

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



Isidora Milanović

**FARMAKOLOŠKI EFEKTI ETARSKOG ULJA RUZMARINA
ROSMARINUS OFFICINALIS, L. (LAMIACEAE), NA MIŠEVIMA SOJA
NMRI-Haan I PACOVIMA SOJA *WISTAR***

Doktorska disertacija

Mentor:

Prof. dr Aleksandar Rašković

Novi Sad, 2015

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani material
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Isidora Milanović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Aleksandar Rašković
Naslov rada: NR	Farmakološki efekti etarskog ulja ruzmarina <i>Rosmarinus officinalis</i> , L. (<i>Lamiaceae</i>), na miševima soja <i>NMRI-Haan</i> i pacovima soja <i>Wistar</i>
Jezik publikacije: JP	Srpski / latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski /engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa; MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	Osam poglavlja, 82 strane, 26 tabela, 4 slike, 136 literaturnih navoda.
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Ruzmarin; Lekovite biljke; Biljna ulja; Antioksidansi; Biljni ekstrakti; Protektivni agensi; Nenarkotični analgetici; Životinjski modeli; Interakcija lekovitog bilja i lekova
UDK	615.322.03/.07:612.08 635.71
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Ruzmarin <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (<i>Lamiaceae</i>) je biljka koja se u tradicionalnoj medicini na našem području koristi za postizanje analgetičkog, holeretičkog i hepatoprotektivnog delovanja. Prema Evropskoj agenciji za lekove (2010 godine), indikacije za sistemsku primenu etarskog ulja ruzmarina su lečenje dispepsije i spazama gastrointestinalnog trakta, a za spoljašnju primenu se preporučuje u lečenju umereno jakih bolova u zglobovima i mišićima i u lečenju poremećaja periferne cirkulacije. Imajući u vidu da komponente etarskog ulja ruzmarina ispoljavaju i druga, potencijalno korisna farmakološka svojstva, postoji potreba da se ova delovanja detaljnije ispituju. Ciljevi ispitivanja su bili da se utvrdi: 1) analgetički efekat etarskog ulja ruzmarina i njegov uticaj na farmakodinamske osobine paracetamola, kodeina, diazepama i pentobarbitala kao i na farmakokinetičke osobine paracetamola; 2) antioksidativni i hepatoprotektivni efekat u uslovima hemijski izazvanog oksidativnog stresa.</p> <p>Metodom gasne hromatografije (GC/MS i GC/FID) utvrđen je kvantitativni sastav etarskog ulja. Najzastupljenije komponente ulja koje je korišćeno u našem ispitivanju su oksidovani monoterpeni 1,8-cineol (43.77%) i kamfor (12.53%) i monoterpeni ugljovodonik α-pinen (11.51%). Suspenzija etarskog ulja ruzmarina primenjivana je miševima u dozama 10 i 20 mg/kg tm tokom sedam dana i jednokratno u farmakodinamskim testovima: test vrele ploče, test „uvijanja“ (posle intraperitonealne primene sirćetne kiseline), test za procenu motorne koordinacije životinja na rotirajućem štapu i test merenja vremena trajanja spavanja. Za ispitivanje uticaja etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetičke osobine paracetamola i za biohemijska i toksikološka ispitivanja, korišćeni su pacovi koji su tokom sedam dana tretirani suspenzijom etarskog ulja ruzmarina u dozi 5 i 10 mg/kg tm, a sedmog dana su primili paracetamol i.v. ili p.o.. Za praćenje farmakokinetičkih parametara korišćeni su uzorci krvi dobijeni iz repne vene pacova u kojima su HPLC metodom merene koncentracije paracetamola, na osnovu kojih su potom određeni farmakokinetički parametri ovog leka. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja ruzmarina je određivana <i>in vitro</i> (DPPH i</p>

Folin-Ciocalteu testovima) i *in vivo*. Nakon žrtvovanja životinja iz prikupljenih uzoraka krvi određivani su iz seruma biokemijski parametri, pokazatelji bubrežne i jetrene funkcije, a u homogenatu tkiva jetre određivani su parametri oksidativnog stresa.

