

**ИЗОФЛАВОНЫ КРАСНОГО КЛЕВЕРА (TRIFOLIUM PRATENSE)
СНИЖАЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СЕЛЕЗЁНКЕ И ПЕЧЕНИ
КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА**

Соколова К. В.^{1, 2},
Туканов Д. А.^{1, 2}

¹ ФГАОУ ВО Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (УрФУ), г. Екатеринбург, РФ.

² ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН), г. Екатеринбург, РФ.

**RED CLOVER (TRIFOLIUM PRATENSE) ISOFLAVONES REDUCE
OXIDATIVE STRESS IN THE SPLEEN AND LIVER OF RATS WITH
EXPERIMENTAL TYPE 2 DIABETES**

Sokolova K. V. ^{a, b},
Tukanov D. A. ^{a, b}

^a Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin,
Ekaterinburg, Russia.

^b Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia.

Резюме

Сахарный диабет 2 типа является хроническим заболеванием с множеством тяжёлых осложнений. Число больных диабетом 2 типа велико и продолжает нарастать по всему миру, что делает разработку новых средств лечения и профилактики данного заболевания крайне актуальной. Оксидативный стресс, вызванный гипергликемией, является одним из основных факторов поражения и дисфункции органов при сахарном диабете 2 типа. Учитывая тесную вовлечённость иммунной системы в патогенез диабета и его осложнений, представляет интерес возможность влияния на активность системы антиоксидантной защиты в органах иммунопоэза, в частности, в селезёнке. Печень, интегрирующая все виды обмена веществ, наравне с органами иммунной системы как вносит вклад в патогенез диабета 2 типа, так и является его мишенью. Красный клевер (*Trifolium pratense*) представляет интерес как дешёвый и доступный источник антиоксидантов. Целью работы была оценка действия перорального введения водных экстрактов изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) на состояние антиоксидантной системы защиты в крови, селезёнке и печени крыс с экспериментальным диабетом. **Материалы и методы.** В течение месяца трижды в неделю половозрелым самцам крыс со стрептозотоцини-никотинамидной моделью сахарного диабета 2 типа перорально вводили водные экстракты изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*), полученные методами «зелёных технологий» с использованием глубоких природных эвтектических растворителей, в дозах 300 мг/кг и 600 мг/кг. В крови было определено содержание глюкозы, относительное содержание гликированного гемоглобина, количество лейкоцитов разных фракций. Биохимически была определена активность ферментов системы антиоксидантной защиты каталазы и супероксиддисмутазы, содержание продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида и эндогенного антиоксиданта восстановленного глутатиона в крови и тканях селезёнки и печени. **Результаты.** Введение экстрактов изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) снижало гипергликемию и восстанавливало количество моноцитов и гранулоцитов в крови, сниженное у крыс с диабетом; нормализовало активность каталазы в печени и активность супероксиддисмутазы в селезёнке, уровень малонового диальдегида в селезёнке и печени и содержание восстановленного глутатиона в селезёнке, изменённые у крыс с диабетом, до показателей здорового контроля, вне зависимости от дозы. **Выводы.** Экстракты изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) ослабляют гипергликемию и снижают окислительный стресс в органах крыс с экспериментальным СД2. Экстракты изофлавонов обладают иммунофармакологическим действием, проявляющемся в воздействии на показатели системы перекисного окисления липидов-антиоксидантной защиты в селезёнке.

Ключевые слова: оксидативный стресс, селезёнка, печень, сахарный диабет 2 типа, изофлавоны, *Trifolium pratense*.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic disease with a large number of severe complications. The quantity of patients is large and continues to grow worldwide, so development of new means of prevention and treatment are extremely relevant. Oxidative stress caused by hyperglycemia is one of the main factors of organ damage and dysfunction in T2D. Given the close involvement of the immune system in the pathogenesis of diabetes and its complications, the possibility of influencing the activity of the antioxidant defense system in the organs of immunopoiesis, in particular, spleen, is of interest. The liver, which integrates all types of metabolism, along with the organs of the immune system, both contributes to the pathogenesis of T2D and is its target. Red clover (*Trifolium pratense*) is of interest as a cheap and accessible source of antioxidants. The aim of the work was to evaluate the effect of red clover isoflavones on the antioxidant defense system in blood, spleen and liver of rats with experimental diabetes.

