



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Маријана М. Анђић

**Развој топикалних формулација на бази етарског
уља смиља (*Helichrysum italicum*) и испитивање
њиховог потенцијала у третману рана и
инфламације**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024. године



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Marijana M. Anđić

**Development of topical formulations based on
Immortelle essential oil (*Helichrysum italicum*) and
investigation of their potential in the treatment of
wounds and inflammation**

Doctoral disertation

Kragujevac, 2024.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор	
Име и презиме: Маријана Анђић	
Датум и место рођења: 10.09.1993. године., Крагујевац, Република Србија	
Садашње запослење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
Докторска дисертација	
Наслов: Развој топикалних формулација на бази етарског уља смиља (<i>Helichrysum italicum</i>) и испитивање њиховог потенцијала у третману рана и инфламације	
Број страница: 131	
Број слика: 17; графика: 36; табела: 15	
Број библиографских података: 256	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац	
Научна област (УДК): Медицина	
Ментор: Проф. др Јована Брадић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу	
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: бр. IV-03-564/18 од 14.07.2021.	

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Marijana Anđić
Date and place of birth: 10.09.1993., Kragujevac, Serbia
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Development of topical formulations based on Immortelle essential oil (<i>Helichrysum italicum</i>) and investigation of their potential in the treatment of wounds and inflammation
No. of pages: 131
No. of images: 17; No. of figures: 36; No. of tables:15
No. of bibliographic data: 256
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Prof. Jovana Bradić, Associate professor at Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Topic Application Date: 9.04.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-564/18 from 14.07.2021.

ЗАХВАЛНИЦА

Посебну захвалност дугујем професору Владимиру Јаковљевићу, на указаном поверењу, неуморном охрабривању и веровању у мене. Ваша безусловна подршка и посвећеност мом академском развоју представљају темељ мог успеха, на чему ћу Вам заувек бити захвална.

Неизмерну захвалност дугујем својој менторки проф. др Јовани Брадић, која је са мном прошла дуг пут, од иницијалне идеје до крајње реализације докторске дисертације, дајући ми драгоцену стручну и пријатељску помоћ и подршку.

Захваљујем се драгим колегама из Центра за претклиничка и функционална истраживања, за несебичну стручну помоћ, моралну подршку и пријатељску атмосферу током целокупне израде докторске дисертације. Посебну захвалност дугујем Невени Лазаревић, Александру Кочовићу, Владимиру Живковићу, Анђели Милојевић Шамановић, Јовани Новаковић и Марини Николић на заједничком раду, солидарности, колегијалном духу и непресушној подршци током спровођења истраживања.

Захваљујем се својим колегама са Катедре за Фармацеутску технологију, на колегијалној подршци, разумевању и саветима у току израде дисертације.

Највећу захвалност дугујем својој породици, родитељима Рајки и Милинку и браћи Николи и Марку, за безусловну љубав, подршку и разумевање, без којих никада не бих била оно што данас јесам. Срећна, задовољна и захвална што сте део мог живота.

Мами и тати

Ваша Маријана

САЖЕТАК

Циљ истраживања био је развој и карактеризација формулација са етарским уљем *Helichrysum italicum* и испитивање безбедности и ефикасности локалне примене датих формулација. Испитивање безбедности спроведено према ОЕСД смерницама показало је да су маст и гел на бази етарског уља смиља безбедни за дермалну примену. У складу са тим, даље је спроведено испитивање локалног антиинфламацијског потенцијала формулација на бази смиља на моделу карагенаном индуковане инфламације. Способност антиинфламацијске активности формулација смиља је процењена праћењем развоја едема шапе, али и маркера инфламације и оксидационог стреса. Резултати показују да топикалне формулације на бази етарског уља смиља испољавају значајан инхибиторни ефекат на повећање едема шапа пацова. Додатно, примећена је значајна модулација концентрације маркера инфламације и оксидационог стреса у групама третираним формулацијама на бази смиља. Ефикасност формулација у процесу зарастања рана испитивана је на моделима рана формираних методом ексцизије и инцизије. Одговор на третман је процењен макроскопском, биохемијском и хистопатолошком анализом. Локална примена масти и гела на бази уља смиља показала је највећу контракцију ране са највећим садржајем хидроксипролина и у моделу инцизије и моделу ексцизије. Боља способност реепителизације препарата са смиљем огледа се и у хистопатолошким резултатима који указују на повећану густину колагених влакана. Добијени резултати последица су и антиинфламацијске и антиоксидационе активности која је показана детектовањем датих маркера у хомогенату ткива. Наши резултати указују да би примена формулација на бази етарског уља смиља биле обећавајуће и иновативно средство како за лечење локалне инфламације тако и за зарастање рана.

Кључне речи: *Helichrysum italicum*; етарско уље; зарастање рана; инфламација; оксидациони стрес.

ABSTRACT

The aim was the development and characterization of formulations based on *Helichrysum italicum* essential oil and testing the safety and effectiveness of their local application. A safety study conducted according to OECD guidelines showed that the formulations based on immortelle essential oil are safe for dermal application. Accordingly, the local anti-inflammatory potential of immortelle-based formulations was investigated in the carrageenan-induced inflammation model. The ability of anti-inflammatory activity was evaluated by monitoring the development of paw edema, as well as markers of inflammation and oxidative stress. The results have shown that topical formulations based on immortelle essential oil exert a significant inhibitory effect on the increase in rat paw edema. Additionally, a significant modulation of the concentration of markers of inflammation and oxidative stress was observed in groups treated with immortelle oil-based formulations. The effectiveness of the formulations in the wound healing process was examined on wounds created by the excision and incision. Response to treatment was assessed by macroscopic, biochemical, and histopathological analysis. Topical application of ointment and gel based on immortelle oil showed the greatest contraction of the wound with the highest content of hydroxyproline in both models. The better re-epithelialization ability is also observed via histopathological results, indicating an increased density of collagen fibers. The obtained results are the consequence of both anti-inflammatory and antioxidant activity, demonstrated by detecting the markers in the tissue homogenate. Our results indicate that immortelle formulations could be a promising tool for both local inflammation and wound healing.

Key words: *Helichrysum italicum*; essential oil; wound healing; inflammation; oxidative stress.

САДРЖАЈ

I УВОД.....	1
1.1. <i>Helichrysum italicum</i>	2
1.1.1. Морфолошка својства	2
1.1.2. Етимологија.....	2
1.1.3. Ботаничка класификација	3
1.1.4. Распрострањеност	3
1.1.5. Традиционална употреба	4
1.1.6. Етарско уље.....	5
1.1.7. Хемијски састав етарског уља	5
1.1.8. Биолошка активност етарског уља.....	11
1.2. Инфламација	14
1.3. Ране и процес зарастања	15
1.3.1. Ране: дефиниција и класификација	15
1.3.2. Зарастање рана.....	16
1.3.3. Фактори који одлажу процес зарастања рана.....	21
1.3.4. Дијабетес мелитус као узрок одложеног зарастања рана.....	22
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	24
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	26
3.1. Етарско уље смиља	27
3.1.1. Узорак.....	27
3.1.2. Хемијска карактеризација.....	27
3.1.3. Антиоксидациони потенцијал	27
3.2. Топикалне формулације на бази етарског уља смиља	30
3.2.1. Развој топикалних формулација	30
3.2.2. Карактеризација топикалних формулација.....	31
3.3. Испитивање безбедности и ефикасности препарата на бази етарског уља смиља	32
3.3.1. Акутна дермална иритација.....	33
3.3.2. Антиинфламацијска активност	34
3.3.3. Третман зарастања рана	38
3.4. Снага студије и величина узорка	45
3.5. Статистичка обрада и анализа података	45
IV РЕЗУЛТАТИ.....	46
4.1. Хемијска карактеризација етарског уља смиља	47
4.2. Антиоксидациони потенцијал етарског уља смиља	49
4.3. Карактеризација топикалних формулација етарског уља смиља	50
4.3.1. Карактеризација масти на бази етарског уља смиља	50
4.3.2. Карактеризација гела на бази етарског уља смиља	52

4.4. Акутна дермална иритација	54
4.4.1. Маст на бази етарског уља смиља	54
4.4.2. Гел на бази етарског уља смиља	54
4.5. Антиинфламацијска активност испитиваних формулација	54
4.5.1. Дебљина шапе	54
4.5.2. Маркери инфламације у хомогенату шапе	56
4.5.3. Маркери оксидационог стреса у хомогенату шапе	58
4.6. Ефекти топикалних формулација на процес зарастања рана изазваних методом ексцизије	60
4.6.1. Дневни унос хране и воде	60
4.6.2. Телесна маса и гликемија	61
4.6.3. Контракција ране	62
4.6.4. Садржај хидроксипролина	66
4.6.5. Маркери инфламације у хомогенату ткива	68
4.6.6. Хистолошка и имунохистохемијска анализа	69
4.6.7. Маркери оксидационог стреса у хомогенату ткива	75
4.6.8. Системски редокс статус	76
4.7. Ефекти топикалних формулација на процес зарастања рана изазваних методом инцизије	79
4.7.1. Дневни унос хране и воде	79
4.7.2. Телесна маса и гликемија	80
4.7.3. Контракција ране	81
4.7.4. Садржај хидроксипролина	86
4.7.5. Маркери инфламације у хомогенату ткива	87
4.7.6. Хистолошка и имунохистохемијска анализа	89
4.7.7. Маркери оксидационог стреса у хомогенату ткива	93
4.7.8. Системски редокс статус	95
V ДИСКУСИЈА	98
5.1. Карактеризација етарског уља смиља	100
5.1.1. Хемијски састав етарског уља	100
5.1.2. Антиоксидациона активност етарског уља	101
5.2. Формулација и процена стабилности масти и гела на бази етарског уља ..	102
5.3. Испитивање безбедности и ефикасности примене формулација на бази смиља	105
5.3.1. Акутна дермална иритација	105
5.3.2. Антиинфламацијска активност формулација на бази етарског уља смиља	106
5.3.3. Улога формулација на бази етарског уља смиља у терапији зарастања рана	109
VI ЗАКЉУЧЦИ	114
VII ЛИТЕРАТУРА	116

I УВОД

1. УВОД

1.1. *Helichrysum italicum*

1.1.1. Морфолошка својства

Helichrysum italicum (*H. italicum*) је вишегодишња, ароматична биљка која растом формира полужбун. Припада породици *Asteraceae*, а распрострањена је дуж Медитерана и у југоисточној Европи (1). Ова ароматична биљка је у основи дрвенаста, а може постићи висину 50 до 70 cm (Слика 1). У горњем делу стабљика је обично разграната и носи наизменичне, дугуљасте и длакаве листове, дужине 2–5 cm. Листови су на лицу зеленкасте боје, док су на наличју сребрнкасти и смењују се дуж целе стабљике до цвасти. На вршним гранчицама формирају се главичасте цвасти са 10-30 па чак и до 100 цветова. Цветови су карактеристичне златно-жуте боје, а свој изглед, боју и карактеристичан мирис на арому зачина кари задржавају и након сушења (2).

Биљка цвета у периоду од маја до септембра месеца, а након оплодне цветови брзо сазревају (3, 4). Цветни пупољци се најчешће користе за добијање сировог лека који се користи у медицинске сврхе, док се надземни делови сакупљају и користе углавном за изоловање етарског уља (5, 6). Плодови су руже прожете белим и сјајним жилицама док је семе веома ситно, издужено и готово црне боје. Опрашивање се спроводи инсектима чиме се сврстава у медоносне биљке, а мед који је сакупљен са цветова ове биљке је изразитог ароматичног укуса и тамне боје (7).



Слика 1. *Helichrysum italicum* - смиље

1.1.2. Етимологија

Име рода, *Helichrysum* води порекло од грчке речи “*helios*” што значи сунце и “*chryos*” што значи злато и асоцира на јарко жуту боју цветова биљних врста овог рода. Друго, али знатно ређе, тумачење порекла имена рода се може односити на биљку златних цветова „*helix*“ која је добила име по вечном цвету. Име врсте, *italicum*, је изведено од имена државе у којој је ова биљна врста по први пут описана, Италији (8).

С обзиром да цветови свој изглед, мирис и боју задржавају дуго времена након брања ова биљна врста се веома често назива и „вечна“ или „бесмртна“ биљка. У складу са тим поседује народне називе попут енглеског *everlasting flower* или француског *immortelle*, који је својом симболиком довео до тога да овај цвет асоцира на вечни живот. Додатно, носи назив и *perpétuasde-Itália* (италијански) и *perpétuas-das-areias* (португалски) (9). Због свог карактеристичног мириса, који подсећа на арому зачина кари, назива се још и *curry plant* (10).

У нашој земљи се овај таксон назива смиље, жуто смиље, цмиље, златноцветна трава, бесмртно цвеће, знељек, ласка камилица, марјетица, снељек (11).

1.1.3. Ботаничка класификација

H. italicum припада роду *Helichrysum*, у који се убраја око 600 биљних врсти, које су већином жбунолике вишегодишње биљке. Врсте овог рода су ксерофити, па су самим тим прилагођени срединама у којима нема воде (4, 12). У Табели 1 је приказана таксономска припадност врсте *H. italicum*.

Табела 1. Таксономска припадност *H. italicum*

Таксономска категорија	Таксони
Царство	Plantae
Одељак	Tracheophyta
Класа	Spermatopsida
Поткласа	Magnoliidae
Ред	Asterales
Фамилија	Asteraceae
Род	<i>Helichrysum</i>
Врста	<i>Helichrysum italicum</i>

1.1.4. Распрострањеност

Око 25 врста рода *Helichrysum* је распрострањено у Европи и Медитерану, док су остале врсте овог рода претежно распрострањене у Азији, Африци и Аустралији (1). Способност да природно расту на сувим, пешчаним и каменитим медитеранским пределима, као и на широком распону надморских висина, од нивоа мора до 2200 m, базирано је на чињеници да су врсте овог рода ксерофити (13, 14).

H. italicum се, у зависности од распрострањености у различитим регионима Медитерана, може поделити на шест подврста, као што је приказано у Табели 2. Ипак, снажан полиморфизам присутан у морфологији *H. italicum*, проузроковао је да се подврсте овог рода веома често преклапају и самим тим је веома тешко направити јасну разлику између њих (1). У Републици Србији је заступљена подврста *H. italicum* (Roth) G. Don, а најзасупљенија је у Војводини, источној Србији, Делиблатској пешчари, Рамском песку и Кладову (15).

Табела 2. Подврсте и распрострањеност *H. italicum*

Подврста	Распрострањеност
<i>H. italicum</i> (Roth) G. Don subsp. <i>italicum</i>	Италија, Хрватска, Француска, Корзика, Босна и Херцеговина, Србија, Црна Гора, Словенија, Грчка...
<i>H. italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyma	Мајорка, Сардинија, Драгонера, Корзика, Сардинија, Кипар и Крит
<i>H. italicum</i> subsp. <i>picardii</i> Franco	Италија, Шпанија, Португал и Француска
<i>H. italicum</i> subsp. <i>pseudolitoreum</i> (Fiori) Vacch. & al	Арђентарио, Гаргано, Монте Конеро
<i>H. italicum</i> subsp. <i>serotinum</i> (Boiss.) P.Fourn.	Пиринејско полуострво
<i>H. italicum</i> subsp. <i>siculum</i> (Jord. & Fourn.) Galbany & al	Сицилија

1.1.5. Традиционална употреба

Први писани подаци који указују на примену врста из рода *Helichrysum* се најчешће односе на целину *Helichrysum* рода, без јасне назнаке на коју врсту се прецизно мисли. Чињеница да је реч о веома сложену роду, који поседује значајне сличности између појединих врста, свакако може оправдати историјске потешкоће у исправној идентификацији биљака овог рода (16). Подаци датирају још из античких времена где је први пут у делу „*Historia Plantarum*“, у 2. веку пре нове ере, описано да се *Helichrysum* може користити у лечењу опекотина у комбинацији са медом, као и код убода или уједа отровних животиња (17). У записима из 1. века нове ере, који су објављени у четвртој књизи „*De Materia Medica*“ описано је да *Helichrysum* цветови, мацеровани у вино поседују диуретичка својства и да имају улогу у лечењу поремећаја мокрења, уједа змија, ишијаса и киле (18).

Појединачно посматрано, *H. italicum* (Roth) G. Don поседује веома важну улогу у традиционалној медицини медитеранских земаља. Бројна етнофармаколошка истраживања показују да је најчешћа традиционална употреба *H. italicum* повезана са респираторним, дигестивним и инфламацијским стањима коже, која укључују третмане респираторних или цревних инфекција, астме као и ране и запаљења коже (1, 19). У зависности од индикације, препарати смиља се примењују орално, у виду инхалације или у облику локално примењеног препарата. Друге терапеутске примене укључују његову антимикробну активност, улогу у третману поремећаја жучи и мокраћне бешике, у терапији бола, снижавању крвног притиска и холестерола, али и повећању имунитета. Иако инфузи и декокти, намењени како за оралну тако и за спољашњу употребу, представљају најчешће коришћене облике, примена прашкова и сокова такође заузима значајно место (20).

Последњих година велико интересовање за примену ове биљне врсте је примећено у многим земљама јужне Европе, углавном због веома потентног етарског уља и његове употребе у парфемској и козметичкој индустрији. За етарско уље *H. italicum*, зарастање рана и друга стања коже попут хематома и ожиљака истакнути су као интересантне ароматерапијске апликације, за које се наводи да су „ефекти етарског уља толико убедљиви да никада није наишло на било какву критику упркос одсуству података о његовој ефикасности“ (21).

Поред своје значајне употребе у традиционалној медицини, *H. italicum* заузима значајно место и у индустрији хране. Често се користи као кулинарски зачин, за ароматизовање локалних јела, салата, као и свињског меса због мириса налик карију (22). У новије време се примењује и као сировина за производњу биопестицида и средстава за заштиту хране. У Европи се годинама користи за освежавање простора и одбијање инсеката (23).

Употребна вредност *H. italicum* међу Словенским народима датира од давнина, па је у многим народним песмама смиље описано као леп и мирисни цвет који служи за кићење девојака и момака. Због лепоте и мириса цвета смиља имена која асоцирају на назив саме биљке попут Смиља, Смиљка или Смиљана су веома често давана деци. Девојке су на глави носиле венчиће направљене од жутих цветова смиља, сматрајући да ће то донети већу плодност.

1.1.6. Етарско уље

Етарско уље смиља је сложена течност, светло жуте боје, састављена од испарљивих секундарних метаболита биљака, које карактеришу слаткаст, слојевит и интезиван ароматичан мирис сличан карију (24). Производи се процесом хидродестилације жлезданих длачица присутних на листовима и цветним главама или процесом парне дестилације користећи ране цветне врхове ове биљне врсте. Берба цветова се одвија у тренутку када је смиље у пуној зрелости, односно када је отворено око 50% цветова. Период брања утиче на садржај етарског уља, па се тако берба обавља у раним јутарњим часовима, када је концентрација етарског уља највећа. Концентрација етарског уља након брања веома брзо опада, па је стога неопходно да се процес дестилације обави у року од 24 сата. У супротном, долази до ферментације цветова, што узрокује промену хемијског састава и терапијске активности. Изузетно низак садржај етарског уља у самој биљној врсти, око 0,05% доприноси веома високој цени етарског уља, с обзиром да је за један килограм етарског уља неопходно више од тоне цветних врхова (25). Етарско уље представља извор веома сложених природних мешавинама, чије су варијације у саставу и концентрацији биоактивних једињења последица климе, састава земљишта, биљног органа, старости и фазе вегетативног циклуса. Хемијски састав етарског уља представља низ великог броја једињења веома сличне структуре и сличних физичко-хемијских својстава, што значајно отежава њихову идентификацију (24-26).

1.1.7. Хемијски састав етарског уља

Смиље је биљна врста која годинама интригира научну јавност, што је резултовало великим бројем спроведених фитохемијских истраживања у циљу његове ближе карактеризације. Резултати указују на веома комплексан хемијски састав различитих екстраката и етарског уља смиља, међу којима у широком спектру хемијских једињења доминирају флавоноиди, α -пирони, фенолне киселине, ацетофенони, треметони, монотерпени, сесквитерпени и тритерпени. Важно је нагласити да је поређење хемијског састава етарских уља и екстраката из различитих региона Медитерана показало различите саставе биоактивних једињења међу узорцима. Главни фактори који утичу на варијабилност састава су еколошке карактеристике места узгоја, попут екологије, климе и географског положаја, али и фаза развоја биљке, текстура и киселост земљишта, као и генотип или подврста биљне врсте (27-29).

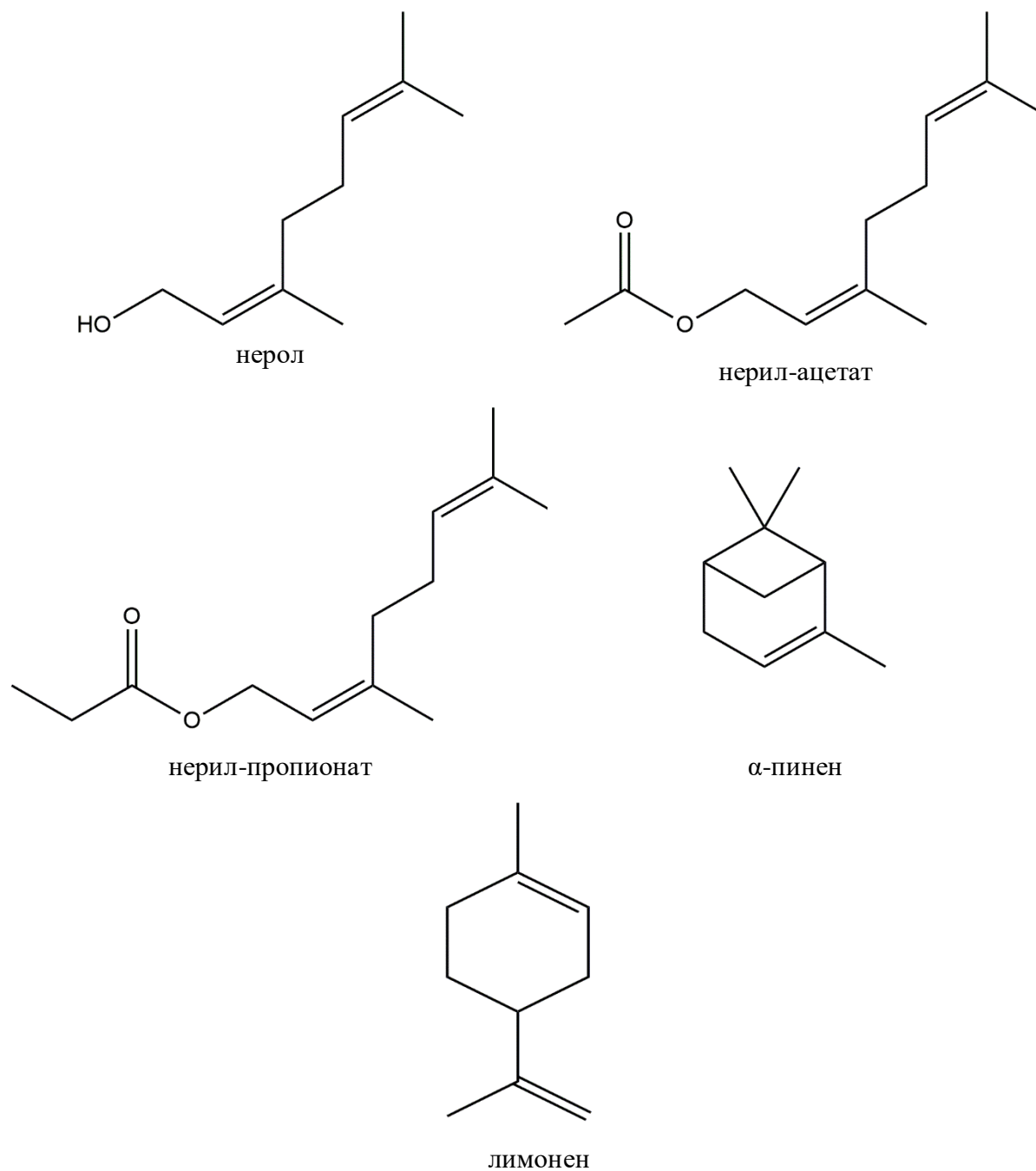
Као што смо и напоменули, постоји више подтипова смиља, који у односу на географско порекло поседују специфичан хемијски састав. На основу тога, у зависности од доминантних хемијских једињења разликујемо више различитих генотипова етарског

уља, у којима од хемијских једињења доминирају монотерпени и сесквитерпени. Као монотерпени највише се издвајају нерол, нерил-ацетат, α -пинен, лимонен, линалол, гераниол док су међу сесквитерпенима најзаступљенији γ -куркумен, α -селинен, β -селинен, еудесм-5-ен-11-ол, неролидол, β -кариофилен (28, 30, 31). Структуре најзаступљенијих моно- и сесквитерпена у етарском уљу смиља приказане су на **Сликама 2 и 3**.

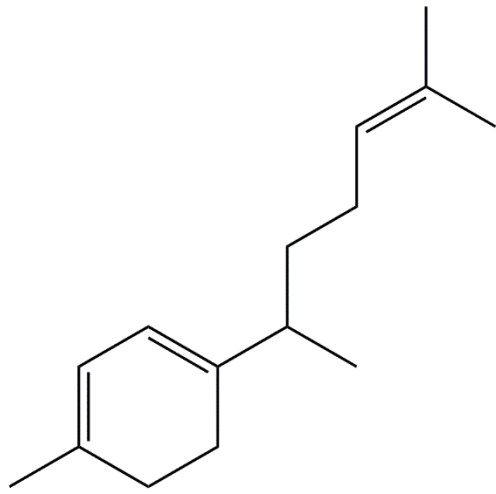
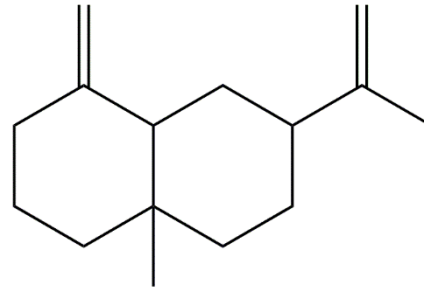
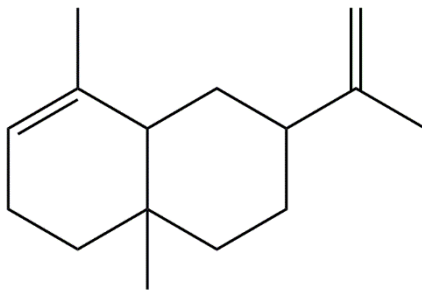
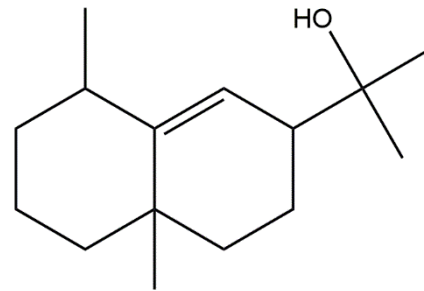
Генотипи етарског уља се разликују у зависности од најзаступљеније компоненте. Па тако, доминантни састојци идентификовани у етарском уљу са подручја Корзике су кисеоникова једињења нерил ацетат, нерил пропионат, алифатични кетони и β -дикетони док је присутан и низак садржај угљоводоника, попут лимонена, γ -куркумена и α -куркумена (32). Висок садржај α -пинена, γ -куркумена, β -селинена, нерил-ацетата и β -кариофилена је главна одлика етарског уља са простора бивше Југославије, док су назаступљенија једињења уља изолованог из биљног материјала скупљеног дуж Јадранске обале α -куркумен и γ -куркумен или α -пинен и нерил ацетат (33). Главне компоненте етарског уља са подручја Грчке су гераниол, геранил-ацетат и неролидол, док су најзаступљенија једињења у уљима са подручја Тоскане α -пинен или нерил-ацетат и високи садржај сесквитерпенских угљоводоника са значајним уделом β -селинена, β -кариофилена и α -селинена (4, 34, 35).

Према литературним подацима, три различита хемотипа су утврђена анализом подврсте *italicum* прикупљеним на различитим локацијама Италије и Корзике, и то: генотип богат неролом и његовим естрима, генотип у којем доминирају β и α -селинен и генотип са високим садржајем γ -куркумена (36-38). Мада, важно је нагласити да се порекло биљне врсте не може одредити само на основу хемијског састава уља, јер се показало да поједине подврсте показују готово исти хемијски састав (4).

Са друге стране, за подврсту *microphyllum* описана су два главна хемотипа. Први хемотип етарског уља као најзаступљеније компоненте садржи нерил-ацетат и нерол док су нерил-пропионат, γ -куркумен и еудесм-5-ен-11-ол такође присутни у значајним количинама. Други хемотип је богат линалолом и γ -куркуменом (39, 40). Преглед литературних података, који показују хемијски састав етарског уља смиља, приказан је у **Табели 3**.



Слика 2. Структуре најзначајнијих монотерпена изолованих из етарског уља *H. italicum*

 γ -куркумен β - селинен α – селинен

еудесм-5-ен-11-ол

Слика 3. Структуре најзначајнијих сесквитерпена изолованих из етарског уља *H. italicum*

Табела 3. Најзаступљеније активне компоненте идентификоване у етарском уљу смиља

Група једињења	Активна компонента	Узорак	Локација	Процент	Референца
Монотерпени	нерил-ацетат	комерцијални	Бугарска	21,20	<i>Balázs et al. (41)</i>
		комерцијални	Хрватска	10,80	<i>Bezek et al. (42)</i>
		херба	Немачка	20,27	<i>Węglarz et al. (23)</i>
		цваст	Немачка	16,38	<i>Węglarz et al. (23)</i>
		цветни надземни део	Црна Гора	29,20	<i>Kladar et al. (43)</i>
	надземни део	Хрватска	10,40	<i>Mastelić et al. (44)</i>	
	нерол	цваст	Немачка	15,73	<i>Węglarz et al. (23)</i>
	нерил-пропаноат	цветни надземни део	Црна Гора	10,10	<i>Kladar et al. (43)</i>
	α-пинен	херба	Немачка	10,42	<i>Węglarz et al. (23)</i>
		лист и стабљика	Хрватска	19,16	<i>Kunc et al. (45)</i>
лимонен	надземни део	Хрватска	12,80	<i>Mastelić et al. (44)</i>	
	надземни део	Хрватска	12,49	<i>Glumac et al. (2)</i>	
гераниол	надземни део	Хрватска	5,74	<i>Glumac et al. (2)</i>	
	херба	Немачка	6,80	<i>Węglarz et al. (23)</i>	
цваст	Немачка	6,32			
геранил-ацетат	надземни део	Алжир	10,05	<i>Djihane et al. (46)</i>	
Сесквитерпени	α-куркумен	комерцијални	Бугарска	15,90	<i>Balázs et al. (41)</i>
	γ-куркумен	комерцијални	Хрватска	18,10	<i>Bezek et al. (42)</i>
		надземни део	Алжир	11,41	<i>Djihane et al. (46)</i>
		цветни надземни део	Црна Гора	18,80	<i>Kladar et al. (43)</i>
	β-селинен	херба	Немачка	8,20	<i>Węglarz et al. (23)</i>
	α-селинен	херба	Немачка	8,20	<i>Węglarz et al. (23)</i>
	росифолиол	цваст	Немачка	6,40	<i>Węglarz et al. (23)</i>
	α-еудесмол	лист и стабљика	Хрватска	16,89	<i>Kunc et al. (45)</i>
	β-еудесмол	лист и стабљика	Хрватска	10,79	<i>Kunc et al. (45)</i>
	италицен	херба	Немачка	6,89	<i>Węglarz et al. (23)</i>
		цваст	Немачка	7,25	<i>Węglarz et al. (23)</i>
		надземни део	Хрватска	3,77	<i>Glumac et al. (2)</i>
	α-кедрен	надземни део	Италија	7,50	<i>Mancini et al. (37)</i>
		надземни део	Алжир	13,61	<i>Djihane et al. (46)</i>
	iso-италицен епоксид	надземни део	Италија	16,80	<i>Mancini et al. (37)</i>
(Z)-α-trans-бергамогол	надземни део	Италија	4,70	<i>Mancini et al. (37)</i>	
2-метилцикло-хексил-пентаноат	надземни део	Хрватска	11,10	<i>Mastelić et al. (44)</i>	
1,7-ди-епи-α-кедрен	надземни део	Хрватска	6,80	<i>Mastelić et al. (44)</i>	

1.1.7.1. Утицај различитих фактора на хемијски састав етарског уља

Литературни подаци указују на то да географско порекло биљне врсте значајно утиче на хемијски састав етарског уља. Поред тога, фаза развоја биљне врсте остварује велики утицај на хемијски састав. Разлике у хемијском саставу етарског уља смиља откривене су испитивањем утицаја развоја ове биљне врсте прикупљене са подручја Јадранске обале током шест различитих фаза раста. Висок садржај α -пинена је детектован у фази пре цветања, док је релативно низак садржај потврђен у фази цветања и након цветања. Слична разлика је уочена и у садржају нерил-ацетата, чија је концентрација значајно опала након цветања, што указује да је његов садржај највиши у најмлађим деловима биљке, а најнижи у старијим деловима, након цветања. Са друге стране, садржај α -куркумена је релативно низак пре, а висок у фази цветања. На основу овога се може извести закључак да у раним фазама развоја биљке доминирају монотерпени, док су сесквитерпени доминантни током и након фазе цветања (47). У прилог овој чињеници су и резултати фитохемијске анализе уља смиља са Сардиније убраног у четири различита стадијума раста, у периоду између фебруара и јула. Нерил-ацетат је приказан као најдоминантнија компонента у свим фазама раста, с тим да се његов садржај након цветања смањило. Садржај нерил-ацетата је у обрнутој корелацији са садржајем 5-еудесмен-11-олом, односно, како се садржај једне компоненте повећа друге се смањује. Додатно, утврђено је да је најбољи састав етарског уља од биљака у јулу (31).

Бројна истраживања су проучавала и значај коришћеног дела биљке на садржај и принос етарског уља. Анализом стабљике и цветова смиља откривено је да је принос етарског уља од 0,18% био знатно већи коришћењем цветова у односу на стабљику са приносом од 0,04%. Главне компоненте етарског уља су биле нерол, нерил-ацетат, нерил-пропионат, лимонен и линалол и њихов садржај је био највиши у фази цветања и значајно је био виши у етарском уљу изолованом коришћењем цветова него стабљика (48).

Како је познато да надморска висина утиче на састав етарског уља група истраживача је дошла до закључка да се највећи принос и састав богат алдехидима, од којих потиче карактеристична арома, очекује уколико се смиље сакупља на надморској висини између 500-700 m (48). Закључак је изведен на основу садржаја *trans*-кариофилена, који је био највиши у узорцима сакупљеним на висини од 490 m (12). Исто тако, анализом четири врсте смиља прикупљених на подручју Далмације је показано да је код три узорка утврђен висок садржај сесквитерпенских угљоводоника, док четврти узорак, сакупљен близу мора, садржи високе концентрације оксигенованих сесквитерпена (27).

Време брања је још један од фактора који остварује значајан утицај на хемијски састав етарског уља смиља. Састав етарског уља добијеног дестилацијом стабљика и листова, прикупљених у три различита вегетациона периода, од јуна до септембра био је предмет истраживања. Приликом бербе која је спроведена у јуну, главне компоненте уља су биле линалол, нерил-ацетат и нерил-пропионат. Стабљике су у поређењу са цветовима биле богатије лимоненом и росифолином, док са друге стране, садржај нерил-ацетата је био већи у цветовима. Берба спроведена у јулу је показала да је концентрација линалола и даље већа у цветовима, док су нерол и нерил-ацетат показали супротну тенденцију где је нерол био концентрованији у стабљикама, као и розифолиол. Приликом бербе у септембру цветови су и даље били богатији линалолом, док је концентрација нерил-ацетата била већа у стабљикама него у цветовима (48).

1.1.8. Биолошка активност етарског уља

Широка употреба етарског уља смиља у народној медицини подстакла је опсежна истраживања његовог биоактивног потенцијала у последњих 20-30 година. Велики број спроведених истраживања показује да етарско уље смиља поседује широк спектар активности, од којих су описана нека од најбитнијих.

1.1.8.1. Антиинфламацијска активност

И поред велике заступљености етарског уља смиља у народној медицини као потентног антиинфламацијског агенса, мали број истраживања је дизајниран са циљем да његову традиционалну примену научно и докаже. То представља и донекле изненађујућу чињеницу, имајући у виду да је једна од најдокументованијих примена овог уља у народној медицини управо за зарастање рана и регенерацију коже (22). Ова етнофармаколошка примена етарског уља смиља делимично је потврђена у клиничком истраживању, у којем је комбинована орална и локална примена етарског уља смиља. Десетодневна примена две капи уља, у трајању од десет дана, која је праћена локалном применом разблаженог етарског уља током три месеца, допринела је значајном смањењу локалне упале, едема, модрица и хематома у постоперативним ожиљцима пацијената подвргнутим пластичној операцији грудног коша (49). Занимљиво је да је у поменутој студији коришћено уље са Корзике, хемотип који као главне састојке садржи нерил-ацетат, γ -куркумен и β -дикетон-италидион I, које је коришћено у низу студија које се баве антимикуробним ефектима уља смиља. Поред тога, антиинфламаторни потенцијал етарског уља је процењен у моделу инхибиције денатурације албумина из јаја. Етарско уље смиља пореклом из Алжира, било је ефикасније са IC вредношћу од 296 $\mu\text{g/mL}$ у односу на позитивну контролу, диклофенак-натријум и постигао је IC₅₀ вредност од 590 $\mu\text{g/mL}$ (50). Исто тако, уље са подручја Србије, које као најдоминантнију компоненту садржи γ -куркумен у значајно већој концентрацији од 250 mg/mL , инхибирао је денатурацију протеина за 37,4% (51).

1.1.8.2. Антимикробна активност

Антимикробна активност етарског уља смиља је сигурно најдубље проучавана, а као резултат тога произилази податак да етарско уље испољава широк спектар деловања, од потпуно неактивне до веома истакнуте активности (1). Давне 1996. године доказана је антимикуробна активност етарског уља смиља и показано је да јака бактериостатска активност етарског уља према грам позитивним бактеријама, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, у највећем делу потиче од оксигенисаних монотерпена гераниола, геранил- и нерил-ацетата (35). Антимикробна активност споменутих компоненти потврђена је и применом етарског уља смиља са подручја Хрватске. Чињеница да етарско уље смиља значајно смањује отпорност широког спектра бактерија на дејство антимикуробних лекова представља добру полазну основу за развој нових лекова на које бактерије не би поседовале резистентност. У директној вези је и податак да је етарско уље смиља значајно повећало ефикасност левомецетина према мултирезистентним сојева *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Овоме додатно доприноси и чињеница да једна од компоненти етарског уља, гераниол, делује као инхибитор ефлукс пумпе, обновља активност хлорамфеникола у борби са *Enterobacter aerogenes*, али и повећава његову осетљивост на норфлоксацин и Б лактамске антибиотике (52, 53). Ови подаци су од посебног значаја због сталног пораста резистентних бактеријских сојева, пре свега грам-

негативних, на већи број лекова, док са друге стране, ефикасне терапијске алтернативе конвенционалним антибиотицима недостају. Бактериостатска активност етарског уља умногоме зависи и од дела биљке који је искоришћен за његово добијање. У складу са тим су и резултати истраживања у којем је етарско уље смиља, добијено од надземних делова биљке, показало двоструко снажнију бактериостатску активност у односу на уље добијено коришћењем цвасти (23). Дата разлика се може објаснити већим уделом α -пинена, који се сматра веома потентним антибактеријским агенсом, који може да уништи интегритет ћелије, инхибира процесе дисања и транспорта јона (54, 55).

Поред евидентне делотворности етарског уља против широког спектра бактерија уочена је његова значајна ефикасност и у терапији гљивичних инфекција, пре свега *Candida Albicans* (30). Активност етарског уља приписана је терпеноидној фракцији и њеним њеним најактивнијим једињењима, која садрже кисеоник (56).

1.1.8.3. Антиоксидациона активност

Литературни подаци указују на способност етарског уља смиља да неутралише поједине радикалске врсте, што је и доказано применом различитих *in vitro* тестова. Антиоксидациону активност етарско уље смиља остварује захваљујући присуству оксигенисаних монотерпена, посебно нерил-ацетата (57). Како се сматра да антиоксидациона активност етарског уља у великој мери доприноси позитивним ефектима у борби против старења коже, компаније широм света су развиле велики број препарата са етарским уљем смиља у циљу превенције и решавања овог естетског проблема. Доступни литературни подаци, који приказују антиоксидациони потенцијал етарског уља смиља, у зависности од коришћеног дела биљног материјала и локализације приказани су у **Табели 4**.

Табела 4. Преглед резултата истраживања *in vitro* антиоксидационе активности етарског уља смиља

Биљни материјал	Земља порекла	Метода	Резултат	Референца
Херба	Немачка	Неутрализација DPPH радикала	61,38 ± 0,54%	<i>Weglarz et al. (23)</i>
		Неутрализација ABTS радикала	67,78 ± 0,31%	<i>Weglarz et al. (23)</i>
Цваст	Немачка	Неутрализација DPPH радикала	58,59 ± 0,73%	<i>Weglarz et al. (23)</i>
		Неутрализација ABTS радикала	60,53 ± 0,65%	<i>Weglarz et al. (23)</i>
	Италија	Неутрализација DPPH радикала	0,35 ± 0,03 mmol/L	<i>Judzentiene et al. (58)</i>
		Неутрализација ABTS радикала	11,18 ± 0,002 mmol/L	<i>Judzentiene et al. (58)</i>
Цветни врхови	Србија	Неутрализација DPPH радикала	254,66 ± 19,01 μmol TE/100 g	<i>Aćimović et al. (51)</i>
		Неутрализација ABTS радикала	734,24 ± 42,62 μmol TE/100 g	
		Одређивање редукционе способности	27,69 ± 0,40 μmol TE/100 g	
		Инхибиција избељивања β-каротена	96,58 ± 7,11 μmol TE/100 g	
Цветови и изданци	Хрватска	Неутрализација DPPH радикала	684,66 ± 94,22 μg АКЕ/mL	<i>Bezек et al. (42)</i>
Надземни део	Црна Гора	Неутрализација DPPH радикала	1,76 mg/mL	<i>Kladar et al. (43)</i>

DPPH - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил; ABTS - 2,2-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат); АКЕ - еквивалент аскорбинске киселине; ТЕ - тролокс еквивалент.

1.1.8.4. Антипролиферативна активност

Недавно је спроведено истраживање са циљем да се испита антипролиферативна активност етарског уља смиља са подручја Далмације, у којем су за процену саме активности коришћене ћелијске линије карцинома грлића материце (HeLa), дојке (MCF-7), дебелог црева (SW620) и панкреаса (MiaPaCa-2). Резултати указују да етарско уље смиља које садржи γ-куркумен, α-пинен и нерил-ацетат, као најдоминантније компоненте, поседује антипролиферативну активност, посебно на ћелијским линијама MCF-7 и HeLa, која настаје као резултат индуковања апоптозе. Антипролиферативна активност на MiaPaCa-2 ћелијској линији обухвата механизам вишеструке ћелијске смрти, који укључује старење и некрозу (59). Снажан цитотоксични ефекат етарског уља потврђен је и на ћелијама хуманог меланома А375 док је на ћелијама хуманог карцинома јајника показана јака и дозно-зависна инхибиција пролиферације ћелија (60, 61). Додатно, етарска уља ове биљне врсте прикупљена са различитих поднебља Хрватске показују умерен или низак цитотоксични ефекат на ћелијске линије карцинома коже, плућа и дојке. Најотпорнију активност према етарском уљу је показала ћелијска линија

карцинома дојке, док ћелијска линија карцинома плућа поседује најмању отпорност на активност етарског уља. Примећен је и антагонистички ефекат појединачних компоненти на њихов индивидуални цитотоксични потенцијал, који је очигледнији у ћелијској линији карцинома дојке, у којој су и појединачне компоненте биле токсичније што и објашњава његову отпорност (2).

1.1.8.5. Примена у дермокозметичким препаратима

Студије које су испитивале ефекте употребе смиља у лечењу кожних поремећаја преобладајуће су спроведене коришћењем екстрактивних препарата смиља, док је примена етарског уља смиља истраживана у мањој мери. Етарско уље смиља представља један од најпопуларнијих састојака у козметичким производима, нарочито у производима за негу коже, из разлога што поседује могућност да одложи или спречи процес старења коже. Ефекат остварује поспешивањем циркулације, па на тај начин снажно регенерише кожу и помаже у смањењу појаве финих линија и бора (51). Употребу етарског уља смиља у различитим формулацијама против старења коже оправдава и чињеница да етарско уље *in vitro* инхибира активност ензима који негативно утичу на изглед коже, колагеназу и еластазу (62). Постигнути ефекат може се приписати способности једне од главних компоненти етарског уља, нерил-ацетату, који јача функцију кожне баријере повећањем садржаја липида и церамида у *stratum corneum*-у и повећањем експресије ензима повезаних са синтезом церамида потребних за пут глукозил-церамида. Стога, нерил-ацетат и само етарско уље могу бити ефикасни у побољшању баријерне функције коже и задржавању влаге код различитих стања коже. Доказано је да остварују и значајан утицај на процес диференцијације кератиноцита и да промовишу формирање кожне баријере (29).

Због свог мириса, етарско уље смиља се користи као мирис у сапунима, козметичким препаратима и парфемима. Научна истраживања су потврдила да етарско уље смиља као и супстанце заступљене у њему показују антиоксидационо, антибактеријско деловање, антипролиферативно и ремоделирајуће дејство, чиме помажу у процесу зарастања рана. Антимикробна и антифунгална активност етарског уља против бактерија и гљивица, које могу изазвати иритацију коже, инфекције и одложити зарастање рана, од посебног значаја је у остваривању ефикасности етарског уља (63).

1.2. Инфламација

Инфламација представља одбрамбену реакцију организма на повреду ткива или присуство страних фактора попут токсина или патогена (64, 65). Оштећење ткива се карактерише појачаним приливом крви у захваћено ткиво, што резултира црвенилом, едемом, топлотом и болом. Успешан и контролисан инфламацијски одговор је користан процес који води ка уклањању штетних стимулуса и обнављању физиологије, која је прецизно регулисана сложеном молекуларном каскадом. Са друге стране, неконтролисана инфламација може довести до повреде ткива, неопластичне трансформације, што може проузроковати морбидитет и смањење животног века. Стога су трајање и обим инфламацијског одговора од кључног значаја за његов исход и последице (64, 66, 67).

Инфламацијски одговор обично укључује низ ћелијских и молекуларних процеса који првенствено стимулишу хемотаксију леукоцита према месту упале и њихову активацију. Активирани леукоцити узрокују ослобађање бројних проинфламацијских медијатора и стварање реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species*, РОС) (68).

Неконтролисана инфламација може пореметити нормалну равнотежу између ћелијских одговора и молекуларних догађаја. Акутна инфламација, услед немогућности да регулише проинфламацијски стимулус доводи до хроничне упале, аутоимуности и прекомерног оштећења ткива. Показано је да хронична инфламација лежи у основи различитих болести, попут дијабетеса, неуродегенеративних и кардиоваскуларних болести, као и карцинома (69, 70).

Савремена терапија запаљењског процеса подразумева примену стероидних и нестероидних антиинфламаторних лекова, која је повезана са развојем великог броја нежељених ефеката (71). Стога, велики изазов за научну јавност представља потрага за новим агенасима који би показали потенцијал ка ублажавању инфламацијског одговора. Идентификација супстанци које могу подстаћи решавање инфламације на начин који је хомеостатски, модулаторан, ефикасан и који тело добро подноси је од фундаменталног значаја. У данашње време прва фармакотерапијска опција за велики број пацијената широм света представљају фитопрепарати. Биљке се сматрају најстаријим обликом медицине који је познат човечанству, док су, са друге стране, такође важан извор савремених лекова и управљају развојем синтетских лекова (72). Од давнина, људи су се ослањали на лековито биље у лечењу разних здравствених поремећаја, укључујући упале и њихове компликације. Ова дејства се приписују сложенем хемијском саставу биљака и присуству секундарних биомолекула као што су фенолна једињења, флавоноиди, сапонини и сесквитерпени (73). Према Светској здравственој организацији, 70–95% светске популације ослања се на примену традиционалне медицине (74). Ово посебно важи за медитеранске земље, где биљке играју виталну улогу у исхрани, а понекад не постоји јасна линија раздвајања између хране и лековитог биља, посебно у аутохтоним и локалним традицијама (75).