Samo etarsko ulje ruzmarina ispoljava analgetičko delovanje i smanjuje visceralnu bol izazvanu sirćetnom kiselinom. Pored toga, potencira analgetički efekat kodeina i paracetamola. Etarsko ulje ruzmarina značajno smanjuje hipnotičko delovanje pentobarbitala i sprečava poremećaj motorne koordinacije nakon primene diazepama. Etarsko ulje ruzmarina ne utiče značajnije na oralnu biološku raspoloživost paracetamola. Višekratna primena različitih doza etarskog ulja ruzmarina ne izaziva toksične promene u krvi i jetri ispitivanih životinja. Primena etarskog ulja ruzmarina štiti životinje od reaktivnih kiseoničnih vrsta, umanjuje posledice izloženosti oksidativnom stresu i ispoljava značajno hepatoprotektivno delovanje

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	5.06.2012. god.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status): KO	Predsednik: Član: Član: Član: Član:

University of Novi Sad
ACIMSI
Key word documentation

Accession number : ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral Thesis, PhD
Author: AU	Isidora Milanović
Mentor : MN	Associate Professor, Aleksandar Rašković
Title: TI	Pharmacological effects of rosemary essential oil <i>Rosmarinus officinalis</i> , L. (<i>Lamiaceae</i>), on mice of strain <i>NMRI-Haan</i> and rats of strain <i>Wistar</i>
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Chapters 8, pages 82, tables 26, images 4 and 136 references.
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Pharmacology
Subject, Key words: SKW	Rosemary; Plants, Medicinal; Plant Oils; Antioxidants; Plant Extracts; Protective Agents; Analgesics, Non-Narcotic; Models, Animal; Herb-Drug Interactions
UC	615.322.03/.07:612.08 635.71
Holding data: HD	The Library of Medical Faculty of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Rosemary <i>Rosmarinus officinalis</i>, L. (<i>Lamiaceae</i>) is traditionally used in folk medicine for its analgetic, choleric and hepatoprotective properties. According to the recommendation of European Medicines Agency from 2010, rosemary essential oil can be used for treating dyspepsia and mild spasmodic disorders of the gastrointestinal tract, and also externally as an adjuvant in the relief of minor muscular and articular pain and minor peripheral circulatory disorders. Different studies conducted with rosemary essential oil show other pharmacological effects of main components of the oil. The aim of this study was to examine: 1) analgetic effects of rosemary essential oil and its influence on the pharmacodynamic properties of paracetamol, codeine, diazepam and pentobarbital, and also its influence on the pharmacokinetic properties of paracetamol; 2) antioxidant and hepatoprotective effects on the parameters of chemically induced oxidative stress.</p> <p>The quantification of chemical constituents of the essential oil was carried out by gas chromatography (GC/FID and GC/MS). The major compounds that were identified and quantitated by GC-FID and GC-MS were oxygenated monoterpenes 1,8-cineole (43.77%), camphor (12.53%) and monoterpene hydrocarbon α-pinene (11.51%). The suspension of rosemary essential oil was applied to mice orally (doses: 10 and 20 mg/kg b.w.) for seven days and in single dose for the pharmacodynamic tests: hot plate, writhing, rotharod and sleeping time. Rats treated with suspension of rosemary essential oil for seven days orally (doses: 5 and 10 mg/kg b.w.) were used for the examination of influence of essential oil on the pharmacokinetic properties of paracetamol. Then on the 7th day the paracetamol was applied to them p.o. or i.v.. The parameters of pharmacokinetic were analyzed in blood samples obtained from rats tail veins. The HPLC method was used for measurement of concentration of paracetamol in blood samples. Those concentrations were used for calculation of the pharmacokinetic parameters. The antioxidant activity of the rosemary essential oil was evaluated <i>in vitro</i> (with DPPH and Folin-Ciocalteu tests) and <i>in vivo</i>. The animals were sacrificed and the samples of blood and liver were taken. The obtained serum</p>

was used for determination of standard biochemical parameters and the parameters of oxidative stress were analyzed in obtained liver homogenates.

