



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милица Б. Николић

**Развој дерматолошких препарата на бази
етарског уља сибирског бора (*Pinus sibirica*) и
испитивање њиховог потенцијала у третману
рана**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Milica B. Nikolić

**Development of dermatological preparations based
on essential oil of Siberian pine (*Pinus sibirica*) and
examination of their potential in the treatment of
wounds**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Милица Николић
Датум и место рођења: 16.07.1994. Смедерево, Република Србија
Садашње запослење: Крка фарм д.о.о. Београд
Докторска дисертација
Наслов: Развој дерматолошких препарата на бази старског уља сибирског бора (<i>Pinus sibirica</i>) и испитивање њиховог потенцијала у третману рана
Број страница: 94
Број: 1 слика, 13 табела, 14 фигура
Број библиографских података: 171
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: Доц. др Аница Петровић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Одлука бр. IV-03-681/35 од 14.09.2023.

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Milica Nikolić
Date and place of birth: July 16 th , 1994., Smederevo, Republic of Serbia
Current employment: Krka farm d.o.o. Belgrade
Doctoral Dissertation
Title: Development of dermatological preparations based on essential oil of Siberian pine (<i>Pinus sibirica</i>) and examination of their potential in the treatment of wounds
No. of pages: 94
No. of images: 1, tables:13, figures: 14
No. of bibliographic data: 171
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): Medical Sciences
Mentor: Ass. Prof. Anica Petrović, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Topic Application Date: May 19 th , 2023.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic:
Decision No: IV-03-681/35, date September 14 th , 2023.

ЗАХВАЛНИЦА

Овом приликом желим да изразим најискренију захвалност свима који су ми били неизмерна подршка и инспирација током мог докторског пута. Првенствено, моја бескрајна захвалност иде мојој изузетној менторки, доц. др Аници Петровић на указаном поверењу, неуморном охрабривању и вери у мене. Ваша безусловна подршка и посвећеност мом академском развоју представљају темељ мог успеха, на чему ћу Вам заувек бити захвална. Ваша мудрост и љубазност остају за мене вечна инспирација.

Такође, искрено захваљујем проф. др Владимиру Јаковљевићу чија вера у моје способности, као и његова спремност да увек пружи помоћ, били су кључни у сваком кораку овог изазовног пута. Његова стручност и посвећеност знатно су обогатили овај рад и учинили сваки тренутак вредним.

Не могу а да не изразим захвалност и свим мојим колегама: др Александру Кочовићу, проф. др Јовани Брадић, др Маријани Анђић, проф. др Марији Томовић, доц. др Анђели Милојевић Шамановић, проф. др Ивану Чапу, проф. др Небојши Кладару, проф. др Вељку Крстоношићу на огромној помоћи при спровођењу експерименталног дела овог рада. Њихова стручност и несебична помоћ учинили су овај пут незаборавним.

Посебну, дубоку и топлу захвалност упућујем мојој породици, чија љубав, разумевање и подршка чине основу сваког успеха. Хвала мојој мајци, оцу, деди, баби и брату, који су увек били уз мене. Хвала Александру, Ивани, као и свим пријатељима који су ми својим осмехом и охрабрењем у сваком тренутку били ослонац и извор радости.

„Снага није у томе да никада не паднемо, већ у томе да се сваки пут подигнемо.“

Хвала вам што сте били део мог путовања и што сте ми помогли да постанем боља и храбрија сваког дана!

САЖЕТАК

Зарастање хроничних рана представља значајан терапијски изазов, посебно код пацијената са дијабетесом, због нарушене регенеративне способности ткива. Ово истраживање је имало за циљ развој, испитивање безбедности и ефикасности нових топикалних формулација (маст и гел) на бази етарског уља сибирског бора (*Pinus sibirica*) у концентрацији од 0,5%, у процесу зарастања рана. Анализа састава етарског уља сибирског бора потврдила је присуство монотерпена, међу којима су најзаступљенији α -пинен, β -пинен и δ -карен. Испитивањем антиоксидативног потенцијала, уље је показало изражену *in vitro* антиоксидативну активност. Стабилност препарата потврђена је током шестомесечног чувања, а безбедност је потврђена тестом акутне дермалне иритације. Формулације су испитиване у ексцизионом моделу рана код дијабетичних *Wistar albino* пацова, који су били подељени у шест група. Током тронедељног третмана, формулације са етарским уљем сибирског бора показале су значајну ефикасност у убрзавању зарастања, што је потврђено већим процентом смањења површине ране и повећаном концентрацијом укупног хидроксипролина. Хистопатолошка анализа је потврдила да су ове промене праћене побољшаном реепителизацијом и регенерацијом ткива. Третман препаратима са етарским уљем сибирског бора допринео је бржем зарастању, смањењу оксидативног стреса и повећању активности антиоксидантних ензима. Топикалне формулације су инхибирале инфламаторни одговор изазван карагенаном. Ови резултати указују на то да терапеутски ефекти препарата са етарским уљем сибирског бора проистичу из њихових антиоксидативних и антиинфламаторних својстава, чинећи их перспективним за зарастање рана, посебно код оболелих од дијабетеса.

Кључне речи: *Pinus sibirica*; етарско уље; зарастање рана; инфламација; оксидациони стрес.

ABSTRACT

The healing of chronic wounds represents a significant therapeutic challenge, especially in diabetic patients, due to impaired tissue regenerative capacity. This study aimed to develop, investigate the safety and efficacy of new topical formulations (ointment and gel) based on Siberian pine essential oil (*Pinus sibirica*) at a concentration of 0.5%, in the wound healing process. Analysis of the composition of Siberian pine essential oil confirmed the presence of monoterpenes, among which α -pinene, β -pinene and δ -carene are the most abundant. Investigation of its antioxidant potential, the oil showed a pronounced *in vitro* antioxidant activity. The stability of the preparation was confirmed during six months of storage, and the safety was confirmed by an acute dermal irritation test. The formulations were tested in an excision wound model in diabetic Wistar albino rats, which were divided into six groups. During the three-week treatment, formulations containing Siberian pine essential oil showed significant efficacy in accelerating healing, as confirmed by a higher percentage of wound surface reduction and an increased concentration of total hydroxyproline. Histopathological analysis confirmed that these changes were accompanied by improved re-epithelialization and tissue regeneration. Treatment with Siberian pine essential oil formulations contributed to faster healing, reduced oxidative stress, and increased antioxidant enzyme activity. Topical formulations inhibited the inflammatory response induced by carrageenan. These results indicate that the therapeutic effects of preparations containing Siberian pine essential oil are due to their antioxidant and anti-inflammatory properties, making them promising candidates for wound healing treatment, especially in diabetes.

Key words: *Pinus sibirica*; essential oil; wound healing; inflammation; oxidative stress.

Садржај:

I	УВОД.....	1
1.1.	<i>Pinus sibirica</i>	2
1.1.1.	Опште карактеристике	2
1.1.2.	Етимологија и таксономија сибирског бора.....	2
1.1.3.	Распрострањеност.....	2
1.1.4.	Хемијски састав	3
1.1.5.	Терпени	3
1.1.6.	Фенолна и полифенолна једињења	4
1.1.7.	Киселине	7
1.1.8.	Масне киселине	7
1.1.9.	Протеини.....	8
1.1.10.	Остала биоактивна једињења присутна у <i>Pinus sibirica</i>	8
1.1.11.	Етарско уље	10
1.1.12.	Традиционална употреба сибирског бора	10
1.1.13.	Фармаколошки ефекти	10
1.1.14.	Антитуморски ефекат.....	11
1.1.15.	Хипогликемијски ефекат.....	11
1.1.16.	Утицај на апетит и регулацију телесне масе	11
1.1.17.	Утицај на централни нервни систем.....	12
1.1.18.	Дерматолошки ефекти.....	12
1.1.19.	Ефекти на остале системе органа.....	13
1.1.20.	Антимикробни ефекат сибирског бора.....	13
1.1.21.	Антиоксидациони ефекат сибирског бора.....	13
1.1.22.	Антиинфламацијски ефекат сибирског бора.....	14
1.2.	Ране	14
1.2.1.	Класификација рана.....	14
1.2.2.	Патофизиологија зарастања рана.....	15
1.2.3.	Компликације рана	18
1.2.4.	Веза између рана и дијабетес мелитуса	18
1.2.5.	Принципи лечења рана код пацијената са дијабетесом	19
1.3.	Улога лековитог биља у инфекцији	20
1.4.	Улога лековитог биља у инфламацији.....	20
1.5.	Улога лековитог биља у оксидационом стресу и дијабетесу	21
II	ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ	22
III	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	24
3.1.	Дизајн студије.....	25

3.2.	Етарско уље сибирског бора	25
3.2.1.	Добијање и хемијска карактеризација	25
3.2.2.	Антиоксидациони потенцијал.....	25
3.2.3.	Испитивање потенцијала етарског уља сибирског бора да неутралише DPPH радикал	26
3.2.4.	Испитивање потенцијала етарског уља сибирског бора да неутралише хидроксил радикал	26
3.2.5.	Испитивање потенцијала етарског уља сибирског бора да инхибира липидну пероксидацију.....	27
3.2.6.	Испитивање редукционог потенцијала етарског уља сибирског бора FRAP методом	28
3.3.	Дермалне формулације са етарским уљем сибирског бора	28
3.3.1.	Израда получврстих формулација са етарским уљем сибирског бора..	28
3.3.2.	Карактеризација получврстих дермалних формулација.....	29
3.3.3.	Органолептичка испитивања	30
3.3.4.	Способност прања	30
3.3.5.	Тест центрифугирања.....	30
3.3.6.	рН вредност и електрична проводљивост	30
3.3.7.	Реолошка испитивања	31
3.4.	Безбедност и ефикасност топикалних формулација са етарским уљем сибирског бора	31
3.4.1.	Акутна дермална иритација	32
3.4.2.	Испитивање антиинфламацијског ефекта	33
3.4.3.	Ефикасност у зарастању рана	36
3.5.	Снага студије и величина узорка	41
3.6.	Статистичка обрада података.....	41
IV	РЕЗУЛТАТИ	43
4.1.	Хемијски састав етарског уља сибирског бора	44
4.2.	Антиоксидациона активност етарског уља сибирског бора	46
4.3.	Анализа топикалних формулација.....	47
4.3.1.	Органолептичка испитивања	47
4.3.2.	Способност прања	47
4.3.3.	Тест центрифугирања.....	48
4.3.4.	Испитивање проводљивости и рН вредности	48
4.3.5.	Реолошке особине топикалних формулација.....	48
4.4.	Акутна дермална иритација	50

4.5.	Испитивање антиинфламацијског потенцијала топикалних формулација	50
4.5.1.	Мерење дебљине шапе пацова	51
4.5.2.	Параметри оксидационог стреса у хомогенату шапе пацова	52
4.6.	Зарастање рана	53
4.6.1.	Брзина зарастања рана	53
4.6.2.	Параметри оксидационог стреса из крви	55
4.6.3.	Садржај хидроксипролина	57
4.6.4.	Хистолошка и имунохистохемијска анализа	58
V ДИСКУСИЈА		62
5.1.	Карактеризација етарског уља сибирског бора	64
5.1.1.	Хемијски састав етарског уља	64
5.1.2.	Антиоксидациона активност етарског уља	65
5.2.	Формулисање и стабилност препарата на бази етарског уља сибирског бора	67
5.3.	Безбедност и ефикасност топикалних препарата на бази етарског уља сибирског бора	69
5.3.1.	Акутна дермална иритација	69
5.3.2.	Антиинфламацијски ефекат топикалних препарата са етарским уљем сибирског бора	70
5.3.3.	Ефикасност дермалних препарата на бази етарског уља сибирског бора у терапији зарастања рана	74
VI ЗАКЉУЧЦИ		81
VII ЛИТЕРАТУРА		83

I

УВОД

1. Увод

1.1. *Pinus sibirica*

1.1.1. Опште карактеристике

Pinus sibirica (*P. sibirica*, сибирски бор) је вишегодишње четинарско дрво из породице *Pinaceae*. Зимзелено дрво сибирског бора достиже висину од 35-40 m, док пречник стабла може достићи дужину од 1,8 m. Иглице (четине) су тамно зелене боје, дужине од 6-13 cm и налазе се у групици од пет у фасцикуларном камбијуму. Ширина женских цвасти (шишарке) може бити између 6 и 8 cm, док дужина може достићи 12 cm. Шишарке се налазе у групи од 2-5 на крају добро осветљених гранчица и у почетку су плаво-љубичасте боје, која касније прелази у браон боју. Опрашивање почиње у априлу, а семе сазрева у септембру наредне године. Семе је жуто браон боје, овалног облика, благо избочено, просечне дужине 10-14 mm и ширине 5-7 mm (1).

Сибирски бор има значајну улогу у одржавању екосистема и дугогодишњу примену у народној медицини. Разни делови ове биљне врсте, попут иглица, семена, смоле због разноврсног хемијског састава имају широку примену у лечењу различитих обољења. Зрело семе, у Русији познато и као кедров орах (руски: Кедровый орех), има веома добру нутритивну вредност и користи се у исхрани и за добијање јестивог уља (2). Етарско уље сибирског бора има дугу традицију и улази у састав бројних тинктура и мелема који су показали високу ефикасност у лечењу разних обољења (3).

1.1.2. Етимологија и таксономија сибирског бора

Назив ове биљне врсте, *Pinus sibirica* потиче од назива рода: *Pinus* (бор), и места где је највише распрострањен: Сибир. Род *Pinus* обухвата више од 100 врста борова који су подељени у два подрода: *Pinus* (тврди борови) и *Strobus* (меки борови). Заједно са врстама *Pinus cembra* (Швајцарски бор) и *Pinus koraiensis* (Корејски бор), сибирски бор припада подроду *Strobus* (4). Раније су борови у народу називани јелама и кедровима, што по таксономији није тачно али су се такви називи у неким подручјима задржали и до данас. Тако је и сибирски бор у народу познат као сибирски кедр (руски: Сибирский кедр) или само кедр.

1.1.3. Распрострањеност

Сибирски бор формира густе шуме у равничарским пределима, влажног земљишта дуж великих сибирских река и на планинама до надморске висине од 1000-2400 m. Добро подноси екстремне услове и јако ниске температуре. Пореклом је са територије Евроазијског континента где претежно настањује Сибир, Урал, Алтај планине, северне делове Монголије, Кине и Казахстана. Протеже се од 66° 25'- 46° 40' северне географске ширине и 49° 40'-127° 20' источне географске дужине (5). Одатле је пренет и успешно се узгаја на хладним подручјима североисточне Европе (1).

Табела 1. Таксономске карактеристике сибирског бора

Таксономска категорија	Таксони
Царство	Plantae
Раздео	Pinophyta
Класа	Pinopsida
Ред	Pinales
Фамилија	Pinaceae
Род	<i>Pinus</i>
Подрод	<i>Strobus</i>
Врста	<i>Pinus sibirica</i>

1.1.4. Хемијски састав

Хемијски састав сибирског бора је интензивно проучаван 70-их година прошлог века, када су откривени бројни секундарни биљни метаболити који имају велики потенцијал у терапији одређених обољења. Сибирски бор је протекле деценије поново у фокусу истраживања због свог састава и бројних фармаколошких ефеката. Фитохемијским анализама је доказано присуство различитих компоненти, као што су: монотерпени, сесквитерпени, фенолна једињења, флавоноиди, танини, моно- и полинезасићене масне киселине, аминокиселине, каротени, полисахариди, витамин Ц, микроелементи (Mn, Fe, Zn, Mo, Cu, Pb) (6,7). На хемијски састав биљне врсте утичу бројни фактори као што су: станиште, климатски услови, старост и стање биљке, као и врста биљног органа (кора, гране, иглице, шишарке, семенке, смола) (8,9).

1.1.5. Терпени

Терпени представљају једну од највећих и најразноврснијих група једињења секундарних метаболита биљака. Иако им је хемијска структура разнолика и могу се јавити у линеарном и цикличном облику, у њиховој основи се налази изопрен који је заједнички за све терпене (10). На основу броја изопренских јединица разликујемо:

- 1) Монотерпене – који садрже две изопренске јединице ($C_{10}H_{16}$)
- 2) Сесквитерпене- који садрже три изопренске јединице ($C_{15}H_{24}$)
- 3) Дитерпене- који садрже четири изопренске јединице ($C_{20}H_{32}$)
- 4) Тритерпене- који садрже шест изопренских јединица ($C_{30}H_{48}$)

Ова неполарна једињења, због свог специфичног мириса имају улогу у одбрани биљака од животиња, инсеката и микроорганизама, али исто тако имају улогу у опрашивању. Ранија испитивања указују на то да су терпени главни састојци етарског уља (ЕУ) сибирског бора. Удео компоненти може да варира у односу на климатске услове, годишње доба, старости и станишта биљке (11). Најзасупљенији су монотерпени којих у шишаркама има 78% а у иглицама око 68%, затим сесквитерпени (око 5% у шишаркама, а 19% у иглицама), док се дитерпени могу наћи у јако малим количинама (7,12).

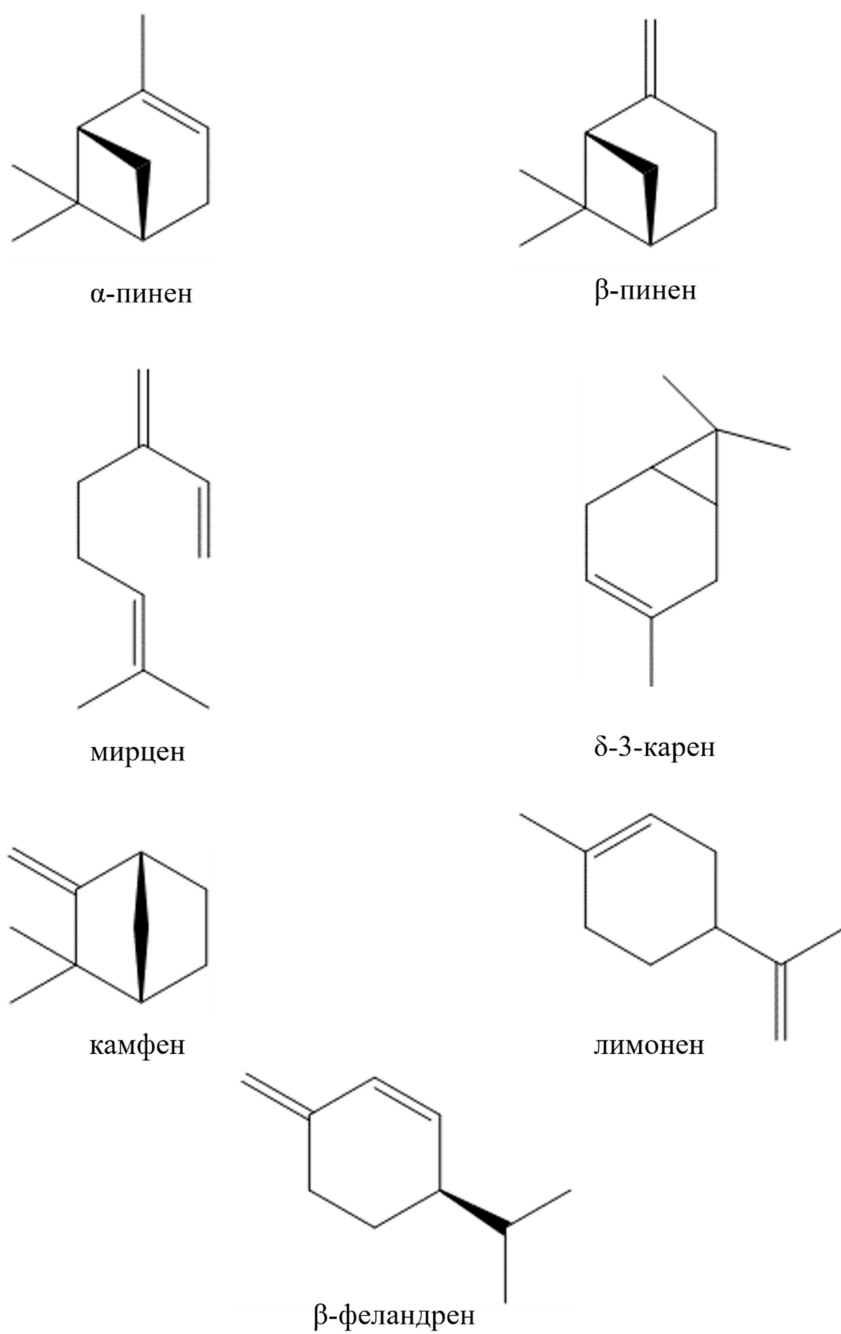
α -пинен, β -пинен, δ -3-карен и β -феландрен су монотерпени који се у највећој количини могу наћи у етарском уљу *P. sibirica* (Фигура 1). У зависности да ли се за

добиање ЕУ користе иглице или гранчице бора разликује се и хемијски састав, што се може видети из досадашњих испитивања састава сесквих терпена као што су β -бисаболен и β -кариофилен чије је присуство доказано у иглицама али не и у гранчицама (6). Цембрен, изоцемброл и цис-абиенол су најзаступљенији дитерпени старског уља (6).

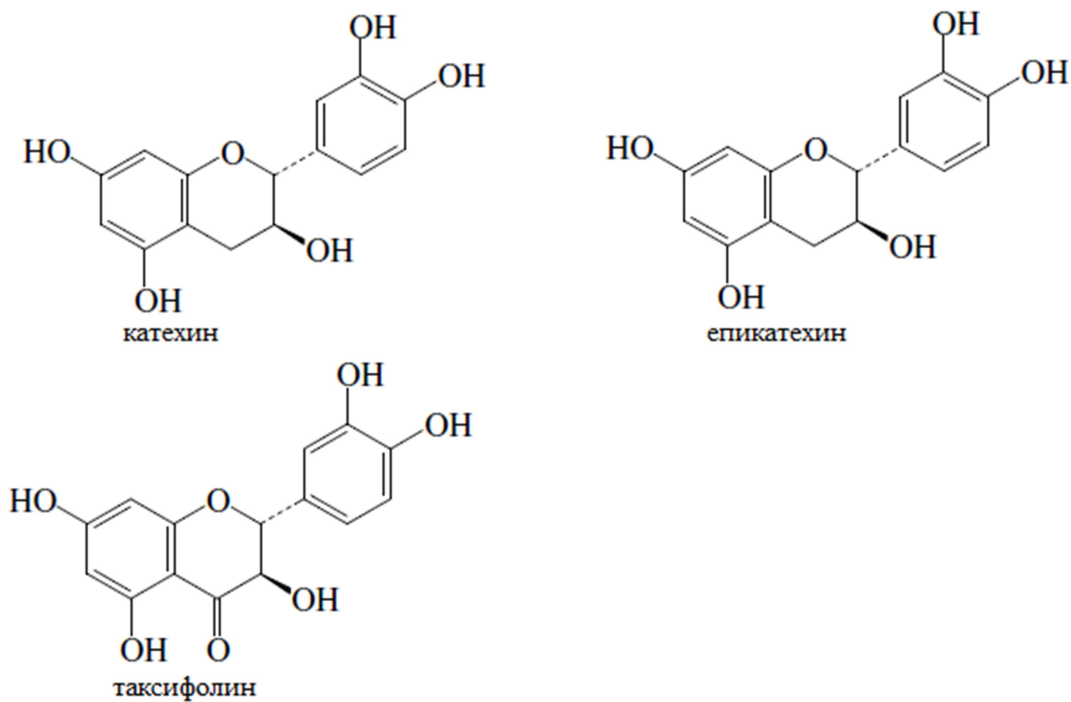
1.1.6. Фенолна и полифенолна једињења

Фенолна и полифенолна једињења су присутна у великом броју биљака и дају им карактеристичну боју, мирис, укус и горчину. Хемијску структуру ових једињења карактерише постојање ароматичног прстена за ког је везана једна или више хидроксилних група. Полифенолна једињења се у природи најчешће налазе везана са једном или више шећерних компоненти при чему формирају гликозиде. Према хемијској грађи могу се поделити на: флавоноиде, фенолне киселине, стилбене и лигнанае. Даље, флавоноиде можемо поделити на: флавоноле, флавоне, флаваноле, изофлаване, флаваноне и антоцијане (13–15). Главна улога ових секундарних метаболита је заштита биљака од штетних утицаја спољашње средине. Због свог изузетног антиоксидационог ефекта фенолна и полифенолна једињења имају широку употребу у превенцији и лечењу бројних обољења (13).

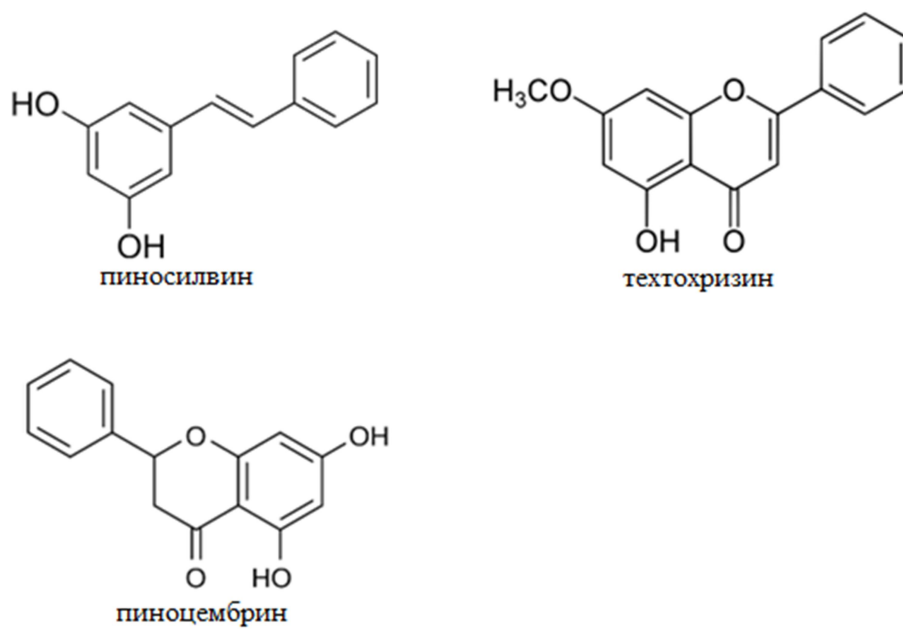
Иако постоји ограничен број студија који у фокусу истраживања има феноле сибирског бора, постоје подаци којима је доказано присуство одређених полифенолних једињења и флавоноида (7,8,16). Катехин, епикатехин и таксифолин су једни од бројних полифенолних једињења добијених екстракцијом пулверизованог семена *P. sibirica* помоћу мешавине раствора ацетона и воде (17). Друга студија се бавила проучавањем етил-ацетатног екстракта дрвета сибирског бора, где су као активне супстанце изоловани пиносилвин, пиноцембрин и тектохризин (18). Хемијске структуре полифенолних једињења су приказане на **Фигури 2.** и **Фигури 3.**



Фигура 1. Структуре најзастпљенијих терпена старског уља *P. sibirica*



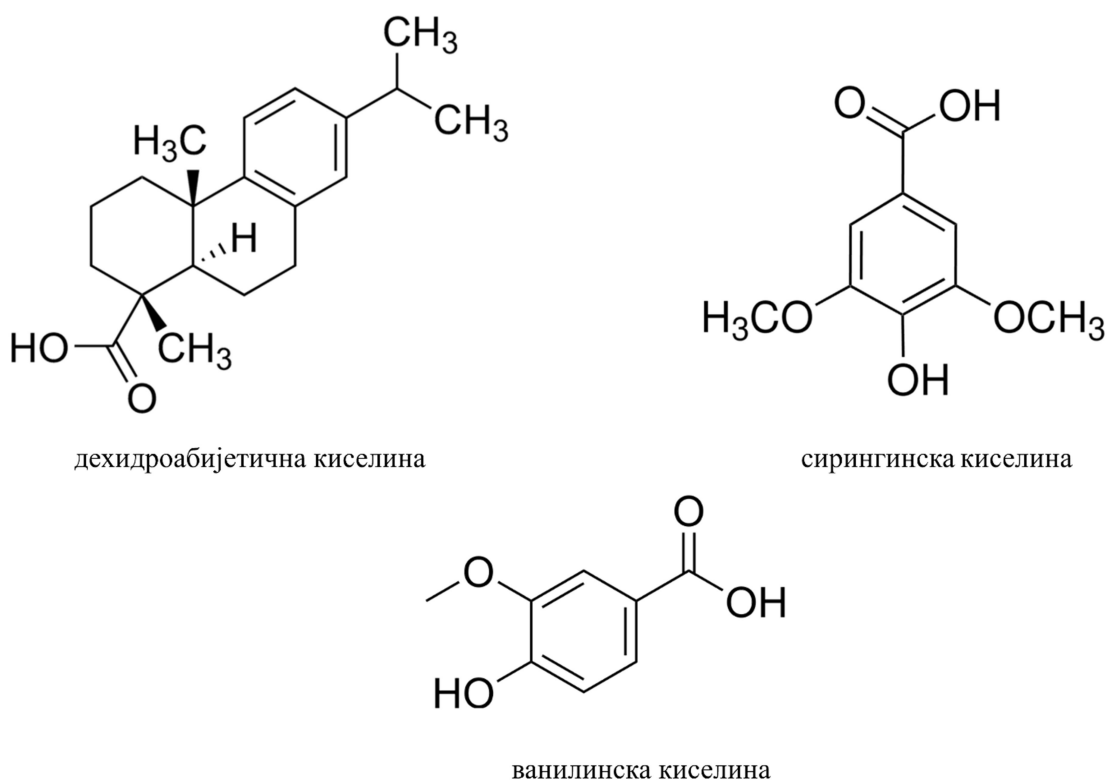
Фигура 2. Полифенолна једињења заступљена у екстракту семена *P. sibirica*



Фигура 3. Полифенолна једињења заступљена у екстракту дрвета *P. sibirica*

1.1.7. Киселине

Киселине које су пронађене у сибирском бору се налазе у слободном облику, у облику гликозида или естара. Испитивањем састава екстракта семена добијеног помоћу раствора ацетона и воде, утврђено је присуство деривата циметне киселине: м-кумаринске и (Е)-циметне киселине; као и деривата бензоеве киселине: протокатехинске, сиригинске и ванилинске киселине (16). Киселине које се могу наћи у екстрактима иглица и гранчица су изокупресинска и 15-О-сукцинилизокупресинска киселина, док се дехидроабијетична и пинусолна налазе у иглицама, а ламбертианске киселина у гранчицама сибирског бора (6). Пинусолна киселина, која спада у лабдански тип дитерпенских киселина је први пут изолована из бора који припада подроду *Strobus*. Хемијске структуре најзаступљенијих киселина су приказане на **Фигури 4**.



Фигура 4. Киселине заступљене у екстракту *P. sibirica*

1.1.8. Масне киселине

Масне киселине су неполарне органске киселине са дугачким угљоводоничним низом. У зависности од типа веза у угљоводоничном ланцу разликујемо засићене масне киселине код којих су присутне једноструке везе и незасићене код којих су присутне двоструке везе. Незасићене масне киселине могу бити мононезасићене (када имају

једну двоструку везу) и полинезасићене (када имају две и више двоструких веза) (19). Најзаступљеније незасићене масне киселине су киселине са 18 угљеникових атома: олеинска (18:1) и линолна киселина (18:2), док су код засићених најдоминантније палмитинска и стеаринска (8). Ова група хемијских једињења има бројне улоге код биљака, учествују у одбрани од различитих биотичких и абиотичких стресова и служе као прекурсори за синтезу бројних алифатичних једињења (20,21).

Количина и однос засићених и незасићених масних киселина знатно варирају у односу на делове биљке из које се изолују, као и годишњег доба и станишта. Калус иглица *P. sibirica* садржи незасићене масне киселине (највише олеинске киселине, 81,7%) и засићене масне киселине (18,4%) од којих је палмитинска киселина (13,5%) доминантна и мале количине миристинске и стеаринске киселине (7). Уље семена садржи γ -линоленску, олеинску и линолну киселину (22,23). Метаболит линолне киселине, пиноленска киселина, која се иначе највећим делом налази у семену се код сибирског бора у већој мери налази у гранчицама, што је потврђено испитивањем екстракта након сапонификације (6).

1.1.9. Протеини

Највећа количина протеина код сибирског бора се налази у семену и износи: 16,33% мерено у односу на суву материју (7). Калус дрвета садржи око 10% протеина, од чега је 63% протеина растворљивих у води молекулске тежине од 33 kD и више (24). Из овога се може закључити да садржај протеина превасходно зависи од биљног органа и методе екстракције.

1.1.10. Остала биоактивна једињења присутна у *Pinus sibirica*

Поред већ наведених хемијских једињења, у биљној врсти *P. sibirica* се могу наћи стероли, витамини и минерали. Фитохемијским испитивањем састава фитостерола у уљу је доказано присуство γ -ситостерола и кемпестерола, док је у иглицама и гранчицама доказано већинско присуство β -ситостерола (6,7,23).

Лабораторијским испитивањима хладно цеђеног уља семена сибирског бора и његовом екстракцијом уз помоћ хексана је утврђено присуство токоферола, од којих су најдоминантнији: γ -токоферол (4,72%) и α -токоферол (8). У иглицама су идентификовани витамин Ц и каротен, као и велики број олигоелемената. Манган и гвожђе се у највећој мери налазе у иглицама и шишаркама, а одмах после њих следе цинк и бакар (7,25). Количине олигоелемената као што су манган, магнезијум, фосфор, калцијум и бројни други зависе од врсте, квалитета земљишта и услова у којима биљка живи.