1.3. Ране и процес зарастања

1.3.1. Ране: дефиниција и класификација

Рана се може дефинисати као оштећење или поремећај анатомског и ћелијског континуитета ткива које настаје као последица трауме изазване физичким, хемијским, термичким, микробним или имунолошким агенсима. На основу природе процеса зарастања, ране се могу класификовати на акутне и хроничне. Акутне ране пролазе кроз уредан и благовремен репаративан процес, који резултира трајном рестаурацијом анатомског и функционалног интегритета. Насупрот томе, процес зарастања хроничних рана не доводи до успостављања трајног анатомског и функционалног интегритета ткива. Разлог томе су поновљене повреде ткива или физиолошка стања пацијента попут дијабетеса, малигних болести, упорних инфекција и других фактора (76).

Ране се класификују и на основу површине и нивоа захваћености коже. Повреда која захвата само епидермални слој коже назива се површинска рана, док повреде које поред епидермиса захватају и дубље слојеве коже, укључујући крвне судове, знојне жлезде и фоликуле длаке, називају се ране пуне дебљине (77).

1.3.2. Зарастање рана

Зарастање ране је природна реакција тела настала као одговор ткива на повреду. Представља сложен и динамичан биолошки процес који се састоји од интегрисаних ћелијских и биохемијских каскада, које доводе до поновног успостављања структурног и функционалног интегритета оштећеног ткива (77). Процес зарастања се састоји од четири временски и просторно преклапајуће фазе: хемостаза, инфламација, пролиферација и ремоделовање (Табела 5) (78, 79). Утицај различитих фактора као што су неухрањеност, старење, зрачење и болести попут дијабетеса, хипертензије и гојазности могу бити повезани са одложеним зарастањем рана (80).

Зарастање ране може бити примарно и секундарно. Примарно зарастање (*sanatio per primam intentionem*) је карактеристика неинфицираних, хируршки створених инцизионих рана, чије су ивице међусобно примакнуте хируршким шавовима, чиме се скраћује величина ране и смањује време потребно за њено зарастање. Секундарно зарастање (*sanatio per secundam intentionem*) се одвија код рана које су праћене великим губитком крви и где се ивице ране не могу међусобно приближити (77).

Табела 5. Фазе нормалног зарастања ране

Фаза	Биофизиолошки догађај
Хемостаза	Васкуларна контракција Агрегација тромбоцита, дегранулација, формирање фибрина (тромб)
Инфламација	Инфилтрација неутрофила Инфилтрација моноцита и диференцијација у макрофаге Инфилтрација лимфоцита
Пролиферација	Реепителизација Ангиогенеза Синтеза колагена Формирање екстрацелуларног матрикса (ЕЦМ)
Ремоделовање	Ремоделовање колагена, васкуларно сазревање и регресија

1.3.2.1. Хемостаза

Губитак структурног интегритета ткива карактеришу микроваскуларна повреда и екстравазација крви у повређено ткиво (81). Прва и основна фаза у процесу зарастања рана је хемостаза, која обухвата три корака: вазоконстрикцију, примарну хемостазу и секундарну хемостазу. Непосредно након повреде ткива, у року од неколико секунди, долази до вазоконстрикције са циљем да се успори или заустави губитак крви из оштећеног ендотела (82). Ово се постиже рефлексном контракцијом глатких мишића крвних судова, коју покрећу вазоконстриктори попут ендотелина, који се ослобађа из оштећеног ендотела. Циркулишући катехоламини, епинефрин, норепинефрин и простагландини, такође остварују значајну улогу у регулацији вазоконстрикције (83).

Додатно, фактор раста тромбоцита (PDGF, енгл. *Platelet Derived Growth Factor*) активира глатке мишиће у зидовима крвних судова који изазивају контракцију (84, 85). Међутим, почетна рефлексна контракција само привремено смањује крварење из разлога што повећање хипоксије и ацидозе ране доводи до пасивне релаксације мишића, која изазива наставак крварења (86). У складу са тим, потребна је накнадна активација коагулационе каскаде са циљем даље регулације вазоконстрикције преко медијатора брадикинина, фибринопептида, серотонина и тромбосана А2, као и дугорочног решавања крварења (87, 88).

Формирање тромбоцитног чепа осликава фазу примарне хемостазе, у којој главну улогу остварују тромбоцити који се активирају када наиђу на васкуларни субендотелни матрикс. Рецептори тромбоцита попут гликопротена ступају у интеракцију са протеинима ЕЦМ-а као што су фибронектин, колаген и *von Willebrandov* фактор и на тај начин промовишу пријањање тромбоцита на зид крвног суда (89). То условљава тромбоците да ослобађају цитокине, факторе раста и бројне проинфламацијске медијаторе, што доводи до агрегације тромбоцита и покретања унутрашњих и спољашњих путева коагулације и последично формирања крвног угрушак. Крвни угрушак се састоји од тромбоцита уметнутих у мрежу фибрина, фибронектина, витронектина и тромбосподина и кључан је за заштиту од крварења (90, 91). Додатно, крвни угрушак штити повређено окружење од инвазије бактерија и служи као извор цитокина и фактора раста који се ослобађају из активираних тромбоцита, а који су потребни за регрутовање имунских ћелија (90). Тромбоцити унутар чепа ослобађају факторе раста и цитокине као што су PDGF, трансформишући фактор раста- β (TGF- β , енгл. *Transforming Growth Factor*), епидермални фактор раста (EGF, енгл. *Epidermal Growth Factor*) и фактор раста инсулина (IGF, енгл. *Insulin-like growth factor-1*), који су важни ћелијски медијатори за наредне фазе зарастања (88).

На завршену фазу примарне хемостазе надовезује се фаза секундарне хемостазе која представља процес коагулације и ојачавање тромбоцитног чепа. Активирани унутрашњи и спољашњи путеви коагулације доводе до активације фактора X. Након активације фактора X у фактор Xa, било којим путем, протромбин се преводи у тромбин. Настали тромбин разлаже фибриноген у фибрин. Фактор XIII ковалентно везује фибрин, који везује агрегирани чеп тромбоцита, формирајући дефинитивни секундарни чеп за хемостазу или тромб. Тромб такође служи као привремена матрица ране за инфилтрацију других ћелија у наредним фазама зарастања (92).

1.3.2.2. Инфламација

Фаза инфламације се значајно преклапа са иницијалном хемостазом, и њен основни циљ је успостављање имунолошке баријере инвазији микроорганизама. У зависности од времена и трајања одговора, као и врсте инфламацијских ћелија, инфламацијска фаза се дели на две одвојене фазе, рану и касну инфламацијску фазу (93, 94).

Рани инфламацијски одговор остварује велики број функција. Активира класични и алтернативни пут каскаде комплемента и покреће молекуларне догађаје, што доводи до инфилтрације неутрофила, чија је главна функција спречавање инфекције (94-96). Неутрофили бивају привучени на место ране и њихов број достиже максимум 24 – 48 сати након повреде. Услед промена у регулацији површинских адхезионих молекула, неутрофили постају лепљиви и веома брзо започињу процес маргинације, и лепе се за ендотелне ћелије у суседним крвним судовима (94). Миграција неутрофила је изазвана разним хемотактичким агенсима, укључујући TGF- β , компоненте комплемента, као што су C3a и C5a, и формилметионил пептиди произведени од стране бактерија и продуката тромбоцита (95). Процес миграције је посредован интеракцијама зависним од селектина

и класификован је као слабо причвршћивање. Затим, од стране хемокина се брзо активира јачи систем адхезије, посредован интегринима (97). Престаје процес миграције ћелија и наступа дијапедеза, током које се ћелије налазе између ендотелних ћелија (94, 97). Неутрофили врше фагоцитозу бактерија и других страних честица и уништавају их ослобађањем протеолитичких ензима и слободних кисеоничних радикала (94, 97, 98). Њихова активност обично престаје у року од неколико дана од тренутка нарушавања структурног интегритета, односно након уклањања контаминирајућих бактерија (97). Главна функција је да минимизирају бактеријску контаминацију ране, чиме се спречава инфекција, и додатно доприносе нормалном процесу зарастања ране након ове фазе. По завршетку своје улоге, неутрофили морају бити елиминисани из ране пре преласка у следећу фазу зарастања. Сувишне ћелије се одлажу екструдирањем на површину ране као љуспице и апоптозом, омогућавајући елиминацију целе популације неутрофила, без оштећење ткива или потенцирање запаљењског одговора (94-101).

У оквиру касне инфламацијске фазе, која наступа 48-72 сати након повреде, процес фагоцитозе бива настављен од стране макрофага (94, 102, 103). Макрофаги су привучени у подручје ране од стране бројних хемоатрактивних агенаса, укључујући факторе згрушавања, компоненте комплемента, цитокина попут PDGF, TGF- β , леукотриена B4 и тромбоцитног фактора IV, као и производа разградње еластина и колагена. Поседују дужи животни век од неутрофила и активнији су на нижим рН вредностима (85, 104). Макрофаги остварују вишеструке улоге у процесу зарастања рана. Макрофаги ослобађају цитокине, који промовишу инфламацијски одговор, регрутовањем и активирањем додатних леукоцита. Макрофаги су такође одговорни за чишћење апоптотских ћелија (укључујући неутрофиле). Како макрофаги чисте ове апоптотске ћелије, оне пролазе кроз фенотипску транзицију у репаративно стање, које стимулише кератиноците, фибробласте и ангиогенезу који даље промовишу регенерацију ткива. На овај начин, макрофаги промовишу прелазак у пролиферативну фазу зарастања (80).

Макрофаги су фундаментални за касне фазе инфламацијског одговора, делујући као кључне регулаторне ћелије и обезбеђујући обилан резервоар моћних фактора раста ткива, посебно TGF- β , као и других медијатора попут TGF- α , фактора раста фибробласта (FGF, енгл. *Fibroblast growth factor*), колагеназа, активирајући кератиноците, фибробласте и ендотелне ћелије. Смањење моноцита и макрофага отежава и успорава процес зарастања ране због лошег дебридмана ране, одложене пролиферације и сазревања фибробласта, као и одложене ангиогенезе, што доводи до неадекватне фиброзе и самим тим слабије санације ране.

Последње ћелије које се појављују на месту ране у касној инфламацијској фази су лимфоцити, привучени 72 сата након повреде, деловањем интерлеукина-1 (IL-1), компоненти комплемента и продуката разградње имуноглобулина G (IgG) (98, 99).

1.3.2.3. Пролиферација

Почетак пролиферативне фазе се преклапа са трајањем инфламацијске фазе, па је самим тим танка граница која може прецизно одвојити ове две фазе, али се сматра да фаза пролиферације започиње око трећег дана након појаве лезије и одвија се око две недеље. Основне одлике ове фазе су миграција фибробласта и кератиноцита као и таложење новоформираног ЕЦМ-а, који делује као замена за привремену мрежу састављену од фибрина и фибронектина. На макроскопском нивоу фаза пролиферације се може посматрати као обилно формирање гранулационог ткива. Циљ овог стадијума је да се контракцијом и фиброплазијом смањи површина оштећеног ткива, а главни догађаји су реепителизација, ангиогенеза и фиброплазија (89).

Реепителизација подразумева обнављање епидерма након повреде ткива и обухвата неколико процеса попут миграције кератиноцита, као и њихову пролиферацију. Убрзо након изазване повреде, промене механичке напетости, као и излагање водоник-пероксиду, разним патогенима, и цитокинима условљавају активацију кератиноцита и њихову миграцију (105). Кератиноцити мигрирају са слободних ивица ране у року од 24 сата. Неколико елемената је укључено у миграцију кератиноцита, укључујући ЕЦМ, интегринске рецепторе, матрикс металопротеиназе (енгл. *Matrix metalloproteinase*, *MMP*) и факторе раста. Мигрирајући кератиноцити производе MMP, као што је MMP-9, која специфично разграђује колаген типа IV у базалној мембрани. Ово омогућава ћелијама да напусте базалну мембрану и мигрирају у рану. MMP-1 ремети било какво везивање за фибрилари колаген и олакшава наставак миграције кератиноцита. Како процес реепителизације укључује повећану пролиферацију кератиноцита, пролиферирајући извор кератиноцита обезбеђује адекватно снабдевање ћелија за мигрирање и покривање ране. Са престанком миграције, кератиноцити се поново везују за основни супстрат, реконституишу базалну мембрану, а затим настављају процес терминалне диференцијације да би се створио слојевит епидермис. Приметно је да су једнослојни кератиноцити лоцирани према централном делу ране, док су вишеслојни или слојевити кератиноцити близу ивица ране (106, 107).

Ћелије које преузимају главну улогу у замени привременог матрикса, богатог фибрином и фибронектином гранулационим ткивом су фибробласти. Фибробласти реагују на широк спектар сигналних молекула који их усмеравају да се преведу у профибробласте и тако секретују протеине ЕЦМ или се диференцирају у миофибробласте, који изазивају контракцију ране. Фибробласти разграђују привремени матрикс тако што производе MMP и замењују га гранулационим ткивом богатим фибронектином, незрелим колагенима и протеогликанима. Формирано гранулационо ткиво делује као основа за миграцију и диференцијацију ћелија, подржавајући и формирање нових крвних судова и таложење зрелог ЕЦМ (108).

Током процеса ангиогенезе долази до формирања нових крвних судова, у циљу задовољења метаболичких захтева високо пролиферативног ткива. Хипоксија узрокује процес ангиогенезе, која покреће експресију фактора изазваних хипоксијом (HIF, енгл. *Hypoxia inducible factor*) и циклооксигеназе 2, као и накнадно ослобађање фактора раста васкуларног ендотела (VEGF, енгл. *Vascular endothelial growth factor*) и других фактора (109). Последице, микроваскуларне ендотелне ћелије подлежу процесу пролиферације и мигрирају у рану, стварајући нове судове који се спајају са другима да би развили стабилне, тубуларне мреже (110). VEGF спречава апоптозу ендотелних ћелија тако што регулише анти-апоптотске протеине као што је Bcl-2, док фибрински матрикс промовише ангиогенезу тако што покреће фенотипске промене у ендотелним ћелијама да би стимулисао њихову миграцију. VEGF изазива повећану густину капилара у рани и обнављање крвотока који подстиче зарастање рана (111, 112).

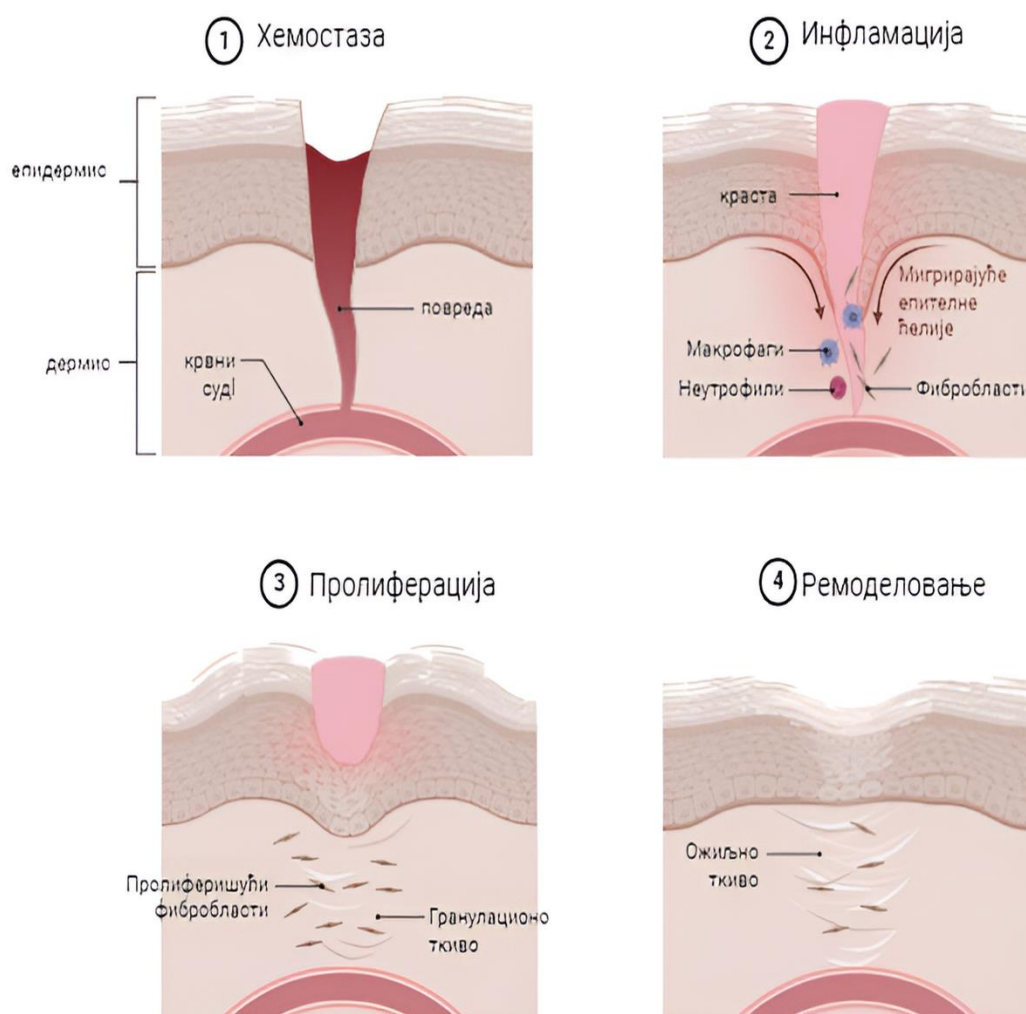
Значајну улогу у ангиогенези остварују и макрофаги, који помажу активности микроваскуларних ендотелних ћелија. Такође, производе MMP, које разграђују густу фибринску мрежу, али и разне хемотактичке факторе попут фактора некрозе тумора алфа (TNF- α , енгл. *Tumor necrosis factor*), VEGF и TGF- β који покрећу ендотелну миграцију (112).

1.3.2.4. Ремоделовање

Ремоделовање представља завршну фазу процеса зарастања, одговорну за развој новог епитела и коначно формирање ожиљног ткива. Фаза ремоделовања почиње две до три недеље након настанка повреде и може трајати неколико месеци, чак и година, у зависности од интензитета повреде и врсте повређеног ткива. Основни циљ фазе ремоделовања је постизање максималне затезне чврстоће кроз реорганизацију, деградацију и ресинтезу ЕЦМ. У овој фази зарастања дешава се покушај опоравка нормалне структуре ткива, а гранулационо ткиво подлеже ремоделовању, формирајући ожиљно ткиво које показује прогресивно повећање концентрације колагених влакана (113).

Ремоделовање обухвата комплетан одговор на повреду, који почиње таложењем фибринског угрушка, а завршава се неколико година касније формирањем зрелог ожиљка богатог колагеном тип I. Фибробласти су главни тип ћелија које су одговорне за ремоделовање, замењујући почетни фибрински угрушак хијалуронском киселином, фибронектином и протеогликанима, као и формирајући зрела колагена влакна (114). Протеогликани помажу у изградњи зрелих, умрежених колагених влакана и делују као канал за миграцију ћелија (115). Интактна кожа одрасле особе садржи приближно 80% колагена тип I у односу на 10% колагена тип III. Насупрот томе, гранулационо ткиво се претежно састоји од колагена тип III (око 30%), са само 10% колагена тип I. Како зарастање напредује, колаген тип III се замењује колагеном тип I, директно повећавајући затезну чврстоћу формираног ожиљка (101). Интегритет и архитектура формираног ожиљка никада у потпуности не достижу степен који су поседовали у неповређеном ткиву. Дакле, ожиљно ткиво ране након повреде даје само до 80% снаге пре рањавања. Процес ове конверзије дермиса се постиже строго контролисаном синтезом новог колагена и лизом старог колагена, углавном спроведеном деловањем MMP. MMP се обично не могу детектовати или су на веома ниским нивоима у здравом ткиву у мировању и уместо тога се индукују током зарастања ране, као одговор на цитокине, факторе раста и/или контакт са ћелијама или са ЕЦМ (116, 117).

Једном када дође до реепителизације, миофибробласти унутар гранулационог ткива настављају да синтетишу MMP и њихове одговарајуће ткивне инхибиторе металопротеиназа (TIMP, енгл. *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*). MMP циљају специфичне компоненте ЕЦМ за деградацију, што је суштински корак ка његовом ремоделовању. Како MMP раде на реконституисању ЕЦМ, синтеза се значајно успорава. Тако се колаген III који се налази у гранулационом ткиву постепено смањује и замењује колагеном I (118). Након модификације ЕЦМ, TIMP почињу да блокирају MMP-е, заустављајући даљу деградацију ЕЦМ. Неравнотежа између експресије TIMP и MMP може довести до абнормалне модификације ЕЦМ, па чак и до хроничних рана (119, 120). Како рана заврши процес зарастања, миофибробласти пролазе кроз посредовану апоптозу. Када ћелије унутар гранулационог ткива не пролазе кроз апоптозу након ремоделовања ране, настају хипертрофични ожиљци (121). На **Слици 4** је приказана схема зарастања рана.



Слика 4. Схематски приказ зарастања ране

1.3.3. Фактори који одлажу процес зарастања рана

Велики број различитих фактора повезан је са компромитованим капацитетом за поспешивање регенерације оштећеног ткива и самим тим последично одложеним зарастањем рана. Фактори који утичу на процес зарастања се могу категорисати на локалне и системске. Локални фактори су фактори који директно утичу на карактеристике саме ране, док системски фактори представљају здравствено стање појединца, које утиче на способност зарастања. Постоји повезаност већег броја фактора и системски фактори делују преко локалних ефеката који утичу на зарастање рана (80). Преглед локалних и системских фактора који у највећем степену утичу на процес зарастања представљен је у Табели 6.

Табела 6. Локални и системски фактори који утичу на процес зарастања

Локални фактори	Системски фактори
оксигенација инфекција страна тело венска инсуфицијенција	године и пол полни хормони стрес исхемија дијабетес гојазност бројни лекови

1.3.4. Дијабетес мелитус као узрок одложеног зарастања рана

Дијабетес мелитус (ДМ) је метаболички поремећај коју карактерише хипергликемија, узрокованом апсолутним или релативним дефектом у секрецији и/или дејству инсулина (122). Према Међународној федерацији за дијабетес, ДМ, као највећа глобална епидемија двадесет првог века, погађа више од 420 милиона појединаца са стално растућом преваленцом (123). ДМ је повезан са високим ризиком од развоја озбиљних микро- и макроваскуларних компликација, а једна од најозбиљнијих свакако је одложено зарастање рана. Пролонгирано зарастање рана код оболелих од ДМ настаје услед одложеног, некомплетног и некоординисаног процеса зарастања, које се прожима кроз све фазе, од инфламације до ремоделовања (124). Као резултат тога, особе са дијабетесом могу развити различите компликације, укључујући хроничне ране које не зарастају, попут чира на стопалу (122).

Продужена фаза инфламације са великим бројем неутрофила и макрофага инфилтрираних у подручје ране је једна од карактеристика хроничних дијабетесних рана (125-127). Инфилтрирајуће ћелије хронично ослобађају проинфламацијске цитокине укључујући IL-1, IL-6 и TNF- α , па је њихов ниво повишен не само током инфламацијске фазе, већ остају у високим концентрацијама дужи временски период, што указује на одржавање продуженог инфламацијског одговора (93, 126). У току процеса физиолошког зарастања, први макрофаги који долазе су фагоцитни, проинфламацијски и замењују се антиинфламацијским макрофагима који синтетишу ЕЦМ и промовишу ангиогенезу. Са друге стране, проинфламацијски макрофаги у подручју хроничне дијабетесне ране не прелазе лако у антиинфламацијске већ настављају да доминирају микроокружењем ране, чиме одлажу процес зарастања (128, 129). Неутрофили такође доприносе пролонгираној инфламацији ослобађањем цитотоксичних ензима, инфламацијских медијатора и слободних радикала, који повећавају оксидациони стрес. Оксидациони стрес доводи до даљег оштећења ткива и одложеног патолошког зарастања дијабетесних рана (130).

Још један фактор који у великој мери доприноси лошем зарастању дијабетесних рана је недовољна ангиогенеза. Прекид континуитета ткива код оболелих од дијабетеса узрокује дефицит неопходних проангиогених фактора, вероватно услед мањег броја и активности макрофага, који представљају њихов извор и извор VEGF. Поред тога, истовремено постоји појачана регулација антиангиогенетских фактора. Поремећај ангиогенезе утиче на функције гранулације и епителизације, а на крају и на фазу сазревања ране (112). Таложење ЕЦМ, чије је стварање модулисано MMP и TIMP је оштећено код дијабетесних рана. Висока концентрација глукозе директно утиче на ниво и експресију MMP-а, које достижу око 60 пута већи ниво него у акутној рани. Исто тако, смањује се експресија TIMP, па на тај начин повећана активност протеазе доводи до уништавања ткива и инхибирања нормалних процеса зарастања. MMP остварују улогу у

различитим фазама зарастања рана, а равнотежа између MMP и TIMP је неопходна да би се избегло нарушавање структуре неопходне за правилно зарастање рана (112).

Показано је да зарастање дијабетесних рана резултира ожиљком који карактерише нижа синтеза колагена, као и промене у његовој структури у поређењу са здравим ожиљцима. Ове промене резултирају ожиљком који има смањену способност контракције и повећану густину колагена, што доводи до формирања ожиљка са нижом затезном чврстоћом и одложеним зарастањем рана. Смањена контракција дијабетесних рана може се делимично приписати фибробластима у ранама које су отпорне на пролиферацију и које су достигле стање старења. Без адекватне контракције, дијабетесне ране више зависе од гранулације и реепителизације, што доводи до лоше толеранције матрикса дијабетесних ожиљака на затезне силе и напон смицања (131, 132).

Ц ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега претходно наведеног циљеви овог истраживања су:

1. Хемијска карактеризација и испитивање антиоксидационе активности етарског уља смиља;
2. Развој топикалних препарата (маст и гел) на бази етарског уља смиља;
3. Карактеризација и испитивање стабилности масти и гела на бази етарског уља смиља;
4. Испитивање безбедности примене масти и гела на бази етарског уља смиља, спровођењем теста акутне дермалне иритације;
5. Испитивање антиинфламацијских ефеката масти и гела на бази етарског уља смиља;
6. Испитивање ефеката тронедељне примене масти и гела са етарским уљем смиља у третману рана изазваних методом ексцизије, код пацова са индукованим ДМ тип 1;
7. Испитивање ефеката тронедељне примене масти и гела са етарским уљем смиља у третману рана изазваних методом инцизије, код пацова са индукованим ДМ тип 1;
8. Хистолошким анализама испитати и упоредити морфолошке промене на кожи пацова који су били изложени третману топикалним препаратима на бази етарског уља смиља;
9. Биохемијским тестовима испитати улогу маркера оксидационог стреса у зарастању рана код пацова изложених третману топикалним препаратима на бази етарског уља смиља.

III
МАТЕРИЈАЛ И
МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

1.1. Етарско уље смиља

1.1.1. Узорак

Етарско уље смиља, коришћено у овом истраживању комерцијално је набављено од фирме *Alepharm* (Београд, Србија) уз обезбеђен сертификат анализе производа. Етарско уље је добијено методом хидродестилације, коришћењем цветних делова биљке *Helichrysum italicum*, методом по *Clevenger*-у.

1.1.2. Хемијска карактеризација

Квалитативна и квантитативна анализа етарског уља смиља извршена је применом технике гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC/MS). GC/MS анализа је урађена коришћењем гасног хроматографа *Agilent Technologies 6890B* у комбинацији са *Agilent Technologies 5977 MSD* детектором, на капиларној HP-5MS колони (30 m × 0.25 mm; дебљина филма стационарне фазе 0,25 μm) (133). Хелијум је коришћен као носећи гас, приликом чега је проток био константан и износио је 1 mL/min. Температура инјектора износила је 220°C, док је температура трансфер линије била 230°C. Температура колоне је линеарно програмирана у опсегу од 60°-246°C са променама од 3°C/мин. Раствор етарског уља у *n*-хексану (2% v/v) је убризган у запремини од 2 μL, у сплит режиму 1:10 (134).

Подаци масеног спектра прикупљани су у опсегу снимања *m/z* од 50 – 550, док је идентификација компонената етарског уља смиља извршена поређењем ретенционих индекса и масених спектра са одговарајућим подацима из базе података масених спектра NIST (*v14*) и из литературних података.

1.1.3. Антиоксидациони потенцијал

Антиоксидациони потенцијал етарског уља смиља је процењен коришћењем пет *in vitro* тестова. Појединачни тестови не пружају увид у свеобухватан антиоксидациони потенцијал с обзиром да различити биљни продукти поседују сложен састав и вишеструке механизме антиоксидационог деловања (135).

1.1.3.1. Испитивање потенцијала етарског уља да неутралише DPPH радикал

Способност неутрализације DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала процењена је применом веома једноставне и осетљиве спектрофотометријске методе, која се базира на способности једињења, која су присутна у етарском уљу, да делују као донори водоника. Метода се базира на промени боје љубичасто обојеног раствора DPPH радикала, у реакцији са антиоксидансима, при чему настаје редукована, жуто обојена форма DPPH-H (136).

Почетни корак у поступку одређивања обухвата припрему серије различитих разблажења етарског уља смиља. Раствори узорака етарског уља су затим помешани са 1 mL 90 μM DPPH раствора и до укупне запремине од 4 mL допуњени су са 95% метанолом. Таква смеша је остављена један сат на собној температури, заштићена од светлости, након чега је апсорбанца мерена на 517 nm на спектрофотометру *Shimadzu UV-1800* (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Као референтни стандард коришћен је пропил-галат и

сва мерења су изведена у четири понављања. Процент неутрализација DPPH радикала (RSC, енгл. *Radical scavenging capacity*) је израчунат на основу једначине:

$$\text{RSC (\%)} = \frac{A_k - A_y}{A_k} 100$$

A_k - апсорбанца контроле (садржи све реагенсе, осим тестираног узорка)

A_y - апсорбанца узорка

Вредност IC_{50} , која означава концентрацију етарског уља која неутралише 50% DPPH радикала израчуната је линеарном регресионом анализом из добијених RSC вредности и изражена је у $\mu\text{g/mL}$.

1.1.3.2. Испитивање потенцијала етарског уља да неутралише OH радикал

У циљу одређивања способности неутралисања хидроксил (OH^{\bullet}) радикала коришћена је претходно описана метода, са извесним модификацијама (137). Фентоновим реакционим системом генеришу се OH радикали, који покреће деградацију 2-дезоксирибозе до крајњих производа, међу којима је најпознатији малонилдиалдехид (MDA). Настали MDA реагује са тиобарбитурном киселином (ТВА), при чему долази до формирања ружичасто обојеног комплекса који се детектује спектрофотометријски (138).

Поступак се огледа у припреми серије од шест раствора двоструког разблажења етарског уља смиља. Након тога, у 100 μL одмереног узорка је додато 500 μL раствора дезоксирибозе, 200 μL смеше FeCl_3 и EDTA (1:1 v/v), 100 μL раствора H_2O_2 , и 100 μL аскорбинске киселине. Смеша је инкубирана на температури од 50°C, у трајању од пола сата. Након тога, смеси је додато по 1 mL раствора ТВА и трихлорсирћетне киселине (ТСА) и поступак инкубације је поновљен под идентичним условима пола сата. Степен оксидације дезоксирибозе одређен је спектрофотометријски (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*), мерењем апсорбанце испитиваних узорка на 532 nm. Као референтни стандарди коришћени су пропил-галат, бутиловани хидрокситолуен и аскорбинска киселина, а сва мерења су изведена у четири понављања. Процент неутрализације OH радикала је израчунат применом једначине:

$$\text{RSC (\%)} = \frac{A_k - A_y}{A_k} 100$$

A_k - апсорбанца контроле (садржи све реагенсе, осим тестираног узорка)

A_y - апсорбанца узорка

Вредност IC_{50} , која означава концентрацију етарског уља која неутралише 50% OH радикала израчуната је линеарном регресионом анализом из добијених RSC вредности и изражена је у $\mu\text{g/mL}$.

1.1.3.3. Испитивање потенцијала етарског уља да неутралише NO радикал

Испитивање капацитета „хватања“ нитрозо (NO^{\bullet}) радикала етарског уља смиља заснива се на синтетисању NO радикала и мерењу његове концентрације употребом *Griess* реагенса. Као основни извор продукције NO радикала коришћен је водени ратвор натријум-нитропрусида при физиолошкој рН вредности. Настали NO радикали реагују са кисеоником и настају нитритни јони, који након реакције са *Griess* реагенсом, на

собној температури, формирају пурпурно-ружичасто диазо комплекс, чија је апсорбанца измерена на 546 nm (139).

Поступак одређивања обухвата мешање раствора узорка са раствором натријум-нитропрусида. Након инкубационог периода од 90 минута, на собној температури, додаје се 1 mL *Griess* реагенса. Направљена смеша се инкубира у трајању од пола сата, под истим условима. *Griess* реагенс представља смешу N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA) и сулфаниламида у 4% фосфорној киселини. Апсорбанца настале хромофоре мерена је на 546 nm, на спектрофотометру *Shimadzu UV-1800* (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Сва мерења су изведена у четири понављања, а проценат неутрализација NO радикала је израчунат применом једначине:

$$\text{RSC (\%)} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \cdot 100$$

Ак - апсорбанца контроле (садржи све реагенсе, осим тестираног узорка)

Aу- апсорбанца узорка

Вредност IC₅₀, која означава концентрацију етарског уља која неутралише 50% NO радикала израчуната је линеарном регресионом анализом из добијених RSC вредности и изражена је у µg/mL.

1.1.3.4. Испитивање потенцијала етарског уља смиља да инхибира липидну пероксидацију

Способност етарског уља смиља да инхибира процес липидне пероксидације је одређена на основу методе описане од стране Кладара и сарадника. За потребе тест система ОН радикали су формирану у Фентоновој реакцији, док је као модел липида у биолошким мембрана коришћена суспензија липозома (136). У претходно припремљену суспензију „*Pro-Lipo S*“ липозома додаване су различите концентрације испитиваног етарског уља. Компетиција између неутрализације ОН радикала и полинезасићених масних киселина је мерена на основу формирања обојеног адукта између MDA и TBA на 532 nm, коришћењем спектрофотометра (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*). Сва мерења су обављена у четири понављања.

Процент инхибиције липидне пероксидације је израчунат применом једначине:

$$\text{I (\%)} = 100 * \frac{A_k - A_u}{A_k}$$

Ак - апсорбанца контроле (садржи све реагенсе, осим тестираног узорка)

Aу - апсорбанца узорка

Вредност IC₅₀, која означава концентрацију етарског уља која инхибира 50% липидне пероксидације израчуната је линеарном регресионом анализом из добијених вредности и изражена је у µg/mL.

1.1.3.5. Испитивање редуционог потенцијала етарског уља смиља FRAP методом

За одређивање редуционог потенцијала етарског уља коришћена је FRAP (енгл. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) метода, која представља спектофотометријску методу базирану на редуцији Fe³⁺ у Fe²⁺. У киселој средини, у присуству антиоксиданаса, долази до редуције гвожђе(III)-2,4,6-трипиридил-S-триазин до

интезивно плаво обојеног комплекса гвожђе(II)-2,4,6-трипиридил-S-триазин, са максимумом апсорбанце на 593 nm (140).

Реакционе смеше поред узорка етарског уља садрже и FRAP реагенс који представља смешу три раствора: 2,4,6-трипиридил-S-триазин растворен у хлороводоничној киселини, ацетатни пуфер и раствор гвожђе (III)-хлорида. Развијање плаве боје прати се у временском интервалу од 8 минута у односу на дестиловану воду. Редукциони капацитет је израчунат на основу калибрационе криве стандардног раствора аскорбинске киселине и изражава се као милиграм еквивалента аскорбинске киселине по милилитру етарског уља (mg АКЕ/mL). Сва мерења су изведена у четири понављања.

1.2. Топикалне формулације на бази етарског уља смиља

1.2.1. Развој топикалних формулација

Топикални препарати са етарским уљем смиља су формулисани у облику масти и гела. Концентрација етарског уља смиља износила је 0,5%, што је засновано на релевантним препорукама из литературе. У наставку је описан начин израде датих формулација са етарским уљем смиља.

1.2.1.1. Формулација масти на бази етарског уља смиља

Израда масти са етарским уљем смиља спроведена је коришћењем валидних прописа за израду полуврстих препарата типа масти, на основу протокола прописаних референтном литературом (141). За припрему масти са етарским уљем смиља коришћена је Еуцерин подлога, која је официнална по Магистралним формулама 2008 и пропис за њену израду је приказан у **Табели 7**.

Масна фаза, која се састоји од вазелина и ланолина је загрејана у емајлираној патени коришћењем воденог купатила до температуре од $75^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Истовремено, у другој емајлираној патени холестерол је разрибан уз помоћ течног парафина, након чега им је постепено додавана претходно отопљена масна фаза, уз континуирано мешање. Тако направљена Еуцерин подлога је у наставку истраживања коришћена као подлога за израду масти (подлога маст).

За припрему масти на бази етарског уља смиља, етарско уље смиља је инкорпорирано у Еуцерин подлогу у концентрацији од 0,5%, методом левигације.

Табела 7. Пропис за израду Еуцерин подлоге

Еуцерин подлога	
Холестерол	5 g
Ланолин	15 g
Течни парафин	15 g
Вазелин	до 100 g

1.2.1.2. Формулација гела на бази етарског уља смиља

За припрему гела са етарским уљем смиља коришћен је официнални хидрофилни гел карбомера, чији је састав представљен у **Табели 8**. Израда гел подлоге захтевала је употребу карбомера, пропилен гликола, раствор триетаноламина и воде. Најпре је карбомер континуирано мешан са водом, све док није дошло до формирања дисперзије. Настала дисперзија је даље мешана са пропилен гликолом, након чега је извршено додавање раствора триетаноламина и смеша је остављена да набубри. Тако формиран гел је коришћен као подлога за израду гела (подлога гел).

Даље, за припрему гела на бази етарског уља смиља, етарско уље смиља је инкорпорирано у хидрофилни гел карбомера у концентрацији од 0,5%.

Табела 8. Пропис за израду хидрофилног гел карбомера

Хидрофилни гел карбомера	
Холестерол	1 g
Пропилен гликол	10 g
Триетаноламин	q.s.
Вода	до 100 g

1.2.2. Карактеризација топикалних формулација

1.2.2.1. Органолептичка испитивања

Органолептичка испитивања, која подразумевају испитивање изгледа, мириса, боје, конзистенције и хомогености припремљених формулација са инкорпорираним етарским уљем смиља, процењена су визуелним посматрањем. Хомогеност је тестирана притиском мале количине формулације између палца и кажипрста (142). У циљу процене физичке стабилности датих формулација, релевантна испитивања су спроведена непосредно након формулације препарата и поновљена су након шест месеци чувања на собној температури. Размазивост препарата је процењена наношењем кружним покретима на кожу и визуалним праћењем трага који остаје на кожи.

1.2.2.2. рН вредност

Одређивање рН вредности, које се спроводи током дужег временског периода, представља поуздану методу која указује на физичко-хемијску стабилност препарата. Мерење рН вредности узорка гела са додатком етарског уља смиља извршено је директним урањањем стаклене електроде рН-метра HI 9321 (*Hanna Instruments Inc.*), у водом разблажен испитивани узорак на собној температури. Пре почетка рада, апарат је калибрисан коришћењем стандардних пуфера рН 4, 7 и 10. Мерење рН вредности је спроведено у триплекату, иницијално (72h након израде) и након шест месеци. Узорак гела је током периода од шест месеци чуван у пластичној кутији, на собној температури.

1.2.2.3. Тест центрифугирања

У циљу одређивања стабилности формулације гела на бази етарског уља смиља дати препарат је подвргнут тесту центрифугирања. За извођење теста центрифугирања, 10 g гела на бази етарског уља смиља је додато у конусну епрувету и подвргнуто циклусу од 3000 rpm током 30 минута на собној температури (143).

1.2.2.4. Реолошка испитивања

У циљу реолошке карактеризације развијених полуврстих формулација спроведена су континуална и осцилаторна реолошка мерења. Коришћен је *HAAKE MARS* реометар (*Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany*) који је повезан са термостатом ради одржавања температуре. Мерења су извршена коришћењем плоча/плоча мерног система, пречника 35 mm уз размак између плоча од 1,000 mm. Мерења су вршена на константној температури од $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Континуална реолошка мерења су спроведена применом контролисане брзине смицања. За формулацију масти криве протицања су одређене мерењем хистерезних петљи у опсегу брзине смицања од 0 до 200 s^{-1} , при чему је брзина смицања првобитно повећавана од $0,001$ до 200 s^{-1} у року од 180 s, да би наредних 120 s била одржавана константном на 200 s^{-1} , након чега је поново смањена на 0 s^{-1} током 180 s.

За формулацију гела узорци су првобитно изложени брзини смицања која је повећавана $0,001$ до 50 s^{-1} током 120 s. Након тога, наредних 60 s брзина смицања је одржавана константном на 60 s^{-1} . Последњи корак подразумевао је одређивање понашања узорака при смањеној брзини смицања са 50 на 0 s^{-1} током 120 s.

Осцилаторним мерењем је испитивано вискоеластично понашање формулација масти и гела. Амплитудна осцилаторна мерења (енгл. *Amplitude sweep*) су спроведена са циљем одређивања линеарног вискоеластичног региона, који је одређен снимањем еластичног (G') и вискозног (G'') модула у односу на напон смицања $0,01 - 100 \text{ Pa}$, на константној фреквенци од 1 Hz. Испитивања фреквенције вршена су од 0,1 до 10 Hz при константном смичном напрезању (1 Pa) амплитудним осцилаторним мерењима (144). Испитивање реолошких параметара спроведено је иницијално, 3 дана након израде и после 6 месеци чувања узорка на собној температури.

1.3. Испитивање безбедности и ефикасности препарата на бази етарског уља смиља

Експерименталне процедуре коришћене у овом истраживању су одобрене од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Универзитета у Крагујевцу, (одлука бр. 01-6292) и спроведене у складу са Европском директивом о добробити лабораторијских животиња (2010/63/EУ) и Европском директивом о заштити животиња коришћених у експерименталне и друге научне сврхе (86/609/ЕЕС), као и етичким принципима.

За потребе спровођења *in vivo* испитивања, у циљу испитивања безбедности и ефикасности датих формулација коришћени су пацови *Wistar albino* соја, мушког пола. Старост пацова је била 8 недеља а телесна маса је износила 200-250 g. Пацови су након транспорта са Војномедицинске академије у Београду смештени у чисте кавезе и чувани у строго контролисаним условима влажности ваздуха, температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) и

осветљености (12/12 часовни циклус светлост/тама). Приступ храни и води је био слободан, *ad libitum*.

1.3.1. Акутна дермална иритација

Експериментални протокол испитивања акутне дермалне иритације спроведен је у складу са смерницама *Economic Cooperation and Development* (OECD) 404.

1.3.1.1. Поступак тестирања

Животиње су најпре анестезиране, при чему је као анестетик коришћена комбинација кетамина (5 mg/kg) и ксилазина (10 mg/kg) која је апликована у виду интраперитонеалне инјекције. Леђа пацова су обријана 24h пре извођења експеримента и само животиње са здравом, нетакнутом кожом су коришћене за извођење теста. Животиње су, у зависности од врсте испитиване и апликоване формулације, подељене у две групе, маст и гел групу. Свака група је подељена у две подгрупе, на основу тога да ли је примењена испитивана формулација са етарским уљем смиља или подлога коришћена за израду саме формулације. Испитиване групе су:

- Подлога маст – примењена је Еуцерин подлога;
- Смиље маст – примењена је 0,5% маст смиља;
- Подлога гел – примењен је хидрофилни гел карбомера;
- Смиље гел – примењен је 0,5% гел смиља.

У овом делу истраживања коришћено је укупно 8 пацова, свака група је обухватала по 2 животиње. Испитиване формулације су локално примењене у количини од 500 mg, на обријана подручја пацова, након чега су животиње смештене у појединачне кавезе.

1.3.1.2. Клиничка запажања и оцењивање кожных реакција

Животиње су са посебном пажњом посматране у току прва 4 сата од наношења препарата, након чега су једном дневно у периоду од 14 дана. У том временском периоду бележени су општи знаци токсичности попут дрхтања, саливације, конвулзије или дијареје као и стопа морталитета. У циљу процене да ли наведени препарати имају потенцијал да изазову иритацију на кожи праћена је појава едема и еритема на основу система бодовања наведеног у **Табели 9** (145, 146). Максимална вредност скорa је 4.

Табела 9. Оцењивање кожних реакција

ФОРМИРАЊЕ ЕРИТЕМА	Скор
Нема еритема	0
Благ еритем (једва приметан)	1
Јасно дефинисан еритем	2
Умерен до јак еритем	3
Тешки еритем до формирања улцерације	4
ФОРМИРАЊЕ ЕДЕМА	
Нема едема	0
Веома благ едем (једва приметан)	1
Благ едем (ивице добро дефинисане)	2
Умерен едем (подигнут око 1 mm изнад нивоа коже)	3
Тешки едем (подигнут више од 1 mm и шири се изван подручја изложености)	4

1.3.2. Антиинфламацијска активност

1.3.2.1. Карагенаном индукована инфламација шапе пацова

Карагенан је природни угљени хидрат, добијен из јестивих црвених морских алги и у бројним претклиничким студијама користи се као ефикасан агенс за изазивање инфламације. Спровођење теста карагенаном индуковане инфламације представља надоградњу резултата добијених *in vitro* тестовима, у циљу испитивања комплетног спектра антиинфламацијске активности (147).

Након инјекције карагенана очекује се двофазни инфламацијски ефекат. Прва фаза, васкуларна фаза, траје 1 до 2,5 сата од примене карагенана и повезана је са ослобађањем хистамина, серотонина и брадикинина, што доводи до брзог повећања васкуларне пермеабилности са последичним формирањем едема. У другој фази, ћелијској фази, која траје од 2,5 до 6 сати од инјекције карагенана, инфламацијска реакција је посредована углавном прекомерном производњом простагландина, који омогућавају одржавање едема због свог снажног вазоактивног деловања и регрутовања инфламацијских ћелија (148-150).

1.3.2.2. Експериментални модел за изазивање инфламације

У циљу испитивања антиинфламацијског потенцијала формулација на бази етарског уља смиља првобитно је вршено апликовање препарата у задњу леву шапу пацова. Дермални препарати су апликовани у количини од 0,3 g и утрљавање се вршило нежним покретима кажипрста, укупно 40 пута. Шездесет минута након дермалне примене одговарајућег препарата, у задњу леву шапицу пацова примењен је 0,5 mL 1% раствора карагенана, растворен у физиолошком раствору, у циљу изазивања инфламације (151, 152).

У овом делу истраживања коришћено је укупно 36 пацова, који су у зависности од примењене топикалне формулације, подељени у укупно шест група:

- К - нетретиране животиње;
- ХДК - животиње којима је апликована 1% хидрокортизон маст;
- Подлога маст - животињама је апликована Еуцерин подлога;
- Смиље маст – животињама је апликована 0,5% маст смиља;
- Подлога гел - животињама је апликован хидрофилни гел карбомера;
- Смиље гел - животињама је апликован 0,5% гел смиља.

Свака група је обухватала по 6 животиња.

1.3.2.3. Утицај примењених формулација на развој едема шапе

Квантификација антиинфламацијског ефекта примењених препарата извршена је мерењем дебљине ткива леве шапице сваког пацова. Дебљина ткива шапе мерена је у следећим временским тачкама: непосредно пре изазивања инфламације (Тренутак 0), као и након првог, другог, трећег и четвртог часа након инјекције карагенана (Тренутак 1, 2, 3 и 4). У циљу мерења дебљине ткива шапе коришћен је дигитални калипер, постављен на средини мерене шапе. Процент инхибиције инфламације израчунат је на основу наведене формуле (153):

$$\% \text{ инхибиције} = 100 \times [1 - (A_t / A_k)]$$

A_t - просечно повећање дебљине шапе забележено у третираној групи између два тренутка мерења;

A_k - просечно повећање дебљине шапе забележено у нетретираној (контролној) групи између два тренутка мерења.

1.3.2.4. Узорковање биолошког материјала

Након спроведеног карагенанског теста, животињама је интраперитонеалном применом комбинације кетамина и ксилазина индукована краткотрајна наркоза, након чега су животиње жртвоване цервикалном дислокацијом у циљу изоловања шапе. Коришћењем маказа и пинцете свим животињама је изолована лева шапа, а затим је и узорак ткива шапе, у зависности од анализе, чуван на одговарајући начин. Узорци ткива шапе се користе за одређивање концентрације маркера инфламације:

- IL-6
- IL-10 и
- TNF- α .

Додатно, у хомогенату ткива шапе су одређивани и маркери оксидационог стреса, и то прооксидациони маркер:

- индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS)

као и маркери антиоксидационог система одбране:

- редуковани глутатион (GSH),
- супероксид дисмутаза (SOD) и
- каталаза (CAT).

