.50	178.00	262.00	0.468
	Placebo	245.03	67.62	232.50	202.00	301.00	
F1	UDCA	244.90	64.74	231.50	193.00	291.00	0.660
	Placebo	252.70	71.60	248.50	214.00	287.00	
F2	UDCA	245.97	68.90	219.00	192.00	285.00	0.187
	Placebo	270.90	75.47	265.50	227.00	313.00	
$\Delta(F2-F0)$	UDCA	13.77	37.45	10.50	-12.00	28.00	0.215
	Placebo	25.87	37.27	24.50	-5.00	45.00	

p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

4.6. Glukoregulacija i stepen insulinske rezistencije kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom

Parametri krakoročne i dugoročne glukoregulacije (glikemija i HbA1c) su prikazani su u Tabeli 24. Prosječna glikemija i HbA1c bili su vrlo slični u obe grupe na početku istraživanja, bez statistički značajne razlike. Nakon upotrebe UDCA/placeba u periodu od četiri nedelje i nakon osam nedelja, nije primijećena statistički značajna razlika, korišćenjem t testa za nezavisne uzorke ($p>0,05$ za sve ispitivane parametre) između grupa. Iako nije dostignut nivo značajnosti, ono što jeste bilo evidentno je značajno veći prosječni pad nivoa glukoze u UDCA grupi na kraju istraživanja (F0: $9,08\pm 3,87$ vs. F2: $8,53\pm 2,72$). Isto se može reći i za HbA1c (F0: $7,23\pm 1,75$ vs. F2: $7,04\pm 1,45$) (Tabela 24)

Tabela 24. Glikemija (mmol/l) i HbA1c(%) kroz tri vremenske tačke po grupama

Glikemija/HbA1c		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	9.08	3.87	8.00	6.55	10.44	0.794
	Placebo	8.85	3.03	8.40	6.50	10.74	
F1	UDCA	8.30	2.38	7.81	6.41	9.85	0.563
	Placebo	8.72	3.10	7.63	6.63	10.10	
F2	UDCA	8.53	2.72	8.00	6.70	9.96	0.489
	Placebo	9.05	3.04	8.35	6.94	10.21	
Δ Glikemija (F2-F0)	UDCA	-.55	2.46	.00	-1.43	.47	0.158
	Placebo	.20	1.51	-.04	-.60	.90	
F0	UDCA	7.23	1.75	6.85	6.00	8.00	0.945
	Placebo	7.26	1.61	7.00	6.10	7.90	
F1	UDCA	7.09	1.58	6.60	5.90	8.00	0.987
	Placebo	7.08	1.59	6.85	6.00	7.60	
F2	UDCA	7.04	1.45	6.55	6.20	7.50	0.622
	Placebo	7.23	1.63	6.85	6.00	8.00	
Δ HbA1c (F2-F0)	UDCA	-.19	.64	-.10	-.50	.30	0.314
	Placebo	-.02	.64	-.10	-.30	.20	

HbA1c-glikozilirani hemoglobin A1c; p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke

Insulin natašte i HOMA IR su mjereni kao i parametri glukoregulacije na početku, nakon četiri i osam nedelja trajanja istraživanja. Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima insulina i HOMA IR niti u jednoj vremenskoj tački između grupa ($p > 0,05$ za oba ispitivana parametra). Takođe, statistička značajnost nije dostignuta ni u razlici ispitivanih parametara, insulina i HOMA IR, između grupa ($p = 0,679$; $p = 0,420$). Rezultati su prikazani u Tabeli 25, a korišćen je neparametrijski *Mann - Whitney U* test.

Tabela 25. Dejestvo UDCA/placebo na stepen insulinske rezistencije (insulin i HOMA IR) u obe grupe

Insulin(μ IU/ml)/HOMA - IR		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	12.69	8.97	11.20	8.20	14.70	0.859
	Placebo	11.58	5.66	10.65	8.50	13.60	
F1	UDCA	12.23	6.62	11.00	7.40	13.90	0.734
	Placebo	10.99	5.05	9.55	7.80	13.50	
F2	UDCA	11.71	6.37	11.05	7.60	14.90	0.877
	Placebo	11.63	5.88	10.40	8.30	13.30	
Δ Insulin	UDCA	-.98	5.03	-.85	-3.20	2.00	0.679
	Placebo	.05	5.52	-.25	-2.50	1.70	
F0	UDCA	4.67	2.99	3.89	2.54	6.95	0.912
	Placebo	4.53	2.48	4.31	2.54	6.52	
F1	UDCA	4.40	2.33	3.74	2.62	5.26	0.779
	Placebo	4.24	2.47	3.55	2.53	5.98	
F2	UDCA	4.19	2.02	3.98	2.63	5.57	0.813
	Placebo	4.82	3.22	4.35	2.30	5.82	
Δ HOMA- IR	UDCA	-.48	2.60	-.36	-1.42	.54	0.420
	Placebo	.29	2.85	-.17	-.67	.60	

HOMA IR-homeostatski model za procjenu insulinske rezistencije; p- statistička značajnost, *Mann-Whitney U* test

4.7. Lipidni status (ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL) kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom

U lipidnom statusu nema značajnih razlika na početku, na kraju istraživanja i promjenama ispitivanih lipidnih frakcija u obe grupe, što je prikazano u Tabeli 26 i 27.

Deskriptivnom statistikom primjetan je pad u vrijednostima svih lipidnih frakcija na kraju istraživanja (F2) u odnosu na bazalne vrijednosti za ukupni kolesterol (F0:5,8 $\pm$ 1,4 vs.F2:5,3 $\pm$ 1,2), trigliceride (F0:2,06(2,04) vs. F2:1,91(1,07)), pa i HDL (F0:1,2 $\pm$ 0,2 vs.1,1 $\pm$ 0,2), te LDL (F0:3,4 $\pm$ 1,3 vs. F2:3,2 $\pm$ 0,9).

Analizom ovih podataka t testom za nezavisne uzorke i *Mann-Whitney U* testom, nije bilo statistički značajne razlike s obzirom na vrijednosti lipidnih frakcija mjerenih u sve tri vremenske tačke između grupa (p>0,05 za sve).

Tabela 26. Frakcije lipidnog statusa - ukupni kolesterol i trigliceridi u tri vremenske tačke po grupama

UH/Tg mmol/l		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	5.75	1.44	5.43	5.15	6.14	0.083 ^a
	Placebo	5.12	1.32	5.06	4.20	5.66	
F1	UDCA	5.18	1.36	5.23	4.34	6.06	0.716 ^a
	Placebo	5.06	1.02	5.13	4.48	5.58	
F2	UDCA	5.27	1.22	5.10	4.60	6.42	0.572 ^a
	Placebo	5.10	1.12	5.17	4.36	5.82	
Δ UH (F2-F0)	UDCA	-.48	1.48	-.16	-.95	.28	0.168 ^a
	Placebo	-.03	1.01	.12	-.45	.46	
F0	UDCA	2.62	2.17	2.06	1.28	3.32	0.751 ^b
	Placebo	2.51	1.66	1.79	1.42	2.98	
F1	UDCA	2.04	.87	2.07	1.20	2.44	0.264 ^b
	Placebo	2.52	1.43	2.24	1.32	3.22	
F2	UDCA	2.06	1.09	1.91	1.26	2.33	0.204 ^b
	Placebo	2.55	1.51	2.19	1.38	3.07	
Δ TG(F2-F0)	UDCA	-.56	1.93	-.06	-.86	.34	0.243 ^b
	Placebo	.04	.75	.09	-.32	.55	

UH -ukupni kolesterol, Tg- trigliceridi; p- statistička značajnost, ^a t test za nezavisne uzorke; ^bMann Whitney U test

Tabela 27. Frakcije lipidnog statusa- HDL i LDL kolesterol u tri vremenske tačke po grupama

HDL/LDL (mmol/l)		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	1.18	.24	1.21	1.00	1.37	0.315
	Placebo	1.12	.23	1.11	.97	1.27	
F1	UDCA	1.12	.18	1.15	.98	1.26	0.159
	Placebo	1.04	.25	1.04	.91	1.18	
F2	UDCA	1.12	.20	1.12	1.00	1.23	0.416
	Placebo	1.07	.29	1.00	.88	1.24	
Δ HDL(F2-F0)	UDCA	-.06	.15	-.03	-.15	.08	0.839
	Placebo	-.05	.20	-.07	-.15	.02	
F0	UDCA	3.39	1.25	3.31	2.69	4.00	0.065
	Placebo	2.77	1.28	3.00	2.00	3.32	
F1	UDCA	3.11	1.20	3.06	2.11	3.73	0.346
	Placebo	2.86	.76	3.00	2.34	3.31	
F2	UDCA	3.20	.94	3.00	2.92	4.00	0.339
	Placebo	2.95	1.04	3.00	2.31	3.72	
Δ LDL(F2-F0)	UDCA	-.19	1.30	.00	-.69	.53	0.225
	Placebo	.18	1.01	.35	-.32	.80	

HDL-lipoprotein velike gustine (HDL, *high density lipoprotein*); LDL- lipoprotein male gustine (LDL, *low density lipoprotein*); p- statistička značajnost, t test za nezavisne uzorke;

4.8. Faktori životnog stila kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom

Tokom studije su praćeni faktori životnog stila/navike ispitanika koji su bili svrstani u UDCA/Placebo grupu, kao što su pušenje, fizička aktivnost i konzumacija alkohola. Iz popunjenog upitnika na početku studije, utvrđeno je da je skoro trostruko više pušača bilo u Placebo grupi, te da je gotovo identično bivših pušača bilo u UDCA grupi sa statistički značajnom razlikom između grupa ($p < 0,007$). Takođe, ispitanici su većinom isticali da upražnjavaju umjerenu fizičku aktivnost i ne konzumiraju alkohol u obe grupe bez statistički značajne razlike. Rezultati su prikazani u Tabeli 28.

Tabela 28. Faktori životnog stila/navike kod ispitanika u obe grupe

		UDCA		Placebo		p
		N=30	%	N=30	%	
Pušački status	da	5	16.7%	14	46.7%	0.007 ^a
	bivši	14	46.7%	4	13.3%	
	ne	11	36.7%	12	40.0%	
	neaktivni	4	13.3%	5	17.2%	
Fizička aktivnost	umjereno	24	80.0%	22	75.9%	0.895 ^b
	f.a.					
	teže f.a.	2	6.7%	2	6.9%	
Alkohol	ne	29	96.7%	29	96.7%	1.000 ^b
	da	1	3.3%	1	3.3%	

UDCA-ursodeoksiholna kiselina ; p- statistička značajnost,^a Pirsonov hi- kvadrat test; ^b Fišerov test tačne vjerovatnoće

4.9. Parametri jetrene funkcije kod ispitanika sa DMT2 liječenih UDCA/placebom

Tokom istraživanja parametri jetrene funkcije (AST,ALT, GGT, AP) su rađeni kao i prethodne biohemijske analize u tri vremenske tačke (F0,F1,F2), radi procjene lične sigurnosti ispitanika.

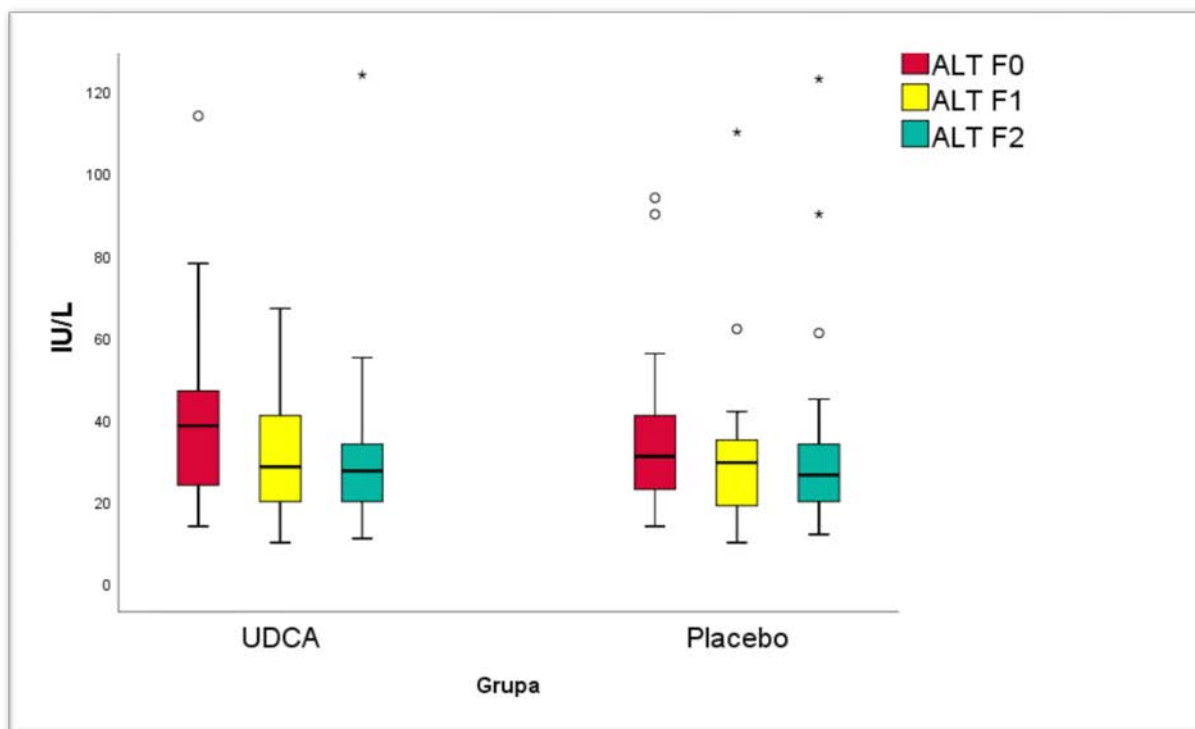
Istovremeno je i potvrđen uticaj UDCA na jetrene parametre, ALT, AP i GGT, dok za vrijednosti AST, nije bilo značajnosti, što je prikazano u Tabeli 29. Na početku istraživanja i nakon četiri nedelje, izmjerene srednje vrijednosti svih jetrenih parametara (medijana i IQR) osim AP su bile približno iste pa nije bilo značajne razlike između grupa, testirano *Mann Whitney U testom* ($p > 0,05$ za sve ispitivane parametre, osim AP). Analizirajući vrijednosti ALT, statistički značajna razlika je utvrđena u Δ ALT(medijana, IQR:-6,0(13) vs.-2,5(12), $p=0,010$) između grupa. Rezultati su isto prikazani u Tabeli 29.

Tabela 29. Vrijednosti AST i ALT mjerene u tri vremenske tačke u obe grupe

AST/ALT		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	28.80	16.42	26.00	21.00	29.00	0.813
	Placebo	28.87	13.77	23.50	21.00	30.00	
F1	UDCA	25.33	9.54	23.00	18.00	30.00	0.824
	Placebo	26.30	12.38	22.00	18.00	29.00	
F2	UDCA	25.97	19.31	22.00	19.00	26.00	0.651
	Placebo	28.40	14.77	21.50	19.00	30.00	
Δ AST(F2-F0)	UDCA	-2.83	6.68	-3.50*	-6.00	.00	0.282
	Placebo	-.47	9.90	.00	-5.00	3.00	
F0	UDCA	39.30	20.96	38.50	24.00	47.00	0.178
	Placebo	34.03	19.16	31.00	23.00	41.00	
F1	UDCA	31.07	15.27	28.50	20.00	41.00	0.679
	Placebo	30.67	18.12	29.50	19.00	35.00	
F2	UDCA	30.97	21.09	27.50	20.00	34.00	0.994
	Placebo	32.47	23.00	26.50	20.00	34.00	
Δ ALT(F2-F0)	UDCA	-8.33	10.77	-6.00*	-14.00	-1.00	0.010
	Placebo	-1.57	11.16	-2.50	-8.00	4.00	

AST- alanin aminotransferaza; ALT- alanin aminotransferaza; p- statistička značajnost, *Mann Whitney U test*

*p statistička značajnost, *Wilcoxon test*



Slika 17. Vrijednosti ALT u tri vremenske tačke po grupama

Naime, došlo je do značajnog pada ALT u UDCA grupi nakon tretmana u odnosu na Placebo grupu u kojoj smo čak imali porast ovog jetrenog parametra. Rezultati su zbog bolje vidljivosti prikazani i grafički (Slika 17).

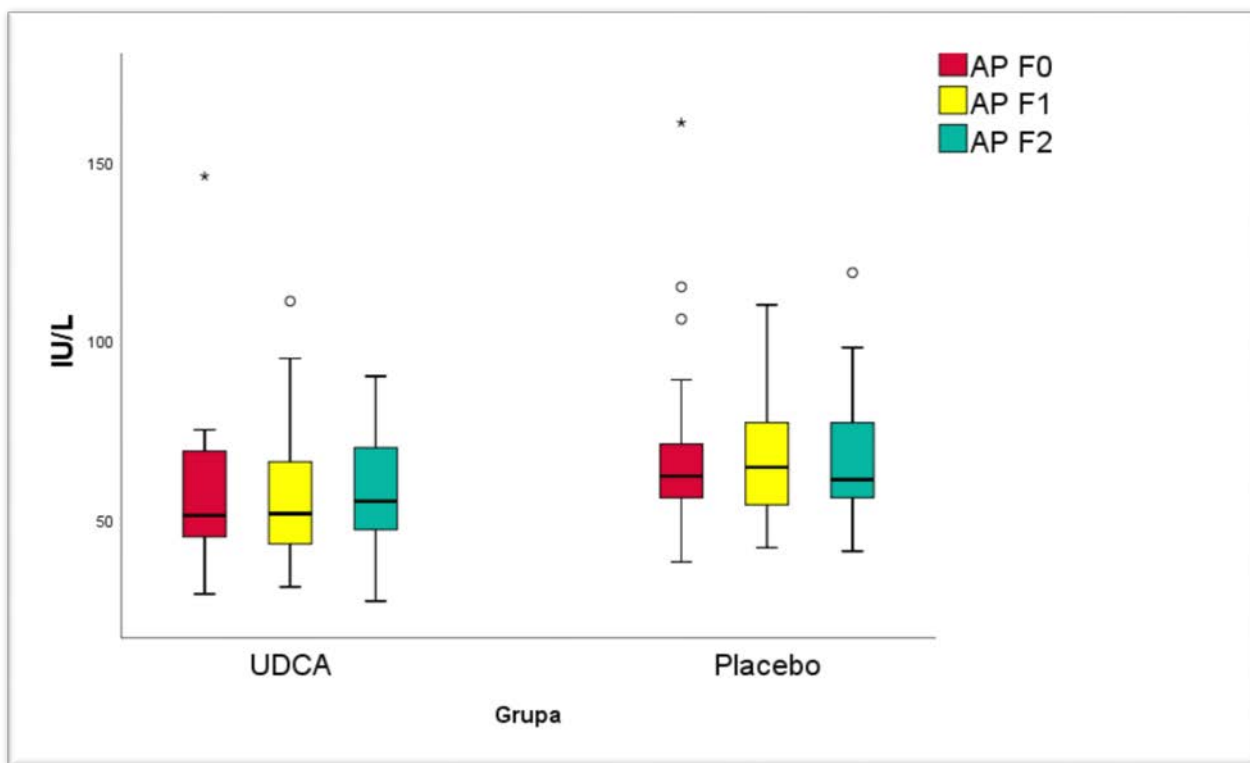
U Tabeli 30 je vidljivo da su ispitanici u UDCA grupi započeli istraživanje sa manjim početnim vrijednostima AP u odnosu na ispitanike u Placebo grupi. Nakon četiri nedelje upotrebe terapije kod ispitanika u UDCA grupi nije došlo do porasta prosječne vrijednosti AP, dok je u Placebo grupi AP značajno porasla.