Materials and methods. For a month, three times a week, sexually mature male rats with a streptozotocin-nicotinamide model of T2D were orally administered aqueous extracts of isoflavones, obtained by “green technology” methods using deep natural eutectic solvents, at doses of 300 and 600 mg/kg. The glucose content, the relative content of glycated hemoglobin and the number of leukocytes of different fractions were measured in blood. The activity of enzymes of the antioxidant defense system catalase and superoxide dismutase, the content of the lipid peroxidation product malondialdehyde and the endogenous antioxidant reduced glutathione were biochemically determined in blood, liver and spleen.

Results. The administration of red clover flower isoflavone extracts (*Trifolium pratense*) reduced hyperglycemia and restored the number of monocytes and granulocytes in the blood, reduced in rats with diabetes; normalized the activity of catalase in the liver and the activity of superoxide dismutase in the spleen, the level of malondialdehyde in the spleen and liver and the content of reduced glutathione in the spleen, changed in rats with diabetes, to healthy control values, regardless of the dose. **Conclusions.** Red clover flower (*Trifolium pratense*) isoflavone extracts attenuate hyperglycemia and reduce oxidative stress in the organs of rats with experimental T2D. Isoflavone extracts have an immunopharmacological effect, manifested in the effect on the parameters of the lipid peroxidation-antioxidant defense system in the spleen.

Keywords: oxidative stress, spleen, liver, type 2 diabetes, isoflavones, *Trifolium pratense*.

1 Введение

Сахарный диабет 2 типа (СД2) – хроническое заболевание, характеризующееся гипергликемией и резистентностью к инсулину, которым в настоящее время страдает почти полмиллиона человек по всему миру. СД2 и его осложнения ощутимо снижают качество жизни и накладывают бремя на здравоохранение и социальную сферу [9], что обуславливает необходимость дальнейшего поиска веществ, способных облегчить гликемическую нагрузку и снизить скорость прогрессирования СД2. Согласно современным представлениям, окислительный стресс (ОС), т.е. дисбаланс между продукцией активных форм кислорода и неспособностью эндогенной антиоксидантной системы нейтрализовать их пагубное действие на клетки и ткани, вызванный гипергликемией, является одним из основных факторов патогенеза СД2, развития его сосудистых осложнений [10], повреждения и дисфункции органов [6]. Таким образом, смягчение ОС в органах является желанным следствием профилактики и терапии СД2.

Развитие представлений о роли иммунной системы в патогенезе СД2 закономерно обращает внимание исследователей на органы иммуноопоза, в частности, на селезёнку. Исследователи отмечают, что, с одной стороны, гипергликемия оказывает значительное воздействие на селезёнку [12], что может выражаться в формировании иммунологической недостаточности, а, с другой стороны, отмечают важную роль этого органа в развитии эндокринных заболеваний [7; 8]. Ранее нами было показано, что селезёнка подвержена воздействию ОС при экспериментальном СД2 в большей степени, чем печень [3]. Между тем, ОС в печени также влияет на развитие осложнений СД2 [1]. Не смотря на важность изучения возможностей ослабления оксидативного стресса в селезёнке и печени при СД2, экспериментальных работ, раскрывающих данный вопрос, крайне мало.

Красный клевер (*Trifolium pratense*) широко используется в качестве источника изофлавонов, обладающих антиоксидантными свойствами [5]. Однако, особенности его действия на систему ПОЛ-АОЗ в разных органах не изучены.

Целью работы было оценить действие ИФ цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) на состояние антиоксидантной системы защиты в крови, селезёнке и печени крыс с экспериментальным СД2.

2 Материалы и методы

Исследование проведено на 43 белых крысах-самцах Вистар массой $353,7 \pm 5,77$ грамма возрастом 12-13 недель, содержащихся в виварии на стандартном рационе для лабораторных животных DeltaFeeds (АО «БиоПро», Россия) с неограниченным доступом к чистой питьевой воде. На проведение эксперимента на животных было получено разрешение этического комитета ИИФ УрО РАН № 10/23 от 09.10.2023, все манипуляции с ними проводились в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов и Директивой Совета ЕС 2010/63/EU.