Табела 2. Приказ најзаступљенијих хемијских састојака у етарском уљу сибирског бора

Хемијске компоненте	Хемијска група	Квантитативни састав етарског уља (%)	
		иглице	гранчице
α -пинен	монотерпени	81,2% (7) 82,9% (27)	14,8% (7)
камфен		1,1% (7) 1,3% (27)	0,1% (7)
β -пинен		2,1% (7) 3,3% (26)	10,7% (7)
δ -3-карен		0,9% (7)	6,0% (7)
мирцен		2,2% (7)	2,3% (7)
лимонен		6,8% (7)	23% (7)
β -феландрен		3,9% (7) 11,9% (27)	37,2% (7)
γ -терпинен		/	1,1% (7)
терпинолен		1,8% (7)	2,1% (7)
борнил ацетат		0,8% (7)	/
β -бисаболен	сесквитерпени	30,76% (7)	/
муролен		13,61% (7)	/
δ -кадинен		3,54% (7)	/
α -лонгипинен		У траговима (7)	/
β -кариофилен		7,50% (7)	
цембрен	дитерпени	26,9% (7)	/
изоцемброл		30,1% (7)	/
катехин	феноли	13,82% (7)	/
ванилинска киселина		1,29% (7)	/
пиноцембрин		Није доступно (7)	/

1.1.11. Етарско уље

Етарско уље иглица сибирског бора (ЕУСБ) је лако испарљива течност која се добија поступком дестилације биљних органа. То је углавном светло жута до безбојна течност на собној температури, јаког, карактеристичног мириса (12). Две велике хемијске класе једињења које чине већински састав етарских уља су терпени и угљоводоници (27). Квалитативни састав зависи од рода и биљне врсте, затим од временских прилика, станишта, годишњег доба и делова биљке који се користе као извори етарских уља (7). Највећа количина ЕУ иглица *P. sibirica* је забележена у периоду септембар-октобар, док је у јуну забележен пад са 2,8% на 1,7% (7). Главни састојци етарског уља су монотерпени, сесквитерпени, дитерпени и феноли.

1.1.12. Традиционална употреба сибирског бора

Због бројних нутритивних и фармаколошких ефеката сибирски бор има дугу, традиционалну употребу како у Русији, тако и на просторима која су природна станишта ове биљне врсте (28). Иако постоји велики број борова чији се пињоли користе у исхрани, када се у Русији каже „Кедровый орех“ мисли се на семе сибирског бора, иако по таксономији није тачан израз он се од давнина користи у народу. Семе сибирског бора и хладно цеђено уље семена улази у састав великог броја традиционалних јела због великог броја хранљивих састојака, а може се користити и као дијететски суплемент или као функционална храна (2). Уље семенки које је богато полинезасићеним масним киселинама и бројним минералима и витаминима је познато по свом благотворном ефекту на метаболизам угљених хидрата, липида због чега се користи у превенцији хипертензије (29–31). Поред интерне примене, уље сибирског бора се може користити екстерно у виду уља за масажу јер побољшава циркулацију и смањује осећај умора. Такође се примењује топикално јер смањује појаву алергијских реакција, помаже у регенерацији коже и додатно је исхрањује и штити (22). Препарати на бази сибирског бора, као што су инфузи се традиционално користе код обољења јетре и бубрега, док декокти имају примену код реуматизма и артритиса (12,16,23). Етарско уље, због специфичног мириса има широку употребу у козметичкој индустрији где улази у састав перфема. Поред овога, ЕУ има бројне фармаколошке ефекте који помажу у одржавању оралне хигијене и доприносе побољшању процеса зарастања рана (9).

1.1.13. Фармаколошки ефекти

Употреба сибирског бора у традиционалној медицини је подстакла многе истраживаче да почну са спровођењем истраживања у циљу потврђивања биолошких активности. Иако постоји ограничен број студија које се баве биолошким ефектима сибирског бора не може се оспорити његова ефикасност, али исто тако се не могу издвојити конкретне индикације за његову примену. Разноврстан фитохемијски састав доприноси бројним активностима као што су: антиинфламацијска, антимикробна, антиоксидациона.

1.1.14. Антитуморски ефекат

Испитивања на пољу антитуморског дејства су рађена само на ћелијском нивоу али не и на *in vivo* моделу. У неким од њих се наводи цитотоксичан ефекат сибирског бора на HEPA-1 ћелијској линији (32). За разлику од претходно наведене студије која је проучавала хидрофилни екстракт дрвета, друга студија је испитивала екстракт семена сибирског бора на SH-SY5Y ћелијској линији неуробластома. Такође, екстракт је показао позитиван ефекат изазивајући некрозу и смањење ћелијске виталности (16).

1.1.15. Хипогликемијски ефекат

Пиноленска киселина, која је у високом проценту заступљена у уљу сибирског бора, остварује значајан ефекат на ниво глукозе у крви. Истраживање на мишевима је показало да се оралном применом уља семена постиже снажан хипогликемијски ефекат пола сата након примене (33). Иста студија је проучавањем на HEK 293T (људски ембрионални бубрег) ћелијској линији покушала да докаже везу између рецептор слободних масних киселина 1 (FFA1) и рецептор слободних масних киселина 4 (FFA4) рецептора са нивоом глукозе и потенцијалног утицаја на метаболичке болести. Утврђено је да агонистичким деловањем пиноленске киселине долази до активације ових рецептора што резултује повећањем секреције инсулина и повећањем инсулинске осетљивости (33). Такође, постоји студија која потврђује да α -пинен значајно доприноси смањењу нивоа глукозе у крви наташте, при чему је овај ефекат евидентан након 2 и 24 сата од примене (34).

1.1.16. Утицај на апетит и регулацију телесне масе

У последњих неколико година уље семена сибирског бора је у фокусу истраживања због свог повољног утицаја на регулацију телесне масе и смањења апетита. Испитивањем ових ефеката на пацовима је утврђено да применом уља долази до боље контроле ослобађања адипокина и проинфламаторних цитокина чиме се може спречити гојазност и настанак инфламаторних метаболичких болести (31). Тачан механизам деловања још увек није разјашњен, али се сматра да смањен ниво лептина и повећани ниво адипонектина имају значајну улогу у регулацији метаболизма липида, као и осећаја глади и ситости. Поред ове студије, рађене су и две *in vivo* студије које су се бавиле испитивањем ефекта капсула са продуженим ослобађањем на бази уља сибирског бора. Потврђен је ефекат смањења апетита испитивањем здравих и гојазних пацијената. Верује се да је активацијом FFA4 рецептора дошло до смањеног лучења грелина који има улогу у регулацији апетита. Са друге стране дошло је до постпрандијалног пораста концентрације инкретинског хормона глугагону сличан пептид-1 (GLP-1) и активације FFA1 рецептора у β -ћелијама панкреаса чиме је стимулисано ослобађање инсулина (35). Њихов заједнички ефекат се огледа у смањењу нивоа глукозе у периоду од два сата након оптерећења глукозом (35). Исти научници су поновили истраживање где су упоређивали ефекте оралне примене капсула са модификованим ослобађањем на бази маслиновог уља и уља сибирског бора. Испитивањем здравих, гојазних пацијената су добијени другачији резултати у односу на претходну студију. Иако долази до повећања GLP-1, није забележена значајана

промена у концентрацији глукозе и инсулина код испитаника. Испитивањем субјективног осећаја се дошло до закључка да капсуле изазивају осећај ситости и да пацијенти имају смањену жељу за храном (36).

1.1.17. Утицај на централни нервни систем

Мали број истраживача се бавио проучавањем ефекта сибирског бора на централни нервни систем. Једина студија која је урађена је спроведена на хипокампаалном делу мозга мишева у циљу испитивања неуропротективног ефекта амида ламбертианске киселине (37). Ламбертианска киселина, добијена из иглица и терпентина *P. sibirica* има инхибиторно дејство на N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторе, чија хиперактивност се доводи у везу са бројним когнитивним и неуродегенеративним болестима, као што су Алцхајмерова, Паркинсонова болест и мултипла склероза (37,38). α -пинен показује значајне неуропротективне ефекте на централни нервни систем, што се приписује његовим антиоксидативним и антиинфламаторним својствима. Истраживања су показала да α -пинен побољшава моторичке функције, когнитивне способности и спречава пероксидацију липида у моделима неуродегенеративних болести, као што су Хантингтонова и Паркинсонова болест. Такође, успостављање баланса оксиданс-антиоксиданс система доприноси његовом заштитном ефекту, побољшавајући меморију и моторичку координацију. Ови резултати истичу потенцијал α -пинена у терапији поремећаја нервног система (39).

1.1.18. Дерматолошки ефекти

До сада нема објављених студија које су се бавиле проучавањем ефекта сибирског бора на кожу иако ова биљка има велики потенцијал и вишевековну традиционалну примену. Таксономски, њему најсличнији *Pinus koraiensis*, је детаљније проучен и има доказану ефикасност у лечењу псоријазе (40), контактнoг дерматитиса (41), као и примену у козметичким препаратима у третману бора (42). Представници рода *Pinus*, који су богати монотерпенима, имају широку примену у препаратима за кожу због изузетног антиинфламацијског, антибактеријског и антифунгалног дејства, захваљујући високом проценту монотерпена. α -пинен, који је и главни састојак етарског уља сибирског бора, има повољне ефекте на кожу, као и на зарастање рана (43–45). Најновија истраживања су на анималним моделима показала антипсоријатичну активност дермално примењеног ЕУ *Pinus* врста (46). Врсте *P. pinea* и *P. halepensis* су испитиване у циљу проналаска доброг агенса за боље зарастање рана. Етарско уље ових биљака је показало одличан резултат што се приписује њиховом специфичном хемијском саставу (47). У потрази за одговарајућом сировином за производњу наноструктурних липидних носача, уље сибирског бора је показало изванредне резултате. Због изузетне способности да штити и негује кожу може се користити у бројним топикалним козметичким препаратима (22). До сад није експериментално доказано, али у народу се користи за масажу јер ослобађа од умора, побољшава циркулацију и повећава виталност (48,49). Такође, на тржишту се може наћи велики број дерматокосметичких препарата као што су сапуни, шампони, лосиони и креме које у свом саставу имају етарско уље биљака из рода *Pinus* (50).

1.1.19. Ефекти на остале системе органа

In vivo истраживање на пацовима је потврдило аналгетски ефекат екстракта уља семена сибирског бора на тесту вруће плоче. Такође, упоредним испитивањем са стандардом фенилбутазона, уље је показало сличну активност, чиме је потврђен антипиретски ефекат (23). Пиноленска киселина показује имуномодулаторни и антиинфламацијски ефекат због чега има потенцијал за примену код реуматоидног артритиса и атеросклерозе (51,52). Истраживања су показала да уље сибирског бора добијено хладним и топлим поступком има повољан утицај на хипертензију. Хипотензивни ефекат је испитан *in vitro* посматрајући проценат инхибиције ангиотензин конвертујућег ензима. Повећањем концентрације уља повећан је и степен инхибиције ензима што има значајан ефекат на регулисање хипертензије (2).

1.1.20. Антимикробни ефекат сибирског бора

Бројна *in vitro* истраживања су показала да екстракти сибирског бора имају изражено дејство против великог броја бактерија и гљивица. Једном студијом је доказано да хидрофилни екстракт коре дрвета има најбољи антимикробни ефекат у поређењу са око тридесет различитих биљака. Истраживачи наводе да је висока концентрација пиносилвина одговорна за снажно деловање *P. sibirica* против патогених микроорганизама као што су: *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *P. fluorescens*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* (32). Различите концентрације уља сибирског бора су такође показале снажан бактерицидан или бактериостатски ефекат против великог броја грам позитивних и грам негативних бактерија, али је примећен изостанак дејства код *Candida albicans* и *Proteus vulgaris* (2). Испитивањем пет различитих фракција дестилације старског уља установљено је да све фракције имају антимикробни ефекат на: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* 209p, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter baumannii* и *Candida albicans*, али не и на *Pseudomonas aeruginosa* (53).

Новије студије потврђују антибактеријско дејство против *E. coli*, и истичу потенцијал биљног екстракта да делује против паразита (54). Истраживање потенцијала четинара да делују против опортунистичких гљивица, *C. parapsilosis* је показало да једино уљани екстракт у односу 1:8 има добар супресивни ефекат (54). Претходно наведене студије указују на то да сибирски бор спада у једне од најефикаснијих антимикробних агенаса природног порекла.

1.1.21. Антиоксидациони ефекат сибирског бора

До данас постоји свега пар радова објављених на тему антиоксидативног ефекта биљне врсте *P. sibirica*, док је њему сличан, и по таксономији и по хемијском саставу, корејски бор доста детаљније истражен (55,56). Сматра се да водећу улогу имају фенолна једињења као што су полифеноли и флавоноиди који имају снажан утицај у борби против слободних радикала (57). Испитивањем антиоксидационе активности старског уља сибирског бора је уочено да повећањем концентрације монотерпена његов ефекат опада (53). Снажан антирадикалски ефекат је доказан у *in vitro* студији на

култури ћелија Мадин-Дарби псеће ћелије бубрега (MDCK1) приликом анализе уља семена које је добијено хладним и топлим поступком цеђења (2).

Одређивањем антиоксидационе активности екстракта семена добијеног помоћу комбинације раствора ацетона и воде, тестовима попут 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH), Fe(II) хелатне активности је показан потенцијал сибирског бора у борби против слободних радикала (16). Хидрофилни екстракт коре дрвета *P. sibirica* је подвргнут различитим хемијским тестовима за испитивање антиоксидационе способности где је забележена јако мала активност против слободних радикала. У поређењу са екстрактима биљака сличног хемијског састава које имају добре антиоксидационе способности ови резултати су били изненађујући (58).

1.1.22. Антиинфламацијски ефекат сибирског бора

Број студија које се баве проучавањем антиинфламацијског ефекта сибирског бора је органичен. На основу фитохемијског састава и поређења са другим биљкама истог рода може претпоставити да има изузетан ефекат (29)**Error! Reference source not found..** У једној *in vivo* студији је испитиван ефекат оралне примене екстракта семена сибирског бора на карагенанском моделу инфламиране шапице пацова, где је забележен инхибиторни ефекат у периоду од шест сати. Како је познато да ω -3 масне киселине делују као антагонисти арахидонске киселине, која је прекурсор за настанак простагландина (59), сматра се да су полинезасићене масне киселине, токофероли и стероли одговорни за антиинфламацијски ефекат (23). Такође, постоје студије којима је доказана ефикасност пиноленске киселине, која је у великој мери заступљена у уљу семена сибирског бора, а ефекат остварује снижавањем нивоа азот-моноксида (NO), простагландина E2 (PGE2), интерлеукина 6 (IL-6) и фактора некрозе тумора алфа (TNF- α) (51,52).

1.2. Ране

Кожа је највећи орган људског организма и има бројне улоге у одбрани организма. У зависности од старости, стања коже и стања организма као и спољашњих утицаја може доћи до повреде. Физичка, хемијска или биолошка повреда интегритета коже, слузокоже или неког ткива представља рану (60,61). Ране имају природну способност регенерације и зарастања што укључује активацију бројних процеса у организму (62). У зависности од врсте ране овај процес се може одвити у потпуности у веома кратком временском периоду, док у неким случајевима процес може бити одложен и неиспуњен у потпуности због различитих унутрашњих и спољашњих фактора (63).

1.2.1. Класификација рана

Постоје различите класификације рана у зависности од дужине трајања, од изазивача и типа повреде, дубине и места ране, као и комплексности и потенцијалне контаминације (61). Према дужини трајања, ране можемо поделити на акутне, које трају до 6 недеља и хроничне које трају дуже од 6 недеља. На основу узрока постоје:

опекотине које могу бити електричне, термалне и хемијске; трауматске ране које настају као последица повреде оштрим или тупим предметом; јатрогене ране које остају након хируршких интервенција. Затим, ако класификујемо ране према дубини, постоје површинске које захватају делове изнад хиподермиса, и дубоке ране које захватају и дубоке слојеве хиподермиса (61). Центар за контролу болести и превенцију (CDC) из Сједињених Америчких Држава је објавио класификацију рана према стању и контаминираности, која садржи четири класе (64):

- Класа 1 (чиста рана), неинфицирана рана, без знакова инфламације
- Класа 2 (чиста до контаминирана рана), рана која се у неким случајевима може инфицирати специфичним путем
- Класа 3 (контаминирана рана), отворене, свеже ране са могућом акутном инфламацијом
- Класа 4 (прљава рана), дуготрајне трауматске ране које су инфициране услед неадекватног збрињавања

Посебна врста рана јесу комплексне ране, које које обухватају више система органа. Код акутних трауматских повреда (фрактура) често долази до појаве рана које захватају и оштећење неуро-вакуларног система (65). Овакве ране не могу саме да се регенеришу већ је неопходно одрадити хируршку интервенцију којом ће се санирати примарна повреда. Како комплексне ране још увек нису строго дефинисане у њих убрајамо све компликоване облике рана које се тешко лече. У такве ране се убрајају: некротичне ране, улцерозне ране, хроничне ране подложне инфекцијама које споро зарастају, ране које се доводе у везу са другим обољењима као што је дијабетес и друге аутоимуне болести (66,67).

1.2.2. Патофизиологија зарастања рана

Зарастање рана је физиолошки процес у организму који активира велики број механизма у циљу одбране и заштите организма као и регенерације повређеног ткива. Неопходна је добра координација бројних система и фактора како би се процес зарастања одиграо правилно. Акутне, површинске ране код млађих особа брзо зарастају при чему се кожи враћа интегритет и функција; док код хроничних рана процес укључује појаву инфламације која додатно продужава процес репарације у ком ће се на крају формирати ожиљно ткиво (61,63). У зависности од типа ране неке фазе зарастања могу да трају дуже или краће, а неке буду и прескочене. До данас су детаљно проучене четири фазе: фаза хемостазе, инфламацијска фаза, пролиферативна фаза и фаза ремоделовања (68–70).

Фаза хемостазе је најкраћа фаза и активира се одмах након што је повреда изазвана. Циљ ове фазе је заустављање крварења и спречавање хеморагије. Ово се постиже вазоконстрикцијом, примарном хемостазом која се огледа у активацији тромбоцита и формирању тромбоцитног чепа, као и секундарном хемостазом која обухвата активацију коагулације и формирање фибринског крвног угрушка (67,68). Велики број ендогених супстанци као што су катехоламини, простагландини и многи прокоагулантни и антикоагулантни фактори су укључени у овај процес (62). Након повреде, ендотел оштећеног крвног суда ослобађа ендотелин који својим вазоконстрикторним деловањем смањује даље отицање крви. Тромбоцити који се налазе на месту повреде се преко својих рецептора и *von Willebrandov*-ог фактора везују за колаген, при чему долази до њиховог пријањања на зид оштећеног ендотела и њихове активације. Активацијом, тромбоцити мењају свој облик и ослобађају велики

број активних супстанци које имају значајну улогу у даљем процесу зарастања ране. Неки од њих су тромбоксан А2 и серотонин који доприносе јачој вазоконстрикцији и заустављању крварења. Аденозин дифосфат и аденозин трифосфат су битни у процесу активације и привлачења великог броја тромбоцита до места повреде, што омогућава бољу агрегацију и формирање тромбоцитног чепа (68). Упоредо са овом фазом долази до активације процеса коагулације, који за циљ има формирање фибринске мреже која ће стабилизovati крвни угрушак. Коагулација представља комплексан мултиензимски процес који се састоји из низа каскадних реакција које се могу активирати спољашњим или унутрашњим путем. Спољашњи, или екстринзички пут се активирају посредством ткивног фактора који се ослобађа из оштећених ћелија, и путем бројних каскадних реакција доводи до стварања фибрина. Активација фактора коагулације доприноси интензивирању унутрашњег пута коагулације при чему долази до још већег формирања фибрина. Екстринзички, спољашњи и интринзички, унутрашњи пут коагулације се сусрећу у нивоу фактора X, одакле се процес одвија путем истих реакција. Активацијом фактора X, настаје фактор Ха који има ензимску улогу у превођењу протромбина у тромбин. Тромбин, даље, конвертује растворљив фибриноген у нерастворљив фибрин који се даље повезује са другим молекулима фибрина при чему се формира фибринска мрежа. Формирањем тромба, односно крвног угрушка који је стабилизован фибринском мрежом се завршава фаза секундарне хемостазе. Тромб представља механичку заштиту од крварења и могућности продора микроорганизама и инфекције ране. Поред овога, тромбоцити из коагулума ослобађају бројне факторе раста и цитокине који имају значајну улогу у наредним фазама инфламације и ремоделовања (62). Неки од тих фактора су: фактор раста тромбоцита (PDGF), трансформишући фактор раста- β (TGF- β) и епидермални фактор раста (EGF) чије се улоге огледају у регулацији инфламације, стимулацији пролиферације и миграције ћелија доприносећи поправци ткива.

Потом се активира фаза инфламације која има улогу у одбрани од микроорганизама. На месту повреде мастоцити испуштају проинфламаторне цитокине, вазодилаторне супстанце и хемоатрактанте из својих гранула. Ови догађаји условљавају активацију имунолошке одбране организма, када на место повреде долази велики број неутрофила и моноцита. Ткивни макрофаги који се налазе на месту повреде ослобађају проинфламаторне цитокине, укључујући интерлеукин 1 (IL-1), IL-6, TNF- α , као бројне друге факторе који су неопходни за фазу ангиогенезе и ремоделовања. Улога неутрофила је да уклоне патогене и некротично ткиво ослобађајући реактивне кисеоничне врсте, антимикуробне пептиде и протеолитичке ензиме, да би на крају извршили фагоцитозу (62). Већина неутрофила се уклања са места повреде уништавањем и гутањем од стране макрофага, или у неким случајевима апоптозом (68). Овај процес означава крај инфламацијске фазе.

Да би рана правилно зарасла потребно је регенерисати повређене крвне судове и епително ткиво, што се одвија у пролиферативној фази (61). У зависности од тежине ране ова фаза може трајати од неколико дана до неколико недеља (63). Кључни процеси за правилно одвијање ове фазе су: ангиогенеза, формирање гранулационог ткива и реепителизација. Фибрински крвни угрушак настао у првој фази се сад под дејством фибробласта замењује гранулационим ткивом које је богато фибронектином, незрелим колагеном и протеогликаном. Поред фагоцитозе, која је битна за претходну фазу, макрофаги и у овој фази имају изузетно битну улогу која се огледа у регрутацији и активацији фибробласта, ендотелних ћелија и бројних других. Повређени крвни судови се регенеришу у процесу ангиогенезе који је активиран уз помоћ васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF, енгл. *Vascular endothelial growth factor*) и фактора изазваних хипоксијом (HIF, енгл. *Hypoxia inducible factor*). M2 макрофаги секретују

VEGF, као и бројне факторе који промовишу процес ангиогенезе. Неки од тих фактора су: TGF- β који има улогу у миграцији фибробласта и синтези колагена; EGF који стимулише пролиферацију кератиноцита и процес епителизације (62). Пролиферацијом микроваскуларних ендотелних ћелија и формирањем нових крвних судова се омућава боља прокрвљеност и оксигенација ткива која ће допринети бољем зарастању (68). Макрофаги овде имају регулаторну улогу, како би разградили фибрин и направили простор за нове крвне судове и како би спречили превелику васкуларизацију ткива. Спречавање васкуларизације ткива је омогућено инхибиторима ангиогенезе: интерферон- α , интерферон- β , матрикс металопротеиназама (ММР). Последњи процес пролиферације је реепителизација која за циљ има затварање површине ране. Миграција и пролиферација кератиноцита је кључна за процес затварања оштећеног епитела и формирање баријере. Поред макрофага, битну улогу имају и Т-ћелије које се налазе у кожи и посредством цитокина и фактора раста делују на кератиноците и активирају их. Ензими матрикс металопротеиназе, ММР-9 и ММР-2 учествују у разградњи екстрацелуларног матрикса (ЕЦМ) и базалне мембране омогућавајући кератиноцитима довољно простора за миграцију. Активирани кератиноцити мигрирају са крајева ране ка центру где се срећу, зауставља се миграција а уједно и формира нова базална мембрана (68). Овај веома сложен процес је посредован различитим врстама фибробласта од којих су једни одговорни за таложење екстрацелуларног матрикса а други за реепителизацију.

Последња фаза у процесу зарастања ране јесте фаза ремоделовања која траје и по више месеци или година у зависности од типа ране (63). Циљ ове фазе је да се кожи врати њена првобитна функција, што је могуће код неких мањих повреда, док се код већих повреда ствара ожиљак који нема исте функције као здрава кожа. Након завршене реепителизације, долази до реорганизације ЕЦМ како би новонастало ткиво обезбедило механичку заштиту. Фибробласти, који су одговорни за производњу колагена, такође имају битну улогу у регулацији деградације и ресинтезе ЕЦМ који морају бити у одговарајућем балансу. ММР и ткивни инхибитор металопротеиназа (TIMP, енгл. *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*) су фактори које производе диференцирани фибробласти- миофибробласти у гранулационом ткиву. Под дејством ММР долази до реконструкције екстрацелуларног матрикса, колаген III из гранулационог ткива се замењује колагеном I. Након деградације ЕЦМ, долази до инхибиције матрикс металопротеиназа под дејством TIMP, при чему се зауставља даља деградација (68). У овој фази TGF- β има битну улогу у регулацији синтезе TIMP, чиме модулише експресију ММР и спречава прекомерну разградњу ЕЦМ. У поређењу са неповређеним ткивом, гранулационо ткиво које настаје на месту повреде има много већи проценат колагена тип III у односу на колаген тип I. Чак и након деловања ММР колаген тип III није у потпуности замењен колагеном тип I, због чега ожиљно ткиво никад неће имати потпуни интегритет и потпуну функцију као неповређено ткиво (62). Формирањем ожиљног ткива потреба за новим крвним судовима опада, због чега долази до смањене експресије фактора који промовишу ангиогенезу, као што је VEGF. Са друге стране долази до активације инхибитора ангиогенезе који омогућавају апоптозу сувишних ендотелних ћелија и разградње ЕЦМ око новоформираних крвних судова што води до њихове ресорпције. У зависности од величине захваћеног ткива, фаза матурације може трајати месецима и годинама. По завршетку процеса матурације, ожиљак има мању чврстину и еластичност у поређењу са здравим епителом. Долази до промене текстуре и боје, ожиљак је због процеса регресије ангиогенезе блеђи од околног ткива јер нема крвних судова. Због неправилне расподеле меланоцита ожиљно ткиво може бити хипер или хипопигментисано. Неравнотежа ових процеса може довести до продуженог и неадекватног зарастања рана.

1.2.3. Компликације рана

Бројни фактори могу утицати на процес зарастања рана. Компликацијама су највише подложне хроничне ране попут улцера, дијабетесног стопала, некротичних гангрена (66). Најчешћа компликација је појава инфекције изазвана патогеним микроорганизмима што доводи до продужетка самог процеса. Микробиолошка контаминација спада у локалне факторе, заједно са зрачењем, радијацијом, излагању великим температурама или хемијским агенсима који могу довести до опеклина (67). Неке аутоимуне болести, као и дијабетес могу интерферирати са неком од фаза зарастања рана што такође може да одложи затварање и репарацију ране. Опште стање пацијента, исхрана, старост, пол, телесна маса, пушење су неки од системских фактора који могу значајно пореметити фазе зарастања рана (69). Поред овога може доћи и до проблема код самог ожиљка који може бити превише слаб што доводи до поновног отварања ране и настанка херније (61). Ожиљак се може јавити као хипертрофирани ожиљак, или у облику келоида или временом, може променити боју услед накупљања хемосидерина.

Хроничне компликоване ране представљају социјални и финансијски проблем. Пацијенти са хроничним ранама нису у могућности да неометано обављају свакодневне обавезе и доста пажње посвећују нези ране. Са друге стране лечење хроничних рана представља велики финансијски терет за здравствени систем. Велики број лекова, топикалних препарата и медицинских средстава се користи за збрињавање рана, а како је понекад потребно и хируршко лечење долази до повећања болничких трошкова што такође пада на терет здравственог система (71,72).

1.2.4. Веза између рана и дијабетес мелитуса

Дијабетес мелитус (ДМ) представља хроничну метаболичку болест која има преваленцу од око 500 милиона пацијената на светском нивоу и има тенденцију раста (73). Основна карактеристика ове болести је хипергликемија настала због недовољне количине инсулина или резистенције на инсулин. Последица констатне хипергликемије су инфламацијски процеси који доводе до микроваскуларних и макроваскуларних компликација. Код особа са ДМ су кардиоваскуларне компликације, ретинопатија, нефропатија и неуропатија веома честе (66). Због присутне неуропатије, пацијенти губе сензитивност периферних нерава што може да доведе до изостанка осећаја бола на периферији (74). Ово је најчешћи узрок појаве улцера на доњим екстремитетима код пацијената са дијабетесом јер их пацијенти не примете на време. Како пацијент не осећа бол, и често не примети улцере, може доћи до погоршања стања у виду проширења или инфицирања ране. Овакве хроничне ране се другачије називају и дијабетично стопало. Недавне студије су показале да се код пацијената са дијабетесом дешава процес оксидационог стреса и поремећај у имунолошком систему што заједно доприноси одлагању процеса зарастања рана. Постоји податак да се код чак око 30% пацијената са дијабетесом развија дијабетично стопало, а више од 50% тих улцера се

инфицира што се неретко завршава ампутацијом дела доњих екстремитета (75). Најчешћи изазивачи инфекција су грам позитивне бактерије (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheria*, *Enterococcus spp.*), грам негативне бактерије (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) и гљивица (*Candida spp.*, *Aspergillus spp.*) (71,76).

Бројни патофизиолошки механизми су одговорни за настанак хроничних рана и њихов одложен процес зарастања код пацијената са ДМ. Због апоптозе Т-лимфоцита и повећаног ослобађања проинфламаторних цитокина као што су TNF- α , IL-1 и IL-6, долази до смањења јачине имунског одговора и хроничне имфламације чиме се успорава процес зарастања рана (62,77). Неутрофили, чија је улога да фагоцитију микроорганизме, долази до губитка функције и експресије цитотоксичних ензима који за последицу имају пролонгирану инфекцију и ослобађање велике количине слободних радикала. Бројне улоге, како у инфламацији тако и у пролиферацији имају макрофаги чија је активност директно нарушена код дијабетеса. Макрофаги код ДМ више не ослобађају VEGF који је проангиогени фактор, због чега је смањена ангиогенеза. Истовремено долази до јаче експресије антиангиогених фактора што такође доводи до инхибиције ангиогенезе. Због смањене ангиогенезе не стварају се нови крвни судови и долази до лоше прокрвљености и оксигенације ткива што за последицу има продужавање фазе пролиферације (78). Код пацијената са ДМ, долази до смањења TIMP-а због чега долази до превелике експресије MMP-2 и MMP-9 и превелике деструкције екстрацелуларног матрикса. Поред значајног утицаја на одлагање процеса пролиферације, металопротеиназе такође нарушавају и процес ремоделовања, јер због њихове превелике активности не може се постићи правилно формирање чврстог ожиљка. Са друге стране, долази до смањене миграције и активности фибробласта, што резултује смањеним стварањем гранулационог ткива које је неопходно за правилно зарастање рана. Фибробласти не синтетишу довољну количину зрелог колагена, а кератиноцити код ДМ губе способност миграције и пролиферације чиме се одлаже зарастање рана (79). Поремећаји у метаболизму угљених хидрата и липида, заједно са факторима ризика као што су пушење, гојазност, неправилна исхрана, доводе до повећаног ослобађања слободних радикала и појаве оксидационог стреса (80,81). Тачан механизам којим дијабетес утиче на брзину зарастања рана још увек није детаљно разјашњен али се сматра да изазива продужетак инфламацијске фазе и омета одвијање фазе пролиферације (73).

1.2.5. Принципи лечења рана код пацијената са дијабетесом

Проучавањем зарастања рана и утицаја дијабетеса можемо пронаћи нове приступе у третману рана. Данас се велики број студија фокусира на детаљно испитивање механизма и фактора који утичу на зарастање рана и утицаја дијабетес мелитуса на молекуларном нивоу. Откриће нових механизма и утицаја фактора на те процесе може помоћи у проналажењу нових циљева и нових начина лечења. Конвенционално лечење рана се заснива на медикаментозној терапији: применом оралних антиинфламаторних лекова, примени системских и топикалних антибиотика, антисептика и хируршком лечењу. Код неких типова рана се саветује примена полиуретанских филмова и пене, као и примена хидрогелова и хидроколоида у циљу хидратације, хлађења и аналгетског ефекта (81,82). Постоје и друге терапије као што је терапија хипербаричним кисеоником, терапија факторима раста, терапија матичним ћелијама, имуномодулација и многе друге (82,83). Примена егзозома смањује инфламацију, побољшава ангиогенезу и стварање колагена што има позитиван утицај

на брзину зарастања рана (84). Због мале ефикасности и великог броја нежељених ефеката стручњаци се okreћу ка развијању нових терапијских система и ка природној медицини која је показала изванредне резултате у *in vivo* студијама на животињама и људима (81–83,85–87).