1.3.2.5. Одређивање маркера инфламације ELISA методом

1.3.2.5.1. Припрема узорка

Узорак тежине 100 mg (ткиво шапе) хомогенизован је са 0,5 mL пуфера за лизу ћелија (енгл. *Cell lysis buffer*). Извршен је процес центрифугирања добијених хомогената, током десет минута, при брзини од 5000 rpm, на температури од 4°C. Тако добијени супернатанти су одвојени у чисте епендорфице и чувани на температури од -70°C до почетка анализе.

1.3.2.5.2. Одређивање концентрације маркера инфламације

Концентрације цитокина у добијеним супернатантима су одређене коришћењем *Duoset enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) китова за TNF- α и IL-6 (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany*), као и сета за IL-10 (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*). Дати сет, али и китови су специфични за цитокине пацова и коришћени су према упутствима произвођача.

ELISA тестом се одређује присутност и количина антигена у узорку, а сама реакција се базира на везивању антитела и антигена из узорка и спектофотометријском мерењу настале реакције, уз промену боје. Сам поступак се одвија у пар корака, који су приказани у наставку. Наиме, прва два корака се односе само на одређивање IL-10, с обзиром да је у питању комерцијално доступан сет за који је неопходно додавање примарног, везујућег антитела, што није неопходно када су у питању китови доступни за TNF- α и IL-6. Поступак се спроводи према упутству произвођача на следећи начин:

1. Додавање везујућег антитела (енгл. *Capture antibody*) у сваки бунарчић микротитар плоче уз инкубацију од 18 сати, на собној температури;
2. Испирање плоче пуфером за испирање (*Wash Buffer*);
3. Додавање узорка одговарајућег разблажења и различитих концентрација стандарда уз прописану инкубацију током које се антигени из узорка везују за примарно антитело;
4. Додавање *Detection* антитела које гради комплекс са антигеном из узорка које је везано за примарно антитело уз инкубацију према упутству произвођача;
5. Испирање плоче пуфером за испирање;
6. Додавање *Streptavidin HRP* (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*) уз инкубацију према упутству произвођача;
7. Испирање плоче пуфером за испирање;
8. Додавање ТМВ (тетраметилбензидин) супстрата у тамном окружењу, који доводи до промене боје у плаво у зависности од количине везаног антигена.
9. Додавање стоп раствора (енгл. *Stop Solution*) да би се зауставила даља ензимска активност и промена боја из плаве у жуту.

По завршетку процедуре интензитет боје је измерен на ELISA читачу *Auto Microplate reader (MRC VT 2100C, Holon, Israel)*, на одговарајућој таласној дужини. Интензитет формиране боје директно зависи од концентрације везаних медијатора у испитиваном узорку. Концентрација цитокина је одређена за сваки појединачни узорак, упоређивањем са стандардном кривом која је направљена од серије предходно познатих концентрација цитокина и уз рекалкулацију разблажења према упутству произвођача. Мерење узорка је извршено у дупликату.

1.3.2.6. Одређивање маркера оксидационог стреса

1.3.2.6.1. Припрема узорка

Узорак ткива леве шапе хомогенизован је у хладном PBS (енгл. *Phosphate buffered saline*) при чему је однос масе и запремине био 1:10. Затим је извршен процес центрифугирања добијених хомогената, током десет минута, на температури од 4°C, при брзини од 1200×g. Добијени супернатанти су одвојени у епендорфице и чувани су на температури од -70°C до тренутка извођења биохемијских анализа.

1.3.2.6.2. Прооксидациони параметри

1.3.2.6.2.1. Индекс липидне пероксидације

Одређивање индекса липидне пероксидације извршено је индиректном методом мерења продуката реакције липидне пероксидације са ТВА, односно нивоа TBARS (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Протокол за одређивање је подразумевао додавање 200 µL 28% ТСА у претходно одмерених 400 µL узорка, уз вортексирање у трајању од пар секунди. Потом су узорци инкубирани на леду током 15 минута, које је праћено 15-минутним центрифугирањем на брзини од 6000 rpm, да би се издвојио супернатант. У другом делу анализе, 400 µL издвојеног супернатанта је помешано са 100 µL 1% ТВА, и смеша је остављена да се инкубира. Након 15-минутне инкубације у воденом купатилу, на температури од 100°C узорци су инкубирани 10 минута на собној температури. Спектрофотометријски (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*) је одређена концентрација ослобођених TBARS, на таласној дужини од $\lambda = 530 \text{ nm}$. За одређивање следеће пробе, уместо узорка коришћена је еквивалентна запремина дестиловане воде (154).

Концентрација TBARS израчуната је на основу дате једначине:

$$\text{nmol TBARS} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1,56 \times 1,25$$

A_u - апсорбанца узорка

A_{sp} - апсорбанца следеће пробе

Вредности наведеног маркера се изражавају у µM, иако се концентрација свих осталих мерених про-оксидационих маркера изражава у nM. Разлог је тај што је количина TBARS за један ранг величина већа од свих осталих параметара.

1.3.2.6.3. Параметри антиоксидационе заштите

1.3.2.6.3.1. Одређивање активности САТ

Каталаза је ензим антиоксидационе заштите организма, који разлаже токсични H₂O₂ на молекул кисеоника и воду. Одређивање активности каталазе се заснива на спектрофотометријској методи, током које се на таласној дужини на којој H₂O₂ поседује могућност апсорбанце светлости, $\lambda = 230 \text{ nm}$ прати брзина разградње H₂O₂. Протокол одређивања активности каталазе је обухватао два корака. Први корак је подразумевао разблаживање узорка, које је извршено додавањем додавањем 10 mL дестиловане воде и 100 µL 70% етанола у 100 µL узорка. Други корак је подразумевао додавање 100 µL

претходно припремљеног разблаженог узорка и 1 mL 10 mM H₂O₂ у 50 µL пуфера за САТ. Потом је спектрофотометријски (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*), коришћењем кварцних кивета, одређена активност каталазе у сваком узорку на таласној дужини $\lambda=230$ nm, приликом чега је сваки узорак измерен шест пута. За одређивање следеће пробе, уместо узорка коришћена је еквивалентна запремина дестиловане воде. Коначне вредности израчунате су на основу раније коришћене схеме за прорачунавање, приликом које се најпре врши одузимање, након чега се рачуна аритметичка средина тих добијених вредности (154).

1.3.2.6.3.2. Одређивање активности SOD

Супероксид дисмутаза чини групу ензима који трансформишу O₂ радикал у H₂O₂ и молекуларни кисеоник и на тај начин обезбеђују одбрану ћелија од реактивних кисеоничних врста. Одређивање активности SOD се заснивало на додавању 1 mL карбонатног пуфера у 100 µL претходно одмереног узорка. Након пар секунди мешања на вортекс мешалици додато је 100 µL адреналина након чега су узорци спектрофотометријски измерени (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*). Мерење апсорбанце се одвијало у дупликату, на таласној дужини $\lambda=470$ nm, при чему је смеша карбонатног пуфера и адреналина коришћена као слепа проба (154).

1.3.2.6.3.3. Одређивање концентрације GSH

За мерење активности редукованог глутатиона коришћена је метода заснована на реакцији оксидације GSH са 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензоевом киселином (DTNB). Поступак одређивања се спроводио кроз два корака. Први корак је подразумевао екстракцију GSH тако што је у 100 µL 0,1% EDTA додато 50 µL узорка и 385 µL преципитационог пуфера. Смеша је мешана на вортекс мешалици пар секунди, након чега је уследила инкубација на леду, у трајању од 15 минута а потом и центрифугирање од 10 минута на 4000 rpm. Други део анализе подразумевао је мешање 300 µL претходно добијеног екстракта са 750 µL натријум-дифосфата (Na₂HPO₄) и 100 µL DTNB. Након инкубације од 10 минута, апсорбанца је мерена на таласној дужини $\lambda=412$ nm, приликом чега је дестилована вода коришћена за слепоу пробу. Четири стандарда са познатим концентрацијама глутатиона су коришћена како би се конструисала калибрациона крива, на основу које је одређена концентрација GSH (154).

1.3.3. Третман зарастања рана

1.3.3.1. Индуција ДМ тип 1

Експериментални модел за индуцију ДМ тип 1 подразумевао је примену стрептозотоцина, који је примењен у дози од 50 mg/kg телесне масе. Стрептозотин је растворен у 1 mL свежје направљеног 0,05 M раствора цитратног пуфера (pH 4,5) и апликован једном интраперитонеалном инјекцијом, након 12 h гладовања (155, 156). Након 72h од администрације стрептозотоцина, наште, из крви, пункцијом латералне репне вене, помоћу *Accu-Chec[®], Roche* апарата су мерене вредности гликемије. Животиње са детектованим вредностима гликемије већим од 11,1 mmol/L су укључене у студију (157).

1.3.3.2. Модел формирања ране

Недељу дана након потврђеног дијабетеса тип 1 животиње су, у зависности од примењеног модела индуковања ране, подељене у две основне групе (158):

- Инцизијска рана;
- Екцизијска рана.

Првобитно, мешавина кетамина (5 mg/kg) и ксилазина (10 mg/kg) је примењена интраперитонеалном инјекцијом у циљу анестезирања животиња. Леђа анестезираних пацова су обријана и очишћена са 70% етанолом.

Екцизијска рана, формирана је помоћу скалпела и маказа и представљала је отворену рану величине 2×2 cm и дубине 2 mm (159, 160).

Инцизијска рана подразумевала је формирање линеарног реза дужине 6 cm (вертикално од главе до репа) након чега је рана затворена хируршким шавовима постањеним на растојању од 1 cm (160).

Одмах након формирања рана, пацови су смештени у одвојене кавезе и третмани су започети свакодневном применом испитиваних формулација.

У односу на примењиван топикални препарат у оквиру основне групе разликовало се по шест подгрупа:

- К - подручје ране није третирано (негативна контрола);
- ССД - подручје ране је третирано 1% сребро-сулфадиазином (позитивна контрола);
- Подлога маст - подручје ране је третирано Еуцерин подлогом;
- Смиље маст - подручје ране је третирано са 0,5% масти смиља;
- Подлога гел - подручје ране је третирано хидрофилним гелом карбомера;
- Смиље гел - подручје ране је третирано са 0,5% гелом смиља.

Свака подгрупа је обухватала по 8 животиња.

1.3.3.3. Хронични третман

Испитиване формулације су примењиване локално, на рану пацова, уз помоћ стерилног штапића. Препарати су апликовани у количини од 0,5 грама једном дневно, укупно 21 дан (161).

1.3.3.4. Параметри праћени током хроничног третмана

Свакога дана је мерена количина хране и воде коју су пацови конзумирали, док је у резултатима представљена просечна потрошња током једне недеље која је изражена на основу телесне масе сваког пацова појединачно. Тако да је количина хране изражена у јединици g хране/100 g телесне масе, док је количина воде изражена као mL воде/100 g телесне масе.

Телесна маса и ниво глукозе у крви наште мерени су једном недељно током целокупног трајања експерименталног периода. Наведени параметри праћени су у свим групама.

1.3.3.5. Контракција ране

Ране пацова су фотографисане одмах након формирања као и након 7, 14 и 21 дана. Процент контракције ране одређен је из израчунате површине ране, која је мерена коришћењем графичког папира и софтвера *Image J*. Процент контракције ране израчунат је за сваку животињу појединачно, у различитим тренуцима коришћењем следеће формуле (162, 163):

$$\% \text{ контракција ране} = \frac{\text{површина ране у } 0. \text{ дану} - \text{површина ране у } (n) \text{ дану}}{\text{површина ране у } 0. \text{ дану}} * 100$$

1.3.3.6. Садржај хидроксипролина

Као индиректни показатељ синтезе колагена одређиван је укупни садржај хидроксипролина. Садржај хидроксипролина је одређиван у узорку ткива коже са подручја на којем је претходно и формирана рана.

1.3.3.6.1. Узorkовање биолошког материјала

Након завршетка тронедељног експерименталног периода, животиње су најпре анестезиране, комбинацијом кетамина и ксилазина а затим и жртвоване методом декапитације. Након жртвовања су уз коришћење скалпела и маказа издвојени узорци ткива коже са подручја на којем је претходно формирана рана.

1.3.3.6.2. Одређивање садржаја хидроксипролина

Процена садржаја хидроксипролина захтева припрему узорка хидролизата ткива. Узорци ткива су првобитно сушени на температури од 60-70°C током 12-18 сати. Након завршеног сушења измерена је тежина сваког узорка, а затим су узорци пренети у стаклене епрувете. Затим, у сваку епрувету је додата HCl у количини од 1 mL на сваких 10 mg сувог узорка и епрувете су инкубиране на температури од 105°C током 4 сата, у циљу хидролизе узорка. Добијени хидролизат је затим центрифугиран на 3000 rpm у трајању од 15 минута и 1 mL добијеног супернатанта је пренесен у епрувету. Супернатант је затим разблажен са 1 mL пуферског раствора који је направљен од лимунске киселине, натријум-хидроксида и безводног натријум-ацетата. Тако разблажен узорак је помешан са хлорамином Т (1 mL) и мешан на вортексу. Запремина од 1 mL Ерлиховог реагенса је додата после 20 минута, смеша снажно промешана и остављена да се инкубира 30 минута на 60°C. Апсорбанца раствора је измерена на 558 nm на UV-1800 спектрофотометру (*Shimadzu, Kyoto, Japan*), а садржај хидроксипролина је процењен као µg/mg тежине сувог ткива (164).

1.3.3.7. Концентрација маркера инфламације

1.3.3.7.1. Узorkовање биолошког материјала

Узорак ткива коже са подручја формиране ране коришћен је и за одређивање концентрације маркера инфламације. Узорци коже су чувани на температури од -80°C до тренутка обављања биохемијских анализа.

1.3.3.7.2. Припрема узорка

Узорак ткива коже масе 100 mg хомогенизован је са 0,5 mL пуфера за лизу ћелија (*Cell lysis buffer*). Добијени хомогенати су подвргнути центрифугирању на 5000 rpm, током 10 минута, на температури од 4°C. Тако добијени супернатанти су одвојени у чисте епендорфице и чувани на температури од -70°C до почетка анализе.

1.3.3.7.3. Одређивање концентрације маркера инфламације

Одређивање концентрације маркера инфламације TNF- α , IL-6 и IL-10 у узорку ткива коже спроведено је на идентичан начин као и када је коришћен узорак ткива шапе. Комплетан поступак је описан у **Поглављу 3.3.2.5.**

1.3.3.8. Патохистолошка анализа

1.3.3.8.1. Припрема узорка

Након жртвовања део изолованог ткива са подручја претходно изазване ране сваке животиње је фиксиран у 10% пуферисаном раствору параформалдехида на 4°C у трајању од 24 сата. Након фиксације, ткива су подвргнута стандардној процедури за парафинско калупљење која обухвата низ корака. Први корак подразумева дехидратацију ткива у серији растућих концентрација изопропил алкохола (70%, 80%, 96% и 100%), након чега следи просветљавање у ксилолу, а потом и калупљење у парафину. Након завршеног калупљења, ткиво је сечено на ротационом микротому на секције дебљине 5 μ m, који су затим испирани у воденом купатилу и лепљени на обична и сијалинизована предметна стакла за потребе имунохистолошких анализа (*Superfrost™ Ultra Plus Adhesion Slides, Thermo Scientific, USA*). Патохистолошку анализу обавио је патолог, који претходно није имао увид у податке који се односе на врсту примењеног третмана.

1.3.3.8.2. Бојење препарата хематоксилин/еозин методом

Неизоставан корак у патохистолошкој анализи представља бојење препарата са циљем да се омогући посматрање препарата под светлосним микроскопом, а као једна од најчешће коришћених техника бојења користи се хематоксилин/еозин. Пре самог процеса бојења неопходно је извршити процес депарафинизације, топљењем парафинских секција у термостату, на температури од 56°C, током 45 минута. На микроскопској плочици остаје само пресек ткива који се потапа у ксилол. Након тога, пресек ткива се проводи кроз серију алкохола у опадајућим концентрацијама (100%, 96%, 80%, 70% алкохол) у циљу рехидратације ткива и на крају се испира дестилованом водом. Затим, секције су бојене *Mayer* хематоксилином у трајању од 10 минута, након чега су испране дестилованом и текућом водом у трајању од 10 и 5 минута. Затим је, током два минута извршено бојење препарата алкохолним еозином које је праћено дехидратацијом ткива коришћењем серије алкохола у растућим концентрацијама (70%, 80%, 96%, 100% алкохол), а потом је потапањем у ксилол извршено просветљавање препарата. На самом крају, секције ткива се прекривају покровним стаклом уз помоћ DPX (*Sigma-Aldrich, Co., USA*). Након сушења од 24 сата извршена је анализа препарата, под светлосним микроскопом (*DMLB 100T, Leica, Wetzlar, Germany*), а добијени резултати су приказани сликама.

1.3.3.8.3. Бојење препарата *Masson trichrome* методом

Често примењивана техника бојења, која омогућава разликовање ћелија од околног везивног ткива, представља *Masson trichrome* бојење. Неопходно је првобитно извршити процес депарафинизације, који се врши топлењем парафинских секција у термостату, на температури од 56°C, током 45 минута. На микроскопској плочици остаје само пресек ткива који се потапа у ксилол. Након тога, пресек ткива се проводи кроз серију алкохола у опадајућим концентрацијама (100%, 96%, 80%, 70% алкохол), у циљу дехидратације ткива и на крају се испира дестилованом водом. Секције препарата се затим преливају смешом раствора киселог фуксина и *Ponceau* (1:1 (v/v)), направљеном непосредно пре употребе и временски период излагања је био 2 минута. Након испирања дестилованом водом, препарати су преливени 1% фосфомолибденском киселином, 2 пута у трајању од по 1 минут. На плочицама је, преко фосфомолибденске киселине додат раствор анилин плавог, током 5 минута да би се омогућило бојење колагена. Након 5 минута извршено је испирање препарата дестилованом водом, током 3 минута, праћено провођењем препарата кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 80%, 96%, 100% алкохол). Након извршене дехидратације, препарати су сушени током 5 минута на температури од 62-64°C, након чега је уследило потапање у толуен током 10 минута, на собној температури. На самом крају, секције ткива се прекривају покровним стаклом уз помоћ DPX (*Sigma-Aldrich, Co., USA*). Након сушења од 24 сата извршена је анализа препарата, под светлосним микроскопом (*DMLB 100T, Leica, Wetzlar, Germany*), а добијени резултати су приказани сликама.

1.3.3.8.4. Имунохистохемијско бојење препарата

Поред стандардног бојења на узорке ткива коже примењено је и имунохистохемијско бојење, за које су коришћена специфична пацовска примарна антитета и то: anti-collagen I (*Abcam; Cambridge, UK*), anti CD34 (*Abcam; Cambridge, UK*), anti-Iba1 (*Abcam; Cambridge, UK*) и anti MMP-9 (*Lab Vision; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*). Парафински пресеци дебљине 5 μm су првобитно изложени поступку депарафинизације, а затим и рехидратације, који су описани у претходном поглављу. Након завршених поступака депарафинизације и рехидратације уследило је демаскирање формалином умрежених епитопа кувањем ткивних исечака у TRIS пуферу (pH=8,2) или цитратном пуферу (pH=6), у зависности од тога које је антители. За anti-collagen I и anti MMP-9 коришћен је TRIS пуфер, док је цитратни пуфер коришћен за anti-Iba1 и anti CD34. Плочице су затим хлађене, а потом и испране PBS. Блокирање активности ендogene пероксидације је омогућено додатком 3% раствора водоник-пероксида, а затим су испране коришћењем PBS. Раствор примарног антитета је додат на ткивне исечке и у влажној комори је током сат времена спроведена инкубација на собној температури. Након испирања употребом PBS на ткивне исечке је додата *Streptavidin Peroxidas*, праћена 10-минутном инкубацијом и испирањем PBS. Следећи корак био је додавање DAB реагенса (енгл. 3,3'-diaminobenzidine, DAB) уз одговарајућу инкубацију праћену испирањем препарата дестилованом водом, које је праћено контрастирањем применом *Mayer* раствора хематоксилина током два минута. Потом ткивни исечци су испрани дестилованом водом, након чега је уследио поступак дехидратације и просветљавања, који су претходно већ описани. На самом крају, секције ткива се прекривају покровним стаклом уз помоћ DPX. Након сушења од 24 сата извршена је анализа препарата, под светлосним микроскопом а добијени резултати су приказани сликама.

1.3.3.9. Системски и ткивни редокс статус

1.3.3.9.1. Узорковање биолошког материјала

По завршетку тронедељног експерименталног периода, животиње су најпре анестезиране мешавином кетамина и ксилазина а затим су жртвоване декапитацијом.

У тренутку жртвовања из југуларне вене су сакупљени узорци крви да би се одредио системски редокс статус пацова. После првобитног центрифугирања узорака, у горњем делу *Vacutainer* тубе издвојена је плазма, која се препознаје као жути слој. Након издвајања плазме еритроцити, који се скупљају на дну тубе, испирају се три пута физиолошким раствором, након чега се додатком хладне дестиловане воде формира лизат еритроцита. Издвојена плазма и лизат се чувају на температури од -20°C до извођења потребних биохемијских анализа.

У узорцима плазме одређивани су нивои прооксидационих параметара: водоник-пероксид (H_2O_2), супероксид анјон радикал (O_2^-), азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-) и индекс липидне пероксидације, мерен као TBARS. Параметри антиоксидационог одбрамбеног система као што је ниво неензимског антиоксиданса GSH и активност антиоксидационих ензима SOD и CAT, одређивани су у лизату еритроцита.

Додатно, уз коришћење скалпела и маказа, изоловани су и узорци ткива коже са подручја на којем је претходно изазвана рана. Узоркована ткива су чувана на температури од -70°C . У хомогенату ткива одређиван је ниво прооксидационог маркера TBARS, као и параметри антиоксидационог система одбране: GSH, SOD и CAT.

1.3.3.9.2. Прооксидациони параметри

1.3.3.9.2.1. Одређивање водоник-пероксида (H_2O_2)

Квантификација H_2O_2 се заснива на хемијској реакцији оксидације фенол црвеног посредством H_2O_2 , у којој се као катализатор примењује ензим пероксидаза, изолован из коњске ротквице. Поступак одређивања је подразумевао додавање $800\ \mu\text{L}$ раствора фенол црвеног и $10\ \mu\text{L}$ пероксидазе (POD) у $200\ \mu\text{L}$ узорка плазме. Смеша је затим инкубирана 10 минута на собној температури и апсорбанца сваког узорка је мерена на таласној тежини $\lambda = 610\ \text{nm}$. За одређивање слепе пробе, уместо узорка коришћена је еквивалентна запремина дестиловане воде. Како је период настанка и ослобађања H_2O_2 5-60 минута, у датом периоду је извршено и мерење апсорбанце, а концентрација и количина H_2O_2 је израчуната на основу датих једначина (165):

$$\Delta A = A_y - A_{sp}$$

$$F = \Delta A / \text{nmol H}_2\text{O}_2 / \text{cuv}$$

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2 / \text{ml плазма} = \Delta A / F$$

F - фактор апсорбанце/nmol H_2O_2

ΔA - коначна апсорбанца

A_y - апсорбанца узорка

A_{sp} - апсорбанца слепе пробе

1.3.3.9.2.2. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Хемијска реакција нитро тетразолијум плавог (енгл. *Nitro blue tetrazolium*) и O_2^- , у којој се као крајњи производ формира нитро формазон плави (енгл. *Nitro formazon blue*), представља реакцију одређивања концентрације O_2^- . Поступак одређивања се базирао на

узорковању 50 μL плазме, у коју је *ex tempore* испипетирано 950 μL есејне смеше. Апсорбанца је измерена, уз мешање три пута. Мерење је спроведено на сваких 60 секунди, а дефинисана таласна дужина је била $\lambda = 550 \text{ nm}$. За одређивање слепе пробе употребљена је еквивалентна запремина дестиловане воде (165).

Концентрација ослобођеног O_2^- израчуната је применом датих једначина:

$$\begin{aligned} \Delta E_y &= E_{2y} - E_{1y} \\ \Delta E_{sp} &= E_{2sp} - E_{1sp} \\ \Delta E &= \Delta E_y - \Delta E_{sp} \\ \text{nmol O}_2^- / \text{ml плазме} &= \Delta E / 0,015 \times 1/0,05 \end{aligned}$$

ΔE - коначна апсорбанца

E_y - апсорбанца узорка

E_{sp} - апсорбанца слепе пробе

1.3.3.9.2.3. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Ниво ослобођених нитрита у узорку је одређиван индиректном методом за одређивање ослобођеног азот-моноксида (NO). Протокол одређивања концентрације NO_2^- је спроведен у два дела. Први део анализе обухватао је додавање 200 μL узорка плазме у претходно испипетирану смешу од 100 μL перхлорне киселине и 400 μL етилендиаминтетраацетатне киселине (EDTA). Након краткотрајног мешања на вортекс мешалици узорци су инкубирани на леду током 15 минута, а затим подвргнути центрифугирању на брзини од 6000 rpm . Издвојени супернатант је декантован, а у формираном талогу је додато 220 μL калијум-карбоната (K_2CO_3). Други део анализе је подразумевао коришћење нових епрувета у које је пипетирано 200 μL новоформираног узорка, а затим је додато 250 μL свеже припремљеног *Griess* реагенса и 125 μL пуфера за NO . *Griess* реагенс представља смешу једнаких запремина 1% сулфанилне киселине растворене у 5% орто-фосфорној киселини и 0,1% воденог раствора N-(1-нафтил)-етилендиамин-дихидрохлорида (NEDA). Смеша је инкубирана у трајању од 15 минута, на собној температури, након чега је апсорбанца измерена на таласној дужини $\lambda = 550 \text{ nm}$. За одређивање слепе пробе употребљена је еквивалентна запремина дестиловане воде (165).

Концентрација ослобођених нитрита израчуната је применом дате једначине:

$$\text{nmol NO}_2^- / \text{ml плазма} = \Delta E (E_y - E_{sp}) / F$$

ΔE - коначна апсорбанца

E_y - апсорбанца узорка

E_{sp} - апсорбанца слепе пробе

F - аритметичка средина добијених стандарда

1.3.3.9.2.4. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Одређивање индекса липидне пероксидације у узорку плазме и хомогенату ткива коже извршено је на идентичан начин као и када је коришћен узорак ткива шапе. Комплетан поступак је описан у Поглављу 3.3.2.6.2.1.

1.3.3.9.3. Параметари антиоксидационе заштите

Поступак одређивања маркера антиоксидационе заштите у лизату еритроцита и хомогенату ткива коже попут CAT, SOD и GSH се спроводи на идентичан начин као и када је коришћен узорак ткива шапе. Комплетан поступак је описан у **Поглављу 3.3.2.6.3.**

1.4. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је прорачуната на основу резултата раније публиковане студије (166). У одговарајућем рачунарском програму студијски узорак је израчунат коришћењем двостраног t- теста за везани узорак, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2). Базирајући се на резултатима наведене студије, укупан број експерименталних животиња, *Wistar Albino* пацова мушког пола је прорачунат на 144. Узимајући у обзир могућност искључења одређених експерименталних животиња из завршне анализе, укупан студијски узорак је утврђен на најмање 174 експерименталних животиња.

1.5. Статистичка обрада и анализа података

Статистичка анализа података извршена је коришћењем статистичког програма *IBM Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS, IBM Corp., Armonk, NY, USA)* за оперативни ситем *Windows v23.0*. Креирање графикона спроведено је коришћењем софтвера *Microsoft Excel* за оперативни ситем *Windows v2016 (Microsoft, Redmond, Washington, USA)*. Процена нормалности расподеле података је извршена коришћењем *Shapiro-Wilk* теста. У зависности од нормалности расподеле података коришћени су непараметарски *Kruskal-Wallis H* и *Mann-Whitney U* тестови или параметарски *One-Way ANOVA* и *Independent Samples T*-тест. Резултати су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација (SD), табеларно и графички. Вредност $p < 0,05$ постављена је као индикатор статистичке значајности.

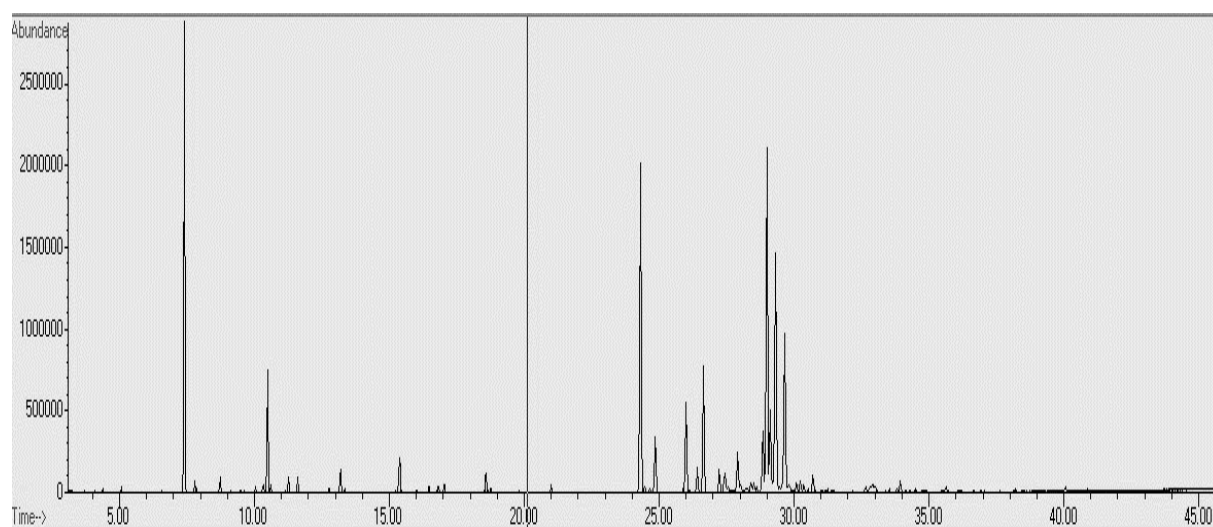
IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Хемијска карактеризација етарског уља смиља

GC/MS хроматограм етарског уља смиља приказан је на **Слици 5**, док је хемијски састав етарског уља приказан у **Табели 10**. Добијени резултати GC/MS анализе показују да је идентификовано четрдесет шест компоненти, које представљају 98,37% укупног састава етарског уља, од којих је велики број једињења присутан у траговима. Најзаступљенију класу хемијских једињења представљају сесквитерпенски угљоводоници, са укупним релативним садржајем од скоро 60%, док монотерпенски угљоводоници чине 18,52% укупног састава етарског уља. Компоненте које су детектоване у највећем проценту су сесквитерпенски угљоводоник γ -куркумен (14,07%), оксигеновани монотерпен нерил-ацетат (12,96%), монотерпенски угљоводоник α -пинен (12,38%), као и сесквитерпенски угљоводоници β -селинен (11,27%) и α -селинен (7,27%).



Слика 5. GC/MS хроматограм етарског уља *H. italicum*

Табела 10. Квалитативна и квантитативна анализа етарског уља *H. italicum*

Редни број	Компонента	Ретенциони индекс [tR]	%
Монотерпенски угљоводоници			18,52
1	α -пинен	937	12,38
2	камфен	952	0,43
3	β -пинен	978	0,44
4	β -мирцен	991	0,03
5	δ -2-карен	1001	0,13
6	α -феландрен	1005	0,06
7	δ -3-карен	1011	0,05
8	α -терпинен	1017	0,25
10	лимонен	1030	3,74
12	<i>cis</i> - β -оцимен	1037	0,43
13	γ -терпинен	1060	0,45
14	терпинолен	1088	0,13
Ароматични монотерпенски угљоводоници			0,37
9	<i>p</i> -цимен	1025	0,37
Оксигеновани монотерпени			15,56
11	1,8-цинеол	1032	0,23
16	линалол	1099	0,76
17	фенхол	1113	0,13
19	<i>endo</i> -борнеол	1167	0,06
20	терпинен-4-ол	1177	0,23
21	α -терпинеол	1189	0,28
22	нерол	1228	0,74
23	гераниол	1253	0,17
23	нерил-ацетат	1364	12,96
Сесквитерпенски угљоводоници			59,62
24	α -кубебен	1351	2,37
25	иланген	1372	0,17
26	α -копаен	1376	0,34
27	β -кубенен	1388	0,97
28	италицен	1403	3,58
29	<i>cis</i> - α - бергамотен	1415	0,93
30	<i>trans</i> - β - кариофилен	1419	4,89
31	цедрен	1422	0,45
32	<i>trans</i> - α - бергамотен	1435	0,88
33	аромандендрен	1441	1,06
34	хумулен	1454	0,48
35	алоаромандендрен	1461	2,66
36	акорадиен	1471	0,44
28	<i>ar</i> -куркумен	1480	1,07
29	γ -куркумен	1483	14,07
40	β -селинен	1486	11,27
41	α -селинен	1494	7,27
42	δ -селинен	1497	3,36
43	α -муролен	1499	0,95
44	δ -кадинен	1524	2,41
Оксигеновани сесквитерпени			0,77
45	кариофилен оксид	1581	0,77
46	<i>trans</i> -фарнезол	1725	0,26
Алифатичне компоненте			0,34
21	додекан	1201	0,34
Остало			3,19
15	бутил-ангелат	1091	0,29
18	2-метилбутил-ангелат	1146	1,25
37	гераниол-пропионат	1475	1,65
Укупно идентификованих једињења			98,37
[tR] — Ретенциони индекс у односу на C9-C24 n-алкана на HP 5MS колони			

4.2. Антиоксидациони потенцијал етарског уља смиља

Резултати испитивања *in vitro* антиоксидационе активности етарског уља смиља, процењене применом пет различитих тестова приказани су у Табели 11.

Када говоримо о способности неутралисања DPPH радикала од стране етарског уља смиља и пропил-галата, као примењеног стандарда, резултати су показали да је 4,45 µg/mL етарског уља смиља потребно да се постигне 50% инхибиције DPPH радикала. Вредности дате анализе указују да је пропил-галат показао знатно снажнију активност неутрализације DPPH радикала у односу на етарско уље смиља, са IC₅₀ вредношћу од 0,69 ± 0,03 µg/mL.

Капацитет неутралисања OH радикала је био у опсегу од 0,03 ± 0,01 µg/mL до 13,33 ± 1,11 µg/mL. Најјачу активност неутралисања датог радикала показао је бутиловани хидрокситолуен, што се уочава на основу најмање IC₅₀ вредности која је износила 0,03 ± 0,01 µg/mL. Са друге стране, најслабију антиоксидациону активност показало је етарско уље смиља са IC₅₀ = 13,33 ± 1,11 µg/mL. Када су у питању стандарди, поред бутилованог хидрокситолуена, који се показао као једињење са најјачом антиоксидационом активношћу, када говоримо о неутрализацији OH радикала, аскорбинска киселина је показала знатно снажнију инхибиторну активност, у односу на пропил-галат.

Капацитет етарског уља смиља да неутралише NO радикал није било могуће детектовати. Тестовима антиоксидационе активности етарског уља смиља је поред антирадикалског деловања обухваћено и испитивање инхибиције липидне пероксидације, с обзиром да је пероксидација незасићених масних киселина основни узрок оксидативног оштећења ћелијских мембрана. Самим тим, резултати инхибиције липидне пероксидације указују да је етарско уље смиља инхибирало липидну пероксидацију са IC₅₀ = 10,48 ± 1,22 mg/mL, што је упоредиво са инхибицијом која је постигнута применом бутилованог хидрокситолуена (IC₅₀ = 7,13 ± 0,54 mg/mL).

Резултат одређивања редокс потенцијала етарског уља смиља изражен је као редокс еквивалент аскорбинске киселине. На основу података приказаних у табели уочава се да вредност FRAP теста етарског уља смиља износи 0,03 ± 0,00 mg AKE/mL етарског уља.

Табела 11. Антиоксидациони потенцијал етарског уља смиља и референтних стандарда

Узорак	DPPH [•] IC ₅₀ (µg/mL)	OH [•] IC ₅₀ (µg/mL)	NO [•] IC ₅₀ (µg/mL)	LP IC ₅₀ (µg/mL)	FRAP (mg AKE/mL етарског уља)
Етарско уље смиља	4,45 ± 0,44	13,33 ± 1,11	н.д.	10,48 ± 1,22	0,03 ± 0,00
Аскорбинска киселина	/	2,03 ± 0,39	/	/	/
Пропил-галат	0,69 ± 0,03	9,01 ± 0,48	/	/	/
Бутиловани хидрокситолуен	/	0,03 ± 0,01	/	7,13 ± 0,54	/

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација. AKE - еквивалент аскорбинске киселине; DPPH[•] - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал; OH[•] - хидроксил радикал; NO[•] - нитрозо радикал; LP - липидна пероксидација; FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*; н.д. – није детектовано.

4.3. Карактеризација топикалних формулација етарског уља смиља

4.3.1. Карактеризација масти на бази етарског уља смиља

Физичко-хемијска карактеризација масти са етарским уљем смиља обухватила је органолептичка испитивања и реолошка мерења. Органолептичким испитивањем запажено је да формулација са етарским уљем смиља има изглед хомогене масти, без грудвица, жуте боје и интензивног мириса који је карактеристичан за етарско уље. Препарат је фине, уједначене, получврсте конзистенције. У погледу размазивости примећено је да се дата формулација добро размазује по кожи и оставља лепљив траг. У току периода праћења од шест месеци на собној температури нису уочене промене боје, мириса, конзистенције, као ни хомогености дате формулације (**Табела 12**).

Табела 12. Карактеристике масти на бази етарског уља смиља три дана и шест месеци након припреме

Параметар	Три дана	Шест месеци
Боја	Жута	Жута
Мирис	Карактеристичан за етарско уље	Карактеристичан за етарско уље
Конзистенција	Получврста	Получврста
Хомогеност	Хомогена маст	Хомогена маст
Размазивост	Лако размазива	Лако размазива

Процена физичке стабилности масти са етарским уљем смиља спроведена је кроз реолошку карактеризацију узорка измереног 3 дана и 6 месеци након израде. Крива протицања, која показује зависност напона смицања од брзине смицања, у различитим временским тачкама при константној температури од $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ приказана је на **Графику 1А** док је крива протицања која показује зависност вискозитета од брзине смицања приказана на **Графику 1Б**. На реограмима су приказане криве протицања формулације масти са инкорпорираним етарским уљем смиља 3 дана и 6 месеци након израде. Присуство хистерезне површине на реограму потврђује да маст показује временски зависно, тиксотропно протицање. Слабе везе које се формирају између неполарних компонената у получврстим мастима лако пуцају при смицању. Вискозитет масти се смањило са повећањем брзине смицања услед разградње структуре. Након одржавања константне брзине смицања, у следећем кораку, смањење брзине смицања довело је до непотпуног опоравка вискозитета масти, стварајући тиксотропну петљу.

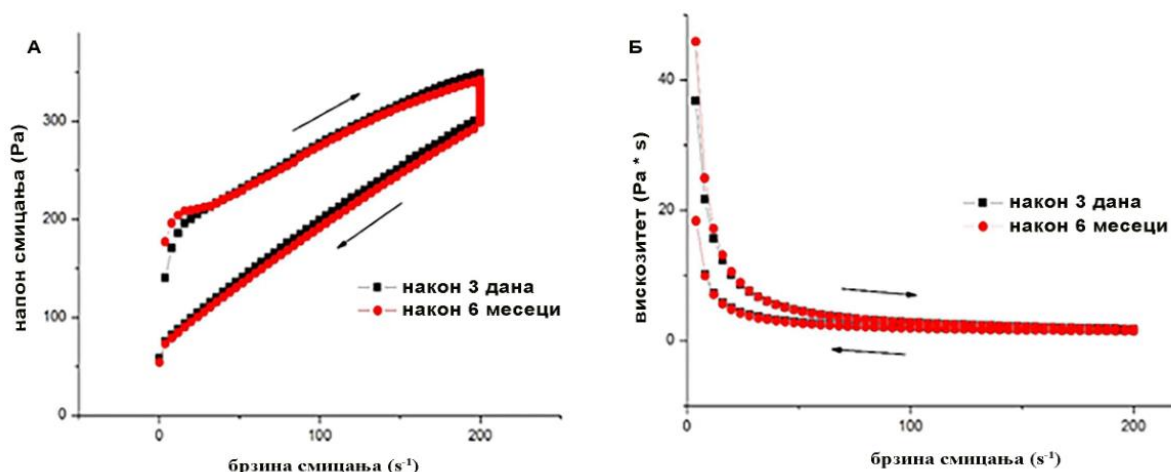


График 1. Зависност А) напона смицања; Б) вискозитета од брзине смицања у различитим временским тачкама

Вискоеластична својства масти са смиљем су одређена тестовима амплитуде и фреквенције у различитим временским тачкама. У циљу утврђивања вискоеластичног режима коришљен је „*Frequency sweep*“ тест. Резултати реолошког мерења модула еластичности (G') и вискозности (G'') у функцији фреквенције приказани су на **Графику 2**. Еластична компонента сложеног вискоеластичног понашања је током промене испитиваних фреквенција била већа од вискозне компоненте ($G' > G''$), што указује на то да је еластична компонента масти израженија од вискозне.

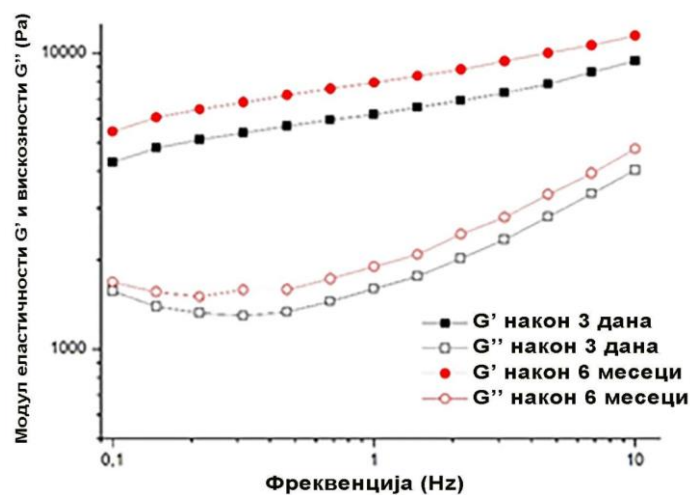


График 2. Зависност модула еластичности (G') и модула вискозности (G'') од фреквенције у различитом временском тренутку

4.3.2. Карактеризација гела на бази етарског уља смиља

Карактеризација гела са етарским уљем смиља обухватила је органолептичко испитивање, испитивање рН вредности, тест центрифугирања и реолошка мерења.

Органолептичким испитивањем гела са етарским уљем смиља запажено је да формулација има карактеристичан изглед транспарентног хомогеног гела, без грудвица, интензивног мириса које је карактеристично за етарско уље. Препарат је fine, уједначене, получврсте конзистенције. У погледу размазивости примећено је да се дата формулација добро размазује по кожи, не остављајући лепљив траг. Није примећена било каква промена боје, мириса, конзистенције, као ни хомогености дате формулације у току периода праћења од 6 месеци (Табела 13).

Физичко-хемијска испитивања формулације гела са етарским уљем смиља обухватила су и одређивање рН вредности. Резултати указују на то да није било значајних промена рН вредности у датом временском периоду, с обзиром да је иницијална рН вредност, измерена три дана након израде самог препарата износила 6,57 док је вредност након 6 месеци била 6,14 (Табела 13).

Табела 13. Карактеристике гела на бази етарског уља смиља три дана и шест месеци након припреме

Параметар	Три дана	Шест месеци
Боја	Бела, прозирна	Бела, прозирна
Мирис	Карактеристичан за етарско уље	Карактеристичан на етарско уље
Конзистенција	Получврста	Получврста
Хомогеност	Нема раздвајања фаза	Нема раздвајања фаза
Размазивост	Лако размазив	Лако размазив
рН	6,57 ± 0,01	6,14 ± 0,03
Тест центрифугирања	Без знакова нестабилности	Без знакова нестабилности

Реолошка карактеризација гела са инкорпорираним уљем смиља представљена је реограмима, који приказују зависност напона смицања односно вискозитета од брзине смицања дате формулације, 3 дана и 6 месеци након израде, а који су приказани на **Графику 3А, односно 3Б**. Присуство хистерезне површине на графикону зависности напона смицања од брзине смицања потврђује да гел са смиљем показује временски зависно, тиксотропно протицање. Тиксотропно течење је уобичајено за гелове, јер долази до формирања веза између полимерних ланаца који се распадају при смицању. Промене у реолошком понашању испитиваног препарата након шест месеца чувања нису примећене.

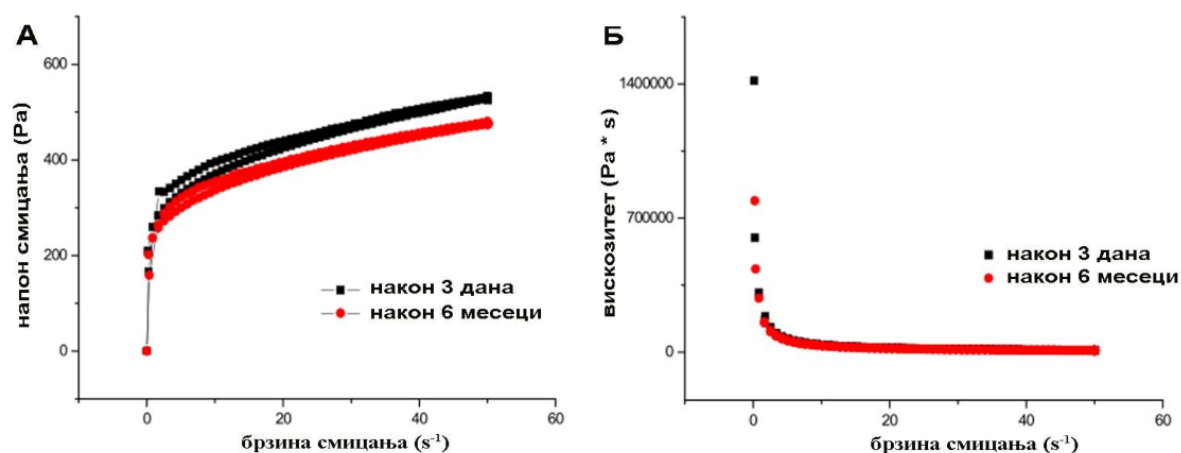


График 3. Зависност А) напона смицања; Б) вискозитета од брзине смицања у различитим временским тачкама

Резултати реолошког мерења модула еластичности (G') и вискозности (G'') у функцији фреквенције приказани су на **Графику 4**. За дату формулацију модул еластичности (G') је доминирао над модулом вискозности (G'') за опсег фреквенција 0,1-10 Hz. На основу тога можемо закључити да се формулација гела са инкорпорираним уљем смиља понаша као вискоеластична супстанца у опсегу утврђене фреквенције. Такво понашање је типично за гелове, због саме структуре полимера, као и веза формираних између полимерних ланаца.

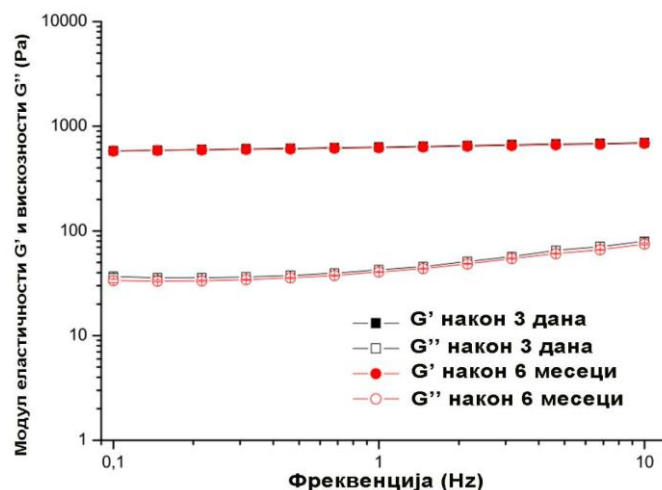


График 4. Зависност модула еластичности (G') и модула вискозности (G'') од фреквенције у различитом временском тренутку

4.4. Акутна дермална иритација

4.4.1. Маст на бази етарског уља смиља

Животиње којима је апликована маст на бази етарског уља смиља нису показале клиничке знаке токсичности, попут дрхтавице, конвулзија, дијареје. Није забележена ни појава морталитета у испитиваној групи. Нежељене реакције које указују на појаву дермалне иритације, попут свраба, еритема, упале и едема током 14 дана посматрања нису примећене. На то указује скор формирања еритема и едема, чија је укупна вредност 0. Чињеница да у посматраном периоду нису примећене нежељене реакције указује на то да је маст са инкорпорираним уљем смиља безбедна за употребу.

4.4.2. Гел на бази етарског уља смиља

Резултати теста спроведеног на животињама, којима је апликован гел на бази етарског уља смиља, показују да је наведена формулација безбедна за коришћење. То се може закључити на основу скор формирања едема и еритема, чија је укупна вредност 0. Није забележена појава морталитета али ни знаци токсичности попут дрхтавице, дијареје и конвулзија. Никакви знаци дермалне иритације, попут свраба, еритема, упале и едема нису примећени у току периода посматрања од 14 дана.