Были сформированы следующие группы животных: 1) крысы с экспериментальным СД2; 2) крысы с экспериментальным СД2, получавшие экстракт ИФ в дозе 300 мг/кг массы тела (СД2 + ИФ 300); 3) крысы с экспериментальным СД2, получавшие экстракт ИФ в дозе 600 мг/кг массы тела (СД2 + ИФ 600); 4) здоровые крысы, получавшие экстракт ИФ в дозе 300 мг/кг (ИФ300); 5) здоровые крысы, получавшие экстракт ИФ в дозе 600 мг/кг (ИФ600); 6) здоровый контроль.

ИФ цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) животные получали в виде водной суспензии перорально через зонд в дозах 300 и 600 мг/кг соответственно. Введение ИФ проводилось 3 раза в неделю на протяжении месяца (всего 12 доз). Экстракты ИФ были получены на базе Химико-технологического института Уральского федерального университета [4]. Контрольным животным из групп 1 и 6 вместо ИФ аналогичным образом вводили воду.

Для моделирования СД2 крысам производили в/б инъекции никотинамида (MilliporeSigma, США), растворённого в воде для инъекций, в дозе 110 мг/кг массы тела, а через 15 минут – стрептозотоцина (MilliporeSigma, США), растворённого в цитратном буфере (pH 4,5), в дозе 65 мг/кг (авторская модификация модели [11]). Крыс выводили из эксперимента декапитацией под изофлурановым (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) наркозом, предварительно взяв кровь из хвостовой вены, извлекали селезенку и печень.

Показатели ОС определяли в тканях селезёнки и печени (методика описана в [3], а также в крови (активность САТ (КФ 1.11.1.6) и СОД (КФ 1.15.1.1) – в эритроцитах, уровень МДА и содержание GSH – в цельной крови) (методика описана в [2]. Количество лейкоцитов в крови определяли при помощи гематологического анализатора Mindray BC-2800 Vet (Mindray, Китай). Концентрацию глюкозы в крови определяли натощак (fasting blood glucose, FBG) в плазме глюкозооксидазным методом с использованием набора реагентов «Глюкоза-Ново» (Вектор-Бест, Новосибирск, РФ)). Относительное содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови определяли методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора реактивов ГЛИКОГЕМОТЕСТ (ЭЛТА, Москва, Россия). Измерение оптической плотности в ходе проведения биохимических исследований проводилось на спектрофотометре DU-800 (Beckman, США). При проведении работ было использовано оборудование Центра коллективного пользования ИИФ УрО РАН (ЦКП ИИФ УрО РАН).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы OriginPro9.0 (OriginLab Corporation, США). Значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни, критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

Введение ИФ приводило к снижению уровня FBG независимо от дозы, достоверное снижение HbA1c наблюдалось после курса ИФ в дозе 600 мг/кг (Рис. 1А-1В).

У крыс с экспериментальным СД2 наблюдалась тенденция к снижению количества лейкоцитов в крови (Рис. 1С-Е), что можно объяснить иммунологической недостаточностью, развивающейся вследствие дисфункции селезёнки в условиях ОС при СД2. Введение ИФ в обеих исследуемых дозах восстанавливало количество моноцитов и гранулоцитов в крови (Рис. 1Е-1F).

Для исследования показателей ПОЛ-АОЗ в тканях были выбраны селезенка – орган иммунной системы, и печень – орган, интегрирующий обмен белков, липидов, углеводов и ответственный за обезвреживание эндогенных и экзогенных токсикантов. У крыс с экспериментальным СД2 содержание МДА возрастало во всех 3 исследованных биологических материалах – в крови, печени и селезёнке (Рис. 2G-I). В селезёнке увеличивалась активность СОД (Рис. 2Е) и снижался уровень GSH (Рис. 2К), в печени снижалась активность САТ (Рис. 2С) и увеличивалось содержание GSH (Рис. 2L).