1.3. Улога лековитог биља у инфекцији

Инфекција данас представља један од водећих проблема како у развијеним земљама, тако и у земљама у развоју. Патогени вируси, бактерије, гљивице и паразити су главни изазивачи заразних болести. Због нерационалне и неконтролисане примене конвенционалних антимикробних лекова долази до појаве резистенције. Бактеријска резистенција представља велики проблем здравственог система јер долази до повећања трошкова и пораста стопе коморбидитета и морталитета (88). Све већа појава мултирезистентних сојева на које антибиотска терапија више не може да делује су узрок скоро половине смртних случајева (89,90). Тренутна ситуација у области лечења инфекција је на забрињавајућем нивоу и захтева проналазак нових лекова, нових супстанци или нових система за одбрану од патогених микроорганизама и њихове резистенције. Становници Азије се већ дужи временски период ослањају на традиционалну медицину која се заснива на примени биљака (91,92). Познато је још од давнина да се одређене биљке користе за спољашњу и унутрашњу употребу у лечењу разних обољења, као што су инфекције респираторних путева, кожне инфекције, инфекције рана. Због тога су данас испитивања која у фокусу имају потенцијал биљних лекова у експанзији. Рађена су бројна *in vitro* и *in vivo* истраживања која су потврдила да одређене биљне врсте или изоловане супстанце тих биљака имају изузетно антимикробно деловање. Терпени, полифеноли, танини, алкалоиди су само неке од хемијских група супстанци за које је доказано да имају антимикробно деловање. Поред изолованих супстанци, различити фитопрепарати као што су екстракти, етарска уља, уља семенки и многи други. Антимикробна активност сибирског бора је доказана *in vitro* испитивањима, али су испитивања на животињама ограничена (2,32,52,54). С обзиром на добар потенцијал било би од великог значаја одрадiti испитивања на животињама која би потврдила ове ефекте и увела употребу сибирског бора у клиничку праксу.

1.4. Улога лековитог биља у инфламацији

Инфламација је у основи етиологије многих обољења као што су дијабетес, гојазност, астма, канцер, кардиоваскуларна обољења (93–96). Она представља вид одбране организма од страних фактора као што су микробиолошки, хемијски и физички агенси, активацијом имунског одговора. Активација имунског одговора и процеса инфламације обухвата велики број ћелија и сложених механизма. Бројни хемијски медијатори који потичу од ћелија беле крвне лозе (мастоцити, неутрофили, моноцити) имају битну регулаторну улогу у процесу инфламације. Антиинфламацијски ефекат се углавном постиже инхибицијом проинфламаторних цитокина и медијатора запаљења (97). Тренутни терапијски приступ се своди на примену кортикостероида и

нестероидних антиинфламаторних лекова. Проблем се јавља код метаболичких болести код којих је присутна стална инфламација и постоји потреба за честом применом антиинфламацијских лекова. Константна примена ових лекова може да доведе до појаве тешких нежељених ефеката и погоршања стања пацијената (98). Због свега наведеног, научна јавност је у фокус својих истраживања ставила детаљно проучавање механизма инфламације који им могу олакшати потрагу за циљним молекулом на који нови антиинфламацијски агенс може да делује. Како је традиционалном употребом биљака примећен њихов добар потенцијал, данас се обавља велики број истраживања биљних врста из свих делова света (99). Флавоноиди, терпени, танини као главни састојци екстрактивних препарата; и полинезасићене масне киселине као састојци природно цеђених уља имају доказано антиинфламацијско деловање (100). Постоји одређен број истраживања који су потврдили антиинфламацијски ефекат уља сибирског бора и пиноленске киселине, међутим ефекти старског уља још увек нису испитивани (23,29).

1.5. Улога лековитог биља у оксидационом стресу и дијабетесу

Слободни радикали настају као резултат бројних метаболичких реакција у организму од којих се организам човека брани физиолошким антиоксидативним супстанцама, међутим када концентрација слободних радикала пређе капацитет антиоксиданса долази до појаве оксидационог стреса. Оксидациони стрес представља велики фактор ризика за развој бројних метаболичких обољења, између осталог и дијабетеса (101). Оксидациони стрес настаје низом реакција реактивних врста кисеоника и азота при чему настају прооксиданси који када се нађу у великој концентрацији могу да изазову поремећаје сигналних путева, оштећење молекула и ћелија (102). Најчешћи прооксиданси кисеоничне врсте су: супероксид анјон радикал (O_2^-), хидроксил радикал ($OH\bullet$) и водоник пероксид (H_2O_2); а азотне врсте: азот моноксид (NO), азот диоксид радикал (103,104). Природни антиоксиданси организма човека могу бити ензимски и неензимски. Од ензима који учествују у одбрани организма познати су: супероксид дизмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx), глутатион редуктаза (GR); а од неензимских су: α -токоферол, β -каротен, витамин Ц и глутатион (GSH).

Константна хипергликемија код особа са дијабетесом узрокује гликозилацију протеина чије накупљање изазива оштећење ткива и друге компликације дијабетеса. Формирање реактивних кисеоничних врста изазива дисфункцију ендотелних ћелија крвних судова чиме се могу објаснити кардиоваскуларне компликације (97). Поред тога долази до утицаја на периферне сензорне нерве што узрокује неуропатију код пацијената са дијабетесом. Познато је да бројни метаболити биљака као што су полифеноли и флавоноиди имају добар антиоксидативни капацитет (57,105). Међутим тип екстракције и врста биљног материјала знатно утичу на количину антиоксидативних агенаса. Код испитивања антиоксидационог потенцијала сибирског бора постоје контрадикторни резултати. Анализом различитих врста екстраката једна група научника тврди да сибирски бор има добар антиоксидациони потенцијал, док је друга група научника доказала да је тај потенцијал јако мали и недовољан за одбрану од слободних радикала (2,53,58).

II
ЦИЉЕВИ
СТУДИЈЕ

2. Циљеви истраживања

На основу свега претходно наведеног циљеви ове студије су:

1. Хемијска карактеризација етарског уља сибирског бора;
2. Испитивање антиоксидационе активности етарског уља сибирског бора;
3. Формулација дермалних препарата (маст и гел) са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора;
4. Испитивање стабилности формулисаних препарата на бази етарског уља сибирског бора;
5. Испитивање безбедности формулисаних дермалних препарата на бази етарског уља сибирског бора;
6. Испитивање антиинфламацијског ефекта формулисаних дермалних препарата са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора;
7. Испитивање утицаја тронедељне примене дермалних препарата (масти и гела) са етарским уљем сибирског бора у третману рана типа ексцизије код пацова са дијабетесом тип 1.

III

МАТЕРИЈАЛ

И МЕТОДЕ

3. Материјал и методе

3.1. Дизајн студије

Експерименти у овој студији су рађени на биљном материјалу и топијалним формулацијама *in vitro*. Такође, експерименти су даље вршени на анималном моделу (*in vivo*) и материјалу животињског порекла (*in vitro* и *ex vivo*).

3.2. Етарско уље сибирског бора

3.2.1. Добијање и хемијска карактеризација

Етарско уље сибирског бора добијено дестилацијом иглица биљке *Pinus sibirica*, је набављено од „Alekharm“, Београд, Србија. Уз етарско уље добијен је и сертификат анализе којим се потврђује квалитет и безбедност сировине. Након пристизања ЕУ извршена је квантитативна и квалитативна анализа истог коришћењем хроматографско-спектроскопске методе: гасна хроматографија са масеном спектрометријом (GC-MS *eng. gass chromatography/mass spectrometry*). Анализа је изведена на гасном хроматографу Agilent Technologies 6890В, који је повезан са детектором Agilent Technologies 5977 MSD. Коришћена је HP-5MS капиларна колона (30 m x 0,25 mm; дебљине стационарне фазе 0,25 μ m). Као носећи гас је коришћен хелијум са константним протоком 1 ml/min. Температурни услови су били следећи: инјектор је подешен на 220°C, док је температура трансфер линије износила 230°C. Програм температуре колоне био је линеарно подешен, почевши од 60°C, уз раст од 3°C/min, до финалне температуре од 246°C. Узорак етарског уља растворен у *n*-хексану (2% *v/v*) убризган је у запремини од 2 μ l у сплит режиму 1:10 (106).

Масени спектрометар је прикупљао податке у опсегу снимања *m/z* од 50–550. Компоненте ЕУ идентификоване су упоређивањем ретенционих индекса и масених спектра са подацима из NIST базе масених спектра (*v14*) и доступне литературе.

3.2.2. Антиоксидациони потенцијал

Спровођењем пет *in vitro* тестова процењен је антиоксидациони потенцијал етарског уља сибирског бора. Коришћене методе су: одређивање способности неутрализације DPPH- радикала, способности неутрализације хидроксил радикала, одређивање инхибиције липидне пероксидације и одређивање способности редукције јона гвожђа-FRAP тест.

3.2.3. Испитивање потенцијала етарског уља сибирског бора да неутралише DPPH радикал

Способност неутрализације DPPH радикала анализирана је применом спектрофотометријске методе која се заснива на промени боје раствора: љубичасто обојени DPPH радикал се, у присуству антиоксиданаса, редукује у DPPH-H при чему настаје жуто обојен раствор. Ова метода се заснива на антиоксидационој способности једињења присутних у етарском уљу да делују као донори водоника (107).

Припрема узорак са огледа у припреми серије раствора различитих разблажења етарског уља сибирског бора. У овако добијене растворе је додато 1 ml 90 μ M DPPH раствора, промешано и допуњено 95% метанолом до запремине од 4 ml. Након једночасовне инкубације на собној температури без присуства светлости, мерена је апсорбанца на 517 nm коришћењем спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Као позитивне контроле коришћени су аскорбинска киселина и 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина (Тролокс), док су мерења извођена у четири понављања. Проценат неутрализације DPPH радикала (*Radical Scavenging Capacity, RSC*) израчунат је применом одговарајуће једначине.

$$\% \text{ неутрализације (RSC)} = 100 * (A_k - A_u) / A_k$$

A_k - апсорбанца контроле (која садржи све реагенсе, осим испитиваног узорка или стандарда)

A_u - апсорбанца узорка

IC_{50} вредност, која представља концентрацију етарског уља потребну за неутрализацију 50% DPPH радикала, одређена је применом линеарне регресионе анализе на основу израчунатог процента неутрализације и изражена у микрограмима по милилитру (μ g/ml).

3.2.4. Испитивање потенцијала етарског уља сибирског бора да неутралише хидроксил радикал

У циљу испитивања способности неутралисања хидроксилних радикала ($OH^\bullet$), примењена је модификована метода заснована на генерисању радикала коришћењем Фентоновог реакционог система. Током реакције, OH радикали индукују деградацију 2-дезоксирибозе, што доводи до формирања малонилдиалдехида (MDA). Новоформирани MDA затим ступа у реакцију са додатом тиобарбитурном киселином (ТВА), стварајући ружичасто обојен комплекс који се може детектовати спектрофотометријском методом (108).

За овај поступак припремљена је серија од шест раствора етарског уља сибирског бора различитих концентрација путем двоструког разблажења. У сваки узорак (100 μ l) додато је 500 μ l раствора дезоксирибозе, 200 μ l смеше $FeCl_3$ и етилендиаминтетраацетатне киселине (EDTA) у односу 1:1 (v/v), 100 μ l раствора H_2O_2 и 100 μ l раствора аскорбинске киселине. Смеша је инкубирана на 50°C у трајању од 30 минута. Након инкубације, додато је по 1 ml раствора ТВА и трихлорсирћетне киселине (ТСА), а затим је инкубација поновљена под истим условима још 30 минута. Степен оксидације дезоксирибозе одређен је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на таласној дужини од 532 nm помоћу спектрофотометра UV-1800 (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Као референтни стандарди коришћени су тролокс, бутиловани хидрокситолуен

(ВНТ) и аскорбинска киселина. Сва мерења су изведена у четири понављања, а прорачун процента неутрализације ОН радикала извршен је помоћу одговарајуће једначине.

$$\% \text{ неутрализације (RSC)} = 100 * (A_k - A_y) / A_k$$

A_k - апсорбанца контроле (која садржи све реагенсе, осим испитиваног узорка или стандарда)

A_y - апсорбанца узорка

IC_{50} вредност, која представља концентрацију етарског уља потребну за неутрализацију 50% хидроксил радикала, одређена је применом линеарне регресионе анализе на основу израчунатог процента неутрализације и изражена у микрограмима по милилитру ($\mu\text{g/ml}$).

3.2.5. Испитивање потенцијала етарског уља сибирског бора да инхибира липидну пероксидацију

Одређивање инхибиције липидне пероксидације је рађено спектрофотометријским мерењем ружичасто обојеног комплекса између MDA и TBA (108). У овом експерименталном систему, хидроксилни радикали су генерисани коришћењем Фентонове реакције. Као модел липида у биолошким мембранама, примењена је суспензија липозома „*Pro-Lipo S*“. У суспензију липозома додате су различите концентрације етарског уља сибирског бора како би се испитала његова антиоксидативна активност. Реакција између ОН радикала и полинезасићених масних киселина липидног модела довела је до стварања MDA, секундарног продукта липидне пероксидације. Количина насталог MDA је детектована спектрофотометријски, засновано на формирању обојеног комплекса са тиобарбитурном киселином (TBA). Мерења су урађена у четири понављања на спектофотометру UV-1800 (*Shimadzu, Kyoto, Japan*) на таласној дужини од 532 nm, а проценат инхибиције је израчунат помоћу одговарајуће једначине.

$$\% \text{ инхибиције} = 100 * (A_k - A_y) / A_k$$

A_k - апсорбанца контроле (која садржи све реагенсе, осим испитиваног узорка или стандарда)

A_y - апсорбанца узорка

IC_{50} вредност, која представља концентрацију етарског уља потребну за неутрализацију 50% липидне пероксидације, одређена је применом линеарне регресионе анализе на основу израчунатог процента инхибиције и изражена у микрограмима по милилитру ($\mu\text{g/ml}$).

3.2.6. Испитивање редукционог потенцијала етарског уља сибирског бора FRAP методом

FRAP (енгл. *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) метода, представља спектофотометријску методу базирану на редукцији Fe^{3+} у Fe^{2+} у киселој средини (109). За извођење овог теста припремљен је FRAP реагенс који се добија мешањем 2,4,6-трипиридил-S-триазина раствореног у хлороводоничној киселини, ацетатног пуфера и раствора гвожђе (III)-хлорида у односу 1:1:10 (v/v/v). Да би добили узорак за анализу помешали смо претходно направљен раствор са етарским уљем сибирског бора и са серијом познатих концентрација аскорбинске киселине који имају антиоксидационе способности. У присуству антиоксиданаса, дошло је до редукције гвожђе(III)-2,4,6-трипиридил-S-триазина до интезивно плаво обојеног комплекса гвожђе(II)-2,4,6-трипиридил-S-триазина чија је апсорбанца мерена спектрофотометријски на 593 nm на спектофотометру UV-1800 (*Shimadzu, Kyoto, Japan*). Редукциони потенцијал сибирског бора је добијен на основу калибрационе криве стандарда аскорбинске киселине. Мерења су урађена у четири понављања, а резултат је изражен као милиграм еквивалента аскорбинске киселине по милилитру етарског уља (mg AKE/ml).

3.3. Дермалне формулације са етарским уљем сибирског бора

У циљу проналаaska оптималне формулације која би била ефикасна у топикалној терапији рана изабрани су полуврсти препарати типа масти и гела. На основу досадашњих литературних података о безбедности и ефикасности, концентрација инкорпорираног етарског уља сибирског бора износила је 0,5%.

3.3.1. Израда полуврстих формулација са етарским уљем сибирског бора

Приликом израде масти биљни материјал је инкорпориран у Еуцерин подлогу (МФ 2008), док је приликом израде гела етарско уље додато у хидрофилни гел карбомера (МФ 2008). Етарско уље сибирског бора у концентрацији од 0,5% је инкорпорирано у наведени фармацеутски препарат у циљу испитивања потенцијалне ефикасности у зарастању рана (110).

На основу рецептуре из Магистралних формула (МФ 2008) Еуцерин подлога је направљена прецизним одмеравањем и мешањем масних компоненти према рецептури приказаној у **Табели 3**. Након одмеравања ланолина и белог вазелина, масна фаза је у емајлираној патени загревана на воденом купатилу на температури од $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. У другој патени се пистилом уз помоћ течног парафина разриба одговарајућа количина претходно одмереног холестерола. У овако припремљену смешу се затим додаје претходно отопљена масна фаза у деловима уз константно мешање. Овако добијен полуврсти препарат смо користили као подлогу за израду масти.

Да би добили маст са сибирским бором користили смо претходно припремљену еуцерин подлогу и етарско уље иглица сибирског бора. Маст је израђена у патени са пистилом методом левигације. У Еуцерин подлогу која је прохлађена до око 40°C је додато 0,5% ЕУСБ.

Табела 3. Израда масне подлоге и масти са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора

Састојци	Маст база (%)	Маст са сибирским бором (%)
Холестерол	5,0	5,0
Ланолин	15,0	15,0
Течни парафин	15,0	15,0
Бели вазелин	65,0	65,0
ЕУСБ	/	0,5

Хидрофилни гел је припремљен мешањем карбомера 940 и пречишћене воде, уз додатак пропилен гликола, триетаноламина и натријум бензоата као конзерванса. Количине потребних супстанци су наведене у **Табели 4**. Према прописима из Магистралних формула (МФ 2008) гел је направљен у патени тако што смо у одговарајућу количину карбомера додали прећишћену воду и мешали пистилом док није добијена дисперзија. Затим смо у тако припремљену дисперзију додали одговарајуће количине пропилен гликола, натријум бензоата и претходно припремљеног 10% раствора триетаноламина и оставили смешу да набубри. Овако добијен полуврсти препарат смо користили као подлогу за израду гела.

Да би добили гел са сибирским бором користили смо претходно припремљену подлогу хидрофилног гела и у њу додали 0,5% етарског уља иглица сибирског бора. Овако припремљени полуврсти препарати за дермалну употребу су паковани у пластичне кутије, сигнирани и чувани на прописан начин.

Табела 4. Израда гела карбомера и гела са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора

Састојци	Гел база (%)	Гел са сибирским бором (%)
Карбомер 940	0,5	0,5
Пропилен гликол	10,0	10,0
Триетаноламин 10%	q.s	q.s
Натријум бензоат	0,2	0,2
ЕУСБ	/	0,5
Пречишћена вода	ad 100,0	ad 100,0

q.s- колико је потребно, ad- до

3.3.2. Карактеризација полуврстих дермалних формулација

Карактеризација добијених полуврстих дермалних формулација је обухватила одређивање физичког изгледа, хомогености, способности прања, раздвајања фаза и рН вредности, електричне проводљивости. Ови параметри су праћени током шест месеци. Узорци припремљених формулација су чувани у пластичним кутијама на собној температури.

3.3.3. Органолептичка испитивања

Органолептичка испитивања масти и гела су рађена непосредно након израде препарата, као и након 6 месеци од израде у циљу праћења физичке стабилности. Ова испитивања подразумевају праћење промене боје, мириса, конзистенције и хомогености. Хомогеност препарата је визуално процењена на основу раздвајања фаза и присуства агрегата, као и на основу додира помоћу палца и кажипрста. Наношењем препарата на кожу кружним покретима и посматрањем трага који остаје на кожи је праћена размазивост (111).

3.3.4. Способност прања

Способност прања је испитивана путем брзине којом се испитивани препарати спирају са коже. Након примене препарата на кожу праћен је процес прања са дестилованом водом (112).

3.3.5. Тест центрифугирања

Тест центрифугирања има за циљ испитивање стабилности препарата, праћењем промена као што је раздвајање фаза. У лабораторијској центрифуги (*Hettich Mikro 120, Germany*), на собној температури су испитивани узорци гела са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора на 3000 обртаја током 30 минута. Да би препарат био стабилан потребно је да након центрифугирања остане непромењен-хомоген и без назнаке о раздвајању фаза (113).

3.3.6. pH вредност и електрична проводљивост

Мерење pH узорка гела са додатком етарског уља сибирског бора извршено је помоћу pH-метра HI 9321 (*Hanna Instruments Inc.*). Пре почетка мерења, уређај је калибрисан стандардним пуферима pH 4, 7 и 10. Затим је испитана pH вредност узорка гела тако што је стаклена електрода pH-метра уроњена у водом разблажени узорак на собној температури. pH вредност је мерена три пута и израчуната је средња вредност на почетку (72 сата након израде) и након шест месеци (114). Узорак гела је током овог периода чуван у пластичној кутији на собној температури.

Узорци гела су испитивани на собној температури након калибрације кондуктометра (*Eutech CON 700, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China*). Мерена је електрична проводљивост (σ) препарата типа гела на собној температури. Ова испитивања су спроведена у трипликату на основу чега је изведена средња вредност (115).

3.3.7. Реолошка испитивања

У овом истраживању, реолошка карактеризација получврстих дермалних формулација (маст и гел) обављена је коришћењем континуалних и осцилаторних реолошких мерења. Испитивања су изведена на *HAAKE MARS* реометру (*Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany*) који је био повезан са термостатом како би се одржала константна температура од $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Плоча/плоча мерни систем пречника 35 mm и размака између плоча од 1000 mm је коришћен у циљу испитивања реологије.

- Континуална реолошка мерења:

За масти: Мерења су извршена применом контролисане брзине смицања, где су криве протицања добијене мерењем хистерезних петљи. Први корак је обухватао одређивање узорка при брзина смицања која је прво повећавана од $0,001$ до 200 s^{-1} у року од 180 секунди, а затим је држана константном на 200 s^{-1} током 120 секунди. На крају је брзина смицања поново смањена на 0 s^{-1} у периоду од 180 секунди.

За гелове: Брзина смицања код испитивања узорака гела је на почетку анализе повећавана од $0,001$ до 50 s^{-1} у року од 120 секунди. Следећи корак се огледао у одржавању константне брзине од 60 s^{-1} током 60 секунди, да би на крају током 120 секунди брзина смањивала са 50 до 0 s^{-1} .

- Осцилаторна мерења:

Амплитудна осцилаторна мерења (енгл. *Amplitude sweep*) су извршена како би се одредио линеарни вискоеластични регион испитиваних узорака. Ова мерења су коришћена да се испита вискоеластично понашање дермалних формулација масти и гела. Модул еластичности (G') и вискозности (G'') су мерени у односу на напон смицања у опсегу од 0,01 до 100 Pa при константној фреквенцији од 1 Hz. Одређивање фреквенције спроведено је при константном смичном напрезању (1 Pa) у опсегу од 0,1 до 10 Hz (116).

Испитивање реолошких параметара обављено је на почетку, 3 дана након израде формулација, а затим поново након 6 месеци чувања узорака на собној температури, како би се проценила дугорочна стабилност и промена својстава формулација током времена.

3.4. Безбедност и ефикасност топикалних формулација са етарским уљем сибирског бора

Експерименти су спроведени у Лабораторији за кардиоваскуларна истраживања, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. При експерименталном раду су поштовани принципи етичности и одредбе прописаних акта: Европском директивом о заштити животиња коришћених у експерименталне и друге научне сврхе (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes* 86/609/EEC), Европском директивом о добробити лабораторијских животиња (2010/63/EU). Студија је одобрена од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука (бр. 01/12408). Истраживање је обухватило 138 *Wistar albino* пацова мушког пола, старости 8 недеља, телесне тежине 200-250 грама. Први део истраживања који се односи на акутну дермалну иритацију обухвата 18 здравих *Wistar albino* пацова, док су се у оквиру

испитивања антиинфламацијског деловања топикалних препарата користили здрави *Wistar albino* пацови ($n=60$). Други део истраживања који се односи на зарастање рана је урађен на *Wistar albino* пацовима ($n=60$) којима је изазван дијабетес мелитус тип 1 интраперитонеалном применом стрептозотоцина (50 mg/kg). Све животиње су достављене са Војномедицинске академије у Београду и чуване у строго контролисаним условима (температура $22\pm 2^\circ\text{C}$, циклус светло:тама 12:12 сати), вода и храна им је била доступна у довољној количини да би их животиње конзумирале према потреби (*ad libitum*).

3.4.1. Акутна дермална иритација

Пре испитивања ефикасности препарата на животињама са изазваном раном, спроведен је тест акутне дермалне иритације према водичу: „*Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines 404*“ (117).

Леђа здравих пацова су депилирана у укупној површини од 500 mm^2 и након 24h је примењен одговарајући топикални препарати са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора у количини од 0,5 грама. Кожа сваке животиње је посматрана у циљу праћења било каквог симптома запаљенских реакција попут отока и еритема у току првих неколико часова и током 14 дана. У **Табели 5.** приказани скорови за оцењивање насталих промена на кожи, док су у **Табели 6.** су приказане групе третираних животиња (укупно $n=12$).

Табела 5. Оцене промена на кожи

Промене на кожи		Скор
Формирање еритема	Еритем није присутан	0
	Једва приметан еритем	1
	Ограничен еритем	2
	Умерен до јак еритем	3
	Јак еритем са формирањем улцерација	4
Формирање едема	Едем није присутан	0
	Једва приметан едем	1
	Лаган едем са дефинисаним ивицама	2
	Умерени едем који је издигнут до 1 mm	3
	Тешки едем који је издигнут више од 1 mm без дефинисаних ивица	4

Табела 6. Групе животиња за испитивање акутне дермалне иритације

Редни број	Испитивана група	Ознака групе	Третман	Број животиња
1.	Маст база	МБ	Еуцерин подлога	3
2.	Испитивана маст	СБМ	0,5% маст <i>P. sibirica</i>	3
4.	Гел база	ГБ	хидрофилни гел карбомера	3
3.	Испитивани гел	СБГ	0,5% гел <i>P. sibirica</i>	3

3.4.2. Испитивање антиинфламацијског ефекта

3.4.2.1. Експериментални модел инфламиране шапице

Карагенански тест на пацовима је експериментални модел за испитивање запаљења и антиинфламацијских својстава различитих супстанци (118). Овај тест се заснива на изазивању акутног запаљења код лабораторијских животиња, након убризгавања карагенана, природног полисахарида добијеног из црвених алги. 1% раствор карагенана се субплантарно убризгава у задњу шапу пацова, што изазива локализовану инфламацију. Овако изазвана инфламација се одвија у две фазе:

1. Рана фаза (прва 2 сата): која је посредована хистамином, серотонином и брадикинином, и због које долази до формирања едема
2. Касна фаза (3-4 сата након индукције): у којој доминира продукција простагландина и других цитокина

3.4.2.2. Спровођење карагенанског теста

Антиинфламацијски потенцијал топикалних формулација са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора одређен је карагенанским тестом на шапици пацова. У оквиру испитивања антиинфламацијског деловања коришћено је 60 *Wistar albino* пацова (старости 6-8 недеља, телесне масе 200-250g). Овај део истраживања је обухватио 6 група животиња које су приказане у **Табели 7**. Сат времена након топикалне примене одговарајућег дермалног препарата на леву задњу шапицу пацова ињектовано је 0,5 ml 1% раствора карагенана у циљу изазивања инфламације. Дебљина ткива шапе пацова је мерена дигиталним калипером пре изазивања инфламације (непосредно пре ињектовања карагенана), као и након један, два, три и четири сата од изазивања инфламације (119). Како карагенан изазива појаву едема, а примена дермалних формулација смањује инфламацију израчунат је проценат инхибиције инфламације према одговарајућој формули:

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

Y_t = просечно повећање дебљине шапе у третираној групи пацова између два тренутка мерења

Y_c = просечно повећање дебљине шапе у нетретираној групи пацова између два мерења.

Након спроведеног карагенанског теста, животиње су анестезиране и жртвоване цервикалном дислокацијом у циљу изоловања шапице за потребе биохемијских анализа.

Табела 7. Групе животиња за испитивање антиинфламацијског ефекта

Редни број	Испитивана група	Ознака групе	Третман	Број животиња
1.	Негативна контрола	К	/	10
2.	Позитивна контрола	ХК	1% хидрокортизон маст	10
3.	Маст база	МБ	Еуцерин подлога	10
4.	Испитивана маст	СБМ	0,5% маст <i>P. sibirica</i>	10
5.	Гел база	ГБ	хидрофилни гел карбомера	10
6.	Испитивани гел	СБГ	0,5% гел <i>P. sibirica</i>	10

3.4.2.3. Анализа параметара оксидационог стреса из хомогената ткива

У хомогенизованом ткиву шапе пацова су спектрофотометријски одређени прооксидациони маркер- индекс липидне пероксидације, мерен као TBARS као и активност ензима антиоксидационог система заштите: супероксид дисмутаза, каталаза, концентрација редукованог глутатиона.

3.4.2.3.1. Припрема узорка

Ткива леве шапице су хомогенизована у раствору PBS-у (енгл. *Phosphate buffered saline*) у односу 1:10. Хомогенати узорака су при брзини од 1200×g центрифугирани током 10 минута на 4°C, одакле је одвојен супернатант. Овако припремљен узорак је чуван на температури од -70°C до тренутка извођења биохемијске анализе.

3.4.2.3.2. Индекс липидне пероксидације — мерен као TBARS

Мерење концентрације TBARS-а (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) представља индиректну методу за добијање индекса липидне пероксидације. Сам поступак подразумева адекватну припрему узорка и следеће пробе, као и мерење апсорбанце спектрофотометријски на 530 nm таласне дужине (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*). Да би се анализа правилно спровела неопходно је 0,4 ml узорка и 0,2 ml 28% раствора трихлорсирћетне киселине (ТСА) помешати на вортекс мешалици и инкубирати на леду 15 минута. Након петнаестоминутног центрифугирања овако припремљеног раствора на 6000 rpm дошло је до издвајања супернатанта који нам је неопходан за даљи ток анализе. У следећем кораку анализе је помешано 0,4 ml издвојеног супернатанта са 0,1 ml 1% TBA у NaOH, и смеша је инкубирана 15 минута у

воденом купатилу на 100°C. Након хлађења узорка 10 минута на собној температури мерена је апсорбанца уз слепу пробу, а концентрација TBARS-а је израчуната на основу одговарајуће једначине (120).

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

A_u - апсорбанца узорка

A_{sp} - апсорбанца слепе пробе

3.4.2.3.3. Испитивање активности SOD

Супероксид дисмутаза је кључни ензим који има улогу у заштити ћелија од оксидативног стреса. Његова активност је одређена тако што је у 0,1 ml узорка додато 1 ml карбонатног пуфера и ова смеша промешана на вортекс мешалици. Након тога је у смешу додато 0,1 ml адреналина и мерена је апсорбанца спектрофотометријски у дупликату на 470 nm таласне дужине (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*). Као слепа проба коришћена је смеша 0,1 ml адреналина и 1 ml карбонатног пуфера (120).

3.4.2.3.4. Испитивање активности CAT

Активност каталазе је одређена праћењем брзине разградње водоник пероксида спектрофотометријски на таласној дужини од 230 nm (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*). Према протоколу, прво је урађено разблаживање узорка тако што је 100 μ l узорка помешано са 10 ml дестиловане воде и 100 μ l 70% етанола. Затим је припремљена смеша 100 μ l претходно направљеног раствора, 1 ml 10 mM H_2O_2 и 50 μ l пуфера за САТ пребачена у кварцне кивете и мерена је апсорбанца у секстету. Као слепа проба коришћена је смеша 50 μ l пуфера за САТ, 100 μ l дестиловане воде и 1ml 10 mM H_2O_2 . Након добијених шест вредности за сваку анализу, коришћењем одговарајуће схеме приликом које се прво врши одузимање а затим се рачуна аритметичка средина добијених вредности долази се до коначне вредности за активност каталазе (120).

3.4.2.3.5. Одређивање концентрације GSH

Концентрација редукованог глутатиона се одређује тако што је прво потребно направити екстракт GSH који се касније користи за припрему анализе којој се мери апсорбанца спектрофотометријски на 412 nm (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*). Да би добили екстракт, помешано је 50 μ l узорка, 100 μ l 0,1% EDTA и 385 μ l преципитационог пуфера на вортекс мешалици и остављено на леду да одстоји 15 минута. Овако прохлађена смеша је затим центрифугирана 10 минута на 4000 rpm. За даљи ток анализе помешано је 300 μ l претходно добијеног екстракта, 750 μ l натријум-дифосфата ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и 100 μ l 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензоевом киселином (DTNB). Након десетоминутне инкубације на собној температури мерена је апсорбанца уз коришћење слепе пробе. Као слепа проба коришћена је смеша 300 μ l дестиловане воде, 750 μ l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 100 μ l DTNB, а концентрација редукованог глутатиона је израчуната на основу конструисане калибрационе криве познатих концентрација стандардних раствора (120).

3.4.3. Ефикасност у зарастању рана

3.4.3.1. Изазивање дијабетес мелитуса код животиња

Након гладовања током ноћи, свим експерименталним животињама је примењена интраперитонеална инјекција стрептозотоцина (STZ, 50 mg/kg) у раствору 0,05М цитратног пуфера (pH = 4,5). Седамдесет два сата након примене STZ и дванаесточасовног гладовања, пацовима је мерен ниво глукозе у крви из репне вене. За мерење је коришћен глукометар (*Accu-Check®*), а само животиње којима је ниво глукозе у крви био изнад 11,1 mmol/l су укључене у даљи ток студије (47).