Tabela 30. Vrijednosti AP i GGT ispitanika mjereni u tri vremenske tačke u obe grupe

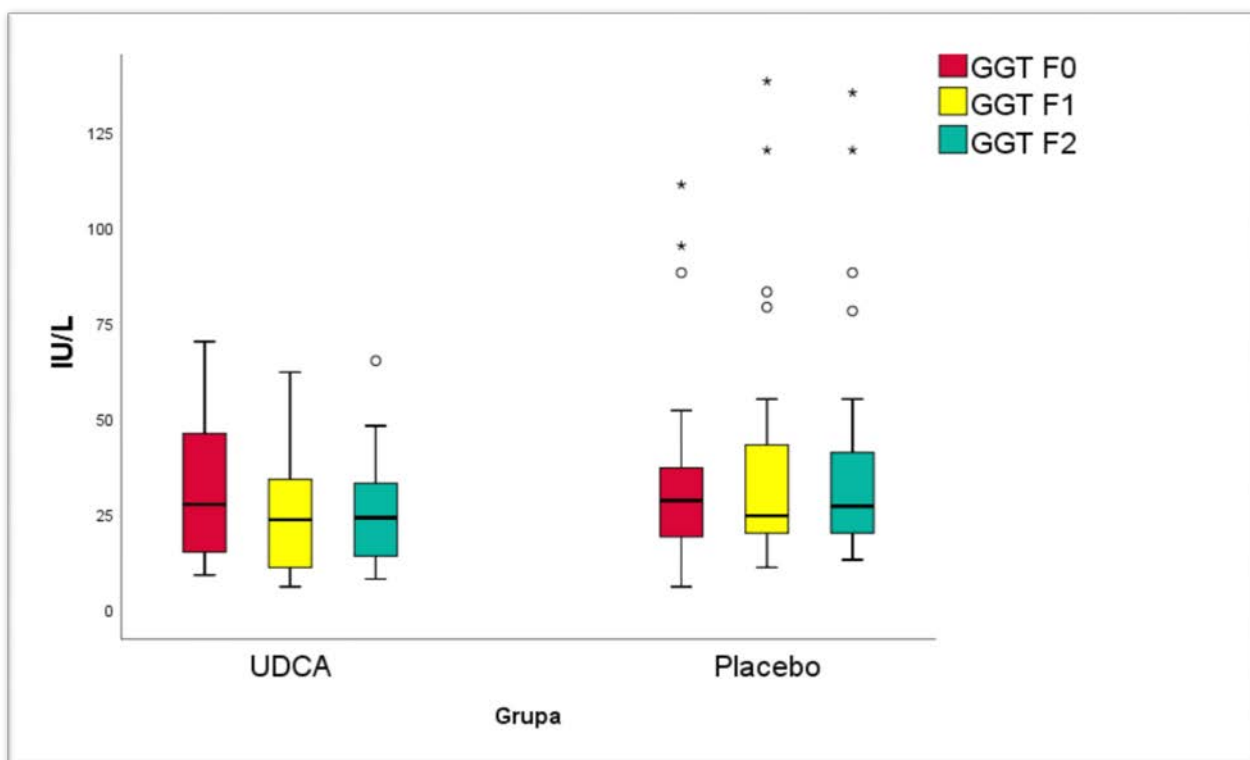
AP/GGT		M	SD	Med	P25	P75	p
F0	UDCA	56.13	21.67	51.00	45.00	69.00	0.020
	Placebo	67.63	24.55	62.00	56.00	71.00	
F1	UDCA	56.57	19.50	51.50	43.00	66.00	0.017
	Placebo	66.93	17.01	64.50	54.00	77.00	
F2	UDCA	58.73	16.64	55.00	47.00	70.00	0.120
	Placebo	66.27	17.59	61.00	56.00	77.00	
Δ AP(F2-F0)	UDCA	2.60	16.61	5.00	-1.00	13.00	0.228
	Placebo	-1.37	23.65	2.50	-12.00	10.00	
F0	UDCA	31.33	18.20	27.50	15.00	46.00	0.773
	Placebo	33.70	24.48	28.50	19.00	37.00	
F1	UDCA	24.37	14.08	23.50	11.00	34.00	0.095
	Placebo	37.30	30.62	24.50	20.00	43.00	
F2	UDCA	23.67	12.57	24.00	14.00	33.00	0.045
	Placebo	37.50	30.18	27.00	20.00	41.00	
Δ GGT(F2-F0)	UDCA	-7.67	11.21	-3.50*	-16.00	.00	<0.001
	Placebo	3.80	12.77	2.00	-3.00	9.00	

AP- alkalna fosfataza; GGT- gamaglutamil transferaza; p- statistička značajnost, *Mann Whitney U test*; *p statistička značajnost, *Wilcoxon test*

Analizirajući vrijednosti AP statističkim testovima, značajna razlika je uvrđena samo u F0 i F1 (medijana, IQR: 51,0(24) vs. 62,0(15), $p=0,020$; medijana, IQR: 51,50(23) vs. 64,50(23), $p=0,017$) po AP između grupa.



Slika 18. Parametar jetrene funkcije - AP u tri vremenske tačke po grupama
Rezultati su zbog bolje vidljivosti prikazani i na Slici 18.



Slika 19. Parametar jetrene funkcije - GGT u tri vremenske tačke po grupama

S obzirom na GGT, statistički značajna razlika je testirana i potvrđena *Mann Whitney U testom* u F2 ($p=0,045$) kao i visoko statistički značajna razlika u promjeni, po GGT između grupa ($p<0,001$). *Wilcoxon* test ekvivalentnih parova korišten je za testiranje promjena unutar grupe, a utvrđene su značajne intragrupne razlike za vrijednosti GGT na kraju studije u odnosu na njen početak u UDCA grupi ($p=0.001$). Svi rezultati za GGT su radi bolje vidljivosti prikazani i na Slici 19.

S obzirom da su kod ispitanika obe grupe, mjereni svi antropometrijski parametri, te SKP i biohemijske analize krvi (glikemija natašte, trigliceridi i HDL), na kraju se prema matematičkoj formuli izračunavao i siMS skor (*Simple Method for Quantifying Metabolic Syndrome*). On predstavlja skor metaboličkog sindroma. siMS skor je određivan u dvije vremenske tačke (F0 i F2).

U Tabeli 31 prikazan je pozitivan uticaj UDCA na metabolički sindrom u komparaciji sa placebo. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ($M \pm SD$) siMS skora su bile slične na početku kao i na kraju istraživanja među grupama. Iako je vidno sniženje vrijednosti skora na kraju u UDCA grupi u odnosu na Placebo grupu nije bilo statistički značajne razlike između grupa. Za ove analizu korišćen je *t test* i doseguta je skoro statistički značajna razlika po siMS skoru u promjeni ($\Delta siMS$) između obe ispitivane grupe ($-0,45 \pm 1,30$ vs. $0,07 \pm 0,65$, $p=0,056$). Ako bi se uzorak povećao za još par slučajeva i ovdje bi se dobila statistička značajnost.

Tabela 31. Vrijednosti siMS skora na početku i na kraju istraživanja u obe ispitivane grupe

siMS skor	Grupa				p
	UDCA		Placebo		
	M	SD	M	SD	
F0	4.39	1.74	4.25	1.45	0.732
F2	3.93	.89	4.31	1.40	0.215
ΔsiMS(F2-F0)	-.45	1.30	.07	.65	0.056

siMS -*Simple Method for Quantifying Metabolic Syndrome*; ; p- statistička značajnost, *t test* za nezavisne uzorke

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji, korišćena je UDCA kao dodatna terapija metforminu, za liječenje DMT2. Iako su ljekoviti efekti žučnih kiselina bili poznati dugi niz godina, veliki interes za ove lijekove pojavio se krajem prošlog vijeka. Međutim, većina eksperimentalnih studija s ovim lijekovima provedena je na životinjama (pacovima). Neke kliničke studije su pokazale korisne efekte žučnih kiselina, posebno UDCA, kod bolesti jetre i drugih gastrointestinalnih poremećaja [143,144,94]. Kako bi se ispitali efekti UDCA na dijabetes melitus kod ljudi provedeno je kliničko ispitivanje na pacijentima sa DMT2.

Za ovu studiju je primijenjena ukupna dnevna oralna doza od 1500 mg UDCA koju su ispitanici uzimali tokom osam nedelja. Osnovni cilj istraživanja je bio da se ispituju antioksidativni i antiinflamatorni efekti UDCA, kao i efekti na moguću disfunkciju endotela kod pacijenata sa DMT2. Istovremeno su se pratili i efekti na glukoregulaciju i druge faktore rizika za oboljevanje od KVB, a koji idu zajedno sa ovom bolešću.

Imajući u vidu stroge kriterijume uključivanja i randomizacije u ovom istraživanju, nisu utvrđene razlike između ispitivanih grupa s obzirom na dob i pol ispitanika, kao niti u njihovom trajanju dijabetesa. Prosječno trajanje DMT2 u ovom istraživanju kod pacijenata koji su uzimali UDCA je bilo 6 godina, a kod onih na placebo 4,5 godine. Iz ovoga se može izvesti zaključak da su ispitanici u našem istraživanju, s obzirom na kraće trajanje svoje bolesti i na godine života, opravdano bili ciljna populacija kako bi se pokušale odgoditi dijabetesne komplikacije.

5.1. Uticaj UDCA na gojaznost kod pacijenata sa DMT2

DMT2 je obično praćen drugim promjenjivim faktorima rizika za KVB, kao što su hipertenzija, dislipidemija i gojaznost. Iz tog razloga je bilo važno pratiti ove faktore i kod oboljelih od DMT2 u ovom istraživanju. S obzirom da se pretpostavlja se da će do 2030.godine približno 50% ljudi biti gojazno, a čak 25% biti morbidno gojazno [22,145], bitno je raditi na prevenciji i liječenju ovog faktora rizika i bolesti. Za gojaznost kao i za DMT2 je poznato da je udružena sa povećanom produkcijom žučnih kiselina, kao i promjenama u transportu istih [146,147].

Ispitanici u ovom istraživanju koji su uzimali UDCA su imali značajno veće smanjenje TM (-1,5kg) poredeći sa ispitanicima koji su uzimali placebo (-0,45kg) nakon završenog istraživanja ($p=0,019$). Naši rezultati su pokazali značajno smanjenje ITM u grupi koja je primala UDCA nakon osam nedelja liječenja, poredeći sa placebo ($p=0.024$). Ovo otkriće je

od velikog značaja budući da je gubitak tjelesne mase vrlo bitan u liječenju oboljelih od DMT2. Shodno tome, prethodna studija na životinjama otkrila je da je UDCA dovela do smanjenja lipogeneze i glukoneogeneze u gojaznih miševa, sugerirajući da UDCA ima važnu ulogu u metabolizmu lipida i glukoze te u kapacitetu skladištenja energije u vezi sa gojaznošću. UDCA je jednako efikasna u smanjenju adipoznosti čitavog tijela [148].

Klinička studija Elhini i saradnika koja je poredila djelovanje empagliflozina (relativno novijeg oralnog antidiijabetika) i UDCA u terapiji pacijenata sa MASLD i DMT2 pronašla je da UDCA signifikantno smanjuje ITM i postiže bolju kontrolu tjelesne mase pacijenata sa DMT2 u odnosu na empagliflozin [149]. Tokom ruske prospektivne kohortne studije kod pacijenata sa DMT2 i MASLD tretiranih sa UDCA, praćeni su i antropometrijski parametri. Još jednom je potvrđen pozitivan efekat UDCA na smanjenje tjelesne mase i obim struka kod pacijenata sa DMT2 u kombinaciji sa MASLD [150].

Dakle, žučne kiseline su prepoznate kao terapijski agensi te se koriste za liječenje i dijabetesa i gojaznosti. Rektalna primjena tauroholata povećala je izlučivanje GLP-1 iz L-ćelija, izlučivanje insulina iz β -ćelija i smanjila serumsku glukozu i unos hrane kod pacijenata sa dijabetesom [151]. Takođe, UDCA je korišćena za liječenje gojaznih pacijenata u malom kohortnom istraživanju morbidne gojaznosti [152]. Lun i saradnici [153] su istakli značaj mehanizma ligandskog vezivanja žučnih kiselina za TGR5 receptore što se može iskoristiti kao cilj u liječenju gojaznosti i bolesti koje su u vezi sa gojaznošću. Slične rezultate je pokazala klinička studija Kars i saradnika da konjugat sa taurinom, TUDCA (1750 mg/dan) poboljšava insulinsku senzitivnost u jetri i mišićima povećanjem transdukcije signala insulina u mišićima kod gojaznih muškaraca i žena. Time je još jedanput ukazano na efektivan farmakološki pristup sa UDCA u liječenju insulinske rezistencije i gojaznosti [154].

5.2. Uticaj UDCA na krvni pritisak kod pacijenata sa DMT2

Povišeni arterijski KP doprinosi povećanoj incidenciji i mikro i makrovaskularnih komplikacija u oboljelih od DMT2. Naime, koegzistencija ova dva faktora rizika dovodi do četiri puta većeg rizika za kardiovaskularne bolesti (KVB) poredeći s normotenzivnim osobama bez dijabetesa [77]. U ovoj studiji UDCA je pokazala pozitivan efekat na krvni pritisak, posebno na DKP. Primjena UDCA u trajanju od osam nedelja značajno je smanjila DKP u bolesnika sa DMT2, poredeći sa placebom ($p < 0,05$). Studija Huang i saradnika [155] je pružila novi uvid o zaštitnom efektu glikoursodeoksiholne kiseline (GUDCA) u

aterosklerozi tako što smanjuje razvoj ateroskleroze te može u budućnosti biti potencijalni terapijski cilj prevencije odnosno liječenja ASKVB.

S obzirom da je hipertenzija čest komorbiditet udružen sa DMT2, ograničeni su dokazi da UDCA ima antihipertenzivan efekat. Al Salami i saradnici su ispitivali uticaj UDCA na hipertenziju kod dijabetesnih miševa koji su bili na ishrani bogatoj mastima i fruktozom (interventna grupa) i niskokaloričnoj ishrani (kontrolna grupa). Oni su poredili efekat UDCA i antihipertenziva, kandasartana. Za razliku od kandasartana koji je pokazao svoje antihipertenzivno djelovanje odmah nakon četiri nedelje, UDCA nije pokazala antihipertenzivni efekat. Ipak nakon 24 nedelje primjena UDCA je značajno umanjila povećanje SKP izazvanog ishranom bogatom mastima i fruktozom [156].

5.3. Uloga UDCA u oksidativnom stresu kod pacijenata sa DMT2

Za UDCA je već poznato da može imati ulogu u oksidativnom stresu, smanjenjem prooksidativnih i povećanjem antioksidativnih parametara uglavnom u pretkliničkim istraživanjima [157,158].

U ovom kliničkom istraživanju, uočeni su antioksidativni efekti UDCA, mjereni praćenjem nivoa ROS i aktivnosti GSH, SOD i CAT kod pacijenata sa DMT2. Rezultati ove studije su pokazali značajno smanjenje svih prooksidativnih parametara: TBARS, NO_2^- i H_2O_2 tokom osmonedeljnog perioda liječenja sa UDCA. Međutim, nivo O_2^- je ostao nepromijenjen, kao jedini prooksidativni parametar na koji UDCA nije djelovala.

Serviddio i saradnici[159] su u svom istraživanju na dvije grupe životinjama kojima su podvezivali žučnu kesu i izazivali holestazu utvrdili da davanje UDCA dovodi do smanjenja slobodnog radikala H_2O_2 u mitohondrijama. Naime, proizvodnja H_2O_2 je potpuno neutralisana u grupi životinja koje su imale dvostruko veće koncentracije ovog markera nego kontrolna grupa. U još jednoj pretkliničkoj studiji *Saad* i saradnika, utvrđeno je da UDCA ne samo da smanjuje stvaranje ROS, nego redukuje i stvaranje RNS [160].

U ovom istraživanju, tokom praćenja vrijednosti parametara oksidativnog stresa, takođe je dokazano da su nivoi antioksidativnih molekula kao što su SOD i GSH značajno povećani u grupi koja je tretirana sa UDCA. Inače najbolji rezultati su dobijeni u segmentu antioksidativne odbrane sa antioksidativnim enzimom SOD kod koje je visoko značajno povećanje dostignuto odmah nakon četiri nedelje terapije sa UDCA. Istovremeno je povećan i nivo CAT. Naime, nakon osam nedelja i završenog istraživanja vrijednosti CAT su bile

mnogo veće sa statistički značajnom razlikom, u komparaciji sa placeboom gdje je nastupilo sniženje istih.

Poznato je da hiperglikemija dovodi do povećanog stvaranja ROS te oksidativnog stresa koji se dešava u mitohondrijama i endoplazmatskom retikulumu. Hiperglikemija sama po sebi je odgovorna i za smanjenje antioksidativnih parametara koji učestvuju u odbrani i štite ćeliju od ROS. UDCA postiže svoje citoprotektivno i antiapoptotičko dejstvo sprečavanjem formiranja ovih po ćeliju štetnih radikala [112,148,161]. Međutim, s obzirom na kratak poluživot ROS i njihovu nestabilnost, mjerenje je i dalje teško i jedna od mnogih dostupnih metoda je lipidna peroksidacija i TBARS, kao korisni markeri rizika i progresije bolesti (dijabetesa, ateroskleroze i hronične inflamacije) [35].

U našem istraživanju produkti tiobarbiturne kiseline su mjereni TBARS metodom da bi se procjenila lipidna peroksidacija, odnosno kako UDCA djeluje na indeks lipidne peroksidacije. S obzirom da je od ranije poznato da je povećana lipidna peroksidacija prisutna u DMT2 i može dalje voditi nastanku dijabetesnih komplikacija, rezultati ovog istraživanja pokazuju da UDCA značajno smanjuje indeks lipidne peroksidacije već nakon četiri nedelje terapije.

Pretklinička studija *Chen* i saradnika pokazala je da upotreba glikoursodeoksiholne kiseline (GUDCA) 100mg/kg/dan može da poboljša oštećenje izazvano oksidativnim stresom kroz povećanje GSH i smanjenje nivoa MDA. Ipak, u ovoj pretkliničkoj studiji GUDCA nije dovela do povećanja drugih antioksidativnih parametara kao što su SOD i CAT [162]. Za razliku od ovih rezultata, u našem kliničkom istraživanju je došlo do povećanja SOD već nakon četiri nedelje upotrebe UDCA.

Od ranije se zna da hidrofobne kiseline (DCA i CDCA) mogu da imaju citotoksično djelovanje dovodeći do apoptoze ćelija i nastanka bolesti [163]. Međutim, UDCA ima povoljan efekat na smanjenje oksidativnog stresa u regulaciji metabolizma glukoze i lipida. Ako se UDCA upotrijebi u kombinaciji sa insulinom u terapiji dijabetesa, može da smanji nivo ROS i redukuje insulinsku rezistenciju koja je izazvana slobodnim masnim kiselinama [164].

5.4. Uloga UDCA u inflamaciji kod pacijenata sa DMT2

Proces inflamacije je odgovoran za nastanak DMT2, zajedno sa oksidativnim stresom. Zapravo, povišena glikemija i oksidativni stres dovode do elevacije citokina koji učestvuju u inflamaciji i dalje nastavljaju kaskadnu reakciju do insulinske rezistencije i DMT2. S druge

strane, sama elevacija citokina (IL-6, TNF- α) koja se ponavlja u kontinuitetu trajanja bolesti, dovodeći do disfunkcije i oštećenja ćelija, utiče i na razvoj dijabetesnih komplikacija [59].