Введение ИФ животным с СД2 нормализовало активность САТ в печени (Рис. 2С), активность СОД в селезёнке (Рис. 2С,Е) уровень МДА в селезёнке и печени (Рис. 2H-I), содержание GSH в селезёнке (Рис. 2К) до показателей здорового контроля вне зависимости от вводимой дозы.

Кроме того, при введении здоровым животным ИФ в дозе 300 мг/кг отмечено снижение уровня GSH в селезёнке по сравнению с показателями контрольных животных. Напротив, в печени мы наблюдаем тенденцию к увеличению содержания GSH во всех экспериментальных группах (Рис. 2L). Содержание GSH в органе является результатом соотношения скорости процессов его синтеза и расходования, которые, в свою очередь, зависят от количества продуктов перекисного окисления, образующихся под действием стресса. Печень является основным местом продукции GSH в организме и его количество в печени отражает потребности в глутатионе всего организма, что, вероятно, обуславливает высокое содержание GSH в печени при любой стрессовой ситуации, будь то развитие СД2 или манипуляции, связанные с пероральным введением ИФ.

Отдельно стоит отметить, что различный эффект от введения ИФ в разных дозах наблюдался при оценке активности САТ и СОД в эритроцитах, при этом активность ферментов у крыс с СД2 при введении дозы 600 мг/кг была на уровне здорового контроля.

Практической ценностью работы являются новые экспериментальные данные, характеризующие состояние системы перекисного окисления липидов-антиоксидантной защиты в селезёнке и печени при введении экстрактов изофлавонов цветков красного клевера (*Trifolium pratense*) крысам с экспериментальным диабетом 2 типа, а также демонстрация

иммунофармакологического действия данных экстрактов, заключающегося в ослаблении оксидативного стресса в селезёнке в модели диабета 2 типа.

4 Выводы

1) Экспериментальный СД2 способствует развитию окислительного стресса в тканях селезёнки и печени.

2) Экстракты ИФ цветков красного клевера (*Trifolium pretense*) способствуют ослаблению оксидативного стресса в селезёнке и печени, снижению гликемии и восстановлению числа моноцитов и гранулоцитов в крови.

3) Влияние экстрактов ИФ красного клевера (*Trifolium pretense*) на активность ферментов АОЗ СОД и каталазы в крови отличается в зависимости от вводимой дозы, введение в дозе 600 мг/кг нормализует активность данных ферментов, при введении в дозе 300 мг/кг этого не наблюдается.