4.5. Антиинфламацијска активност испитиваних формулација

4.5.1. Дебљина шапе

4.5.1.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Резултати *in vivo* антиинфламацијске активности, који приказују промену дебљине шапе услед примене испитиваних формулација, приказани су у **Табели 14**. Очекивано, примена стандардног антиинфламацијског лека, хидрокортизона, показала је највећи проценат инхибиције едема шапе, и то од почетног првог сата, па све до краја испитиваног периода, односно четвртог сата. Најизраженији степен инхибиције у хидрокортизон групи примећен је у четвртом сату и износио је 65,20%. Примена масти на бази етарског уља смиља је изазвала значајно смањење дебљине шапе пацова у односу на негативну контролну групу, што је детектовано у трећем и четвртом сату након субплантарне апликације карагенана. Најизраженији ефекат масти на бази смиља је постигнут у трећем и четвртом сату, са процентом инхибиције 42,55%, односно 59%. Додатно, примена масти на бази етарског уља смиља је изазвала већу инхибицију едема шапе у поређењу са применом подлоге за маст у свим тачкама испитиваног временског интервала.

Табела 14. Ефекти испитиваних формулација на промену дебљине шапе.

Дебљина шапе пацова (mm) (% инхибиције)					
Групе	0h	1h	2h	3h	4h
К	3,80 ± 0,02	5,03 ± 0,23	6,20 ± 0,46	6,93 ± 0,31	5,47 ± 0,23
ХДК	3,93 ± 0,31	5,00 ± 0,40 (13,51%)	5,64 ± 0,33* (29,03%)	5,43 ± 0,40* (52,13%)	4,51 ± 0,62* (65,20%)
ПМ	4,50 ± 0,44	5,66 ± 0,60 (5,95%)	6,67 ± 2,14 (9,45%)	7,05 ± 0,51 (18,51%)	5,71 ± 0,48 (27,60%)
СМ	4,53 ± 0,06	5,66 ± 0,20 (8,38%)	6,34 ± 0,87 (24,72%)	6,33 ± 1,16* (42,55%)	5,22 ± 0,16* (59,00%)

Резултати су изражени као средња вредност ± стандардна девијација (n=6).

* статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом;
К - контролна група; ХДК - хидрокортизон; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.5.1.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Ефекти примене гела са етарским уљем смиља на промену дебљине шапе представљени су у Табели 15. Примена хидрокортизона је остварила потентнији антиинфламацијски потенцијал, изражен кроз проенат инхибиције едема шапе пацова, у односу на групе животиња којима су апликоване формулације подлоге и гела на бази смиља. Исто тако, примена хидрокортизона је показала статистички значајно смањење едема шапе у односу на контролну групу, у другом, трећем и четвртом сату, са степеном инхибиције од 29,09%, 52,13%, односно 65,20%. Са друге стране, примена гела на бази етарског уља смиља је показала већи степен инхибиције едема шапе на односу на контролну негативну групу и групу којој је апликована подлога за гел. Статистички значајна разлика у инхибицији едема шапе у смиље гел групи у односу на контролну групу примећена је у трећем и четвртом сату. Примена гела на бази етарског уља смиља је довела до највећег смањења едема шапе пацова у четвртом сату, са процентом од 56%.

Табела 15. Ефекти формулације гела са инкорпорираним етарским уљем смиља на промену дебљине шапе

Дебљина шапе пацова (mm) (% инхибиције)					
Групе	0h	1h	2h	3h	4h
К	3,80 ± 0,02	5,03 ± 0,23	6,20 ± 0,46	6,93 ± 0,31	5,47 ± 0,23
ХДК	3,93 ± 0,31	5,00 ± 0,40 (13,51%)	5,64 ± 0,33* (29,03%)	5,43 ± 0,40* (52,13%)	4,51 ± 0,62* (65,20%)
ПГ	4,37 ± 0,50	5,55 ± 0,53 (4,05%)	6,58 ± 0,51 (7,78%)	7,01 ± 0,32 (15,53%)	5,64 ± 0,31 (23,80%)
СГ	4,71 ± 0,15	5,77 ± 0,21 (8,11%)	6,48 ± 0,15 (23,06%)	6,47 ± 0,06* (41,49%)	5,37 ± 0,29* (56,00%)

Резултати су изражени као средња вредност ± стандардна девијација (n=6).

* статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом;
К - контролна група; ХДК - хидрокортизон; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.5.2. Маркери инфламације у хомогенату шапе

4.5.2.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Концентрације проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-6 као и антиинфламацијског IL-10 приказане су на **Графику 5**. Примена масти на бази етарског уља смиља допринела је значајном смањењу концентрације прооксидационих маркера детектованих у хомогенату шапе, у поређењу са негативном контролном групом (**Графици 5А и 5Б**). Са друге стране, највећа концентрација антиинфламацијског маркера IL-10 у хомогенату ткива шапе измерена је код животиња којима је апликована формулација на бази етарског уља смиља (**График 5В**). Није примећена значајна разлика између концентрација ових маркера између хидрокортизон и смиље маст групе.

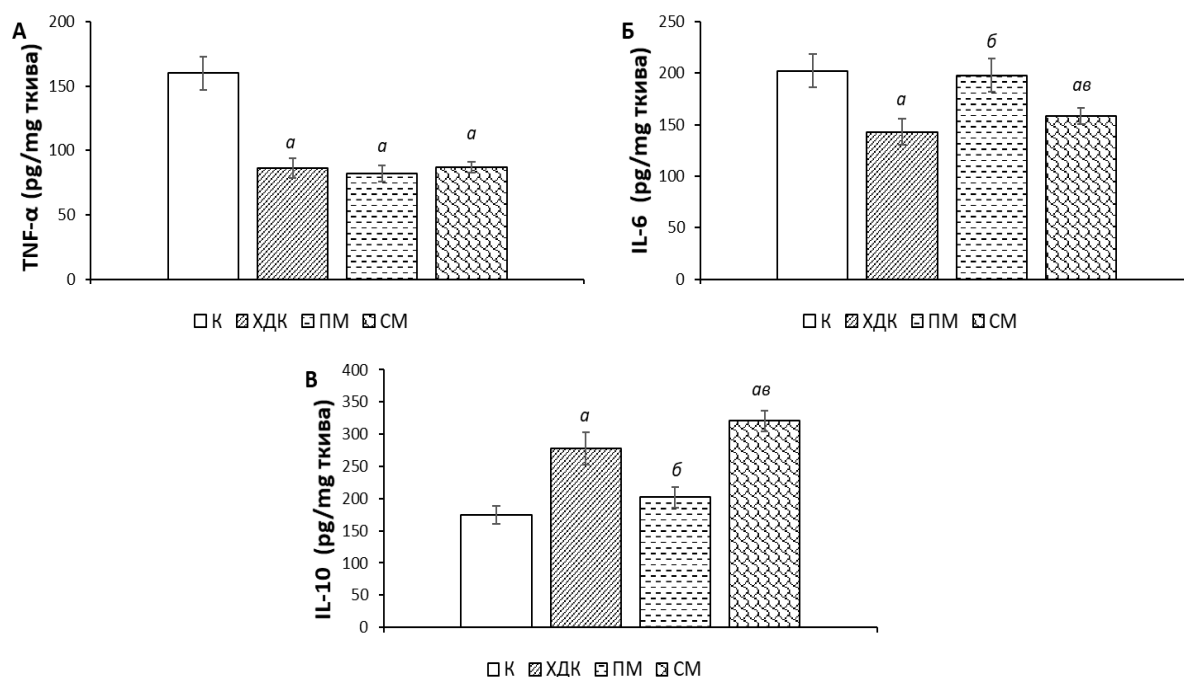


График 5. Ефекти примењених формулација на проинфламацијске и антиинфламацијске маркере у хомогенату ткива шапе: А) TNF-α; Б) IL-6; В) IL-10. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=6). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ХДК групом; ^{ав} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПМ групом. К - контролна група; ХДК - хидрокортизон; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.5.2.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Примена гела на бази етарског уља допринела је смањењу концентрације проинфламацијских медијатора у хомогенату инфламиране шапе (**Графици 6А и 6Б**). Концентрације TNF-α и IL-6 у групи третираној гелом на бази смиља су бележиле сличне вредности као у групи животиња третираних стандардним антиинфламацијским средством, хидрокортизоном. Са друге стране, примена формулације гела са етарским уљем смиља је статистички значајно повећала концентрацију IL-10 у односу на контролну групу и групу третирану подлогом (**График 6В**).

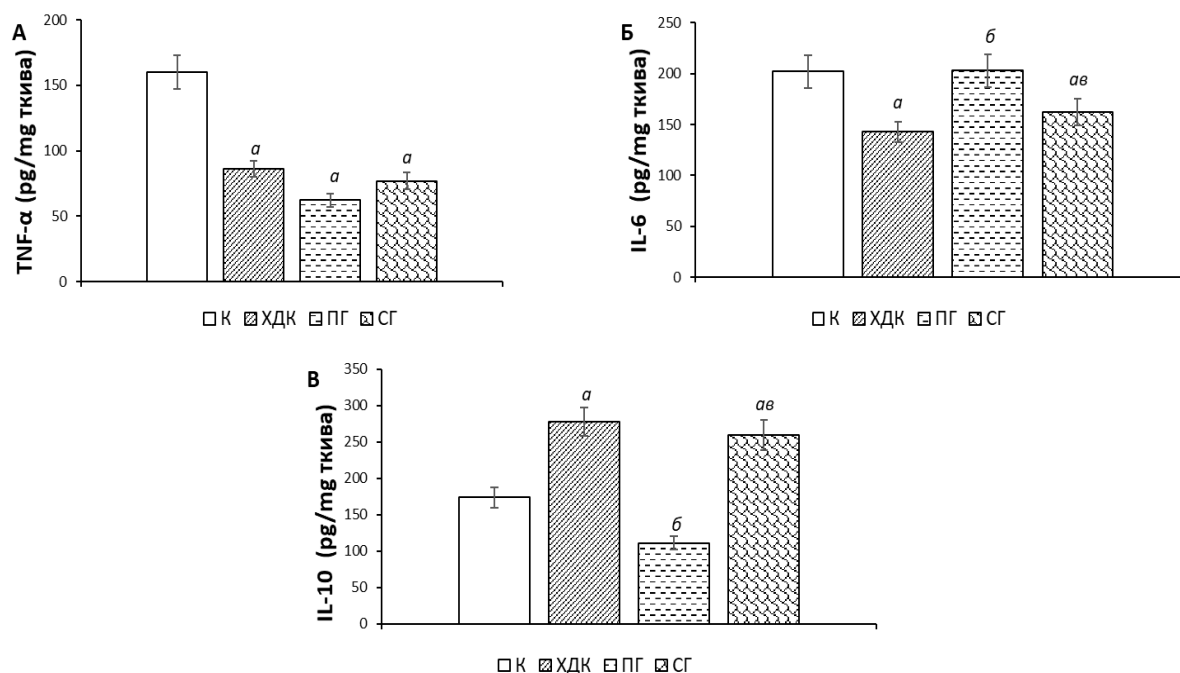


График 6. Ефекти примењених формулација на проинфламацијске и антиинфламацијске маркере у хомогенату ткива шапе: А) TNF-α; Б) IL-6; В) IL-10. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=6). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ХДК групом; ^{ав} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ХДК - хидрокортизон; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.5.3. Маркери оксидационог стреса у хомогенату шапе

4.5.3.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Параметри оксидационог стреса мерени у хомогенату ткива шапе представљени су на **Графику 7**. Резултати указују да је вредност прооксидационог маркера, TBARS, била најнижа у групи животиња које су претходно третиране формулацијом масти на бази смиља (**График 7А**). Са друге стране, параметри антиоксидационе заштите показују да су САТ и GSH активност биле значајно веће у смиље маст групи у односу на контролне групе (**Графици 7Б и 7В**). Значајних разлика између испитиваних група није било приликом одређивања концентрације GSH (**График 7Г**).

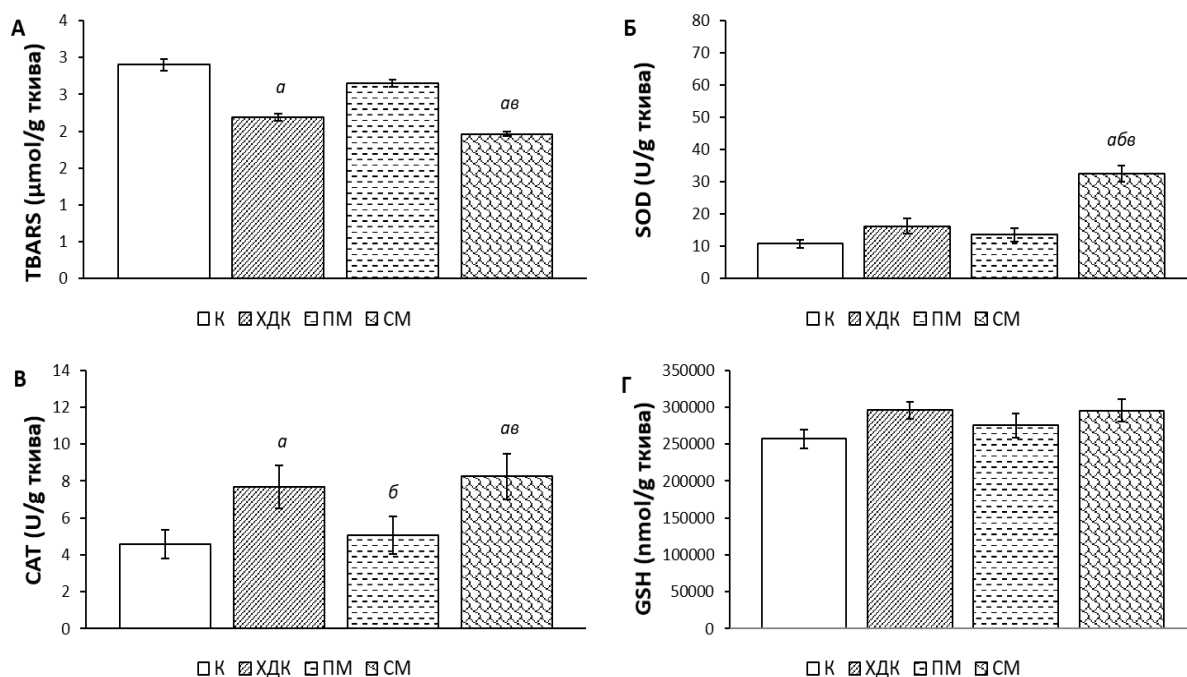


График 7. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у хомогенату ткива шапе: А) TBARS; Б) SOD; В) CAT; Г) GSH. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=6$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ХДК групом; ^v Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ХДК - хидрокортизон; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.5.3.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Након спроведених биохемијских анализа у узорку ткива шапе уочено је смањење нивоа TBARS у групи животиња третираних формулацијом гела на бази етарског уља смиља у односу на негативну контролну и групу третирану подлогом (**График 8А**). Такође, примена гела на бази смиља је показала већи степен антиоксидационе заштите праћен кроз повећање вредности CAT и SOD у односу на контролну групу (**График 8Б и 8В**). Одређивање концентрације GSH није довело до значајних разлика између испитиваних група.

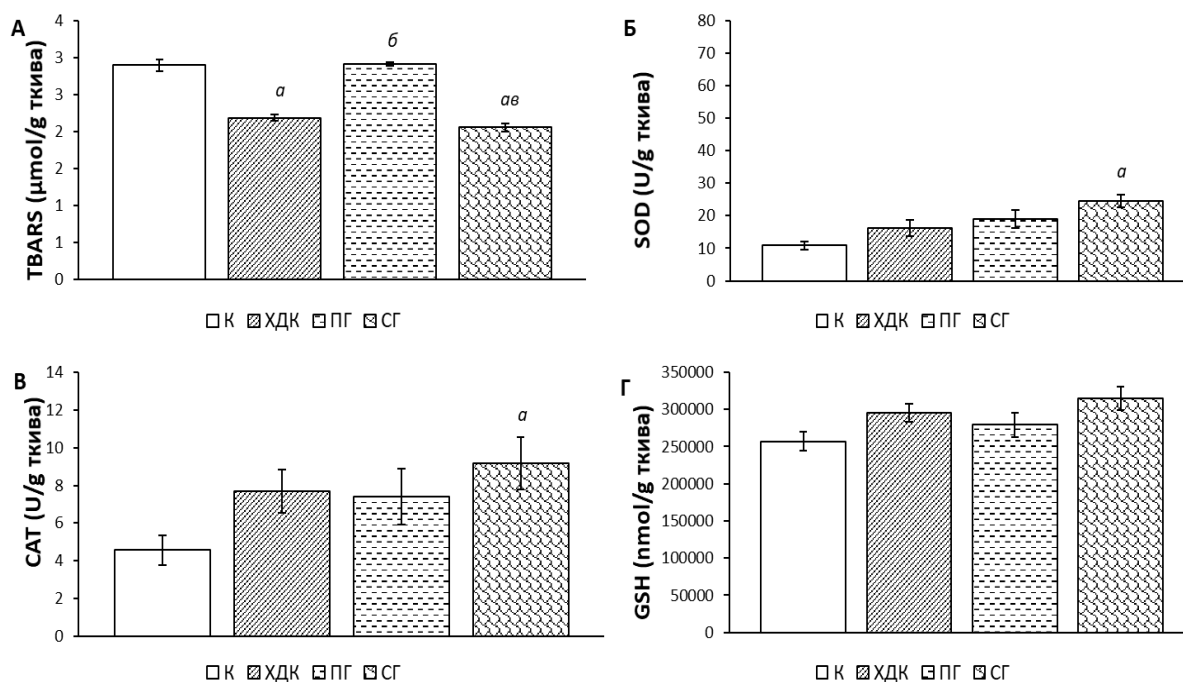


График 8. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у хомогенату ткива шапе: А) TBARS; Б) SOD; В) CAT; Г) GSH. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=6). ^a Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са ХДК групом; ^{ав} Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ХДК - хидрокортизон; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6. Ефекти топикалних формулација на процес зарастања рана изазваних методом ексцизије

4.6.1. Дневни унос хране и воде

4.6.1.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Дневни уноси хране и воде у третираним групама представљени су на **Графику 9**. Резултати показују да између група није уочена разлика у погледу уноса хране и воде у току периода од три недеље.

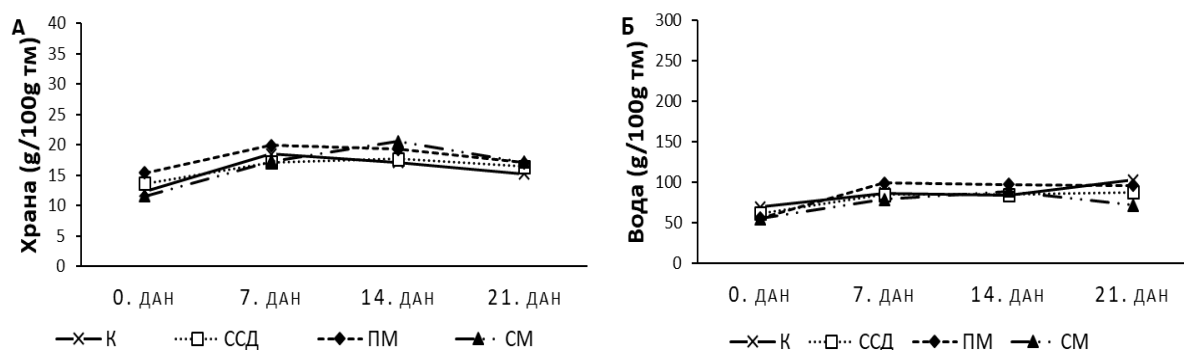


График 9. Унос хране и воде током три недеље: А) унос хране; Б) унос воде; 0 - непосредно пре изазивања ексцизионе ране; 7 - након 7 дана третмана; 14 - након 14 дана третмана; 21 - након 21 дан третмана. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.6.1.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

На **Графику 10** су представљени дневни уноси хране и воде, изражени на 100 g телесне масе. Није примећена статистички значајна разлика у уносу хране и воде између испитиваних група.

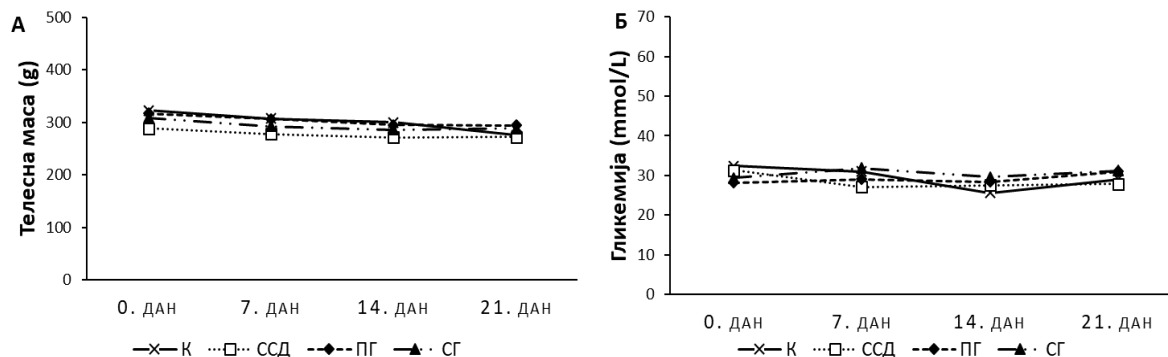


График 10. Унос хране и воде током три недеље: А) унос хране; Б) унос воде; 0 - непосредно пре изазивања ексцизионе ране; 7 - након 7 дана третмана; 14 - након 14 дана третмана; 21 - након 21 дан третмана. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6.2. Телесна маса и гликемија

4.6.2.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

У току периода од три недеље праћена је телесна маса пацова као и вредност гликемије наште. Дати резултати показују да се телесна маса и нивои глукозе у крви

нису статистички значајно разликовали између контролних и експерименталних група (График 11).

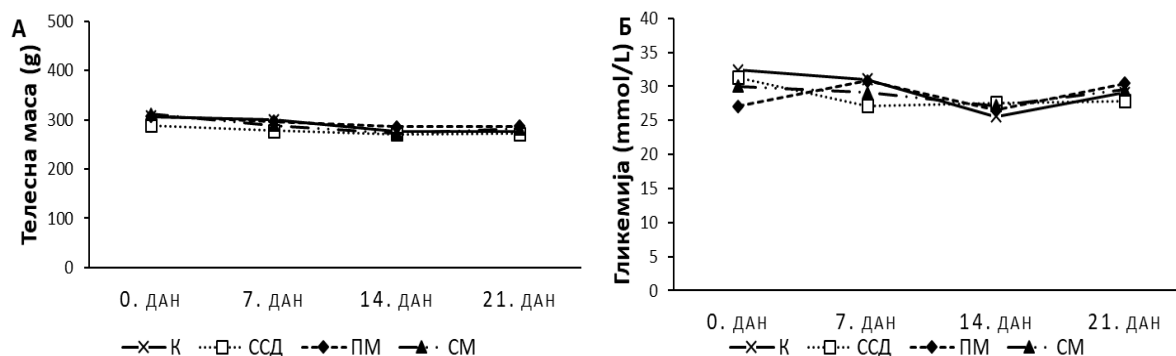


График 11. Вредности телесне масе и гликемије наше током три недеље: А) телесна маса; Б) гликемија наше. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (n=8). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.6.2.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Није примећена значајна разлика у вредностима испитиваних параметара између група током периода од три недеље (График 12).

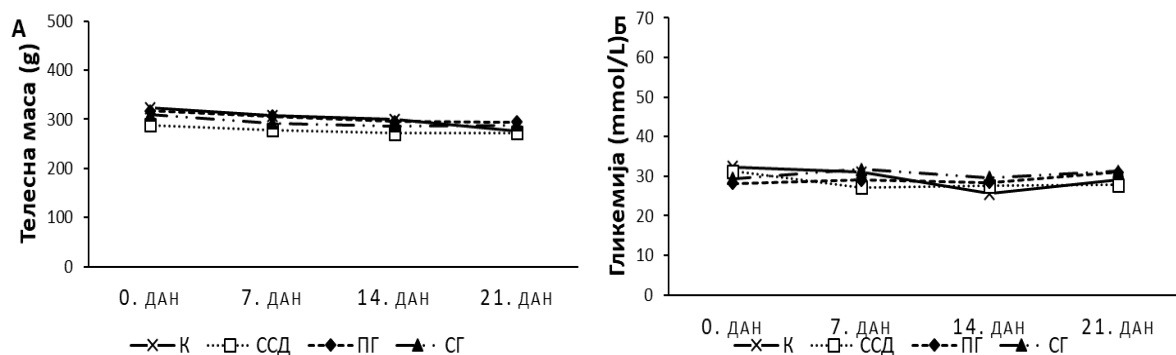


График 12. Вредности телесне масе и гликемије наше током три недеље: А) телесна маса; Б) гликемија наше. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (n=8). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6.3. Контракција ране

4.6.3.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Ефикасност формулације масти на бази етарског уља смиља у зарастању рана изазваних методом ексцизије је испитивана у трајању од три недеље. Величина ране је мерена једном недељно на основу чега је контракција ране израчуната и процентуално изражена. Примена масти на бази етарског уља смиља је довела до бржег зарастања рана у односу на контролне групе, што можемо уочити на основу макроскопских

карактеристика формираних рана и њиховог тока зарастања приказаних на **Слици 6**. Додатно, значајна ефикасност масти на бази смиља може се уочити и на основу процента контракције ране у периоду од три недеље (**График 13**). Ефекти масти на бази смиља су уочени већ након недељу дана, где је контракција ране у датој групи била значајно већа у односу на контролну групу и групу третирану подлогом. Маст са инкорпорираним етарским уљем смиља је значајно убрзала затварање ране и у другој и трећој недељи, како у односу на контролну, нетретирану групу, тако и у односу на групу животиња третираних подлогом. Иако је контракција ране након примене масти са смиљем била нешто већа у односу на позитивну контролу, та разлика није била статистички значајна. Примена сребро-сулфадиазина се очекивано показала делотворнија у односу на нетретирану групу и групу третирану Еуцерин подлогом.

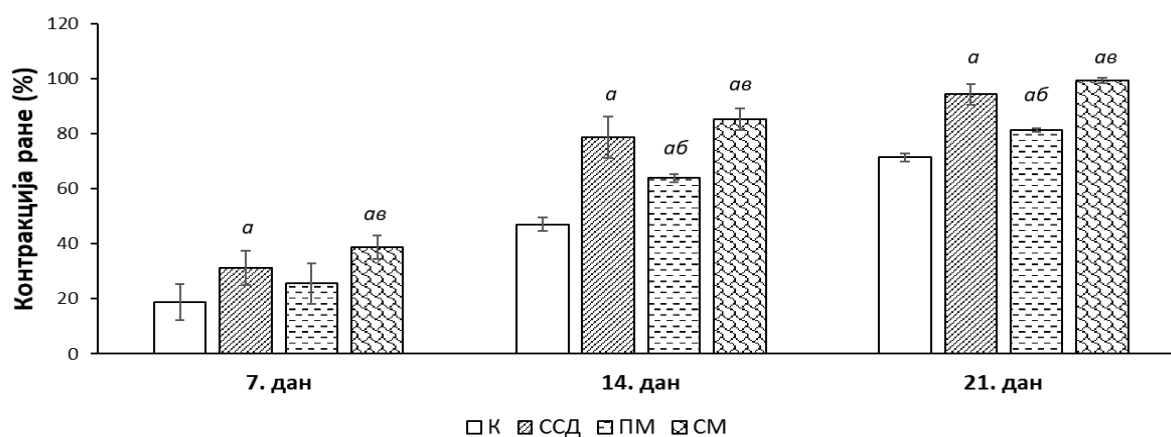
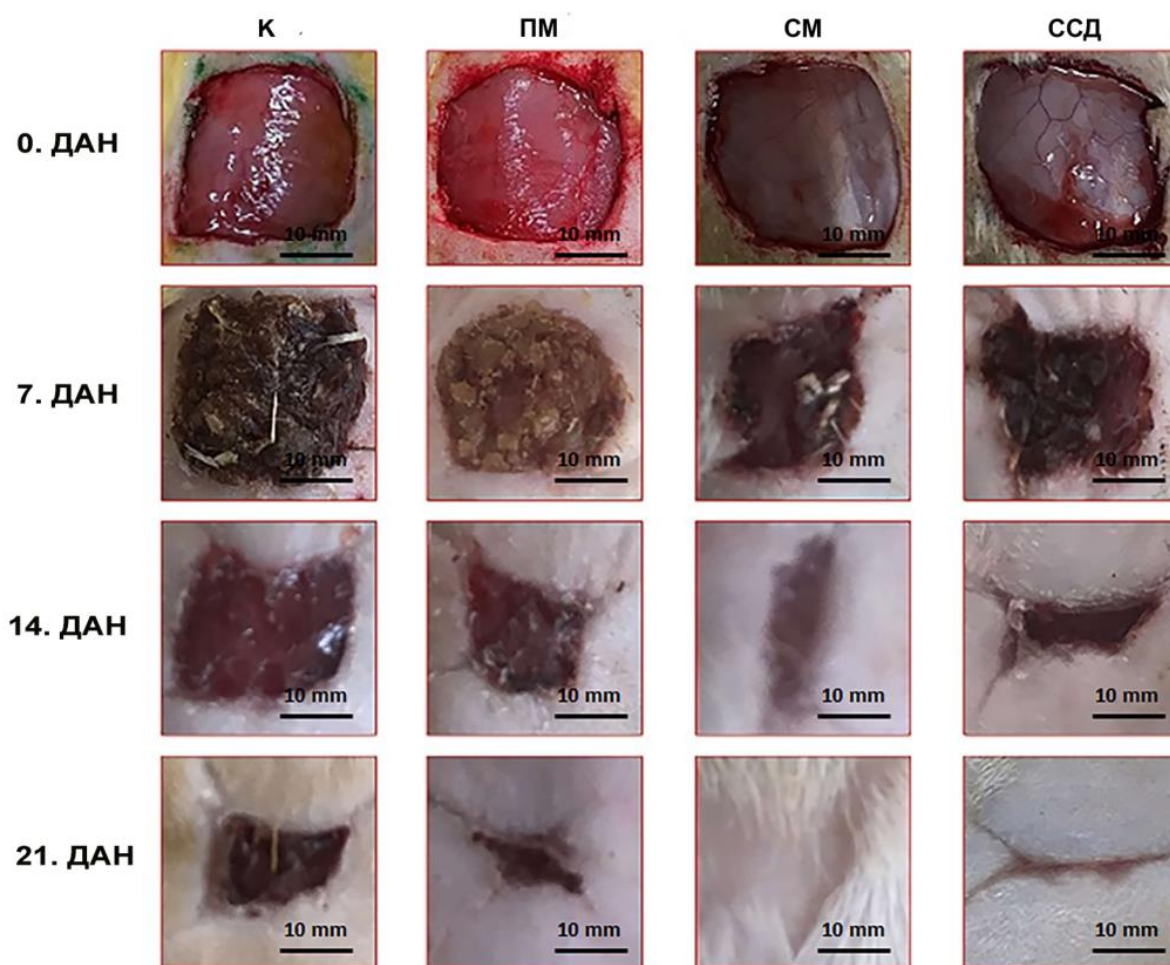


График 13. Ефекти примењених формулација на контракцију ране изазване методом ексцизије. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^v Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.



Слика 6. Ефекат примењених формулација на зарастање рана изазваних методом ексцизије у различитим данима (0, 7, 14, 21). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.6.3.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Ефекат примењених формулација, исказан кроз различите тренутке, приказан је на основу фотографија рана, које указују на макроскопске промене зарастања рана у различитим тренуцима (Слика 7), али и графички као проценат контракције ране (График 14). Примена формулације гела са етарским уљем смиља је показала брже зарастање рана у односу на контролну, негативну групу и у односу на групу третирану подлогом, у свим тренуцима праћења, односно у 7., 14. и 21. дану. Значајна ефикасност гела на бази смиља је повезана са бржим зарастањем рана од почетка до краја тронедељне примене дате формулације. Није било статистички значајне разлике у површини ране изражене кроз време између групе животиња третираних формулацијом гела на бази смиља у односу на стандард, сребро-сулфадиазина.

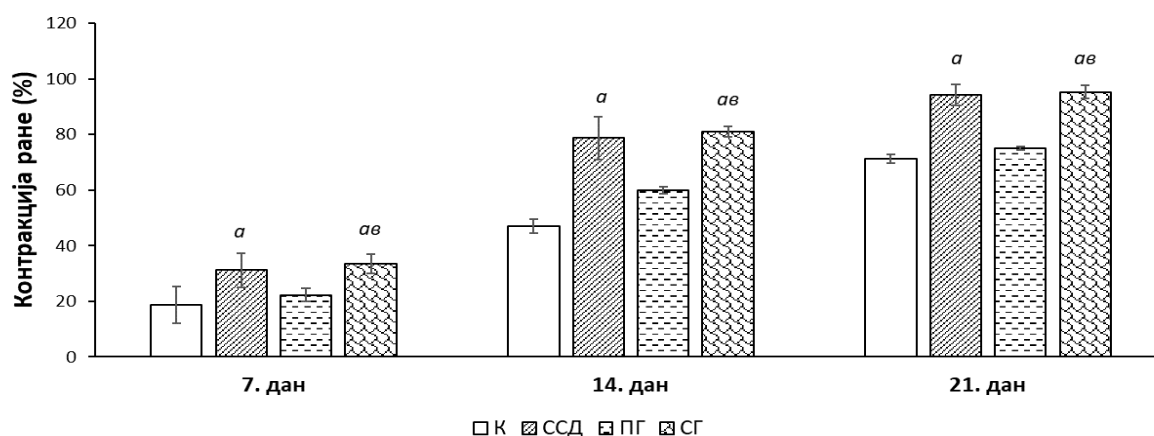
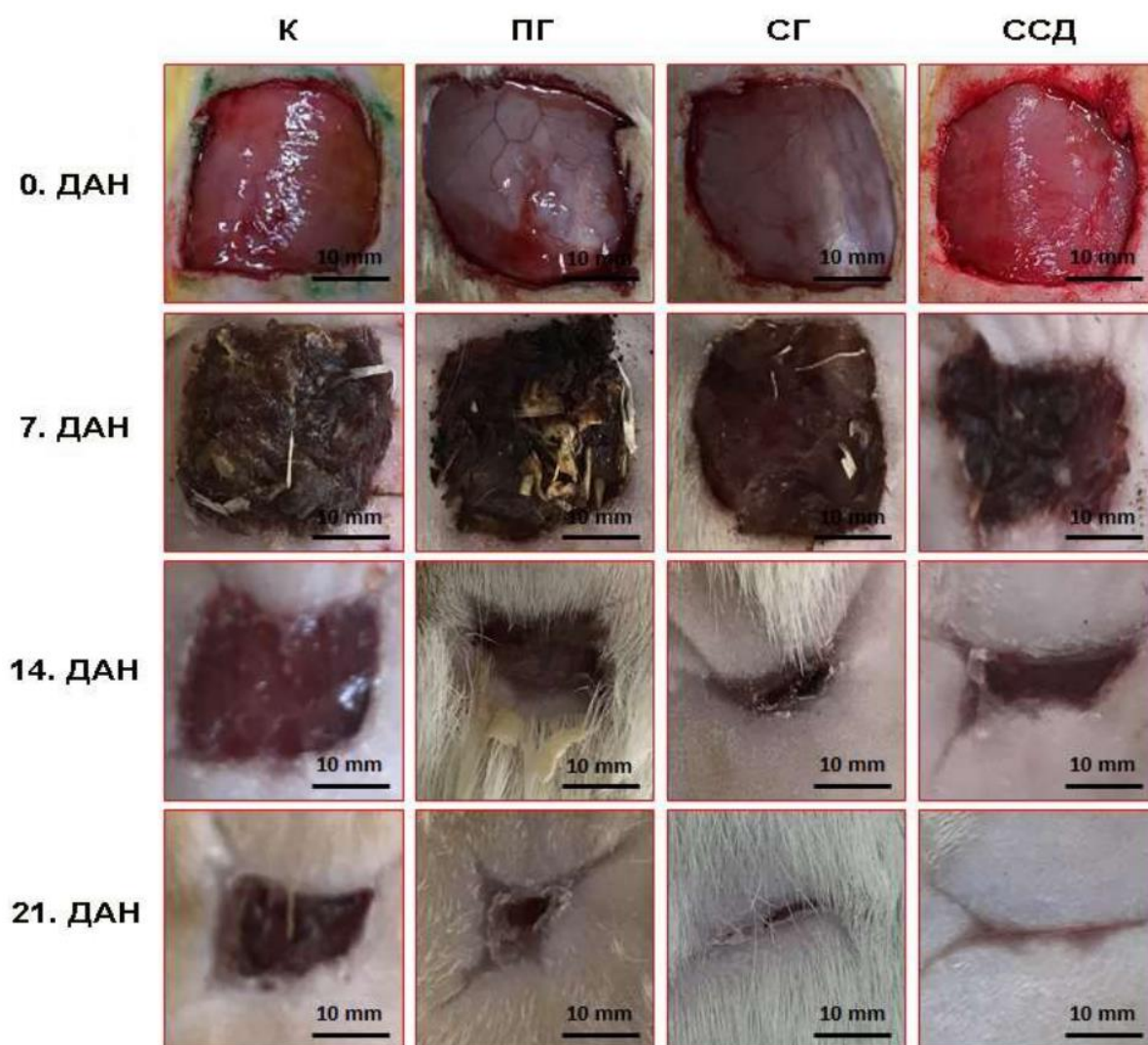


График 14. Ефекти примењених формулација на контракцију ране изазване методом ексцизије. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$).

^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^c Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.



Слика 7. Ефекат примењених формулација на зарастање рана изазваних методом ексцизије у различитим данима (0, 7, 14, 21). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6.4. Садржај хидроксипролина

4.6.4.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Садржај хидроксипролина у узорцима коже животиња са претходно изазваном раном методом ексцизије представљен је на **Графику 15**. Највећи ниво хидроксипролина забележен је у групи животиња којима је апликована маст на бази етарског уља смиља. Ниво хидроксипролина у датој групи је 21. дана након изазивања ране био готово двоструко већи у односу на контролну групу и значајно већи у односу на групе третиране Еуцерин подлогом и 1% сребро-сулфадиазиним. Третман стандардним агенсом, 1% сребро-сулфадиазиним, био је повезан са значајно већим нивоом хидроксипролина у односу на контролну групу и групу третирану подлогом за израду масти.

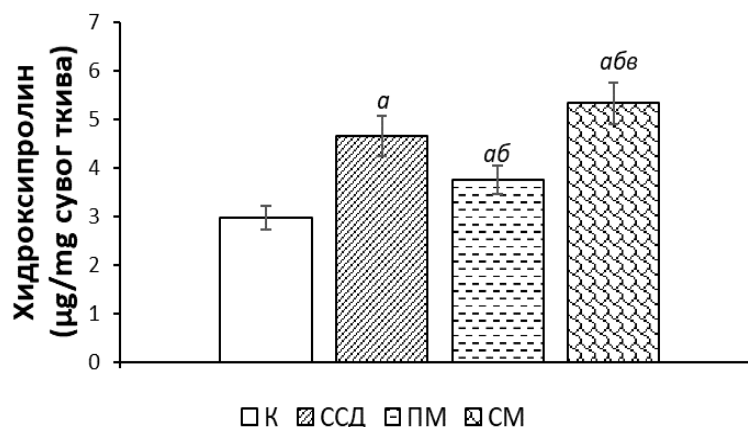


График 15. Ефекти примењених формулација на садржај хидроксипролина у ткиву са подручја ране изазване методом ексцизије. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^v Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.6.4.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Тронеделна апликација гела на бази смиља довела је до статистички значајно повећања садржаја хидроксипролина у односу на негативну контролну групу и групу животиња које су третиране гел подлогом (График 16).

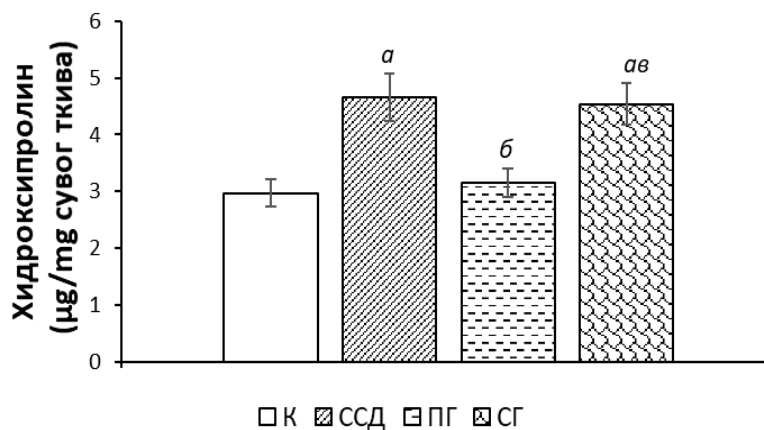


График 16. Ефекти примењених формулација на садржај хидроксипролина у ткиву ране са подручја ране изазване методом ексцизије. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^v Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6.5. Маркери инфламације у хомогенату ткива

4.6.5.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Концентрације проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-6, као и антиинфламацијског IL-10, у хомогенату ткива са подручја ране, претходно изазване методом ексцизије, приказане су на **Графику 17**. Највећа концентрација проинфламацијског медијатора TNF- α измерена је у негативној контролној групи. Применом свих испитиваних формулација примећена је значајно нижа концентрација овог параметра у односу на контролну групу. Истовремено, тронедељна примена масти на бази смиља је значајно смањила концентрацију IL-6 у односу на контролну и групу подлоге, док је његова концентрација била готово идентична у поређењу са позитивном контролном групом. Када је реч о антиинфламацијском маркеру, IL-10, примећена је статистички највећа концентрација у групи животиња третираних препаратом на бази смиља.

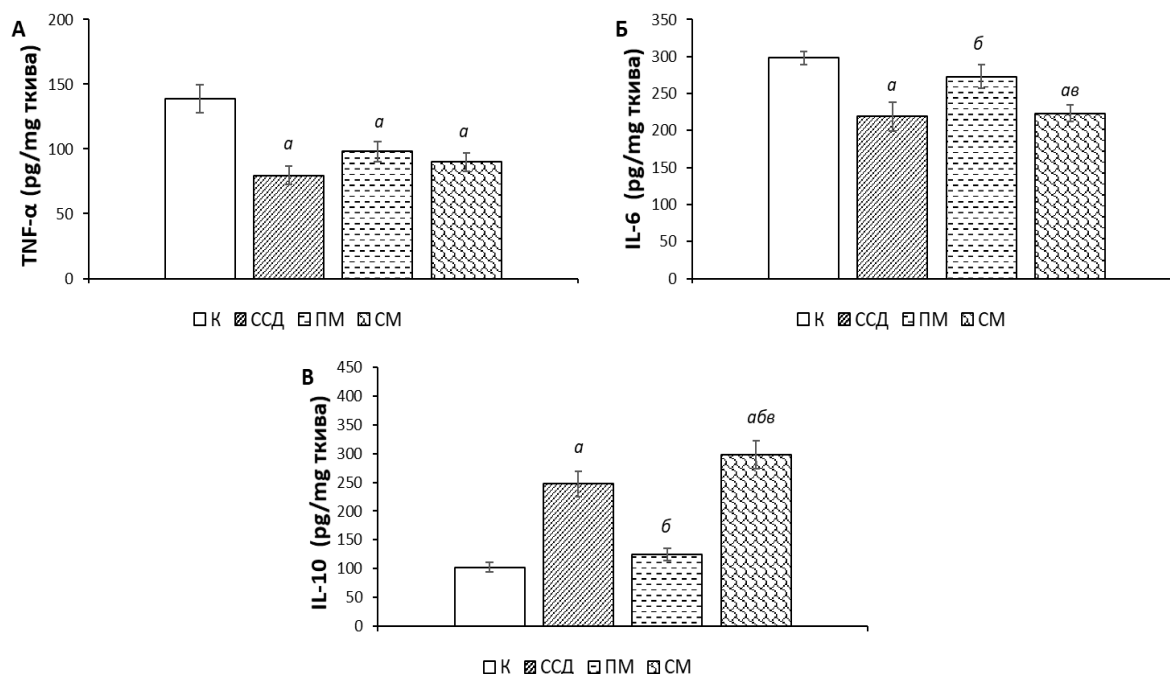


График 17. Ефекти примењених формулација на проинфламацијске и антиинфламацијске маркере у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом ексцизије: А) TNF- α ; Б) IL-6; В) IL-10. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација (n=8). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; ^в Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.6.5.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Примена гела на бази етарског уља смиља је показала сличан тренд као и примена масти. Тронедељна примена гела на бази смиља је успела значајно да снизи концентрације проинфламацијских маркера у односу на негативну контролну групу и групу третирану подлогом. Исто тако, концентрација антиинфламацијског маркера је

значајно већа у смиље гел групи. Није било разлика у концентрацијама испитиваних маркера између смиље гел и подлога гел групе.