The essential oil of rosemary shows analgetic properties and it decreases visceral pain induced with intraperitoneally injected acetic acid. The rosemary essential oil increases pharmacological effects of codeine and paracetamol. Also, this oil reduces pentobarbital-induced sleeping time and diminishes diazepam-induced disorder of psychomotor coordination. The essential oil of rosemary does not change paracetamol bioavailability. The rosemary essential oil applied in multiple doses does not induce toxic changes in blood and liver samples obtained from animals. The use of rosemary essential oil protects animals from reactive oxygen species, decreases the effects caused by oxidative stress and shows significant hepatoprotective effect.

Accepted on Scientific Board on:
AS

June 5th 2012

Defended:
DE

Thesis Defend Board:
DB

President:

Member:

Member:

Member:

Member:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Regulatorna u oblasti lekovitih biljaka i njihovih preparata	2
1.2. Ruzmarin u narodnoj medicini	2
1.3. Biljna droga ruzmarin, <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae) i etarsko ulje ruzmarina, <i>Aetherolum Rosmarini</i>	3
1.4. Pregled literature o farmakološkim svojstvima ruzmarina, njegovih ekstrakata i etarskog ulja	4
1.4.1. Uticaj na centralni nervni sistem	4
1.4.2. Analgetsko delovanje	5
1.4.3. Hepatoprotektivno delovanje	6
1.4.4. Uticaj na funkciju kardiovaskularnog sistema i krvi	7
1.4.5. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na homeostazu glukoze	8
1.4.6. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na endokrini sistem	9
1.4.7. Antimikrobna svojstva etarskog ulja ruzmarina	9
1.5. Interakcije etarskog ulja ruzmarina sa klasičnim lekovima	10
1.6. Odobrene indikacije za etarsko ulje ruzmarina	11
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	13
3. RADNE HIPOTEZE	14
4. MATERIJAL I METODE	15
4.1. Eksperimentalne životinje	15
4.2. Etarsko ulje ruzmarina i izračunavanje doza	15
4.3. Lekovite supstance korišćene u ogledu	17
4.4. Tretman i podela eksperimentalnih grupa	17
4.5. Farmakodinamska ispitivanja	21
4.5.1. Metod vrele ploče	22
4.5.2. Test sa sirćetnom kiselinom (test uvijanja)	22
4.5.3. Metod rotirajućeg štapa	23
4.5.4. Vreme trajanja spavanja	23
4.6. Ispitivanje uticaja etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetičke osobine paracetamola	23
4.6.1. Prikupljanje uzoraka krvi	23
4.6.2. Standardi i hemikalije	24

4.6.3. Aparatura	24
4.6.4. Priprema uzorka	25
4.7. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na parametre toksičnosti	25
4.7.1. Biohemijski parametri	25
4.7.2. Procena <i>in vitro</i> antioksidativne aktivnosti	26
4.7.2.1. Procena antioksidativne aktivnosti etarskog ulja ruzmarina DPPH testom	26
4.7.2.2. Ukupni sadržaj fenola u etarskom ulju ruzmarina	26
4.7.3. Procena <i>in vivo</i> antioksidativne aktivnosti	27
4.8. Statistička obrada podataka	28
5. REZULTATI	29
5.1. Hemijska analiza etarskog ulja ruzmarina	29
5.2. Parametri farmakodinamskih ispitivanja	33
5.2.1. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na analgetski efekat paracetamola i kodeina	33
5.2.1.1. Analgetski efekat etarskog ulja ruzmarina	33
5.2.1.2. Interakcija etarskog ulja ruzmarina sa paracetamolom	34
5.2.1.3. Interakcija etarskog ulja ruzmarina sa kodeinom	37
5.2.2. Test sa sirćetnom kiselinom (test uvijanja)	40
5.2.3. Efekat diazepama na motornu koordinaciju (test rotirajućeg štapa)	41
5.2.4. Hipnotički efekat pentobarbitala (vreme trajanja spavanja)	44
5.3. Rezultati ispitivanja uticaja etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetске osobine paracetamola	46
5.4. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na parametre toksičnosti	50
5.4.1. Biohemijski pokazatelji funkcije jetre	50
5.4.2. Parametri bubrežne funkcije	52
5.5. Rezultati procene <i>in vitro</i> antioksidativne aktivnosti etarskog ulja ruzmarina	53
5.5.1. Rezultat DPPH testa	53
5.5.2. Ukupni sadržaj fenola u etarskom ulju ruzmarina	54
5.6. Procena <i>in vivo</i> antioksidativne aktivnosti	55
6. DISKUSIJA	58
6.1. Hemijski sastav etarskog ulja	58
6.2. Analgetsko delovanje etarskog ulja ruzmarina i interakcija sa paracetamolom i	