3.4.3.2. Изазивање рана типа ексцизије и њихов третман

Након седам дана од потврде дијабетес мелитуса, животиње су анестезиране интраперитонеалном применом мешавине ксилазина (10 mg/kg) и кетамина (5 mg/kg). Пре изазивања ране, леђа пацова су депилирана и дезинфикована 70% раствором етанола. Помоћу маказа и скалпела су изазване ране методом ексцизије величине 2 x 2 cm и дубине 2 mm (121).

Након потврде дијабетеса, пацови којима је изазвана рана методом ексцизије су смештени у одвојене кавезе и подељени у 6 група у односу на примењену дермалну формулацију. Групе животиња које су праћене у овом делу истраживања су приказане у Табели 8.

Табела 8. Групе животиња за испитивање ефикасности дермалних препарата

Редни број	Испитивана група	Ознака групе	Третман рана	Број животиња
1.	Негативна контрола	К	/	10
2.	Позитивна контрола	ССД	1% сребро-сулфадиазин	10
3.	Маст база	МБ	Еуцерин подлога	10
4.	Испитивана маст	СБМ	0,5% маст <i>P. sibirica</i>	10
5.	Гел база	ГБ	хидрофилни гел карбомера	10
6.	Испитивани гел	СБГ	0,5% гел <i>P. sibirica</i>	10

На рану сваке животиње је примењивано по 0,5 грама одговарајућег топикалног препарата, сваког дана уз помоћ стерилног памука током три недеље. Последњег дана истраживања, пацови су анестезирани интраперитонеалном применом мешавине ксилазина (10 mg/kg) и кетамина (5 mg/kg) и жртвовани (122).

3.4.3.3. Параметри за процену ефекта зарастања рана

3.4.3.3.1. Проценат контракције ране

Током експерименталног периода ране су фотографисане нултог дана, након недељу дана, након две и након три недеље (123). Промена површине ране мерена је помоћу софтвера: Image J software (version 2.9.0/1.54d) на основу чега је израчуната брзина контракције ране за сваку животињу посебно. За прерачунавање брзине зарастања рана коришћена је следећа формула:

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

n- дан од интереса (нулти, седми, четрнаести, двадесет први)

3.4.3.3.2. Маркери оксидационог стреса

3.4.3.3.2.1. Узорковање биолошког материјала

У циљу даљег испитивања, као узорци су коришћени ткиво коже и крв. На крају експерименталног протокола све животиње су анестезиране интраперитонеалном применом мешавине кетамина и ксилазина и жртвоване методом декапитације.

Крв је прикупљена одмах након жртвовања из југуларне вене пацова. Спектрофотометријским методама одређивани су следећи биомаркери оксидационог стреса из плазме (добијене центрифугирањем узорака крви): азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), пероксид анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2), и индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS. Такође је одређивана активност ензима антиоксидационог система заштите из лизата еритроцита и то: каталаза, супероксид дисмутаза, и концентрација редукованог глутатиона.

Ткиво коже у подручју где је претходно изазвана рана је издвојено уз помоћ маказа и скапела за хистопатолошка испитивања и одређивање садржаја хидроксипролина (86).

3.4.3.3.2.2. Одређивање азот моноксида у форми нитрита

Концентрација нитрита је одређена индиректном спектрофотометријском методом на таласној дужини од 550 nm (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*). За почетак је смеша припремљена од 200 μl узорка плазме, 100 μl перхлорне киселине и 400 μl EDTA инкубирана 15 минута на леду. Талог који је добијен након петнаестоминутног центрифугирања на 6000 rpm и декантовања супернатанта је помешан са 220 μl калијум-карбоната (K_2CO_3). За даљи ток анализе је коришћен овако добијен

новоформирани узорак. Други део анализе је подразумевао коришћење *Griess*-овог реагенса који је направљен мешањем једнаких запремина 1% сулфанилне киселине растворене у 5% орто-фосфорној киселини и 0,1% воденог раствора N-(1-нафтил)-етилendiамин-дихидрохлорида (NEDA). У новим, чистим спруветама је одмерено 200 μl новоформираног узорка, 250 μl свеже припремљеног *Griess*-овог реагенса и 125 μl пуфера за NO. Апсорбанца раствора је мерена након инкубације на собној температури у трајању од 15 минута. Слепа проба је припремљена на исти начин као и узорак, само што је уместо 200 μl узорка додата иста количина дестиловане воде (124). Помоћу одговарајуће једначине добијене су вредности концентрације ослобођених нитрита.

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

ΔE – коначна апсорбанца

E_y – апсорбанца узорка

E_{sp} – апсорбанца следе проба

F – аритметичка средина добијених стандарда

3.4.3.3.2.3. Одређивање супероксид анјон радикала

Поступак одређивања супероксид анјон радикала се базира на хемијској реакцији нитро тетразолијум плавог (енгл. *Nitro blue tetrazolium*) и O_2^- , у којој се као крајњи производ формира нитро формазон плави (енгл. *Nitro formazon blue*). Сама метода је спроведена тако што се у 50 μl узорка плазме додало 950 μl *ex tempore* припремљене есејне смеше и апсорбанца мери три пута уз мешање садржаја пре сваког мерења. Спектрофотометријско мерење је урађено на *UV-1800* спектрофотометру (*Shimadzu, Kyoto, Japan*) на таласној дужини од 550 nm, а као слепа проба је коришћена иста запремина дестиловане воде (124). Применом одговарајућих једначина је израчуната концентрација ослобођеног O_2^- .

$$\Delta E_y = E_{2y} - E_{1y}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp}$$

$$\Delta E = \Delta E_y - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml плазме} = \Delta E / 0,015 \times 1/0,05$$

ΔE - коначна апсорбанца

E_y - апсорбанца узорка

E_{sp} - апсорбанца следе проба

3.4.3.3.2.4. Одређивање водоник-пероксида

Концентрација водоник-пероксида се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 610 nm (*UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan*), и заснива се на реакцији оксидације фенол црвеног помоћу H_2O_2 уз присуство пероксидазе као катализатора. 200 μl узорка плазме је помешано са 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl пероксидазе (POD) и таква смеша је инкубирана десет минута на собној температури. С обзиром да

је за формирање и ослобађање H_2O_2 потребно од 5 до 60 минута, у складу са тим је и извршено мерење апсорбанце. Слепа проба је припремљена на исти начин, само је уместо узорка плазме одмерена иста количина дестиловане воде, док су за прерачун концентрације H_2O_2 коришћене одговарајуће једначине (124).

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

$$F = \Delta A / \text{nmol } H_2O_2 / \text{cuv}$$

$$\text{nmol } H_2O_2 / \text{ml плазма} = \Delta A / F$$

F - фактор апсорбанце/nmol H_2O_2

ΔA - коначна апсорбанца

A_y - апсорбанца узорка

A_{sp} - апсорбанца слепе пробе

3.4.3.3.2.5. Одређивање индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Одређивање индекса липидне пероксидације из крви жртвованих пацова је спроведено на исти начин како је описано у **Поглављу 3.4.2.3.2.**

3.4.3.3.2.6. Одређивање активност ензима антиоксидационог система заштите

Поступци за одређивање активности ензима CAT и SOD, као и концентрација GSH су претходно описани у поглављима: **3.4.2.3.3;** **3.4.2.3.4.** и **3.4.2.3.5.** Узорци који су се користили за ова испитивања су добијени из југуларне вене жртвованих животиња.

3.4.3.3.3. Садржај хидроксипролина

3.4.3.3.3.1. Узорковање биолошког материјала

На крају експерименталног протокола све животиње су анестезиране интраперитонеалном применом мешавине кетамина и ксилазина и жртвоване методом декапитације. Као узорак у овом делу истраживања коришћено је ткиво коже са подручја на којем је претходно изазвана рана методом ексцизије. Након жртвовања животиња, уз помоћ маказа и скалпела су издвојени узорци ткива.

3.4.3.3.3.2. Одређивање садржаја хидроксипролина

Из прикупљеног ткива коже је спектрофотометријском анализом одређен ниво хидроксипролина као индиректног маркера синтезе колагена. Ткиво ране пацова је сушено на 60-70°C током 12-18 сати. Измерени узорци су пренети у чисту, стаклену епрувету у коју је додато по 1 ml раствора HCl на сваких 10 mg сувог узорка. Након инкубације на температури од 130°C током 4h добијен је хидролизат. Хидролизат ткива је подвргнут петнаестоминутном центрифугирању на 3000 rpm. Следећи корак је био

одвајање супернатанта у засебну епрувету, у којој је разблажен са 1 ml пуферског раствора (који је добијен мешањем лимунске киселине, натријум-хидроксида и безводног натријум-ацетата). Затим је разблажени узорак помешан на вортексу са 1 ml хлорамина Т. Након 20 минута је додат Ерлихов реагенс, смеша је снажно промешана и остављена да се инкубира на температури од 60°C током 30 минута. Последњи корак у овој анализи био је мерење апсорбанце на 558 nm спектрофотометром (*Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan*). Резултат је представљен као садржај хидроксипролина као $\mu\text{g}/\text{mg}$ осушене тежине ткива (125).

3.4.3.3.4. Хистолошка анализа

3.4.3.3.4.1. Припрема узорка за анализу

Након завршеног експерименталног протокола део узорка коже са подручја ране, укључујући дермис, епидермис и поткожно ткиво је коришћено за хистопатолошка истраживања. Узорци коже са подручја ране су фиксирани у 10% пуферизованом параформалдехиду на 4°C током 24h. Прво су ткива дехидрирана у изопропил алкохолу растућих концентрација (70%, 80%, 96% и 100%), просветљена у ксилолу и након тога уграђена у парафинске калупе. Калупи са узорцима ткива су сечени на секције дебљине 5 микрона уз помоћ ротирајућег микротоме (*Leica, Wetzlar, Germany*). Након сечења узорци су испирани у воденом купатилу и прикупљени стандардним предметним стаклима, док су узорци за имунохистохемијску анализу прикупљени адхезивним стаклима (*Superfrost™ Ultra Plus, Thermo Scientific, USA*). Патохистолошка анализа је одрађена од стране патолога који није имао информације о третманима.

3.4.3.3.4.2. Бојење препарата хематоксилин/еозин методом

У циљу посматрања морфолошких промена у ткиву коже, узорци су бојени хематоксилин/еозин методом. За почетак је било неопходно извршити процес депарафинизације, који је обављен тако што су се парафинске секције отопиле у термостату за 45 минута на температури од 56°C. Предметна стакла са пресеком ткива су затим потопљена у ксилол, проведена кроз серију алкохола у опадајућим концентрацијама (100%, 96%, 80%, 70% алкохол) и испирана дестилованом водом. Овако припремљени препарати су 5 минута бојени Мајеровим раствором хематоксилина (*Sigma Aldrich*), испрани у дестилованој води, а затим бојени 2% раствором еозина (*Sigma Aldrich*) у трајању од 2 минута. Затим је извршена дехидратација узорака коришћењем серије алкохола у растућим концентрацијама (70%, 80%, 96%, 100% алкохол), и просветљење потапањем у раствор ксилола (2 x 5 минута). Овако припремљени препарати се на крају прекривају покровним стаклом уз помоћ DPX (*Sigma-Aldrich, Co., USA*), и оставе на сушење 24 сата. Резултати су добијени посматрањем препарата под светлосним микроскопом (*DMLB 100T, Leica, Wetzlar, Germany*) и представљени у форми слика.

3.4.3.3.4.3. Имунохистохемијско бојење препарата

Имунохистохемијско бојење је коришћено за одређивање микроструктуре коже, укључујући епителизацију, пролиферацију фибробласта, васкуларизацију и стварање гранулационог ткива. Имунохистохемијски маркери коришћени за ово бојење су: пацовски anti-MMP9 у разблажењу 1:25 (*Lab Vision; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*); пацовски anti-колаген I у разблажењу 1:300 (*Abcam; Cambridge, UK*); пацовски anti-CD34 у разблажењу 1:3500 (*Abcam; Cambridge, UK*); и пацовски anti-Iba1 у разблажењу 1:8000 (*Abcam; Cambridge, UK*). За визуелизацију су коришћени системи за детекцију: Mouse and Rabbit EnVision Detection Systems, ИНС комплет за детекцију пероксидазе/DAB (*DAKO Agilent; Manchester, UK*). Пре почетка процеса имунохистохемијског бојења неопходно је прво извршити депарафинизацију и рехидратацију парафинских секција узорака ткива као што је описано у претходном поглављу. Затим је, пре примене антитела, извршено демаскирање формалином умрежених епитопа кувањем ткивних исечака у одговарајућим пуферима. За anti-колаген I и anti-MMP9 коришћен је TRIS базни пуфер (pH 8,2), док је за anti-CD34 и anti-Iba1 коришћен је цитратни пуфер (pH 6,0). Затим је било неопходно блокирати активност ендogene пероксидације што је урађено додавањем 3% раствора водоник-пероксида, и испирањем у PBS-у. Раствори антитела су примењивани 60 минута у влажној комори на собној температури након чега су плочице поново испиране са PBS-ом. На ткивне исечке је након испирања додата *Streptavidin Peroxidase* у трајању од 10 минута уз поновно испирање коришћењем PBS-а. У следећем кораку ткивни исечци су третирани 3,3'-диаминобензидином (DAB реагенсом), инкубирани и испрани дестилованом водом. Контрастирање је постигнуто уз помоћ Мајеровог хематоксилен раствора, након чега су узорци испрани дестилованом водом, дехидрирани и просветљени већ описаним, одговарајућим поступком. Последњи корак је био постављене покровних стакла помоћу DPX (*Sigma Aldrich, Co., USA*). Анализа плочица је урађена помоћу Leica DMLB 100T (*Leica, Wetzlar, Germany*) професионалним биолошким микроскопом, а плочице су скениране помоћу дигиталног микроскопа VisionTek® (*Sakura, Osaka, Japan*) након сушења у трајању од 24 часа.

3.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је добијен на основу резултата претходно публиковане студије. За прорачун је коришћен t-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма. Узимањем у обзир резултате наведене студије (85), укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 108. Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупан студијски узорак је утврђен на најмање 138 експерименталних животиња.

3.6. Статистичка обрада података

Статистичка анализа резултата је спроведена коришћењем статистичког програма IBM SPSS 21.0 за *Windows* (*IBM SPSS, IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Сви добијени подаци су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD). Графикони су направљени у *Microsoft Excel*-у. Подаци су процењени путем

једносмерне *ANOVA* праћене Тукијевим вишеструким поређењем *post hoc* тестова, користећи IBM SPSS, верзија 20. *p*-вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним.

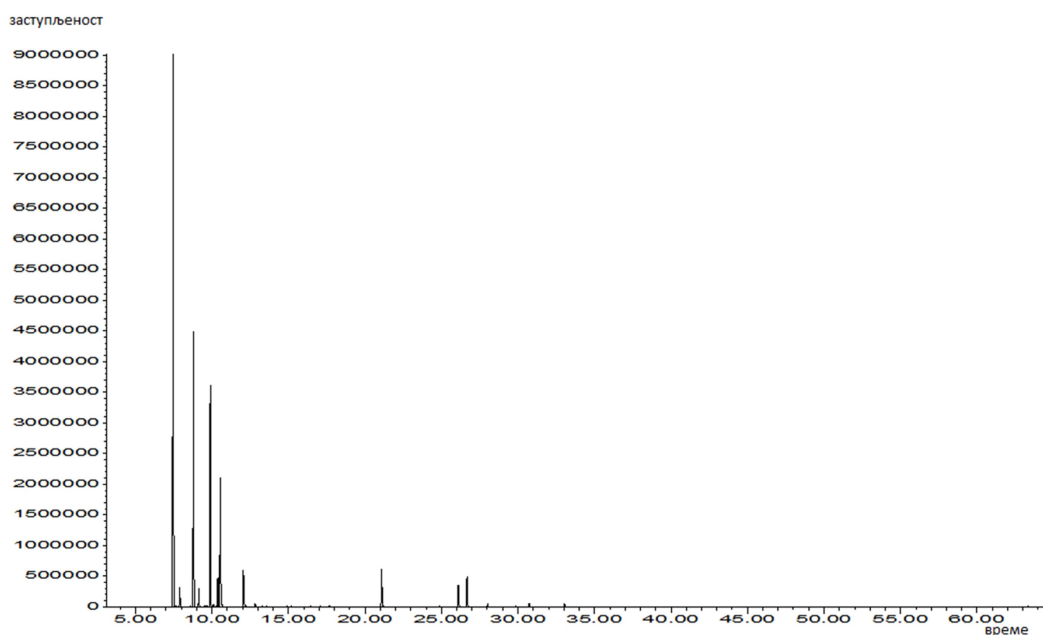
IV

РЕЗУЛТАТИ

4. Резултати

4.1. Хемијски састав етарског уља сибирског бора

Коришћењем GC-MS методе је испитан хемијски састав етарског уља иглица сибирског бора. Детаљан приказ квалитативног и квантитативног састава се налази у **Табели 9**. Анализом је одређено 99,32% укупног састава уља, од чега је идентификовано 16 компоненти. Група хемијских једињења која је заступљена у највећем проценту од 88,62% јесу монотерпени. Представници монотерпена који су у највећој мери идентификовани су: α -пинен (40,19%), β -пинен (19,64%) и δ -карен (16,14%). На **Фигури 5** је приказан изглед хроматограма етарског уља иглица сибирског бора.



Фигура 5. Хроматограм гасне хроматографије-масене спектроскопије етарског уља *P. sibirica*

Табела 9. Квалитативни и квантитативни састав етарског уља сибирског бора

Редни број	Назив компоненте	Ретенционо време (min)	%
1	α -пинен	7,481	40,19
2	камфен	7,907	1,17
3	β -пинен	8,804	19,64
4	β -мирцен	9,146	1,13
5	δ -3-карен	9,902	16,14
6	α -терпинен	10,102	0,22
7	о-цимен	10,386	2,06
8	D-лимонен	10,553	9,92
9	еукалиптол	10,66	0,12
10	терпинолен	12,825	0,25
11	борнил ацетат	21,099	0,13
12	лонгифолен	26,112	3,18
13	кариофилен	26,668	1,97
14	хумулен	28,028	2,59
15	δ -кадинен	30,734	0,27
16	кариофилен оксид	33,047	0,34
Укупан % идентификованих једињења			99,32

4.2. Антиоксидациона активност етарског уља сибирског бора

У Табели 10. су приказани резултати испитивања антиоксидационог потенцијала методом DPPH, OH и липидне пероксидације, као и резултати редукционог потенцијала етарског уља сибирског бора FRAP методом. Резултати су приказани као IC₅₀, односно концентрација испитиваног узорка која је потребна да би се почетна концентрација DPPH или OH радикала смањила за 50%. Најјачу способност неутрализације DPPH радикала је показао стандард аскорбинске киселине са IC₅₀ вредношћу 9,08 ± 1,95 µg/ml. Затим следи тролокс са IC₅₀ вредношћу од 14,27 ± 3,81 µg/ml, док је етарско уље сибирског бора (19,45 ± 7,69 µg/ml) показало најмању антиоксидативну активност.

Испитивањем антиоксидационе активности путем хидроксил радикала дошли смо до резултата који показују да је потребно чак 46,99 ± 11,88 µg/ml ЕУСБ да би се постигло 50% инхибиције OH радикала. Са друге стране, што се тиче испитиваних стандарда, аскорбинска киселина (8,28 ± 0,24 µg/ml) је и у овом тесту показала најјачу способност неутрализације OH радикала, а одмах за њом следи и тролокс (12,40 ± 0,40 µg/ml) са нешто слабијом антиоксидативном активношћу.

Када говоримо о способности ЕУСБ да инхибира липидну пероксидацију, из приложених резултата можемо видети да је вредност бутилованог хидрокситолуена скоро дупло мања од вредности за ЕУСБ. Односно, ВНТ (6,89 ± 0,78 µg/ml) има двоструко већу способност инхибиције липидне пероксидације од испитиваног узорка ЕУСБ (12,11 ± 1,52 µg/ml).

За редукциони потенцијал ЕУСБ мерена је апсорбанца при различитим концентрацијама уз аскорбинску киселину и тролокс као стандарде. Добијени резултати су изражени у еквивалентима аскорбинске киселине, одакле се уочава најбољи ефекат код аскорбинске киселине (0,281 mg AKE/ml), док је ефекат ЕУСБ значајно мањи (0,092 mg AKE/ml).

Табела 10. Антиоксидациона активност етарског уља сибирског бора и референтних стандарда

Испитивани узорак	DPPH· (IC ₅₀ µg/ml)	OH· (IC ₅₀ µg/ml)	Липидна пероксидација (IC ₅₀ µg/ml)	FRAP (mg AKE/ml етарског уља)
ЕУСБ	19,45 ± 7,69	46,99 ± 11,88	12,11 ± 1,52	0,092
АА	9,08 ± 1,95	8,28 ± 0,24		0,281
Тролокс	14,27 ± 3,81	12,40 ± 0,40		0,204
ВНТ			6,89 ± 0,78	

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација.

ЕУСБ – етарско уље сибирског бора; АА – аскорбинска киселина; ВНТ – бутил-хидрокси толуен; DPPH·- 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал; OH·- хидроксил радикал; FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*; AKE -еквивалент аскорбинске киселине.

4.3. Анализа топикалних формулација

4.3.1. Органолептичка испитивања

Органолептичким испитивањем на собној температури добијени су резултати који су приказани у **Табели 11**. Маст је била получврсте конзистенције, жуте боје, без грудвица, лако се наносила и остављала лепљив траг након примене на кожи. Топикалне формулације типа гела су биле транспарентне, без грудвица, лако су се наносиле, остављајући пријатан осећај хлађења након примене на кожу. Обе формулације су карактеристичног мириса због додатка ЕУСБ. Органолептичко испитивање је поновљено након 6 месеци, током којих су дерматолошки препарати чувани у пластичним кутијама на собној температури. У испитиваном периоду нису уочене промене у погледу боје, мириса, конзистенције, хомогености, као и осећаја након примене.

Табела 11. Основне карактеристике топикалних формулација са етарским уљем сибирског бора

Формулација Карактеристике	Маст са сибирским бором		Гел са сибирским бором	
	1 дан	6 месеци	1 дан	6 месеци
Боја	Жута	Жута	Прозирна	Прозирна
Мирис	Специфичан због ЕУСБ	Специфичан због ЕУСБ	Специфичан због ЕУСБ	Специфичан због ЕУСБ
Хомогеност	Без грудвица	Без грудвица	Без грудвица	Без грудвица
Конзистенција	Получврста	Получврста	Получврста	Получврста
Осећај након примене	Мастан и лепљив	Мастан и лепљив	Пријатан	Пријатан

ЕУСБ- етарско уље сибирског бора

4.3.2. Способност прања

Након испирања дестилованом водом топикалних препарата примењених на кожи утврђено је да се препарати типа гела могу веома лако уклонити, док се препарати типа масти знатно теже уклањају.

4.3.3. Тест центрифугирања

Испитивање је показало да и након тридесет минута центрифугирања није било знакова физичке нестабилности, тј узорци су остали стабилни и непромењени.

4.3.4. Испитивање проводљивости и рН вредности

Одређивање проводљивости и рН вредности је рађено на топикалној формулацији типа гела. Праћене су промене у циљу поређења базе гела (гел карбомера) и гела са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора. Резултати проводљивости и рН вредности су приказане у **Табели 12**, где се може видети да додатак етарског уља у гел базу није утицао на промену рН вредности, док се електрична проводљивост незнатно смањила додатком етарског уља.

Табела 12. рН вредност и електрична проводљивост препарата

Испитивани узорак	рН вредност	Електрична проводљивост ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Гел база	$5,84 \pm 0,11$	$77,50 \pm 0,56$
Гел са сибирским бором	$6,21 \pm 0,14$	$72,5 \pm 0,67$

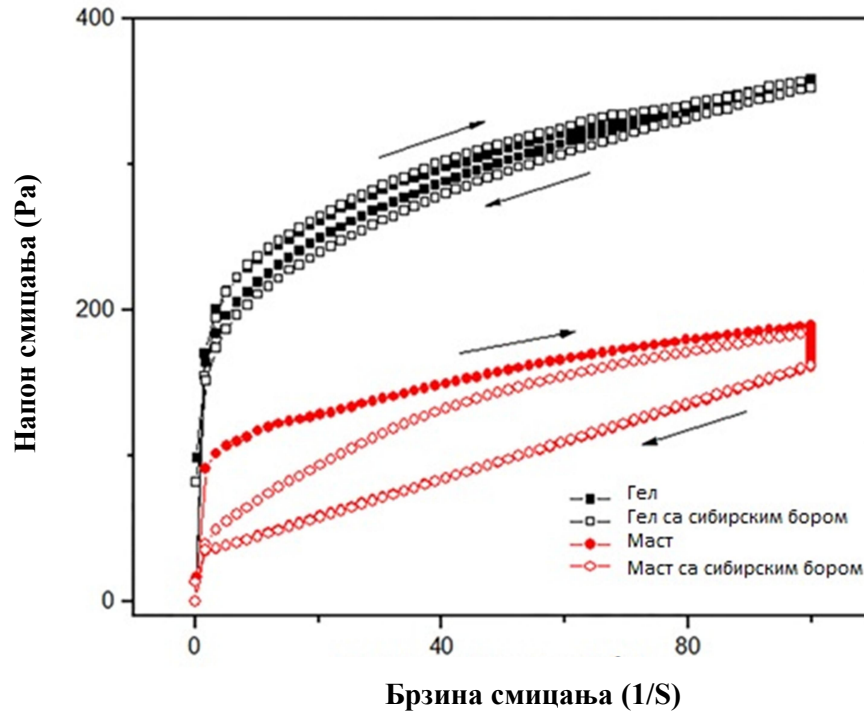
Приказане су вредности као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($n = 3$)

4.3.5. Реолошке особине топикалних формулација

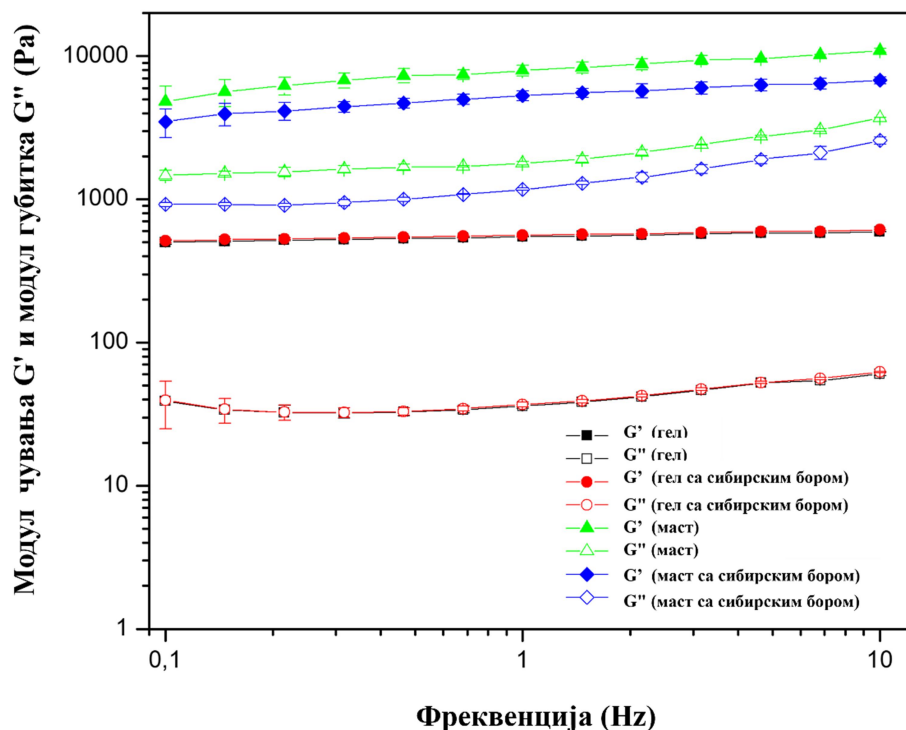
Реолошком анализом препарата типа гела и масти, са и без додатка етарског уља сибирског бора се може закључити да све формулације показују тиксотропно понашање. Криве протицања, које показују зависност напона смицања од брзине смицања при константној температури од 25°C , гела и масти (са и без додатка етарског уља сибирског бора) приказани су на **Фигури 6**. На реограму се види присуство хистерезне површине код обе формулације што потврђује тиксотропно понашање. Ова врста понашања протока је карактеристична за гелове и масти и представља жељено својство топикалних препарата. У мастима се формирају слабе везе између неполарних компонената које пуцају при смицању. Примећено је да се вискозитет масти мањује са повећањем брзине смицања. Када су у питању гелови тиксотропно течење је карактеристично за њих јер се полимерни ланци при смицању распадају. Такође вискозитет гела се смањује са повећањем брзине смицања.

Резултати теста амплитудног осцилаторног мерења за све тестиране формулације су приказани на **Фигури 7**. Евидентно је да је за све испитиване препарате модул чувања (G') био већи од модула губитка (G'') у читавом опсегу примењених фреквенција, што недвосмислено указује да су се у датом опсегу фреквенција сви испитивани препарати понашали као вискоеластичне чврсте материје. Додавање ЕУСБ у формулацију гела није изазвало промену вискоеластичних својстава, док је његово

додавање масти довело до смањења и еластичног и вискозног модула у читавом опсегу утврђених фреквенција.



Фигура 6. Зависност напона смицања од брзине смицања код гела и маст и без и са етарским уљем сибирског бора



Фигура 7. Зависност модула чувања (G') и модула губитка (G'') од фреквенције за гел и маст и без и са етарским уљем сибирског бора

4.4. Акутна дермална иритација

Испитивањем акутне дермалне иритације на животињама, маст са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора није показала знакове нежељених ефеката као што су едем, еритем, пруритис или инфламација. Ово потврђују резултати мерења еритема и едема, са укупним скором 0. Такође нису забележени ни други знаци токсичности, као ни појава морталитета у испитиваној групи. Током 14 дана посматрања, нису примећени знаци токсичности чиме је утврђено да је маст са ЕУСБ безбедна за употребу.

Група животиња којима је примењен гел са инкорпорираним ЕУСБ није показала знакове токсичности као што су дијареја, дрхтавица и конвулзије. Током 14 дана посматрања, није забележена појава морталитета, као ни појава едема, еритема, пруритиса или инфламације. На основу скора формирања едема и еритема, чији је скор 0 се може закључити да је гел са ЕУСБ безбедан за употребу.

4.5. Испитивање антиинфламацијског потенцијала топикалних формулација

4.5.1. Мерење дебљине шапе пацова

Резултати *in vivo* испитивања антиинфламацијског ефекта гела и масти на моделу карагенаном индукованог отока шапе пацова током 4 сата су приказани у **Табели 13**. Из приложених резултата се може видети да примена базе масти и базе гела није имала значајан ефекат на инхибицију едема шапице у свим временским периодима, за разлику од позитивне контроле, где се јасно види најизраженији ефекат примене хидрокортизона.

Хидрокортизон, који се користи као стандардни антиинфламаторни лек је од почетка испитивања имао најбоље резултате, са највећим процентом инхибиције од 67,86% у четвртом сату. Применом масти на карагенаном индукован едем шапице се примећује значајна инхибиција од 23,02% у трећем и од 45,44% у четвртом сату. Проценат инхибиције едема шапице применом масти је приказан у **Табели 13**.

Иако је хидрокортизон показао најбољи ефекат, ефекат гела са сибирским бором је показао значајну инхибицију у два временска тренутка. У трећем сату проценат инхибиције је износио 20,41%, док је у четвртом сату тај проценат порастао до 41,23%. У овом испитивању, поред хидрокортизона који је показао најбољи ефекат, обе топикалне формулације на бази сибирског бора су такође показале значајне ефекте на моделу инфламације.