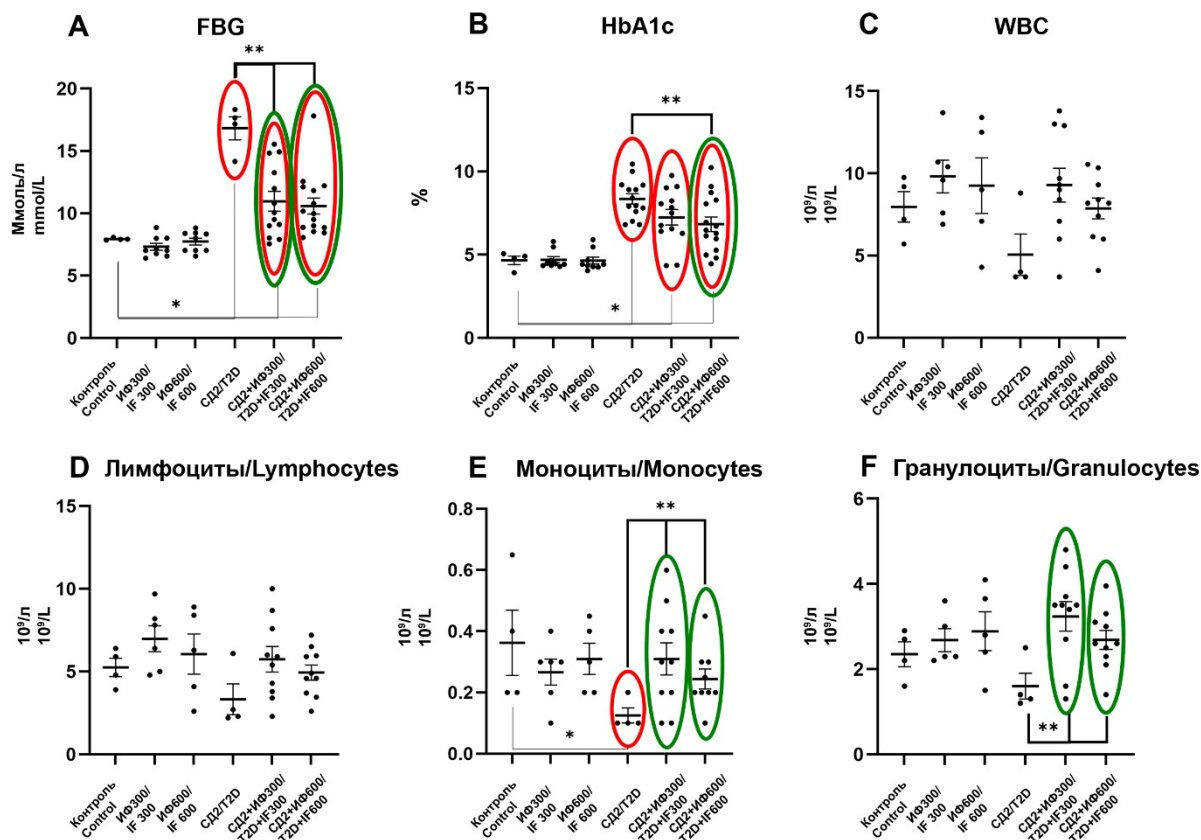
Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-25-20147 (<https://rscf.ru/project/24-25-20147>) и Правительства Свердловской области.

Конфликт интересов отсутствует.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Влияние изофлавонов красного клевера (*Trifolium pratense*) на показатели крови у крыс с экспериментальным СД2, $M \pm m$, значение каждого животного показано отдельной точкой.

Figure 1. Effect of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on the blood parameters in rats with experimental T2D, $M \pm m$, the value of each animal is shown as a separate point.