Analiza rezultata u ovom istraživanju je pokazala da UDCA, kao dodatna terapija metforminu, nije uspjela značajno da promijeni vrijednosti markera upale i to IL-6 i TNF- α . Međutim, ono što je dokazano je sniženje CRP u intragrupnoj promjeni (Δ CRP) u grupi koja je koristila UDCA, poredeći krajnje i početne vrijednosti CRP.

S obzirom da je poznato da UDCA ima antiinflamatorne osobine, Mooranian /Mikov i saradnici su ispitivali promjene u profilu žučnih kiselina (UDCA, CDCA i LCA) u pretkliničkoj studiji na miševima, koji su tretirani metforminom. Farmakološka intervencija samo sa metforminom, je pokazala značajne efekte i na profil žučnih kiselina (za koji je poznato da je promijenjen u dijabetesu) i na upalne parametre (IL-6, TNF- α) kod miševa sa predijabetesom u odnosu na zdrave životinje. Naime, profili žučnih kiselina su dodatno izmijenjeni metforminom. To ukazuje na međusobnu interakciju između razvoja i progresije predijabetesa, žučnih kiselina i inflamatornog profila u ovom mišjem modelu [165].

U dodatku markerima inflamacije, tokom ovog istraživanja, su praćene i analizirane i vrijednosti homocisteina kao pokazatelja KV rizika, folna kiselina te vitamin D. Ni za jedan od ovih parametara nije bilo statističke značajnosti, a mjereni su tri puta, bazalno, nakon četiri i nakon osam nedelja ($p > 0,05$). Ranije studije su utvrdile da deficit vitamina D može biti u vezi sa prethodno navedenim inflamatornim markerima kao što su CRP, IL-6 i TNF- α i imati ulogu u nastanku insulinske rezistencije i DMT2 [166-168]. Dakle, vitamin D kao što je već poznato može doprinijeti razvoju DMT2 i zbog toga je bitno da vrijednosti ovog vitamina budu u preporučenim granicama.

Danas se dosta rade pretklinička i klinička ispitivanja s obzirom na inflamatorne bolesti crijeva, a utvrđena je veza žučnih kiselina i crijevnog mikrobioma [169]. Epimeri žučnih kiselina imaju svoju ulogu u zdravlju domaćina. S obzirom da je UDCA 7 β epimer CDCA, ima svoje zaštitne efekte u crijevima, posebno kroz inhibiciju TNF- α kao i oslobađanje IL-6. Rezultati istraživanja *Lajczak* i saradnika su pokazali da administracija UDCA na mišjem modelu prevenira citokinima izazvanu epitelnu apoptozu, poboljšava funkciju crijevne barijere i štiti od inflamacije kolona [170].

5.5. Uloga UDCA u endotelnoj disfunkciji kod pacijenata sa DMT2

Endotel je biološki aktivan unutrašnji sloj krvnog suda koji reguliše vaskularni tonus i strukturu. Ako se to naruši i poremeti ravnoteža između vazokonstriktornih i vazodilatatornih

faktora, koje on stvara dolazi do endotelne disfunkcije. Endotelna disfunkcija je jedan od patogenetskih mehanizama za nastanak vaskularne bolesti u DMT2 [171].

Iz tog razloga, u ovom istraživanju analizirani parametri su bili vWF, ICAM-1, VCAM-1, fibrinogen i trombociti. Niti po jednom ispitivanom parametru koji su mjereni na početku i na kraju istraživanja nije bilo statističke značajnosti između ispitivanih grupa. Iako je vidno sniženje ICAM-1 i VCAM-1, na kraju istraživanja u odnosu na bazalnu vrijednost u UDCA grupi, nije dostignuta statistička značajnost poredeći sa placebo. Sniženje ovih parametara endotelne disfunkcije je evidentirano u obe ispitivane grupe. U UDCA grupi je došlo do sniženja ICAM -1 skoro duplo na kraju istraživanja, dok je nešto manje sniženje bilo u Placebo grupi, bez dostizanja statističke značajnosti. Ovaj nalaz se možda može pripisati dvojnoj terapiji sa metforminom koji takođe utiče na poboljšanje endotelne disfunkcije i redukciju nekoliko biomarkera kao što su ICAM-1 i VCAM-1 što je već ranije poznato [172-174]. *De Jager* i saradnici [175] su u svojim rezultatima iznijeli da se poboljšanjem endotelne disfunkcije sa upotrebom bigvanida, smanjuje KV rizik za 34%.

5.6. Uticaj UDCA na glukoregulaciju i insulinsku rezistenciju u DMT2

Kako je dijabetes neizlječiva bolest, stroga metabolička kontrola (glukoregulacija, lipidi, krvni pritisak) je vrlo bitna stavka u liječenju, ali i prevenciji dijabetesnih komplikacija [20,176]. Naime, dobra glukoregulacija centralni je fokus liječenja dijabetesa i komplikacija koje su u vezi sa dijabetesom. Istraživanja na pacovskom modelu DMT2 pokazala su da bi tauroursodeoksiholna kiselina (TUDCA) mogla da poboljša glikemiju, potencijalno svojim efektima na stres endoplazmatskog retikuluma u metaboličkim tkivima i/ili β ćelijama [177,178]. Takođe još jedna preklinička studija je ispitivala uticaj GUDCA na dijabetesnim miševima koji su tretirani tokom osam nedelja. Nakon upotrebe GUDCA, došlo je do značajnog smanjenja glikemije kod dijabetesnih miševa već nakon dvije nedelje kao i nakon osam nedelja [163]

Prethodne studije su pokazale da UDCA poboljšava metabolizam glukoze odnosno da primjena visokih doza UDCA poboljšava glikemijske parametre, insulinsku senzitivost i surogat markere insulinske rezistencije u bolesnika sa nealkoholnim steatohepatitisom [102,103,149]. Inače TUDCA se dugo koristi u liječenju bolesti jetre, zbog svoje sposobnosti da poveća protok žuči. Meta-analiza koja je uključivala 17 studija fokusiranih samo na glukoregulaciju kod 2950 oboljelih od DMT2 pronašla je sniženje HbA1c za 0,55% kao i glukoze natašte nakon korištenja žučnih derivata [179]. Druga meta-analiza 7 studija je

pokazala u svojim rezultatima da UDCA signifikantno redukuje glikemiju natašte, HbA1c i insulin, ističući tako pozitivan efekt na glukoznu homeostazu [180].

Tokom ovog istraživanja dobijeni su rezultati koji su pokazali vidljivo, ali ne i statistički značajno, smanjenje nivoa glukoze u krvi natašte i HbA1c u grupi koja je primala UDCA. Ostali praćeni parametri u vezi sa glukozom, kao što su insulin i HOMA IR, se nisu značajno promijenili.

U liječenju DMT2 prvi i najčešće korišćeni lijek je metformin koji ima složen mehanizam djelovanja. Privukao je pažnju sniženjem glikemije i povećanjem insulinske osjetljivosti djelovanjem na metabolizam žučnih kiselina. U eksperimentalnoj studiji na pacovskom modelu DMT2 izazvanog streptozocinom, metformin može zaustaviti dobijanje na težini, smanjiti sintezu primarne holne žučne kiseline i ublažiti insulinsku rezistenciju. Takođe metformin može uticati ne samo na sintezu žučnih kiselina, već i na njihovu sekreciju i ponovno skladištenje [181,182]. Postoje dokazi da metformin može poboljšati metabolizam glukoze, regulišući nivo žučnih kiselina u serumu dijabetesnih pacova [7].

Pretklinička studija Wu i saradnika je pokazala da primjena metformina tokom četiri mjeseca povećava koncentraciju žučnih kiselina u plazmi, dok u stolici ona ostaje nepromijenjena kod dijabetesnih pacova [183].

Sun i saradnici [184] su u svojim rezultatima iznijeli da metformin povećava nivo GUDCA regulišući crijevnu mikrobiotu (inhibicija rasta *Bacteroides fragilis*) čime se inhibira FXR signalni put za smanjenje glukoze u krvi i na taj način održava glukozna homeostaza.

Hipoglikemijski mehanizam žučnih kiselina je kompleksan i odvija se kroz različite receptorske puteve, a uglavnom preko FXR i TGR5. Za TGR5 je ranije utvrđeno da imaju protektivnu ulogu u glukoznoj homeostazi. Krajnji ishod je poboljšanje inzulinske rezistencije i smanjenje jetrene glukoneogeneze, te poboljšanje insulinske senzitivnosti u masnom tkivu. Svim ovim efektima, žučne kiseline podstiču sekreciju insulina i dovode do bolje energetske potrošnje. Stoga se može reći da bi supstituciona terapija žučnim kiselinama bila efikasna u poboljšanju DMT2 [182].

Japanska klinička studija Shima i saradnika kod pacijenata sa DMT2 i hroničnom bolešću jetre je utvrdila da tretman UDCA i inhibitorima dipeptil-peptidaze 4 (DPP-4) značajno smanjuje nivo HbA1c kao i da povećava ranu fazu sekrecije GLP-1 [185]. Ovom pilot studijom se poredio efekat UDCA i sitagliptina, a krajnji ishod je bio da kombinovani tretman bolje djeluje nego sama upotreba DPP-4 inhibitora na smanjenje HbA1c.

Skorašnja studija Bai i saradnika [186] je ispitala uticaj UDCA na glikemiju kod pacova kojima je izazvana fibroza jetre, podvezivanjem žučnih kanala. Nakon četiri nedelje

pošto su pacovi razvili fibrozu jetre, došlo je i do poremećene glukoregulacije. UDCA koja im se potom aplicirala je ne samo poboljšala fibrozu jetre već dovela i do sniženja nivoa glikemije i pozitivno djelovala na ekspresiju TGR5 gena u crijevima i kontrolu glukozne homeostaze.

Prethodno navedena kohortna studija ruskih istraživača je pratila 36 pacijenata sa DMT2 i MASLD, koji su uzimali UDCA (15mg/kg/dan) u periodu od 6 mjeseci. Rezultati ove studije su pokazali da uključivanje UDCA u kompleksnu terapiju DMT2 dodatno poboljšava metabolizam ugljikohidrata [150].

5.7. Uticaj UDCA na dislipidemiju u DMT2

Meta-analiza 15 različitih studija na ljudima, uključujući pacijente sa DMT2 i efekte žučnih kiselina i derivata, pokazala je da su se vrijednosti lipida (LDL, HDL, trigliceridi), kao i HbA1c, poboljšale nakon tretmana sa žučnim kiselinama [117]. Nedavna eksperimentalna studija na miševima sa dijabetesom otkrila je biološke efekte liječenja antilipemikom probukolom zajedno sa UDCA (mikrokapsule), što je rezultovalo hipoglikemijskim i antiupalnim efektima kod oboljelih životinja [118]. UDCA, korištena kao dio kombinovane terapije, potvrdila je povoljne terapijske efekte osnovnog lijeka i njegovu bioraspoloživost. Dodatno, druge studije koristile su pristup nano- i mikročesticama za bolje oralno davanje lijeka u kombinaciji sa žučnim kiselinama [119-121].

Studija Elhini i saradnika [149] kod pacijenata sa DMT2 i MASLD je ispitivala efekte empagliflozina i UDCA kao novijih terapijskih mogućnosti u DMT2. Oni su pronašli povoljno djelovanje UDCA jedino na HDL holesterol dok je na druge lipidne parametre, mnogo bolje rezultate pokazao empagliflozin.

Suprotno tome, rezultati naše studije su pokazali da je lipidni status ostao nepromijenjen, zajedno sa upalnim parametrima (IL-6, TNF- α). Moguće objašnjenje za ovaj efekat moglo bi proizaći iz oralne bioraspoloživosti lijeka koja možda neće biti dovoljna da spriječi upalu osim ako se ne kombinuje sa nekim drugim lijekovima. UDCA zajedno sa fibratima lagano smanjuje serumske lipide [179].

5.8. Uticaj UDCA na parametre jetrene funkcije u DMT2

UDCA ima hepatoprotektivni efekat koji je poznat od ranije, dokazano u više kliničkih studija sa visokim nivoem dokaza. UDCA je jedini lijek odobren za liječenje primarnog bilijarnog holangitisa i primarnog sklerozirajućeg holangitisa, sa odgovarajućim

sigurnosnim profilom i minimalnim neželjenim efektima, čak i pri visokim dozama [143,144].

Alonso-Peña i saradnici [187] otkrili su da UDCA normalizuje nivoe transaminaza, te da ovaj lijek takođe može smanjiti oštećenje jetre u pacijenata sa neobjašnjivo povišenim jetrenim enzimima. Studija koju su proveli *Mueller* i saradnici [152] utvrdila je smanjenje serumskih AST, GGT, slobodnih masnih kiselina, ukupnog i LDL holesterola nakon tronedeljne primjene UDCA u gojaznih pacijenata, u dozi od 20 mg/kg/dan. *Robles-Díaz* i saradnici [188] naglasili su ulogu UDCA u liječenju i prevenciji oštećenja jetre izazvanog lijekovima. Pored toga, čini se da je relativno česta empirijska upotreba UDCA, u ovim uslovima oštećenja jetre lijekovima, bezbjedna i da je dovela do smanjenja nivoa bilirubina i transaminaza.

Još jedna studija je potvrdila da UDCA u velikoj mjeri normalizuje jetrene enzime tokom tri mjeseca liječenja. Ista studija je još potvrdila da UDCA poboljšava lipidni profil i masnu jetru nezavisno od gubitka težine i pozitivno djeluje na 10-godišnji rizik od ASKVB kod žena nakon šest mjeseci liječenja [189].

Prema rezultatima studije UDCA tretmana žena sa intrahepatičnom holestazom tokom trudnoće utvrđeno je da UDCA ima potencijal da bude efikasan lijek za poboljšanje glikemije kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom [190]. S obzirom na ograničenu upotrebu lijekova u trudnoći, takođe randomizovano placebo kontrolisano istraživanje u kojem se ispitivao tretman intrahepatičke holestaze nije pokazao nikakav porast neželjenih događaja, uključujući gastrointestinalne simptome, kod trudnica koje su primale UDCA u poređenju sa placeboom [191].

Ruska klinička studija *Rasskazove* i saradnika je ispitivala mogućnost upotrebe UDCA u tretmanu MASLD kod pacijenata koji su imali DMT2. Njihovi rezultati govore u prilog smanjenja jetrenih enzima AST i ALT te smanjenja stepena steatoze jetre kod pacijenata sa DMT2 (jedan od kardiometaboličkih faktora rizika) u kombinaciji sa MASLD [150].

Shodno opisanim efektima UDCA na profil jetrenih enzima, rezultati naše studije potvrđuju značajno smanjenje jetrenih enzima, ALT i GGT u grupi koja je primala UDCA, kada se poredi sa placeboom. Uprkos visokim dozama UDCA, uočeni su minimalni neželjeni efekti i dobra saradljivost ispitanika u ovoj studiji. Isto je potvrđeno i u ranijoj studiji [149] te zaključeno da se UDCA može koristiti zajedno sa empagliflozinom u terapiji pacijenata sa DMT2 i MASLD.

Pored svih navedenih efekata UDCA u ovom istraživanju, kod pacijenata sa DMT2, bitno je i kliničko praćenje metaboličkog statusa korištenjem siMS skora. Upotreba UDCA je pokazala smanjenje vrijednosti siMS skora kroz vrijeme što može doprinijeti sprečavanju razvoja metaboličkog sindroma bar u početku DMT2 ili dok se još nisu razvile dijabetesne komplikacije. DMT2 je među četiri vodeća uzroka smrtnosti u svijetu. Uprkos mnoštvu dostupnih mogućnosti liječenja koja su sažete u poslednjim smjernicama, potrebna su stalno nova istraživanja za novim terapijskim modalitetima kako bi se život oboljelih učinio lakšim.

5.9. Prednosti i ograničenja istraživanja

Ovo istraživanje je utvrdilo korisne efekte UDCA kod pacijenata sa DMT2 kao dodatnog lijeka u kombinaciji sa metforminom. Pored malog broja kliničkih studija sprovedenih na pacijentima, snaga ove studije je doprinos liječenju DMT2, posebno sa drugim pridruženim bolestima koje su prisutne i u trenutku dijagnoze DMT2. Osim toga, dizajn ove studije, kao dvostruko slijepog randomizovanog kliničkog ispitivanja sa paralelnim grupama i jakim kriterijumima za uključivanje/isključivanje, čini dobijene rezultate izvanrednim.

Ovo istraživanje je bilo istraživanje manjeg obima sa ograničenim brojem učesnika tokom pandemije COVID-19 sprovedeno u jednom centru, stvarajući tako ograničenje ovom kliničkom istraživanju. Rezultati koji su dobijeni tokom studije su obećavajući i potrebna su nova i obimnija istraživanja kako bi se istražile sve prednosti UDCA u DMT2 i drugim pratećim metaboličkim poremećajima.

6. ZAKLJUČCI

U kontekstu sprovedenog istraživanja i dobijenih konačnih rezultata mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. Primjena UDCA kod predgojaznih i gojaznih pacijenata sa DMT2 je značajno smanjila tjelesnu masu i ITM, te skoro dostigla značajno smanjenje za obim struka, poredeći sa placebom.
2. Ovim istraživanjem je postignut povoljan efekat na krvni pritisak upotrebom UDCA koja je značajno smanjila DKP kod pacijenata sa DMT2, poredeći sa placebom.
3. UDCA je kod pacijenata sa DMT2 pokazala antioksidativno djelovanje, značajno smanjujući prooksidativne parametre (TBARS, NO_2^- i H_2O_2) tokom osmonedeljnog tretmana.
4. UDCA je očekivano kod pacijenata sa DMT2 pokazala antioksidativno djelovanje, kroz značajno povećanje enzimskih i neenzimskih mehanizama antioksidativne zaštite (SOD, GSH, CAT).
5. Tokom istraživanja UDCA nije pokazala značajan uticaj na inflamaciju i endotelnu disfunkciju kod pacijenata sa DMT2, osim po intragrupnoj promjeni CRP u UDCA grupi. Dodatne analize homocisteina, folne kiseline i vitamina D, nisu pokazale značajne promjene, nakon primjene UDCA.
6. UDCA može da smanji parametre kratkoročne i dugoročne glukoregulaciju (glikemija, HbA1c), bez statističke značajnosti, dok je stepen insulinske rezistencije (insulin i HOMA-IR) u ovom istraživanju, ostao nepromijenjen.
7. S obzirom na lipidni status, UDCA nije uticala značajno niti na jedan lipidni parametar, u prilog smanjenja ovog KV faktora rizika.
8. UDCA je pokazala impresivan uticaj na smanjenje enzima jetre (ALT, AP, GGT) sa statistički značajnom razlikom u odnosu na placebo u ovako kratkom vremenskom periodu od osam nedelja.