Табела 13. Карагенански тест за испитивање антиинфламацијског ефекта

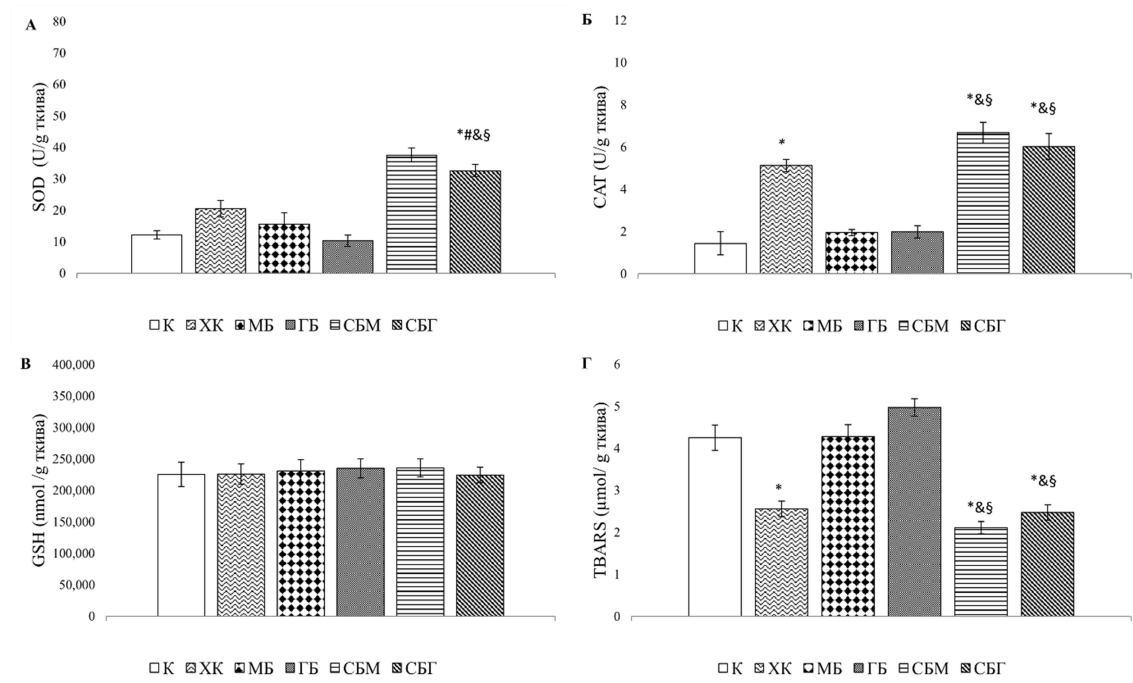
Дебљина шапе пацова (mm) (% инхибиције)					
	0h	1h	2h	3h	4h
МБ	1,35 ± 0,29	2,91 ± 0,33 (3,11%)	5,32 ± 0,45 (6,05%)	4,88 ± 0,29 (7,13%)	4,57 ± 0,44 (8,53%)
ГБ	1,58 ± 0,37	2,84 ± 0,25 (2,89%)	5,22 ± 0,67 (5,32%)	5,03 ± 0,49 (6,16%)	4,62 ± 0,33 (7,84%)
СБМ	1,49 ± 0,05	2,77 ± 0,23 (3,6%)	3,78 ± 0,26 (13,20%)	3,62 ± 0,22 (23,02%)*	2,15 ± 0,33 (45,44%)*
СБГ	1,72 ± 0,19	2,67 ± 0,11 (4,2%)	4,27 ± 0,24 (12,22%)	4,01 ± 0,33 (20,41%)*	2,45 ± 0,18 (41,23%)*
ХК	1,66 ± 0,33	2,55 ± 0,45 (15,50%)	3,28 ± 0,28 (29,06%)*	3,50 ± 0,15 (51,24%)*	2,79 ± 0,21 (67,86%)*
К	1,50 ± 0,16	3,15 ± 0,10	5,55 ± 0,17	5,10 ± 0,12	5,05 ± 0,42

Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација ($n=8$). *Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на контролну групу. МБ-маст база; ГБ- гел база; СБМ- маст са сибирским бором; СБГ- гел са сибирским бором; ХК- хидрокортизон, К- контрола.

4.5.2. Параметри оксидационог стреса у хомогенату шапе пацова

Примена топикалних формулација и њихов ефекат на параметре оксидационог стреса је приказан на **Фигури 8**.

Испитивањем SOD и CAT у хомогенату ткива забележено је значајно повећање активности ензима код препарата типа масти и гела на бази сибирског бора у односу на контролу (**Фигура 8А, Б**). Концентрација редукованог глутатиона се није мењала приликом поређења између испитиваних група (**Фигура 8В**). У поређењу са контролном групом и подлогама за маст и гел, вредности прооксидационог маркера TBARS су биле значајно ниже у односу на групу животиња које су биле третиране формулацијама на бази сибирског бора (**Фигура 8Г**).



Фигура 8. Утицај апликованих формулација на параметре оксидационог стреса у хомогенату ткива шапе: А) SOD; Б) CAT; В) GSH; Г) TBARS. Приказане су вредности као средња вредност $\pm$ стандардна девијација. * $p < 0,05$ у поређењу са К групом; # $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; & $p < 0,05$ у поређењу са МБ групом; § $p < 0,05$ у поређењу са ГБ групом; К- нетретирана контролна група; ССД-1% сребро

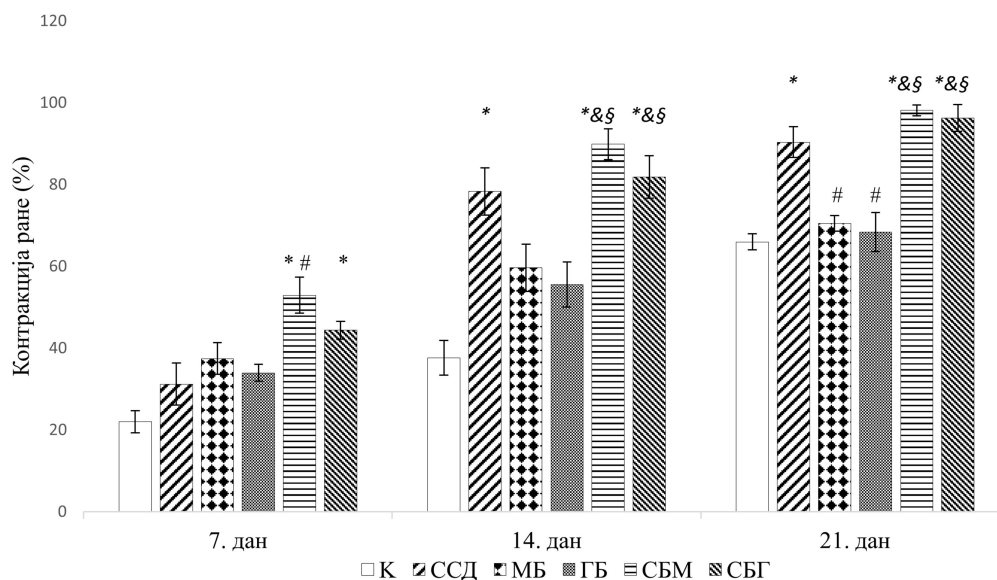
сулфадиазинска група; МБ-маст база; ГБ-гел база; СБМ- маст са сибирским бором; СБГ- гел са сибирским бором.

4.6. Зарастање рана

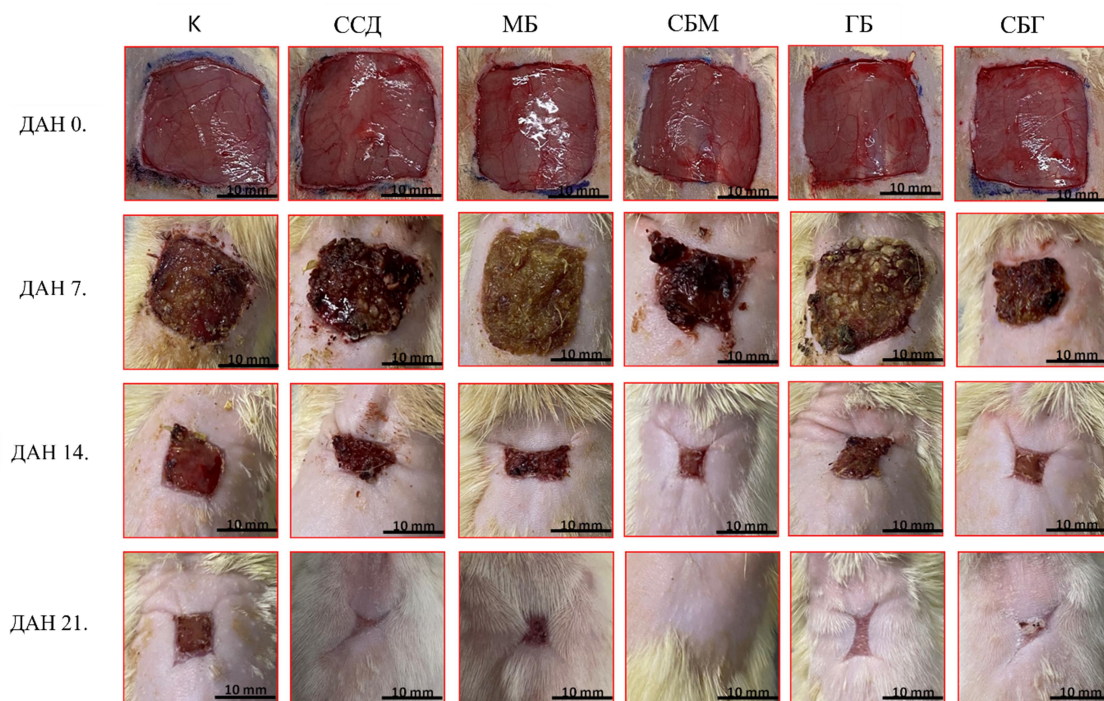
4.6.1. Брзина зарастања рана

Експерименталне животиње са потврђеним дијабетесом и раном изазваном методом ексцизије су свакодневно третиране одговарајућим топикалним препаратом, а промене су евидентирани и фотографисане нултог, седмог, четрнаестог и двадесетпрвог дана. На **Слици 1.** се могу јасно уочити промене и сам процес зарастања рана применом топикалних препарата 1% сребро сулфадиазина; базе масти; базе гела; као и масти и гела са етарским уљем сибирског бора током три недеље. На основу измерене величине ране израчунат је проценат контракције, а добијени резултати су приказани на **Фигури 9.** Већ након недељу дана је примећено да и маст и гел са инкорпорираним ЕУСБ имају бољи ефекат на зарастање рана у односу на контролу и примењене базе. Примећена је интересантна чињеница да је проценат контракције ране третиране са СБМ седмог дана испитивања био значајно већи од позитивне контроле где је рана третирана са сребро сулфадиазином. Након четрнаест дана највећи проценат зарастања ране примећен је у групама третираним СБМ (89,86%) и СБГ (81,84%), што нам указује на то да је примена препарата са етарским уљем сибирског бора показала брже зарастање рана у односу на контролну групу и у односу на групе третиране подлогама.

Упоређивањем ефекта масти и гела са етарским уљем сибирског бора није забележена статистички значајна разлика, иако се из приложених резултата може приметити да препарат типа масти има незнатно бољи ефекат у односу препарат типа гела у свим тренуцима праћења, односно у 7, 14. и 21. дану. На крају експерименталног протокола, после тронедељне локалне примене топикалних формулација, животиње третиране са 0,5% ЕУСБ масти и 0,5% ЕУСБ гелом показале су значајно затварање ране у поређењу са контролном, МБ и ГБ групама. Са друге стране, иако је максималан проценат затварања ране примећен је у групама СБМ (98,14%), СБГ (96,28%) није било статистички значајне разлике у поређењу са ССД групом.



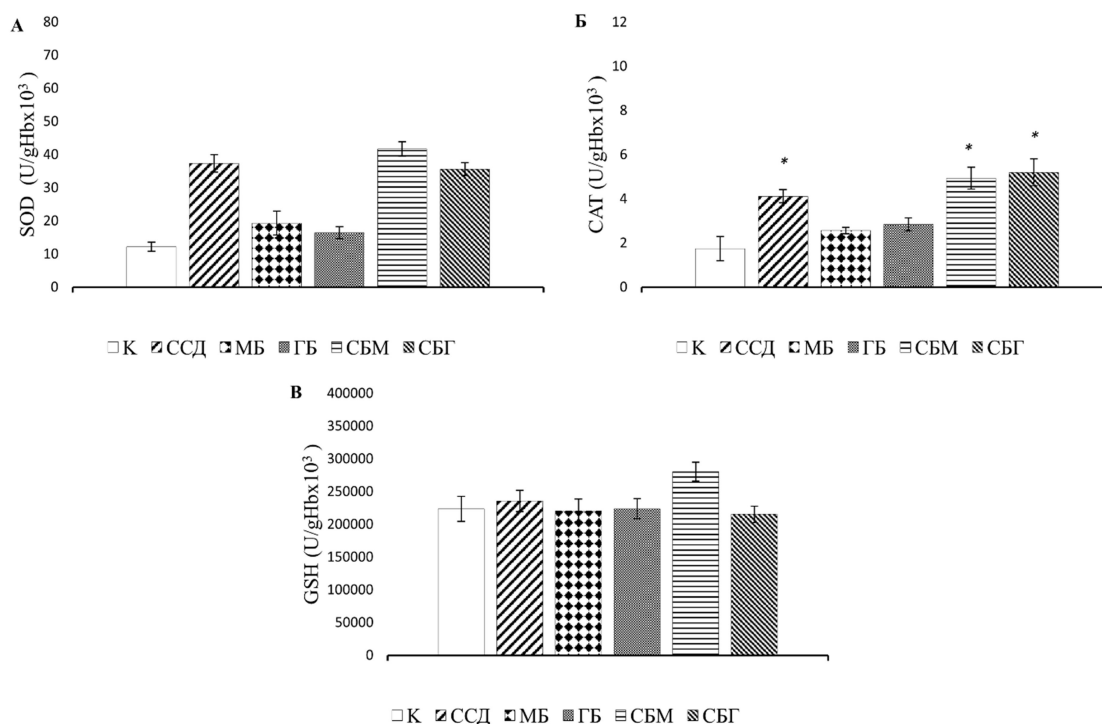
Фигура 9. Утицај полуврстих формулација на проценат зарастања рана код дијабетичних пацова. Приказане су вредности као средња вредност $\pm$ стандардна девијација. * $p < 0,05$ у поређењу са К групом; # $p < 0,05$ у поређењу са ССД групом; & $p < 0,05$ у поређењу са МБ групом; § $p < 0,05$ у поређењу са ГБ групом; К- нетретирана контролна група; ССД-1% сребро сулфадиазинска група; МБ-маст база; ГБ-гел база; СБМ- маст са сибирским бором; СБГ- гел са сибирским бором.



Слика 1. Утицај дермалних формулација на зарастање рана током три недеље. К- нетретирани контролна група; ССД- 1% сребро сулфадиазинска група; МБ- маст база; ГБ- гел база; СБМ- маст са сибирским бором; СБГ- гел са сибирским бором

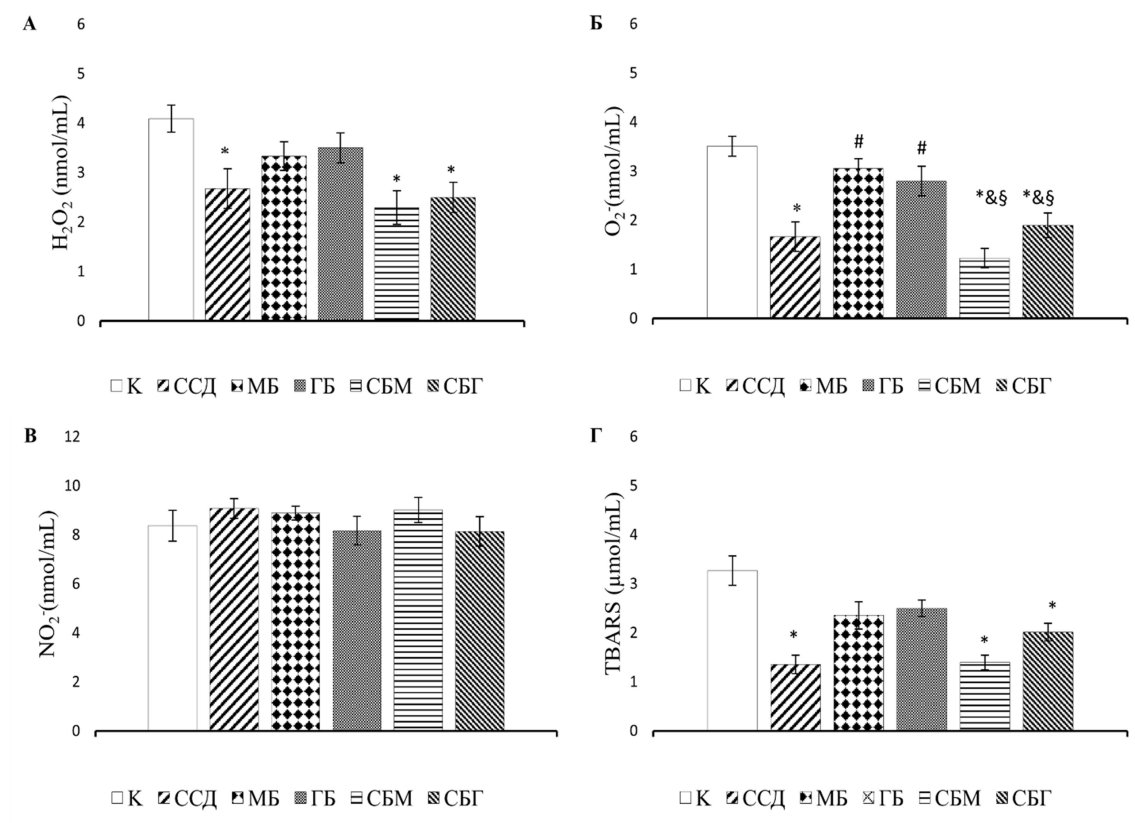
4.6.2. Параметри оксидационог стреса из крви

Вредности маркера антиоксидационе заштите представљени су на **Фигури 10.** где су приказане активности каталазе, супероксид дисмутазе и нивоа редукованог глутатиона. Примена масти и гела са ЕУСБ као и примена ССД су довеле до значајног повећања нивоа SOD и CAT у поређењу са групом која није третирана испитиваним препаратима. Такође, активност SOD је значајно повећана у СБМ и СБГ групама, када се упоређи вредности овог ензима са групама третираним само базама за маст и гел. Ниједан од топикалних третмана није значајно утицао на ниво GSH.



Фигура 10. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у крви пацова: А) SOD; Б) CAT; В) GSH. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација. * статистичка значајност при $p < 0,05$ у односу на К групу; & статистичка значајност на $p < 0,05$ у односу на МБ групу; § статистичка значајност при $p < 0,05$ у односу на ГБ групу. К-нетретирана контролна група; ССД- 1% сребро сулфадиазинска група; МБ- маст база; ГБ- гел база; СБМ- маст са сибирским бором; СБГ- гел са сибирским бором.

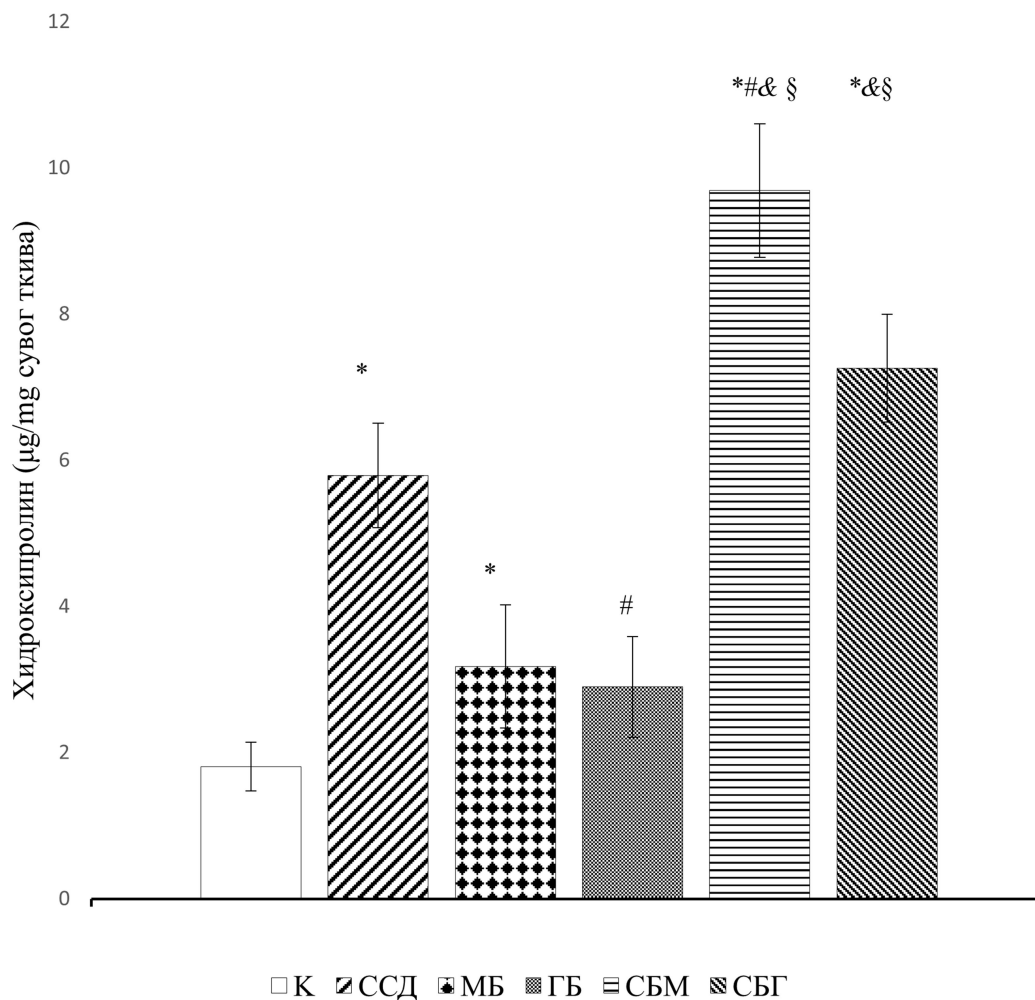
Ниво прооксидационих маркера одређених у плазми животиња третираних одговарајућим топикалним формулацијама, у моделу рана изазваних ексцизијом, представљени су на **Фигури 11**. Најнижа концентрација O_2^- радикала је примећена код групе животиња које су третиране машћу са сибирским бором, која је јако слична оној код позитивне контроле. Значајно смањење O_2^- радикала је такође примећено код групе третиране препаратом типа гела са ЕУСБ у односу на контролу и примењене подлоге (МБ и ГБ). Нивои ослобађања водоник пероксида су такође смањени у групама третираним са 1% ССД, 0,5% СБМ и 0,5% СБГ у односу на нетретирану (К) групу. Међутим, није било статистички значајне разлике када ове резултате упоредимо са примењеним подлогама. Слично претходним резултатима, топикална примена масти и гела са ЕУСБ је довела до статистички значајне промене у погледу нивоа TBARS у односу на негативну контролу. Посматрањем утицаја позитивне контроле на ниво TBARS се може закључити да су резултати испитиваних препарата (СБМ и СБГ) слични, али и да промена није значајна у односу на примењене подлоге (МБ и ГБ). Када говоримо о нивоу азот монооксида, можемо приметити да није дошло до значајне промене концентрације ни у контролним ни у испитиваним групама.



Фигура 11. Ефекти примењених формулација на маркере оксидационог стреса у крви пацова: А) H_2O_2 ; Б) O_2 ; В) NO_2 ; Г) TBARS. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација. * статистичка значајност при $p < 0,05$ у односу на К групу; # статистичка значајност на $p < 0,05$ у односу на ССД групу; & статистичка значајност на $p < 0,05$ у односу на МБ групу; § статистичка значајност при $p < 0,05$ у односу на ГБ групу. К-нетретирана контролна група; ССД-1% сребро сулфадиазинска група; МБ-маст база; ГБ-гел база; СБМ-маст са сибирским бором; СБГ-гел са сибирским бором.

4.6.3. Садржај хидроксипролина

На **Фигури 12.** је графички приказан ниво хидроксипролина у испитиваним узорцима ткива. Након 21. дана примене 1% сребро сулфадиазина, као позитивне контроле, дошло је до умереног повећања нивоа хидроксипролина у односу на контролну-нетретирану групу и групу третирану само гел базом. Нивои хидроксипролина након примене базе масти и базе гела су већи него код нетретиране групе, док су у односу на позитивну контролу значајно нижи. Са друге стране примена гела и масти са ЕУСБ довела до још већих нивоа хидроксипролина у односу на негативну контролу. Док је највиши ниво хидроксипролина у узорцима ткива коже забележен у групи третираној машћу на бази етарског уља сибирског бора.

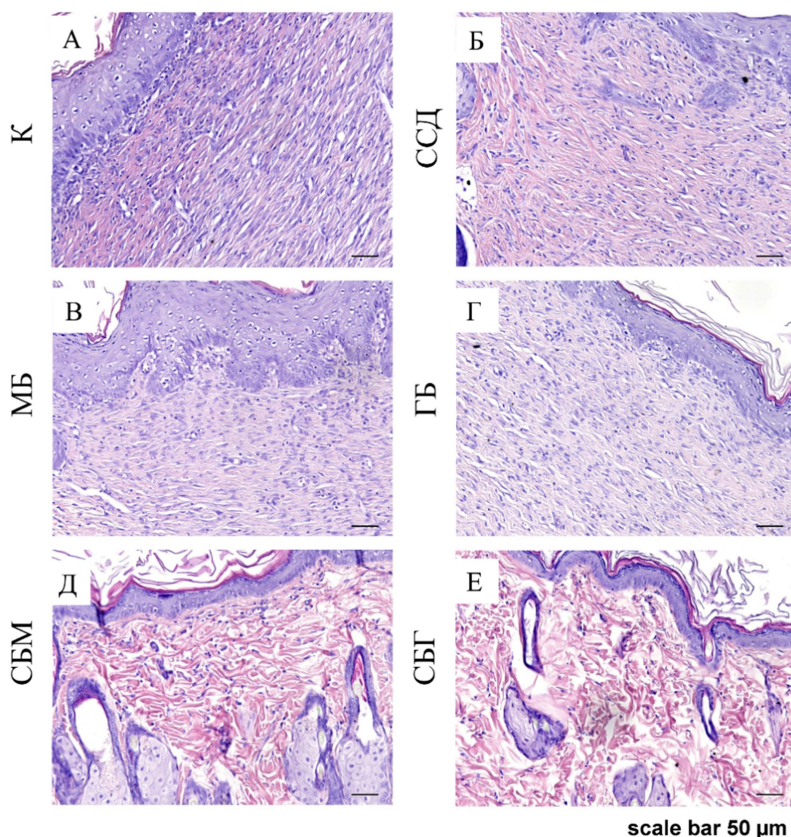


Фигура 12. Садржај хидроксипролина након три недеље примене топикалних формулација. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација. * Статистичка значајност при $p < 0,05$ у односу на К групу; # статистичка значајност на $p < 0,05$ у односу на ССД групу; & статистичка значајност на $p < 0,05$ у односу на МБ групу; § статистичка значајност при $p < 0,05$ у односу на ГБ групу. К-нетретирана контролна група; ССД- 1% сребро сулфадиазинска група; МБ- маст база; ГБ- гел база; СБМ-маст са сибирским бором; СБГ-гел са сибирским бором.

4.6.4. Хистолошка и имунохистохемијска анализа

Хистолошка анализа рађена три недеље након изазивања ране методом ексцизије је показала потпуну реепителизацију епидермалних слојева у свим испитиваним групама. Потпуни опоравак дебљине епидерма је примећен у групама СБМ и СБГ, док је у свим осталим групама, посебно у пределу ресекције, епидерм био мало тањи. Најочљивије промене могу се приметити у површинским и дубоким слојевима дермиса, док су са друге стране очуване цитолошке карактеристике епидермиса између група. Најтежа репаративна фиброза примећена је у контролној групи (Фигура 13 А) са фокалном инфилтрацијом неутрофилних гранулоцита. У

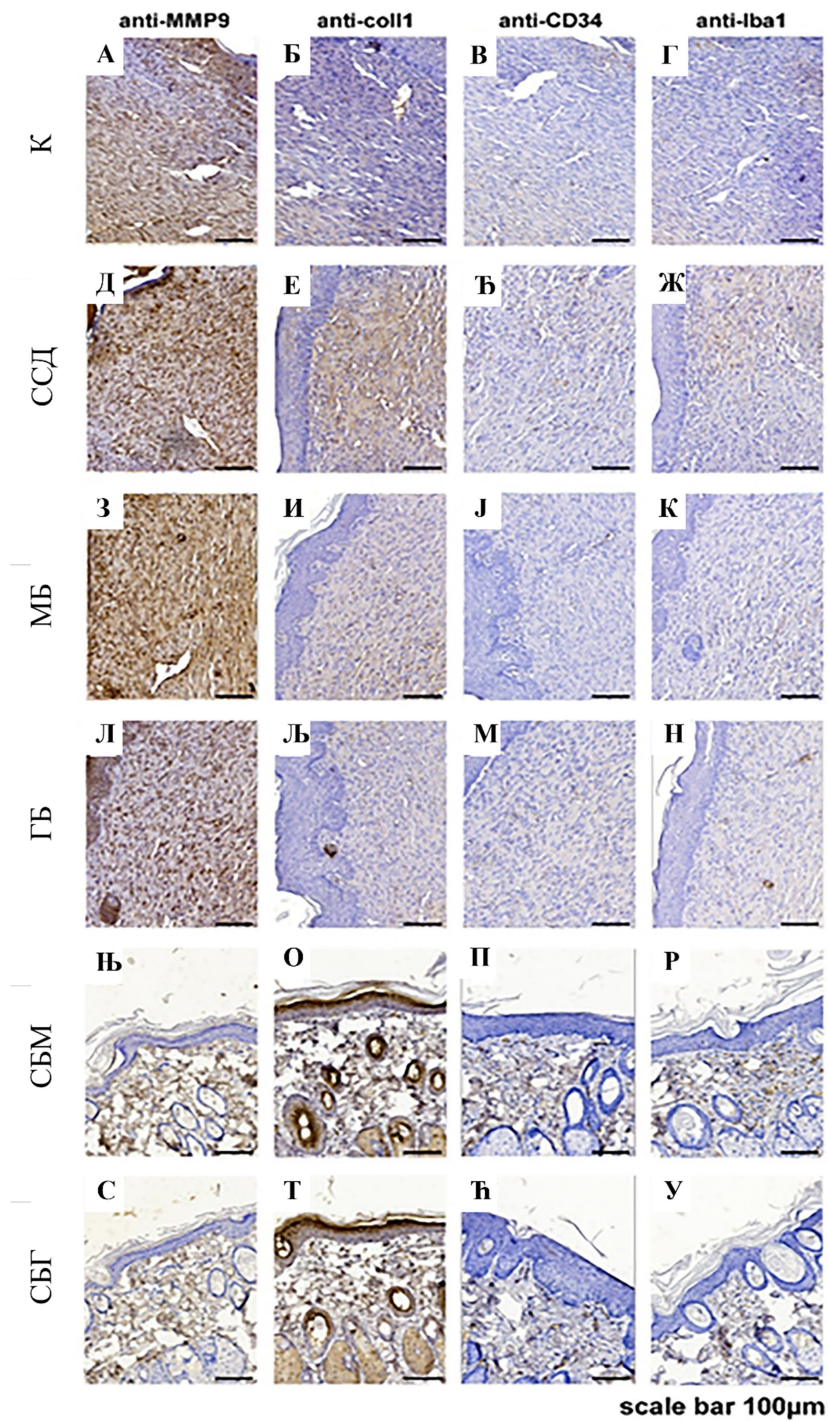
групама третираним са ССД, МБ и ГБ уочена је умерена фиброза, али још увек без обнове аднекса (**Фигура 13 Б-Г**). Потпуна регенерација лојних и знојних жлезда, као и фоликула длаке без присуства фиброзе, примећена је у ткиву које је било третирано СБМ и СБГ (**Фигура 13 Д, Е**).



Фигура 13. Хистолошке промене на делу ране обојене хематоксилин-еозин техником. К-нетретирана контролна група (А); ССД-1% сребро сулфадиазинска група (Б); МБ-подлога маст (В); ГБ-подлога гел (Г); СБМ- маст са сибирским бором (Д); СБГ- гел са сибирским бором (Е).

Имунохистохемијским бојењем ММР-9, примећено је претежно бледо бојење цитоплазме фибробласта у дермису група: К, ССД, МБ и ГБ што се може видети на **Фигури 14 А, Д, З, Л**. Међутим, у групама животиња којима су примењивани препарати са инкорпорираним ЕУСБ (СБМ и СБГ) није детектована ММР-9 активност фибробласта, што сугерише да је процес ремоделовања ткива у овим групама завршен и да је постигнута боља регенерација (**Фигура 14 Њ, С**). Најизраженија производња колагена I након три недеље од формирања ране је уочена у групи ССД животиња (**Фигура 14 Е**), што указује на појачану фиброзу активност. Контролна група животиња и групе третиране базама масти и гела показале су нижи ниво производње колагена (**Фигура 14 Б, И, Љ**). Интересантно је да су СБМ и СБГ групе показале дистрибуцију колагена типа I која одговара нормалној кожи, што сугерише на оптималну обнову са мањом тенденцијом ка стварању фиброзног ожиљка (**Фигура 14 О, Т**). Анализа CD34-позитивних капиларних судова унутрашњег фиброзног ожиљка

није показала значајне разлике међу експерименталним групама позитивне и негативне контроле (Фигура 14 В, Ђ, Ј, М).



Фигура 14. Репрезентативно имунохистохемијско бојење MMP9, колагена I, CD34 и Iba1 у неким групама животиња. К-нетретирана контролна група (А-Г); ССД-1% сребро сулфадиазинска група (Д-Ж); МБ- подлога маст (З-К); ГБ- подлога гел (Л-Н); СБМ-маст са сибирским бором (Њ-Р); СБГ- гел са сибирским бором (С-У).

У ткивима рана код животиња третираних препаратима на бази сибирског бора (СБМ и СБГ група), дистрибуција капиларних судова била је слична оној у нормалној кожи, што указује на адекватну васкуларну регенерацију (**Фигура 14 П, Њ**). Идентификација Iba1-позитивних макрофага открила је да процес сазревања фиброзног ткива није у потпуности завршен у контролним групама и групама третираним базама масти и гела (**Фигура 14 Г, Ж, К, Н**). Насупрот томе, у СБМ и СБГ групама забележено је веома ретко присуство макрофага, што сугерише да је инфламаторна фаза зарастања завршена и да је постигнута боља резолуција инфламације (**Фигура 14 Р, У**).