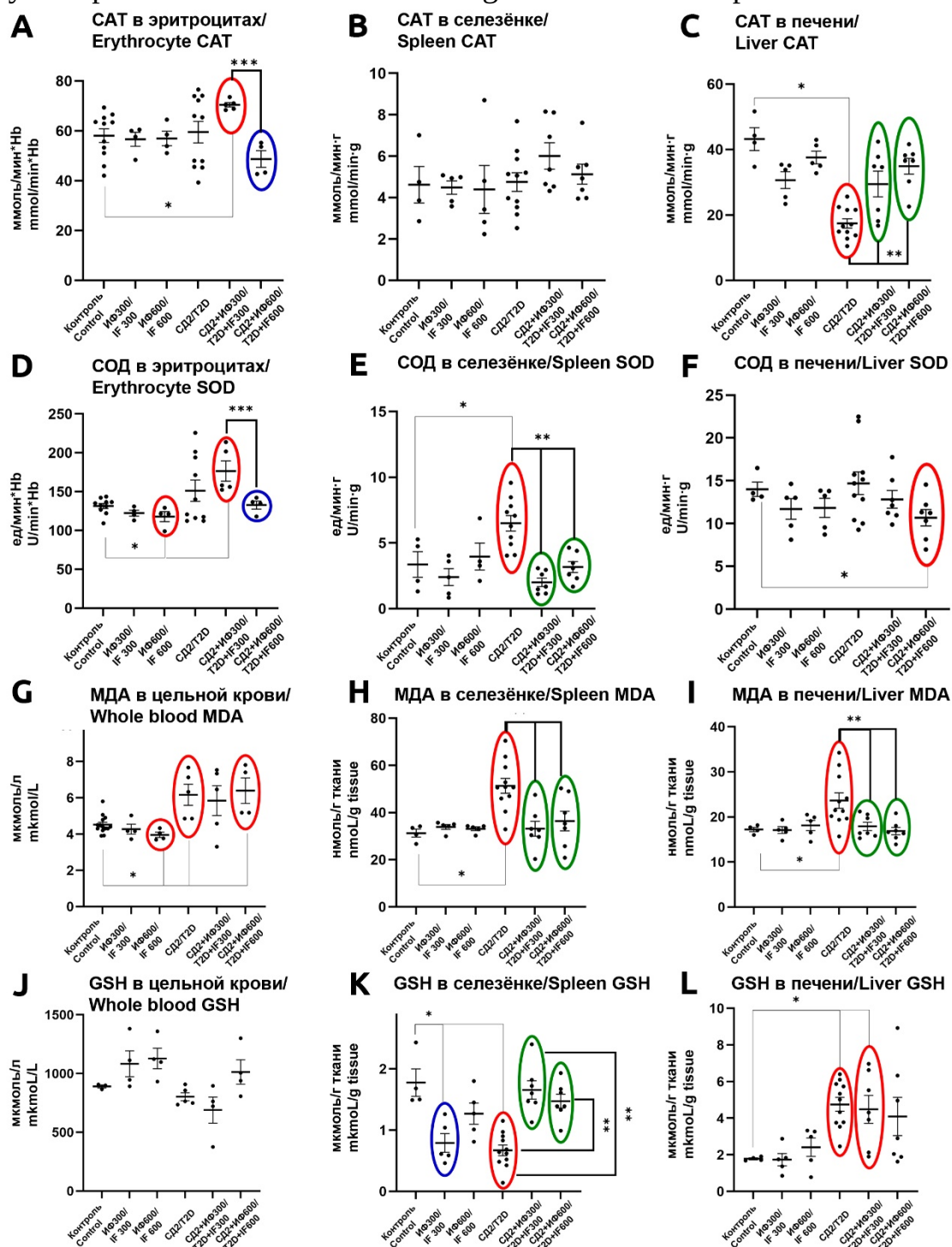


Примечание: СД2 – экспериментальный сахарный диабет 2 типа; ИФ – изофлавоны; ИФ300 и ИФ600 – дозы ИФ 300 и 600 мг/кг соответственно; FBG (fasting blood glucose) – концентрация глюкозы в крови натощак; WBC (white blood cell) – лейкоциты; * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой здоровых животных; ** – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой животных с СД2. Красным овалом отмечено отличие показателя от здорового контроля, зелёным – отличие от СД2 при приёме ИФ.

Note: СД2 – experimental diabetes mellitus type 2; ИФ – isoflavones; ИФ300 and ИФ600 – doses of IF of 300 and 600 mg/kg, respectively; FBG (fasting blood glucose) – fasting blood glucose concentration; WBC (white blood cell) – leukocytes; * – $p < 0.05$ in comparison with the control group of healthy animals; ** – $p < 0.05$ in comparison with the control group of animals with DM2. The red oval marks the difference from the healthy control, the green one shows the difference between T2DM and T2D+IF.

Рисунок 2. Влияние изофлавонов красного клевера (*Trifolium pratense*) на показатели системы ПОЛ-АОЗ в крови и органах у крыс с экспериментальным СД2.

Figure 2. Effect of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on the LPO-AOD system parameters in the blood and organs of rats with experimental T2DM.



Примечание: СД2 – экспериментальный сахарный диабет 2 типа; ИФ – изофлавоны; ИФ300 и ИФ600 – дозы ИФ 300 и 600 мг/кг соответственно; CAT – активность каталазы; СОД – активность супероксиддисмутазы; MDA – уровень малонового диальдегида; GSH – содержание восстановленного глутатиона; * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой здоровых

животных; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой животных с СД2; *** – $p < 0,05$ в сравнении с группой животных СД2 + ИФ600. Красным овалом отмечено отличие показателя от здорового контроля, зелёным – отличие от СД2 при приёме ИФ, синим – отличие между животными с СД2, получавшими разные дозы ИФ.