7. LITERATURA

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2022;183:109119.
2. World Health Organization. Global report on diabetes. Geneva:World Health Organization; 2016.
3. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. Incidencija i mortalitet od dijabetesa. Registar za dijabetes u Srbiji. Institut za javno zdravlje Srbije ”Dr Milan Jovanović Batut ”; 2016.
4. Šiljak S, Štrkić D, Rodić Vukmir N, Petković V, Danojević D, Todorović M. Zdravstveno stanje stanovništva Republike Srpske u 2022.godini. JZU Institut za javno zdravstvo, 2022. <https://www.phi.rs.ba/pdf/publikacije/Zdravstveno-stanje-stanovnistva-u-2022.pdf>
5. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes – 2020: Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2020;43(Suppl 1):S14-S31.
6. Esser N, Utzschneider KM, Kahn SE. Early beta cell dysfunction vs insulin hypersecretion as the primary event in the pathogenesis of dysglycaemia. *Diabetologia.* 2020;63(10):2007-2021.
7. Zhang Q, Hu N. Effects of metformin on the gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:5003-5014.
8. Ferranini E, Gastaldelli A, Iozzo P. Pathophysiology of prediabetes. *Med Clin North Am.* 2011;95(2):327-339.
9. Derakhshan A, Tohidi M, Arshi B, Khalili D, Azizi F, Hadaegh F. Relationship of hyperinsulinaemia, insulin resistance and β -cell dysfunction with incident diabetes and pre-diabetes: the Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabet Med.* 2015;32(1):24-32.
10. Powers AC, Niswender KD, Evans-Molina C. Diabetes mellitus:Diagnosis, Classification, and Pathophysiology. In *Harrison’s Principles of Internal Medicine.* 20th edition, Editors:Jemison, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Loscalzo. Mc Grow-Hill 2018; p.719.
11. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes* 2017;66(2):241-255.
12. WHO-International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens.* 1999;17:151-183.
13. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the International Diabetes

Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120(16):1640-1645.

14. Elnasri HA, Ahmed AM. Patterns of lipid changes among type 2 diabetes patients in Sudan. *East Mediterr Health J*. 2008;14(2):314-324.

15. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009;5(3):150-159.

16. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2018;41(12):2669-2701.

17. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association. *Circulation* 2016;133(4):e38–e360.

18. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2020: Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes*. 2020; 38(1):10–38.

19. Laiteerapong N, Ham SA, Gao Y, Moffet HH, Liu JY, Huang ES, Karter AJ. The Legacy Effect in Type 2 Diabetes: Impact of Early Glycemic Control on Future Complications (The Diabetes & Aging Study). *Diabetes Care* 2019;42(3):416-426.

20. Khunti K, Seidu S. Therapeutic Inertia and the Legacy of Dysglycemia on the Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Diabetes Care* 2019;42(3):349-351.

21. WHO/UCN/NCD. Diagnosis and management of type 2 diabetes (HEARTS-D). Geneva: World Health Organization; 2020 (WHO/UCN/NCD/20.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

22. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2022: Glycemic Targets. *Diabetes Care* 2022;45(Suppl. 1):S83–S96.

23. Tiwari D, Aw TC. The 2024 American Diabetes Association guidelines on Standards of Medical Care in Diabetes: key takeaways for laboratory. *Explor Endocr Metab Dis*. 2024;1:158-166.

24. Chung WK, Erion K, Florez JC, Hattersley A, Hivert MF, Lee CG, et al. Precision medicine in diabetes: a consensus report from the American Diabetes Association (ADA) and

the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia* 2020; 63(9):1671-1693.

25. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: A patient-centered approach. Update to a Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2015;38(1):140-149.

26. American Diabetes Association Professional Practice Committee. Standards of Care in Diabetes - 2024:Glycemic Goals and Hypoglycemia. *Diabetes Care* 2024;47 (Suppl.1): S111-S125.

27. Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Martínez de Marañón A, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S, et al. Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes:The Battle Continues. *Journal of Clinical Medicine* 2019;8(9):1385.

28. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014; 224:164-175.

29. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.

30. Al-Gadi IS, Haas RH, Falk MJ, Goldstein A, McCormack SE. Endocrine Disorders in Primary Mitochondrial Disease. *J Endoc Soc.* 2018;2(4):361-373.

31. Murphy MP. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum. *Cell Metab.* 2013;18(2):145-146.

32. Zeeshan HM, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):327.

33. Shirakawa J, Togashi Y, Sakamoto E, Kaji M, Tajima K, Orime K, Inoue H, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic betacells. *Diabetes* 2013;62(10):3448-3458.

34. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress - a concise review. *Saudi Pharm J.* 2016;24(5):547-553.

35. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(3):72.

36. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res.* 2012;42(8):741-9.

37. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 2018;54:287-293.
38. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vasc Pharmacol.* 2018;100:1-19.
39. Alkadi H. A review on free radicals and antioxidants. *Infect Disord Drug Target.* 2020;20(1):16–26.
40. Ghasemi-Dehnoo M., Amini-Khoei H., Lorigooini Z., Rafician-Kopaei M. Oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Asian Pac J Trop Med.* 2020;13(10):431-438.
41. Vassalle C, Gaggini M. Type 2 diabetes and oxidative stress and inflammation pathophysiological mechanism and possible therapeutic options. *Antioxidants.* 2022;11(5):953.
42. Pouvreau C, Dayre A, Butkowski EG, de Jong B, Jelinek HF. Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *J Inflamm Res.* 2018;11:61-68.
43. Strackowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Oziomek E, Adamska A, Karolczuk Zarachowicz M, et al. Increased serum interleukin-18 concentration is associated with hypoadiponectinemia in obesity, independently of insulin resistance. *Int J Obes* 2007;31:221-225.
44. Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, Al-Abri S, Al-Lawati J, Al-Maskari M. Analysis of Inflammatory Mediators in Type 2 Diabetes Patients. *Int J Endocrinol* 2013;(2013):1-7.
45. Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, Palma CC, Negrato CA, Gomes MB. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int J Hypertens.* 2013; 2013: 653789.
46. Donath MZ, Shoelsen SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11(2):98-102.
47. Gupta S, Maratha A, Siednienko J, Natarajan A, Gajanayake T, Hoashi S, et al. Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications. *Sci Rep.* 2017;7(1):7633.
48. Araujo LS, da Silva MV, da Silva CA, Borges MdF, Palhares HMdC, Rocha LP, et al. Analysis of serum inflammatory mediators in type 2 diabetic patients and their influence on renal function. *PLoS ONE* 2020;15(3): e0229765.

49. Bashir H, Ahmad Bhat S, Majid S, Hamid R, Koul RK, Rehman MU, et al. Role of inflammatory mediators (TNF- α , IL-6, CRP), biochemical and hematological parameters in type 2 diabetes mellitus patients of Kashmir, India. *Med J Islam Repub Iran*. 2020;34:5.
50. Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SF, Gavin JR, Aguilar, R.B. The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the β -Cell–Centric Classification Schema. *Diabetes Care* 2016;39(2):179-186.
51. Popyhova EB, Stepanova TV, Lagutina DD, Kiriazhi TS, Ivanov AN. The role of diabetes in the onset and development of endothelial dysfunction. *Probl Endokrinol (Mosk)* 2020;66(1):47-55.
52. Paneni, F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino, F. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology clinical consequence, and medical therapy: Part I. *Eur Heart J*. 2013;34(1):2436-2443.
53. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):853-876.
54. Odegaard AO, Jackobs DR, Sanchez OA, Goff DC, Reiners AP, Gross MD. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2016;15(1):1-12.
55. Dhananjayan R, Koundinya KS, Malati T, Kutala VK. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J Clin Biochem*. 2016;31(4):372-379.
56. Qiu S, Cai X, Liu J, Yang B, Zügel M, Steinacker JM, Sun Z, Schumann U. Association between circulating cell adhesion molecules and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2019;287:147-154.
57. Domingueti, CP, Dusse LM, Carvalho MdG, de Sousa P, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes Mellitus: The Linkage Between Oxidative Stress, Inflammation, Hypercoagulability and Vascular Complications. *J Diabetes Complications* 2016;30(4):738-745.
58. Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho MdG, Gomes KB, Fernandes AP. Hypercoagulability and cardiovascular disease in diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2013;415:279-285.
59. Scioli MG, Storti G, D'Amico F, Rodríguez Guzmán R, Centofanti F, Doldo E, et al. Oxidative Stress and New Pathogenetic Mechanisms in Endothelial Dysfunction: Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *J Clin Med*. 2020;9(6):1995.
60. An Y, Xu BT, Wan SR, Ma XM, Long Y, Xu Y, Jiang ZZ. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol*. 2023;22(1):237.

61. DeFronzo RA, Reeves WB, Awad AS. Pathophysiology of diabetic kidney disease: Impact of SGLT2 inhibitors. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(5):319–334.
62. Davies MJ, Aroda VR, Collins BS, Gabbay RA, Green J, Maruthur NM, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2022;45(11):2753-2786.
63. Rahelić D, Altabas V, Bakula M, Balić S, Balint I, Bergman Marković B i sar. Hrvatske smjernice za farmakološko liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Liječ Vjesn* 2016;138(1-2):1-21.
64. Messaoudi SE, Rongen GA, de Boer, Riksen NP. The cardioprotective effects of metformin. *Curr Opin Lipidology* 2011;22(6):445-453.
65. Ma C, Chiua YC, Wu C, Jou I, Tu Y, Hung C, Hsieh P, Tsai K. Homocysteine causes dysfunction of chondrocytes and oxidative stress through repression of SIRT1/AMPK pathway: A possible link between hyperhomocysteinemia and osteoarthritis. *Redox Biol.* 2018; 15:504-512.
66. Malaguarnera G, Gagliano C, Giordano M, Salomone S, Vacante M, Bucolo C, et al. Homocysteine Serum Levels in Diabetic Patients with Non Proliferative, Proliferative and without Retinopathy. *BioMed Res. Int.* 2014; 2014:191497.
67. Mao X, Xing X, Xu R, Gong Q, He Y, Li S et al. 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):1-8.
68. Stanhewicz AE, Kenney WL. Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function. *Nutr Rev.* 2016;75(1):61-70.
69. Stofan M, Guo GL. Bile acids and FXR: novel targets for liver diseases. *Front Med (Lausanne).* 2020;11;7:544.
70. Di Leva FS, Festa C, Renga B, Sepe V, Novellino E, Fiorucci S, et al. Structure-based drug design targeting the cell membrane receptor GPBAR1: exploiting the bile acid scaffold towards selective agonism. *Sci Rep.* 2015;5:16605.
71. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2015;14(1):18-33.
72. Pavlovic N, Stanimirov B, Mikov M. Bile acids as novel pharmacological agents: the interplay between gene polymorphisms, epigenetic factors and drug response. *Curr Pharm Des.* 2017;23(1):187-215.

73. Martinot E, Sedes L, Baptissart M, Lobaccaro JM, Caira F, Beaudoin C, et al. Bile acids and their receptors. *Mol Aspects Med.* 2017;56:2-9.
74. Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2017;152(7):1679-1694.
75. Van Nierop FS, Scheltema MJ, Eggink HM, Pols TW, Sonne DP, Knop FK, et al. Clinical relevance of the bile acid receptor TGR5 in metabolism. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(3):224-233.
76. Prawitt J, Caron S, Staels B. Bile Acid Metabolism and the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 2011;11(3):160-166.
77. Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D, Elinav EJ. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J Exp Med.* 2018;215(2):383-396.
78. Ye D, He J, He X. The role of bile acid receptor TGR5 in regulating inflammatory signalling. *Scand J Immunol.* 2024;99(4):e13361.
79. Campbell MJ, Adorini L. The vitamin D receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2006; 10(5):735-748.
80. Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2014;111(1):23-45.
81. Fenercioglu AK, Gonen MS, Uzun H, Sipahioglu NT, Can G, Tas E, et al. The Association between Serum 25-Hydroxyvitamin D3 Levels and Pro-Inflammatory Markers in New-Onset Type 2 Diabetes Mellitus and Prediabetes. *Biomolecules* 2023;13(12):1778.
82. Xie C, Huang W, Young RL, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK, Wu T. Role of Bile Acids in the Regulation of Food Intake, and Their Dysregulation in Metabolic Disease. *Nutrients* 2021;13(4):1104.
83. Xie AJ, Mai CT, Zhu YZ, Liu XC, Xie Y. Bile Acids as Regulatory Molecules and Potential Targets in Metabolic Diseases. *Life Sci.* 2021;287:120152.
84. Chiang JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr Physiol.* 2013; 3:1191-1212.
85. Andrade LJO, Oliveira GCM, Oliveira LM. The connection between bile acids and type 2 diabetes mellitus. *Arquivos de Gastroenterologia* 2023;60(04):536-542.
86. Van den Bossche L, Hindryckx P, Devisscher L, Devriese S, Van Welden S, Holvoet T, et al. Ursodeoxycholic acid and its taurine- or glycine-conjugated species reduce colitogenic dysbiosis and equally suppress experimental colitis in mice. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(7):e02766-16.

87. Šarenac TM, Mikov M. Bile Acid Synthesis: From Nature to the Chemical Modification and Synthesis and Their Applications as Drugs and Nutrients. *Front Pharmacol.* 2018;9:939-961.
88. Di Ciaula A, Garruti G, Lunardi Baccetto R, Molina-Molina E, Bonfrate L, Wang DQ, Portincasa P. Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol.* 2017;16(Suppl. 1: s3-105.):s4-s14.
89. Ferrell JM, Chiang JYL. Understanding bile acid signaling in diabetes: From pathophysiology to therapeutic targets. *Diabetes Metab J.* 2019;43:257-272.
90. Mantovani A, Dalbeni A, Peserico D, Cattazzo F, Bevilacqua M, Salvagno GL, et al. Plasma Bile Acid Profile in Patients with and without Type 2 Diabetes. *Metabolites.* 2021;11(7):453.
91. Mikov M, Kuhajda K, Kandrač J. Current aspects of pharmacological application of bile acids. *Med Pregl* 2003;LVI(5-6):237-242.
92. Dawson PA. Bile Formation and the Enterohepatic Circulation. In: Said HM, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*: Academic Press; 2018; pp. 931-956.
93. Dawson PA, Karpen SJ. Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res.* 2015;56(6):1085-1099.
94. Keely SJ, Steer CJ, Lajczak-McGinley NK. Ursodeoxycholic acid: a promising therapeutic target for inflammatory bowel diseases? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2019;317(6): G872–G881.
95. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(3):332-338.
96. Sonne DP, van Nierop FS, Kulik W, Soeters MR, Vilsbøll T, Knop FK. Postprandial plasma concentrations of individual bile acids and FGF-19 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(8):3002–3009.
97. Cunningham AL, Stephens JW, Harris DA. Gut microbiota influence in type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Gut Pathog.* 2021;13(1):50.
98. Li XY, Su FF, Jiang C, Zhang W, Wang F, Zhu Q, et al. Efficacy evolution of bearbile and related research on components. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2022;47(18):4846–4853.
99. Hirschfield GM, Dyson JK, Alexander GJM, Chapman MH, Collier J, Hubscher S, et al. The British Society of Gastroenterology/UK-PBC primary biliary cholangitis treatment and management guidelines. *Gut* 2018;67:1568-1594.
100. Ali AH, Tabibian JH, Carey EJ, Lindor KD. Emerging drugs for the treatment of primary biliary cholangitis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2016;21(1):39-56.

101. Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap - bile acids in metabolic control. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(8): 488-498.
102. Ratzliff V, de Ledinghen V, Oberti F, Mathurin P, Wartelle-Bladou C, Renou C, et al. A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2011;54(5):1011-1019.
103. Tsuchida T, Shiraishi M, Ohta T, Sakai K, Ishii S. Ursodeoxycholic acid improves insulin sensitivity and hepatic steatosis by inducing the excretion of hepatic lipids in high-fat diet-fed KK-Ay mice. *Metabolism* 2012;61(7):944-953.
104. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*. 2009;89(1):147-191.
105. Dilger K, Hohenester S, Winkler-Budenhofer U, Bastiaansen BA, Schaap FG, Rust C, Beuers U. Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid profiles and intestinal detoxification machinery in primary biliary cirrhosis and health. *J Hepatol*. 2012;57(1):133-140.
106. Dosa PI, Ward T, Castro RE, Rodrigues CM, Steer CJ. Synthesis and evaluation of water-soluble prodrugs of ursodeoxycholic acid (UDCA), an anti-apoptotic bile acid. *Chem Med Chem* 2013;8:1002-1011.
107. Bellentani S. Immunomodulating and anti-apoptotic action of ursodeoxycholic acid: Where are we and where should we go? *Eur J Gastroenterol Hepatology* 2005;17(2):137-140.
108. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med*. 1998;4(3):165-178.
109. Manley S, Ding W. Role of farnesoid X receptor and bile acids in alcoholic liver disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2015;5(2):158-167.
110. Wang Y, Yu J, Chen B, Jin W, Wang M, Chen X, et al. Bile acids as a key target: traditional Chinese medicine for precision management of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus through the gut microbiota-bile acids axis. *Front Endocrinol*. 2024;15:1481270.
111. Zhu Z, Xu Y, Xia Y, Jia X, Chen Y, Liu Y, et al. Review on chronic metabolic diseases surrounding bile acids and gut microbiota: What we have explored so far. *Life Sci*. 2024;336:122304.
112. Mikov M, Đanić M, Pavlović N, Stanimirov B, Goločorbin-Kon S, Stankov K, et al. Potential applications of gliclazide in treating type 1 diabetes mellitus: formulation with bile acids and probiotics. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2017;43(3):269-280.

113. Cao A, Wang L, Chen X, Guo H, Chu S, Zhang X, Peng W. Ursodeoxycholic Acid Ameliorated Diabetic Nephropathy by Attenuating Hyperglycemia-Mediated Oxidative Stress. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(8):1300-1308.
114. Osorio H, Coronel I, Arellano A, Franco M, Escalante B, Bautista R. Ursodeoxycholic acid decreases sodium-glucose cotransporter (SGLT2) expression and oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pr.* 2012;97(2):276-282.
115. Lukivskaya O, Egorov LR, Naruta A, Tauschel E, Buko VU. The protective effect of ursodeoxycholic acid in alloxan-induced diabetes. *Cell Biochem Funct.* 2004;22:97-103.
116. Lukivskaya O, Patsenker E, Buko V. Protective effect of ursodeoxycholic acid on liver mitochondrial function in rats with alloxan-induced diabetes: link with oxidative stress. *Life Sci.* 2007;80(26):2397-2402.
117. Mooranian A, Raj Wagle S, Kovacevic B, Takechi R, Mamo J, Lam V, et al. Bile acid bio-nanoencapsulation improved drug targeted-delivery and pharmacological effects via cellular flux: 6-months diabetes preclinical study. *Sci Rep.* 2020;10(1):106.
118. Mooranian A, Negrulj R, Chen-Tan N, Fakhoury M, Arfuso F, Jones F, et al. Advanced bile acid-based multi-compartmental microencapsulated pancreatic β -cells integrating a polyelectrolyte-bile acid formulation, for diabetes treatment. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(2):588-595.
119. Mooranian A, Negrulj R, Mathavan S, Martinez J, Sciarretta J, Chen-Tan N, et al. An advanced microencapsulated system: a platform for optimized oral delivery of antidiabetic drug-bile acid formulations. *Pharm Dev Technol.* 2015;20(6):702-709.
120. Mooranian A, Zamani N, Mikov M, Goločorbin-Kon S, Stojanovic G, Arfuso F, et al. Novel nano-encapsulation of probucol in microgels: scanning electron micrograph characterizations, buoyancy profiling, and antioxidant assay analyses. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46(sup3):S741-S747.
121. Mooranian A, Negrulj R, Al-Sallami HS, Fang Z, Mikov M, Golocorbin-Kon S, et al. Probucol release from novel multicompartmental microcapsules for the oral targeted delivery in type 2 diabetes. *AAPS PharmSciTech.* 2015;16(1):45-52.
122. Kusaczuk M. Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells* 2019;8(12):1471.
123. Wewalka M, Patti ME, Barbato C, Houten SM, Goldfine AB. Fasting serum taurine-conjugated bile acids are elevated in type 2 diabetes and do not change with intensification of insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99:1442-1451.