V

ДИСКУСИЈА

5. Дискусија

Последњих година, у настојању да се пронађе ефикасан и безбедан препарат за третман рана, истраживачи су се све више усмерили на проучавање различитих врста биљака, које су познате по разноврсном фитохемијском саставу и одличној ефикасности. С обзиром на то да бројни препарати који се користе за локалну примену често изазивају иритације и/или алергијске реакције, научници су се суочили са великим изазовом – да пронађу агенсе који ће бити безбедни, уз минималан број нежељених ефеката, а истовремено обезбедити изванредну ефикасност. Тренутни протоколи лечења рана засновани су на примени различитих антисептика, антибиотика и антиинфламаторних лекова, који често имају бројне нежељене ефекте, укључујући развој бактеријске резистенције. У свету више од 8 милиона пацијената болује од различитих врста рана, са или без компликација, што све више оптерећује здравствени систем и утиче на растуће трошкове лечења. Због тога је основни циљ истраживања развој нових и ефикасних стратегија које ће унапредити процес зарастања рана и побољшати свакодневне активности пацијената. У том контексту, развој нових формулација на бази етарског уља сибирског бора представља потенцијално решење, захваљујући његовом широком спектру активности, укључујући антиоксидативне, антиинфламаторне и антимикробне особине. Вишевековна традиционална употреба овог етарског уља, уз ограничен број студија које истражују његову безбедност и ефикасност, представљају главне разлоге за избор сибирског бора као теме за даља истраживања. Због свега претходно наведеног, приступили смо детаљној карактеризацији етарског уља сибирског бора при којој је одређен квалитативни и квантитативни састав активних компоненти. Утврђивањем комплетног састава, увидели смо да треба испитати *in vitro* антиоксидациону активност етарског уља сибирског бора чији резултати су били обећавајући. Резултати ових анализа су нам помогли у одлуци да управо етарско уље сибирског бора искористимо како би формулисали дермалне препарате за локалну терапију дијабетесних рана. Приликом формулације топикалних препарата сагледали смо предности и недостатке различитих фармацеутских облика са аспекта фармацеутске технологије и развили дермалне формулације за локалну примену типа масти и гела. Након припреме препарата испитана је стабилност у периоду од шест месеци како би утврдили да ли би овакви производи били стабилни током дужег временског периода ако би се потенцијално нашли на тржишту.

У другом делу истраживања смо испитивали безбедност формулисаних топикалних препарата при чему је коришћен тест акутне дермалне иритације. Како инфламација представља једну од најбитнијих фаза у процесу зарастања рана, антиинфламацијски ефекат је испитан на анималном моделу карагенаном индуковане инфламације при чему је праћена способност препарата да смањи инфламацију.

Трећа фаза студије обухватила је систематско испитивање ефикасности топикалних фармацеутских формулација, масти и гела са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора, примењених на експерименталном моделу пацова са индукованим дијабетесом тип 1. Методолошки приступ је укључивао различите врсте анализа. Дуготрајна примена дермалних препарата праћена је кроз детаљну макроскопску опсервацију процеса зарастања, што је омогућило процену видљивих параметара регенерације ткива. Такође су спроведене опсежне биохемијске анализе које су пружиле увид у молекуларне механизме деловања активних компоненти препарата. Додатно, патолошка анализа ткива омогућила је прецизну процену целуларних и структурних промена током процеса зарастања. Овакав интегрисани

приступ нам омогућава процену терапијског потенцијала етарског уља сибирског бора у лечењу компликованих рана повезаних са дијабетесом.

5.1. Карактеризација етарског уља сибирског бора

5.1.1. Хемијски састав етарског уља

У првој фази истраживања извршена је детаљна хемијска карактеризација етарског уља сибирског бора применом GC-MS анализе. Ова аналитичка метода омогућила је идентификацију 16 различитих хемијских компоненти, које чине 99,32% укупног састава анализираниог етарског уља. Хемијска анализа је указала на доминантно присуство терпенске групе једињења, са посебним акцентом на монотерпене као најзаступљенију подгрупу. Међу идентификованим монотерпенима највише вредности су показали α -пинен са уделом од 40,19%, праћен β -пиненом (19,64%) и δ -кареном (16,14%). Значајан удео у укупном саставу припада и D-лимонену са 9,92%, док су у нешто нижим концентрацијама детектовани лонгифолен од 3,18% и хумулен од 2,59%. Комплетан квалитативан и квантитативан састав свих идентификованих компоненти представљен је у **Табели 9**, док је њихов графички приказ дат на **Фигури 5**. Овакав хемијски профил сугерише потенцијално значајну биолошку активност испитиваног етарског уља, посебно имајући у виду позната фармаколошка својства доминантних монотерпенских компоненти.

С обзиром да за етарско уље *P. sibirica* не постоји фармакопејски стандард са којим се може упоредити квалитативни и квантитативни састав, резултате је могуће упоређивати само са истраживањима која су спроведена од стране других аутора. У поређењу са испитивањима спроведених до сада, наше испитивано етарско уље је у великој мери у складу са другим истраживањима, са мањим одступањима. Како је познато да количина хемијских компоненти ЕУ зависи од различитих фактора као што су део и здравље дрвета, зрелост иглица, географска локација и годишње доба, њима можемо објаснити мања одступања од резултата у нашем испитивању (11). Претходна истраживања су показала да се највећи проценат ЕУ у иглицама може наћи у периоду од септембра до октобра (2,8%), док је код шишарки тај проценат знатно мањи (0,5%) у периоду од јануара до марта (7). Анализом ЕУ сибирског бора са простора Казахстана доказано је да највећи удео компоненти чине монотерпени, са 66,8%, што је у складу са нашим испитивањем где је утврђено присуство чак 88,62% монотерпена, са α -пиненом као најзаступљенијим представником (12). Састав монотерпена ЕУ се мало разликује, нарочито у погледу β -феландрена (11,2%) који у нашем узорку није ни идентификован, и δ -кадинена (6,3%) који је у нашем узорку заступљен у много мањој мери (0,27%). Постоје истраживања која су показала да је садржај β -феландрена и лимонена доста већи у етарском уљу из младих гранчица, што нам доказује да део биљке и њена старост имају велики утицај на састав етарског уља (7). Географско порекло и надморска висина значајно утичу на састав етарског уља, што је доказано студијом која показује да је у етарском уљу из Монголије забележено присуство β -пинена, а одсуство δ -кадинена за разлику од уља пореклом из Казахстана (12). Бројни радови који се тичу квалитативног и квантитативног састава сибирског бора нису били доступни у индексованим базама или су на руском језику, али је Rogachev (7) у свом прегледном раду објединио све ове информације, одакле можемо закључити да су резултати нашег истраживања конзистентни са резултатима истраживања рађених на подручју Сибира у Русији.

Састав етарског уља и екстракта *P. sibirica* показује значајне разлике. Док етарско уље доминантно садржи монотерпене, уз присуство сесквитерпена у распореду од 5 до 10%, у њему нису детектовани феноли и флавоноиди. Насупрот томе, у биљним екстрактима су ове компоненте присутне, мада у релативно малом проценту (0,21%), што указује на различите поларности једињења која се екстрахују у зависности од методе изолације (7,26).

Фитохемијска истраживања су показала да је поред састава етарског уља анализиран и хемијски профил осталих делова биљке, као и њихових екстраката. Екстракт коре бора је фенолним јединствима, од којих је најзначајнији пиносилвин, као и флавоноидима (кемпферол, кверцетин, катехин) (126). Етил-ацетатни екстракт садржи чак 45,9% фенолних компоненти, због чега су најзаступљенији пиносилвин (стилбен), као и пиноцембрин и пинобанксин (флавоноиди) (18). Водено-ацетонски екстракт семена сибирског бора такође показује изузетно висок садржај фенола ($266 \pm 3,9$ mg галеног киселина/g) (16). Показано је да пиноцембрин и пинобанксин поседују антиоксидативна својства, инхибирају пероксидацију липотеина ниске густине и смањују садржај пероксил радикала (127). Због изражене антиоксидативне, антиинфламаторне и антимикробне активности, биљке са високим садржајем фенола и флавоноида имају широку примену у медицини.

Компаративна анализа хемијског састава етарског уља сибирског бора из различитих региона указује на значајну различитост у заступљености биоактивних једињења. Ова разлика је резултат како еколошких услова стања, укључујући морску висину, географску локацију и климатске карактеристике, тако и унутрашње особине саме биљке, као што су развојна фаза, генетски профил и припадност припадности.

5.1.2. Антиоксидациона активност етарског уља

Спречавањем нагомилавања слободних радикала и/или јачањем антиоксидационе заштите се остварује антиоксидациона активност једињења природног порекла која су богата супстанцама које садрже велики број хидроксилних група и коњугованих угљоводоничних двоструких веза. Могућност наведених група да донирају водоник, инхибирањем слободних радикала може се ублажити оксидациони стрес (128). Комбинација оваквих супстанци се може наћи у различитим деловима биљке од којих се припремају екстракти али и у етарским уљима. Овакви природни производи имају изузетан антиоксидациони потенцијал што биљним препаратима даје могућност примене у превенцији и лечењу великог броја поремећаја који у својој основи имају оксидациони стрес (129,130). Да би добили праву слику антиоксидационе заштите најбоље је урадити *in vivo* испитивање, али данас постоји велики број *in vitro* метода за одређивање антиоксидационе активности етарских уља, што знато олакшава препознавање антиоксидационог потенцијала биљака. Због сложеног састава и многоструких механизма антиоксидационог деловања, за процену антиоксидационе активности се препоручује коришћење већег броја тестова (131).

Применом различитих *in vitro* тестова за одређивање антиоксидационе активности испитано је на узорку етарског уља сибирског бора. Спроведени тестови се заснивају на трансферу електрона у циљу неутрализације DPPH радикала, OH радикала, одређивању редукционе способности уља коришћењем FRAP теста, као и потенцијалу инхибиције липидне пероксидације. Као стандард, у исто време су испитане и активности моћних, синтетских антиоксиданаса попут бутилованог хидрокситолуена, тролокса и аскорбинске киселине.

Један од најчешће коришћених тестова, због своје приступачности и лаког и брзог извођења је тест одређивања капацитета етарског уља да неутралише DPPH радикале. Из резултата приказаних у **Табели 10.** се може видети да је за неутрализацију 50% DPPH радикала потребна концентрација етарског уља од 19,45 $\mu\text{g/ml}$ што је многоструко више него код коришћених стандарда аскорбинске киселине и тролокса. С обзиром на то да је број студија које су испитивале антиоксидативну активност етарског уља сибирског бора ограничен, добијени резултати могу се упоредити са истраживањима екстракта ове биљне врсте. Екстракти сибирског бора показују значајно већи антиоксидативни капацитет ($257 \pm 2,36 \mu\text{g/ml}$), али и даље не достижу ефикасност позитивних контрола (16). Поред тога, истраживања усмерена на анализу антиоксидативног потенцијала етарских уља врста из рода *Pinus* показала су да само одређени број ових ЕУ има израженију антиоксидативну активност у поређењу са аскорбинском киселином (131). Детаљније анализе указују да се смањењем садржаја монотерпена у етарском уљу повећава његова антирадикална активност, што може бити једно од објашњења за релативно низак антиоксидативни капацитет ЕУ етарског уља сибирског бора, које је природно богато овим једињењима (53).

Испитивањем антиоксидативног капацитета ЕУСБ утврђено је да оно има ограничену способност неутралисања ОН радикала у поређењу са референтним стандардима. Добијена вредност IC50 за ЕУСБ износи 46,99 $\mu\text{g/ml}$, што је значајно више у односу на тролокс (IC50 = 12,40 $\mu\text{g/ml}$) и аскорбинску киселину (IC50 = 8,28 $\mu\text{g/ml}$). Ови резултати указују да су стандарди знатно ефикаснији у неутралисању ОН радикала. Присуство велике количине монотерпена, нарочито α -пинена, у етарском уљу сибирског бора, може бити један од главних разлога његовог релативно слабијег антиоксидативног капацитета. Ова запажања су у складу са студијама које су испитивале антиоксидативне способности α -пинена и показале његову умерену ефикасност у овом погледу. такође, студија која је испитивала антиоксидативна својства етарског уља *Pinus sibirica* показала је да ово уље у концентрацијама од 25 до 400 $\mu\text{g/ml}$ има значајну и концентрационо-зависну способност смањења оштећења ДНК изазваног радикалима (132). Примећено је да са повећањем дозе долази до побољшања антиоксидативне ефикасности, што указује на његов потенцијал у заштити од оксидативног стреса у већим концентрацијама. Упоредивањем добијених резултата може се закључити да антиоксидативни капацитет етарског уља сибирског бора зависи од специфичног типа радикала и примењених метода тестирања (131). Док се у овој студији показало да је способност ЕУСБ да неутралише ОН радикале ограничена, у литератури је показана његова ефикасност у смањењу оштећења ДНК изазваних другим типовима радикала. Разлика у методологији, као што је употреба специфичних тестова за радикале (DPPH, ABTS, или тест оштећења ДНК), може делимично објаснити варијације у добијеним резултатима (129).

Способност испитиваног уља да заштити интегритет биолошких мембрана које садрже липиде утврђена је одређивањем потенцијала инхибиције липидне пероксидације. У овом испитивању ЕУСБ је показало много бољу антиоксидациону активност у односу на претходне тестове. Иако је резултат IC50 (12,11 $\mu\text{g/ml}$) етарског уља дупло већи од стандарда, може се закључити да ЕУ поседује антиоксидациони потенцијал у мањој мери. Са друге стране етанолни екстракти иглица бора показују много бољу антиоксидациону активност која се може упоредити са α -токоферолом (133).

DPPH метода се заснива на преносу електрона или водониковог атома са антиоксиданаса на стабилни DPPH радикал, што доводи до његове неутрализације и смањења апсорпције. Са друге стране, FRAP метода процењује редукциони капацитет једињења на основу њихове способности да трансформишу фери (Fe^{3+}) јоне у феро

(Fe²⁺) облик у киселој средини, при чему се формира стабилан комплекс који се квантитативно анализира спектрофотометријски. Резултати добијени за етарско уље сибирског бора су многоструко мањи у односу на аскорбинску киселину и тролокс, што указује на слаб потенцијал уља да редукује фери јон. Овакви резултати су и очекивани с обзиром да феноли нису главнodelујућа компонента испитиваног етарског уља, већ терпени за које је познато да имају слабији антиоксидациони потенцијал. Овом методом су добијени резултати који су у складу са осталим тестовима антиоксидационе заштите етарског уља сибирског бора, који потврђују слабији антиоксидациони капацитет (131). Са друге стране, екстракти иглица борова показује бољу антиоксидативну активност у односу на његово етарско уље, што може бити последица присуства фенолних и других поларних једињења која доприносе снажнијој антиоксидативној реакцији (132).

Анализа добијених резултата указује да етарско уље сибирског бора испољава одређени ниво антиоксидативне активности, која је мање изражена у односу на синтетске антиоксидансе. Ова разлика се може приписати ниском уделу фенолних једињења, која представља кључне носиоце антиоксидативних својстава. Поред тога, ограничена растворљивост етарских уља и њихових компоненти у поларним растурачима додатно утиче на њихову редукциону способност. Ипак, могуће је да сложени састав терпена у етарском уљу сибирског бора доприноси антиоксидативном потенцијалу кроз синергетске интеракције између појединачних компоненти (134).

5.2. Формулисање и стабилност препарата на бази етарског уља сибирског бора

У овом делу истраживања смо на основу прописаних формулација за полуврсте препарате из **Табеле 3. и 4.**, направили еуцерин подлогу, као базу за маст и гел карбомера, као базу за гел. Сви препарати су направљени у складу са прописима Магистралних формула (МФ 2008) и Добре Фармацеутске Праксе. Због мањка литературних података који се тичу топикалне примене етарског уља сибирског бора, и због могућности да изазове иритацију коже на месту примене користили смо ЕУ у концентрацији од 0,5%. У складу са тим, у одговарајуће магистрално израђене подлоге за израду полуврстих препарата је инкорпорирано је ЕУ сибирског бора у концентрацији од 0,5% у циљу добијања масти и гела на бази сибирског бора.

У циљу процене физичке стабилности израђених полуврстих формулација праћене су промене органолептичких својстава препарата на собној температури, у трајању од шест месеци. Релевантни показатељи физичке стабилности који су праћени током испитивања су: рН вредности, електричне проводљивости и реолошки параметари препарата током периода чувања и коришћења. Испитивање органолептичких карактеристика обухватало је праћење промене боје, мириса, конзистенције и хомогености. Током шестомесечног праћења резултати указују да није дошло до промена органолептичких особина испитиваних препарата (**Табела 11**). Са аспекта физичке стабилности, одсуство промене боје, мириса, конзистенције и хомогености, као и одсуство раздвајања фаза након тридесетоминутног центрифугирања показатељи су стабилности испитиваних топикалних формулација. Добијени резултати су у складу са студијама других истраживача који су проучавали стабилност топикалних препарата (135,136).

Како се топикални препарати примењују од стране пацијента потребно је да формулације буду погодне за лаку употребу. Размазивост и лакоћа примене су кључне

приликом избора одговарајуће топикалне формулације, јер неодговарајућа примена препарата доприноси томе да активне компоненте не буду апликоване на место где треба да делују због чега ће ефикасност самог препарата бити смањена. Додатак етарског уља подлогама не утиче на размазивост, одакле закључујемо да полуврсти препарати задржавају особине база у које је ЕУ инкорпорирано, односно масти и гел базе. Формулације типа гела имају лаку примену, лаку размазивост и остављају пријатан осећај на кожи, док су формулације типа масти лепљиве, теже се примењују и остављају непријатан, мастан осећај на кожи. У складу са тим, испитивањем способности прања је утврђено да се препарати типа масти тешко уклањају испирањем са дестилованом водом, док се са друге стране препарати типа гела веома лако уклањају.

Реолошка својства топикалних препарата су параметри који описују физичку стабилност припремљених формулација за локалну употребу, и гела и масти. Познавање реологије полуврстих препарата је веома важна јер доприноси утврђивању стабилности током производње, паковања, па чак и истискивања производа из тубе. Штавише, испитивање реолошког профила топикалног производа може открити информације о његовој способности да остане на кожи довољно дуго како би се осигурала ефикасност, као и да утиче на брзину ослобађања активне супстанце из самог препарата. Да би се предвидео квалитет производа и његове перформансе на кожи истражен је реолошки профил базе масти и гела, као и масти и гела са инкорпорираним ЕУ сибирског бора.

Криве протицања, које представљају зависност напона смицања од брзине смицања, важан су параметар за процену могућих промена у физичкој стабилности испитних формулација. Анализом ових кривих утврђено је да се тестирају масти и масти са додатном етарског уља сибирског бора, као и гелови и њихове варијанте са истим компонентом, показују сличне вредности напона смицања (**Фигура 6**). Дијаграм јасно указује на то да се дода етарског уља сибирског бора у топикалне препарате није утицало на њихово реолошко понашање.

Псеудопластично својство представља значајну карактеристику и код масти и код гелова, јер омогућава да препарати при већим брзинама смицања, којима су изложени током извлачења из примарног паковања, постану мање вискозни и тиме лакши за апликацију. Са друге стране, при ниским брзинама смицања, препарати задржавају вишу вредност привидног вискозитета, што омогућава оптимално задржавање на месту примене и потенцијално побољшање терапијске ефикасности.

Резултати реолошке анализе испитиваних формулација који се могу видети на **Фигури 7**, указују на специфичне карактеристике које одговарају типичним вредностима за полуврсте препарате за дермалну примену. Код гел система, измерене вредности модула чувања (G') су у складу са литературним подацима за карбомерне гелове који показују оптималну конзистенцију за дермалну апликацију. Инкорпорирање етарског уља сибирског бора није значајно утицало на вискоеластична својства гела, што је пожељно са аспекта очувања структурне стабилности формулације. Када је реч о препаратима типа масти, измерене вредности модула чувања биле су значајно више, што је карактеристично за липофилне системе. Интересантно је да је додаток етарског уља довео до редукције вредности оба модула кроз цео фреквентни опсег, што може бити последица интеракције компоненти уља са липофилном основом масти. Обе формулације показују оптималан однос еластичних и вискозних карактеристика ($G' > G''$), што је кључно за очување структурне стабилности и постизање адекватних апликативних својстава. Добијени резултати потврђују да модификација реолошких параметара након инкорпорирања ЕУСБ остаје у границама прихватљивим за дату категорију фармацеутских облика.

Претходна истраживања су показала да је локална примена масти и гела лакша због псеудопластичног понашања получврстих препарата (135–138). Имајући у виду наведене резултате, можемо закључити да топикални препарати са ЕУ сибирског бора имају адекватна својства (лако размазивање и добро пријањање) која су погодна за наношење на кожу.

Одговарајућа рН вредност дермокозметичких производа има значајан утицај на очување структуре и функције кожне баријере. Површина коже природно има благо киселу реакцију, са рН вредношћу у распореду од 4 до 6. Коришћење производа чија рН вредност одступа од овог опсега може довести до дисбаланса заштитних слојева коже, што може повећати и склоност ка различитим инфекцијама и дерматолошким проблемима (139). Резултати овог истраживања показали су да рН вредност испитиваних формулација остаје стабилна током целог периода праћења. Установљено је да рН вредност гел базе износи 5,84, док је рН вредност гела са етарским уљем сибирског бора 6,21. Очување рН у оптималном опсегу током шестомесечног складиштења указује на добру стабилност формулације, што је од кључног значаја за њену ефикасност и безбедност. Одржавање рН у физиолошки прихватљивим границама додатно потврђује потенцијал испитиване формулације за топикалну примену, смањујући ризик од иритације или нарушавања интегритета коже. Ови резултати су у складу са претходним истраживањима, која указују на важност стабилности рН вредности у формулацији дерматолошких препарата, посебно оних базираних на етарским уљима (135,136,140,141). С друге стране, познато је да етарска уља, због свог сложеног хемијског састава, могу значајно утицати на рН вредност фармацеутских и козметичких формулација. Велики удео незасићених масних киселина, као што су линолна и линоленска киселина, може довести до снижавања рН вредности препарата, што је нарочито изражено код формулација у којима ове компоненте доминирају (142).

Када се погледа опсег кретања вредности електричне проводљивости у **Табели 12.** примећује се мала промена у виду смањења електричне проводљивости код гела са сибирским бором. Познато је да електрична проводљивост зависи од више фактора, укључујући концентрацију јона у раствору, садржај воде као главног поларног растварача, али и физичко-хемијске карактеристике самих компонената формулације. Осим тога, на овај параметар могу утицати и спољашњи фактори, као што су температура, време складиштења и могуће интеракције активних и помоћних супстанци. Резултати су у складу са другим истраживањима уз минимална одступања (135,136). Мала разлика која је примећена у нашем узорку се може приписати чињеници да гел са сибирским бором има мању количину воде која је поларни растварач и доприноси електричној проводљивости препарата. Испитивањем електричне проводљивости препарата гела и гела са сибирским бором добијени су слични резултати, чиме можемо закључити да додатак ЕУ сибирског бора није значајно утицао на овај параметар. Ова запажања потврђују да је испитивана формулација стабилна у погледу електричних својстава, што је од значаја за њену примену у дерматолошкој терапији.

5.3. Безбедност и ефикасност топикалних препарата на бази етарског уља сибирског бора

5.3.1. Акутна дермална иритација

Први корак у процени безбедности неког препарата за локалну примену јесте тест акутне дермалне иритације. Овим испитивањем на животињама добијају се веома битни резултати који указују на потенцијал формулација да изазову било какву осетљивост коже чиме се утврђује безбедоносни профил получврстих препарата као што је случај у нашем испитивању: маст и гел са ЕУ сибирског бора. Један од најчешћих нежељених ефеката препарата за локалну примену је иритација коже која може настати у контакту са било којим агенсом и која се манифестује у виду упалне реакције и повећане осетљивости. Иако се сензибилизација коже може јавити услед контакта коже са синтетским супстанцама, исто тако постоји и део популације који су осетљиви на препарате природног порекла, нарочито високе концентрације етарских уља (143,144). Иритација коже укључује оштећење баријере коже, производњу цитокина и оксидациони стрес, што доводи до видљивих и субклиничких инфламацијских реакција које су реверзибилне, за разлику од ирреверзибилних оштећења која укључују некрозу, крварење и чиреве. Током овог испитивања прати се појава еритема и едема на кожи испитиваних животиња током 14 дана. Еритем и едем углавном настају као последица присуства алергена који активирају имунски одговор и подстичу ослобађање проинфламаторних цитокина. Еритем је дефинисан као црвенило коже или слузокоже које настаје услед дилатације капилара и повећаног протока крви у површинским слојевима дермиса. Овај феномен може бити изазван различитим факторима, укључујући инфламаторне процесе, инфекције, алергијске реакције или физичке агенсе. Клинички се манифестује као локализовано или дифузно црвенило, често праћено осећајем топлоте. Еритем представља облик хиперемije, при чему повећан проток крви у површинским капиларима доводи до црвенила коже, док се, с друге стране, едем карактерише прикупљањем вишка интерстицијске течности, што резултује отоком ткива (145).

Ова студија представља прву свеобухватну процену акутне дермалне иритације топикалних формулација са 0,5% етарским уљем сибирског бора, пружајући кључне доказе о њиховој безбедности. Током двонедељног периода праћења, код испитиваних животиња нису уочене макроскопске или бихевиоралне промене, као ни знаци токсичности или локалне иритације, што указује на одсуство нежељених реакција. С обзиром на високу осетљивост коже експерименталних животиња на фармаколошке супстанце, добијени резултати потврђују да формулације на бази етарског уља сибирског бора не изазивају иритацију и могу се безбедно примењивати чак и током дужег временског периода. Добијени резултати пружају снажну основу за даље клиничке студије, у циљу потврде њиховог терапијског потенцијала у лечењу инфламаторних и хроничних дерматолошких обољења, посебно у контексту примене код пацијената са повећаном осетљивошћу коже.

5.3.2. Антиинфламацијски ефекат топикалних препарата са етарским уљем сибирског бора

С обзиром да процес инфламације лежи у патофизиологији многих болести, антиинфламаторни лекови који постоје тренутно на тржишту су разноврсни и у великој су употреби. Међутим, њихова употреба је повезана са многобројним и озбиљним нежељеним ефектима, као што су гастроинтестинално крварење, чир на желуцу, имunosупресија и повећан ризик од инфекција, погоршање других хроничних болести, али и висока цена новијих лекова. Управо због претходно наведених негативних дејстава, све више се изучавају природни препарати који у свом саставу садрже једињења одговорна за антиинфламацијски ефекат производа. Антиинфламацијски

ефекат многих борова је добро проучен, међутим студије које показују антиинфламацијску активност сибирског бора нису многобројне (29,146–148). Постоје истраживања којима је доказана антиинфламацијска активност екстракта уља семена (23), као и истраживања која антиинфламацијски ефекат сибирског бора објашњавају присуством масних киселина у калусу биљке (149). Недостатак инфомација о антиинфламацијском ефекту етарског уља сибирског бора и велика традиционална употреба уља нас је навела да извршимо испитивање потенцијала дермалних препарата на бази етарског уља сибирског бора уз помоћ карагенанског теста на анималном моделу уз праћење едема шапице. Овај модел је један од најпримењиванијих модела за утврђивање брзог и ефикасног одговора на изазвану инфламацију. Едем шапе је изазван интраплантарном администрацијом карагенана, а током наредна четири сата праћена је способност инхибиције едема као главног показатеља антиинфламацијске активности. Поред овог параметра, праћени су и параметри антиоксидационог система заштите, као што су CAT, SOD, GHS и TBARS, који могу помоћи у бољем разумевању ефекта ЕУ сибирског бора.

Применом карагенана у задњу шапу пацова се активира инфламаторни одговор у две фазе. Прва, акутна фаза едема се јавља одмах након инјекције карагенана, а настаје услед ослобађања хистамина, леукотриена и серотонина, и траје до сат времена. Након сат времена се јавља друга фаза услед повећане продукције метаболита арахидонске киселине, простагландина, као и инфилтрације неутрофила (150). Повећана производња проинфламаторних цитокина и слободних кисеоничних врста, попут O_2^- и ОН радикала додатно доприноси инфламацијском одговору.

Резултати добијени након четворочасовног испитивања указују на значајан антиинфламаторни ефекат топикалних препарата са етарским уљем сибирског бора (ЕУ СБ), што се огледа у редукцији едема шапице изазваног карагенаном (Табела 13). У поређењу са нетретираним животињама и применом формулације база, маст и гел са инкорпорираним ЕУСБ показали су значајну инхибицију едема, посебно у трећем и четвртном сату испитивања, што указује на временску зависност ефекта. Ова студија представља прво истраживање које је систематски испитивало ефекте топикалних препарата на бази сибирског бора на анималном моделу инфламације. Резултати су показали да су обе формулације оствариле изражену ефикасност, при чему је маст са ЕУСБ показала благо супериорне резултате у односу на гел. Ово се може приписати различитим физичко-хемијским својствима формулација и њиховом утицају на ослобађање активних компоненти. Иако је хидрокортизон, коришћен као позитивна контрола, постигао највећи степен инхибиције, препарати са ЕУСБ показали су значајан антиинфламацијски ефекат, захваљујући присуству активних компоненти попут пинена, које играју кључну улогу у сузбијању упалних процеса (129). Ови резултати истичу потенцијал препарата са ЕУСБ за даљи развој и примену у терапији инфламаторних стања.

С обзиром на ограниченост доступних истраживања која би потврдила ефикасност испитиваних топикалних формулација, остварена антиинфламаторна активност може се приписати антиинфламацијском деловању најзаступљенијих биоактивних компоненти етарског уља сибирског бора. Поједини терпени који су главни састојци етарског уља имају доказан антиинфламацијски ефекат, а такође се сматра да њихов синергистички ефекат томе додатно доприноси. Циклооксигеназа-2 (COX-2) представља кључни ензим у регулацији инфламаторног одговора, будући да учествује у биосинтези простагландина, који имају централну улогу у развоју и одржавању упалних процеса. Његова експресија је повећана у току инфламације, а инхибиција овог ензима сматра се једним од главних механизма антивоспалне терапије. С тим у вези, могућност модулације COX-2 представља значајну стратегију у

контроли инфламаторних стања. Доступни подаци указују на то да α -пинен може инхибирати активност COX-2, што је потврђено студијама у којима је овај монотерпен примењен локално или интраперитонеално код животињских модела инфламације (151). С обзиром на то да је α -пинен једна од главних компоненти етарског уља сибирског бора, основано је претпоставити да је инхибиција COX-2 један од примарних механизма деловања формулација базираних на овом уљу. Овај механизам би могао бити посебно значајан у топикалној терапији инфламаторних обољења коже, где би инхибиција локалне продукције простагландина могла допринети смањењу еритема, едема и бола. Поред утицаја на активност COX-2, антиинфламаторни потенцијал α -пинена се може приписати његовом деловању на више инфламаторних путева. Доказано је да α -пинен и сродни монотерпени, као што је β -пинен, инхибирају инфламаторну инфилтрацију леукоцита и супримирају ослобађање хистамина, чиме смањују пропустљивост крвних судова и локалне инфламаторне реакције. Поред тога, показано је да α -пинен инхибира активацију кључних инфламаторних медијатора, укључујући ИКК- β , каспазу-1 и нуклеарни фактор капа В (NF- κ B), који имају централну улогу у продукцији проинфламаторних цитокина и одржавању хроничне упале (152–155). Осим директног утицаја на инфламаторне сигналне путеве, α -пинен исказује и снажан антиоксидативни ефекат, што додатно доприноси његовој активностима. Редукција оксидативног стреса, као једног од покретача инфламаторних процеса, омогућава смањење оштећења ткива и модулацију имунолошког одговора. Сматра се да α -пинен делује као регулатор хомеостазе слободних радикала, што је посебно значајно у патогенези инфламаторних и дегенеративних обољења. Синергистички ефекат α -пинена, који обухвата инхибицију COX-2, модулацију NF- κ B сигналног пута, сузбијање инфилтрације леукоцита и антиоксидативно деловање, указује на његов значајан терапијски потенцијал.

Инфламаторни одговор у другој фази карактерише нагомилавање реактивних кисеоничних врста (РОС), што доводи до оксидативног стреса и оштећења ћелијских структура. Током овог процеса, неутрофили ослобађају слободне радикале, који интерагују са липидима плазма мембране, узрокујући липидну пероксидацију (156). Овај механизам доводи до нарушавања ћелијске пермеабилности, убрзава деградацију протеина и може резултирати ћелијском лизом. Поред тога, поремећај структуре мембране може изазвати дисфункцију ензима укључених у регулацију ћелијског метаболизма, што додатно погоршава инфламаторни процес. Као компензациони механизам, организам активира антиоксидативне ензиме, укључујући супероксид дисмутазу, каталазу и глутатион пероксидазу (GPx), чија је улога умањење штетних ефеката слободних радикала и очување ћелијске хомеостазе (157).