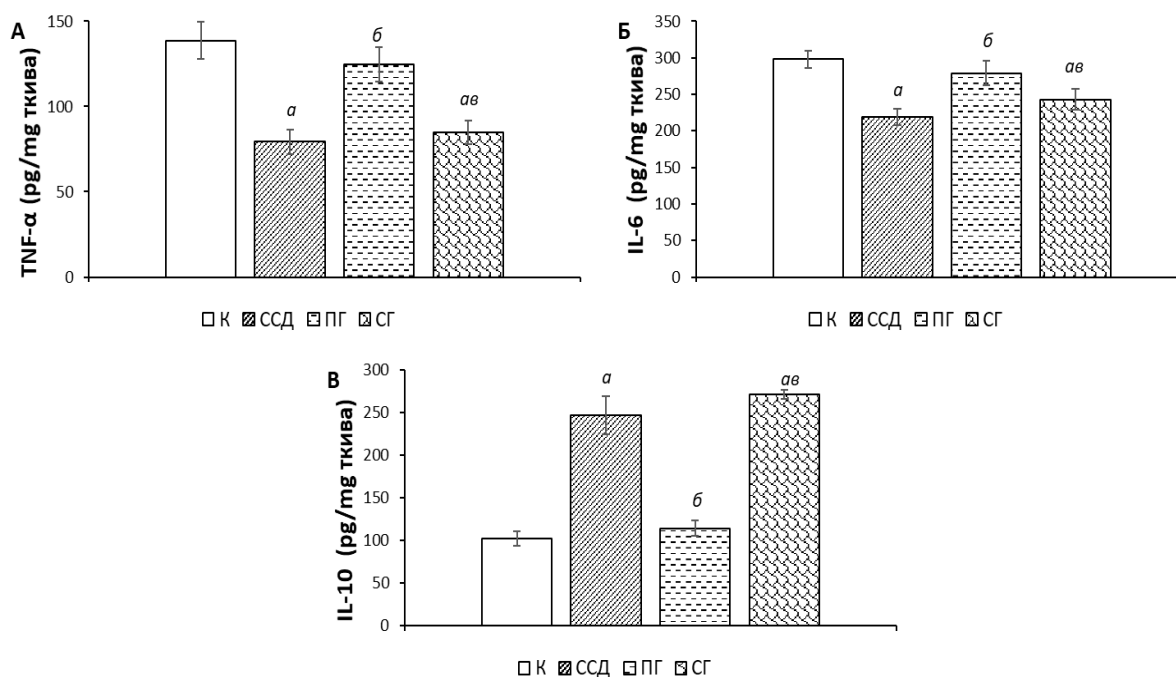


График 18. Ефекти примењених формулација на проинфламацијске и антиинфламацијске маркере у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом ексцизије: А) TNF α ; Б) IL-6; В) IL-10. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација (n=8). *a* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; *б* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; *ав* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

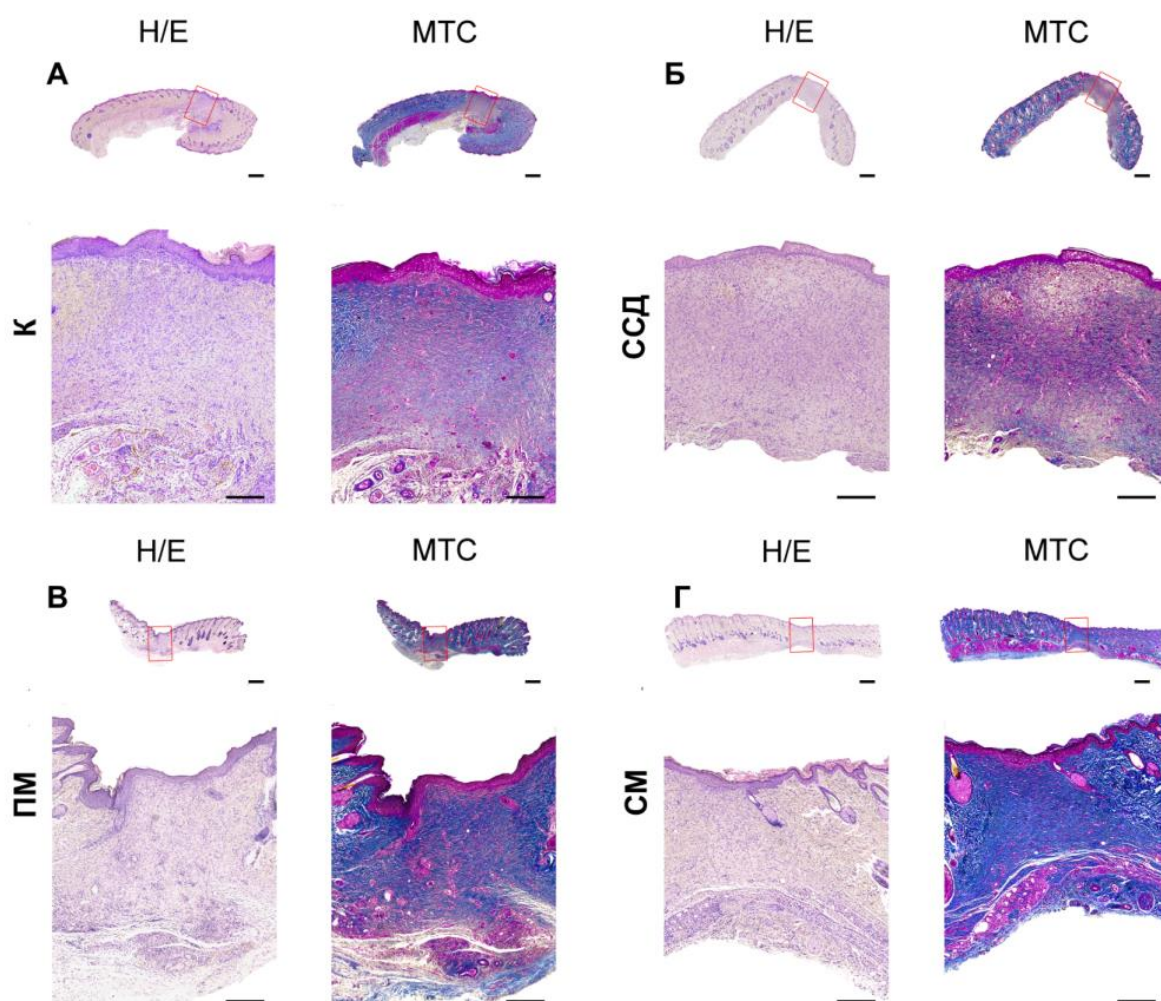
4.6.6. Хистолошка и имунохистохемијска анализа

4.6.6.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

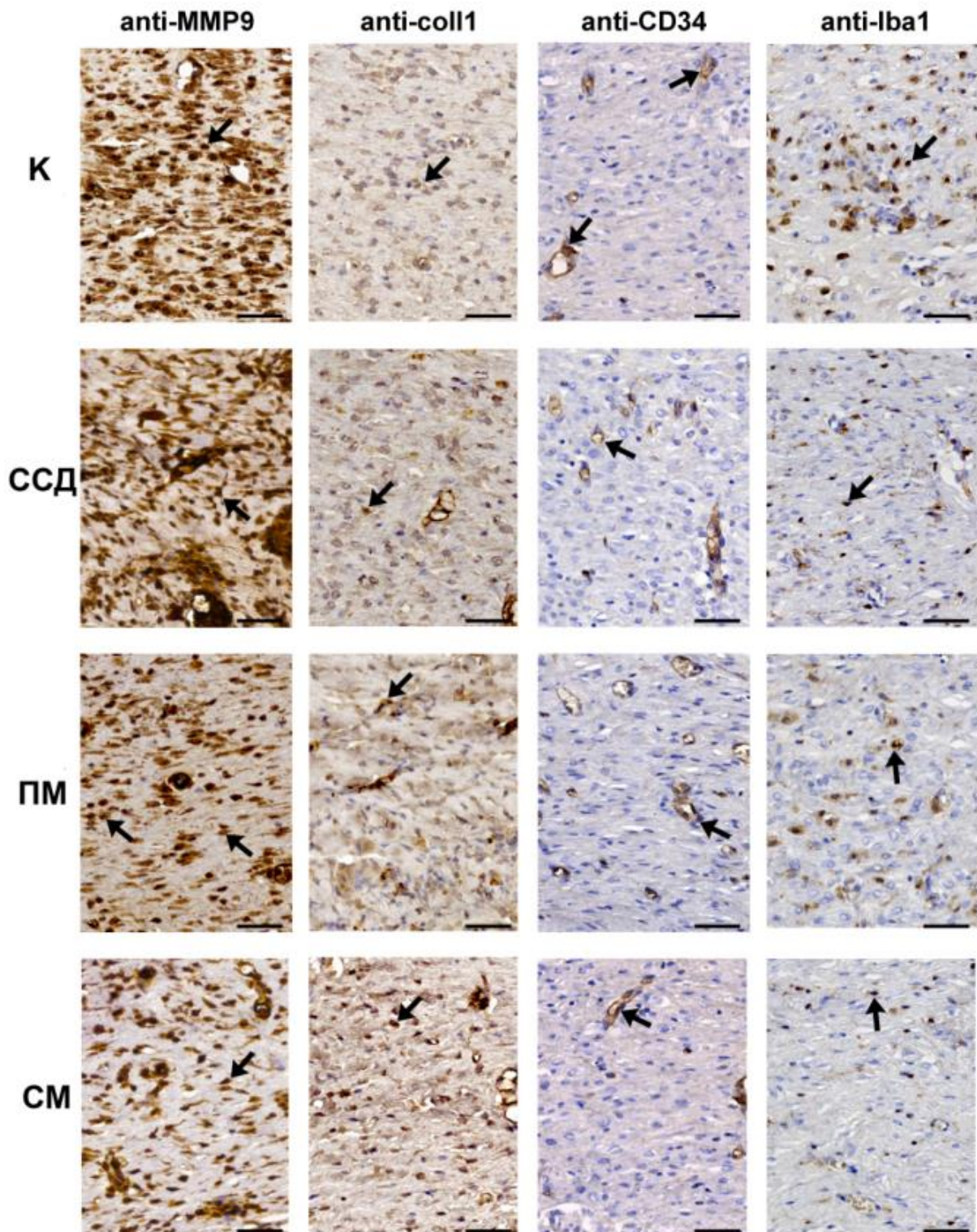
Три недеље након формирања ране методом ексцизије примећена је потпуна реепителизација епидермалних слојева у свим анализираним групама. У појединим случајевима, дебљина епидермиса је била мања од околног подручја коже, али су цитоархитектонске структуре биле очуване. Најочљивије промене су примећене на нивоу дермиса. Приметна је разлика у нивоу репаративне фиброзе између група. У контролној групи, ожиљак је био састављен од хиперцелуларног фиброзног ткива са преовлађујућим фибробластима (Слика 8А-Н/Е) и малом количином екстрацелуларних влакнастих влакана (слика 8А-МТС). Сличан патохистолошки налаз забележен је у позитивној контролној групи. Сазревање фиброзног ожиљка је било непотпуно (Слика 8Б), а присуство дермалних влакана је још увек било у лабавој везивној хистолошкој форми. Са друге стране, у групи животиња третираних подлогом или формулацијом масти са етарским уљем детектовали смо евидентно сазревање ожиљака са повећаном густином колагених влакана (Слике 8В и 8Г).

Имунохистохемијска анализа негативне контролне групе указује да је експресија на нивоу MMP-9 била интензивно висока, док је колаген 1 још увек био на ниском нивоу. У истој групи, густина CD34 није била истакнута, али су макрофаги, Iba1 позитивни и

даље били присутни у великом броју (Слика 9-К). С друге стране, присуство макрофага у позитивној контролној групи је смањено у поређењу са негативном контролном групом (Слика 9-ССД). Експресија ММР-9 је интензивно смањена у групама које су третиране подлогом и формулацијом масти са етарским уљем смиља (Слике 9-ПМ и 9-СМ). Присуство coll 1 позитивног фиброцита је повећано, посебно у смиље групи (Слика 9-СМ). Густина крвних судова у групи подлоге (Слика 9-ПМ) је и даље била иста као у негативној контролној групи, док је у групи третираној формулацијом масти на бази смиља (Слика 9-СМ) примећено истакнуто одсуство CD34 позитивне структуре, што је у корелацији са сазревањем ожиљака. Такође, број Iba1 позитивних макрофага откривених у подлога маст групи (Слика 9-ПМ) је интензивно смањен у смиље маст групи (Слика 9-СМ).



Слика 8. Репрезентативни приказ обојеног ткива ране хематоксилин/еозин (Н/Е) и *Masson trichrom* (МТС) техником, скала 1 mm. К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

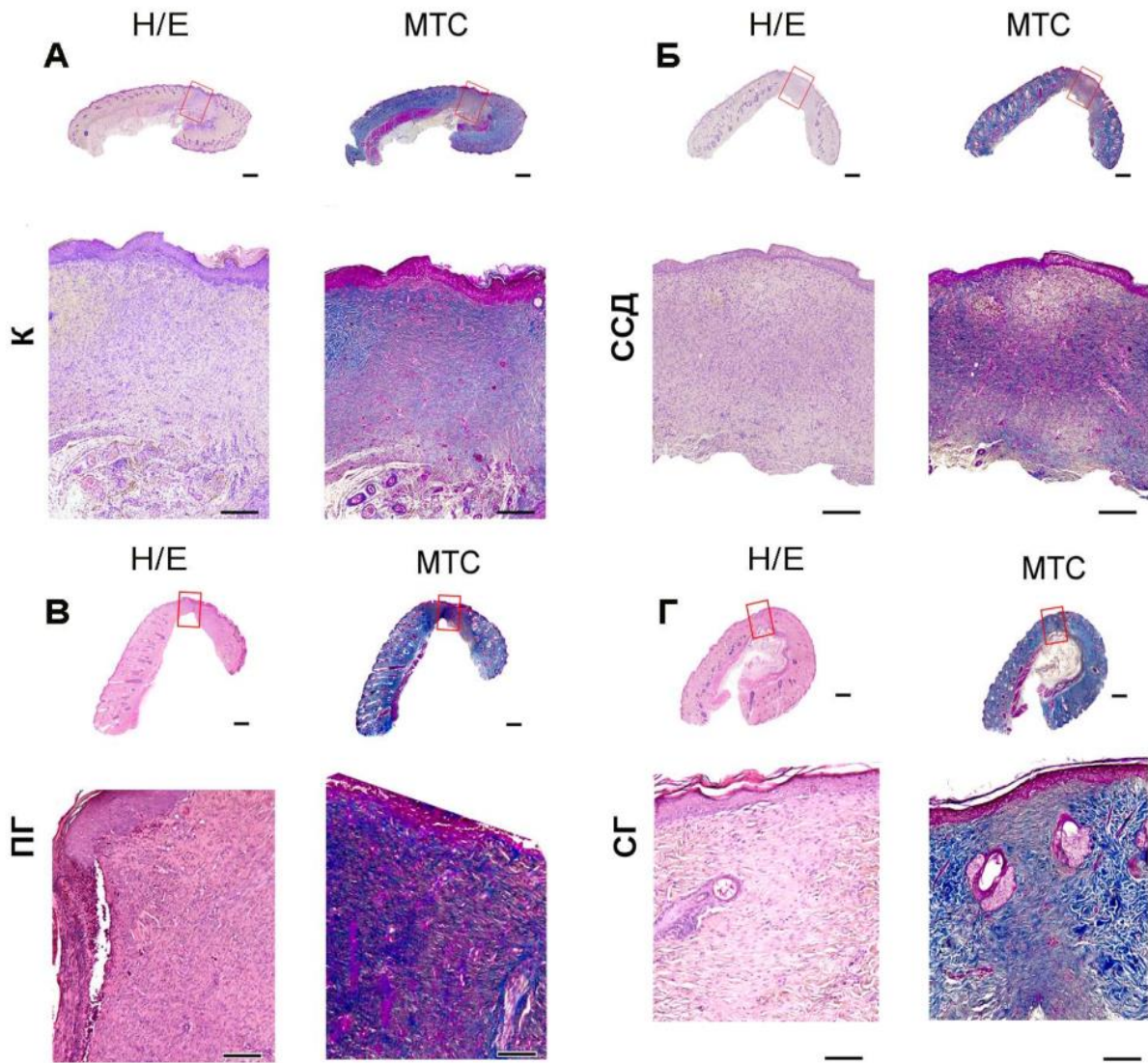


Слика 9. Репрезентативни имунохистохемијски приказ бојења MMP-9, колагена I, CD34 и Iba1 у К групи, ССД групи, ПМ групи и СМ групи. Скала 50 μm ; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

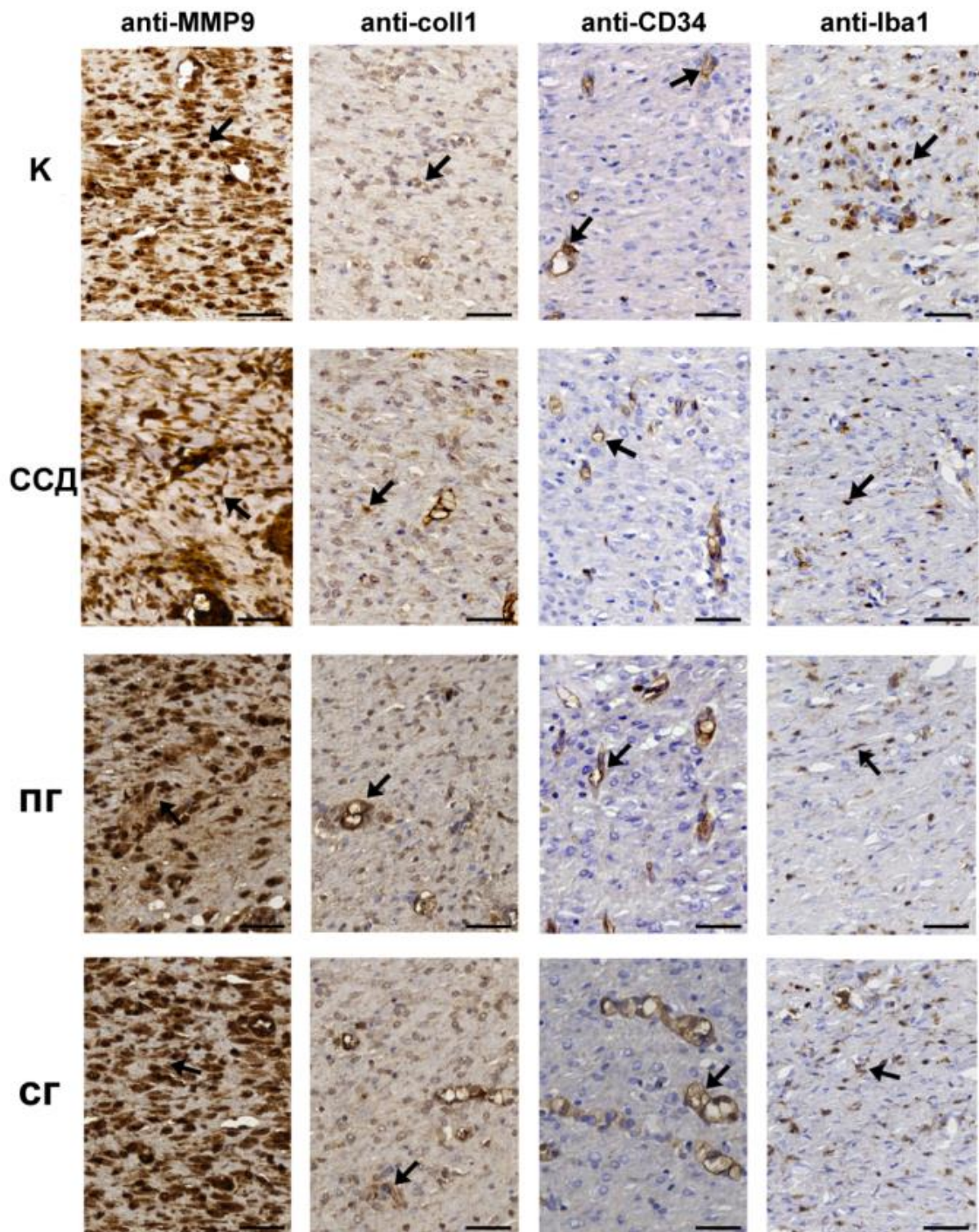
4.6.6.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Потпуна реепителизација епидермалних слојева примећена је у групама животиња које су третиране формулацијама гела, било у форми подлоге или на бази етарског уља смиља. Уочљивије промене су забележене на нивоу дермиса. Тронедељна примена гела на бази етарског уља допринела је евидентном сазревању ожиљака са повећаном густином колагених влакана (Слика 10Д). У ПГ групи ожиљак је био састављен од хиперцелуларног фиброзног ткива са преовлађујућим фибробластима (Слика 10В-Н/Е) и малом количином екстрацелуларних влакнастих влакана (Слика 10В-МТС). Додатно, евидентно сазревање ожиљака са повећаном густином колагених влакана уочено је у смиље гел групи (Слика 10Г).

Имунохистохемијско бојење MMP-9, колагена 1 и CD34 у ПГ групи је било истоветних одлика као и у негативној и позитивној контролној групи. Са друге стране, присуство макрофага у ПГ је смањено у поређењу са негативном контролном групом. Експресија MMP-9 је интензивно смањена у групи животиња третираним гел подлогом. Присуство coll 1 позитивног фиброцита је повећано у групи која је третирана препаратом на бази етарског уља смиља. Густина крвних судова у ПГ групи је и даље била иста као у негативној контролној групи, док је у групи третираној формулацијом гела на бази смиља примећено истакнуто одсуство CD34 позитивне структуре, што је у корелацији са сазревањем ожиљака. Такође, број Iba1 позитивних макрофага откривених у подлога гел групи је интензивно смањен у смиље гел групи (Слика 11).



Слика 10. Репрезентативни приказ обојеног ткива ране хематоксилин/еозин (H/E) и *Masson trichrom* (MTC) техником, скала 1mm. К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.



Слика 11. Репрезентативни имунохистохемијски приказ бојења MMP-9, колагена I, CD34 и Iba1 у К групи, ССД групи, ПГ групи и СГ групи. Скала 50 μ m; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6.7. Маркери оксидационог стреса у хомогенату ткива

4.6.7.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Маркери оксидационог стреса одређени у хомогенату ткива ране изазване методом ексцизије животиња третираних одговарајућим формулацијама масти представљени су на **Графику 19**. Највеће активности ензима антиоксидационе заштите CAT и SOD примећене су у групи која је третирана формулацијом масти са инкорпорираним етарским уљем смиља. Тронеделна примена масти на бази смиља није проузроковала статистички значајне промене TBARS и GSH између испитиваних група.

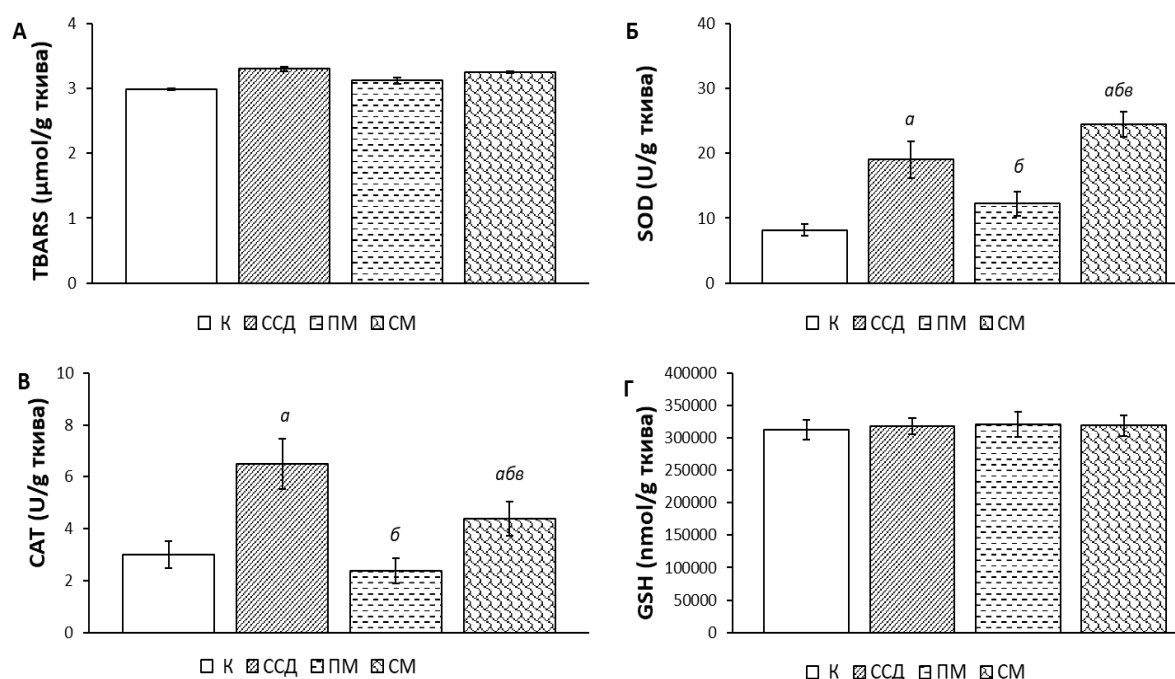


График 19. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом ексцизије: А) TBARS; Б) SOD; В) CAT; Г) GSH. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=8). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; ^{абв} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6.7.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Редокс статус животиња третираних одговарајућим формулацијом гела у хомогенату ткива ране изазване методом ексцизије представљен је на **Графику 20**. Резултати показују да је активност CAT била статистички већа у смиље гел групи, у односу на тестиране формулације, док је контролна група имала статистички мању активност у односу на остале испитиване групе. Додатно, администрација гела на бази смиља проузроковала је значајно повећање активности SOD у односу на контролну групу и групу третирану подлогом за израду гела.

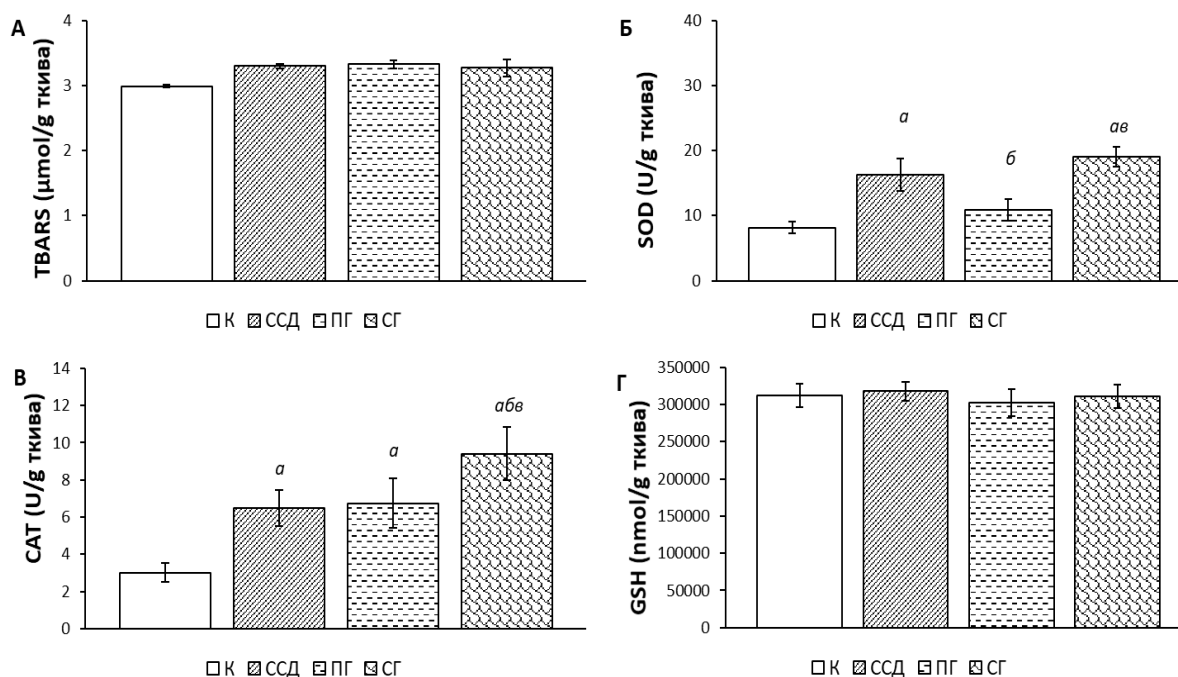


График 20. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у хомогенату ткива ране са подручја ране изазване методом ексцизије: А) TBARS; Б) SOD; В) CAT; Г) GSH. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^{ab} Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.6.8. Системски редокс статус

4.6.8.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Ниво прооксидационих маркера измерен у плазми животиња, третираних одговарајућим формулацијама масти, представљен је на **Графику 21**. Резултати су показали да је највећи ниво свих прооксидационих маркера забележен у контролној, нетретираној групи. Топикална примена масти са етарским уљем смиља је значајно смањила нивое O_2^- и TBARS у поређењу са свим испитиваним формулацијама. С друге стране, значајне промене у нивоу NO_2^- и H_2O_2 нису забележене између испитиваних група.

Вредности параметара антиоксидационе заштите представљени на **Графику 21** указују да је капацитет антиоксидационе заштите између испитиваних група без значајних разлика, када су у питању активност SOD и ниво GSH. Супротно томе, активност CAT је значајно већа код животиња третираних формулацијом масти на бази етарског уља смиља у поређењу са позитивном и негативном контролном групом.

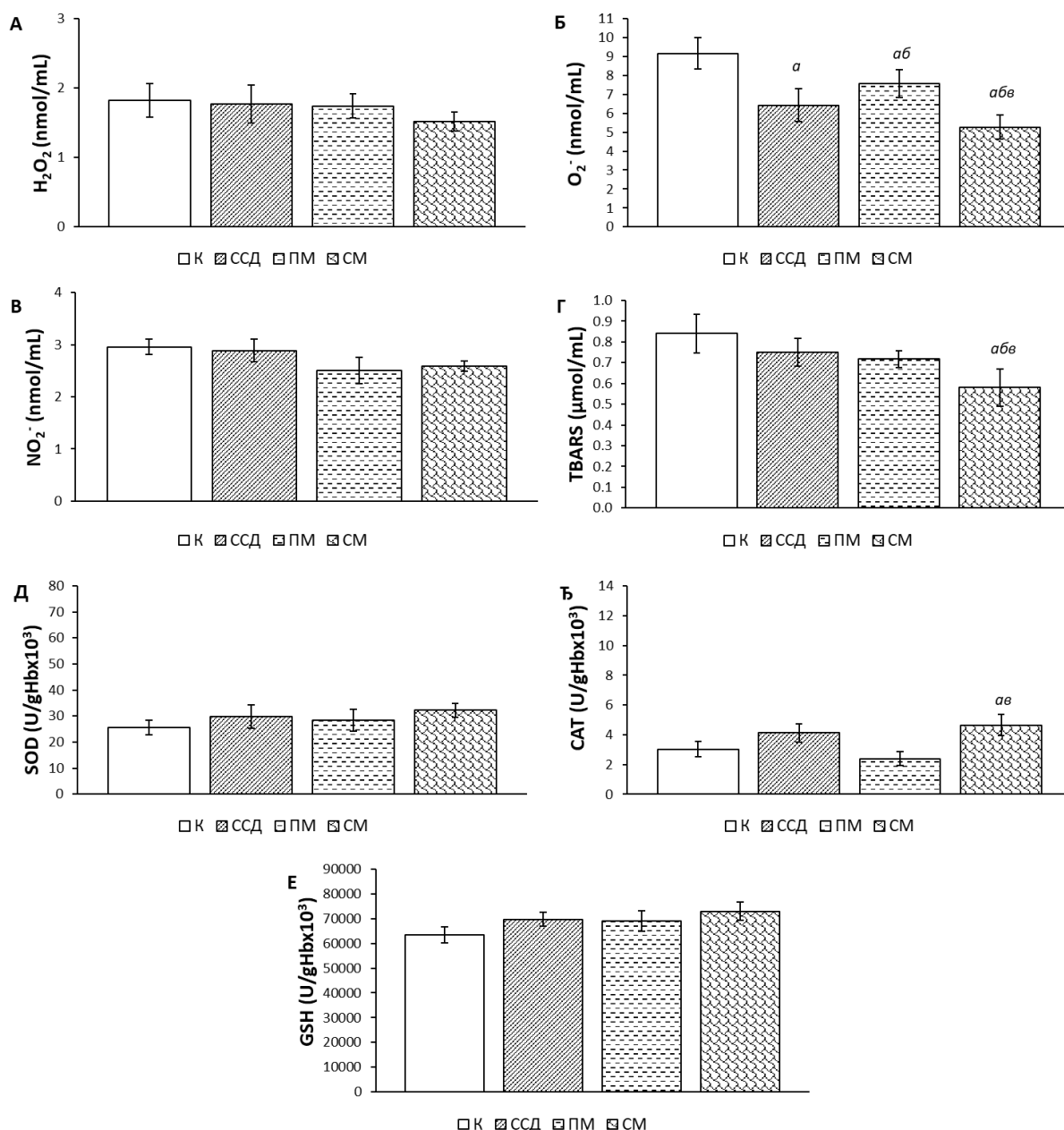


График 21. Ефекти примењених формулација на прооксидационе маркере у плазми животиња са раном изазваном методом ексцизије: А) H_2O_2 ; Б) O_2^- ; В) NO_2^- ; Г) $TBARS$; Д) SOD ; Ђ) CAT ; Е) GSH . Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^v Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.6.8.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Највећа концентрација прооксидационог маркера O_2^- је забележена у негативној контролној групи. Апликација гела на бази смиља је значајно смањила концентрацију датог маркера у односу на негативну контролну и ПГ групу. Ниво $TBARS$ је статистички најнижи у групи животиња које су третирани гелом са инкорпорираним етарским уљем. Када говоримо о параметрима антиоксидационе заштите, уочава се да је активност CAT

највећа у СГ групи. Дата активност је значајно виша у поређењу са негативном контролном и подлога гел групом, док је без значајне разлике у односу на позитивну контролну, ССД групу. Вредности GSH и SOD нису се значајно мењале између група (График 22).

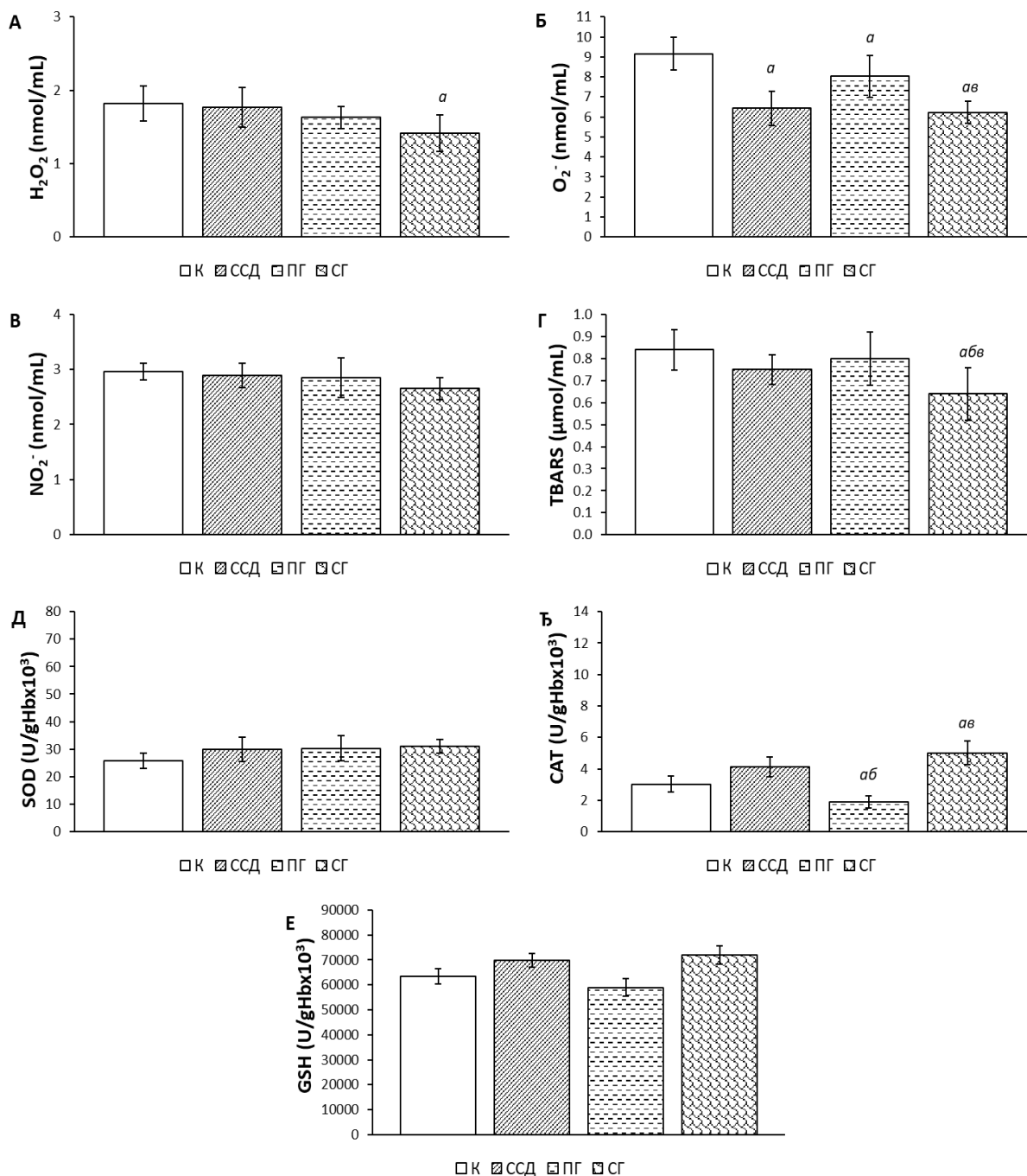


График 22. Ефекти примењених формулација на прооксидационе маркере у плазми животиња са раном изазваном методом ексцизије: А) H₂O₂; Б) O₂⁻; В) NO₂⁻; Г) TBARS; Д) SOD; Ђ) CAT; Е) GSH. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=8). ^a Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са ССД групом; ^{ab} Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.7. Ефекти топикалних формулација на процес зарастања рана изазваних методом инцизије

4.7.1. Дневни унос хране и воде

4.7.1.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Количине конзумиране хране и воде, изражене на 100 g телесне масе представљене су на **Графику 23**. Резултати указују да између група није било значајних промена у дневном уносу хране и воде током периода праћења од три недеље.

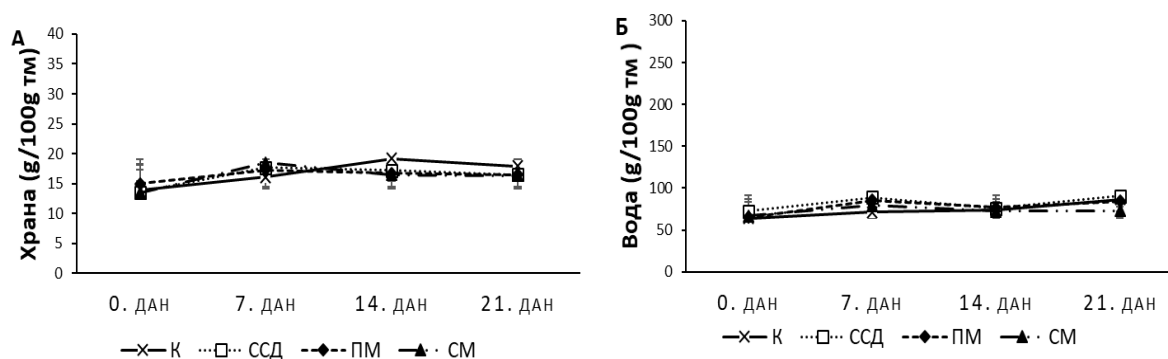


График 23. Унос хране и воде током три недеље: А) унос воде; Б) унос хране; 0 – непосредно пре изазивања инцизионе ране; 7 - након 7 дана третмана; 14 - након 14 дана третмана; 21 - након 21 дан третмана. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (n=8). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.7.1.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Дневни унос хране и воде приказан на **Графику 24** показује да није било значајних разлика између испитиваних група у току периода од три недеље.

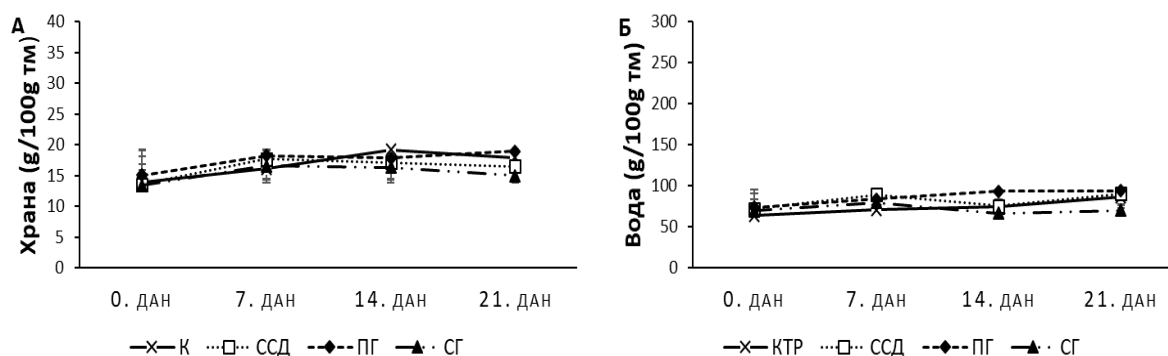


График 24. Унос хране и воде током три недеље: А) унос хране; Б) унос воде; 0 – непосредно пре изазивања инцизионе ране; 7 – након 7 дана третмана; 14 – након 14 дана третмана; 21 – након 21 дан третмана. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (n=8). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.7.2. Телесна маса и гликемија

4.7.2.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

У току периода од три недеље праћена је телесна маса пацова као и вредност гликемије наше. Дати резултати показују да се телесна маса и нивои глукозе у крви нису статистички значајно разликовали између контролних и експерименталних група (График 25).

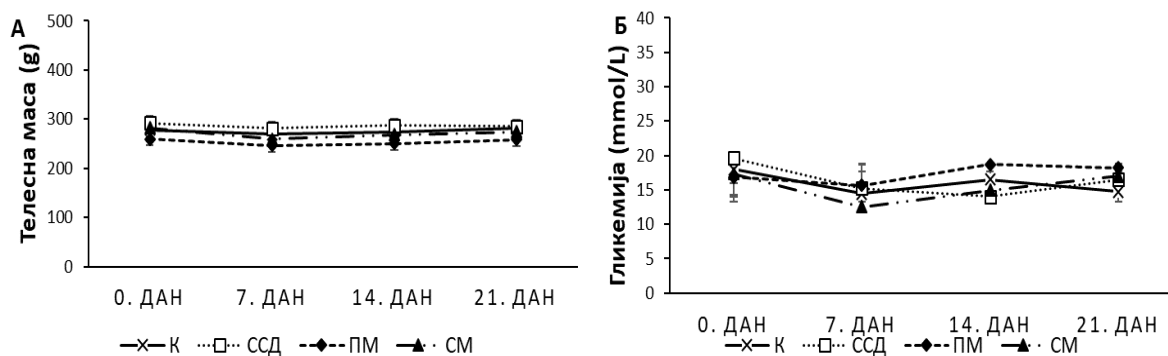


График 25. Вредности телесне масе и гликемије наше током три недеље: А) телесна маса; Б) гликемија наше; 0 – непосредно пре изазивања инцизионе ране; 7 – након 7 дана третмана; 14 – након 14 дана третмана; 21 – након 21 дан третмана. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (n=8). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.7.2.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Није примећена значајна разлика у вредностима датих параметара између испитиваних група током периода од три недеље (**График 26**).

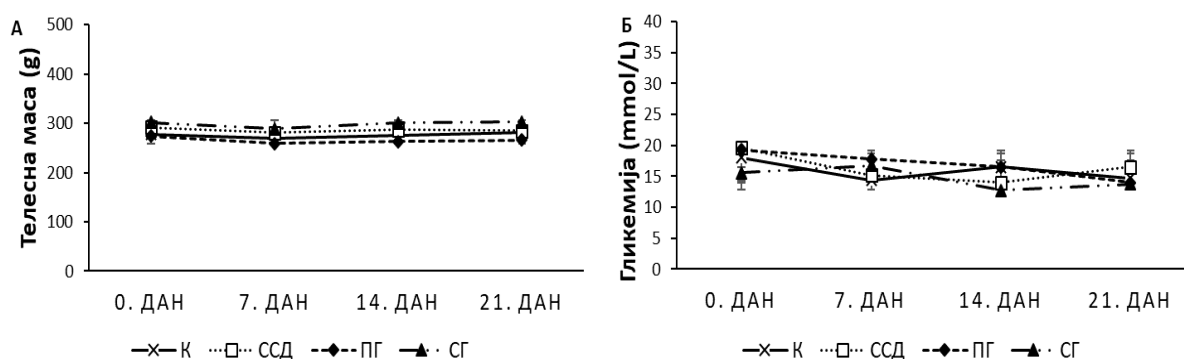


График 26. Вредности телесне масе и гликемије наште током три недеље: А) телесна маса; Б) гликемија наште; 0 - непосредно пре изазивања инцизионе ране; 7 - након 7 дана третмана; 14 - након 14 дана третмана; 21 - након 21 дан третмана. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.7.3. Контракција ране

4.7.3.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Процент смањења површине рана које су изазване методом инцизије а третиране формулацијама масти, представљени су на **Графику 27**. Макроскопске карактеристике формираних рана и њихов ток зарастања приказани су на **Слици 12**. Резултати показују да је након седмодневне локалне примене најизраженија контракција била у групи животиња које су третиране формулацијом на бази етарског уља смиља. Исти тренд је забележен и током преостале две недеље праћења, па на самом крају третмана примећује се да група третирана формулацијом са етарским уљем смиља показује знатно већу контракцију у односу на контролну групу и групу која је третирана Еуцерин подлогом. Животиње које су третиране сребро-сулфадиозином и Еуцерин подлогом су показале значајно брже зарастање рана у односу на нетретиране животиње у последњем тренутку.

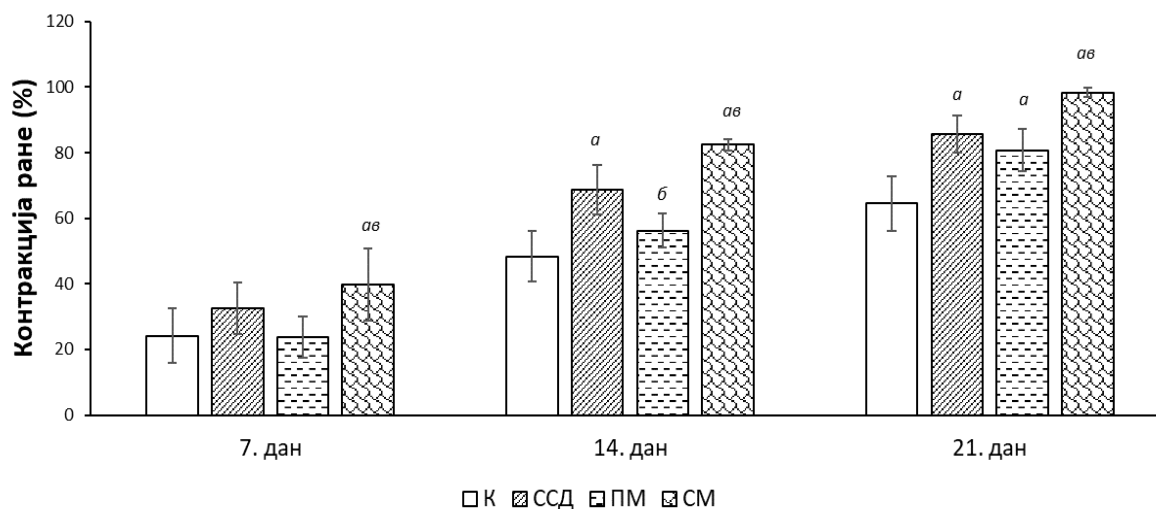
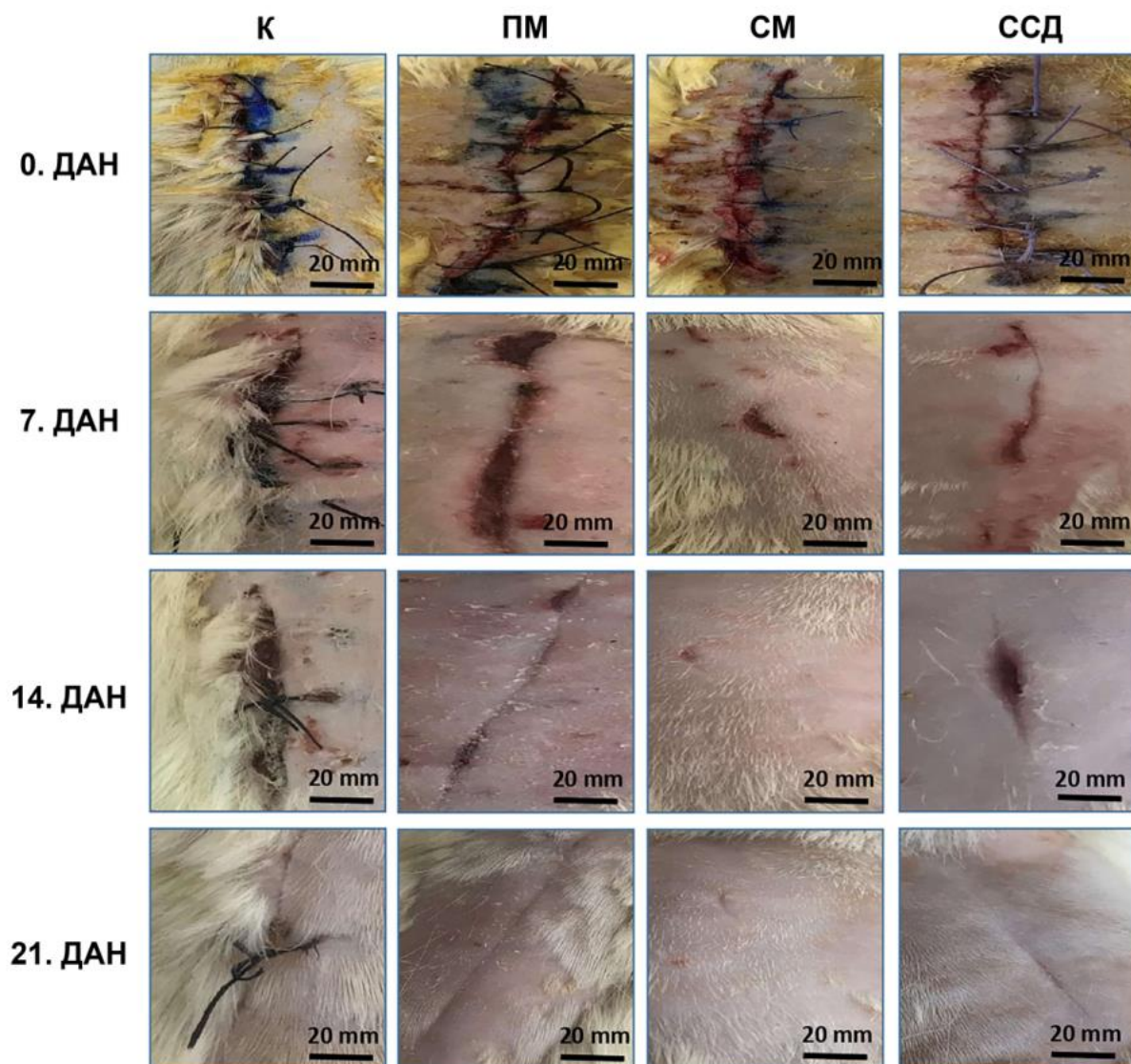


График 27. Ефекти примењених формулација на контракцију ране изазване методом инцизије. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^{ab} Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.



Слика 12. Ефекат примењених формулација на зарастање рана изазваних методом инцизије у различитим данима (0, 7, 14, 21). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.7.3.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Ефекти примењених формулација на контракцију ране изазвану методом инцизије, у три различита тренутка, представљени су на **Графику 28**. Макроскопске карактеристике формираних рана и њихов ток зарастања приказани су на **Слици 13**. Третман формулацијом гела на бази етарског уља смиља допринео је најбржем зарастању почевши од седмог дана, па све до краја испитиваног периода. Вредности контракције ране у групи смиља у односу на сулфадиазин групу су биле више у свим данима од интереса, али без статистичке валидације. На крају тронедељног третмана групе третиране базом карбомера и контролним агенсом су показале знатно брже зарастање у односу на нетретиране животиње.