124. Brufau G, Stellaard F, Prado K, Bloks VW, Jonkers E, Boverhof R, et al. Improved glycemic control with colessevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatology* 2010;52(4):1455-1464.
125. Wu Y, Zhou A, Tang L, Lei Y, Tang B, Zhang L. Bile Acids: Key Regulators and Novel Treatment Targets for Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res.* 2020;2020:6138438.
126. European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes. European Association for the Study of Obesity. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): Executive Summary. *Diabetologia* 2024; 67(11):2375-2392.
127. Popović-Pejičić i sar. Savremeni stavovi u liječenju dijabetes melitusa tipa 2. Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, 2021;str.277-294.
128. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of WHO Expert Committee, Technical Report Series No. 854. Geneva (Switzerland): World Health Organization, 1995.
129. Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske. Klinički vodič za primarnu zdravstvenu zaštitu: Gojaznost kod odraslih. Prvo izdanje. Banja Luka: Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske, 2015;5-35.
130. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing The Global Epidemic. Report of WHO Expert Consultation, Technical Report Series No.894. Geneva (Switzerland): World Health Organization, 2000.
131. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran et al. International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension* 2020;75:1334-1357.
132. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412-9.
133. Soldatovic I, Vukovic R, Culafic D, Gajic M, Dimitrijevic-Sreckovic V. siMS Score: Simple Method for Quantifying Metabolic Syndrome. *PLoS ONE* 2016;11(1):e0146143.
134. Mandić-Kovačević N, Kukrić Z, Latinović S, Cvjetković T, Šobot T, Bajić Z, et al. Antioxidative potential of pomegranate peel extract: in vitro and in vivo studies. *Scr Med.* 2023;54(1):9-18.
135. Auclair C, Voisin E. Nitroblue-tetrazolium reduction, in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Greenwald, Ed, pp. 123-132, CRC Press, Boca Raton, 1985.

136. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38(1-2):161-170.
137. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 1982;126(1):131-138.
138. Beutler E, Duron O, Kelly B. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882-888.
139. Beutler E. *Manual of biochemical Methods*. Grune and Stratton, New York 1982.
140. Beutler E. *Red Cell Metabolism a Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, Philadelphia 1984.
141. Rankovic M, Draginic N, Jeremic J, Samanovic AM, Stojkov S, Mitrovic S, et al. Protective Role of Vitamin B1 in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats: Focus on Hemodynamic, Redox, and Apoptotic Markers in Heart. *Front Physiol* 2021;12:690619.
142. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejovic I, et al. Cardiovascular Properties of the Androgen-Induced PCOS Model in Rats: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2021:8862878.
143. Carey E, Ali A, Lindor K. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2015;386:1565-1575.
144. Saffioti F, Gurusamy K, Hawkins N, Toon C, Tsochatzis E, Davidson B, et al. Pharmacological interventions for primary sclerosing cholangitis: an attempted network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3(3):CD011343.
145. Ward ZJ, Bleich SN, Cradock AL, Barrett JL, Giles CM, Flax C, Long MW, Gortmaker SL. Projected U.S. State-Level Prevalence of Adult Obesity and Severe Obesity. *N Engl J Med*. 2019;381(25):2440-2450.
146. Haeusler RA, Camastra S, Nannipieri M, Astiarraga B, Castro-Perez J, Xie D, et al. Increased Bile Acid Synthesis and Impaired Bile Acid Transport in Human Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(5):1935-1944.
147. Steiner C, Othman A, Saely CH, Rein P, Drexel H, von Eckardstein A, Rentsch KM. Bile acid metabolites in serum: intraindividual variation and associations with coronary heart disease, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *PLoS One*. 2011;6(11):e25006.
148. Chen YS, Liu HM, Lee TY. Ursodeoxycholic acid regulates hepatic energy homeostasis and white adipose tissue macrophages polarization in leptin-deficiency obese mice. *Cells* 2019;8(3):253.

149. Elhini SH, Wahsh EA, Elberry AA, El Ameen NF, Abdelfadil Saedii A, Refaie SM, Elsayed AA, Rabea HM. The Impact of an SGLT2 Inhibitor versus Ursodeoxycholic Acid on Liver Steatosis in Diabetic Patients. *Pharmaceuticals*. 2022;15(12):1516.
150. Rasskazova MA, Vorobyev SV, Butova HN. Possibilities for the use of ursodeoxycholic acid in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease. *Ter Arkh*. 2023;95(4):316-321.
151. Adrian TE, Gariballa S, Parekh KA, Thomas SA, Saadi H, Al Kaabi J, Nagelkerke N, Gedulin B, Young AA. Rectal taurocholate increases L cell and insulin secretion, and decreases blood glucose and food intake in obese type 2 diabetic volunteers. *Diabetologia*. 2012;55:2343–2347.
152. Mueller M, Thorell A, Claudel T, Jha P, Koefeler H, Lackner C, et al. Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity. *J Hepatol*. 2015;62(6):1398-404.
153. Lun W, Yan Q, Guo X, Zhou M, Bai Y, He J, et al. Mechanism of action of the bile acid receptor TGR5 in obesity. *Acta Pharm Sin B*. 2024;14(2):468-491.
154. Kars M, Yang L, Gregor MF, Mohammed BS, Pietka TA, Finck BN, et al. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes*. 2010;59(8):1899-1905.
155. Huang K, Liu C, Peng M, Su Q, Liu R, Guo Z, et al. Glycoursodeoxycholic Acid Ameliorates Atherosclerosis and Alters Gut Microbiota in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(7):e019820.
156. Al-Salami H, Mamo JC, Mooranian A, Negrulj R, Lam V, Elahy M, Takechi R. Long-Term Supplementation of Microencapsulated ursodeoxycholic Acid Prevents Hypertension in a Mouse Model of Insulin Resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017;125(1):28-32.
157. Milivojac T, Grabež M, Krivokuća A, Maličević U, Gajić Bojić M, Đukanović Đ, et al. Ursodeoxycholic and chenodeoxycholic bile acids attenuate systemic and liver inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Mol Cell Biochem*. 2025;480(1):563-576.
158. Mihajlović D, Đukanović Đ, Gajić Bojić M, Jovičić S, Mandić-Kovačević N, Uletilović S, et al. Cardioprotective Effects of Ursodeoxycholic Acid in Isoprenaline-Induced Myocardial Injury in Rats. *Biomolecules*. 2024; 14(10):1214.
159. Serviddio G, Pereda J, Pallardó FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, et al. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 2004;39(3):711–720.

160. Saad RA, Mahmoud YI. Ursodeoxycholic acid alleviates cholestasis-induced histophysiological alterations in the male reproductive system of bile duct-ligated rats. *Reprod Toxicol.* 2014;50:87–97.
161. Amaral JD, Viana RJS, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CMP. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 2009;50(9):1721-1734.
162. Chen B, Bai Y, Tong F, Yan J, Zhang R, Zhong Y, et al. Glycoursodeoxycholic acid regulates bile acids level and alters gut microbiota and glycolipid metabolism to attenuate diabetes. *Gut Microbes* 2023;15(1): 2192155.
163. Ignacio Barrasa J, Olmo N, Perez-Ramos P, SantiagoGomez A, Lecona E, et al. Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis* 2011; 16:1054–1067.
164. Yokoyama K, Tatsumi Y, Hayashi K, Goto H, Ishikawa T, Wakusawa S. Effects of Ursodeoxycholic Acid and Insulin on Palmitate-Induced ROS Production and Down Regulation of PI3K/Akt Signaling Activity. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(11):2001-2004.
165. Mooranian A, Chester J, Johnston E, Ionescu CM, Walker D, Jones M, et al. Reduced Cytokine Tumour Necrosis Factor by Pharmacological Intervention in a Preclinical Study. *Biomolecules* 2022;12(7):877.
166. Zhang M, Gao Y, Tian L, Zheng, L, Wang X, Liu W, Zhang Y, Huang G. Association of serum 25-hydroxyvitamin D3 with adipokines and inflammatory marker in persons with prediabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2017; 468:152-158.
167. Hoseini R, Rahim HA, Ahmed JK. Concurrent alteration in inflammatory biomarker gene expression and oxidative stress: How aerobic training and vitamin D improve T2DM. *BMC Complement Med Ther.* 2022; 22(1):165.
168. Lips P, Eekhoff M, Van Schoor N, Oosterwerff M, Jongh R, Krul-Poel Y, Simsek S. Vitamin D and type 2 diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;173:280-285.
169. Malicevic U, Rai V, Skrbic R, Agrawal DK. NLRP3 Inflammasome and Gut Dysbiosis Linking Diabetes Mellitus and Inflammatory Bowel Disease. *Arch Intern Med Res.* 2024;7(3):200-218.
170. Lajczak-McGinley NK, Porru E, Fallon CM, Jessica Smyth J, Curley C, McCarron PA, et al. The secondary bile acids, ursodeoxycholic acid and lithocholic acid, protect against intestinal inflammation by inhibition of epithelial apoptosis. *Physiol Rep.* 2020; 8:e14456.
171. Shi Y, Vanhoutte P.M. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes.* 2017;9:434-449.

172. Salvatore T, Pafundi PC, Galiero R, Rinaldi L, Caturano A, Vetrano E, et al. Can Metformin Exert as an Active Drug on Endothelial Dysfunction in Diabetic Subjects? *Biomedicines* 2021; 9(1):3.
173. Nafisa A, Gray SG, Cao Y, Wang T, Xu S, Wattoo FH, et al. Endothelial function and dysfunction: Impact of metformin. *Pharmacol Ther.* 2018;192:150-162.
174. Ding H, Ye K, Triggle CR. Impact of currently used anti-diabetic drugs on myoendothelial communication. *Curr Opin Pharmacol.* 2019; 45:1-7.
175. De Jager J, Kooy A, Schalkwijk C, Van Der Kolk J, Leher P, Bets D, et al. Long-term effects of metformin on endothelial function in type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *J Intern Med.* 2014;275:59-70.
176. Hansen M, Sonne DP, Mikkelsen KH, Gluud LL, Vilsbøll T, Knop FK. Bile acid sequestrants for glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials. *J Diabetes Complications* 2017;31(5):918-927.
177. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313(5790):1137-1140.
178. Lee YY, Hong SH, Lee YJ, Chung SS, Jung HS, Park SG, Park KS. Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397(4):735-739.
179. Mazidi M, Rezaie P, Karimi E, Kengne AP. The effects of bile acid sequestrants on lipid profile and blood glucose concentrations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol.* 2017;227:850–857.
180. Sanchez-Garcia A, Sahebkar A, Simental-Mendia M, Simental-Mendia LE. Effect of ursodeoxycholic acid on glycemic markers: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacol Res.* 2018;135:144-149.
181. Mengsiyu L, Xiaowen H, Yeqiu X, Xiaolin H, Chunxue Z, Shuguang P. A Possible Mechanism of Metformin in Improving Insulin Resistance in Diabetic Rat Models. *Int J Endocrinol* 2019; 2019:1-9.
182. Hou Y, Zhai X, Wang X, Wu Y, Wang H, Qin Y et al. Research progress on the relationship between bile acid metabolism and type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2023;15:235 .
183. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med.* 2017;23(7):850-858.

184. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*. 2018;24(12):1919-1929.
185. Shima KR, Ota T, Kato K, Takeshita Y, Misu H, Kaneko Sh, et al. Ursodeoxychoic acid potentiates dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by enhancing glucagonlike peptide-1 secretion in patients with type 2 diabetes and chronic liver disease: a pilot randomized controlled and add-on study. *BMJ Open Diab Res Care* 2018;6:e000469.
186. Bai XP, Du WJ, Xing HB, Yang GH, Bai R. Influence of ursodeoxycholic acid on blood glucose, insulin and GLP-1 in rats with liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Diabetol Metab Syndr*. 2023;15:18.
187. Alonso-Peña M, Espinosa-Escudero R, Herraiz E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, et al. Beneficial effect of ursodeoxycholic acid in patients with acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2) deficiency–associated hypertransaminasemia. *Hepatology* 2022;76:1259-1274.
188. Robles-Díaz M, Nežić L, Vujic-Aleksic V, Björnsson ES. Role of ursodeoxycholic acid in treating and preventing idiosyncratic drug-induced liver injury. A systematic review. *Frontiers in Pharmacology* 2021;12:744488.
189. Nadinskaia M, Maevskaya M, Ivashkin V, Kodzoeva K, Pirogova I, Chesnokov E, et al. Ursodeoxycholic acid as a means of preventing atherosclerosis, steatosis and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2021;27(10):959-975.
190. Manna L, Papacleovoulou G, Flaviani F, Pataia V, Qadri A, Abu-Hayyeh S, et al. Ursodeoxycholic acid improves fetoplacental and offspring metabolic outcomes in hypercholanemic pregnancy. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-14.
191. Chappell LC, Bell JL, Smith A, Linsell L, Juszczak E, Dixon PH, et al. Ursodeoxycholic acid versus placebo in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy (PITCHES): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2019;394(10201):849-860.

LISTA SKRAĆENICA

DM -	Dijabetes melitus
IDF -	Međunarodna federacija za dijabetes (<i>International Diabetes Federation</i>)
DMT2 -	Dijabetes melitus tipa 2
ITM -	Indeks tjelesne mase
SZO -	Svjetska zdravstvena organizacija
KVB -	Kardiovaskularne bolesti
HDL -	Lipoprotein velike gustine, (<i>High-Density Lipoprotein</i>)
LDL -	Lipoprotein male gustine, (<i>Low-Density Lipoprotein</i>)
HbA1c -	Glikozilirani hemoglobin
ADA -	Američko udruženje za dijabetes (<i>American Diabetes Association</i>)
ROS -	Reaktivne vrste kiseonika (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
ATP -	Adenozin trifosfat
*OH -	Hidroksilni radikal
O ₂ ⁻ -	Superoksidni anjonski radikal
ONOO ⁻ -	Peroksinitrit
H ₂ O ₂ -	Vodonik peroksid
RNS -	Reaktivne vrste azota (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
MDA -	Malonildialdehid
GSH -	Redukovani glutation (<i>Reduced glutathione</i>)
SOD -	Superoksid dismutaza
AGEs -	Krajnji produkti glikacije (<i>Advanced Glycation End Products</i>)
CAT -	Katalaza
TNF- α -	Faktor tumorske nekroze alfa
IL-1 -	Interleukin 1
IL-6 -	Interleukin 6
hsCRP -	Visoko senzitivni C-reaktivni protein (<i>high sensitive CRP</i>)
NO -	Azot oksid
PAI-1 -	Inhibitor aktivatora plazminogena
CAMs -	Ćelijski adhezioni molekuli (<i>Cellular Adhesion Molecules</i>)
ICAM-1 -	Molekul međućelijske adhezije 1 (<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>)
VCAM-1 -	Molekul vaskularne ćelijske adhezije 1 (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
vWF -	Von Willebrand-ov faktor

MNT -	Medicinska nutritivna terapija
FXR -	Farnezoid X receptor
GPBAR1 (TGR5) -	G-protein vezani receptor žučnih kiselina ili Takeda G-protein vezani receptor 5
GLP-1 -	Glukagonu-sličan peptid -1(<i>Glucagon-like peptide-1</i>)
CYP7A1 -	Holesterol 7 α -hidroksilaza
CYP27A1 -	Sterol 27-hidroksilaza
CYP46A1 -	24-hidroksilaza
CA -	Holna kiselina (<i>Cholic acid</i>)
CDCA -	Henodeoksiholna kiselina (<i>Chenodeoxycholic acid</i>)
DCA -	Deoksiholna kiselina (<i>Deoxycholic acid</i>)
LCA -	Litoholna kiselina (<i>Lithocholic acid</i>)
ASBT -	Apikalni natrijum-zavisni transporter žučnih kiselina (<i>Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter</i>)
UDCA -	Ursodeoksiholna kiselina (<i>Ursodeoxycholic acid</i>)
TCDCA -	Taurohenodeoksiholna kiselina, konjugovana CDCA sa taurinom
FDA -	Agencija za hranu i lijekove američke vlade (<i>Food and Drug Administration</i>)
ER -	Endoplazmatski retikulum
NAFLD -	Nealkoholna masna bolest jetre (<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>)
MASLD -	Metabolička disfunkcija udružena sa masnom bolesti jetre (<i>Metabolic disfunction-associated steatotic liver disease</i>)
MASH -	Metabolička disfunkcija udružena sa steatohepatitisom (<i>Metabolic disfunction-associated steatohepatitis</i>)
HOMA-IR -	Homeostatski model procjene insulinske rezistencije
ITM -	Indeks tjelesne mase
APM -	Ambulante porodične medicine
JZU DZ BL -	Javno zdravstvena ustanova Dom zdravlja Banja Luka
EASD -	Evropska asocijacije za proučavanje dijabetesa (<i>European Association for the Study of Diabetes</i>)
F0 -	Početak istraživanja
F1 -	Nakon 4 nedelje od početka istraživanja
F2 -	Nakon 8 nedelja od početka istraživanja ili kraj istraživanja

TV -	Tjelesna visina
TM -	Tjelesna masa
OS -	Obim struka
KP -	Krvni pritisak
AHA -	Američko udruženje za srce (<i>American Heart Association</i>)
AST -	Aspartat aminotransferaza
ALT -	Alanin aminotransferaza
GGT -	Gama-glutamil transferaza
AP -	Alkalna fosfataza
IFCC -	Međunarodna federacija za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu (<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>)
siMS skor -	Skor za kvantifikaciju metaboličkog sindroma (<i>Simple Method for Quantifying Metabolic Syndrome</i>)
UH -	Ukupni kolesterol
Tg -	Trigliceridi
SKP -	Sistolni krvni pritisak
TBARS -	Produkti reakcije tiobarbiturne kiseline (<i>Thiobarbituric acid reactive species</i>)
M -	Aritmetička sredina (<i>Mean</i>)
SD -	Standardna devijacija
Med -	Medijana (<i>Median</i>)
GCP -	Dobra klinička praksa (<i>Good Clinical practice</i>)

PRILOZI

PRILOG 1.

SERTIFIKAT ANALIZE UDCA 250 mg film obložene tablete

SERTIFIKAT ANALIZE PLACEBO UDCA 250 mg film obložene tablete

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Analysis no. : 40000044598
Product code and name : 1003510 BILEXIN 250mg film-coated tablets
Packaging size : 50 film-coated tablets
Control no. : 4291 0421
Batch no. : 4291
Manufacturing Date : 04.21.
Expiry Date : 04.23.
Release Date : 10.05.2021

Quality Requirements	Specification		Results	
Appearance	Conforms		Conforms	
Oblong, white to almost white, biconvex film coated tablets.				
Average mass of filmcoated tablets (AMT)	455.98	503.98	482.00	mg
Individual masses of film coated tablets	458	506	476 - 487	mg
Not less than 18/20 AMT +5%			4.65	min.
Disintegration	NMT 30		Positive	
Identification	Positive			
HPLC				
Related substances	Conforms		Conforms	
Impurity A	-	NMT 1.0	<0.05	%
Individual unknown impurities	-	NMT 0.2	<0.05	%
Total impurities	-	NMT 1.5	<0.05	%
Assay/ film coats tablet	Conforms		Conforms	
Ursodeoxycholic Acid	237.50	262.50	246.64	mg
Uniformity of dosage units	-	NMT 15	1.2	
(Mass variation)	NLT 85	-	96 - 98	%
Dissolution				
Not less than 80 % (Q) of the labelled amount of				
Ursodeoxycholic acid / film coated tablet for 45 minutes	-	NMT 1000	0	/g
Total aerobic microbial count	-	NMT 100	0	/g
Total combined yeasts and moulds count	Absent		Absent	
Escherichia coli / 1 g				

Complies with specification of Marketing Authorisation

Date:

10.05.2021

Qualified Person
 Mr sc. Lejla Zilic, pharm spec.