kodeinom	59
6.3. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetiku paracetamola	62
6.4. Interakcija etarskog ulja ruzmarina sa diazepamom i pentobarbitalom	64
6.5. Antioksidativna aktivnost i hepatoprotektivno delovanje etarskog ulja ruzmarina	67
6.5.1. Biohemijski parametri u serumu pacova	67
6.5.2. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost i ukupni sadrzaj fenola	68
6.5.3. Parametri antioksidativne aktivnosti etarskog ulja ruzmarina ispitivane <i>in vivo</i> na pacovima nakon primene ugljentetrahlorida	69
7. ZAKLJUČCI	72
8. LITERATURA	73

1. UVOD

Upotreba biljaka u ishrani i lečenju je stara koliko i samo čovečanstvo. Koristeći biljke kao jednu od osnovnih prehrambenih grupa namirnica, čovek je vremenom sticao saznanja i o njihovom lekovitom dejstvu. Oskudno znanje o bolestima i o njihovim uzročnicima bilo je uzrok tome da su saznanja o upotrebi biljaka u lečenju bila isključivo empirijska. Kasnije, razvojem nauke, iz biljaka su izdvojeni aktivni principi koji su odgovorni za njihov terapijski efekat i istovremeno započinju ispitivanja mehanizama njihovog dejstva.

Široka primena biljnih preparata tokom istorije je bila posledica nedostatka drugih načina lečenja. Razvojem hemije i dobijanjem lekova sintetskim putem, upotreba biljnih preparata opada u lečenju i sprečavanju bolesti. Međutim, poslednjih nekoliko decenija, upotreba biljnih lekova, kao pomoćne terapije ili kao alternative klasičnim lekovima, opet postaje sve rasprostranjenija pojava [1].

Sve češća upotreba biljnih preparata se može objasniti činjenicom da većina ljudi smatra da kao „prirodni“, biljni preparati predstavljaju i bezbedniji način lečenja ili prevencije bolesti u poređenju sa klasičnim lekovima [2,3]. Biljni lekovi su danas lako dostupni i njihova upotreba najčešće predstavlja oblik samomedikacije, pri čemu, jasne indikacije, bezbednost njihove primene i tačan kvantitativni sastav, predstavljaju pitanja na koja je neophodno odgovoriti na naučno utemeljen način. Isto tako, nedovoljno su ispitane njihove potencijalne interakcije sa klasičnim lekovima. Zbog toga su pretklinička ispitivanja njihovih farmakodinamskih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina, kao i ispitivanje uticaja na reprodukciju i utvrđivanje njihovog mutagenog i kancerogenog potencijala važan preduslov za procenu bezbednosti i stvarne efikasnosti ovih preparata. Rezultati pretkliničkih ispitivanja su osnova za sprovođenje ispitivanja efekata biljnih preparata na ljudima, čiji cilj je dobijanje dovoljno kvalitetnih podataka o terapijskom delovanju ali i o potencijalnim neželjenim efektima preparata biljnog porekla.

Indikacije za najveći broj biljnih preparata su empirijski utemeljene, za razliku od klasičnih lekova, kod kojih, pre stavljanja u promet, prethode opsežna pretklinička i klinička preregistraciona ispitivanja [2, 3, 4, 5]. Iako se danas prate neželjena delovanja biljnih preparata, sistem farmakovigilance za biljne lekove ipak nije razvijen u onoj meri kao što je to slučaj sa klasičnim lekovima [3,4].