Липидна пероксидација је један од кључних биомаркера оксидативног стреса и инфламације, што потврђују значајно повећани нивои TBARS у упаљеном ткиву. Овај пораст је нарочито изражен у нетретираној групи и код животиња третираних формулацијама безе гела и масти, што указује на недостатак активних компоненти са антиоксидативним деловањем у овим препаратима. Насупрот томе, код животиња третираних топикалним формулацијама са етарским уљем сибирског бора примећено је статистички значајно смањење нивоа TBARS, што је праћено смањењем величине отока шапе (**Фигура 8Г**). Ово смањење може се приписати присуству монотерпена α -пинена, β -пинена и δ -карена, који су познати по својим антиоксидативним и антиинфламаторним својствима. Ови резултати указују на то да редукција оксидативног стреса, посредована активним састојцима етарског уља сибирског бора, може имати значајан утицај на смањење инфламаторне реакције и заштиту ћелијских структура од оштећења, што додатно оправдава њихову примену у терапијским стратегијама за стања праћена упалним процесима.

Индукција инфламације карагенаном довела је до значајног смањења активности антиоксидативних ензима SOD и CAT у инфламираном ткиву код контролне групе, што је јасно приказано на **Фигурама 8А** и **8Б**. Ова редукција активности антиоксидативних ензима указује на њихову прекомерну потрошњу услед интензивне продукције РОС у току инфламаторног процеса. У условима хроничног оксидативног стреса, исцрпљивање антиоксидативних ензима доводи до дисбаланса између продукције слободних радикала и заштитних механизма организма, што резултира оштећењем ћелијских структура. На основу добијених резултата, може се закључити да ниво GSH, као једног од главних ендогених антиоксиданата, није значајно измењен између испитиваних група у случају дермалне примене препарата са етарским уљем сибирског бора (**Фигура 8В**). Овај налаз сугерише да GSH задржава своју концентрацију упркос присутним инфламаторним процесима, што указује на постојање компензационих механизма који регулишу његов метаболизам и одржавају антиоксидативну заштиту. Могуће је да дермална примена не пружа довољну системску биорасположивост да би значајно утицала на ниво GSH у периферним ткивима. С друге стране, доступна истраживања показују да орална примена α -пинена значајно утиче на повећање нивоа GSH у централном нервном систему. Орална примена α -пинена је спречила смањење нивоа GSH у кортексу и стријатуму изазвано оксидативним стресом, што указује на његову јасну антиоксидативну активност. Овај ефекат се објашњава способношћу α -пинена да неутралише слободне радикале, пероксиде и липидне пероксиде, као и да спречи оштећења изазвана тешким металима. Уз то, α -пинен подстиче активност глутатион пероксидазе, чиме доприноси очувању интегритета ћелијских компоненти и остварује неуропротективни ефекат (39). Поређењем дермалне и оралне примене, може се уочити да је ефекат α -пинена на ниво GSH израженији код оралне примене, што је последица његове боље системске апсорпције и дистрибуције. Док дермална примена обезбеђује локалну заштиту и антиоксидативне ефекте ограничене на место примене, орална примена омогућава широку системску дистрибуцију активне супстанце, са директним утицајем на централни нервни систем.

Супротно томе, животиње третиране дермалним препаратима на бази етарског уља сибирског бора показале су значајно повећану активност SOD и CAT у инфламираном ткиву, што указује на појачану антиоксидативну заштиту. Овакав налаз имплицира да активне компоненте етарског уља сибирског бора модулирају инфламаторни одговор, делујући као стимулатори ендогених антиоксидативних ензима, чиме се спречава прогресија оксидативног оштећења. Антиоксидативна својства ових формулација могу допринети стабилизацији ћелијских мембрана и спречавању даљег оштећења ткива, што се рефлектује кроз редукцију инфламаторних биомаркера и смањење едема. Механизам деловања ових препарата може се објаснити њиховим специфичним хемијским профилем, који је богат монотерпенима, као што су α -пинен, β -пинен и δ -карен. Ови молекули су познати по својој способности да делују као хватачи слободних радикала, смањујући продукцију реактивних кисеоничних врста и инхибирајући липидну пероксидацију. Поред тога, монотерпени могу директно утицати на инфламаторне путеве, мењајући активност ензима и сигналних молекула укључених у регулацију упале (158). У једној студији је доказано да α -пинен штити IEC6 ћелије од оксидативног стреса изазваног аспирином, што се огледа у очувању ћелијске виталности, смањењу липидне пероксидације и редукцији активности SOD и манган-зависне супероксид дисмутазе (Mn-SOD). Посебно је значајно што је α -пинен довео до деактивације фосфорилације p38 и JNK митоген-активираних протеинских киназа (МАРК), чиме је смањен инфламаторни одговор, с обзиром на то да је p38 МАРК критичан за експресију проинфламаторних цитокина и медијатора. Инхибиција

овог сигналног пута спречава прекомерну активацију инфламаторних механизма, смањује оксидативно оштећење ћелија и ограничава програмирану ћелијску смрт. Ови резултати указују на то да α -пинен може бити користан у превенцији оштећења гастроинтестиналног епитела изазваних аспирином, с обзиром на његову способност да модулише p38 MAPK и JNK MAPK сигналне путеве, смањује инфламаторни стрес и одржава ћелијску хомеостазу (159). У овом контексту, добијени резултати сугеришу да етарско уље сибирског бора и његове главне компоненте, као што су пинени, испољавају антиинфламаторни ефекат кроз инхибицију кључних сигналних путева, при чему истовремено доприносе одржавању оксидативно-антиоксидативне равнотеже и редукцији инфламаторних медијатора.

Ови налази су значајни јер потврђују да би дермална примена препарата на бази етарског уља сибирског бора могла представљати ефикасну стратегију за контролу инфламаторних стања, посебно у контексту обољења праћених хроничним оксидативним стресом. Даља истраживања би требало да се фокусирају на клиничку потврду ових резултата, како би се утврдила њихова примена у терапијским протоколима за лечење кожных инфламаторних болести.

5.3.3. Ефикасност дермалних препарата на бази етарског уља сибирског бора у терапији зарастања рана

Оштећења коже изазвана физичким или хемијским факторима, која доводе до прекида њеног интегритета, дефинишу се као ране. Оне представљају значајан глобални здравствени проблем, с обзиром на њихову високу преваленцу и сложеност лечења. Подаци указују да чак преко 8 милиона људи широм света болује рана (акутних и хроничних), што омета квалитет живота пацијената и представља значајно оптерећење за здравствени систем (160). Лечење рана зависи од њиховог типа, дубине и величине, при чему се код мањих и површинских рана најчешће примењује локална или системска терапија синтетским антиинфламаторним и антибиотским препаратима. Међутим, код тежих и хроничних облика неопходне су сложеније интервенције, укључујући хируршку санацију, одстањивање некротичних ткива и примену напредних биоматеријала који унапређују процесе регенерације.

Осим фактора средине, као што су недовољна хигијена, неправилна нега ране и изложеност контаминираној околини, који могу продужити процес зарастања и повећати ризик од инфекција, значајну улогу у компликацијама зарастања имају и различити унутрашњи фактори. Одређена хронична обољења, попут дијабетеса, васкуларних обољења (периферна артеријска болест, хронична венска инсуфицијенција), малнутриције, хипертензије и хроничне бубрежне инсуфицијенције, значајно успоравају процес зарастања услед нарушене микроциркулације и смањене оксигенације ткива. Поред тога, системска обољења попут аутоимуних поремећаја (реуматoidни артритис, системски лупус еритематозус) и хроничних инфламаторних стања (Кронова болест, улцерозни колитис) додатно компликују регенеративне механизме због повећаног оксидативног стреса и дисбаланса инфламаторних медијатора. Имуносупресивна стања, као што су инфекције (ХИВ/АИДС), онколошке болести, терапија кортикостероидима и имуносупресивним лековима након трансплантација, такође представљају значајне факторе ризика за продужено зарастање и повећану подложност секундарним инфекцијама. У том контексту, лечење рана захтева мултидисциплинаран приступ који укључује процену свих релевантних фактора, укључујући опште здравствено стање пацијента, присуство коморбидитета и индивидуалне терапијске потребе. Оптимизација терапије подразумева комбинацију

фармаколошких, хируршких и регенеративних метода, са циљем смањења компликација, убрзања зарастања и побољшања квалитета живота пацијената (61,65).

Хроничне ране код пацијената са дијабетесом представљају један од највећих изазова савремене медицине, с обзиром на њихово споро зарастање и високу стопу компликација. Основни патофизиолошки механизам који стоји иза овог проблема јесте хронична инфламација, која је карактеристична за дијабетес и директно доприноси оштећењу периферне циркулације. Ово доводи до смањене оксигенације и нутритивне подршке ткиву, чиме се успорава регенерација и зарастање рана. Додатни фактор који компликује опоравак је дијабетесна неуропатија, која смањује осетљивост на бол и онемогућава пацијентима да благовремено примете оштећења на кожи, што доводи до прогресије и хроничности ових улцерација. Поред поремећене микроциркулације и неуропатије, хронична хипергликемија доприноси имunosупресији, што значајно повећава ризик од бактеријских инфекција и додатно одлаже зарастање. Недовољна способност организма да се бори против инфекција омогућава несметан развој патогених микроорганизама, што често резултира некротичним процесима и потребом за агресивним терапијским приступом. Најчешћа локализација дијабетесних рана су доњи екстремитети, где због комбинованог дејства неуропатије, слабљења циркулације и инфекције може доћи до некрозе, што у тежим случајевима доводи до потребе за ампутацијом. Забрињавајуће је да тренутни подаци указују на пораст учесталости овог проблема, при чему се процењује да чак 15% дијабетичара развије хроничне ране на доњим екстремитетима, а значајан број њих завршава са ампутацијом стопала (79). Овај тренд наглашава хитну потребу за развојем ефикаснијих терапијских стратегија које не само да би убрзале зарастање, већ и спречиле настанак инфекција и тежих компликација. Савремена истраживања указују да употреба топикалних препарата са антиинфламаторним и антиоксидативним својствима може представљати перспективан приступ у терапији ових стања, смањујући оксидативни стрес и побољшавајући локалну микроциркулацију, што би могло допринети убрзавању процеса зарастања и смањењу стопе ампутација.

Последично, хроничне ране, а нарочито оне код дијабетичара, представљају значајно економско оптерећење за здравствени систем услед високих трошкова дуготрајне терапије, хоспитализације и учесталих компликација. Конвенционални терапијски приступи, који укључују примену антисептика, антибиотика и антиинфламаторних лекова, често захтевају продужено лечење, што повећава ризик од нежељених ефеката, антимикробне резистенције и оштећења здравих ткива (70,71). С тим у вези, научна заједница се све више окреће истраживању природних терапијских опција, које су често приступачније, безбедније и са мање нежељених реакција, а које могу имати значајан потенцијал у убрзавању зарастања и смањењу ризика од компликација. Локална примена лековитих препарата у терапији рана показала је бројне предности у односу на системску терапију, укључујући директно деловање на месту оштећења, бољу пенетрацију у дубље слојеве коже, већу биорасположивост и смањен ризик од системских нежељених ефеката (161). Овакав приступ омогућава бољу контролу инфламаторног одговора, редукцију оксидативног стреса и побољшање локалне циркулације, што су кључни фактори у процесу регенерације ткива. У том контексту, природни активни састојци, попут етарских уља и биљних екстраката, све више се истражују као потенцијални терапеутски агенси, с обзиром на њихова антиинфламаторна, антиоксидативна и антимикробна својства. Њихова примена може значајно умањити потребу за дуготрајним антибиотским режимима и инвазивним терапијским процедурама, доприносећи смањењу економског терета и унапређењу исхода лечења хроничних рана.

Иако се традиционално етарско уље сибирског бора примењује у лечењу бројних обољења и користи за масажу због свог благотворног ефекта на умор и виталност, не постоје литературни подаци који потврђују његов повољан ефекат на третман рана. Са друге стране, због свог специфичног мириса и способности да штити и негује кожу улази у састав бројних козметичких препарата за топикалну употребу (22). Узевши у обзир одличне карактеристике у виду антиоксидационг, антимањбајријског и антиинфламацијског ефекта, претпоставили смо да ће инкорпорирањем у полуврсте топикалне препарате ЕУ сибирског бора показати повољан ефекат на зарастање рана код дијабетичних пацова. Праћење потенцијала топикалних препарата типа масти и гел са ЕУ сибирског бора је извршено макроскопским посматрањем смањења величине ране, али и праћењем биохемијских и хистопаталогских промена.

Код макроскопског праћења, битни фактори као што су контракција ране и епителизација указују на повољан ефекат у процесу зарастања. На Слици 1. се јасно може видети да је тронедељна примена масти са сибирским бором довела до потпуне контракције и епителизације ране која је претходно изазвана методом ексцизије. Топикални препарати на бази сибирског бора су већ од седмог дана показали супериоран ефекат у односу на контролне групе, као и групу животиња која је третирана сребро-сулфадиазином који је коришћен као позитивна контрола (Фигура 9). У кључним тренуцима праћења, односно 14. и 21. дана, гел и маст са ЕУ су задржали свој импозантан ефекат на контракцију ране, са максималним ефектом од 98,14% за маст и 96,28% за гел са сибирским бором. На крају тронедељног испитивања, свакодневне примене топикалних препарата на ране дијабетичних пацова добијени резултати показују да је време реепителизације краће у групама третираним етарским уљем у односу на остале групе. Ово су директни показатељи ефикасности топикалних формулација на бази сибирског бора на зарастање рана код пацова са дијабетесом.

Изузетан терапијски потенцијал топикалних формулација са етарским уљем сибирског бора може се приписати његовом богатом фитохемијском саставу. Посебно се издвајају монотерпени α -пинен, β -пинен и δ -карен, који су као најзаступљеније компоненте овог уља вероватно имали кључну улогу у процесу зарастања рана. Терпени, који су познати по свом адстрингентном и антимикробном деловању, могу унапредити регенерацију ткива тако што убрзавају контракцију ране и подстичу епителизацију (162,163). Захваљујући својим физичко-хемијским својствима, етарска уља имају способност лаке пенетрације кроз кожу, где остварују више значајних биолошких ефеката, укључујући антиинфламаторно, антиоксидативно и антимикробно деловање, као и стимулативни ефекат на синтезу колагена. Ова комбинација активности доприноси регулацији механизма зарастања рана, што може значајно унапредити процесе регенерације оштећеног ткива (85,86).

У складу са добијеним резултатима, једна студија је потврдила да етарска уља различитих врста *Pinus*-а са подручја Турске имају повољан ефекат на зарастање ексцизионих рана. Наведена истраживања су показала да су за овај ефекат највероватније одговорни α -пинен и β -пинен, који се издвајају као главне компоненте борових етарских уља. Њихова способност инхибирања активности хијалуронидазе може играти значајну улогу у заштити и стабилизацији ванћелијског матрикса, што додатно подржава њихову улогу у зарастању рана (147,148). Резултати студије која је испитивала ефекат креме са катраном бора показују високу подударност са нашим налазима. Наиме, топикална примена формулације која садржи 1% катрана довела је до значајног повећања контракције ране у поређењу како са нетретираном групом, тако и са групама третираним 1% сребро-сулфадиазином, истичући потенцијал ове формулације у побољшању процеса зарастања (135).

Колаген, као примарни структурни протеин ванћелијског матрикса, игра кључну улогу у одржавању интегритета ткива и органа, а његова синтеза је од суштинског значаја за процес зарастања рана. Његова продукција и нагомилавање су нарочито важни у фази реепителизације и реконструкције оштећеног ткива, што га чини једним од главних биомаркера регенеративних механизма (164). Ипак, различити патолошки фактори, као што је дијабетес, могу пореметити синтезу колагена, чиме се продужава трајање регенеративног процеса и повећава ризик од настанка хроничне ране. С обзиром на значај колагена у овим механизмима, његов садржај у ткиву коже је процењен мерењем нивоа хидроксипролина, аминокиселине која је одговорна за стабилност, синтезу и нагомилавање колагена у ткиву. Концентрација хидроксипролина је директан показатељ фазе зарастања ране, с обзиром на његову улогу у стимулацији ћелијске пролиферације, побољшању биосинтезе колагена, као и у процесима његовог сазревања и организације у ткиву (123). У циљу испитивања регенеративног потенцијала етарског уља сибирског бора, спроведена је анализа садржаја хидроксипролина у узорцима ткива изолованим са места претходно формираних рана. Овај приступ омогућио је процену способности ових дермалних формулација да унапреде процесе синтезе и таложења колагена, што је кључно за потврду њихове ефикасности у терапији зарастања рана.

Након три недеље апликовања топикалних формулација на подручје ране, највиши ниво хидроксипролина је забележен у групама животиња које су биле третиране формулацијама са сибирским бором. На **Фигури 12.** се може уочити значајна разлика између група третираних препаратима са сибирским бором и контролних група које су имале знатно нижи садржај хидроксипролина. Најистакнутији ниво хидроксипролина примећен је у групи третираној машћу са сибирским бором и то од 9,69 g/mg сувог ткива, затим код гела са сибирским бором од 7,26 g/mg сувог ткива, и код позитивне контроле која је третирана сребро сулфадиазином од 5,79 g/mg сувог ткива. Резултати нашег истраживања показују да је локална примена масти и гела са инкорпорираним ЕУ сибирског бора током три недеље допринела повећању синтезе колагена и бржем опоравку ткива код рана дијабетичких пацова. У складу са овим резултатима, повећан ниво хидроксипролина је утврђен и у ткивима третираним мастима које садрже етерична уља неких *Pinus* врста (распон: 17,54–30,60 g/mg сувог ткива) (148). Ови резултати указују да водећу улогу у повећању синтезе и таложења колагена има етарско уље сибирског бора. Резултати наше студије указују да α -пинен, као главни састојак етарског уља сибирског бора, игра кључну улогу у зарастању рана, доприносећи синтези и депозицији колагена, што побољшава механичку отпорност и стабилност ожиљака. Ови колагенски депозити обезбеђују да кожа, захваљујући својој структури и густини колагенских влакана у различитим слојевима, може да издржи напетост и спољне силе током зарастања. Поред тога, α -пинен редукује инфламацију убрзавајући прелазак у фазу регенерације. Овакви механизми омогућавају не само брже зарастање већ и формирање функционалног и стабилног ткива са побољшаним механичким својствима (43).

Повећани садржај хидроксипролина и боље зарастање ткива примећено је у групама којима су наношене формулације са ЕУ сибирског бора а додатно су потврђене прецизним хистолошким анализама. Након третмана ексцизионе ране машћу и гелом са сибирским бором утврђено је значајно повећање присуства колаген 1 позитивних фиброцита и повећане суштине колагених влакана што је резултирало сазревању ожиљка (**Фигура 14**). Како је до сада познато, да би рана правилно зарасла, поред стварања колагена неопходно је регенерисати повређене крвне судове што се одвија процесом ангиогенезе (61). Дијабетес, као хронично метаболичко обољење ремети све ове процесе због чега долази до продужавања процеса зарастања рана (79,165).

Породица матрикс металопротеиназа, игра виталну улогу у сложенем механизму реепителизације рана, тако што регулишу ангиогенезу и управљање деградацијом, као и депозицијом екстрацелуларног матрикса. Нама најзначајнији је MMP-9 који је укључен у процес разградње екстрацелуларног матрикса, промовише ангиогенезу и регулише про-ангиогене цитокине. MMP-9, се брзо ослобађају и активирају још у почетним фазама зарастања рана. Већа активност MMP-9 повезана је са смањењем пролиферације и активности фибробласта, што доводи до отежаног зарастања рана, што је случај код пацијената са дијабетесом (166). У нашем истраживању, група животиња којима је апликована маст и гел на бази ЕУ сибирског бора је показала изражено смањење експресије MMP-9, наглашавајући заштитне ефекте наших природних формулација за локалну употребу (**Фигура 14Њ,С**). У корелацији са нашом студијом, у којој је потпуна реепителизација уочена 21. дана након формирања ране су и резултати који показују да је смањење експресије MMP-9 добар показатељ ефикасног процеса зарастања рана (167).

За разлику од контролних група са формираним фиброзним ожиљком где смо уочили повећан ниво CD34-позитивних структура, у испитиваним групама након примене масти и гела са сибирским бором примећени су охрабрујући резултати у смислу одсуства CD34-позитивних структура и значајног смањења Iba1-позитивних макрофага. Како раније спроведена истраживања сугеришу да је недостатак позитивних CD34 структура повезан са ефикасним зарастањем рана можемо рећи да је ово потврђено и нашим испитивањем (168). Ови резултати су у снажној корелацији са процесом контракције ране, наглашавајући да ЕУ сибирског бора може послужити као нова, потврђена стратегија у лечењу дијабетесних рана. Посматрањем хистопатолошких промена након тронедељне апликације дермалних препарата на место ране можемо приметити да је у групама третираним сибирским бором заступљен потпуни опоравак дебљине епидерма са очуваним цитолошким карактеристикама (**Фигура 13**). Код контролних група је ситуација другачија, јер је на месту ране примећено фиброзно ткиво без карактеристика нормалне коже. Наше резултате потврђују и друге студије које су се бавиле локалном применом других врста борова којима је потврђена ефикасност формулација у третману рана (135,148). Истраживању додатно показују да овакве формулације значајно побољшавају процесе регенерације. Уочена је интензивна депозиција колагена, што је од кључног значаја за обнову екстрацелуларног матрикса, као и побољшана ангиогенеза. Истовремено, значајно смањење инфламацијског одговора, праћено редукцијом експресије Iba1, указује на способност ових формулација да модулишу инфламаторне процесе и убрзају прелазак у фазу регенерације. Ови налази потврђују мултифункционални механизам деловања етарског уља сибирског бора, који укључује антиинфламаторне, антиоксидативне и регенеративне ефекте, чиме значајно доприноси процесу зарастања рана.

Оба топикална препарата формулисана са етарским уљем сибирског бора (маст и гел) показала су супериорну ефикасност у поређењу са нетретираним групама, као и у односу на групе третиране базним формулацијама и сребро-сулфадиазином. Анализом добијених резултата утврђено је да маст на бази етарског уља сибирског бора исказује незнатно бољи терапеутски ефекат у односу на гел, што се може приписати физичко-хемијским карактеристикама фармацеутске подлоге. Наиме, маст се дуже задржава на кожи, мање је подложна испирању, чиме се продужава време излагања активних компоненти на месту апликације, што може резултирати интензивнијим биолошким ефектом. Резултати макроскопске анализе су у корелацији са хистопатолошким налазима, посебно у погледу смањења површине ране, што указује на убрзану регенерацију ткива и бољи ток зарастања. На основу добијених података, етарско уље сибирског бора се може сматрати перспективним терапијским агенсом у третману

хроничних рана, нарочито код пацијената са дијабетесом, код којих је процес зарастања значајно компромитован.

Дијабетес мелитус је хронично метаболичко обољење које, поред хипергликемије, карактерише појачан инфламаторни одговор и оксидативни стрес, што значајно нарушава процесе зарастања рана. Оксидативни стрес настаје као последица дисбаланса између продукције РОС и антиоксидативних механизма организма, при чему вишак РОС доводи до оксидативног оштећења биомолекула, укључујући протеине, липиде и ДНК. Осим тога, РОС ремете сигналне путеве који регулишу ангиогенезу, миграцију ћелија и синтезу колагена, што су кључни процеси у регенерацији ткива. Хипергликемија утиче на повећану продукцију РОС кроз више механизма, укључујући активацију протеин киназе C (PKC), повећану продукцију напредних гликозилационих крајњих продуката (AGEs), активацију никотинамид аденин динуклеотид фосфата (NADPH) оксидазе и полилозни метаболички пут. Посебно је значајно што полилозни пут доводи до исцрпљивања NADPH, кофактора неопходног за регенерацију GSH, једног од најважнијих ендогених антиоксиданата. Дефицит NADPH резултира смањеном антиоксидативном заштитом и повећаном продукцијом РОС, што додатно погоршава инфламаторни процес и ремети равнотежу у процесу зарастања рана. Недавна истраживања указују да су нивои AGEs и њихових рецептора (RAGE) знатно повишени код особа са дијабетесом, што представља један од кључних фактора у патогенези дијабетичких компликација. Везивањем AGEs за RAGE рецепторе на површини ендотелних ћелија активирају се инфламаторни путеви који доводе до прекомерне продукције РОС, доприносећи оштећењу ткива и хроничној инфламацији. Присуство AGEs у микроокружењу дијабетичке ране омета нормалан процес зарастања, успорава контракцију ране, продужава инфламаторну фазу и негативно утиче на пролиферацију и ремоделовање екстрацелуларног матрикса (ECM). Поред тога, AGEs редукују биорасположивост ендотелног NO, што погоршава микроциркулацију и доприноси васкуларним компликацијама. Сматра се да AGEs-RAGE оса игра значајну улогу у развоју микро и макроваскуларних компликација дијабетеса, додатно погоршавајући хроничне инфламаторне процесе и реметећи хомеостазу ткива (79). Комбинација хипергликемијом индукованог оксидативног стреса и продужене инфламаторне реакције доводи до успореног и неефикасног зарастања рана код дијабетичких пацијената, што захтева примену терапијских стратегија усмерених на модулацију инфламаторних и антиоксидативних механизма. Смањена производња РОС и/или појачана антиоксидациона активност може обезбедити брже зарастање рана и побољшати поремећене процесе зарастања рана. Овакви ефекти су примећени код бројних оралних и топикалних препарата на природној бази која су богата антиоксидансима (147,169,170). Са тим у вези, на крају тронедељног третмана, из крви жртвованих животиња одређени су биохемијски параметри који одражавају комплетан антиоксидациони профил. Циљ овог дела истраживања био је да утврдимо да ли топикалне формулације на биљној бази које су примењиване свакодневно могу модулисати системски оксидативни статус.

Нетретирана група и групе којима је примењивана база, показале су већу производњу прооксиданата као што су H_2O_2 , O_2^- и TBARS што је утицало на спорији процес зарастања рана. Са друге стране инхибиција липидне пероксидације и елиминација прооксиданаса се може видети на **Фигури 11.** код група којима су примењиване формулације са сибирским бором. Код животиња којима је апликована 0,5% маст сибирског бора је примећено значајно смањење прооксиданаса, и то: 2,23 nmol/ml за H_2O_2 , 1,23 nmol/ml за O_2^- и 1,3 μ mol/ml за TBARS. Сличне вредности су забележене и у групи животиња које су третиране 0,5% гелом сибирског бора, што се значајно разликује од резултата добијених у контролној групи: 4,08 nmol/ml за H_2O_2 ,

3,51 nmol/ml за O_2^- и 3,27 $\mu\text{mol/ml}$ за TBARS, док значајних промена међу испитиваним групама у нивоу NO_2^- није било. У стањима оксидационог стреса, када постоји већа концентрација РОС, активирају се системи антиоксидационе заштите у виду ензима који имају улогу у смањењу концентрације слободних радикала. Повећани нивои ових ензима, SOD и CAT, на бољи антиоксидациони потенцијал, што се може видети на **Фигури 11**. Значајно повећање активности антиоксидационих ензима у односу на контролну групу је примећено код примене дермалних препарата са инкорпорираним ЕУ *P. sibirica*. Добијене вредности за ниво SOD су $41,72 \text{ U/gHb} \times 10^3$ за маст сибирског бора и $35,61 \text{ U/gHb} \times 10^3$ за гел сибирског бора. Што се тиче нивоа CAT, гел је показао за нијансу боље резултате од масти са ЕУ (маст: $4,93 \text{ U/gHb} \times 10^3$, гел: $5,20 \text{ U/gHb} \times 10^3$). Како су литературни подаци о топикалној примени ЕУ сибирског бора ограничени, не можемо направити директну корелацију наших резултата са другим студијама. Поред *Pinus*-а постоје многе друге биљне врсте које одговарају хемијском саставу ЕУСБ. Један од примера је *Helichrysum italicum* чији је главни састојак етарског уља α -пинен и која показују позитиван утицај на процес зарастања рана који су у складу са нашим истраживањем (85,86). Испитивањем ЕУ *Juniperus oxycedrus*, добијени резултати су показали да етарско уље значајно убрзава зарастање рана, при чему је већ трећег дана уочено смањење површине ране, а потпуно зарастање забележено до 12. дана. Његови антимикробни ефекти испољили су снажну активност против *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *C. albicans*, што је допринело смањењу инфекције и убрзању регенеративних процеса. Поред антимикробног деловања, уочено је да етарско уље *J. oxycedrus* подстиче зарастање рана кроз цитотоксични ефекат на епителне ћелије, олакшавајући уклањање оштећеног ткива и стимулишући регенерацију. Ови налази истичу α -пинен, као једну од доминантних компоненти, као значајан фактор у терапији инфицираних рана, с обзиром на његова антибактеријска, антигљивична и регенеративна својства (171). Друга студија је испитивала ефекат екстракта коре *Pinus brutia* на зарастање инцизионих рана код пацова. Резултати су показали да је екстракт *P. brutia* значајно инхибирао липидну пероксидацију и повећао антиоксидативну активност, што је потврђено испитивањем нивоа SOD и CAT у ткиву рана, где је након локалне примене препарата забележено њихово повећање. Хистолошка анализа ткива након девет дана примене је указала на побољшане процесе зарастања, укључујући повећану васкуларизацију, редукцију некротичног ткива и убрзану регенерацију (169).

Инхибицијом производње РОС покреће се ангиогенеза и пролиферација фибробласта, чиме се стимулише затварање рана на кожи. Такође, повећање активности ензима антиоксидационе заштите, доводи до ублажавања оксидационог стреса за ког се сматра да је један од одговорних механизма за остварене ефекте у процесу зарастања рана код дијабетичних пацова. На основу добијених резултата може се закључити да топикалне формулације на бази сибирског бора позитивно утичу на смањење оксидационог стреса чиме доприносе бољем зарастању рана.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. Закључци

Резултати овог истраживања нам омогућавају да формулишемо следеће закључке:

1. Хемијском анализом етарског уља сибирског бора утврђено је присуство једињења од којих су најзаступљенији монотерпени: α -пинен, β -пинен и δ -карен.
2. Изражену антиоксидациону активност *in vitro* тестовима показало је етарско уље сибирског бора.
3. Дермални препарати на бази етарског уља сибирског бора (маст и гел) су се показали стабилним у року од шест месеци.
4. На основу резултата теста акутне дермалне иритације, утврђено је да су маст и гел са инкорпорираним 0,5% етарским уљем сибирског бора безбедни за топикалну примену, што указује на њихов потенцијал за даљу дерматолошку употребу.
5. Утврђено је да топикалне формулације на бази сибирског бора ефикасно инхибирају инфламаторну реакцију индуковану карагенаном, што се манифестује смањењем едема шапе и оксидативног стреса, указујући на њихов потенцијал у антиинфламаторној терапији.
6. Резултати истраживања показали су да препарати за дермалну примену са инкорпорираним етарским уљем сибирског бора унапређују процес зарастања рана насталих ексцизионом методом, убрзавајући реепителизацију и регенерацију.
7. Добијени резултати указују на то да се постигнути терапеутски ефекти могу приписати антиоксидативном и антиинфламаторном деловању етарског уља сибирског бора, као и биолошкој активности његових најзаступљенијих активних састојака, што додатно потврђује његов потенцијал у топикалној примени. У складу са тим, даља клиничка испитивања су неопходна како би се потврдио њихов терапијски потенцијал и омогућила широка примена у дерматолошкој пракси.

VII

ЛИТЕРАТУРА

7. Литература:

1. Ivanova N, Tantsyrev N, Li G. Regeneration of *Pinus sibirica* Du Tour in the Mountain Tundra of the Northern Urals against the Background of Climate Warming. *Atmosphere*. 2022; 13(8):1196.
2. Prosekov AY, Kemerovo State University, Milent'eva IS, Kemerovo State University, Pavsky VA, Kemerovo State University, et al. Study of the biofunctional properties of cedar pine oil with the use of testing cultures. *FRM*. 2018; 6(1):136–43.
3. Goroshkevich S, Velisevich S, Popov A, Khutornoy O, Vasilyeva G. 30-year cone production dynamics in Siberian stone pine (*Pinus sibirica*) in the southern boreal zone: a causal interpretation. *Pl Ecol Evol*. 2021; 154(3):321–31.
4. Critchfield W. Hybridization and classification of the white pines (*Pinus* section *Strobus*). *Taxon*. 1986; 35(4):647–56.
5. Wang H, Hong J. Genetic resources, tree improvement and gene conservation of five-needle pines in East Asia. *USDA Forest Service Proceedings RMRS-P*. 2004;32:73–8.
6. Shpatov AV, Popov SA, Salnikova OI, Kukina TP, Shmidt EN, Um BH. Composition and Bioactivity of Lipophilic Metabolites from Needles and Twigs of Korean and Siberian Pines (*Pinus koraiensis* SIEBOLD & ZUCC . and *Pinus sibirica* DU TOUR). *Chemistry & Biodiversity*. 2017;14(2):e1600203.
7. Rogachev AD, Salakhutdinov NF. Chemical Composition of *Pinus sibirica* (Pinaceae). *Chemistry & Biodiversity*. 2015;12(1):1–53.
8. Zadernowski R, Naczek M, Czaplicki S. Chemical composition of *Pinus sibirica* nut oils. *Euro J Lipid Sci & Tech*. 2009; 111(7):698–704.
9. Carrión-Prieto P, Martín-Gil J, Fernández-Coppel I, Ruíz-Potosme N, Martín-Ramos P. Physico-chemical studies of Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) derived chewing gum. *Trends in Phytochemical Research*. 2018; 2(2):119–24.
10. Ninkuu V, Zhang L, Yan J, Fu Z, Yang T, Zeng H. Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *IJMS*. 2021; 27:22(11):5710.
11. Romanenko EP, Domrachev DV, Tkachev AV. Variations in Essential Oils from South Siberian Conifers of the *Pinaceae* Family: New Data towards Identification and Quality Control. *Chemistry & Biodiversity*. 2022; 19(2):e202100755.
12. Sampietro DA, Gomez ADLA, Jimenez CM, Lizarraga EF, Ibatayev ZA, Suleimen YM, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from medicinal plants of Kazakhstan. *Natural Product Research*. 2017; 18:31(12):1464–7.
13. Pandey KB, Rizvi SI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2(5):270–8.
14. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu Rev Nutr*. 2002; 22(1):19–34.