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product code and name : PLACEBO BILEXIN 250 mg film coated tablets
Batch Number : 0083
Manufacturing Date : 04 21
Expiry Date : 04 23

Quality Requirements	Specification	Results
Appearance Oblong, white to almost white, biconvex film coated tablets.	Conforms	Conforms
Microbiological Condition Total aerobic microbial count Total combined yeasts and moulds count Escherichia coli /1 g	NMT 10^3 /g NMT 10^2 /g Absence	0 /g 0 /g Absence

Date: 07.05.2021.

Head of Analytical Department
 Nina Avdic, M.Sc. Chem.



PRILOG 2.

UPITNIK (UDCADMT2) ZA ISPITANIKE

DATUM početka studije:

I Socio-demografski podaci

1. IME I PREZIME PACIJENTA:

2. Godina rođenja/starost:

3. Pol: M Ž

4. Bračni status:

a) oženjen/udata

c) razveden/a

b) neoženjen/neudata

d) udovac/a

5. Zanimanje:

a) zaposlen/a

c) domaćica

b) nezaposlen/a

d) penzioner

6. Obrazovanje

a) Osnovna škola i manje

c) Viša škola

b) Srednja škola

d) Fakultet

II Medicinska istorija pacijenta

7. TRAJANJE DIJABETESA TIP 2 (u godinama):

8. HRONIČNE BOLESTI: _____

9. KONTINUIRANA TERAPIJA

9a. Da li koristite biljne preparate? DA NE

Ako DA, koje: _____

10. FAKTORI RIZIKA

10a. Pušački status:

PUŠAČ (Koliko godina: _____)

Koliko dnevno konzumirate cigareta: ____

NEPUŠAČ

BIVŠI PUŠAČ _____(koliko dugo)

10b. Fizička aktivnost:

- 1) Neaktivni
- 2) Umjereno fiz.aktivni (brza šetnja, teži kućni poslovi)
- 3) Teže fiz.aktivni (trčanje, teški fiz.poslovi)

10c. Da li konzumirate alkohol? DA NE

Ako DA, koliko alkohola dnevno uzimate: _____

ANTROPOMETRIJA I MJERENJE KRVNOG PRITISKA (ispunjava ISTRAŽIVAČ!!!)

10d. Antropometrijski parametri:

F0-početak studije: TV_____ TT_____

ITM (Indeks tjelesne mase)_____,

Obim struka (OS)_____

10e. Krvni pritisak

F0-početak studije: TA:_____

F2-kraj studije: TV_____ TT_____

ITM (Indeks tjelesne mase)_____,

Obim struka (OS)_____

DATUM kraja studije:

F2-kraj studije: TA:_____

PRILOG 3.

DNEVNIK ZA PACIJENTE

Dan uzimanja UDCA	Doza	Vrijeme	Drugi lijekovi	NAPOMENA
1. dan	prva			
	druga			
	treća			
2. dan	prvi			
	drugi			
	treći			

....

27. dan	prvi			
	drugi			
	treći			
28. dan	prvi			
	drugi			
	treći			

PRILOG 4.

OBRADA ERITROCITA

EPRUVETE SA PLAVIM ČEPOM (CITRATNI PUFER).

OBRADA ERITROCITA PRIJE ZAMRZAVANJA

POSTUPAK ZA STABILIZACIJU ERITROCITA (opis)

1. Dobijena krv je centrifugirana 10 min. na 3000 obrtaja kako bi se izdvojila plazma. 1ml dobijene plazme se sipao u ependorifice i obilježavao. Ostatak plazme je aspiriran u sudoperi kako bi ostali samo eritrociti.
2. Dodavan je fiziološki rastvor u epruvete sa eritrocitima, tako da odnos bude 1/3 eritrocita i 2/3 fiziološkog rastvora. Miješanje na vortex-u, te centrifugiranje 10 minuta na 3000 obrtaja, što je ponovljeno 3 puta.
3. Nakon 3 centrifugiranja se aspirirao supernatant.
Poslije se ispipetirao 1ml eritrocita, sipao u novu staklenu epruvetu uz dodavanje 3ml hladne destilovane vode.
Tako lizirani eritrociti su se stavljali 30 minuta u ledeno kupatilo (epuruvete su bile postavljene na led, koji se nalazi u zamrzivaču u plastičnoj posudi), te su se okretale 3 puta u toku 30 minuta ili na svakih 10 minuta.
4. Nakon ledenog kupatila, uzorak se dijelio u 3 porcije; Po 1ml u 3 ependorifice.

PRILOG 5.

Research Article - Beneficial Effects of Ursodeoxycholic Acid on Metabolic Parameters and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study

Research Article

Beneficial Effects of Ursodeoxycholic Acid on Metabolic Parameters and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study

Biljana Lakić ^{1,2}, **Ranko Škrbić** ^{3,4}, **Snežana Uletilović**⁵, **Nebojša Mandić-Kovačević**⁶, **Milkica Grabež** ⁷, **Mirna Popović Šarić**², **Miloš P. Stojiljković** ^{3,4}, **Ivan Soldatović**⁸, **Zorica Janjetović** ⁹, **Anastasija Stokanović**², **Nataša Stojaković**³, and **Momir Mikov**⁴

¹Department of Family Medicine, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

²Primary Health Care Centre, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

³Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

⁴Centre for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

⁵Department of Medical Biochemistry and Chemistry, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

⁶Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

⁷Department of Hygiene, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

⁸Institute of Medical Statistics and Informatics, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

⁹Department of Dermatology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

Correspondence should be addressed to Biljana Lakić; biljana.lakic@med.unibl.org

Received 10 November 2023; Revised 15 January 2024; Accepted 15 February 2024; Published 29 February 2024

Academic Editor: Ilaria Campesi

Copyright © 2024 Biljana Lakić et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Oxidative stress and inflammation are closely related pathophysiological processes, both occurring in type 2 diabetes mellitus (T2DM). In addition to the standard treatment of T2DM, a potential strategy has been focused on the use of bile acids (BAs) as an additional treatment. Ursodeoxycholic acid (UDCA), as the first BA used in humans, improves glucose and lipid metabolism and attenuates oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the potential metabolic, anti-inflammatory, and antioxidative effects of UDCA in patients with T2DM. **Methods.** This prospective, double-blind, placebo-controlled clinical study included 60 patients with T2DM, randomly allocated to receive UDCA or placebo. Subjects were treated with 500 mg tablets of UDCA or placebo administered three times per day (total dose of 1500 mg/day) for eight weeks. Two study visits, at the beginning (F0) and at the end (F1) of the study, included the interview, anthropometric and clinical measurements, and biochemical analyses. **Results.** UDCA treatment showed a significant reduction in body mass index ($p = 0.024$) and in diastolic blood pressure ($p = 0.033$), compared to placebo. In addition, there was a statistically significant difference in waist circumference in the UDCA group before and after treatment ($p < 0.05$). Although no statistical significance was observed at the two-month follow-up assessment, an average decrease in glucose levels in the UDCA group was observed. After two months of the intervention period, a significant decrease in the activity of liver enzymes was noticed. Furthermore, a significant reduction in prooxidative parameters (TBARS, NO_2^- , H_2O_2) and significant elevation in antioxidative parameters such as SOD and GSH were found ($p < 0.001$). **Conclusions.** The eight-week UDCA administration showed beneficial effects on metabolic and oxidative stress parameters in patients with T2DM. Thus, UDCA could attenuate the progression and complications of diabetes and should be considered as an adjuvant to other diabetes treatment modalities. This trial is registered with NCT05416580.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a common chronic disease causing life-threatening, disabling, and costly complications and reducing life expectancy. Worldwide in 2021, 537 million (10.5%) adults aged 20 to 79 already had diabetes, according to the data from the International Diabetes Federation (IDF). It is estimated that by 2045, 783 million (12.2%) adults will live with diabetes [1]. Among the ten countries with the highest prevalence of diabetes in the European region in 2015, Bosnia and Herzegovina was ranked fourth (9.9%), after Serbia in third (10.3%) while Turkey and Albania were in first and second place, respectively [2, 3].

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is the most prevalent form, contributing to 90–95% of all cases of diabetes [4]. It is a metabolic disorder manifested by hyperglycemia and insulin resistance (IR); allegedly, oxidative stress is the primary cause of this disorder [5]. T2DM is associated with multiple cardiovascular disease (CVD) risk factors, such as dyslipidemia, hypertension, inflammation, obesity, and oxidative stress. Oxidative stress is defined as an imbalance between the production and elimination of reactive oxygen species (ROS) in favor of their increased production [6, 7]. Mitochondria and endoplasmic reticulum are the main sources of ROS [8–10].

Oxidative stress and inflammation are closely related pathophysiological processes; one can be easily induced by the other and both are found in many pathological conditions [11] including T2DM. The current focus is on specific mechanism-based strategies that can target both oxidative stress and inflammatory pathways to improve the outcome of the disease burden [12].

A potential strategy in the therapy of T2DM is the use of bile acids (BAs), especially as an adjuvant therapy to other diabetes treatment modalities. Data from preclinical and clinical trials have shown that BAs, by activating the Takeda G-protein receptor 5 (TGR5) on enteroendocrine L cells, increase both the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and insulin secretion, and postprandial glycemia, which might have a beneficial effect in T2DM [13–16]. A growing body of evidence supports the role of BA as mediators of the metabolic beneficial effects of therapies in the treatment of metabolic disorders [17].

Ursodeoxycholic acid (UDCA) is a hydrophilic BA that was discovered in bear bile, while in humans, it is only found as a secondary BA (1%–3% of total endogenous human BA production). UDCA is used as a medicine in the prevention of chronic hepatitis or cholestasis and in treatment of the primary biliary cholangitis [18, 19]. Studies show that UDCA improves the metabolism of glucose [20–22], alters the composition of BAs [23], attenuates oxidative stress or immune response, and exhibits anti-inflammatory properties that are especially important in metabolic diseases related to obesity [24–27]. UDCA is an important regulator of lipid metabolism; it also improves liver and adipose tissue mitochondrial function. Treatment of obese mice with UDCA resulted in reduced body weight and improved glucose metabolism. Such a drastic effect may be a consequence not only of the conversion of white to brown adipose tissue

but also of the effects on other important metabolic organs, including the liver, which directly regulates lipid metabolism and nutrient absorption [28].

In accordance with previous observations, the aim of this study was to evaluate the potential metabolic, anti-inflammatory, and antioxidative effects of UDCA in patients with T2DM who are being treated with metformin but failed to achieve the target level of glycosylated hemoglobin (HbA1c) <7%. In these patients, the effects of UDCA on metabolic parameters and oxidative stress in T2DM patients were assessed.

2. Patients and Methods

2.1. Study Design and Study Population. This was a prospective, double-blind, placebo-controlled clinical study with T2DM patients. It included 60 participants, 30 on UDCA and 30 on placebo treatment. The study was conducted at the Department of Family Medicine, Primary Health Care Centre (PHCC) in the city of Banja Luka, The Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. Using the database of family medicine teams, eligible patients with T2DM were invited to participate in the study. The study protocol with detailed information was presented to 98 selected patients, and 60 of them who met the inclusion criteria for the study had to sign the informed consent prior to the study enrolment (Figure 1). The inclusion criteria were as follows: age 40 to 65 years, T2DM verified at least one year prior to the study enrolment, patients with an incomplete biochemical response and the value of HbA1c $\geq 6.5\%$, monotherapy (on metformin, maximally tolerated dose, up to 2000 mg/day), and body mass index (BMI) corresponding to overweight or obese ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$). The exclusion criteria were as follows: patients with insulin or other injection treatment of T2DM, systemic administration of glucocorticoids (i.e., 10 days continuously) within 12 weeks prior to the study enrolment or other prior and concomitant immunosuppressant therapy, a medical history of cholecystitis, psychiatric disorders, acute and chronic kidney or liver disease, history of hypersensitivity to UDCA, malignancies, current pregnancy, and compliance issues.

2.2. Intervention. The study subjects were randomized 1:1 to 8 weeks of treatment with 500 mg tablets (2 tablets of 250 mg) of UDCA or a visually identical placebo administered three times per day (total dose of 1500 mg/day). The study drug was obtained from the pharmaceutical and chemical industry “Bosnalijek” (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina). Randomization was performed using a unique scheme unknown to the investigator with 30 patients in the treatment group and 30 in the placebo group. The participants, as well as the investigators, were blinded to the study drug allocation. During the follow-up, patients were asked to register in the treatment log diary any reaction or possible adverse effects. Each report was registered, and causality was analyzed. To ensure compliance for all study participants, a weekly follow-up through telephone conversation was performed.

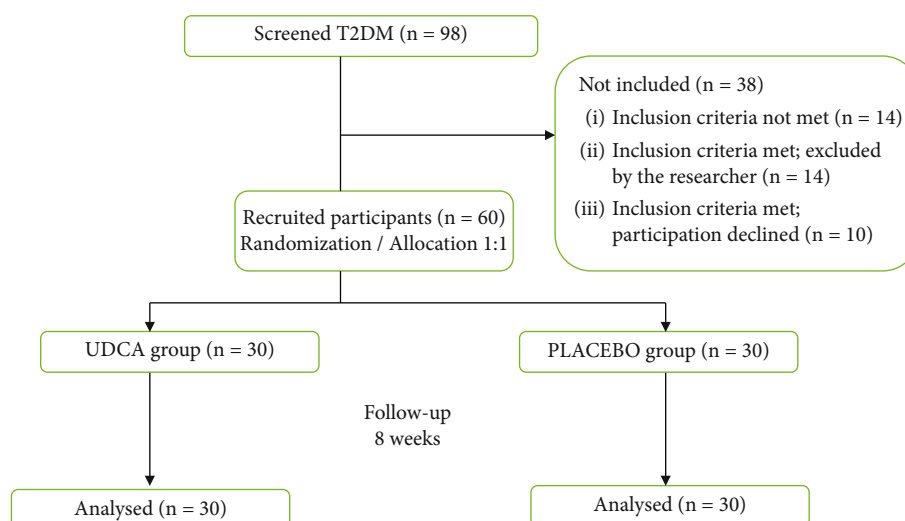


FIGURE 1: The study flowchart.

2.3. Anthropometric and Clinical Measurements. Study visits were carried out at the beginning (F0) and at the end of the study (F1). At F0 and F1 visits, the interview (UDCA T2DM questionnaire) and physical examination (anthropometric and clinical measurements) were performed. The socio-demographic and clinical data such as age, gender, education and occupation, duration of T2DM, related comorbidities, and current medication were collected. Anthropometric and clinical measurements included body weight and height, waist circumference (WC), body mass index (BMI), and blood pressure—systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP). Anthropometric measurements were performed in accordance with the Clinical Guideline for Primary Health Care [29]. BMI was calculated as weight (kg) divided by the square of height (m^2) according to the WHO [30]. Blood pressure was assessed using a mercury sphygmomanometer GIMA, CE 0476, Italia. The cuff was placed around the left upper arm 2.5 cm above the cubital fossa. A participant was in a sitting position resting for 10 minutes prior to blood pressure measurement; three measurements were obtained five minutes apart. The mean value expressed in millimeters of mercury (mmHg) was used for the data collection in accordance with the American Heart Association recommendations [31].

2.4. Biochemical Analyses. Blood samples were taken at the beginning of the study (F0) and following the intervention period (F1). Serum levels of fasting glucose, lipid profile: triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and, from whole blood, glycosylated hemoglobin (HbA1c) were measured utilizing the enzymatic methods on the biochemical analyzer (Abbott Alinity c). Liver enzymes including aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transferase (GGT), and alkaline phosphatase (ALP) were measured to assess liver function, and the IFCC method of reference (with pyridoxal phosphate) was used. LDL-C was calculated by the Friedewald formula: $LDL - C (mg/dL) = TC -$

$(HDL - C + TG/5)$. Others, such as fasting insulin and proinflammatory markers: C reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6), were determined using the automatic immunoassay analyzer (ECLIA Cobas PRO). Reference values for IL-6 were 0-7.7 pg/mL. Insulin resistance was defined as the value of the insulin resistance index, HOMA IR ≥ 2.5 ; it was determined using the Homeostatic Model Assessment (HOMA IR) index, calculated as the product of fasting insulin (mIU/L) and fasting glucose levels (mmol/L) divided by 22.5 [32].

2.5. Oxidative Stress Parameters. We exploited plasma and erythrocyte lysate to establish the values of oxidative stress parameters. The following methods are used: nitro blue tetrazolium (NTB) reduction [33] for measuring superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), Pick and Keisari [34] for measuring hydrogen peroxide (H_2O_2), a green method [35] for measuring nitrite (NO_2^-), TBA [36] for measuring the index of lipid peroxidation and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and Beutler's methods [37–41] for measuring catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH).

2.6. Statistical Analyses. Results are presented as count (%), means $\pm$ standard deviation, or median (interquartile range) depending on data type and distribution. Groups are compared using parametric (*t*-test) and nonparametric (chi-square, Mann-Whitney *U* test, and Wilcoxon's signed-rank test) tests. All *p* values less than 0.05 were considered significant. All data were analyzed using SPSS 29.0 (IBM Corp. Released 2023. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) or R 3.4.2. (R Core Team (2017, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

2.7. Ethics Approval and Consent to Participate. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Ethics Committee for Research in Humans and Biological Materials of the Faculty of Medicine,

TABLE 1: (a) Patients' sociodemographic characteristics at baseline of UDCA or placebo treatment. (b) Patients' clinical characteristics (anthropometry and blood pressure) at baseline and after eight weeks of UDCA or placebo treatment.

(a)						
Parameters	UDCA		Placebo		<i>p</i> value	
Age (yrs.)	56.4 ± 6.6		56.1 ± 6.3		0.842 ^a	
Gender male	17 (56.7%)		16 (53.3%)		0.795 ^c	
DM duration (years)					0.181 ^b	
<5	11 (36.7%)		15 (50%)			
5-9.9	12 (40%)		12 (40%)			
10-14.9	5 (16.7%)		2 (6.7%)			
15+	2 (6.7%)		1 (3.3%)			

(b)						
Parameters	UDCA (<i>n</i> = 30)			Placebo (<i>n</i> = 30)		
	Baseline (F0)	8 weeks (F1)	8 weeks—baseline (Δ)	Baseline (F0)	8 weeks (F1)	8 weeks—baseline (Δ)
Anthropometry and BP						
BMI (kg/m ²)	32.4 ± 5.9	31.9 ± 5.7	−0.5 ± 0.7†	31.2 ± 5.3	31.1 ± 5.4	−0.2 ± 0.5*
WC (cm)	106.7 ± 11.2	102 ± 11	−4.7 ± 4.5†	101 ± 13.3	98.5 ± 11.7	−2.5 ± 4.4†
BP systolic (mmHg)	134.8 ± 17.4	131.7 ± 14.2	−3.2 ± 14.6	130 ± 16.1	128.7 ± 19.3	−1.3 ± 16.2
BP diastolic (mmHg)	83.8 ± 7.4	82.3 ± 6.9	−1.5 ± 4.9	82.2 ± 8.1	84.2 ± 8.6	2 ± 7.3*

All values are expressed as mean ± SD. **p* < 0.05: Independent sample *t*-test compared with UDCA group. †*p* < 0.05: Wilcoxon's signed ranks test compared 8 weeks and baseline in the UDCA group or compared 8 weeks and baseline in the placebo group. F0: beginning of study; F1: end of study; WC: waist circumference; BP: blood pressure.