Note: СД2 – experimental diabetes mellitus type 2; ИФ – isoflavones; ИФ300 and ИФ600 – doses of IF of 300 and 600 mg/kg, respectively; CAT – catalase activity; СОД – superoxide dismutase activity; МДА – malondialdehyde level; GSH – reduced glutathione content; * – $p < 0.05$ compared to the control group of healthy animals; ** – $p < 0.05$ in comparison with the control group of animals with DM2; *** – $p < 0.05$ compared to animals with T2DM + IF600. The red oval shows the difference from the healthy control, the green one shows the difference between T2DM and T2D+IF, and the blue one shows the difference between animals with T2DM that received different doses of IF.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Туканов Данил Александрович, аспирант ИИФ УрО РАН; лаборант-исследователь лаборатории функционального дизайна нанокластерных полиоксиметаллатов Института естественных наук и математики УрФУ; адрес: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, дом 106, ИИФ УрО РАН, Соколовой К.В.;

телефон: 8(906)800-72-58;

e-mail: xenia.socolova@gmail.com

Tukanov Danil A., graduate student of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Laboratory Assistant-Researcher, Laboratory of Functional Design of Nanocluster Polyoxymetallates, Institute of Natural Sciences, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin;

address: 106, Pervomayskaya str., Yekaterinburg, 620049, Institute of Immunology and Physiology UB RAS;

telephone: 8(906)800-72-58;

e-mail: xenia.socolova@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Соколова Ксения Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН; лаборант кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики УрФУ;

Sokolova Ksenia V., Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Assistant, Medical Biochemistry and Biophysics Department, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin.

Блок 3. Метаданные статьи

ИЗОФЛАВОНЫ КРАСНОГО КЛЕВЕРА (TRIFOLIUM PRATENSE)
СНИЖАЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СЕЛЕЗЁНКЕ И ПЕЧЕНИ КРЫС С
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА
RED CLOVER (TRIFOLIUM PRATENSE) ISOFLAVONES REDUCE
OXIDATIVE STRESS IN THE SPLEEN AND LIVER OF RATS WITH
EXPERIMENTAL TYPE 2 DIABETES

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ИФ СНИЖАЮТ ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС ПРИ СД2

IF REDUCE OXIDATIVE STRESS IN T2D

Ключевые слова: оксидативный стресс, селезёнка, печень, сахарный диабет 2 типа, изофлавоны, *Trifolium pratense*.

Keywords: oxidative stress, spleen, liver, type 2 diabetes, isoflavones, *Trifolium pratense*.

Иммунологические чтения в Челябинске.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

29.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1.	Вольхина И.В., Бутолин Е.Г. Оксидативный стресс и изменения показателей обмена сialoglycoconjugate печени крыс с аллоксановым сахарным диабетом. Сахарный диабет. – 2022. – Т. 25, №3. – С. 249-255. https://doi.org/10.14341/DM12763	Volkhina I.V., Butolin E.G. Oxidative stress and changes in liver sialoglycoconjugate metabolic parameters in rats with alloxanic diabetes mellitus. <i>Diabetes mellitus</i> . 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 249-255. https://doi.org/10.14341/DM12763	https://doi.org/10.14341/DM12763
2.	Емельянов В.В., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Сидорова Л.П., Цейтлер Т.А., Мухлынина Е.А. Влияние соединения класса 1,3,4-тиадиазинов на выраженность окислительного стресса при экспериментальном сахарном диабете 2 типа. Химико-фармацевтический журнал. – 2023. –Т.57, № 3. – С. 20-24. doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-3-20-24	Emelianov V.V., Gette I.F., Danilova I.G., Sidorova L.P., Zeitler T.A., Mukhlynina E.A. Effect of 1,3,4-thiadiazine class compounds on the severity of oxidative stress in experimental type 2 diabetes mellitus. <i>Chemical and pharmaceutical journal</i> . 2023. Vol. 57, No. 3. pp. 20-24. doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-3-20-24	http://chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/6952
3.	Соколова К.В., Гетте И.Ф., Туканов Д.А., Данилова И.Г. Особенности оксидативного стресса в печени и селезёнке крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа // [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. – 2024. – Т. 21, № 5,	Sokolova K.V., Gette I.F., Tukanov D.A., Danilova I.G. Peculiarities of oxidative stress in the liver and spleen of rats with experimental type 2 diabetes mellitus. [Online] <i>Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science</i> . 2024, Vol. 21, no. 5, pp. 565-573.	http://vestnikural.ru/uploads/2024/5/VUMAN_5_2024_565-573.pdf