1.1. Regulatoriva u oblasti lekovitih biljaka i njihovih preparata

Primena lekovitih biljaka, kao samostalnih preparata ili kao pomoćnih terapijskih sredstava, u sprečavanju bolesti ili njihovom lečenju, danas je uređena od strane nacionalnih regulatornih tela.

U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), proizvodi koji sadrže biološki aktivne komponente ili preparate lekovitih biljaka, su klasifikovani kao dodaci ishrani. Pored toga, u Sjedinjenim Američkim Državama, distributeri biljnih preparata su obavezni da prijave sve neželjene događaje koji se mogu dovesti u vezu sa njihovom upotrebom. Na osnovu dospelih prijava, Federalna agencija za lekove i hranu (FDA), razmatra i procenjuje rizik za zdravlje i može doneti odluku o povlačenju ili potpunoj zabrani primene ovih preparata [4,6].

Evropska agencija za lekove (European Medicines Agency, EMA), objavljuje monografije (Community Herbal Monographs) za biljne droge i njihove preparate na osnovu izveštaja o farmakološkim i toksikološkim efektima biljnih droga i njihovih preparata, dobijenih od strane nemačke Komisije E. Ova Komisija je osnovana 70ih godina dvadesetog veka, sa ciljem da utvrdi opravdanost i bezbednost korišćenja biljnih lekova, samostalno ili u kombinaciji sa klasičnim lekovima [7].

U našoj zemlji, upotreba lekovitih biljaka i njihovih preparata je regulisana Zakonom o lekovima i medicinskim sredstvima (Službeni glasnik br. 30/2010, od 7.05.2010. god) i preciznije je uređena Pravilnikom o uslovima i načinu upisa u Registar tradicionalnih biljnih i homeopatskih lekova [8,9].

S obzirom da se u našoj sredini preparati na bazi biljke ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) široko primenjuju kao začin u ishrani i u obliku različitih farmaceutskih preparata za spoljašnju i unutrašnju primenu za lečenje i sprečavanje bolesti, neophodna su detaljnija ispitivanja potencijalno korisnih ali i osobina koje mogu biti štetne po zdravlje ljudi.

1.2. Ruzmarin u narodnoj medicini

Na srpskom govornom području ruzmarin se javlja pod različitim imenima u narodnoj medicini i u usmenom narodnom predanju. Ta imena se najčešće povezuju sa latinskim poreklom imena biljke – *ros (roris) marinus*, ``morska rosa``. U zapisima iz bolnica osnovanih pri manastirima na našem području, mogu se naći indikacije i način upotrebe ruzmarina u medicinskoj praksi u Srednjem veku [10]. Prema njima, ruzmarin se preporučuje

za lečenje glavobolje i bubrežnih kolika, u lečenju dismenoreje, respiratornih poremećaja, dispepsije i spazama gastrointestinalnog trakta [11].

1.3. Biljna droga ruzmarin, *Rosmarinus officinalis* L. (*Lamiaceae*) i etarsko ulje ruzmarina, *Aetherolum Rosmarini*

Ruzmarin je gust, uvek zelen, razgranat grm, visine 1-2 m (**Slika 1.**). Cveta tokom cele godine sitnim, plavičastim cvetićima. Cela biljka ima aromatičan, intenzivan miris, koji potiče od etarskog ulja, koga u najvećem procentu sadrže listovi biljke (1,5-2%). Etarsko ulje, *Aetheroleum rosmarini*, se dobija procesom destilacije pomoću vodene pare iz svežeg lišća i vrhova grančica (herba biljke) ruzmarina, *Rosmarinus officinalis* [12,13].