University of Banja Luka (no. 18/4.92/22). Informed consent was obtained from each participant involved in the study. This trial is registered at <http://www.clinicaltrial.gov/> as NCT05416580.

3. Results

Sixty patients with T2DM were included in this clinical study. The average age was 56.3, and 33 participants were males (55%). The average age and gender distribution were similar in both groups, as well as the duration of diabetes mellitus (Table 1 part a). The demographic and clinical characteristics at baseline and upon study completion are succinctly summarized in Table 1 parts a and b. Notably, no significant differences were observed between the treatment group and placebo group with respect to all baseline characteristics.

The majority in both groups were in cohabitation (86.7% in UDCA, 73.3% in placebo; *p* = 0.197) and employed (66.7% in UDCA, 56.7% in placebo; *p* = 0.426). The CVD was observed in 63.3% of patients in the UDCA group and 76.7% of patients in the placebo group. Notably, 66.7% of patients were receiving antihypertensive medications within the UDCA group, as compared to 73.3% of patients in the placebo group. Additionally, approximately one-quarter of the participants in both groups were using statins, with no statistically significant differences between the two groups.

The baseline anthropometric values (BMI and WC) were very similar in both groups; they were even several units

higher in the UDCA group. Regarding the BMI, while no significance was observed at the baseline, a significantly higher average decrease was observed in the UDCA group after 8 weeks of treatment, compared to placebo (−0.5 ± 0.7 vs. −0.2 ± 0.5; *p* = 0.024). Also, a significant decrease in the intragroup change compared to baseline values in UDCA was found (31.9 ± 5.7 vs. 32.4 ± 5.9; *p* < 0.05). A significant decrease in WC in intragroup change compared to baseline values in UDCA was observed (102 ± 11 vs. 106.7 ± 11.2; *p* < 0.05).

Besides anthropometry, both blood pressures, SBP and DBP, were analyzed. At the beginning of the trial, there were no differences between the groups in BP. The significant difference in average decrease in DBP (Table 1 part b) was observed in the UDCA group, compared to the placebo group (−1.5 ± 4.9 vs. 2 ± 7.3; *p* = 0.033).

The values of glucoregulation parameters (glucose, insulin, HOMA IR, and HbA1c) and lipids (total cholesterol, triglycerides, HDL-C, and LDL-C) are presented in Table 2. The average glucose and HbA1c levels were very similar in both groups at the beginning of the trial, with no significant differences. However, the comparative analysis of postintervention measures between the study groups failed to yield a statistically significant difference regarding glucoregulation parameters, insulin resistance, and lipid profile. While no statistical significance was observed at the two-month follow-up assessment, the average decrease in glucose levels was revealed within the UDCA treatment group. It is noteworthy that no significant differences were revealed in the

TABLE 2: Glucoregulation and lipid status at baseline and after eight weeks of UDCA or placebo treatment.

Parameters	UDCA (<i>n</i> = 30)			Placebo (<i>n</i> = 30)		
	Baseline (F0)	8 weeks (F1)	8 weeks—baseline (Δ)	Baseline (F0)	8 weeks (F1)	8 weeks—baseline (Δ)
Glucoregulation						
Glucose (mmol/L)	9.1 $\pm$ 3.9	8.5 $\pm$ 2.7	-0.6 $\pm$ 2.5	8.8 $\pm$ 3.0	9.0 $\pm$ 3.0	0.2 $\pm$ 1.5
HbA1c (%)	7.2 $\pm$ 1.8	7.0 $\pm$ 1.5	-0.2 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 1.6	7.2 $\pm$ 1.6	0 $\pm$ 0.6
Insulin (mIU)	11.2 (6.5)	11.1 (7.3)	-0.9 (5.2)	10.7 (5.1)	10.4 (5)	-0.3 (4.2)
HOMA IR	3.9 (4.4)	4.0 (2.9)	-0.4 (2)	4.3 (4)	4.4 (3.5)	-0.2 (1.3)
Lipids						
Cholesterol (mmol/L)	5.8 $\pm$ 1.4	5.3 $\pm$ 1.2	-0.5 $\pm$ 1.5	5.1 $\pm$ 1.3	5.1 $\pm$ 1.1	0.0 $\pm$ 1.0
Triglycerides (mmol/L)	2.1 (2)	1.9 (1.1)	-0.1 (1.2)	1.8 (1.6)	2.2 (1.7)	0.1 (0.9)
HDL-C (mmol/L)	1.2 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	-0.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3	-0.1 $\pm$ 0.2
LDL-C (mmol/L)	3.4 $\pm$ 1.2	3.2 $\pm$ 0.9	-0.2 $\pm$ 1.3	2.8 $\pm$ 1.3	3.0 $\pm$ 1.0	0.2 $\pm$ 1

All values are expressed as mean $\pm$ SD or median (IQR). F0: beginning of study; F1: end of study; HbA1c: glycosylated hemoglobin A1c; HOMA IR: Homeostatic Model Assessment index; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol.

TABLE 3: The change of liver enzymes and inflammatory parameters at baseline and after eight weeks of UDCA or placebo treatment.

Parameters	UDCA (<i>n</i> = 30)			Placebo (<i>n</i> = 30)		
	Baseline (F0)	8 weeks (F1)	8 weeks—baseline (Δ)	Baseline (F0)	8 weeks (F1)	8 weeks—baseline (Δ)
Liver enzymes						
AST (UI)	26 (8)	22 (7)	-3.5 (6)†	23.5 (9)	21.5 (11)	0 (8)
ALT (UI)	38.5 (23)	27.5 (14)	-6 (13)†	31 (18)	26.5 (14)	-2.5 (12)*
ALP (UI)	51 (24)	55 (23)	5 (14)	62 (15)*	61 (21)	2.5 (22)
GGT (UI)	27.5 (31)	24 (19)	-3.5 (16)†	28.5 (18)	27 (21)*	2 (12)***
Inflammatory						
CRP(mg/L)	1.9 (2.4)	1.4 (2.3)	-0.4 (0.7)†	2.5 (2.7)	2.6 (2.5)	-0.2 (1.2)
IL-6 (pg/mL)	2.4 (2.1)	2.1 (1.9)	0 (1.8)	3.3 (4.3)*	2.7 (1.8)	-0.5 (2)

Data are expressed as median (IQR). * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$: Mann–Whitney *U* test compared with UDCA group. † $p < 0.05$: Wilcoxon's signed rank test compared 8 weeks and baseline in the UDCA group. F0: beginning of study; F1: end of study; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; GGT: gamma-glutamyl transferase; CRP: C reactive protein; IL-6: interleukin-6.

lipid status in the UDCA group after eight weeks of treatment.

Table 3 presents the baseline and end-of-study results for values of liver enzymes (AST, ALT, ALP, and GGT) and inflammatory parameters (CRP and IL-6) in both the UDCA and placebo groups. There were no significant differences in liver enzyme and inflammation parameter levels between the groups at baseline. However, at the end of the study, both groups exhibited a significant reduction in Δ ALT, as well as in Δ GGT, with median (IQR) values of -6 (13) vs. -2.5 (12) ($p = 0.01$) and Δ GGT -3.5 (16) vs. 2 (12) ($p < 0.001$), respectively, in the within-group analysis. Also, a significant decrease in the intragroup change of AST (22 (7) vs. 26 (8); $p < 0.05$), ALT (27.5 (14) vs. 38.5 (23); $p < 0.05$), and GGT (24 (19) vs. 27.5 (31); $p < 0.05$) compared to baseline values in the UDCA group was found.

Inflammatory parameters did not change significantly. A significant decrease in the intragroup change was found in CRP (1.4 (2.3) vs. 1.9 (2.4); $p < 0.05$) compared to baseline values in the UDCA group.

Finally, both prooxidative and antioxidative parameters within both study groups at the beginning and culmination

of the intervention period were monitored (Figures 2 and 3). Initial observations revealed no discernible discrepancies in oxidative status between the groups. However, as the intervention period drew to a close, noteworthy and statistically significant alterations occurred within the UDCA-treated group. Specifically, the group receiving UDCA exhibited a statistically significant reduction in prooxidative parameters (TBARS, NO_2^- , and H_2O_2) and a concurrent, statistically significant elevation in antioxidative parameters (SOD and GSH). Furthermore, significant intragroup changes were also reported ($p < 0.05$) after the follow-up period. CAT revealed significantly higher values on follow-up between groups (14.1 $\pm$ 3.2 vs. 12.2 $\pm$ 4; $p = 0.048$), but no significant change was observed (Figure 3).

4. Discussion

In this study, UDCA was used for the cotreatment of patients with T2DM. Although the medicinal effects of BAs were known for many years, a great interest in these drugs appeared at the end of the last century. However, most experimental studies with these drugs have been conducted

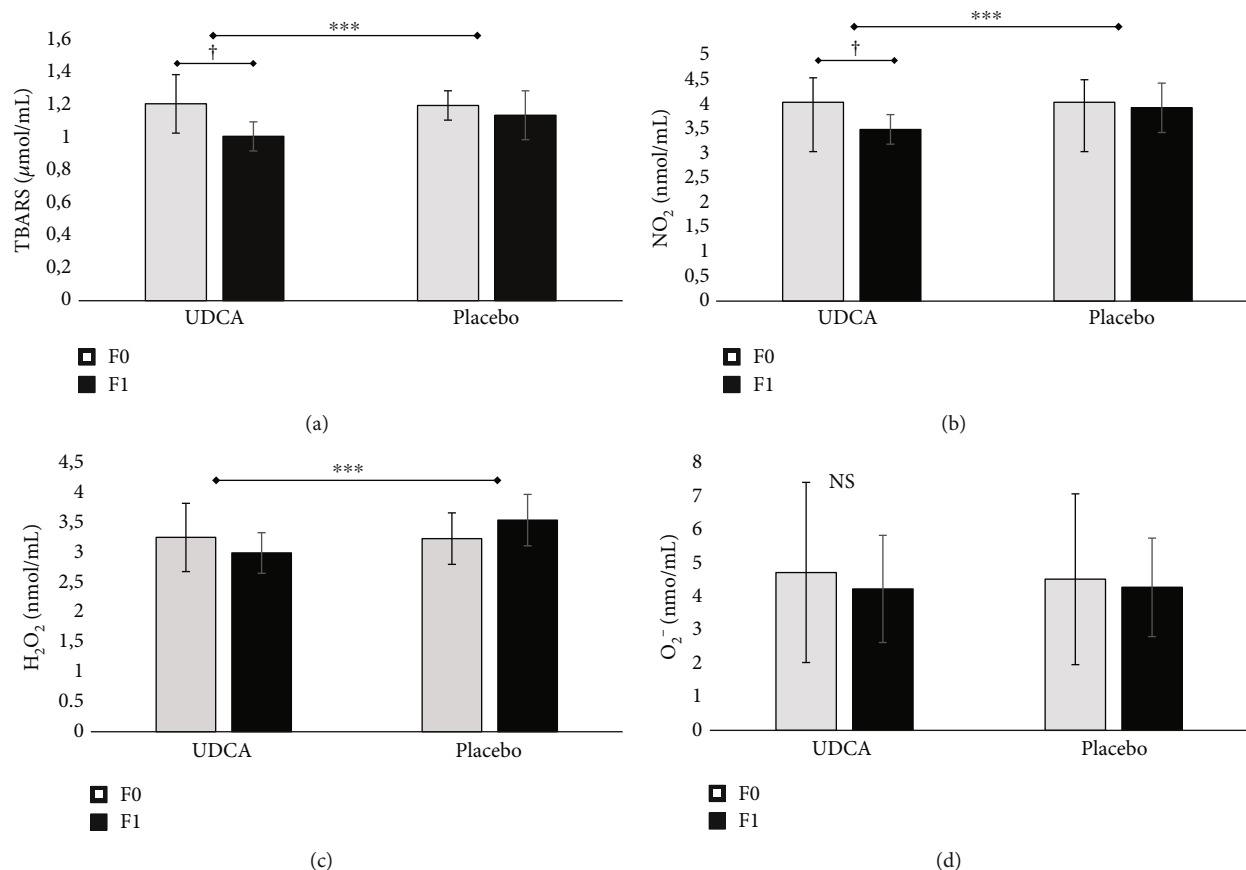


FIGURE 2: The effects of eight weeks of UDCA/placebo treatment on prooxidative stress parameters in T2DM patients (a–d). The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), NO₂, H₂O₂, and O₂⁻ values at the beginning (F0) and at the end of the study (F1). Independent sample *t*-test was done, and asterisk (*) indicates significant differences between the groups, ****p* < 0.001. Paired sample *t*-test was used to test for changes within the group, and the dagger sign (†) indicates significant differences within the groups, †*p* < 0.05.

in animals (rodents). Some clinical studies have demonstrated the beneficial effects of BAs, particularly UDCA, in liver diseases, and other gastrointestinal pathology [42–44]. To unravel the underlying mechanism of UDCA on diabetes mellitus in humans, a clinical trial in patients with T2DM was conducted. A daily oral dose of 1500 mg of UDCA was administered to the study subjects for eight weeks. As a previous study showed [45], the short-term changes in HbA1c are observed eight weeks after the medication alteration. During this period, the effects of this drug on diabetes, specifically metabolic, anti-inflammatory, and antioxidative outcomes, were monitored. T2DM is usually accompanied by other modifiable CVD risk factors, such as hypertension, dyslipidemia, and obesity. Therefore, it was important to monitor these factors in diabetic patients as well.

The results of the present study showed a significant reduction in BMI in the UDCA group after eight weeks of treatment, compared to placebo. This finding is of great importance since weight loss is a part of lifestyle management of T2DM patients. In accordance with that notion, the study in animals revealed that UDCA led to a reduction of lipogenesis and gluconeogenesis in obese mice, suggesting that UDCA plays an important role in lipid and glucose metabolism and energy storage capacity in connection with

obesity. UDCA is equally effective in reducing whole-body adiposity [28].

Elevated arterial BP contributes to increased incidence of both micro- and macrovascular complications in patients with T2DM. Namely, the coexistence of these two major risk factors leads to a fourfold increased risk for cardiovascular disease (CVD) as compared to normotensive nondiabetic individuals [46]. In this study, UDCA exhibited a positive effect on BP, particularly on DBP. Eight-week-treatment with UDCA significantly reduced DBP in T2DM patients, compared to placebo. In accordance with strict inclusion criteria and randomization of the present study, no differences between the examined groups in the age and gender of study participants, as well as the duration of diabetes were found. As an incurable disease, strict metabolic control in T2DM (glucoregulation, lipids, and blood pressure) is a very important element of the treatment, as well as in the prevention of diabetic complications [47, 48]. Glycemic control is the central focus of managing diabetes and its complications. Early reports indicate that UDCA improves glucose metabolism; that is, administration of high-dose UDCA improves glycemic parameters, insulin sensitivity, and insulin resistance surrogate markers in patients with nonalcoholic steatohepatitis [20, 21]. A meta-analysis, including 17 studies focusing

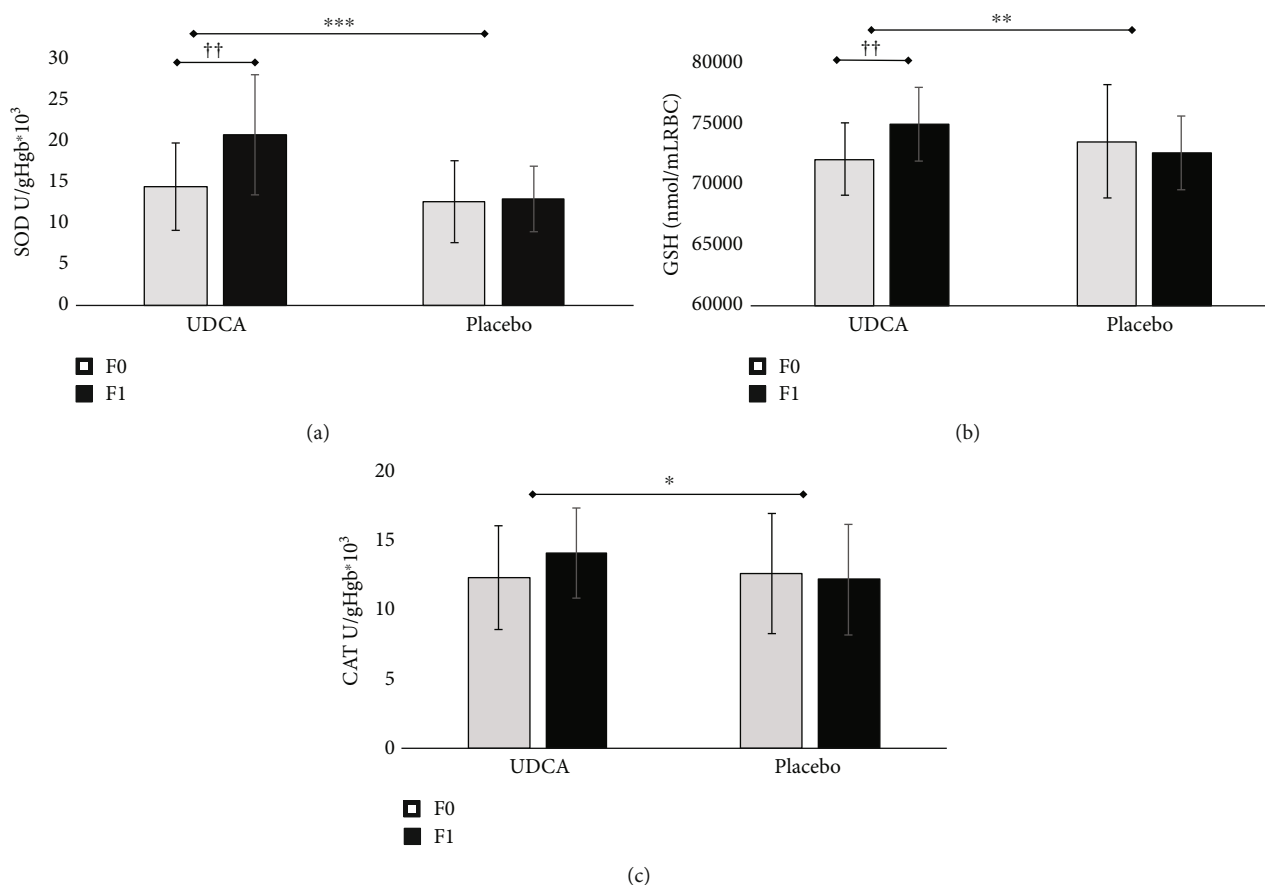


FIGURE 3: The effects of eight weeks of UDCA/placebo treatment on antioxidative stress parameters in T2DM patients (a–c). The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione (GSH) at the beginning (F0) and at the end of the study (F1). Independent sample *t*-test was done, and asterisk (*) indicates significant differences between the groups, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001. Paired sample *t*-test was used to test for changes within the group, and the dagger sign (†) indicates significant differences within the groups, †*p* < 0.01.

only on glucoregulation in 2,950 patients with T2DM found a 0.55% improvement in HbA1c and fasting glycemia after using BA sequestrants [49]. Our data revealed a visible, but not statistically significant, decrease in fasting blood glucose and HbA1c levels in the UDCA treatment group. Other glucose parameters, such as insulin and HOMA IR, did not change significantly either.