	C. 565–573, DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-5-565-573	DOI: 10.22138/2500-09182024-21-5-565-573	
4.	Aboushanab S.A., Shevyrin V.A., Melekhin V.V., Andreeva E.I., Makeev O.G., Kovaleva E.G. Cytotoxic Activity and Phytochemical Screening of Eco-Friendly Extracted Flavonoids from Pueraria montana var. lobata (Willd.) Sanjappa & Pradeep and Trifolium pratense L. Flowers Using HPLC-DAD-MS/HRMS // <i>AppliedChem.</i> 2023; 3(1):119-140. https://doi.org/10.3390/appliedchem3010009	-	https://www.mdpi.com/2673-9623/3/1/9
5.	Akbaribazm M., Khazaei M.R., Khazaei M. Phytochemicals and antioxidant activity of alcoholic/hydroalcoholic extract of Trifolium pratense // <i>Chinese Herbal Medicines</i> , Volume 12, Issue 3, 2020, Pages 326-335, https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.02.002	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674638420300575?via%3Dihub
6.	Caturano A, D'Angelo M, Mormone A, Russo V, Mollica MP, Salvatore T, Galiero R, Rinaldi L, Vetrano E, Marfella R, Monda M, Giordano A, Sasso FC. Oxidative Stress in Type 2 Diabetes: Impacts from Pathogenesis to Lifestyle Modifications. <i>Curr Issues Mol</i>	-	https://www.mdpi.com/1467-3045/45/8/420

	<i>Biol. 2023 Aug 12;45(8):6651-6666. doi: 10.3390/cimb45080420</i>		
7.	Dias, H.F., Fu, J.F., Luck, T.G. et al. The spleen assumes a major role in blood glucose regulation in type 1 diabetes patients treated with BCG. <i>Sci Rep</i> 14, 17611 (2024). https://doi.org/10.1038/s41598-024-67905-x	-	https://www.nature.com/articles/s41598-024-67905-x
8.	Hanchang W, Wongmanee N, Yoopum S, Rojanaverawong W. Protective role of hesperidin against diabetes induced spleen damage: Mechanism associated with oxidative stress and inflammation. <i>J Food Biochem.</i> 2022 Dec;46(12):e14444. doi: 10.1111/jfbc.14444	-	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.14444
9.	Janssen LMM, Hiligsmann M, Elissen AMJ, Joore MA, Schaper NC, Bosma JHA, Stehouwer CDA, Sep SJS, Koster A, Schram MT, Evers SMAA. Burden of disease of type 2 diabetes mellitus: cost of illness and quality of life estimated using the Maastricht Study. <i>Diabet Med.</i> 2020 Oct;37(10):1759-1765. doi: 10.1111/dme.14285	-	https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dme.14285

10	Jasvinder Singh Bhatti, Abhishek Sehrawat, Jayapriya Mishra, Inderpal Singh Sidhu, Umashanker Navik, Naina Khullar, Shashank Kumar, Gurjit Kaur Bhatti, P. Hemachandra Reddy Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives // <i>Free Radical Biology and Medicine</i> . – 2022. – Vol. 184, pp. 114-134, https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.019	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584922001228?via%3Dihub
11.	Masiello P., Broca C., Gross R., [et al.] Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. <i>Diabetes</i> . – 1998. – Vol. 47 (2). – P. 224-9	-	https://diabetesjournals.org/diabetes/article/47/2/224/9981/Experimental-NIDDM-Development-of-a-New-Model-in
12	Mora-Ortiz, M., Nuñez Ramos, P., Oregioni, A. et al. NMR metabolomics identifies over 60 biomarkers associated with Type II Diabetes impairment in db/db mice. <i>Metabolomics</i> 15, 89 (2019). https://doi.org/10.1007/s11306-019-1548-8	-	https://link.springer.com/article/10.1007/s11306-019-1548-8