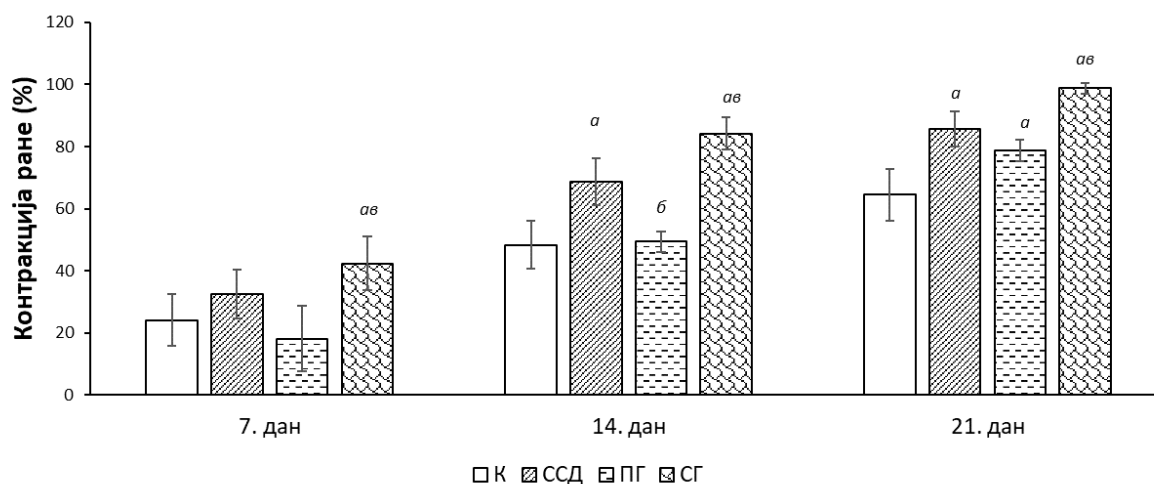
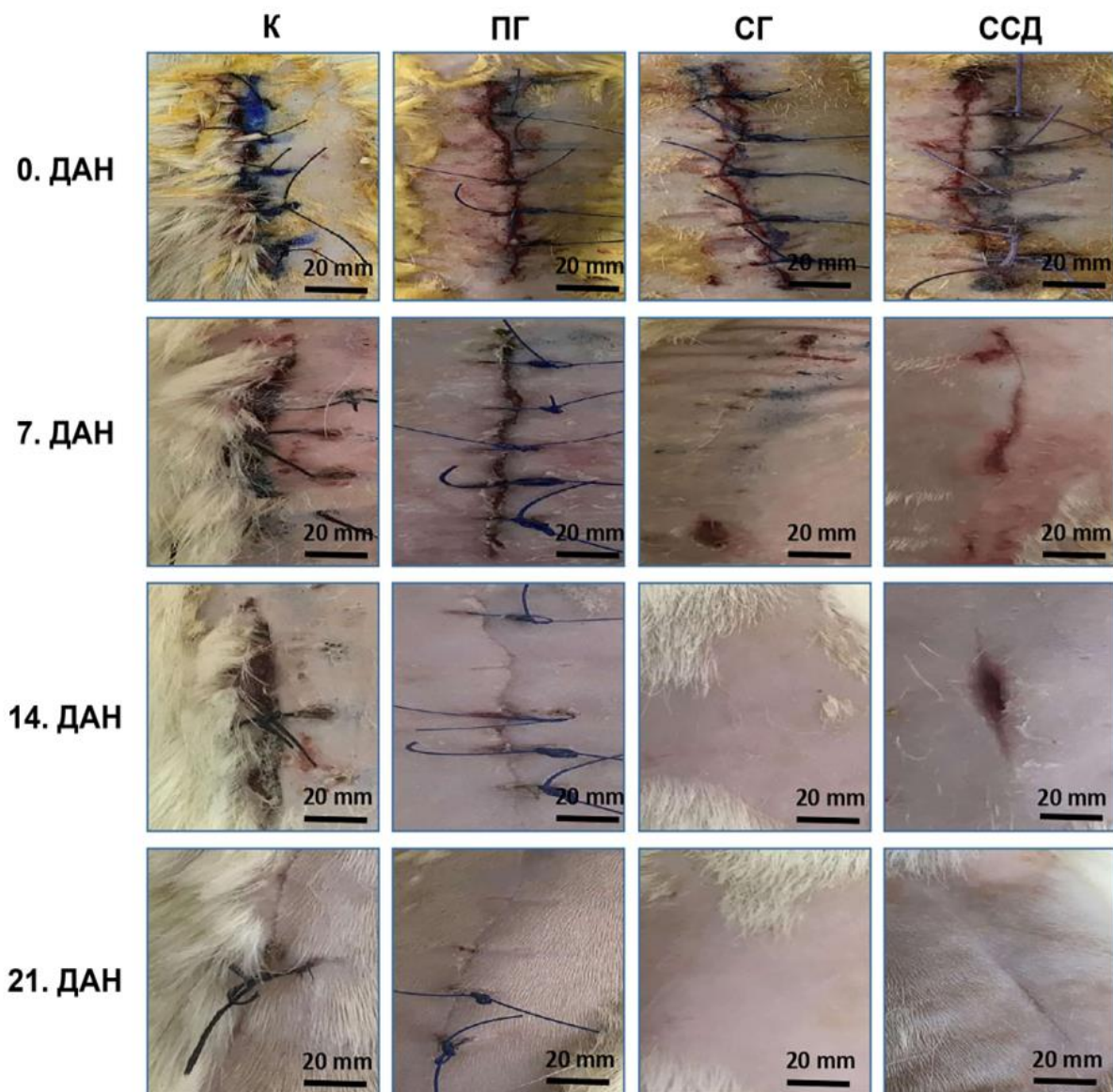


График 28. Ефекти примењених формулација на контракцију ране изазване методом инцизије. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=8).
a Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; *b* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; *ab* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.



Слика 13. Ефекат примењених формулација масти на зарастање рана изазваних методом инцизије у различитим данима (0, 7, 14, 21). К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.7.4. Садржај хидроксипролина

4.7.4.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Садржај хидроксипролина, у узорцима коже животиња са претходно изазваном раном методом инцизије, представљен је на **Графику 29**. Примена масти са инкорпорираним етарским уљем смиља је проузроковала највећи ниво хидроксипролина у узорку ткива, статистички значајно већи у односу на преостале групе. Додатно, ниво хидроксипролина у контролној, нетретираној групи, био је значајно мањи у поређењу са свим испитиваним групама.

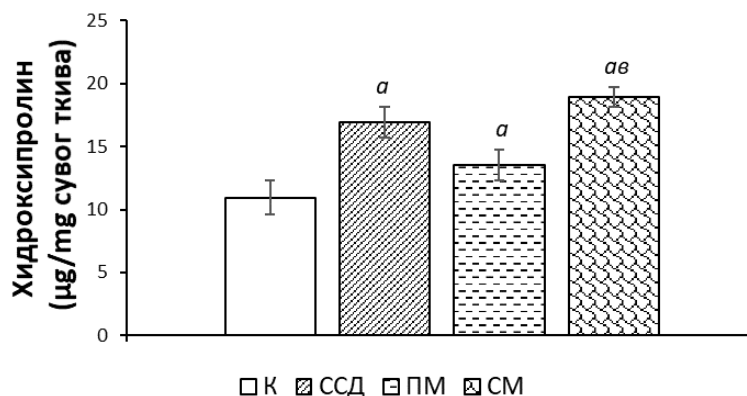


График 29. Ефекти примењених формулација на садржај хидроксипролина у ткиву са подручја ране изазване методом инцизије. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^c Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.7.4.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Садржај хидроксипролина у ткиву ране, изазване методом инцизије, представљен је на **Графику 30**. Највећи ниво хидроксипролина забележен је у групи животиња третираних гелом на бази етарског уља смиља. Уочено је значајно повећање нивоа хидроксипролина у групи животиња третираних формулацијом гела на бази смиља у поређењу са негативном контролом и подлогом. Са друге стране, није примећена значајно већа количина хидроксипролина у односу на позитивну контролну, тј. ССД групу.

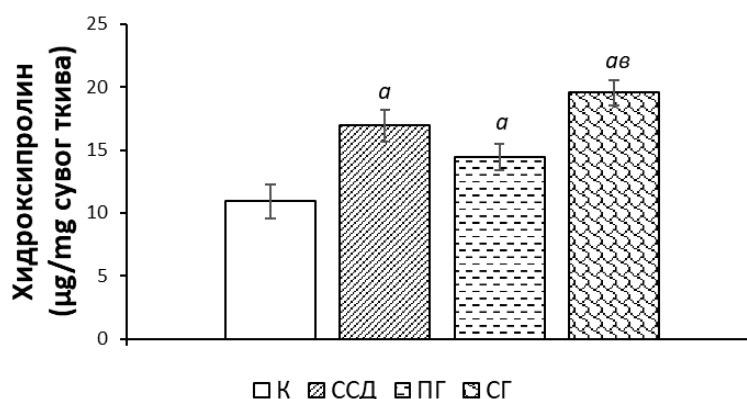


График 30. Ефекти примењених формулација на садржај хидроксипролина у ткиву са подручја ране изазване методом инцизије. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^c Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.7.5. Маркери инфламације у хомогенату ткива

4.7.5.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Концентрације проинфламацијских цитокина $TNF-\alpha$ и $IL-6$, као и антиинфламацијског $IL-10$, у хомогенату ткива са подручја ране, претходно изазване методом инцизије, приказане су на **Графику 31**. Примена масти на бази етарског уља смиља допринела је значајном смањењу концентрације прооксидационих маркера детектованих у хомогенату ткива у поређењу са негативном контролном групом (**Графици 31А и 31Б**). Значајно већа концентрација антиинфламацијског маркера, $IL-10$, у хомогенату ткива измерена је код животиња којима је апликована формулација на бази етарског уља смиља или сребро-сулфадиазин у поређењу са контролним групама (**График 31В**).

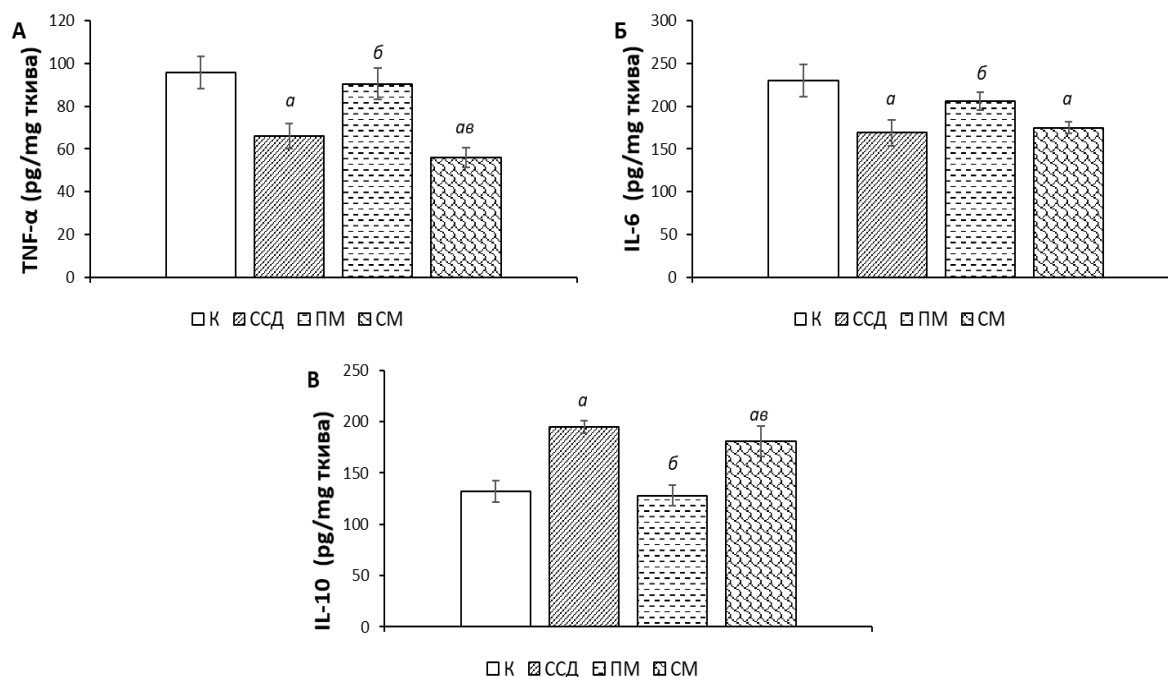


График 31. Ефекти примењених формулација на проинфламацијске и антиинфламацијске маркере у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом инцизије: А) TNF-α; Б) IL-6; В) IL-10. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=8). ^a Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са ССД групом; ^{ав} Статистички значајна разлика на нивоу p<0,05 у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.7.5.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

На **Графику 32** су приказане концентрације проинфламацијских цитокина TNF - α и IL-6, као и антиинфламацијског IL-10, у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом инцизије. Примена формулације гела са инкорпорираним уљем смиља значајно је смањила концентрације прооксидационих маркера детектованих у хомогенату ткива у поређењу са негативном контролном групом (**Графици 32А и 32Б**). Са друге стране, тронедељна примена гела са инкорпирираним етарским уљем смиља показала је значајно смањење концентрације антиинфламацијског маркера IL-10 у хомогенату ткива у поређењу са ССД групом (**График 32В**).

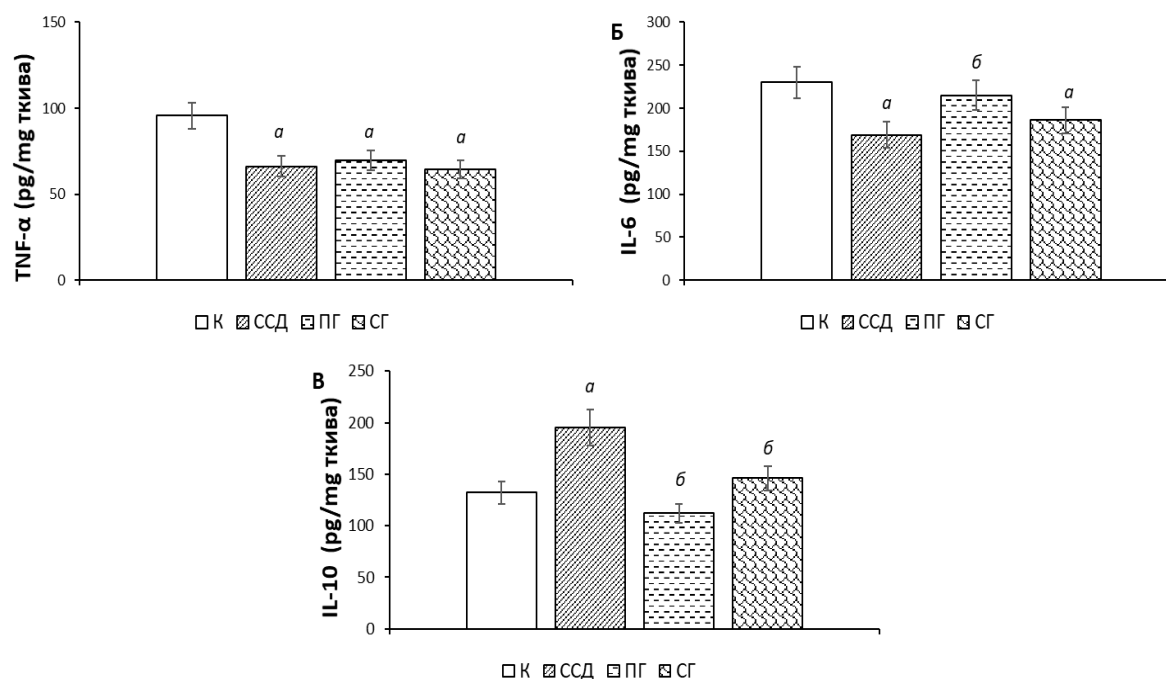


График 32. Ефекти примењених формулација на проинфламацијске и антиинфламацијске маркере у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом инцизије: А) TNF-α; Б) IL-6; В) IL-10. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=8). ^а Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; ^в Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

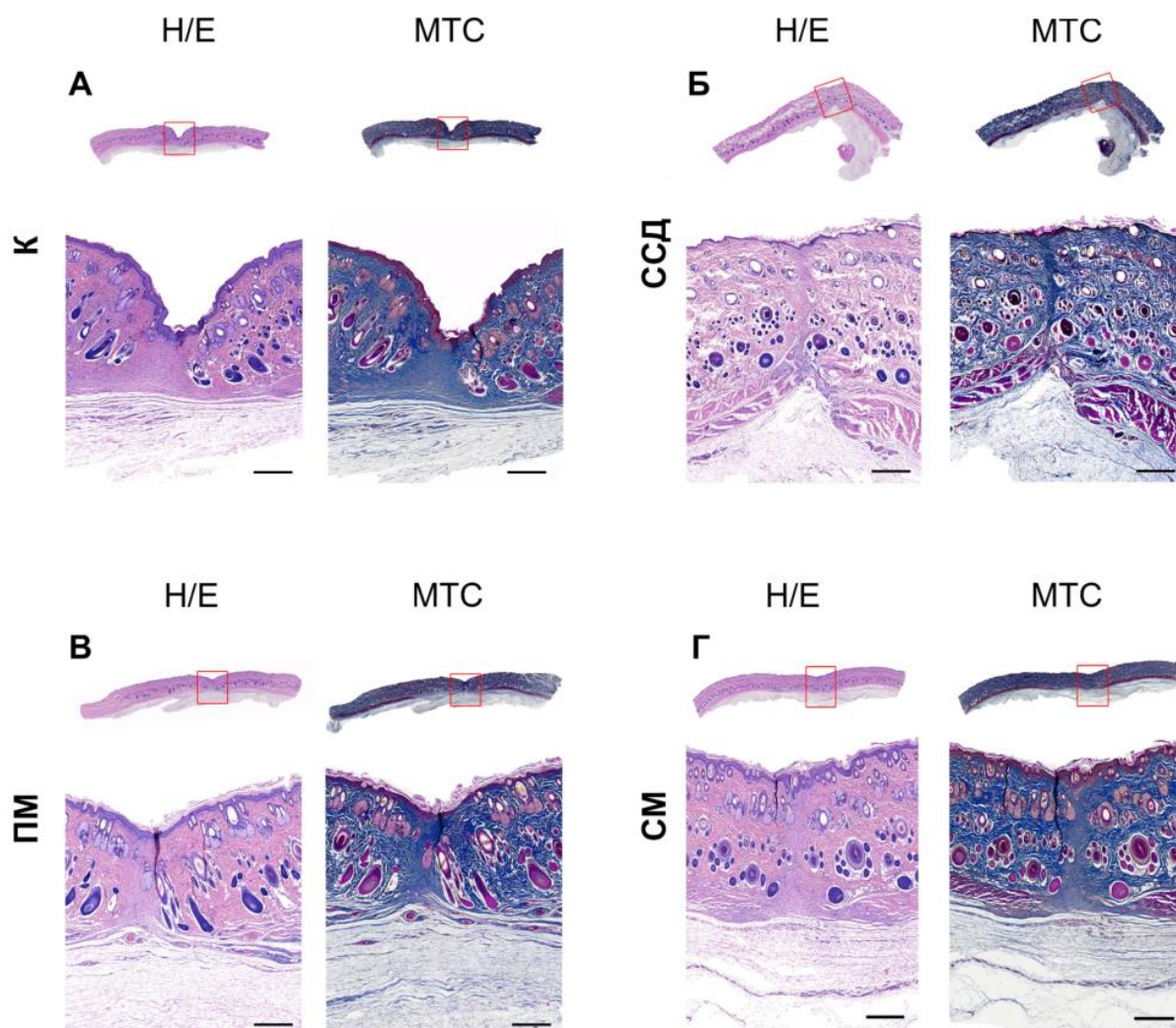
4.7.6. Хистолошка и имунохистохемијска анализа

4.7.6.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

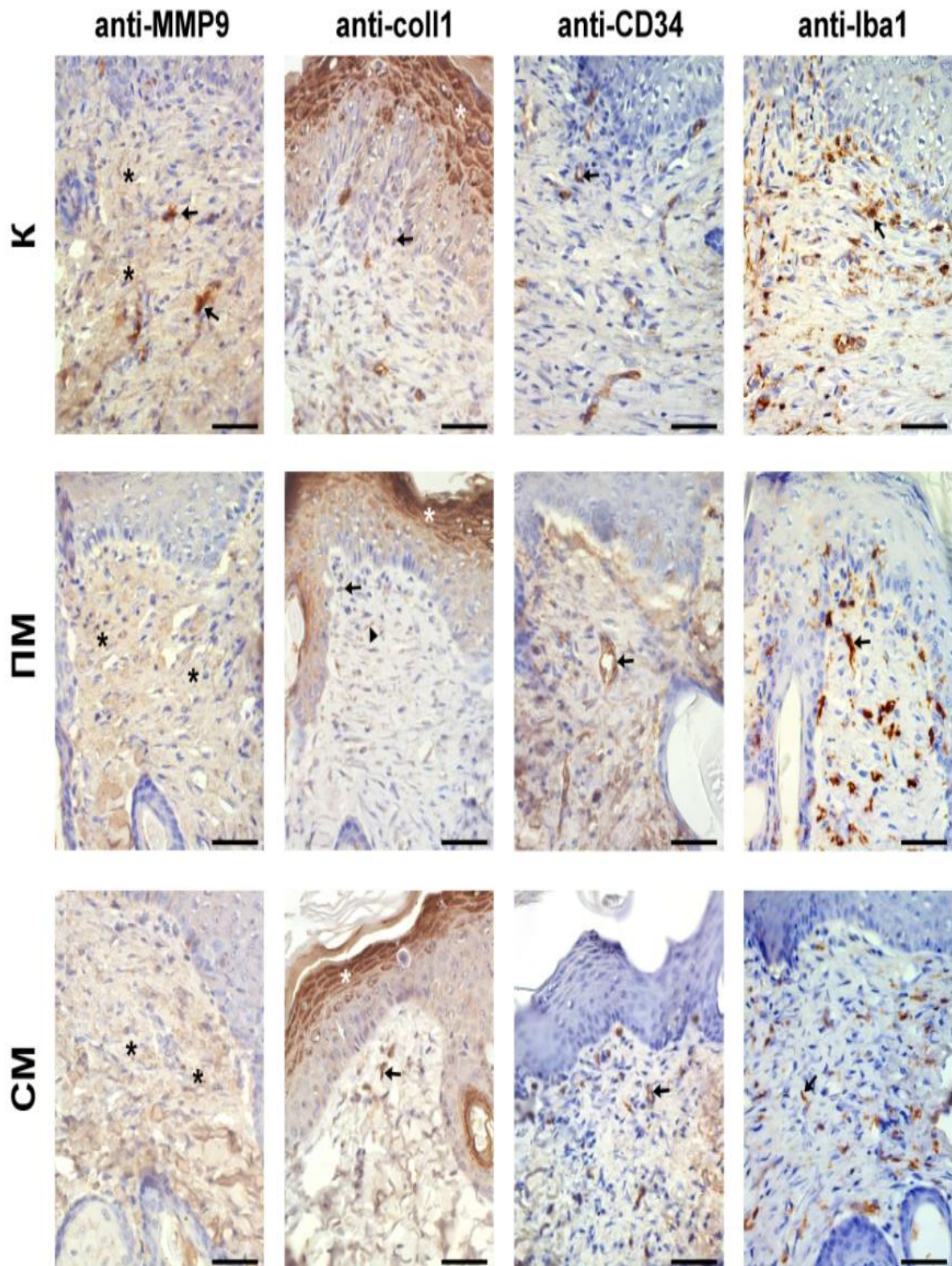
Резултати хистопатолошких промена у узорцима ткива са подручја ране, претходно изазване методом инцизије, приказани су на **Слици 14**. Три недеље након повреде примећена је потпуна реепителизација епидермалног слоја у експерименталним групама третираним различитим формулацијама масти. Значајне разлике у дебљини и цитолошким карактеристикама епидермиса између група нису примећене. С друге стране, примећене су значајне промене у површинским и у дубоким слојевима дермиса. Најизраженија фиброза је примећена у негативној контролној групи, док је умерена фиброза, али још увек без обнављања кожных аднекса, примећена у сребро-сулфадиазин групи (**Слика 14Б**). Први знаци поновне појаве кожных аднекса, као што су лојне жлезде, знојне жлезде и фоликули длаке, али и даље са присуством фиброзе, примећени су у групи животиња третираних Еуцерин подлогом (**Слике 14В**). Примена формулације у облику масти са инкорпорираним етарским уљем довела је до цитоархитектонског обнављања дермиса (**Слике 14Г**).

Имунореактивност према антителима coll I, CD34, Iba1 и MMP-9 је представљена на **Слици 15**. Слаб интензитет MMP-9 бојења цитоплазме фибробласта у дермису примећен је у свим групама. У контролној групи су чак пронађене и ретке ћелије позитивне на MMP-9, које су највероватније припадале макрофагима (**Слика 15-К**). Три недеље након изазване инцизионе ране у свим групама је приметно и присуство coll I-позитивних

фибробласти и влакна. Унутар фиброзног ожиљка идентификовани су и CD34-позитивни капиларни судови. Када је реч о васкуларизацији ожиљка разлике између група није било. Иако је сазревање фиброзног ткива у ожиљку било скоро завршено, идентификовање присуства Iba1-позитивних макрофага је било могуће. Доминација Iba1-позитивних макрофага је примећена у контролној групи (Слика 15-К).



Слика 14. Репрезентативне слике хематоксилин-еозином (H/E) и *Masson Trichrome* (MTC) обојених пресека ткива из К, ССД, ПМ и СМ групе. Скала бар, 1 mm. К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

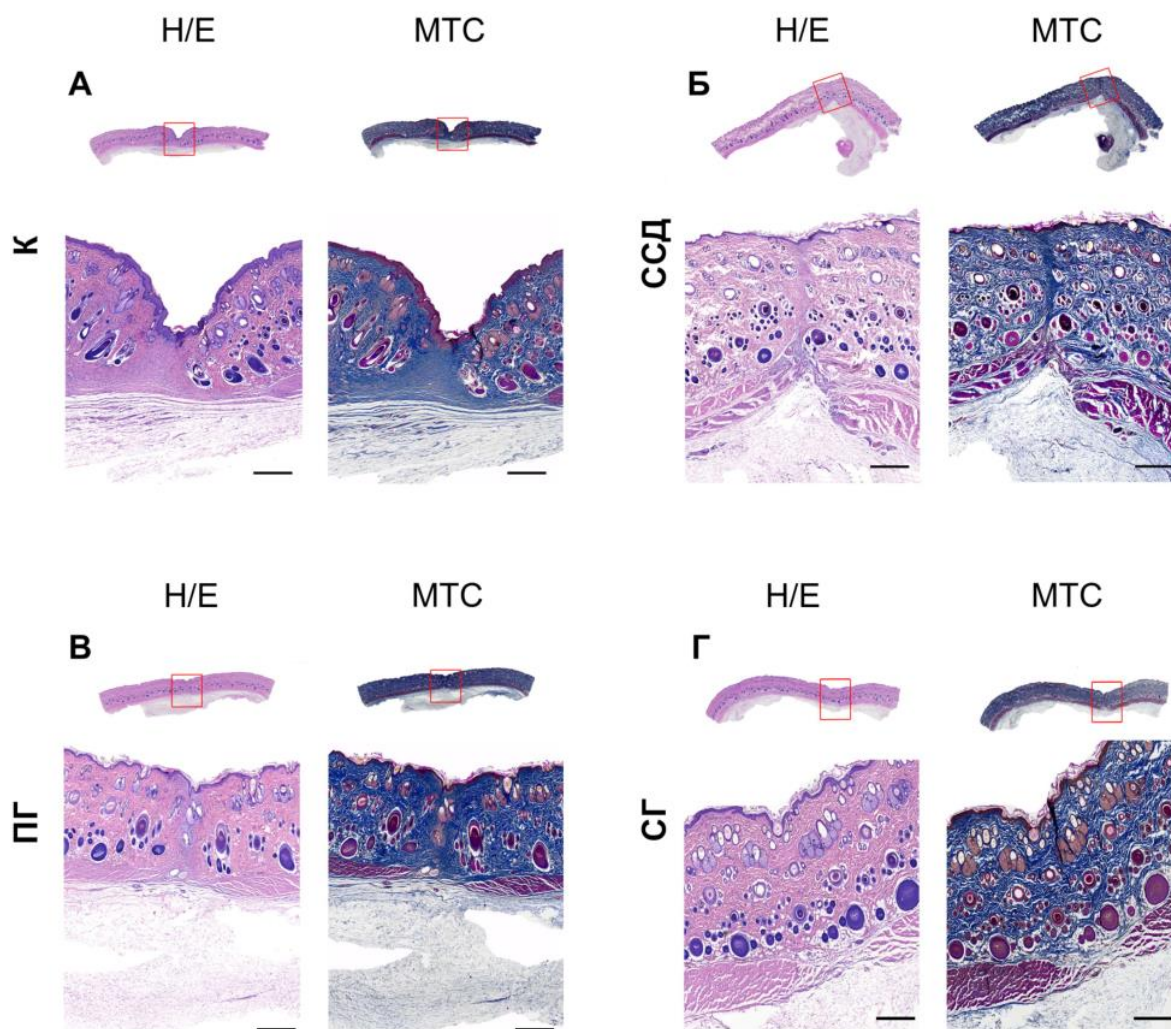


Слика 15. Репрезентативни имунохистохемијски приказ бојења MMP-9, колагена I, CD34 и Iba1 у К, ССД, ПМ групи и СМ групи. Скала 50µm; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

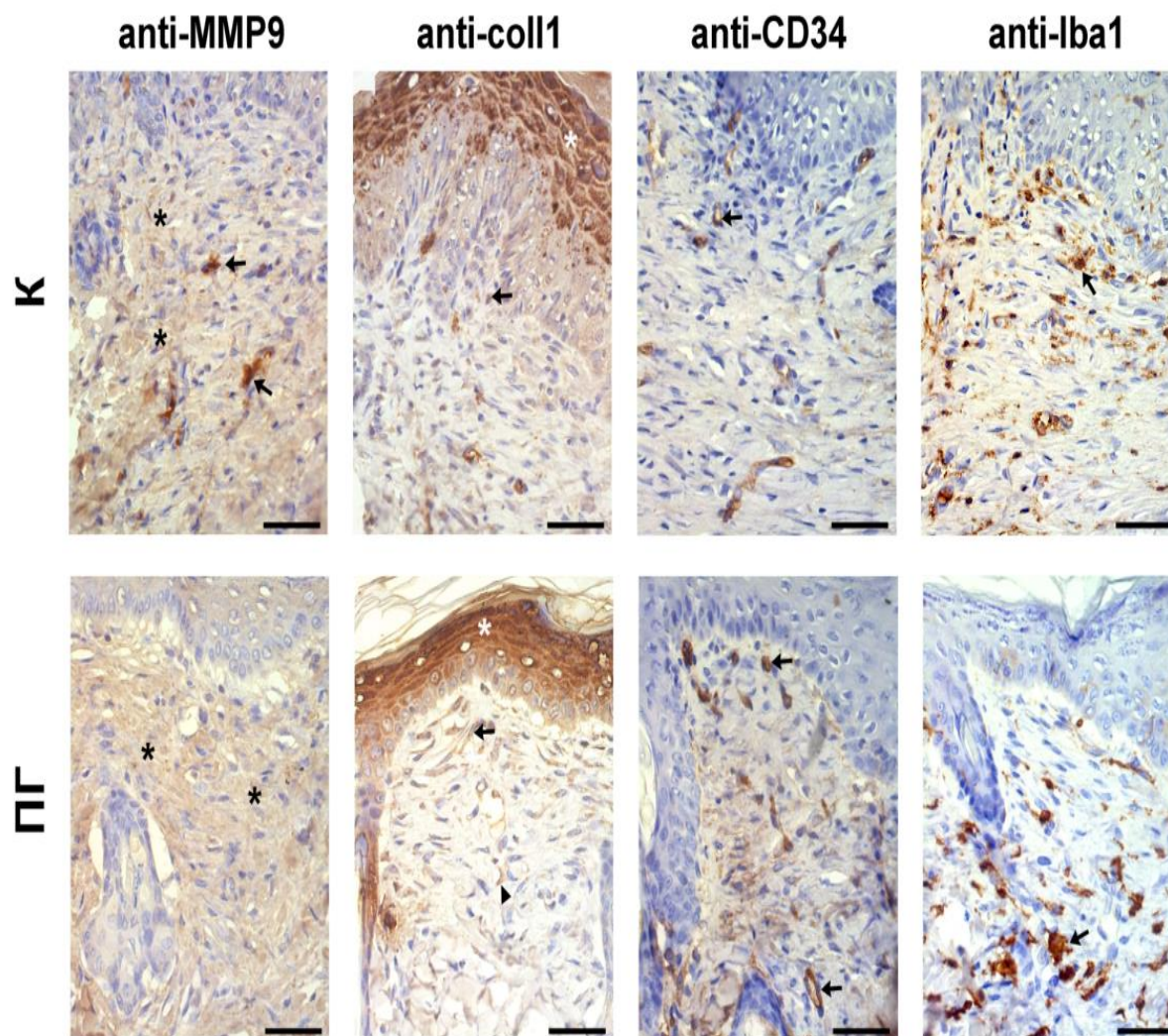
4.7.6.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Хистопатолошке промене ткива коже животиња третираних различитим формулацијама гела приказане су на **Слици 16**. Резултати показују да је након три недеље примећена потпуна реепителизација епидермалног слоја, без значајних разлика у дебљини и цитолошким карактеристикама између група. Евидентна разлика је примећена на нивоу дермиса, где је наизраженије обнављање дермиса изражено у групи животиња третираних формулацијом гела на бази етарског уља смиља (**Слика 16Г**). Код појединих узорака из дате групе обнављање аднексалних структура је било толико изражено да је само основни мишићни дефект указивао на место реза (**Слика 16Г**).

Резултати имунохистохемијског бојења узорака ткива ране животиња, третираним формулацијама гела, представљени су на **Слици 17**. Резултати су готово идентични као у групи животиња које су третиране формулацијом масти. Важно је нагласити да је најизраженија производња coll-I пронађена у групи животиња третираних карбомерним гелом (**Слика 17-ПГ**).



Слика 16. Репрезентативне слике хематоксилин-еозином (Н/Е) и *Masson Trichrome* (МТС) обојених пресека ткива из К групе (А), ССД групе (Б), ПГ групе (Ц), СГ (Д). Скала бар, 1 mm; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.



Слика 17. Репрезентативни имунохистохемијски приказ бојења MMP-9, колагена I, CD34 и Iba1 у К групи (А), ССД групи (Б), ПГ групи (Ц) и СГ групи (Д). Скала 50 μ m; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.7.7. Маркери оксидационог стреса у хомогенату ткива

4.7.7.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Резултати указују на то да је апликација масти са етарским уљем смиља значајно смањила ниво ослобађања прооксидационог маркера TBARS у поређењу са свим испитиваним групама. Са друге стране, активност SOD и CAT је била значајно већа у групи животиња третираних са смиље маст формулацијом у односу на контролну групу. Додатно, активност CAT је у датој групи била значајно већа и у односу на групу третирану подлогом (**График 33**).

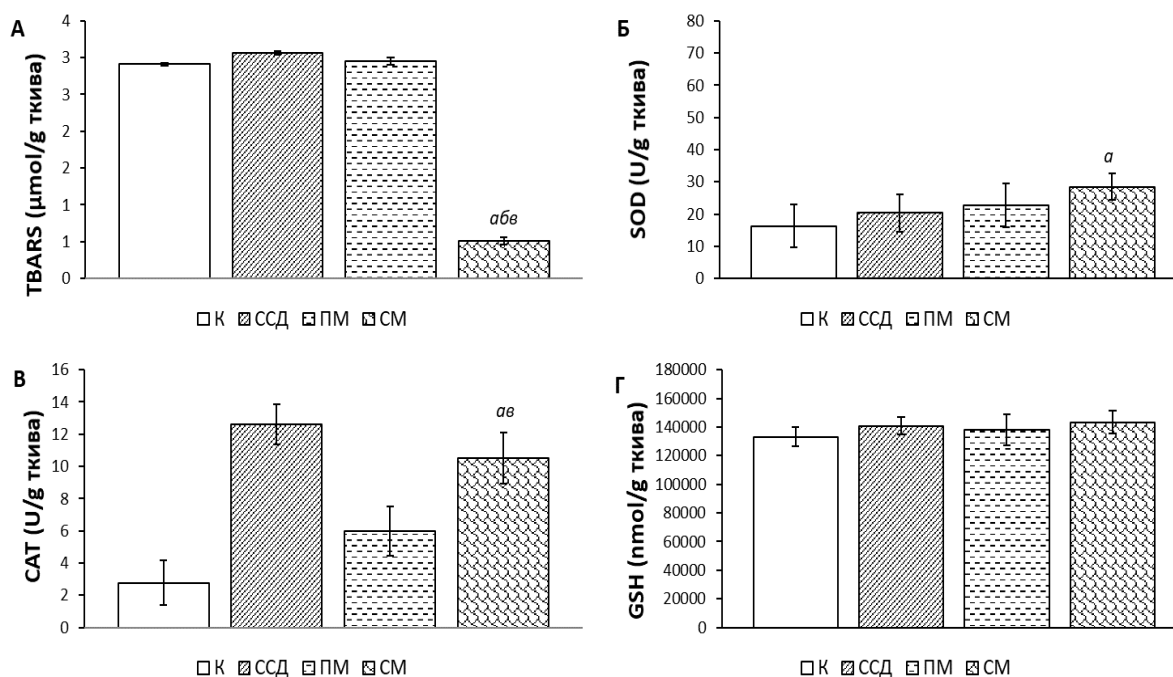


График 33. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом инцизије: А) TBARS; Б) SOD; В) CAT; Г) GSH. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^b Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^c Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.7.7.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Готово идентични резултати као за групу маст на бази смиља указују на то да је најмања концентрација ослобођеног прооксидационог маркера показана у групи која је третирана гелом на бази смиља. Када говоримо о маркерима антиоксидационе заштите можемо приметити да је активност CAT статистички најизраженија у групама које су третиране гелом на бази смиља и референтним стандардом (График 34).

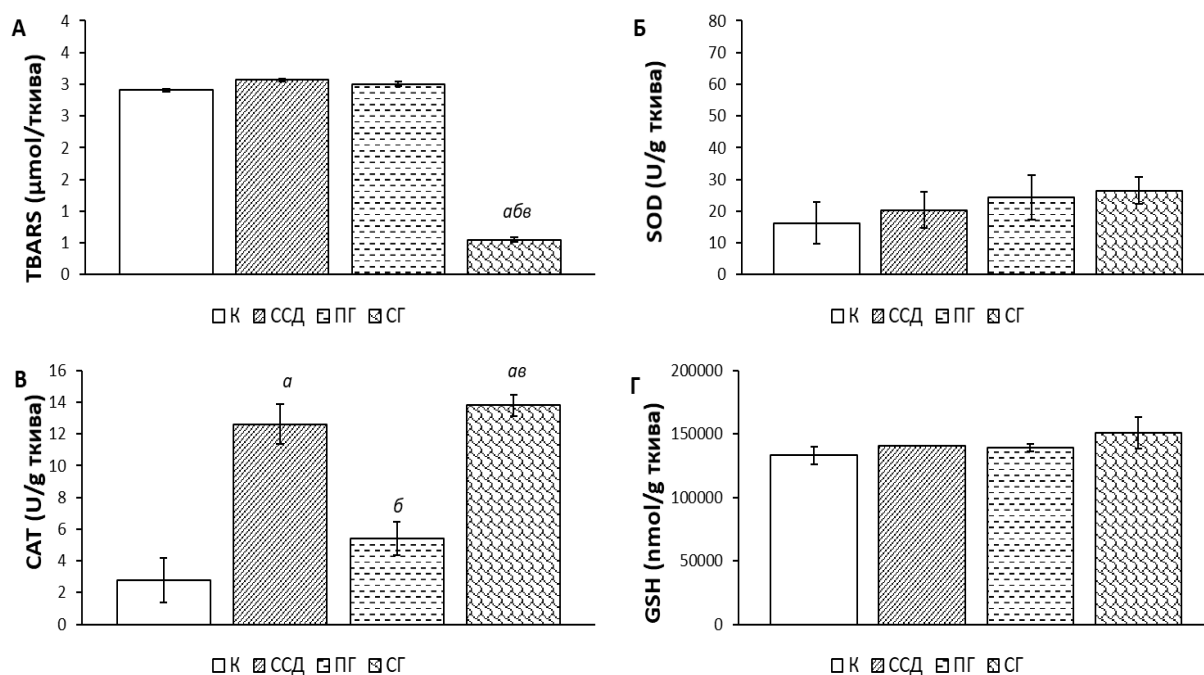


График 34. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у хомогенату ткива са подручја ране изазване методом инцизије: А) TBARS; Б) SOD; В) CAT; Г) GSH. Вредности су изражене као средња вредност \pm стандардна девијација ($n=8$). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ССД групом; ^{ав} Статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у поређењу са ПГ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

4.7.8. Системски редокс статус

4.7.8.1. Примена масти на бази етарског уља смиља

Ниво прооксидационих маркера измерених у плазми животиња третираних одговарајућим формулацијама масти, у моделу рана изазваних инцизијом, представљени су на **Графику 35**. Резултати указују на то да је апликација масти са етарским уљем смиља значајно смањила ниво ослобађања H_2O_2 и O_2^- у односу на позитивну и негативну контролну групу. Са друге стране, значајне промене ослобађања NO и TBARS нису уочене.

Вредности маркера антиоксидационе заштите представљени на **Графику 35** показали су да значајних разлика у нивоу антиоксидационих маркера заштите SOD и GSH није било. Са друге стране, значајно веће вредности CAT су примећене у групи животиња третираних формулацијом масти са смиљем у односу на контролне групе.

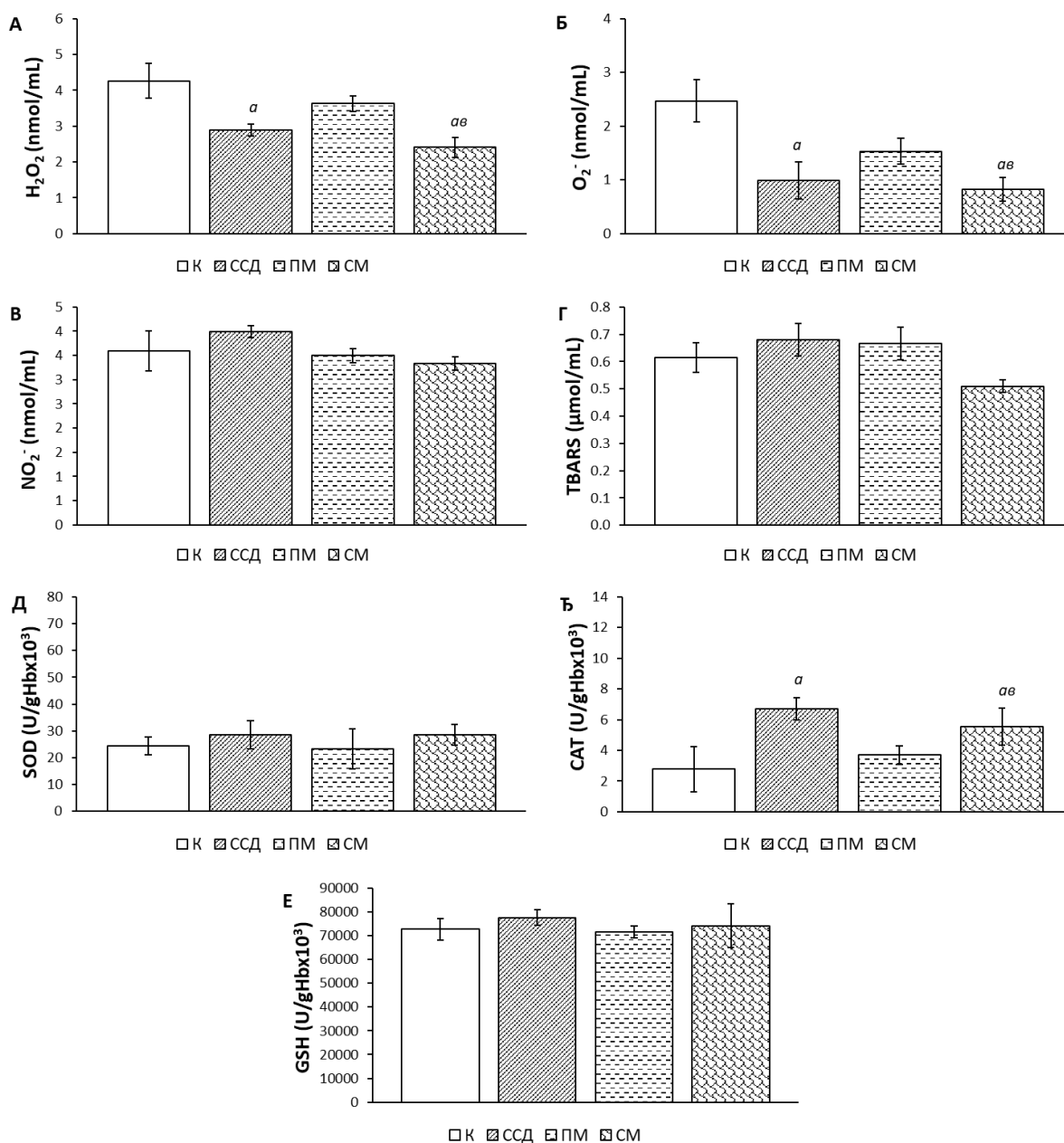


График 35. Ефекти примењених формулација на прооксидационе маркере у плазми животиња са раном изазваном методом инцизије: А) H_2O_2 ; Б) O_2^- ; В) NO_2^- ; Г) TBARS; Д) SOD; Ђ) CAT; Е) GSH. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=8). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са К групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; ^в Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПМ групом; К - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПМ - подлога за маст; СМ - смиље маст.

4.7.8.2. Примена гела на бази етарског уља смиља

Ниво прооксидационих маркера измерених у плазми животиња, третираних одговарајућим формулацијама масти, у моделу рана изазваних инцизијом представљени су на **Графику 36**. Резултати указују на то да је апликација масти са етарским уљем смиља била повезана са значајно нижим нивоом ослобађања H_2O_2 и O_2^- у односу на

позитивну и негативну контролну групу. Са друге стране, значајне промене ослобађања NO_2^- и TBARS нису уочене. Резултати параметара антиоксидационе заштите показују да значајних разлика у вредностима антиоксидационих маркера SOD и GSH није било. Са друге стране, значајно веће вредности CAT су примећене у групи животиња третираних формулацијом масти са смиљем у односу на све испитиване групе (График 36).