A meta-analysis of 15 different studies in humans, including patients with DMT2 and the effects of BAs and sequestrants, showed that lipid levels (LDL-C, HDL-C, and triglycerides), as well as HbA1c, improved upon BA treatment [50]. A recent experimental study in mice with diabetes divulged the biological effects of the treatment with the antilipemic probucol together with UDCA (microcapsules) drugs, resulting in hypoglycemic and anti-inflammatory effects in these animals [51]. UDCA, used as a part of the combination therapy, supported the favorable therapeutic effects of the basic drug and its bioavailability. Additionally, other studies utilized the nano- and microparticle approach for better oral drug delivery in combination with BAs [52–55]. Nevertheless, the results of this study revealed that lipid status remained unaffected, along with the inflammatory parameters (IL-6 and CRP). The possible explanation for this effect could stem from the oral bioavailability of

the drug that might not be sufficient to hinder inflammation unless combined with some other drugs.

The hepatoprotective effects of UDCA are already known. UDCA is a well-established drug approved for the treatment of primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis, with an adequate safety profile and minimal side effects, even at high doses [42, 43]. Alonso-Peña et al. [56] found that treatment with UDCA normalized aminotransferase levels and that the drug can also efficiently attenuate liver damage in patients with unexplained hypertransaminasemia. The study conducted by Mueller et al. [57] reported that the three-week-long administration of UDCA in obese patients, at a dose of 20 mg/kg/day, reduced the serum AST, GGT, free fatty acids, total cholesterol, and LDL-C. Robles-Díaz et al. [58] emphasized the role of UDCA in the treatment and prevention of drug-induced liver injury. In addition, the relatively common empiric use of UDCA in these conditions appears to be safe and led to reductions in bilirubin and transaminase levels.

In accordance with the described effects of UDCA on liver enzyme profile, we have found a significant reduction in liver enzymes, ALT, and GGT in the UDCA group compared to placebo. Despite the high doses of UDCA, minimal side effects and good compliance were observed. UDCA

achieves its cytoprotective and antiapoptotic effects by preventing the formation of ROS [59, 60]. However, measurement of ROS is still difficult and one of many available methods is lipid peroxidation and TBARS, as useful markers of disease risk and progression [61]. Hyperglycemia is associated with the massive production of ROS. In the present study, the antioxidative effects of UDCA, as measured through monitoring levels of ROS and the activity of GSH, SOD, and CAT, were observed. The results of this study demonstrated a significant reduction of all prooxidative parameters: TBARS, NO_2^- , and H_2O_2 , during the 8-week-long period of UDCA treatment. However, the level of O_2^- remained unaffected. During the follow-up, it was also found that the level of antioxidative molecules such as SOD and GSH significantly increased by UDCA treatment. At the same time, the CAT level was also increased, but that increase was not significant.

This study revealed the beneficial effects of UDCA in T2DM patients as an auxiliary treatment to metformin. In addition to a small number of clinical studies performed on patients, the strength of this study is its contribution to the treatment of T2DM. Besides, the design of this study, as a double-blind randomized clinical trial with parallel groups and strong inclusion/exclusion criteria, makes the obtained results outstanding. This study is a small-scale study with a limited number of participants during the COVID-19 pandemic performed in one center, thus creating a major limitation to this study. The results of this study are promising, and more research is warranted to explore all the benefits of UDCA in T2DM.

5. Conclusions

The study demonstrated that an eight-week UDCA administration had beneficial effects on anthropometric status, liver function, and diastolic blood pressure in patients with T2DM. UDCA significantly improved BMI, diastolic blood pressure, liver enzymes (ALT and GGT), and oxidative stress parameters, thus potentially attenuating the progression and complications of diabetes.

Data Availability

Supporting data is not applicable.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- [1] H. Sun, P. Saeedi, S. Karuranga et al., "IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 183, article 109119, 2022.
- [2] World Health Organization, *Global Report on Diabetes*, World Health Organization, Geneva, 2016.
- [3] Institute for Public Health of Serbia "Dr. Milan Jovanović Batut", "Incidence and mortality from diabetes," in *Register for diabetes in Serbia*, Institute for Public Health of Serbia"Dr Milan Jovanović Batut", Belgrade, Serbia, 2016.
- [4] American Diabetes Association, "2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2020," *Diabetes Care*, vol. 43, Supplement_1, pp. S14–S31, 2020.
- [5] E. Burgos-Morón, Z. Abad-Jiménez, A. Martínez de Marañón et al., "Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues. Journal of," *Clinical Medicine*, vol. 8, no. 9, p. 1385, 2019.
- [6] V. I. Lushchak, "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 224, pp. 164–175, 2014.
- [7] U. Asmat, K. Abad, and K. Ismail, "Diabetes mellitus and oxidative stress - a concise review," *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 24, no. 5, pp. 547–553, 2016.
- [8] I. S. Al-Gadi, R. H. Haas, M. J. Falk, A. Goldstein, and S. E. McCormack, "Endocrine disorders in primary mitochondrial disease," *Journal of the Endocrine Society*, vol. 2, no. 4, pp. 361–373, 2018.
- [9] M. P. Murphy, "Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum," *Cell Metabolism*, vol. 18, no. 2, pp. 145–146, 2013.
- [10] H. M. Zeeshan, G. H. Lee, H. R. Kim, and H. J. Chae, "Endoplasmic reticulum stress and associated ROS," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 3, p. 327, 2016.
- [11] S. K. Biswas, "Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 5698931, 9 pages, 2016.
- [12] R. J. Pickering, C. J. Rosado, A. Sharma, S. Buksh, M. Tate, and J. B. de Haan, "Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications," *Clinical and Translational Immunology*, vol. 7, no. 4, article e1016, 2018.
- [13] T. M. Šarenac and M. Mikov, "Bile acid synthesis: from nature to the chemical modification and synthesis and their applications as drugs and nutrients," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, pp. 939–961, 2018.
- [14] M. Mikov, H. Al-Salami, S. Golocorbin-Kon, R. Skrbic, A. Raskovic, and J. P. Fawcett, "The influence of $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanate on gliclazide pharmacokinetics and glucose levels in a rat model of diabetes," *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, vol. 33, no. 3, pp. 137–142, 2008.
- [15] M. Mikov, M. Đanić, N. Pavlović et al., "Potential applications of gliclazide in treating type 1 diabetes mellitus: formulation with bile acids and probiotics," *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, vol. 43, no. 3, pp. 269–280, 2018.
- [16] M. Mikov, J. P. Fawcett, K. Kuhajda, and S. Kevresan, "Pharmacology of bile acids and their derivatives absorption promoters and therapeutic agents," in *Chemistry, biosynthesis, analysis, chemical and metabolic transformations and pharmacology*, M. Mikov and J. P. Fawcett, Eds., pp. 177–200, Mediset-Publishers, Geneva, 2008.
- [17] C. Xie, W. Huang, R. L. Young et al., "Role of bile acids in the regulation of food intake, and their dysregulation in metabolic disease," *Nutrients*, vol. 13, no. 4, p. 1104, 2021.
- [18] G. M. Hirschfield, J. K. Dyson, G. J. M. Alexander et al., "The British Society of Gastroenterology/UK-PBC primary biliary cholangitis treatment and management guidelines," *Gut*, vol. 67, no. 9, pp. 1568–1594, 2018.

- [19] A. H. Ali, J. H. Tabibian, E. J. Carey, and K. D. Lindor, "Emerging drugs for the treatment of primary biliary cholangitis," *Expert Opinion on Emerging Drugs*, vol. 21, no. 1, pp. 39–56, 2016.
- [20] V. Ratzl, V. de Ledinghen, F. Oberti et al., "A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis," *Journal of Hepatology*, vol. 54, no. 5, pp. 1011–1019, 2011.
- [21] T. Tsuchida, M. Shiraiishi, T. Ohta, K. Sakai, and S. Ishii, "Ursodeoxycholic acid improves insulin sensitivity and hepatic steatosis by inducing the excretion of hepatic lipids in high-fat diet-fed KK-Ay mice," *Metabolism*, vol. 61, no. 7, pp. 944–953, 2012.
- [22] P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, and B. Staels, "Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation," *Physiological Reviews*, vol. 89, no. 1, pp. 147–191, 2009.
- [23] K. Dilger, S. Hohenester, U. Winkler-Budenhof et al., "Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid profiles and intestinal detoxification machinery in primary biliary cirrhosis and health," *Journal of Hepatology*, vol. 57, no. 1, pp. 133–140, 2012.
- [24] P. I. Dosa, T. Ward, R. E. Castro, C. M. Rodrigues, and C. J. Steer, "Synthesis and evaluation of water-soluble prodrugs of ursodeoxycholic acid (UDCA), an anti-apoptotic bile acid," *Chem Med Chem*, vol. 8, no. 6, pp. 1002–1011, 2013.
- [25] S. Bellentani, "Immunomodulating and anti-apoptotic action of ursodeoxycholic acid: where are we and where should we go?," *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 17, no. 2, pp. 137–140, 2005.
- [26] C. M. Rodrigues, G. Fan, P. Y. Wong, B. T. Kren, and C. J. Steer, "Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production," *Molecular Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. 165–178, 1998.
- [27] S. Manley and W. Ding, "Role of farnesoid X receptor and bile acids in alcoholic liver disease," *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 5, no. 2, pp. 158–167, 2015.
- [28] Y. S. Chen, H. M. Liu, and T. Y. Lee, "Ursodeoxycholic acid regulates hepatic energy homeostasis and white adipose tissue macrophages polarization in leptin-deficiency obese mice," *Cell*, vol. 8, no. 3, p. 253, 2019.
- [29] Ministry of Health and Social Welfare of the Republic of Srpska, *Clinical guideline for primary health care: obesity in adults*, Ministry of Health and Social Welfare of the Republic of Srpska, Banja Luka, First edition, 2015.
- [30] World Health Organization, "Obesity: preventing and managing the global epidemic," in *Report of WHO Expert Consultation, Technical Report Series No. 894*, World Health Organization, Geneva (Switzerland), 2000.
- [31] T. Unger, C. Borghi, F. Charchar et al., "2020 international society of hypertension global hypertension practice guidelines," *Hypertension*, vol. 75, no. 6, pp. 1334–1357, 2020.
- [32] D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner, "Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man," *Diabetologia*, vol. 28, no. 7, pp. 412–419, 1985.
- [33] C. Auclair and E. Voisin, "Nitroblue-tetrazolium reduction," in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Greenwald, Ed., pp. 123–132, CRC Press, Boca Raton, 1985.
- [34] E. Pick and Y. Keisari, "A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture," *Journal of Immunological Methods*, vol. 38, no. 1–2, pp. 161–170, 1980.
- [35] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids," *Analytical Biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, 1982.
- [36] N. Mandić-Kovačević, Z. Kukrić, S. Latinović et al., "Antioxidative potential of pomegranate peel extract: in vitro and in vivo studies," *Scripta Medica*, vol. 54, no. 1, pp. 9–18, 2023.
- [37] E. Beutler, O. Duron, and B. Kelly, "Improved method for the determination of blood glutathione," *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 61, pp. 882–888, 1963.
- [38] E. Beutler, *Manual of Biochemical Methods*, Grune and Stratton, New York, 1982.
- [39] E. Beutler, *Red Cell Metabolism a Manual of Biochemical Methods*, Grune and Stratton, Philadelphia, 1984.
- [40] M. Rankovic, N. Dragicin, J. Jeremic et al., "Protective role of vitamin b1 in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: focus on hemodynamic, redox, and apoptotic markers in heart," *Frontiers in Physiology*, vol. 12, article 690619, 2021.
- [41] J. Joksimovic Jovic, J. Sretenovic, N. Jovic et al., "Cardiovascular properties of the androgen-induced PCOS model in rats: the role of oxidative stress," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, Article ID 8862878, 16 pages, 2021.
- [42] E. Carey, A. Ali, and K. Lindor, "Primary biliary cirrhosis," *Lancet*, vol. 386, no. 10003, pp. 1565–1575, 2015.
- [43] F. Saffioti, K. S. Gurusamy, N. Hawkins et al., "Pharmacological interventions for primary sclerosing cholangitis: an attempted network meta-analysis," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 3, no. 3, article CD011343, 2017.
- [44] S. J. Keely, C. J. Steer, and N. K. Lajczak-McGinley, "Ursodeoxycholic acid: a promising therapeutic target for inflammatory bowel diseases?," *Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 317, no. 6, pp. G872–G881, 2019.
- [45] J. A. Hirst, R. J. Stevens, and A. J. Farmer, "Changes in HbA1c level over a 12-week follow-up in patients with type 2 diabetes following a medication change," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, article e92458, 2014.
- [46] D. I. Pavlou, S. A. Paschou, P. Anagnostis et al., "Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: targets and management," *Maturitas*, vol. 112, pp. 71–77, 2018.
- [47] N. Laiteerapong, S. A. Ham, Y. Gao et al., "The legacy effect in type 2 diabetes: impact of early glycemic control on future complications (the diabetes & aging study)," *Diabetes Care*, vol. 42, no. 3, pp. 416–426, 2019.
- [48] K. Khunti and S. Seidu, "Therapeutic inertia and the legacy of dysglycemia on the microvascular and macrovascular complications of diabetes," *Diabetes Care*, vol. 42, no. 3, pp. 349–351, 2019.
- [49] M. Hansen, D. P. Sonne, K. H. Mikkelsen, L. L. Gluud, T. Vilsbøll, and F. K. Knop, "Bile acid sequestrants for glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials," *Journal of Diabetes and its Complications*, vol. 31, no. 5, pp. 918–927, 2017.
- [50] M. Mazidi, P. Rezaie, E. Karimi, and A. P. Kengne, "The effects of bile acid sequestrants on lipid profile and blood glucose concentrations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials," *International Journal of Cardiology*, vol. 227, pp. 850–857, 2017.
- [51] A. Mooranian, S. Raj Wagle, B. Kovacevic et al., "Bile acid bio-nanoencapsulation improved drug targeted-delivery and

- pharmacological effects via cellular flux: 6-months diabetes pre-clinical study,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 106, 2020.
- [52] A. Moorianian, R. Negrulj, N. Chen-Tan et al., “Advanced bile acid-based multi-compartmental microencapsulated pancreatic β -cells integrating a polyelectrolyte-bile acid formulation, for diabetes treatment,” *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 44, no. 2, pp. 588–595, 2016.
 - [53] A. Moorianian, R. Negrulj, S. Mathavan et al., “An advanced microencapsulated system: a platform for optimized oral delivery of antidiabetic drug-bile acid formulations,” *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 20, no. 6, pp. 702–709, 2015.
 - [54] A. Moorianian, N. Zamani, M. Mikov et al., “Novel nano-encapsulation of probucol in microgels: scanning electron micrograph characterizations, buoyancy profiling, and antioxidant assay analyses,” *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 46, no. sup3, pp. 741–S747, 2018.
 - [55] A. Moorianian, R. Negrulj, H. S. Al-Sallami et al., “Probuco release from novel multicompartmental microcapsules for the oral targeted delivery in type 2 diabetes,” *American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 16, no. 1, pp. 45–52, 2015.
 - [56] M. Alonso-Peña, R. Espinosa-Escudero, E. Herraes et al., “Beneficial effect of ursodeoxycholic acid in patients with acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2) deficiency-associated hypertransaminasemia,” *Hepatology*, vol. 76, pp. 1259–1274, 2022.
 - [57] M. Mueller, A. Thorell, T. Claudel et al., “Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity,” *Journal of Hepatology*, vol. 62, no. 6, pp. 1398–1404, 2015.
 - [58] M. Robles-Díaz, L. Nezic, V. Vujic-Aleksic, and E. S. Björns-son, “Role of ursodeoxycholic acid in treating and preventing idiosyncratic drug-induced liver injury. A systematic review,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, article 744488, 2021.
 - [59] J. D. Amaral, R. J. S. Viana, R. M. Ramalho, C. J. Steer, and C. M. P. Rodrigues, “Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid,” *Journal of Lipid Research*, vol. 50, no. 9, pp. 1721–1734, 2009.
 - [60] A. Cao, L. Wang, X. Chen et al., “Ursodeoxycholic acid ameliorated diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress,” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 39, no. 8, pp. 1300–1308, 2016.
 - [61] F. Ito, Y. Sono, and T. Ito, “Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 3, p. 72, 2019.

PRILOG 6. BIOGRAFIJA

Biljana Lakić (rođ.Milanković), dr.medicine, rođena je 21. maja 1975. godine u Bosanskoj Dubici. Osnovnu školu pohađala u Bosanskoj Dubici, a srednju školu je završila u Prijedoru, u vrijeme ratnih dešavanja u BiH. Medicinski fakultet, Univerziteta u Banjoj Luci je upisala 1993. godine, a diplomirala 1999. godine sa prosječnom ocjenom 8,47. Pripravnički staž doktora medicine je započela 2000. godine u JZU DZ "Kozma i Damjan" u Kozarskoj Dubici. Specijalizaciju iz porodične medicine je završila u četvrtoj generaciji specijalizanata porodične medicine (od 2002. do 2005.godine), prema prvobitnom nastavnom planu Queen's Univerziteta iz Kanade. 2002. godine je bila uključena u „Nacionalni projekat za dijabetes melitus u Republici Srpskoj“, učestvujući u brojnim seminarima u cilju dodatne edukacije iz dijabetologije. Od 2007. godine je zaposlena u JZU DZ Banja Luka i radi kao specijalista porodične medicine u ECPM Poliklinika. U okviru kontinuirane medicinske edukacije na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci, od 2021.godine je supspecijalizant dijabetologije za JZU DZ Banja Luka i trenutno u pripremi supspecijalističkog rada.

Postdiplomski studij je upisala školske 2007/2008. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci, a magistrirala 2015.godine sa magistarskom tezom " Akutni infarkt miokarda u ordinaciji porodične medicine i stanicama hitne pomoći - analiza faktora rizika i prehospitalno liječenje", sa prosječnom ocjenom 9,64. Studijski program III ciklusa Biomedicinskih nauka upisala je školske 2017/2018. godine, sa položenim svim ispitima, sa prosječnom ocjenom 9,43.

Od 2017.godine do 2022. godine je bila angažovana u dopunskom radu na Katedri porodične medicine Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci, u zvanju višeg asistenta. Novim reizborom, od 24.02.2022. godine ponovo angažovana, u istom zvanju, do danas.

Autor je i koautor nekoliko naučnih i stručnih radova objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima. Jedan je od autora Farmakoterapijskog vodiča u porodičnoj medicini - Terapija bola Katedre za porodičnu medicinu i Katedre za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci, izdatog 2019. godine.

Član je Evropske Akademije nastavnika u opštoj praksi - EURACT, kao i Udruženja doktora porodične medicine Republike Srpske, te Komore doktora medicine i Društva doktora medicine Republike Srpske.

Udana je i majka jednog djeteta.

IZJAVE

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem
da je doktorska disertacija

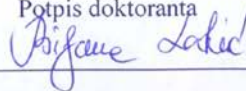
"Uticaj ursodeoksiholne kiseline na parametre oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne disfunkcije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2"

" The effects of ursodeoxycholic acid on parameters of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes "

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, 16.04.2025.godine

Potpis doktoranta



Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

" Uticaj ursodeoksiholne kiseline na parametre oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne disfunkcije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2"

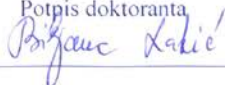
koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
- 4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, 16.04.2025.godine

Potpis doktoranta


Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: Biljana Lakić

Naslov rada: " Uticaj ursodeoksiholne kiseline na parametre oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne disfunkcije kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2"

Mentori: Prof. dr Momir Mikov

Prof.dr Ranko Škrbić

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, 16.04.2025.godine

Potpis doktoranta