15. Singh S, Kaur I, Kariyat R. The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions. *IJMS*. 2021; 22(3):1442.
16. Lantto TA, Dorman HJD, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Tikhonov VP, et al. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*. 2009; 112(4):936–43.
17. Shikov A, Pozharitskaya O, Laakso I, Dorman H, Makarov V, Tikhonov V, et al. Thiolytic-HPLC characterization of the phenolic composition of nut shells of *Pinus sibirica* (Du Tour) Rupr. *Planta Med*. 2006; 24:72(11):s-2006-949766.
18. Fedorova TY, Fedorov SV, Babkin VA. Phenolic compounds of cedar wood (Siberian pine) *Pinus sibirica* du tour. *JCPRM*. 2020; 22(3):97–104.
19. Chen J, Liu H. Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *IJMS*. 2020; 8;21(16):5695.
20. He M, Ding NZ. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response. *Front Plant Sci*. 2020; 4:11:562785.
21. He M, Qin CX, Wang X, Ding NZ. Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation. *Front Plant Sci*. 2020; 23:11:390.
22. Averina ES, Seewald G, Müller RH, Radnaeva LD, Popov DV. Nanostructured lipid carriers (NLC) on the basis of Siberian pine (*Pinus sibirica*) seed oil. *Pharmazie*. 2010; 65(1):25–31.
23. Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Makarova MN. Anti-inflammatory effect of *Pinus sibirica* oil extract in animal models. *J Nat Med*. 2008; 62(4):436–40.
24. Koh ZA, Litovka YA, Makolova PV, Shabanova KA, Pavlov IN. Biochemical composition of vegetative explants and callus *Pinus sibirica* du tour. *JCPRM*. 2020; 21(4):395–403.
25. Matveeva R, Bratilova N, Kubrina S. Variability of *Pinus sibirica* by mineral accumulation in needles and seeds. *Lesnoy Zhurnal (Forestry Journal)*. 2009; 96.
26. Pokrovsky L, Tkachev A. Study of Composition of Volatile Compounds of Siberian and Far East Conifers by Gas Chromatography - Mass-Spectrometry. In Novosibirsk, Russia; 1998.
27. Sharma S, Barkauskaite S, Jaiswal AK, Jaiswal S. Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*. 2021; 343:128403.
28. Velisevich S, Popov A. Evaluation of cone and seed quality of Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour) for plus-tree selection. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2022; 1:46(5):717–29.
29. Xie K, Miles EA, Calder PC. A review of the potential health benefits of pine nut oil and its characteristic fatty acid pinolenic acid. *Journal of Functional Foods*. 2016; 23:464–73.

30. Bhandari C, Agnihotr N. Pine nut oil supplementation alleviates the obesogenic effects in high-fat diet induced obese rats: A comparative study between epididymal and retroperitoneal adipose tissue. *Nutr Res.* 2022; 106:85–100.
31. Baker EJ, Miles EA, Calder PC. A review of the functional effects of pine nut oil, pinolenic acid and its derivative eicosatrienoic acid and their potential health benefits. *Prog Lipid Res.* 2021; 82:101097.
32. Valimaa A, Honkalampihamalainen U, Pietarinen S, Willfor S, Holmbom B, Vonwright A. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International Journal of Food Microbiology.* 2007; 115(2):235–43.
33. Christiansen E, Watterson KR, Stocker CJ, Sokol E, Jenkins L, Simon K, et al. Activity of dietary fatty acids on FFA1 and FFA4 and characterisation of pinolenic acid as a dual FFA1/FFA4 agonist with potential effect against metabolic diseases. *Br J Nutr.* 2015 ; 113(11):1677–88.
34. Özbek H, Yılmaz BS. Anti-inflammatory and hypoglycemic activities of alpha-pinene. *actapharm.* 2017; 55(4):7.
35. Sørensen KV, Korfitzen SS, Kaspersen MH, Ulven ER, Ekberg JH, Bauer-Brandl A, et al. Acute effects of delayed-release hydrolyzed pine nut oil on glucose tolerance, incretins, ghrelin and appetite in healthy humans. *Clin Nutr.* 2021; 40(4):2169–79.
36. Sørensen KV, Kaspersen MH, Ekberg JH, Bauer-Brandl A, Ulven T, Højlund K. Effects of Delayed-Release Olive Oil and Hydrolyzed Pine Nut Oil on Glucose Tolerance, Incretin Secretion and Appetite in Humans. *Nutrients.* 2021; 13(10):3407.
37. Vechkapova SO, Zapara TA, Morozova EA, Proskura AL, Schul'ts EE, Tolstikova TG, et al. Amide of Lambertian Acid Suppresses Hyperactivation of Inotropic Glutamate Receptors, but not Synaptic Potentiation in Hippocampal Sections. *Bull Exp Biol Med.* 2016;161(6):782–5.
38. Shahinozzaman M, Islam M, Basak B, Sultana A, Emran R, Ashrafizadeh M, et al. A review on chemistry, source and therapeutic potential of lambertianic acid. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2021; 76(9–10):347–56.
39. Rahmani H, Moloudi MR, Hashemi P, Hassanzadeh K, Izadpanah E. Alpha-Pinene alleviates motor activity in animal model of Huntington's disease via enhancing antioxidant capacity. *Neurochemical Research.* 2023; 48. 1-8. 10.1007/s11064-023-03860-9.
40. Ryuk JA, Ko BS, Moon NR, Park S. *Pinus koraiensis* needle or cone extracts alleviate atopic dermatitis symptoms by regulating immunity and suppressing inflammation in HaCaT cells and Nc/Nga mice. *J Food Biochem.* 2022; 46(7):e14135.
41. Kang Y, Oh S, Son Y, Yang W, Kim S, Lyu JH, et al. Therapeutic Effects of *Pinus koraiensis* on 1-Fluoro-2,4-Dinitrofluorobenzene-induced Contact Dermatitis in Mice. *Pharmacognosy Magazine.* 2023; 19(1):168–75.

42. Kim HM, Kim TJ, Im D bin, Ha SB, Kim EH, Cha BS, et al. Skin Anti-aging and Anti-wrinkle Effects of *Pinus koreaiensis* Seed Oil. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*. 2021; 34(4):1–11.
43. 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(9):2488.
44. Grzeszczak J, Wróblewska A, Klimowicz A, Gajewska S, Kucharski Ł, Koren ZC, et al. Antioxidant Activities of Ethanolic Extracts Obtained from α -Pinene-Containing Plants and Their Use in Cosmetic Emulsions. *Antioxidants*. 2024; 13(7):811.
45. El Omari N, Mrabti HN, Benali T, Ullah R, Alotaibi A, Abdullah ADI, et al. Expediting Multiple Biological Properties of Limonene and α -Pinene: Main Bioactive Compounds of *Pistacia lentiscus* L., Essential Oils. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023; 28(9):229.
46. Kamal RM, Sabry MM, El-Halawany AM, Rabie MA, El Sayed NS, Hifnawy MS, et al. GC-MS analysis and the effect of topical application of essential oils of *Pinus canariensis* C.Sm., *Cupressus lusitanica* Mill. and *Cupressus arizonica* Greene aerial parts in Imiquimod-Induced Psoriasis in Mice. *J Ethnopharmacol*. 2024; 318(Pt B):116947.
47. Akinlade OM, Owoyele BV, Soladoye AO. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy. *Afr Health Sci*. 2021;21(2):719–27.
48. Zhukova E, Budaeva V, Egorova E, Erohina G, Vizukova A. Pine seed oil and opportunities of its usage. *J Oils and Fats*. 2005; (2):9–15.
49. Sachuk RM, Stravsky YaS, Horyuk YuV, Katsaraba OA, Zhyhalyuk SV. Selection of the optimal composition of vegetable oil and chlorophyllipt oil components. *Ukr Jour of Vet and Agr Sci*. 2019; 2(3):11–4.
50. Mirković S, Tadić V, Milenković MT, Ušjak D, Racić G, Bojović D, et al. Antimicrobial Activities of Essential Oils of Different *Pinus* Species from Bosnia and Herzegovina. *Pharmaceutics*. 2024; 16(10):1331.
51. Takala R, Ramji DP, Andrews R, Zhou Y, Farhat M, Elmajee M, et al. Pinolenic acid exhibits anti-inflammatory and anti-atherogenic effects in peripheral blood-derived monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2022; 12(1):8807.
52. Takala R, Ramji DP, Andrews R, Zhou Y, Burston J, Choy E. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of pinolenic acid in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2022; 61(3):992–1004.
53. Efremov AA, Zykova ID, Senashova VA, Grodnitskaya ID, Pashenova NV. Antimicrobial and Antiradical Activities of Individual Fractions of *Pinus sibirica* Du Tour and *Abies sibirica* Ledeb. Growing in Siberia. *Russ J Bioorg Chem*. 2021; 47(7):1439–44.
54. Aidarkhanova GS, Kukhar EV. Search for the therapeutic potential of biologically active substances contained in coniferous plants. *kazatuvc*. 2023; (1(001)):4–16.

55. Chung HS, Kim IH, Kim SH, Lee JH. Antioxidant Properties of *Pinus koraiensis* Needle Powder Extracts as Influenced by Drying Methods. *Food Eng Prog.* 2013; 17(4):396–400.
56. Zhang H, Zou P, Zhao H, Qiu J, Regenstein JM, Yang X. Isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharide from pinecones of *Pinus koraiensis*. *Carbohydr Polym.* 2021; 251:117078.
57. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem.* 2022; 383:132531.
58. Willför SM, Ahotupa MO, Hemming JE, Reunanen MHT, Eklund PC, Sjöholm RE, et al. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(26):7600–6.
59. Bender D. Omega-3 masne kiseline-svojstva i djelovanje. *Dijetetika.* 2011; (17):234–40.
60. Percival NJ. Classification of Wounds and their Management. *Surgery (Oxford).* 2002; 20(5):114–7.
61. Sarabahi S, Tiwari VK, Bhattacharya S. Principles and Practice of Wound Care. *Indian J Plast Surg.* 2012; 45(01):167–9.
62. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.* 2020; 10(9):200223.
63. Niculescu AG, Grumezescu AM. An Up-to-Date Review of Biomaterials Application in Wound Management. *Polymers.* 2022; 14(3):421.
64. Herman TF, Popowicz P, Bordoni B. Wound Classification. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. PMID: 32119343.*
65. Milne KE, Penn-Barwell JG. Classification and management of acute wounds and open fractures. *Surgery (Oxford).* 2020; 38(3):143–9.
66. Ferreira MC, Tuma P, Carvalho VF, Kamamoto F. Complex wounds. *Clinics (Sao Paulo).* 2006; 61(6):571–8.
67. Tudoroiu EE, Dinu-Pîrvu CE, Albu Kaya MG, Popa L, Anuța V, Prisada RM, et al. An Overview of Cellulose Derivatives-Based Dressings for Wound-Healing Management. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(12):1215.
68. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews.* 2019; 99(1):665–706.
69. Rani Raju N, Silina E, Stupin V, Manturova N, Chidambaram SB, Achar RR. Multifunctional and Smart Wound Dressings-A Review on Recent Research Advancements in Skin Regenerative Medicine. *Pharmaceutics.* 2022; 14(8):1574.
70. Criollo-Mendoza MS, Contreras-Angulo LA, Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Jiménez-Ortega LA, Heredia JB. Wound Healing Properties of Natural Products: Mechanisms of Action. *Molecules.* 2023; 28(2):598.

71. Sen CK. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. *Adv Wound Care* (New Rochelle). 2021; 10(5):281–92.
72. Andrews KL, Houdek MT, Kiemlele LJ. Wound management of chronic diabetic foot ulcers: from the basics to regenerative medicine. *Prosthet Orthot Int*. 2015; 39(1):29–39.
73. Patel S, Srivastava S, Singh MR, Singh D. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed Pharmacother*. 2019; 112:108615.
74. Tomic D, Shaw JE, Magliano DJ. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2022; 18(9):525–39.
75. Anisuzzaman DM, Patel Y, Niezgoda J, Gopalakrishnan S, Yu Z. Wound Severity Classification using Deep Neural Network [Internet]. *arXiv*; 2022 [cited 2025 Feb 1]. Available from: <https://arxiv.org/abs/2204.07942>
76. Ding X, Tang Q, Xu Z, Xu Y, Zhang H, Zheng D, et al. Challenges and innovations in treating chronic and acute wound infections: from basic science to clinical practice. *Burns Trauma*. 2022; 10:tkac014.
77. Ramirez-Acuña JM, Cardenas-Cadena SA, Marquez-Salas PA, Garza-Veloz I, Perez-Favila A, Cid-Baez MA, et al. Diabetic Foot Ulcers: Current Advances in Antimicrobial Therapies and Emerging Treatments. *Antibiotics*. 2019; 8(4):193.
78. Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017 ; 18(7):1419.
79. 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.
80. Yang S, Li Y, Liu C, Wu Y, Wan Z, Shen D. Pathogenesis and treatment of wound healing in patients with diabetes after tooth extraction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13:949535.
81. Burgess JL, Wyant WA, Abdo Abujamra B, Kirsner RS, Jozic I. Diabetic Wound-Healing Science. *Medicina (Kaunas)*. 2021; 57(10):1072.
82. Baldassarro VA, Lorenzini L, Giuliani A, Cescatti M, Alastra G, Pannella M, et al. Molecular mechanisms of skin wound healing in non-diabetic and diabetic mice in excision and pressure experimental wounds. *Cell Tissue Res*. 2022; 388(3):595–613.
83. Heydari P, Kharaziha M, Varshosaz J, Javanmard SH. Current knowledge of immunomodulation strategies for chronic skin wound repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022; 110(2):265–88.
84. Li D, Wu N. Mechanism and application of exosomes in the wound healing process in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022; 187:109882.

85. Andjić M, Draginić N, Kočović A, Jeremić J, Vučićević K, Jeremić N, et al. Immortelle essential oil-based ointment improves wound healing in a diabetic rat model. *Biomed Pharmacother.* 2022; 150:112941.
86. Andjić M, Božin B, Draginić N, Kočović A, Jeremić JN, Tomović M, et al. Formulation and Evaluation of *Helichrysum italicum* Essential Oil-Based Topical Formulations for Wound Healing in Diabetic Rats. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(8):813.
87. Mohamed H, El Lenjawi B, Abu Salma M, Abdi S. Honey based therapy for the management of a recalcitrant diabetic foot ulcer. *J Tissue Viability.* 2014; 23(1):29–33.
88. Corrêa RCG, Heleno SA, Alves MJ, Ferreira ICFR. Bacterial Resistance: Antibiotics of Last Generation used in Clinical Practice and the Arise of Natural Products as New Therapeutic Alternatives. *Curr Pharm Des.* 2020; 26(8):815–37.
89. Terreni M, Taccani M, Pregnolato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules.* 2021 ; 26(9):2671.
90. Matta-Gutiérrez G, García-Morales E, García-Álvarez Y, Álvaro-Afonso FJ, Molines-Barroso RJ, Lázaro-Martínez JL. The Influence of Multidrug-Resistant Bacteria on Clinical Outcomes of Diabetic Foot Ulcers: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2021 ; 10(9):1948.
91. Castronovo LM, Vassallo A, Mengoni A, Miceli E, Bogani P, Firenzuoli F, et al. Medicinal Plants and Their Bacterial Microbiota: A Review on Antimicrobial Compounds Production for Plant and Human Health. *Pathogens.* 2021; 10(2):106.
92. Sun T, Li XD, Hong J, Liu C, Zhang XL, Zheng JP, et al. Inhibitory Effect of Two Traditional Chinese Medicine Monomers, Berberine and Matrine, on the Quorum Sensing System of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2019; 10:2584.
93. Yang YM, Kim SY, Seki E. Inflammation and Liver Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Semin Liver Dis.* 2019; 39(1):26–42.
94. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S, et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol.* 2019; 14(1):50–9.
95. Alfaddagh A, Martin SS, Leucker TM, Michos ED, Blaha MJ, Lowenstein CJ, et al. Inflammation and cardiovascular disease: From mechanisms to therapeutics. *Am J Prev Cardiol.* 2020; 4:100130.
96. Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity.* 2022; 55(1):31–55.
97. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* 2020; 180:114147.

98. Parolini M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Sci Total Environ.* 2020; 740:140043.
99. Lippert A, Renner B. Herb-Drug Interaction in Inflammatory Diseases: Review of Phytomedicine and Herbal Supplements. *J Clin Med.* 2022; 11(6):1567.
100. Choy KW, Murugan D, Leong XF, Abas R, Alias A, Mustafa MR. Flavonoids as Natural Anti-Inflammatory Agents Targeting Nuclear Factor-Kappa B (NFκB) Signaling in Cardiovascular Diseases: A Mini Review. *Front Pharmacol.* 2019; 10:1295.
101. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E, Pietraforte D. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019:8267234.
102. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants.* 2020 ; 9(9):852.
103. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(7):3380.
104. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021; 20(9):689–709.
105. Deseo MA, Elkins A, Rochfort S, Kitchen B. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract. *Food Chem.* 2020; 314:126180.
106. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy. Carol Stream, Ill: Allured Publishing Corporation; 2007. 804 p.
107. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry.* 2012; 130(4):1036–43.
108. 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.
109. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *JpnJNutrDiet.* 1986; 44(6):307–15.
110. Kouhihabidehkordi G, Kheiri S, Karimi I, Taheri F, Bijad E, Bahadoram M, et al. Effect of White Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Skin Wound Healing Process in Rats. *World J Plast Surg.* 2021; 10(1):85–95.
111. Akhtar N. Evaluation of various functional skin parameters using a topical cream of *Calendula officinalis* extract. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2011; 5(2):199–206.
112. Joshi P, Joshi S, Rajani U, Semwal RB, Semwal DK. Formulation and Evaluation of Polyherbal Cream and Lotion for the Treatment of Psoriasis-Induced Secondary Infections. *Curr Rev Clin Exp Pharmacol.* 2021; 16(1):79–96.

113. Stolić Jovanović A, Martinović M, Žugić A, Nešić I, Tosti T, Blagojević S, et al. Derivatives of L-Ascorbic Acid in Emulgel: Development and Comprehensive Evaluation of the Topical Delivery System. *Pharmaceutics*. 2023; 15(3):813.
114. Ma B, Yuan J, Chen S, Huang K, Wang Q, Ma J, et al. Topical application of temperature-sensitive caerin 1.1 and 1.9 gel inhibits TC-1 tumor growth in mice. *Am J Transl Res*. 2020; 12(1):191–202.
115. Tadić VM, Žugić A, Martinović M, Stanković M, Maksimović S, Frank A, et al. Enhanced Skin Performance of Emulgel vs. Cream as Systems for Topical Delivery of Herbal Actives (Immortelle Extract and Hemp Oil). *Pharmaceutics*. 2021; 13(11):1919.
116. Beserra FP, Vieira AJ, Gushiken LFS, 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; 2019:3182627.
117. OECD. Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD; 2015. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Available from: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_9789264242678-en.html
118. 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.
119. 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.
120. Bradic J, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, et al. Cardioprotective effects of Galium verum L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2020; 126(5):408–15.
121. Wang J, Wang M, Zhao L, Liu L, Wang X, Fan Z. Investigating the efficacy and safety of mineral smectite granules on wound healing. *Exp Ther Med*. 2021 Feb;21(2):160.
122. Andritoiu 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; 25(22):5356.
123. G/Giorgis SG, Ambikar D, Tsegaw A, Belayneh YM. Wound Healing Activity of 80% Methanolic Crude Extract and Solvent Fractions of the Leaves of *Justicia schimperiana* (Hochst. ex Nees) T. Anderson (Acanthaceae) in Mice. *J Exp Pharmacol*. 2022; 14:167–83.
124. 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*. 2023; 12(6):1277.

125. Abdul Latif M, Zulasyraf Mohd Zaki M, May Leng T, Hidayah Abdul Rahman N, Aisyah Arshad S, Hamid A. *Alocasia denudata* Engler treatment enhance open wound healing activities in Wistar rat's skin. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 176:258–67.
126. Fedorov VS, Ryazanova TV. Bark of Siberian Conifers: Composition, Use, and Processing to Extract Tannin. *Forests*. 2021; 12(8):1043.
127. Metsämuuronen S, Sirén H. Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochem Rev*. 2019; 18(3):623–64.
128. Zhang HY. Structure-Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical-Scavenging Antioxidants. *CAD*. 2005; 1(3):257–73.
129. Xanthis V, Fitsiou E, Voulgaridou GP, Bogadakis A, Chlichlia K, Galanis A, et al. Antioxidant and Cytoprotective Potential of the Essential Oil *Pistacia lentiscus* var. *chia* and Its Major Components Myrcene and α -Pinene. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(1):127.
130. Koutsaviti A, Toutoungy S, Saliba R, Loupassaki S, Tzakou O, Roussis V, et al. Antioxidant Potential of Pine Needles: A Systematic Study on the Essential Oils and Extracts of 46 Species of the Genus *Pinus*. *Foods*. 2021; 10(1):142.
131. Ancuceanu R, Anghel AI, Hovanet MV, Ciobanu AM, Lascu BE, Dinu M. Antioxidant Activity of Essential Oils from Pinaceae Species. *Antioxidants*. 2024; 13(3):286.
132. Matić SLj, Mladenović MP, Tomašević NM, Capobianco R, Ragno A, Sapienza FU, et al. Oxidative DNA damage preventive activity of essential oils of three *Pinus* species: *P. mugo*, *P. sibirica*, and *P. silvestre*. In: *Book of Proceedings. Institute for Information Technologies, University of Kragujevac*; 2023: 321–5. Available from: <https://doi.ub.kg.ac.rs/doi/zbornici/10-46793-iccbi23-321m/>
133. Kwak CS, Moon SC, Lee MS. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). *Nutr Cancer*. 2006; 56(2):162–71.
134. Stanojević J, Stanojević L, Bulatović V, Zvezdanović J, Milenković A, Simonović N, et al. Chemical composition and antioxidant activity of immortalé (*Helichrysum italicum*) (Roth) G. Don and yarrow (*Achillea millefolium* L.) essential oils. *Adv Techol*. 2022; 11(1):93–103.
135. Petrovic B, Petrovic A, Bijelic K, Stanisic D, Mitrovic S, Jakovljevic V, et al. From Nature to Healing: Development and Evaluation of Topical Cream Loaded with Pine Tar for Cutaneous Wound Repair. *Pharmaceutics*. 2024; 16(7):859.
136. Petrovic B, Bradic J, Petrovic A, Ivanovic D, Tabakovic M, Saric S, et al. Development and Stability Evaluation of Natural Topical Formulations Containing *Pinus sibirica* Essential Oil. *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR)*. 2024; Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/eabr-2024-0003>
137. Ganguly R, Verma G, Ingle A, Kumar S, Sarma HD, Dutta D, et al. Structural, rheological and therapeutic properties of pluronic F127 hydrogel and beeswax based lavender oil ointment formulations. *Journal of Molecular Liquids*. 2022; 365:120157.

138. Medeshova A, Orazbayeva P, Romanova A, Dildabekova N, Orazbayev B, Ashirbekova B, et al. Development and Rheological studies of gels with Essential oil of Chamomile (*Chamomillae recutita* L.). RJPT. 2023; 5161–6.
139. Lukić M, Pantelić I, Savić SD. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics*. 2021; 8(3):69.
140. Azam F, Alqarni MH, Alnasser SM, Alam P, Jawaid T, Kamal M, et al. Formulation, In Vitro and In Silico Evaluations of Anise (*Pimpinella anisum* L.) Essential Oil Emulgel with Improved Antimicrobial Effects. *Gels*. 2023; 9(2):111.
141. Saraiva S, Crespo A, Vaz F, Filipe M, Santos D, Jacinto T, et al. Development and Characterization of Thermal Water Gel Comprising Helichrysum italicum Essential Oil-Loaded Chitosan Nanoparticles for Skin Care. *Cosmetics*. 2023; 10(1):8.
142. Irianto IDK, Ismiyati I, Witaningrum E, Ayuningtyas EN, Ulfah MM, Purwanto P. Antibacterial activity of cream, ointment, and emulgel of *Ocimum basilicum* L. essential oil against *Propionibacterium acnes*. *TradMedJ*. 2023; 28(1):40.
143. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Bampidis V, Azimonti G, Bastos M de L, Christensen H, Fašmon Durjava M, et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting of an essential oil from *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl (cassia leaf oil) for use in all animal species (FEFANA asbl). *EFS2*. 2022; 20(10). Available from: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2022.7600>
144. Abelan US, de Oliveira AC, Cacoci ÉSP, Martins TEA, Giacon VM, Velasco MVR, et al. Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. *J Cosmet Dermatol*. 2022; 21(4):1407–18.
145. Abdlaty R, Hayward J, Farrell T, Fang Q. Skin erythema and pigmentation: a review of optical assessment techniques. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021; 33:102127.
146. Hajhashemi V, Zolfaghari B, Amin P. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and essential oil of *Pinus eldarica* in animal models. *Avicenna J Phytomed*. 2021; 11(5):494–504.
147. Tümen İ, Akkol EK, Taştan H, Süntar I, Kurtca M. Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait). *J Ethnopharmacol*. 2018 Jan 30;211:235–46.
148. Süntar I, Tumen I, Ustün O, Keleş H, Akkol EK. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. *J Ethnopharmacol*. 2012 ; 139(2):533–40.
149. Makarenko SP, Konstantinov YuM, Shmakov VN, Konenkina TA. Fatty acid composition of lipids in the calluses of two pine species *Pinus sibirica* and *Pinus sylvestris*. *Russ J Plant Physiol*. 2010; 57(5):739–43.
150. 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.

151. 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.
152. Santos ES, Abrantes Coelho GL, Saraiva Fontes Loula YK, Saraiva Landim BL, Fernandes Lima CN, Tavares de Sousa Machado S, et al. Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022; 2022:8173307.
153. Kummer R, Estevão-Silva C, Bastos R, Rocha B, Spironello R, Yamada A, et al. Alpha-pinene reduces in vitro and in vivo leukocyte migration during acute inflammation. *International Journal of Applied Research in Natural Products.* 2015; 8(4):12–7.
154. Santos ES, De Sousa Machado ST, Rodrigues FB, Da Silva YA, Matias LCX, Lopes MJP, et al. Potential anti-inflammatory, hypoglycemic, and hypolipidemic activities of alpha-pinene in diabetic rats. *Process Biochemistry.* 2023; 126:80–6.
155. 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(4):731–42.
156. Ramos-Tovar E, Muriel P. Molecular Mechanisms That Link Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis in the Liver. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9(12):1279.
157. Mistry K, Dabhi B, Joshi B. Evaluation of oxidative stress biomarkers and inflammation in pathogenesis of diabetes and diabetic nephropathy. *IJBB.* 2020; 57:45–50.
158. de Alvarenga JFR, Genaro B, Costa BL, Purgatto E, Manach C, Fiamoncini J. Monoterpenes: current knowledge on food source, metabolism, and health effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2023; 63(10):1352–89.
159. Bouzenna H, Hfaiedh N, Giroux-Metges MA, Elfeki A, Talarmin H. Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017; 93:961–8.
160. 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.
161. Dantas MGB, Reis SAGB, Damasceno CMD, Rolim LA, Rolim-Neto PJ, Carvalho FO, et al. Development and Evaluation of Stability of a Gel Formulation Containing the Monoterpene Borneol. *ScientificWorldJournal.* 2016; 2016:7394685.
162. Rivas da Silva AC, Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DCM, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules.* 2012; 17(6):6305–16.
163. Cimino C, Maurel OM, Musumeci T, Bonaccorso A, Drago F, Souto EMB, et al. Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. *Pharmaceutics.* 2021; 13(3):327.
164. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering (Basel).* 2021; 8(5):63.

165. Okonkwo UA, Chen L, Ma D, Haywood VA, Barakat M, Urao N, et al. Compromised angiogenesis and vascular Integrity in impaired diabetic wound healing. Kirchmair R, editor. PLoS ONE. 2020; 15(4):e0231962.
166. Fu K, Zheng X, Chen Y, Wu L, Yang Z, Chen X, et al. Role of matrix metalloproteinases in diabetic foot ulcers: Potential therapeutic targets. Front Pharmacol. 2022;13:1050630.
167. Spampinato SF, Caruso GI, De Pasquale R, Sortino MA, Merlo S. The Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes: Looking among Old Drugs. Pharmaceuticals (Basel). 2020; 13(4):60.
168. He J, Huang W, Wang J, Li G, Xin Q, Lin Z, et al. Single-cell analysis reveals distinct functional heterogeneity of CD34+ cells in anagen wound and diabetic wound. Biochem Biophys Res Commun. 2023; 639:9–19.
169. Cetin EO, Yesil-Celiktas O, Cavusoglu T, Demirel-Sezer E, Akdemir O, Uyanikgil Y. Incision wound healing activity of pine bark extract containing topical formulations: a study with histopathological and biochemical analyses in albino rats. Pharmazie. 2013; 68(1):75–80.
170. Geana EI, Ciucure CT, Tamaian R, Marinas IC, Gaboreanu DM, Stan M, et al. Antioxidant and Wound Healing Bioactive Potential of Extracts Obtained from Bark and Needles of Softwood Species. Antioxidants. 2023; 12(7):1383.
171. Battah B, Shbibe L, Ahmad O, Soukkarieh C, Al Okla SM, Chianese T, et al. Juniperus oxycedrus L. ssp. Essential Oil Microneedles: A Promising Antimicrobial and Wound Healing Activity. Pharmaceuticals. 2023; 17(1):40.

БИОГРАФИЈА

Мр фарм, Милица Николић, рођена је 16.07.1994. године у Смедереву. Основну школу „Вожд Карађорђе“ у Водњу је завршила са одличним успехом и носилац је дипломе „Вук Караџић“. Средњу Медицинску школу у Београду је завршила са одличним успехом и стекла звање фармацеутски техничар 2013. године.

Уписала је Фармацеутски факултет у Београду-Интегрисане академске студије за магистра фармације 2013. након чега је студије наставила на Фармацеутском факултету у Новом Саду 2015. године. Дипломирала је у јулу 2018. године. Стручни испит за магистра фармације положила је у марту 2019. године пред комисијом Министарства здравља Републике Србије. Након стицања лиценце за рад радила је као управник апотеке „Galen Pharm“ до августа 2021. године. Након тога је радила у средњој Медицинско-фармацеутској школи „Св. Петка“ запослена као наставник стручних предмета из области фармације: фармакологија са фармакотерапијом, токсикологија, медицинска биохемија и клиничка фармација до августа 2023. године. Тренутно ради у Крка фарм д.о.о. као стручни сарадник у сектору за фармаковигиланцу.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2019/2020 године. Положио је све испите предвиђене програмом докторских академских студија, као и усмени докторски испит. Учесник је јуниор пројекта бр. 14/22 на Факултету медицинских наука под називом: „Развој и процена ефикасности и безбедности нових биљних дерматолошких препарата у процесу зарастања рана, опекотина и третману локалне инфламације“. Говори и пише енглески језик и одлично познаје рад на рачунару.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Nikolic M**, Andjic M, Bradic J, Kocovic A, Tomovic M, Samanovic AM, Jakovljevic V, Veselinovic M, Capo I, Krstonosic V, Kladar N, Petrovic A. Topical Application of Siberian Pine Essential Oil Formulations Enhance Diabetic Wound Healing. *Pharmaceutics*. 2023; 9;15(10):2437. doi: 10.3390/pharmaceutics15102437
2. **Nikolic M**, Jakovljević V, Bradić, J Tomović M, Petrović B, Petrović A. Korean and Siberian Pine: review of chemical composition and pharmacological profile. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2022; 79 (6): 785-797. doi: 10.32383/appdr/161040
3. Safiye T, Vukčević B, Milidrag A, Dubljanin J, Gutić Cikotić A, Dubljanin D, Lačković M., Rodić I, **Nikolić M**, Čolaković G, Mladenović T, Gutić M. Relationship between mentalizing and teacher burnout: A cross-sectional study. *PLoS ONE*. 2023; 18 (1), e0279535.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

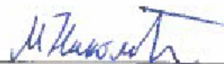
„Развој дерматолошких препарата на бази етарског уља сибирског бора (*Pinus sibirica*) и испитивање њиховог потенцијала у третману рана“

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, 21.02.2025 године,



потпис аутора

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

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

„Развој дерматолошких препарата на бази етарског уља сибирског бора (*Pinus sibirica*)
и испитивање њиховог потенцијала у третману рана“

истоветне.

У Крагујевцу, 21.02.2025. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милица Николић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

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

„Развој дерматолошких препарата на бази етарског уља сибирског бора (*Pinus sibirica*) и испитивање њиховог потенцијала у третману рана“

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

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

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.

- 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, 21.02.2025 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/>