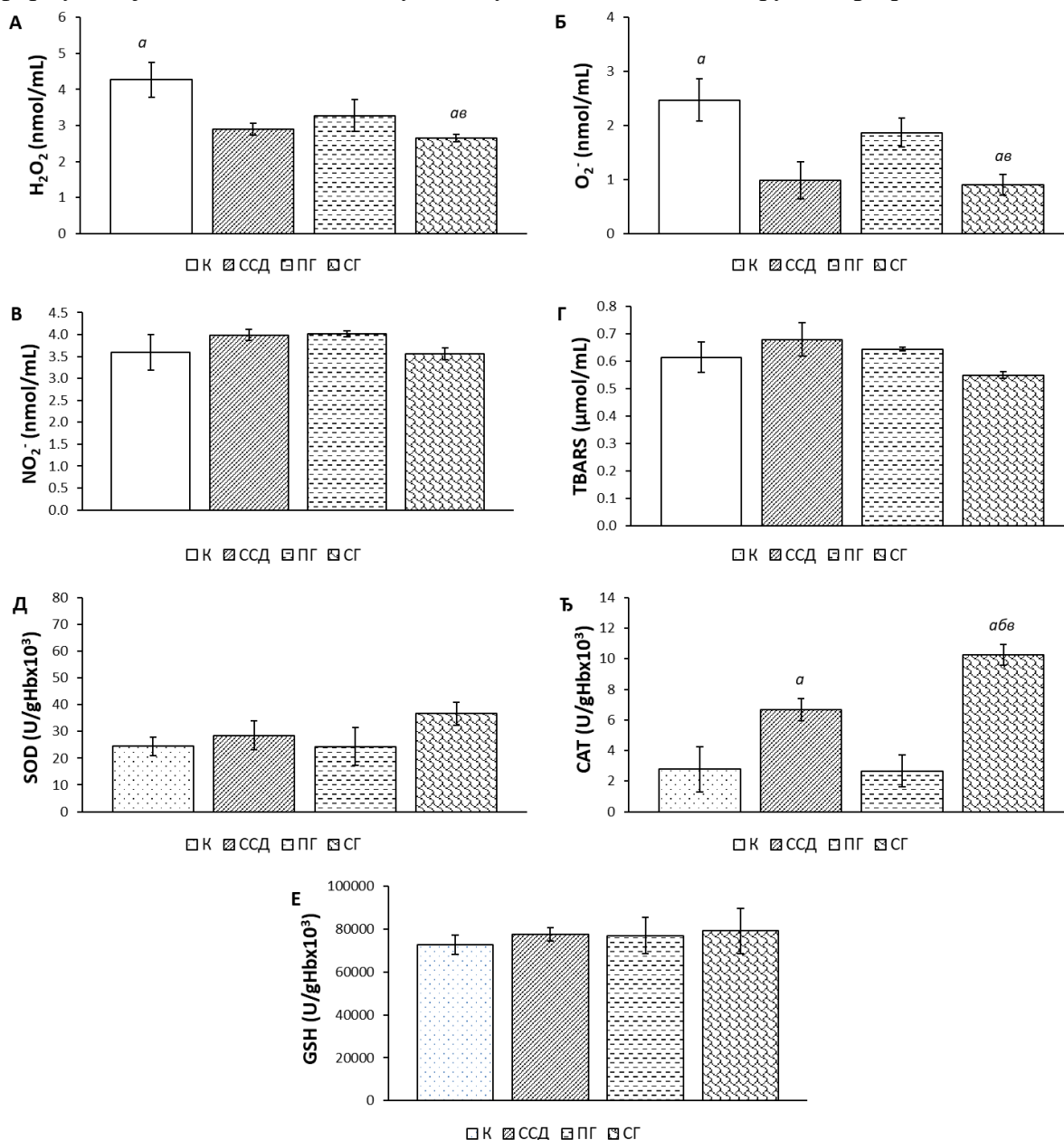


График 36. Ефекти примењених формулација на прооксидационе маркере у плазми животиња са раном изазваном методом инцизије: А) H_2O_2 ; Б) O_2^- ; В) NO_2^- ; Г) TBARS; Д) SOD; Ђ) CAT; Е) GSH. Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна девијација (n=8). ^a Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са КТР групом; ^б Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; ^{абв} Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у поређењу са ПГ групом; КТР - контролна група; ССД - сребро-сулфадиазин; ПГ - подлога за гел; СГ - смиље гел.

V
ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Узимајући у обзир учесталост појаве алергија, иритација и других компликација на кожи које настају услед употребе синтетски активних супстанци, последњих година, у фокусу научних истраживања су фитопрепарати за локалну примену. Додатно, примена биљних препарата представља потенцијалну стратегију у терапији многих обољења. Самим тим, велики изазов за научну јавност представља потрага за новим, мање токсичним агенсима, који остварују значајну активност у терапији различитих обољења (167). У складу са тим, развој нових формулација на бази етарског уља смиља представља потенцијално решење захваљујући његовом различитом спектру активности, попут антиинфламацијске, антиоксидационе и антимицробне. Избор етарског уља смиља је првенствено заснован на његовој вишевековној традиционалној примени при чему је број студија које потврђују његову терапијску ефикасност лимитиран.

Стога, примарни део спроведеног истраживања обухватио је карактеризацију етарског уља смиља, која се огледа кроз идентификацију активних састојака етарског уља, као и испитивање његовог антиоксидационог потенцијала. Обећавајући резултати подстакли су нас да искористимо етарско уље смиља као природну сировину за развој топикалних формулација у облику масти и гела са потенцијалном применом за ублажавање инфламације и лечење рана. Имајући у виду да су стабилност и безбедност неопходни захтеви које препарат треба да испуни, праћене су промене карактеристика масти и гела у периоду од 6 месеци, као и тестирање потенцијала да изазову иритацију. С обзиром да литературни подаци указују на потенцијалну антиинфламацијску активност етарског уља смиља, претпоставили смо да би наше формулације на бази ове биљне сировине могле остварити ефекте у смањењу инфламације. Локални антиинфламацијски потенцијал је испитан на моделу карагенаном индуковане инфламације шапе пацова. Како инфламација представља једну од кључних фаза у процесу зарастања рана, од посебног интереса је било сагледати потенцијалну ефикасност формулација на бази етарског уља смиља, као антиинфламацијских агенаса у третману зарастања рана. Узимајући у обзир повезаност дијабетеса и отежаног зарастања рана, посебна актуелност истраживања се огледа у испитивању хроничне примене масти и гела, са инкорпорираним етарским уљем смиља, у лечењу рана код пацова са индукованим дијабетесом тип 1. Ефекти топикалних формулација на бази етарског уља смиља у терапији зарастања рана су испитивани кроз широк спектар приступа који обухватају макроскопску опсервацију и различите биохемијске и патохистолошке анализе.

У циљу једноставнијег праћења, секција дискусије је попут секције резултата подељена на три главна дела. Анализа резултата добијених у овом истраживању али и поређење са резултатима претходно спроведених студија се прожимају кроз сва три дела. Први део се односи на карактеризацију етарског уља смиља, односно одређивање хемијског састава и сагледавање антиоксидационог потенцијала. У наставку су формулисани топикални препарати са инкорпорираним уљем смиља, па се самим тим други део истраживања односи на карактеризацију масти и гела на бази етарског уља смиља и испитивање њихове стабилности. Трећи део је обухватао *in vivo* истраживања која су спроведена на животињама. Истраживања укључују испитивање безбедности примене формулација на бази етарског уља смиља, као и испитивање локалног антиинфламацијског потенцијала и потенцијалне ефикасности датих формулација у третману зарастања рана.

5.1. Карактеризација етарског уља смиља

5.1.1. Хемијски састав етарског уља

Први део истраживања спроведен је са циљем да се испита квалитативна и квантитативна заступљеност биомолекула у етарском уљу смиља. Анализа етарског уља смиља, спроведена коришћењем GC/MS анализе, открила је присуство 46 једињења, која представљају 98,37% укупног састава етарског уља. Најзаступљенију класу биомолекула представљају терпени са знатно већим процентом заступљености сесквитерпена (59,62%) у односу на монотерпене (18,52%). Најзаступљенија једињења из групе сесквитерпена су γ -куркумен и β -селинен, док су као монотерпени доминирали угљоводонични монотерпен α -пинен и монотерпенски естар нерил-ацетат (Табела 10, Слика 5).

Како фармакопејом нису прописане стандардне вредности у погледу заступљености главних компонената етарског уља смиља, резултате је могуће упоређивати искључиво са истраживањима која су спроведена од стране других аутора. Наиме, етарско уље смиља представља продукт биљне врсте која годинама интригира пажњу научне јавности и његов хемијски састав је био предмет истраживања великог броја аутора. Ипак, са друге стране, анализа етарског уља је прилично захтевна, с обзиром да постоји велики број подврста сличне структуре и физичко-хемијских својстава, што додатно отежава његову идентификацију (168).

Резултати анализе хемијског састава етарског уља, коришћеног у нашој студији, у складу су са литературним подацима који приказују γ -куркумен као главну компоненту заступљену у етарском уљу смиља пореклом из Србије (51). Доминантна заступљеност γ -куркумена указује на постојање хемотипа γ -куркумена, који је карактеристичан за уља изолована са подручја Србије, Црне Горе, Италије (Фођа, Палермо и Сардинија) и САД (36, 40, 169, 170). Такође, компоненте које доминирају у етарском уљу смиља, сакупљеном дуж јадранске обале су α -пинен и сесквитерпенски угљоводоници (α - и γ -куркумен), као и нерил-ацетат (59). У прилог томе говори чињеница да етарско уље, добијено процесом хидродестилације цветова смиља са подручја Босне и Херцеговине, поседује веома сличан хемијски састав као уље коришћено у нашем истраживању. Сесквитерпени представљају доминантнију хемијску класу једињења у односу на монотерпене, а највећу заступљеност показују γ -куркумен и β -селинен, који су као најзаступљенија једињења детектовани и у нашој студији. Када је у питању садржај монотерпена компоненте које преовлађују су α -пинен и лимонен (171).

Са друге стране, висок садржај нерил-ацетата је идентификован у уљу пореклом са Сардиније (172), док је умерен садржај присутан у уљу изолованом са подручја Корзике (32, 36). Уља са високим садржајем α -пинена су карактеристична за поднебље Италије (5), Португала (173) и Хрватске (47), док је умерен садржај α -пинена забележен у уљу изолованом са подручја Бугарске (174), Хрватске (47), Босне и Херцеговине (175) и Алжира (176). За подручја Италије попут Потенце, Сијене и Матере анализа уља је показала највећу заступљеност β -селинена, компоненте која је значајна за парфемску индустрију (36).

Тумачењем наведеног, може се истаћи да је поређењем хемијског састава етарског уља смиља из различитих региона Медитерана уочена значајна варијабилност заступљених биоактивних једињења. Значајан утицај на варијабилност произилази из чињенице да етарско уље смиља поседује повећан ниво интраспецифичних разлика у одговору на факторе животне средине, посебно на својства попут текстуре и киселости земљишта (177). Додатно, велики утицај остварују и еколошке карактеристике места

узгоја (клима, географски положај, надморска висина), али и фактори који се односе на саму биљну врсту, попут развојне фазе биљке, као и генотип или подврста биљке (4).

5.1.2. Антиоксидациона активност етарског уља

Сматра се да се антиоксидациона активност једињења пореклом из природних извора може остварити путем спречавања акумулације слободних радикала и/или јачања антиоксидационе заштите (178). Третман природним антиоксидационим производима биљног порекла представља могућу опцију за превенцију великог броја поремећаја, у чијој основи лежи оксидациони стрес (179). Етарска уља представљају мешавине формиране од великог броја различитих органских једињења, која садрже коњуговане угљеникове двоструке везе и хидроксилне групе. С обзиром да наведене групе поседују могућност да донирају водоник, инхибирањем слободних радикала могу да ублаже оксидациони стрес (180, 181).

Развијен је велики број различитих *in vitro* метода за одређивање антиоксидационе активности етарских уља, али је важно нагласити да се, због сложеног састава и вишеструких механизма антиоксидационог деловања, процена антиоксидационе активности никада не препоручује коришћењем само једног теста (135).

Одређивање антиоксидационе активности етарског уља смиља спроведено је применом различитих *in vitro* тестова, који се заснивају на трансферу електрона у циљу неутрализације DPPH радикала, одређивању редукционе способности уља коришћењем FRAP теста, неутрализације слободнорадикалских врста, попут OH радикала и NO радикала, као и потенцијалу инхибиције липидне пероксидације. У исто време су испитане и активности потентних, синтетских антиоксиданаса попут пропил-галата, бутилованог хидрокситолуена и аскорбинске киселине.

Одређивање капацитета неутрализације DPPH радикала свакако представља једну од најзаступљенијих метода приликом одређивања антиоксидационог потенцијала, првенствено због тачности и брзине, али и комерцијалне доступности DPPH реагенса. Резултати приказани у **Табели 11** су показали да етарско уље смиља поседује антиоксидациони потенцијал, с обзиром на то да је неутралисало 50% DPPH радикала уз IC₅₀ вредност од 4,45 mg/mL. Ипак, већу способност неутралисања DPPH радикала је показао пропил-галат као стандард, уз IC₅₀ од 0,69 mg/mL. У складу са нашим резултатима су и резултати истраживања, које је показало да етарско уље смиља поседује три пута мањи капацитет неутралисања DPPH радикала у односу на пропил-галат (43). Исто тако, етарско уље добијено процесом хидродестилације биљног материјала у фази цветања, које садржи нерил-ацетат и γ -куркумен, као најзаступљеније компоненте, испољило је значајно мањи потенцијал за ублажавање оксидационог стреса у односу на уље тестирано у нашој студији. IC₅₀ вредност испитиваног етарског уља је била 68,65 mg/mL, док је бутил-хидроксианизол, примењен као стандард, поседовао вредност 0,09 mg/mL (51). Са друге стране, етарско уље са подручја Босне и Херцеговине није показало антиоксидациону активност јер није постигло 50% инхибиције DPPH радикала. Могуће објашњење дискрепанце у резултатима DPPH инхибиције је различито географско порекло етарског уља, које је у директној корелацији са хемијским саставом и последичном антиоксидационом активношћу. Антиоксидациона моћ етарских уља може бити повезана са присуством оксигенисаних монотерпена, посебно нерил-ацетата (57, 182). У прилог томе говори чињеница да етарско уље са подручја Француске, богато оксигенисаним монотерпенима, показује знатно бољу антиоксидациону активност у односу на уље из Босне и Херцеговине, које је богато сесквитерпенским угљоводонцима (183). Поред тога, не треба занемарити утицај неидентификованих

једињења, као и интеракције међу њима на укупни антиоксидациони потенцијал етарских уља (173, 184).

Док DPPH метода одражава способност антиоксиданаса да донирају електрон или водонични радикал стабилном слободном радикалу DPPH, FRAP метода упоредно је антиоксидансе на основу њихове способности да редукују гвожђе Fe^{3+} до феро (Fe^{2+}) јона и обично је применљива на узорке са високим садржајем фенола. Добијена FRAP вредност за етарско уље смиља од 0,03 mg AKE/mL уља указује на слаб потенцијал уља да редукује фери јон, што је и очекивано с обзиром да феноли нису саставна компонента испитиваног етарског уља. Слични резултати су показани и у истраживању других аутора, где је бутиловани хидрокситолуен показао 100 пута већу антиоксидациону активност у односу на етарско уље смиља (185). Извештаји претходно спроведеног истраживања показују да је антиоксидациони капацитет мерен FRAP методом показао највећу редукујућу моћ етарског уља при концентрацији 880 $\mu\text{g/mL}$ (175).

Анализа капацитета „хватања“ хидроксил радикала указује да највећи потенцијал поседује бутиловани хидрокситолуен са постигнутом IC_{50} вредношћу од $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$. С друге стране, етарско уље смиља је показало слабији капацитет „хватања“ радикала, али ипак компарабилан са капацитетом који је постигао пропил-галат. Додатно, етарско уље није постигло 50% инхибиције NO радикала. На основу вредности капацитета инхибиције липидне пероксидације етарско уље смиља показује антиоксидациону активност у вредности од $10,48 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$, док пропил-галат поседује активност од $7,13 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$. Наведени резултат може се објаснити чињеницом да етарска уља садрже антиоксидансе који делују у хидрофобном окружењу, инхибирајући пероксидацију липида и уклањајући липидне пероксидне радикале, чиме спречавају ширење ланчаних реакција посредованих слободним радикалима (185).

У складу са наведеним, можемо извести закључак да је етарско уље смиља показало извесну антиоксидациону активност која је нижа у односу на синтетске антиоксидансе. Такви резултати не треба да буду изненађујући имајући у виду да фенолна једињења, која су одговорна за добар антиоксидациони потенцијал, нису идентификована у испитиваном узорку уља (185). Други значајан параметар, који објашњава нижу антиоксидациону активност етарског уља, представља поларност система растварача који се користи у методи. Етарска уља и њихова чиста једињења нису растворљива у поларним растварачима, па самим тим не могу показати значајне антиоксидационе ефекте (186). Са друге стране, постигнута антиоксидациона активност може бити резултат разноврсности монотерпена и сесквитерпена присутних у сложеној мешавини етарског уља и синергијских ефеката међу њима (187).

5.2. Формулација и процена стабилности масти и гела на бази етарског уља

Литературни подаци сугеришу да је концентрација етарског уља смиља од 0,5% оптимална и погодна за локалну примену и да њено повећање није препоручљиво због могућности иритације коже (188). У складу са тим, у нашој студији етарско уље смиља је инкорпорирано у одговарајуће магистрално израђене подлоге за израду полуврстих препарата у концентрацији од 0,5% у циљу добијања масти и гела на бази смиља. У циљу процене физичке стабилности израђених полуврстих формулација спроведена је студија природног старења препарата на собној температури, у трајању од шест месеци. Релевантни показатељи физичке стабилности су промене органолептичких својстава, рН вредности и реолошких параметара препарата током периода чувања и коришћења. Стога, у уорцима масти и гела који су чувани шест месеци на собној температури од 22

$\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ наведени параметри од интереса праћени су у следећим временским тачкама: на почетку и крају периода чувања.

У оквиру органолептичких карактеристика праћене су промене боје, мириса, конзистенције и хомогености у периоду од шест месеци. Резултати шестомесечног праћења указују да није дошло до измена органолептичких особина испитиваних формулација (Табеле 12 и 13). Са аспекта физичке стабилности, одсуство промене боје, мириса, конзистенције и хомогености показатељ је прелиминарне стабилности испитиваних топикалних формулација.

Одређивање рН вредности представља незаобилазан параметар, како за праћење стабилности дермокозметичких препарата, тако и за испитивање погодности, односно подношљивости примене на кожи. Оптимална рН вредност формулација за дермалну примену треба да буде између 5 и 6 јединица. Одсуство промене рН вредности тестиране гел формулације, током целог периода чувања, указује на стабилност испитиване формулације. Важно је да се рН вредност гела са инкорпорираним уљем смиља одржавала у опсегу 5-6, током шестомесечног праћења, што указује на биокомпатибилност формулације за примену на кожи, са минималним ризиком од настанка иритације или бактеријске или гљивичне инфекције.

Одређивање размазивости, као индекса лакоће примене, представља једну од неопходних метода пре пласирања препарата на тржиште с обзиром да је потребно да се полуврсти производи за локалну примену лако наносе на површину коже. Размазивост у великој мери утиче на ефикасност локалне терапије и представља важну карактеристику одговорну за испоруку активне супстанце на циљно место, лакоћу наношења и најважније, потребе потошача (189).

Из тог разлога пратили смо и размазивост наших препарата у току времена која је остала непромењена, што представља додатну потврду стабилности полуврстих препарата на бази смиља. непромењена вредност параметра размазивости током периода од шест месеци. Имајући у виду процентуалну заступљеност етарског уља смиља у наведеним формулацијама, може се закључити да на способност размазивости углавном утичу подлоге коришћене за израду масти и гела. На основу наведеног налаза јасно се истиче да формулисани маст и гел на бази смиља поседују одговарајуће структурне и вискоеластичне особине, као и вискозитет који је погодан за дермалне препарате (190).

Употреба и прихватљивост фармацеутских и козметичких препарата у великој мери зависе и од типа протицања финалног производа. Стога, реолошка мерења представљају важан пут за откривање типа протицања, који не само да могу да побољшају ефикасност препарата већ могу помоћи корисницима у избору оптималног производа за њихове индивидуалне потребе. Такође, ова мерења нам пружају могућност предвиђања понашања и стабилности препарата у току производње, складиштења и примене.

Криве протицања, које показују зависност напона смицања од брзине смицања у различитим временским тачкама, веома су важан показатељ могућих промена физичке стабилности испитиваних формулација. Када је реч о формулацији масти, криве протицања, прва анализирана три дана након припреме масти и друга анализирана након шест месеци складиштења указују да реолошка својства препарата остају непомењена услед времена складиштења. Може се закључити да није било промена у понашању течења масти током периода складиштења (График 1). Псеудопластично понашање је пожељно својство за формулацију масти, јер ће при високим брзинама смицања маст лако тећи и на тај начин се олакшава локална примена. С друге стране, у случају ниског смицања, маст ће имати већу конзистенцију и самим тим дуже остати на кожи.

Вискоеластично понашање полуврстих формулација масти и гела на бази етарског уља смиља показује да су вредности еластичног (G') модула веће од вредности вискозног (G'') модула за цео опсег испитиваних фреквенција, што указује да је еластична

компонента масти израженија од вискозне. Ови резултати сугеришу постојање гел структуре у узорку, која потиче од интеракције између компоненти преко слабих неполарних веза. Са **Графика 2** може се закључити да период складиштења није изазвао значајне промене у вискоеластичним својствима масти (191).

Када је реч о реолошким особинама гела на бази смиља, може се приметити да је припремљени гел показао одговарајућа реолошка својства. Реограми указују на нењутновско понашање, односно на псеудопластичан тип протицања. Промене вискозитета су истражене, уз примену различите брзине смицања и самим тим примећено је смањење вискозитета са повећањем брзине смицања (**График 3**). Показано псеудопластично понашање гела је нарочито битно за једноставну примену формулације на предвиђено место. Истовремено, неопходно је да гел постигне одговарајућу вискозност да би се задржао на месту примене (192). Псеудопластично понашање је пожељно својство како за масти, тако и за гелове, као полуврсте облике, јер ће при високим брзинама смицања, којима је полуврсти препарат изложен када се извади из свог непосредног паковања, гел лако тећи, и самим тим олакшати локалну администрацију. Са друге стране, при ниским брзина смицања, када се гел рашири на месту примене, препарат ће поседовати већу конзистенцију, обнављајући своја оригинална реолошка својства пре примене (193-195). Додатно, гел са инкорпорираним етарским уљем смиља је у току испитиваног периода од шест месеци задржао реолошке карактеристике, с обзиром да нису забележене промене током периода праћења.

У тестовима деформације приказаним на **Графику 4** уочене су велике разлике између еластичног G' и модула губитка G'' , при чему је G' много већи од G'' , што би могло да укаже на заступљеније вискоеластичне особине припремљеног гела (196). Зависност модула еластичности и модула вискозности од фреквенције је познат и као механички спектар који је користан за одређивање чврстоће насталих гелова. Код слабих гелова постоји зависност од фреквенце, а разлика између модула није изражена. Са друге стране, код „правих гелова“ G' модул је већи од G'' током целог времена и самим тим независан је од фреквенције и управо такве одлике поседује и испитивана формулација гела са инкорпорираним етарским уљем смиља (197).

5.3. Испитивање безбедности и ефикасности примене формулација на бази смиља

5.3.1. Акутна дермална иритација

У циљу процене опасности и ризика од примене различитих препарата први корак представља сагледавање потенцијала формулације да изазове сензибилизацију коже (199). У складу са тим, тест акутне дермалне иритације на анималном моделу у нашој студији чини есенцијални скрининг, који пружа основну карактеризацију безбедоносног профила формулација, масти и гела са инкорпорираним етарским уљем смиља. Тест акутне дермалне иритације је веома важан за утврђивање података о потенцијалном ризику од дермалне иритације за нове супстанце или производе, који ће бити коришћени од стране пацијената (199).

Иритација коже је један од нежељених ефеката лекова, који се обично јавља након употребе синтетских лековитих супстанци (200). Настаје услед неспецифичног оштећења, изазваног контактом са спољним стимулусом или агенсом и последичног повећавања осетљивости и изазивања запаљењске реакције. У зависности од фактора окружења, домаћина и различитих стимулуса може имати различите клиничке манифестације. Иритација коже се пре свега односи на реверзибилно оштећење коже узроковано испитиваним агенсом који се примењује до 4 сата, док корозија коже укључује иреверзибилна оштећења, некрозу, чиреве, крварење и кржаве красте. Главни патогени механизми иритације коже укључују оштећење кожне баријере, производњу цитокина и оксидациони стрес, што доводи до видљивих и субклиничких инфламацијских реакција (201, 202). Главни параметри који се прате приликом спровођења теста иритације не на анималним моделима су појава еритема и/или едема. Еритем представља црвенило коже узроковано хиперемијом или повећањем протока крви у површинским капиларима. Са друге стране, едем представља оток који настаје услед накупљања вишка интерстицијске течности. Настанак еритема и едема је узрокован стимулацијом алергена који покрећу имунски одговор на ослобађање проинфламацијских цитокина, попут хистамина и леукотриена (203).

Ово је прва студија која је испитивала ризик од настанка иритације коже након примене топикалних формулација са инкорпорираним етарским уљем смиља. Испитивање је изведено према OECD 404 смерницама и имало је за циљ праћење настанка промена у временском трајању од 14 дана, након примене испитиваних формулација у концентрацији од 0,5%. Одсуство било каквог токсичног знака, попут едема и иритације, у прописаном периоду након примене масти и гела на бази смиља указује на то да су припремљене формулације безбедне за локалну употребу. Како се сматра да је животињска кожа веома осетљива на већину фармацеутских састојака, добијени резултати су пружили јаке доказе о одсуству ризика при примени датих формулација чак и током дужег времена. Наши налази су у складу са релевантним препорукама за безбедну примену етарског уља смиља, где је истакнуто да се етарско уље смиља, за локалну примену, сме користити у максималној концентрацији од 0,5%. Самим тим, повећање концентрације етарског уља се не препоручује због могућности иритације коже (188, 204).

Одсуство појаве еритема и едема потврђује безбедну примену масти и гела са инкорпорираним етарским уљем смиља и самим тим представља неопходан корак који омогућава њихову даљу примену као потенцијалних локалних агенаса у терапији различитих обољења.

5.3.2. Антиинфламацијска активност формулација на бази етарског уља смиља

Годинама уназад, примена синтетских препарата у терапијском збрињавању инфламацијских болести је у драстичном паду, првенствено због њихове уске повезаности са појавом озбиљних нежељених ефеката. Последично, њихова небезбедна примена је омогућила да препарати на бази природних производа поврате своју популарност и стекну велико интересовање научне јавности у превенцији и лечењу инфламацијских стања. Иако је антиинфламацијска активност екстраката смиља и његових састојака добро позната, података о ефектима етарског уља смиља у терапији инфламацијских поремећаја готово да нема. Сходно томе, један од циљева овог истраживања био је да се по први пут испита локални антиинфламацијски потенцијал формулација на бази етарског уља смиља.

Антиинфламацијска активност топикалних формулација је испитана коришћењем *in vivo* модела едема шапе, изазваног интраплантарном администрацијом карагенана. Способност антиинфламацијске активности препарата смиља је процењена праћењем развоја едема шапе, као првог показатеља антиинфламацијског одговора али и кроз праћење маркера инфламације и оксидационог стреса, који леже у основи овог поремећаја.

Едем шапе изазван карагенаном представља репродуцибилан модел, широко примењиван за процену антиинфламацијске активности. Присуство едема је један од примарних знакова упале, а само формирање едема настаје као последица синергистичког деловања медијатора упале, попут хистамина, серотонина и брадикинина, што доводи до повећања васкуларне пермеабилности и протока крви (205). Примена карагенана у задњу шапу индукује двофазни инфламациони одговор. Рана фаза едема се јавља непосредно након убризгавања карагенана, траје до сат времена и највероватније настаје услед ослобађања хистамина, леукотриена, серотонина и кинина (206). Важан посредник акутне фазе инфламације је и NO, који се на месту инфламације формира од стране леукоцита, ендотелних и сензорних нервних ћелија (207). Касна фаза, која се јавља сат времена након примене инфламацијског агенса, последица је повећане продукције простагландина, метаболита арахидонске киселине, као и инфилтрације неутрофила (208). Ћелијска инфилтрација додатно доприноси инфламацијском одговору повећаном производњом слободних кисеоничних врста, попут O_2^- и OH радикала (207). Такође, научно је доказано да интраплантарна примена карагенана доводи до повећања експресије и ослобађања различитих цитокина, попут TNF- α и IL-1 β , који последично изазивају ослобађање проинфламацијских медијатора IL-6, кинина, леукотриена, метаболита арахидонске киселине и ROS (209, 210). Дати цитокини представљају кључне компоненте урођеног имуног система, које активирају леукоците и обезбеђују одбрану домаћина од повреде ткива (211, 212).

Резултати спроведеног истраживања указују да локална примена масти и гела са инкорпорираним уљем смиља значајно супримира отицање шапе изазвано карагенаном, чиме се потвђује антиинфламацијска активност датих формулација (Табеле 14 и 15). Поред тога, редукција проинфламацијских и прооксидационих маркера, постигнута применом масти и гела на бази смиља један је од кључних механизма укључених у постигнуте антиинфламацијске ефекте датих формулација (Графици 5-8). Обе формулације показале су изражену антиинфламацијску активност, али се као снажнији антиинфламацијски агенс, показала маст на бази смиља. Додатно, резултати указују да је степен инхибиције едема шапе временски зависан с обзиром да маст и гел са инкорпорираним етарским уљем смиља показују највећи степен инхибиције едема у последњем сату мерења. Препарати на бази смиља су од првог сата праћења показали значајну разлику инхибиције едема шапе у односу на контролну групу (Табеле 14 и 15).

Наша студија је показала да је едем шапе изазван карагенаном у корелацији са повишеним нивоом TNF- α и IL-6 у ткиву шапе. Са друге стране примена масти и гела на бази смиља значајно је смањила нивое TNF- α и IL-6 у ткиву шапе у поређењу са контролном групом. Дакле, препарати са инкорпорираним етарским уљем смиља су смањили осетљивост ткива шапа пацова на проинфламацијске медијаторе. Самостална примена карагенана проузроковала је смањење нивоа IL-10 у ткиву шапе. IL-10 је антиинфламацијски цитокин, који производе Т-ћелије и моноцити/макрофаги и познато је да смањује лучење проинфламацијских цитокина. Неравнотежа између про- и антиинфламацијских цитокина повезана је са прогресијом локалног инфламацијског одговора (213). Резултати сугеришу ниске вредности IL-10 у групи животиња којима је апликован само карагенан. Са друге стране, значајно повећање нивоа IL-10 је примећено у групама које су третиране формулацијама на бази смиља. На основу тога, можемо рећи да је примена масти и гела на бази смиља показала антиинфламацијску активност против акутног инфламацијског одговора, у ткиву шапе, изазваног карагенаном.

Уочени антиинфламацијски ефекти топикалних формулација на бази смиља су по први пут начно доказани у нашој студији, па у недостатку истраживања, која потврђују ефикасност датих препарата, постигнута антиинфламацијска активност се може објаснити на основу антиинфламацијске активности најзаступљенијих компоненти етарског уља. Чињеница је да компоненте етарског уља смиља испољавају синергистичке ефекте па самим тим, размишљање да једно једињење носи одговорност за постигнуту антиинфламацијску активност с разлогом није оправдано. Бројне студије указују на антиинфламацијски одговор неких од главних састојака етарског уља. Подаци који описују антиинфламацијску активност етарског уља смиља указују да је десетодневна орална примена етарског уља смиља, праћена локалном применом 10% раствора уља, допринела смањењу упале и узаном повлачењу модрица и хематома код пацијената подвргнутим пластичним и реконструкционим операцијама грудног коша (49). С обзиром да је нерил-ацетат најзаступљенији састојак етарског уља може се претпоставити да топикалне формулације коришћене у нашем истраживању, такође, остварују антиинфламацијски ефекат јер садрже нерил-ацетат као једну од компоненти присутну у највећем проценту. Поред тога, потврђено је да етарско уље смиља испољава *in vitro* антиинфламацијску активност путем концентрацијско-зависне инхибиције денатурације протеина (50).

Допринос у смањењу инфламацијског одговора α -пинен остварује делотворним ефектима на нивоу различитих ћелија. У перитонеалним мастоцитима пацова, α -пинен антиинфламацијску активност остварује инхибирањем ослобађања хистамина, док у хуманим мастоцитима делује тако што инхибира активацију ИКК- β , нуклеарног фактора-капа В (NF- κ B) и каспазе-1 (214, 215). Додатно, претходно спроведене студије потврђују да α -пинен остварује супресију митоген-активираних протеин киназа (МАРК) и NF- κ B у перитонеалним макрофагима миша (216, 217). Слично томе, у нецитотоксичним дозама, изазива најснажнију инхибицију катаболичких и инфламацијских путева индукованих IL-1 β , тј. активацију NF- κ B и JNK и експресију инфламацијских (iNOS) и катаболичких (MMP-1 и -13) гена (218).

Литературни подаци указују да се максимална експресија ензима циклооксигеназе COX-2 постиже 1 сат након субплантарне администрације карагенана. У складу са тим, развој локалне инфламацијске реакције потврђен је и у нашем истраживању, с обзиром да је максималан развој едема постигнут у другом сату. Претретман топикалним формулацијама смиља проузроковао је смањење едема шапе већ у првом сату након примене карагенана. С обзиром да повећана продукција метаболита арахидонске киселине представља главни фактор одговоран за прву и другу фазу инфламацијског одговора, антиинфламацијски ефекат етарског уља смиља могао би бити повезан са

инхибицијом ослобађања или синтезе циклооксигеназе (219). У складу са наведеним су и резултати студије који потврђују да локална или интраперитонеална примена α -пинена код мишева доводи до СОХ-2 инхибиције, што представља главни механизам антиинфламацијског ефекта α -пинена (217, 220). Како је α -пинен један од главних састојака етарског уља смиља, може се претпоставити да је инхибиција СОХ-2 један од кључних механизма деловања формулација на бази уља смиља.

Као што је већ споменуто, локални инфламацијски одговор изазван карагенаном се манифестује стварањем РОС и игра кључну улогу у настанку оксидационог стреса (221). Неравнотежа оксидационог статуса је карактеристична за другу фазу едема изазваног применом карагенана, јер током ове фазе долази до ослобађања слободних радикала од стране неутрофила. Слободни радикали нападају плазма мембрану што доводи до пероксидације липида. Одбрамбени систем делује против стања оксидационог стреса, активирањем одбрамбених механизма заснованих на производњи антиоксидационих ензима као што су SOD, CAT и глутатион пероксидаза (GPx) (222). У бројним патофизиолошким стањима, која су повезана са запаљењем или оксидационим стресом, примећено је да слободни радикали посредују у оштећењу ћелија у јетри. Као маркер оксидационог оштећења, липидна пероксидација указује на промене у флуидности и пермеабилности мембране и на тај начин повећава стопе деградације протеина, што ће на крају довести до лизе ћелија. Једна од последица пероксидације липида такође може довести до промене активности ензима (223). Према нашим резултатима, локална инфламација изазвана карагенаном је резултирала значајним појачањем нивоа TBARS, као маркера липидне пероксидације у инфламираном ткиву. Повећање TBARS одражава прекомерну производњу слободних радикала, што индукује повећање биомаркера оксидационог стреса. Насупрот томе, након четири сата, примећено је значајно смањење у нивоу TBARS код пацова третираних препаратима на бази етарског уља смиља, што је било повезано са смањењем величине едема.

Додатно, инјекција карагенана је изазвала значајно смањење активности SOD, CAT и нивоа GSH у инфламираном ткиву. Смањење антиоксидационе активности се може објаснити великом употребом произведених ензима, који делују као хватачи слободних радикала насталих током инфламацијског процеса и чињеницом да њихова експресија још није извршена ни четири сати након апликације карагенана (213). Насупрот томе, локална примена масти и гела са смиљем повећала је активност активности маркера антиоксидационе заштите у инфламираном ткиву. Ови резултати сугеришу да је заштитни ефекат етарског уља смиља резултат стимулације експресије и активности антиоксидационих ензима током инфламацијског процеса. Узимајући у обзир поменути активност антиоксиданаса у антиинфламацијском процесу, сугерише се да се антиинфламацијски ефекат етарског уља смиља може побољшати његовом антиоксидационом активношћу (219). Претпостављамо да разлог лежи у томе што етарско уље садржи фитохемијска једињења са антиоксидационим деловањем која могу допринети антиинфламацијском процесу. Имајући у виду да је ткиво шапе пацова инфламиране применом карагенана осетљиво на антиоксидансе, антиоксидационе компоненте у етарском уљу могу допринети његовом антиинфламацијском капацитету (224). Пре свега, монотерпени делују као хватачи слободних радикала насталих током инфламацијског процеса (225). β -пинен и α -пинен, који су такође идентификовани у етарском уљу, инхибирају синтезу NO, што указује на антиоксидациони ефекат (226). Додатно, α -пинен је показао антиинфламацијски дозно-зависан ефекат на моделу едема шапе изазван карагенаном (227). Знајући да сесквитерпени имају одличне антиинфламацијске активности, антиинфламацијска активност формулација на бази етарског уља смиља може се делимично објаснити присуством сесквитерпена (228, 229).

5.3.3. Улога формулација на бази етарског уља смиља у терапији зарастања рана

Ране подразумевају повреду коже са оштећењем континуитета ткива и настају као последица унутрашње или спољашње трауме изазване механичким, хемијским или физичким агенсима (230). Процењује се да око 8,2 милиона људи широм света и око 2 милиона у Европи пати од акутних или хроничних рана (231). Лечење рана представља економски значајан терет за здравствени систем широм света, чији трошкови годинама расту (232). У складу са све већом распрострањеношћу и последично већим директним и индиректним трошковима, ране представљају „тиху епидемију“ међу светском популацијом (231). Утицај различитих фактора попут дијабетеса, хипертензије, неухрањености, зрачења могу бити повезани са компромитованим капацитетом коже да подстиче регенерацију, што за последицу доводи до одложеног зарастања рана (79).

Једна од најтежих дугорочних компликација дијабетеса јесте отежано зарастање рана и велики проблем данас проистиче из чињенице да оболели од дијабетеса могу развити хронични дијабетесни чир, који често траје месецима или чак годинама. Хронични чир доњих екстремитета се сматра главним здравственим проблемом који погађа друштво, у земљама у развоју али и у развијеним, са глобалном преваленцом од 6,3%. Око 15% пацијената са дијабетесом пати од развоја хроничног чира доњих екстремитета, који веома тешко зараста и чини главни узрок ампутације стопала или ногу, код пацијената са дијабетесом (233, 234).

Узимајући у обзир огроман утицај хроничних дијабетичних рана на економију и друштво, постоји хитна потреба за развојем нових терапијских стратегија које могу допринети правилном зарастању рана и испољити што мање нежељених ефеката. За лечење рана коришћена су различита средства, локално или системски, а на опоравак пацијената директно утиче могућност прилагођавања третмана променама на месту ране. Предности локалних формулација у односу на системско примењене лекове су пенетрација у дубље слојеве коже, повећана биорасположивост и директно деловање на месту примене (143). Иако су за лечење рана доступни различити терапијски протоколи, који укључују антибиотике, антисептике и антиинфламацијске агенсе, лековито биље и природни производи су последњих година главни извор агенаса који се користе за зарастање рана. Значајан пораст употребе лековитог биља резултат је веће безбедности у односу на синтетске лекове, али и приступачније цене (235).

Литературни подаци сугеришу да се етарско уље смиља традиционално примењује у дерматологији, ефикасно третирајући локалне упале, модрице, едеме и хематоме. Поред тога, етарско уље смиља се инкорпорира у велики број производа за негу коже, управо због својих антимикробних, антиоксидационих и антиинфламацијских својстава (44). Имајући у виду патогенетске механизме укључене у одложено зарастање рана, претпоставили смо да се етарско уље припремљено од ове биљне врсте може користити за убрзање процеса зарастања рана у условима дијабетеса. Сходно томе, истраживали смо ефекте формулација масти и гела на бази етарског уља смиља у зарастању рана, а способност зарастања рана је сагледана са више аспеката, тј. макроскопским, хистопатолошким и биохемијским анализама.

Важни фактори у процесу зарастања рана су контракција и епителизација, па је праћење ових параметара од кључне важности у сагледавању потенцијала зарастања рана етарског уља смиља (123). Резултати нашег истраживања су показали да је проценат контракције ране, изазване методом инцизије и ексцизије, био значајно већи у групама животиња које су третиране препаратима на бази етарског уља смиља. Процент контракције ране је одређен на основу израчунате површине ране, а праћен је у више различитих тренутака при чему је први тренутак од интереса био након седам дана примене топикалних формулација, а последњи након три недеље једнодневне

администрације датих формулација. Импозантан учинак формулација са инкорпорираним етарским уљем примећен је од првог тренутка, тачније након седам дана примене. Супериоран ефекат формулација на бази етарског уља смиља је бележен до последњег дана експерименталног периода и дати резултати указују на краће време реепителизације у групама третираним етарским уљем у односу на друге групе (**Графици 13, 14, 27 и 28; Слике 6, 7, 12 и 13**).

Ефикасност препарата на бази етарског уља смиља, у процесу убрзаног зарастања рана, вероватно је у директној корелацији са хемијским саставом етарског уља и његовим активним једињењима, попут γ -куркумена, β -селинена и α -пинена, који су играли кључну улогу у процесу зарастања рана (43). Етарска уља лако продиру кроз кожу и утичу на модулацију једне или више фаза процеса зарастања и сматра се да се заштитни ефекти заснивају на његовом антиинфламацијском, антиоксидационом, антимикробном деловању, као и на повећању синтезе колагена (43). Потенцијал за зарастање рана може бити последица присуства терпена са потврђеним адстрингентним и антимикробним потенцијалом, који помажу у побољшању контракције ране и олакшавају епителизацију (236, 237). Резултати наше студије су у складу са првобитно објављеним подацима где је декокт, произведен након дестилације смиља, ефикасан у поновном успостављању континуитета ткива (238). Исто тако, етарско уље смиља показало је снажну и значајну антипролиферативну активност, а ефекти зарастања рана су потпомогнути инхибирањем протеина повезаних са ремоделовањем ткива, као што су колаген I и III. Додатно, сесквитерпени, као главни састојци етарског уља смиља, у претходно спроведеном истраживању су показали значајну активност у процесу зарастања рана повећањем стопе контракције ране, формирања гранулационог ткива, ћелијске пролиферације и синтезе колагена (239).

Једна од најзаступљенијих компоненти етарског уља смиља, α -пинен, такође подстиче процес зарастања рана убрзавајући затварање ране, стварајући ожиљке са ефективном затезном чврстином и доприносећи таложењу колагена. У рани третираној α -пиненом примећен је благи пораст таложења колагена, што је веома важно, јер процес санације ране зависи од биосинтезе, депозиције и сазревања колагена. Поред тога, наслаге колагена у ранама пружају отпорност на напетост насталих ожиљака (240).

Како колаген игра значајну улогу у одржавању структурног интегритета ткива, његова производња и таложење су неопходни у фазама као што су реепителизација ткива и зарастање рана (241). Узимајући у обзир чињеницу да је колаген доминантни екстрацелуларни протеин у гранулационом ткиву ране, постоји потреба за његовом квантификацијом у узорцима ткива (242). Слободни хидроксипролин се ослобађа разградњом колагена и сходно томе се одређивање садржаја хидроксипролина користи као златни стандард за квантификацију садржаја колагена (241). Хидроксипролин омогућава оштро увртање колагенског хеликса, а његове високе концентрације усмеравају ћелијску пролиферацију, као и синтезу, локализацију и сазревање колагена, што је све у директној вези са брзином зарастања рана (243). У циљу потврде супериорних ефеката етарског уља смиља на зарастање, процењен је садржај хидроксипролина у ткиву изолованом са подручја претходно формиране ране. Резултати јасно указују на највиши ниво хидроксипролина у ткиву ране код пацова третираних препаратима на бази етарског уља смиља (**Графици 15, 16, 29 и 30**). Чињеница да су највише вредности хидроксипролина у групама третираним формулацијама на бази етарског уља смиља забележене и у ранама изазваним методом ексцизије и инцизије, потврђује да етарско уље смиља значајно повећава ниво хидроксипролина. Овај резултат указује на повећану синтезу и таложење колагена под утицајем етарског уља смиља, чиме се обезбеђују снага и интегритет ткива. Самим тим, етарско уље смиља може значајно утицати на процес зарастања, али и обезбеђује снагу обновљеном ткиву, чиме

игра важну виталну улогу у епителизацији ткива и хомеостази (244). Додатно, етарско уље смиља је међу третанима избора у непосредном постоперативном терапијском протоколу због добре подношљивости и потенцијала да смањећи локалну упалу, едем, хематом (49).

Висок ниво хидроксипролина и ефикасније обнављање ткива, које је уочено у групама животиња третираним формулацијама на бази етарског уља смиља, потврђени су и хистопатолошким анализама. Евидентно сазревање ожиљака након ексцизије и инцизије, са повећањем густине колагених влакана и повећаним присуством колаген 1 позитивног фиброцита, примећено је у групама које су третиране препаратима на бази смиља (**Слике 8-11 и 14-17**). Ови резултати сугеришу да је примена датих формулација стимулисала таложење колагена и тиме подстакла зарастање рана.

Поред повећаног таложења колагена значајан утицај на зарастање рана остварује и процес ангиогенезе. Претпоставља се да дефекти ангиогенезе и метаболизма колагена изазвани дијабетесом играју важну улогу у одложеном зарастању рана (245). ММР играју кључну улогу у реепителизацији ране, пошто су укључене у регулацију ангиогенезе, деградације и депозиције ЕЦМ, који је од суштинског значаја за процес реепителизације (118). Металопротеиназе, попут ММР-9, могу се брзо ослободити и активирати се у почетним фазама зарастања рана. Већа активност ММР-9 повезана је са смањењем пролиферације и активности фибробласта, што доводи до отежаног зарастања рана код дијабетичара. С друге стране, ниски нивои ММР-1 и ММР-9, повезани су са завршетком патолошког стања (118, 246). Дакле, зарасла подручја ране губе активну експресију ММР-1 и ММР-9 и то је у корелацији са нашом студијом, у којој је потпуна реепителизација уочена 21. дана након формирања ране. ММР-9 утиче на ангиогенезу кроз активацију проангиогених цитокина, укључујући VEGF и TNF- α , као и стварањем антиангиогених пептида (118). Пошто је повећана експресија активне ММР-9 у ткиву коже повезана са одложеном зарастањем ране, изражено смањење експресије ММР-9 у групи животиња третираних препаратима на бази смиља јасно потврђује заштитне ефекте новоформулисаних препарата. Ипак, значајан напредак у санацији рана, третираних формулацијама са етарским уљем, огледа се кроз интензивно смањење броја I β a позитивних макрофага и кроз изразито одсуство CD34-позитивне структуре. Густина капилара у ожиљном ткиву може се изразити кроз експресију CD34. CD34, као маркер у ткиву, одражава процес зарастања повећањем покретљивости васкуларних ендотелних ћелија, што је корисно за опоравак ендотела и васкуларну реконструкцију (247). Вероватно је да је период од три недеље након хируршког формирања ране и потпуне реепителизације допринео томе да међу групама није било разлика у васкуларизацији ожиљка. Третман топикалним формулацијама значајно је инхибирао каснију инфилтрацију I β a1-позитивних ћелија (макрофага), у поређењу са контролном групом, где је примећена њихова доминација.

Да бисмо детаљно проценили улогу локалних формулација на бази етарског уља смиља у зарастању рана, пратили смо структурне промене након тронедељног третмана. Хистопатолошка анализа је потврдила да су примењене формулације етарског уља смиља биле делотворне у терапији рана. Локална апликација препарата на бази етарског уља довела је до цитоархитектонске реституције дермиса, са само основним мишићним дефектом, који указује на место реза. Према томе, етарско уље се може апликовати уграђено у гел или у маст, јер су оба ефикасна у промовисању зарастања. Потенцијално бољи ефекти формулације гела у моделу инцизије могу се објаснити чињеницом да гел згрушава крв у врло кратком временском периоду. Друге предности гела као дозног облика укључују његову лаку примену и могућност спирања. С друге стране, масти су лепљиве, масне и нису умирујуће за наношење на ране, а њихово деловање у контроли крварења је спорије (248).

Резултати хистопатолошке анализе су у корелацији са макроскопским карактеристикама и процентуално израженом контракцијом ране и указују на то да етарско уље смиља представља обећавајућу стратегију у лечењу улцера код пацијената са дијабетесом.

Важну улогу у процесу зарастања остварује фаза инфламације, која је неопходна за правилно зарастање рана. Проинфламацијски цитокини IL-6 и TNF- α су укључени у ћелијску диференцијацију и пролиферацију, координирајући синтезу гранулационог ткива, ангиогенезу, реепителизацију и механизме ремоделовања колагена (249). Штавише, ови цитокини побољшавају миграцију и пролиферацију леукоцита на рани, побољшавајући уклањање некротичног ткива и фагоцитозу антигена (250). IL-10 је још један интерлеукин укључен у инфламацијски одговор код рана, који делује као антиинфламацијски медијатор, који инхибира синтезу проинфламацијских цитокина и остварује улогу у ангиогенези (251). Међутим, неравнотежа између инфламацијских цитокина може довести до хроничног инфламацијског процеса, што резултује ометањем и одлагањем процеса зарастања (252). Резултати квантификације цитокина у хомогенату ткива изолованог са подручја ране, претходно изазване методом ексцизије и инцизије, показали су да је антиинфламацијска активност топикалних формулација етарског уља смиља у кожним ранама последица смањења нивоа IL-6 и TNF- α . Поред тога, третман препаратима на бази смиља је повећао активност IL-10, који смањује експресију проинфламацијских цитокина, као и формирање ожиљка (**Графици 17, 18, 31 и 32**). Самим тим, формулације са етарским уљем смиља су оствариле антиинфламацијски потенцијал сличан стандарду, сребро-сулфадиазину. С обзиром на концентрацију маркера инфламације која је детектована у ткиву узоркованом на крају експерименталног периода, може се увидети да је етарско уље смиља дату антиинфламацијску активност остварило у фази ремоделовања. Наши резултати су у складу са претходно спроведеним истраживањима, која показују антиинфламацијску активност етарског уља смиља. Претходна истраживања су показала да инфламацијска фаза обнавља хомеостазу, а да у пролиферативној фази фибробласти и друге ћелије из везивног ткива инфилтрирају у место ране и луче цитокине, привлаче кератиноците и доводе до реепителизације (253). Спречавање продужене инфламације сузбијањем производње инфламацијских цитокина је пожељна мета за производе за зарастање рана, док са друге стране прекомерна инфламација доводи до развоја хроничних рана и ожиљака (254). Модулација производње цитокина од стране топикалних формулација на бази етарског уља смиља указује на антиинфламацијску активност, што подржава претходно описане резултате самог етарског уља и његових доминантних састојака.

Ометање процеса зарастања ране повезано је и са оксидационим стресом, који настаје услед неравнотеже у стварању РОС и ендогеног антиоксидационог одбрамбеног механизма. Есенцијални оксиданси, попут РОС, настају у различитим физиолошким процесима. Њихови ефекти на процес зарастања рана зависе од концентрација, генерално показујући позитивне ефекте као секундарни преносиоци при ниским концентрацијама. Међутим, при високим концентрацијама оштећују ДНК, протеине и липиде у ћелијама изазивајући токсичност. Код пацијената са дијабетесом, оксидациони стрес изазван хипергликемијом негативно утиче на процес зарастања рана и у складу са тим, биљни производи са антиоксидационим деловањем могу бити корисна средства за поновно успостављање анатомског и ћелијског континуитета ткива (255). Бројне студије су показале да се на месту кожних рана повећава концентрација РОС и смањује производња антиоксиданаса, што доводи до одложеног зарастања рана (256). У инфламацијској фази, неутрофили и макрофаги производе велике количине РОС, који директно нападају патогене, али и оштећују здрава околна ткива. Инхибиција производње РОС покреће ангиогенезу и пролиферацију фибробласта, стимулишући затварање ране на кожи. Како

смо у првом делу истраживања потврдили *in vitro* антиоксидационе ефекте етарског уља смиља, претпоставили смо да хронична примена масти и гела на бази уља смиља може значајно убрзати зарастање рана кроз редукујућу оксидационог стреса. Резултати тронедељне једнодневне администрације топикалних формулација указују да су пацови третирани формулацијама са етарским уљем смиља показали значајно повећање активности CAT и SOD и смањење нивоа TBARS у хомогенату ткива са подручја претходно изазване ране (**Графици 19, 20, 33 и 34**). У исто време, параметри системског редокс статуса показују смањење нивоа прооксиданаса у поређењу са контролном групом (**Графици 21, 22, 35, 36**). Истовремено, активност CAT, детектована у лизату еритроцита је била значајно повишена што је у складу са резултатима у хомогенату ткива. Смањење нивоа прооксиданаса и повећање активности ензима антиоксидационе заштите, постигнуто формулацијама смиља, указују на то да је ублажавање оксидационог стреса један од механизма одговорних за остварене ефекте у процесу зарастања рана.

VI
ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата можемо извести следеће закључке:

- GC/MS анализом етарског уља смиља је идентификован велики број биоактивних компоненти међу којима су најзаступљенији монотерпенски и сесквитерпенски угљоводоници.
- Етарско уље смиља је показало *in vitro* антиоксидациони потенцијал.
- Формулације масти и гела на бази смиља су показале стабилност у испитиваном периоду од шест месеци.
- Спровођењем теста акутне дермалне иритације доказано је да су маст и гел са инкорпорираним етарским уљем смиља безбедни за топикалну примену.
- Топикални препарати са инкорпорираним етарским уљем смиља ублажили су инфламацијску реакцију шапе индуковану карагенаном, посредством смањења маркера инфламације и оксидационог стреса.
- Топикални препарати са инкорпорираним етарским уљем смиља стимулишу зарастање и брзину реепителизације рана изазваних методом ексцизије.
- Наведене формулације стимулишу зарастање и брзину реепителизације и рана изазваних методом инцизије.
- Остварени ефекти настају као резултат етарског уља смиља да стимулише таложење колагена.
- Постигнути ефекти се могу сматрати последицом антиоксидационих и антиинфламацијских ефеката етарског уља смиља и његових доминантних активних састојака.
- У складу са резултатима ове студије, формулације на бази етарског уља смиља се могу сматрати одличним локалним агенсом за зарастање рана код оболелих од дијабетеса.
- Исто тако, потребно је сповести клиничка истраживања како би се потврдило да обећавајуће активности формулација на бази етарског уља смиља могу бити безбедно и ефикасно примењене са клиничком ефикасношћу и у циљу апсолутне потврде његове употребе у традиционалној медицини.

VII
ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Antunes Viegas D, Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(1):54-65.
2. Glumac M, Jažo Z, Paštar V, Golemac A, Čikeš Čulić V, Bektić S, et al. Chemical Profiling and Bioactivity Assessment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Essential Oil: Exploring Pure Compounds and Synergistic Combinations. *Molecules.* 2023;28(14):5299.
3. Furlan V, Bren U. *Helichrysum italicum*: From Extraction, Distillation, and Encapsulation Techniques to Beneficial Health Effects. *Foods.* 2023;12(4):802.
4. Ninčević T, Grdiša M, Šatović Z, Jug-Dujaković M. *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don: Taxonomy, Biological Activity, Biochemical and Genetic Diversity. *Ind. Crops Prod.* 2019;138:111487.
5. Leonardi M, Ambryszewska KE, Melai B, Flamini G, Cioni PL, Parri F, et al. Essential-oil composition of *Helichrysum italicum* (ROTH) G.DON ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). *Chem Biodivers.* 2013;10(3):343-55.
6. Bisset NG, Wichtl M. 2001. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis.* MedPharm Scientific Publishers, Stuttgart.
7. Stepanović B, Radanović D, Turšić I, Nemčević N, Ivanec J. 2009. Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja. *Jan-Spider, Pitomača*, p. 243-5.
8. Perrini R, Morone-Fortunato I, Lorusso E, Avato P. Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman. *Ind. Crops Prod.* 2009;29:395–403.
9. Ivanovic J, Ristic M, Skala D. Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: influence of CO₂ density and moisture content of plant material. *J. Supercritical Fluids.* 2011;57:129–36.
10. Appendino G, Ottino M, Marquez N, Bianchi F, Giana A, Ballero M, et al. Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *J Nat Prod.* 2007;70(4):608-12.
11. Cajkanovic V. *Recnik srpskih narodnih verovanja o biljkama.* Beograd, Srpska knjizevna zadruga. 1994.
12. Tundis R, Statti GA, Conforti F, Bianchi A, Agrimonti C, Sacchetti G, et al. Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (Asteraceae). *Nat Prod Res.* 2005;19(4):379-87.
13. Galbany-Casals M, Blanco-Moreno JM, Garcia-Jacas N, Breitwieser I, Smissen RD. Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin? *Plant Biol (Stuttg).* 2011;13(4):678-87.
14. Nostro A, Bisignano G, Angela Cannatelli M, Crisafi G, Paola Germanò M, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17(6):517-20. Erratum in: *Int J Antimicrob Agents* 2001;18(3):305.
15. Josifović M. 1974. *Flora SR Srbije.* Beograd. 599.
16. Sala A. 2001. Principios antiinflamatorios y antioxidantes de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. PhD Thesis, University of Valencia, Valencia.
17. Scarborough J. Theophrastus on herbals and herbal remedies. *J Hist Biol.* 1978 Fall;11(2):353-85.
18. Quer PF. 1993. *Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado*, 14th ed. Editorial Labor, S.A., Barcelona.

19. Pereira CG, Barreira L, Bijttebier S, Pieters L, Neves V, Rodrigues MJ, et al. Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in vitro biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane (*Aspalathus linearis*). *J Pharm Biomed Anal.* 2017;145:593-603.
20. Rigano D, Formisano C, Pagano E, Senatore F, Piacente S, Masullo M, et al. A new acetophenone derivative from flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Fitoterapia.* 2014;99:198-203.
21. Schnaubelt K. 2013. *Medical aromatherapy: Healing with essential oils.* North Atlantic Books.
22. Genčić MS, Aksić JM, Živković Stošić MZ, Randjelović PJ, Stojanović NM, Stojanović-Radić ZZ, et al. Linking the antimicrobial and anti-inflammatory effects of immortelle essential oil with its chemical composition - The interplay between the major and minor constituents. *Food Chem Toxicol.* 2021;158:112666.
23. Węglarz Z, Kosakowska O, Pióro-Jabrucka E, Przybył JL, Gniewosz M, Kraśniewska K, et al. Antioxidant and Antibacterial Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. from Central Europe. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(6):735.
24. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-75.
25. Masotti V, Juteau F, Bessière JM, Viano J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem.* 2003;51(24):7115-21.
26. Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem.* 2006;54(12):4364-70.
27. Zeljković SĆ, Šolić ME, Maksimović M. Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. *Nat Prod Res.* 2015;29(19):1874-7.
28. Tzanova M, Grozeva N, Gerdzhikova M, Atanasov V, Terzieva S, Prodanova R. Biochemical Composition of Essential Oil of Corsican *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don, Introduced and Cultivated in South Bulgaria. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2018;24:1071–1077.
29. Lemaire G, Olivero M, Rouquet V, Moga A, Pagnon A, Cenizo V, et al. Neryl acetate, the major component of Corsican *Helichrysum italicum* essential oil, mediates its biological activities on skin barrier. *PLoS One.* 2023;18(3):e0268384.
30. Mastelic J, Politeo O, Jerkovic I, Radosevic N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem. Nat. Compd.* 2005;41:35–40.
31. Usai M, Foddai M, Bernardini AF, Muselli A, Costa J, Marchetti M. Chemical composition and variation of the essential oil of wild sardinian *Helichrysum italicum* G. Don subsp. *microphyllum* (Willd.) from vegetative period to post-blooming. *J. Essen. Oils Res.* 2010;225:373–80.
32. Bianchini A, Tomi P, Costa J, Bernardini AF. Composition of *Helichrysum italicum*(Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France). *Flavour Frag. J.* 2001;16: 30–4.
33. Weyerstahl P, Marschall-Weyerstahl H, Weirauch M, Meier N, Manteuffel E, Leimner J, et al. Isolation and synthesis of compounds from the essential oil of *Helichrysum italicum*. In: *Progress in Essential Oil Research*, Walter de Gruyter: Berlin; 1986, p. 178-95.
34. Bianchini A, Tomi P, Bernardini AF, Morelli L, Flamini G, Cioni PL, et al. A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy). *Flavour Frag. J.* 2003; 18:487–91.

35. Chinou IB, Roussis V, Perdetzoglou D, Loukis A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. *Planta Med.* 1996;62(4):377-9.
36. Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabetta W, Blanco A, et al. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Ind. Crops Prod.* 2010;32:639-49.
37. Mancini E, De Martino L, Marandino A, Scognamiglio MR, De Feo V. Chemical composition and possible in vitro phytotoxic activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum*. *Molecules.* 2011;16(9):7725-35.
38. Jaganjac JD, Ademović Z, Šarić Kundalić B, Horozić E. Chemical Composition and Antioxidant. *Technol. Acta.* 2021;14:21-6.
39. Marongiu B, Piras A, Desogus E, Porcedda S, Ballero M. Analysis of the volatile concentrate of the leaves and flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman (Asteraceae) by supercritical fluid extraction and their essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 2003;15:120-6.
40. Satta M, Tuberoso C, Angioni A, Pirisi F, Cabras P. Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. *J. Essent. Oil Res.* 1999;11:711-5.
41. Balázs VL, Filep R, Répás F, Kerekes E, Szabó P, Kocsis B, et al. Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) Essential Oil Showed Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity against Respiratory Tract Pathogens. *Molecules.* 2022;27(17):5518.
42. Bezek K, Kramberger K, Barlič-Maganja D. Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Hydrosol. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(8):1017.
43. Kladar NV, Anačkov GT, Rat MM, Srdenović BU, Grujić NN, Šefer EI, et al. Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. *Chem Biodivers.* 2015;12(3):419-31.
44. Mastelić J, Politeo O, Jerković I. Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Determination of ester bonded acids and phenols. *Molecules.* 2008;13(4):795-803.
45. Kunc N, Frlan A, Baričević D, Kočevar Glavač N, Kokalj Ladan M. Essential Oil and Hydrosol Composition of Immortelle (*Helichrysum italicum*). *Plants (Basel).* 2022;11(19):2573.
46. Djihane B, Wafa N, Elkhamssa S, Pedro HJ, Maria AE, Mohamed Mihoub Z. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharm J.* 2017;25(5):780-7.
47. Blažević N, Petričić J, Stanić G, Maleš Ž. Variations in yields and composition of immortelle (*Helichrysum italicum*, Roth Guss.) essential oil from different locations and vegetation periods along Adriatic coast. *Acta Pharm.* 1995;45:517-22.
48. Angioni A, Barra A, Arlorio M, Coisson JD, Russo MT, Pirisi FM, et al. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. *J Agric Food Chem.* 2003;51(4):1030-4.
49. Voinchet V, Giraud-Robert AM. Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie.* 2007;5:67-72
50. Djihane B, Zerroug MM. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil. *Der Pharm. Lett.* 2016;8(4):41-4.

51. Aćimović M, Ljujić J, Vulić J, Zheljaskov VD, Pezo L, Varga A, et al. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil from Serbia: chemical composition, classification and biological activity – May it be a suitable new crop for Serbia? *Agronomy*. 2021;11(7):1282.
52. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(4):457-70.
53. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pages JM, Amaral L, et al. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2009;53:2209–11.
54. Tzakou O, Verykokidou E, Roussis V, Chinou I. Chemical composition and antibacterial properties of *Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* oils: Three chemotypes in the same population. *J. Essen. Oils Res*. 1998;10:97–99.
55. Tekaya-Karoui A, Boughalleb N, Hammam S, Ben Jannet H, Mighri Z. Chemical composition and antifungal activity of volatile components from woody terminal branches and roots of *Tetraclinis articulate* (Vahl). Masters growing in Tunisia. *Afr. J. Plant Sci*. 2011;5:115–122.
56. Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, et al. Anti-*Candida* activity of essential oils. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9(11):1292-305.
57. Ben Bakri W, Aghraz A, Hriouch F, Larhsini M, Markouk M, Bekkouche K, et al. Phytochemical study and antioxidant activity of the most used medicinal and aromatic plants in Morocco. *J. Essent. Oil Res*. 2022;34:131–42.
58. Judzentiene A, Budiene J, Nedveckyte I, Garjonyte R. Antioxidant and Toxic Activity of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench and *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Essential Oils and Extracts. *Molecules*. 2022;27(4):1311.
59. Staver MM, Gobin I, Ratkaj I, Petrovic M, Vulinovic A, Dinarina-Sablic M, et al. In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia). *J. Essent. Oil-Bear. Plants*. 2018;21(1):77–91.
60. Ornano L, Venditti A, Sanna C, Ballero M, Maggi F, Lupidi G, et al. Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. ssp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo e Giusso growing in La Maddalena Archipelago, Sardinia. *J Oleo Sci*. 2015;64(1):19-26.
61. Contini A, Di Bello D, Azzarà A, Giovanelli S, D'Urso G, Piaggi S, et al. Assessing the cytotoxic/genotoxic activity and estrogenic/antiestrogenic potential of essential oils from seven aromatic plants. *Food Chem Toxicol*. 2020; 138:111205.
62. Fraternali D, Flamini G, Ascrizzi R. In Vitro Anticollagenase and Antielastase Activities of Essential Oil of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don. *J Med Food*. 2019;22(10):1041-6.
63. Sarkic A, Stappen I. Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics*. 2018; 5(1):11.
64. Majno G, Joris I. 2004. *Cells, Tissues and Disease*. Oxford Univ. Press.
65. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 2003. *Robbins Basic Pathology*. Saunders.
66. Finch CE. Developmental origins of aging in brain and blood vessels: an overview. *Neurobiol Aging*. 2005;26(3):281-91.
67. Robbins SL, Kumar V, Abbas AK, Aster JC. 2007. *Basic Pathology*. 8th edition. Philadelphia, PA, USA: Saunders.
68. Sanadgol N, Najafi S, Ghasemi LV, Motalleb G, Estakhr J. A study of the inhibitory effects of *Citrullus colocynthis* (CCT) using hydro-alcoholic extract on the expression of cytokines: Tnf-and il-6 in high fat diet-fed mice towards a cure for diabetes mellitus. *J. Pharm. Phytother*. 2011;3:81–8.

69. Marzouk B, Marzouk Z, Fenina N, Bouraoui A, Aouni M. Anti-inflammatory and analgesic activities of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruit and seed organic extracts. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(6):665-72.
70. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997;336(14):973-9. Erratum in: *N Engl J Med* 1997 Jul 31;337(5):356.
71. de Araújo ERD, Félix-Silva J, Xavier-Santos JB, Fernandes JM, Guerra GCB, de Araújo AA, et al. Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf aqueous extract. *Biomed Pharmacother.* 2019;113:108721.
72. Faqi AS, Yan J.S. Nonclinical safety assessment of botanical products. In: *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development.* 2nd ed. Academic Press; Boston, MA, USA: 2017.813–23.
73. Radovanović K, Gavarić N, Aćimović M. Anti-Inflammatory Properties of Plants from Serbian Traditional Medicine. *Life.* 2023; 13(4):874.
74. Carmona F, Soares Pereira AM. Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2013;23:379–385.
75. Rivera D, Obon C, Inocencio C, Heinrich M, Verde A, Fajardo J, et al. The ethnobotanical study of local mediterranean food plants as medicinal resources in southern Spain. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005;56:97–114.
76. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528-42.
77. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2892-923.
78. Karakaya S, Süntar I, Yakinci OF, Sytar O, Ceribasi S, Dursunoglu B, Ozbek H, Guvenalp Z. In vivo bioactivity assessment on *Epilobium* species: A particular focus on *Epilobium angustifolium* and its components on enzymes connected with the healing process. *J Ethnopharmacol.* 2020;262:113207.
79. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
80. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet.* 2005;366:1736-43.
81. Beldon P. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford).* 2010;28(9):409–12.
82. Rumbaut RE, Thiagarajan P. 2010. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences.
83. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(9):e108-e114.
84. Berk BC, Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Webb RC. Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor. *Science.* 1986;232(4746):87-90.
85. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem.* 1991;45:319–26.
86. Pool JG. Normal hemostatic mechanisms: a review. *Am J Med Technol.* 1977;43:776–80.
87. Teller P, White TK. The physiology of wound healing: injury through maturation. *Surg Clin North Am.* 2009;89:599–610.
88. Strecker-McGraw MK, Jones TR, Baer DG. Soft tissue wounds and principles of healing. *Emerg Med Clin North Am.* 2007;25:1–22.
89. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.* 2020;10:200223.
90. Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb. Res.* 2019;179:56–63.

91. Del Amo C, Perez-Valle A, Perez-Zabala E, Perez-Del-Pecho K, Larrazabal A, Basterretxea A, et al. Wound Dressing Selection Is Critical to Enhance Platelet-Rich Fibrin Activities in Wound Care. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:624.
92. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 2019;99(1):665-706.
93. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):265sr6.
94. Hart J. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care.* 2002;11(6):205-9.
95. Robson MC, Steed DL, Franz MG: Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg.* 2001;38:72 – 140.
96. Robson MC. Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):637-50.
97. Flanagan M. The physiology of wound healing. *J Wound Care.* 2000;9(6):299-300.
98. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
99. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care.* 2000;13:6–11.
100. Longaker MT. Wound healing. In: Grabb and Smith's Plastic Surgery, 5th edn. Philadelphia: Lippincott–Raven, 1997.3 – 12.
101. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;1:283–9.
102. Ennis WJ, Meneses P. Wound healing at the local level: the stunned wound. *Ostomy Wound Manage.* 2000;46(1A Suppl):39S-48S; quiz 49S-50S.
103. Hess CT. Skin care basics. *Adv Skin Wound Care.* 2000;13:127–8.
104. Ramasastry SS. Acute wounds. *Clin Plast Surg.* 2005;32:195–208.
105. Shaw TJ, Martin P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. *Curr Opin. Cell Biol.* 2016;42:29–37.
106. Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2019;146:344–65.
107. Sinha M, Sen C, Singh K, Das A, Ghatak S, Rhea B. Direct conversion of injury-site myeloid cells to fibroblast-like cells of granulation tissue. *Nat. Commun.* 2018;9:1–19.
108. Xue M, Jackson CJ. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv. Wound Care.* 2015;4:119–36.
109. Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, et al. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J. Biomed. Sci.* 2005;12:229–41.
110. Honnagowda TM, Kumar P, Udupa E, Kumar S, Kumar U, Rao P. Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plast. Aesthet. Res.* 2015;2:243–9.
111. Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, et al. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes.* 2003;52: 2959–68.
112. Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:1419.
113. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(3):119-36.
114. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2014;7:301–11.

115. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009;17:153–62.
116. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North Am.* 1997;77:509–28.
117. Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2011;29: 475–9.
118. Caley MP, Martins VL, O’Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4:225–34.
119. Gill SE, Pape MC, Khokha R, Watson AJ, Leco KJ. A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. *Dev Biol.* 2003;261:313–23.
120. Telgenhoff D, Shroot B. Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. *Cell Death Differ.* 2005;12:695–8.
121. Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 2003;90:993–1002.
122. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2009;32: S62-S67.
123. Li Y, Li J, Zhao C, Yang L, Qi X, Wang X, Zhou Q, Shi W. Hyperglycemia-reduced NAD⁺ biosynthesis impairs corneal epithelial wound healing in diabetic mice. *Metabolism.* 2021;114:154402.
124. Mi Q, Rivière B, Clermont G, Steed DL, Vodovotz Y. Agent-based model of inflammation and wound healing: insights into diabetic foot ulcer pathology and the role of transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen.* 2007;15(5):671-82.
125. Burgess JL, Wyant WA, Abdo Abujamra B, Kirsner RS, Jozic I. Diabetic Wound-Healing Science. *Medicina (Kaunas).* 2021;57(10):1072.
126. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv. Wound Care.* 2016;5:65–78.
127. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkötter C, Scharffetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011;121(3):985-97.
128. Morey M, O’Gaora P, Pandit A, Héлары C. Hyperglycemia acts in synergy with hypoxia to maintain the pro-inflammatory phenotype of macrophages. *PLoS ONE.* 2019;14:e0220577.
129. Montanaro M, Meloni M, Anemona L, Giurato L, Scimeca M, Izzo V, Servadei F, Smirnov A, Candi E, Mauriello A, Uccioli L. Macrophage Activation and M2 Polarization in Wound Bed of Diabetic Patients Treated by Dermal/Epidermal Substitute Nevelia. *Int J Low Extrem Wounds.* 2022;21(4):377-83.
130. Rosique R G, Rosique M J, Farina Junior J A. Curbing Inflammation in skin wound healing: a review. *Int J Inflamm.* 2015;2015:316235.
131. Minossi JG, Lima F de O, Caramori CA. Alloxan diabetes alters the tensile strength, morphological and morphometric parameters of abdominal wall healing in rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29(02):118–24.
132. Dasari N, Jiang A, Skochdopole A, Chung J, Reece EM, Vorstenbosch J, et al. Updates in Diabetic Wound Healing, Inflammation, and Scarring. *Semin Plast Surg.* 2021;35(3):153-8.
133. Adams RP. 2005. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured; Carol Stream, IL, USA.
134. Marčetić M. Varijabilnost sastava i biološka aktivnost etarskog ulja vrste *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae). 2014

135. Božin B, Kladar N, Grujić N, Anačkov G, Samojlik I, Gavarić N, et al. Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., Hypericaceae) from the Central Balkans. *Molecules*. 2013;18(10):11733-50.
136. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem*. 2006;54(5):1822-8.
137. Hinneburg I, Dorman HJD, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*. 2006; 97(1):122-9.
138. Mimica-Dukić N, Bozin B, Soković M, Mihajlović B, Matavulj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med*. 2003;69(5):413-9.
139. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-8.
140. Lesjak MM, Beara IN, Orčić DZ, Anačkov GT, Balog KJ, Francišković MM, et al. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chem*. 2011;124(3):850-6.
141. Valizadeh A, Shirzad M, Pourmand MR, Farahmandfar M, Sereshti H, Amani A. Preparation and Comparison of Effects of Different Herbal Oil Ointments as Wound-Healing Agents. *Cells Tissues Organs*. 2019;207(3-4):177-86.
142. Chen MX, Alexander KS, Baki G. Formulation and Evaluation of Antibacterial Creams and Gels Containing Metal Ions for Topical Application. *J Pharm (Cairo)*. 2016;2016:5754349.
143. Dantas MG, Reis SA, Damasceno CM, Rolim LA, Rolim-Neto PJ, Carvalho FO, Quintans-Junior LJ, Almeida JR. Development and Evaluation of Stability of a Gel Formulation Containing the Monoterpene Borneol. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016:7394685.
144. Korhonen M, Hellen L, Hirvonen J, Yliruusi J. Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *Int J Pharm*. 2005; 197: 143–51.
145. Beserra FP, Vieira AJ, Gushiken L, de Souza EO, Hussni MF, Hussni CA, et al. Lupeol, a Dietary Triterpene, Enhances Wound Healing in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats with Modulatory Effects on Inflammation, Oxidative Stress, and Angiogenesis. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2019;3182627.
146. Boudjelal A, Smeriglio A, Ginestra G, Denaro M, Trombetta D. Phytochemical Profile, Safety Assessment and Wound Healing Activity of *Artemisia absinthium* L. *Plants (Basel)*. 2020;9(12):1744.
147. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4367.
148. Danielewski M, Zielińska S, Matuszewska A, Słupski W, Włodarczyk M, Jęśkowiak I, et al. Sanguinarine-Chelerythrine Fraction of *Coptis chinensis* Exerts Anti-inflammatory Activity in Carrageenan Paw Oedema Test in Rats and Reveals Reduced Gastrotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1504929.
149. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol*. 1971;104(1):15-29.
150. Odira HO, Mitema SO, Mapenay IM, Moriasi GA. Anti-inflammatory, Analgesic, and Cytotoxic Effects of The Phytexponent: A Polyherbal Formulation. *J Evid Based Integr Med*. 2022;27:2515690X221082986.

151. Singh M, Kumar V, Singh I, Gauttam V, Kalia AN. Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Mirabilis jalapa* Linn. leaves. *Pharmacognosy Res.* 2010;2(6):364-7.
152. Calvo MI. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(3):380-2.
153. Mićović T, Katanić Stanković JS, Bauer R, Nöst X, Marković Z, Milenković D. In vitro, in vivo and in silico evaluation of the anti-inflammatory potential of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2022;293:115201.
154. Bradic J, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejavic I, et al. Cardioprotective effects of *Galium verum* L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem.* 2020;126(5):408-15.
155. García-Pedraza JÁ, Hernández-Abreu O, Morán A, Carretero J, García-Domingo M, Villalón CM. Role of peripheral 5-HT_{5A} receptors in 5-HT-induced cardiac sympatho-inhibition in type 1 diabetic rats. *Sci Rep.* 2020;10(1):19358.
156. Esmatie EM, Abo-Youssef AM, Tohamy MA. Antidiabetic and antioxidant effects of tannic acid and melatonin on streptozotocin induced diabetes in rats. *Pak J Pharm Sci.* 2019;32(4):1453-9.
157. Jeremic JN, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Srejavic IM, Bradic JV, Bolevich S, et al. The cardioprotective effects of diallyl trisulfide on diabetic rats with ex vivo induced ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 2019;460(1-2):151-164.
158. Sarandy MM, Novaes RD, Xavier AA, Vital CE, Leite JPV, Melo FCSA, et al. Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9538351.
159. Goswami S, Kandhare A, Zanwar AA, Hegde MV, Bodhankar SL, Shinde S, et al. Oral L-glutamine administration attenuated cutaneous wound healing in Wistar rats. *Int Wound J.* 2016;13(1):116-24.
160. Thangavel P, Pathak P, Kuttalam I, Lonchin S. Effect of ethanolic extract of *Melia dubia* leaves on full-thickness cutaneous wounds in Wistar rats. *Dermatol Ther.* 2019 Nov;32(6):e13077.
161. Andrițoiu CV, Andriescu CE, Ibanescu C, Lungu C, Ivanescu B, Vlase L, et al. Effects and Characterization of Some Topical Ointments Based on Vegetal Extracts on Incision, Excision, and Thermal Wound Models. *Molecules.* 2020 Nov 16;25(22):5356.
162. Güzel S, Özyay Y, Kumaş M, Uzun C, Özkorkmaz EG, Yıldırım Z, et al. Wound healing properties, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia kronenburgii* Rech. f. and *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* on excision and incision wound models in diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* 2019;111:1260-76.
163. Can NM, Thao DTP. Wound Healing Activity of *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore. Leaf Hydroethanolic Extract. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:2483187.
164. Latif MA, Zaki MZ, Leng TM, Rahman NH, Arshad SA, Hamid A. *Alocasia denudata* Engler treatment enhance open wound healing activities in Wistar rat's skin. *J Ethnopharmacol.* 2015;176:258-67.
165. Bradic J, Andjic M, Novakovic J, Kocovic A, Tomovic M, Petrovic A, et al. Lady's Bedstraw as a Powerful Antioxidant for Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(6):1277.
166. Abu Dayyih W, Abu Rayyan W, Al-Matubsi HY. Impact of sildenafil-containing ointment on wound healing in healthy and experimental diabetic rats. *Acta Diabetologica.* 2020; 57(11):1351-8.
167. Ribeiro AS, Estanqueiro M, Oliveira, MB, Sousa Lobo JM. Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. *Cosmetics.* 2015;2:48-65.

168. Guinoiseau E, Lorenzi V, Luciani A, Muselli A, Costa J, Casanova, J, Berti L. Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 2013. 1073-80.
169. Tucker AO, Maciarelo MJ, Charles DJ, Simon JE. Volatile Leaf Oil of the Curry Plant *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* and Dwarf Curry Plant subsp. *microphyllum* (Willd.) Nyman in the North American Herb Trade. *J. Essent. Oil Res.* 1997;9:583-5.
170. Stupar M, Ljaljevic-Grbic M, Dzamic A, Unkovic N, Ristic M, Vukojevic J. Antifungal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects. *Arch. Biol. Sci.* 2014;66:1539-45.
171. Jerković I, Rajić M, Marijanović Z, Bilić M, Jokić S. Optimization of supercritical CO₂ extraction of dried *Helichrysum italicum* flowers by response surface methodology: GC-MS profiles of the extracts and essential oil. *Sep. Sci. Technol.* 2016;51(18):2925-31.
172. Melito S, Petretto G, Podani J, Foddai M, Maldini M, Chessa M, et al. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. *Ind. Crop. Prod.* 2016;80:242-50.
173. Costa P, Loureiro JM, Teixeira MA, Rodrigues AE. Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO₂ from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal. *Ind. Crop. Prod.* 2015;77:680-3.
174. Oliva A, Garzoli S, Sabatino M, Tadić V, Costantini S, Ragno R, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Nat. Prod. Res.* 2020;34:445-8.
175. Talić S, Odak I, Bevanda AM, Crnjac N, Paštar M. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Herzegovina. *Croat. Chem. Acta.* 2019;92:69-77.
176. Bouchaala M, Ramdani M, Chalard P, Figueredo G, Lograda T. Chemical Composition, Antibacterial Activity and Chromosome Number of *Helichrysum italicum* from Algeria. *Int. J. Pharm. Phytoch. Res.* 2016;8:1675-83.
177. Bianchini A, Santoni F, Paolini J, Bernardini AF, Mouillot D, Costa J. Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. essential oil. *Chem Biodivers.* 2009;6(7):1014-33.
178. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995;35(1-2):7-20.
179. Lee HP, Zhu X, Casadesus G, Castellani RJ, Nunomura A, Smith MA, et al. Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2010;10(7):1201-8.
180. Hamidpour R. *Rosmarinus Officinalis* (Rosemary): A Novel Therapeutic Agent for Antioxidant, Antimicrobial, Anticancer, Antidiabetic, Antidepressant, Neuroprotective, Anti-Inflammatory, and Anti-Obesity Treatment. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2017;1.
181. Zhang HY. Structure-Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical- Scavenging Antioxidants. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* 2005;1:257-73.
182. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 2000;69:167-74.
183. Mollova S, Fidan H, Antonova D, Bozhilov D, Stanev S, Kostova I, et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *H. italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils. *Turk. J. Agric. For.* 2020;44:371-8.
184. Costa P, Goncalves S, Grosso C, Andrade PB, Valentão P, Bernardo-Gil MG, et al. Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Ind. Crop Prod.* 2012;36:246-56.

185. Stanojević J, Stanojević Lj, Bulatović V, Zvezdanović J, Milenković A, Simonović N, et al. Chemical composition and antioxidant activity of immortelle (*Helichrysum italicum*) (Roth) G. Don) and yarrow (*Achillea millefolium* L.) essential oils. *Adv Technol.* 2022;11(1):93-103.
186. Emami SA, Javadi B, Hassanzadeh MK. Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus communis*. subsp. *hemisphaerica*. and *Juniperus oblonga*. *Pharm. Biol.* 2007;45(10):769-76.
187. Sanchez MC, Larrauri JA, Saura CF. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res. Int.* 1999;32:407–12.
188. Petersen, D. Immortelle essential oil and extract: Are two preparations better than one? *J. Am. Herb. Guild.* 2015;13:21–7.
189. Borghetti GS, Knorst MT. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2006;42(4):531-7.
190. Hovaneţ M-V, Ozon EA, Moroşan E, Şeremet OC, Oprea E, Geană E-I, et al. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effects of a Newly Developed Ointment Containing Jujube Leaves Extract. *Life.* 2022; 12(12):1947.
191. Schramm GA. *Practical Approach to Rheology and Rheometry*, 2nd Ed., Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe, Germany. 2020.
192. Rahman1 NSA, Qader A, Sukmasari S, Ismail AF, Doolaanea AA. Rheological characterization of different gelling polymers for dental gel formulation. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2017;9(12):2633-40.
193. Orţan A, Dinu-Pîrvu C, Ghica MV, Popescu LM, Ioniţă L. Rheological study of a liposomal hydrogel based on carbopol. *Rom. Biotechnol. Lett.* 2011;16:47–54.
194. Ghica MV, Popa L, Moisescu Ş. Evaluation of some rheological parameters for sodium carboxymethylcellulose topical hydrogels with indomethacin. *Farmacia.* 2007;55:671–9.
195. Ghica MV, Albu MG, Coară G, Dinu-Pîrvu C. The influence of crosslinking agent on kinetic release and rheological behaviour of some collagen-niflumic acid hydrogels. *Proceedings of the 4th International Conference on Advanced Materials Systems (ICAMS)*, Bucharest, Romania. 267–72.
196. Khanbanha N, Atyabi F, Taheri A, Talaie F, Mahbod M, Dinarvand R. Healing efficacy of an EGF impregnated triple gel based wound dressing: in vitro and in vivo studies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:493732.
197. Rao MA. *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods*. Food Engineering Series. Boston, Springer Science+Business Media, 3rd edition, 2014.113-247.
198. Ali AM. Acute skin irritation, acute and sub-acute oral toxicity studies of *Rosmarinus officinalis* essential oils in mice and rabbit. *AJPP.* 2018;12(26):389-96.
199. Steiling W. Safety evaluation of cosmetic ingredients regarding their skin sensitization potential. *Cosmetics.* 2016;3(2):14.
200. Che Soh N', Rapi HS, Mohd Azam NS, Santhanam RK, Assaw S, Haron MN, et al. Acute Wound Healing Potential of Marine Worm, *Diopatra claparedii* Grube, Aqueous Extract on Sprague Dawley Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:6688084.
201. Basketter D, Jírova D, Kandárová H. Review of skin irritation/corrosion hazards on the basis of human data: A regulatory perspective. *Interdiscip. Toxicol.* 2012;5:98–104.
202. Novak-Bilić G, Vučić M, Japundžić I, Meštrović-Štefekov J, Stanić-Duktaj S, Lugović-Mihić L. Irritant and allergic contact dermatitis—Skin lesion characteristics. *Acta Clin. Croat.* 2018;57:713–20.
203. Wang J, Li Z, Sun F, Tang S, Zhang S, Lv P, Li J, Cao X. Evaluation of dermal irritation and skin sensitization due to vitacoxib. *Toxicol Rep.* 2017;4:287-90.

204. Meynadier B et al. The cutaneous effects of the common concretes and absolutes used in the perfume industry. In: The antimicrobial/biological activity of essential oils. Allured, Carol Stream, Illinois. 2005. 10-23.
205. Kang HS, Lee JY, Kim CJ. Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*. *J Ethnopharmacol*. 2008;116(2):305-12.
206. Bhukya B, Anreddy RNR, William CM, Gottumukkala KM. Analgesic and anti-inflammatory activities of leaf extract of *Kydia calycina* Roxb. *Bangladesh J. Pharmacol*. 2009;4(2):101-4.
207. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):331-8.
208. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544-7.
209. Murray AR, Kisin E, Castranova V, Kommineni C, Gunther MR, Shvedova AA. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. *Chem Res Toxicol*. 2007;20(12):1769-77.
210. Huang MH, Huang SS, Wang BS, Wu CH, Sheu MJ, Hou WC, Lin SS, Huang GJ. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):743-50.
211. Kumar S, Kumar D, Manjusha, Saroha K, Singh N, Vashishta B. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharm*. 2008;58(2):215-20.
212. Yu M, Zheng X, Witschi H, Pinkerton KE. The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants. *Toxicol Sci*. 2002;68(2):488-97.
213. Ben Khedir S, Mzid M, Bardaa S, Moalla D, Sahnoun Z, Rebai T. In Vivo Evaluation of the Anti-Inflammatory Effect of *Pistacia lentiscus* Fruit Oil and Its Effects on Oxidative Stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:6108203.
214. Moon PD, Choi IS, Go JH, Lee BJ, Kang SW, Yoon S, et al. Inhibitory effects of BiRyuChe-bang on mast cell-mediated allergic reactions and inflammatory cytokines production. *Am J Chin Med*. 2013;41(6):1267-82.
215. Nam SY, Chung CK, Seo SY, Rah HM, Kim HK, Jeong HJ. The therapeutic efficacy of α -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. *Int. Immunopharmacol*. 2014;23:273-82.
216. Dragomanova S, Tancheva L, Georgieva M, Klisurov R. Analgesic and anti-inflammatory activity of monoterpenoid Myrtenal in rodents. *J IMAB*. 2019;25:2406-13.
217. Kim DS, Lee HJ, Jeon YD, Han YH, Kee JY, Kim HJ, et al. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chin Med*. 2015;43:731-42.
218. Rufino AT, Ribeiro M, Judas F, Salgueiro L, Lopes MC, Cavaleiro C, et al. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: structural and enantiomeric selectivity. *J Nat Prod*. 2014;77:264-9.
219. El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Doukkali Z, Boudida EH, Touati D, et al. Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulata* L. *J Tradit Complement Med*. 2016;7(3):281-7.
220. Li XJ, Yang YJ, Li YS, Zhang WK, Tang HB. α -Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. *J Ethnopharmacol*. 2016;179:22-6.

221. Vircheva S, Nenkova G, Georgieva A, Alexandrova A, Tzvetanova E, Mateeva P, et al. Effects of desipramine on the antioxidant status in rat tissues at carrageenan-induced paw inflammation. *Cell Biochem Funct.* 2012;30(1):18-23.
222. Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Front Plant Sci.* 2015;6:69.
223. Boarescu I, Boarescu PM, Pop RM, Boçşan IC, Gheban D, Râjnoveanu RM, et al. Curcumin Nanoparticles Enhance Antioxidant Efficacy of Diclofenac Sodium in Experimental Acute Inflammation. *Biomedicines.* 2021;10(1):61.
224. Zouari Bouassida K, Makni S, Tounsi A, Jlaiel L, Trigui M, Tounsi S. Effects of *Juniperus phoenicea* Hydroalcoholic Extract on Inflammatory Mediators and Oxidative Stress Markers in Carrageenan-Induced Paw Oedema in Mice. *Biomed Res Int.* 2018;2018:3785487.
225. Dapkevicius A, van Beek TA, Lelyveld GP, van Veldhuizen A, de Groot A, Linsen JP, et al. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *J Nat Prod.* 2002;65(6):892-6.
226. Baik JS, Kim SS, Lee JA, Oh TH, Kim JY, Lee NH, et al. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(1):74-9.
227. Orhan I, Küpeli E, Aslan M, Kartal M, Yesilada E. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L. *J Ethnopharmacol.* 2006;105(1-2):235-40.
228. Liu X, Sun Z, Zhang M, Meng X, Xia X, Yuan W, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Carbohydr Polym.* 2012;90(4):1664-70.
229. Kim JY, Oh TH, Kim BJ, Kim SS, Lee NH, Hyun CG. Chemical composition and anti-inflammatory effects of essential oil from *Farfugium japonicum* flower. *J Oleo Sci.* 2008;57(11):623-8.
230. Kour H, Raina R, Verma PK, Khan AM, Bhat MA, Nashiruddullah N. Evaluation of the wound healing activity of ethanolic extract of *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. rhizome with excision wound model in Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2021;281:114527.
231. Stan D, Tanase C, Avram M, Apetrei R, Mincu NB, Mateescu AL, et al. Wound healing applications of creams and "smart" hydrogels. *Exp Dermatol.* 2021;30(9):1218-32.
232. Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nussbaum M, et al. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value Health.* 2018;21(1):27-32.
233. Quazi A, Patwekar M, Patwekar F, Mezni A, Ahmad I, Islam F. Evaluation of Wound Healing Activity (Excision Wound Model) of Ointment Prepared from Infusion Extract of Polyherbal Tea Bag Formulation in Diabetes-Induced Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022;2022:1372199.
234. Deng L, Du C, Song P, Chen T, Rui S, Armstrong DG, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:8852759.
235. Kazemi M, Mohammadifar M, Aghadavoud E, Vakili Z, Aarabi MH, Talaei SA. Deep skin wound healing potential of lavender essential oil and licorice extract in a nanoemulsion form: Biochemical, histopathological and gene expression evidences. *J Tissue Viability.* 2020;29(2):116-24.
236. Rivas da Silva AC, Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules.* 2012;17(6):6305-16.

237. Dzamic AM, Mileski KS, Ciric AD, Ristic MS, Sokovic MD, Marin PD. Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oil and deodorized extracts of *H. italicum* (Roth) G. Don. *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 2019;22:493–503.
238. Addis R, Cruciani S, Santaniello S, Bellu E, Sarais G, Ventura C, et al. Fibroblast Proliferation and Migration in Wound Healing by Phytochemicals: Evidence for a Novel Synergic Outcome. *Int J Med Sci*. 2020;17(8):1030-42.
239. Mazutti da Silva SM, Rezende Costa CR, Martins Gelfuso G, Silva Guerra EN, de Medeiros Nóbrega YK, Gomes SM, et al. Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) Leaves. *Molecules*. 2018;24(1):2.
240. Salas-Oropeza J, Jimenez-Estrada M, Perez-Torres A, Castell-Rodriguez AE, Becerril-Millan R, Rodriguez-Monroy MA, et al. Wound Healing Activity of α -Pinene and α -Phellandrene. *Molecules*. 2021;26:2488.
241. Caetano GF, Fronza M, Leite MN, Gomes A, Frade MA. Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis. *Pharm Biol*. 2016;54(11):2555-9.
242. Murthy S, Gautam MK, Goel S, Purohit V, Sharma H, Goel RK. Evaluation of in vivo wound healing activity of *Bacopa monniera* on different wound model in rats. *Biomed Res Int*. 2013;2013:972028.
243. Yadav E, Yadav P, Verma A. In silico study of *Trianthema portulacastrum* embedded iron oxide nanoparticles on glycogen synthase kinase-3 β : A possible contributor to its enhanced in vivo wound healing potential. *Front. Pharmacol*. 2021;12:664075.
244. Ponrasu T, Jamuna S, Mathew A, Madhukumar KN, Ganeshkumar M, Iyappan K, et al. Efficacy of L-proline administration on the early responses during cutaneous wound healing in rats. *Amino Acids*. 2013;45:179–89.
245. Ahmad M, Sultana M, Raina R, Pankaj NK, Verma PK, Prawez S. Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Wound Healing Potential of Quercetin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pharmacogn Mag*. 2017;13:S633-S639.
246. Chen LY, Cheng HL, Kuan YH, Liang TJ, Chao YY, Lin HC. Therapeutic Potential of Luteolin on Impaired Wound Healing in Streptozotocin-Induced Rats. *Biomedicines*. 2021;9(7):761.
247. Peng X, Xu J, Tian Y, Liu W, Peng B. Marine fish peptides (collagen peptides) compound intake promotes wound healing in rats after cesarean section. *Food Nutr Res*. 2020;64.
248. Mukherjee D, Banthia AK. Preparation of adrenochrome hydrogel patch, gel, ointment, and the comparison of their blood coagulating and wound healing capability. *Mater. Manuf. Process*. 2006;21:297–301.
249. Serra MB, Barroso WA, da Silva NN, Silva SDN, Borges ACR, Abreu IC, et al. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *Int J Inflamm*. 2017;2017:3406215.
250. Wagner W, Wehrmann M. Differential cytokine activity and morphology during wound healing in the neonatal and adult rat skin. *J Cell Mol Med*. 2007;11(6):1342-51.
251. Sato Y, Ohshima T, Kondo T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265(1):194-9.
252. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12):2085.
253. Al-Dhuayan I, Kotb E, Alqosaibi A, Mahmoud A. Histological studies on a newly isolated *Bacillus subtilis* D10 protease in the debridement of burn wound eschars using mouse model. *Pharmaceutics*. 2021;13:923.

-
254. Dorjsembe B, Lee HJ, Kim M, Dulamjav B, Jigjid T, Nho CW. *Achillea asiatica* extract and its active compounds induce cutaneous wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 2017;206:306–14.
255. Yadav E, Singh D, Yadav P, Verma A. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Prosopis cineraria* based phenolic rich ointment in wound healing. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:1572-83.
256. Ud-Din S, Wilgus TA, McGeorge DD, Bayat A. Pre-emptive priming of human skin improves cutaneous scarring and is superior to immediate and delayed topical anti-scarring treatment post-wounding: A double-blind randomised placebo-controlled clinical trial. *Pharmaceutics.* 2021;13:510.

БИОГРАФИЈА

Мр фарм. Маријана Анђић рођена је 10.09.1993. у Крагујевцу, Република Србија. Основну школу „Свети Сава“ и Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршила је у Крагујевцу. Интегрисане академске студије фармације је на Факултету медицинских наука уписала школске 2012/2013, а дипломирала у јулу 2017. године и стекла звање магистар фармације. Након завршених студија обавила је обавезан приправнички стаж и положила стручни испит пред комисијом Министарства здравља 2018. године.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2017/2018. године и од тада се активно бави научно истраживачким радом у Центру за експериментална и претклиничка истраживања којим руководи проф. др Владимир Јаковљевић. Од септембра 2017. ангажована је као фацилитатор на Факултету медицинских наука, за ужу научну област Фармацеутска технологија. Априла 2019. године изабрана је у звање сарадника у настави, а од фебруара 2020. добија звање асистента за ужу научну област Фармацеутска технологија. Школске 2020/2021 уписала је специјалистичке студије из здравствене области Фармацеутска технологија.

Аутор је 30 оригиналних научних радова објављених у часописима индексираним на SCI листи, и 4 публикације категорије М51. Учесник је бројних националних и интернационалних конгреса.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Андјић М**, Draginić N, Kočović A, Jeremić J, Vučićević K, Jeremić N, Krstonošić V, Božin B, Kladar N, Čapo I, Andrijević L, Pecarski D, Bolevich S, Jakovljević V, Bradić J. Immortelle essential oil-based ointment improves wound healing in a diabetic rat model. *Biomed Pharmacother.* 2022; 150:112941.
2. **Андјић М**, Božin B, Draginić N, Kočović A, Jeremić JN, Tomović M, Milojević Šamanović A, Kladar N, Čapo I, Jakovljević V, Bradić JV. Formulation and Evaluation of Helichrysum italicum Essential Oil-Based Topical Formulations for Wound Healing in Diabetic Rats. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021. 14(8):813
3. Bradić J, **Андјић М***, Novaković J, Kocović A, Tomović M, Petrović A, Nikolić M, Mitrović S, Jakovljević V, Pecarski D. Lady's Bedstraw as a Powerful Antioxidant for Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Antioxidants.* 2023; 12(6):1277.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

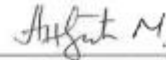
„Развој топикалних формулација на бази етарског уља смиља (*Helichrysum italicum*) и испитивање њиховог потенцијала у третману рана и инфламације“

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 14.02.2024. године,



потпис аутора

Образац 2

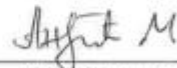
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Развој топикалних формулација на бази етарског уља смиља (*Helichrysum italicum*) и испитивање њиховог потенцијала у третману рана и инфламације“

истоветне.

У Крагујевцу, 14.02.2024. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маријана Анђић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Развој топикалних формулација на бази старског уља смиља (*Helichrysum italicum*) и испитивање њиховог потенцијала у третману рана и инфламације“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

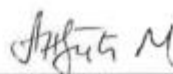
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 14.02.2024. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>