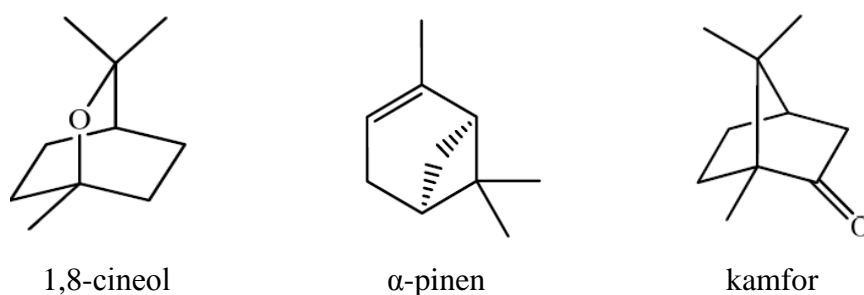
Slika 1. Biljka ruzmarin, *Rosmarinus officinalis*, L., herba [14] i u cvatu [15].

U važećoj, petoj Jugoslovenskoj farmakopeji (Ph Jug V), etarsko ulje ruzmarina, *Aetheroleum Rosmarini*, je oficinalni preparat biljne droge ruzmarina, *Rosmarinus officinalis*, L. [16].

Etarska ulja su biološki proizvodi različitih familija aromatičnih biljaka, između kojih i familije usnatica, *Lamiaceae*, kojoj pripada ruzmarin. Etarska ulja su mešavine od oko 20-60 isparljivih komponenti. Među njima su u najvećem procentu zastupljena monoterpenska jedinjenja tj. ugljovodonici aciklične ili ciklične strukture sa najviše deset ugljenikovih atoma. Monoterpeni imaju različite funkcionalne grupe: ketonske, aldehidne, estarske, etarske i kiselinske; imaju malu molekulsku masu i izrazito su liposolubilni. U etarskom ulju ruzmarina, monoterpenski ugljovodonici mogu biti alifatične strukture, i to kao aciklični alifatični monoterpeni (mircen, linalol) i ciklični (α - i β - pinen, kamfen, cimen, sabinen). Ciklični oksidovani monoterpeni prisutni u etarskom ulju ruzmarina su: 1,8-cineol, kamfor i borneol. Osim monoterpenskih komponenti, etarsko ulje ruzmarina sadrži i

seskviterpene, kao što su longifolen i kadinen, koji su slabije isparljivi zbog većeg broja ugljenikovih atoma (do petnaest) [12,13,17].

Etarsko ulje ruzmarina je bezbojna ili blago žuta tečnost, karakterističnog mirisa, koji potiče uglavnom od monoterpenskih sastojaka 1,8-cineola, kamfora i α -pinena (**Slika 2.**). Na osnovu njihovog procentualnog udela, sedma Evropska farmakopeja (Ph Eur 7) klasifikuje etarska ulja ruzmarina u dva najvažnija hemotipa: Marokansko/Tunižanski i Francusko/Španski hemotip etarskog ulja ruzmarina [11,13,18].



Slika 2. Strukturne formule 1,8-cineola, α -pinena i kamfora [19].

1.4. Pregled literature o farmakološkim svojstvima ruzmarina, njegovih ekstrakata i etarskog ulja

1.4.1. Uticaj na centralni nervni sistem

Literaturni podaci o uticaju etarskog ulja ruzmarina na funkciju centralnog nervnog sistema su brojni. Farmakodinamskim testovima za utvrđivanje antidepresivnog delovanja („test u visećem položaju“ i test „prinudnog“ plivanja), dokazano je da etarsko ulje ruzmarina, primenjeno per os kod miševa, ispoljava antidepresivno delovanje [20,21]. Komponenta za koju se smatra da poseduje najizraženija antidepresivna svojstva je 1,8-cineol [20]. Stimulacijom monoaminske transmisije, tj. povećanjem koncentracije serotonina i noradrenalina u centralnom nervnom sistemu laboratorijskih životinja, etarsko ulje ruzmarina značajno umanjuje depresivne obrasce ponašanja na ispitivanim životinjskim modelima.

Prema literaturnim podacima, ingestijom veće količine ruzmarina od strane životinja, nastaje stanje koje karakterišu plašljivost i pojačana reaktivnost na spoljašnje nadražaje, bez razvijanja agresivnosti [11].

Kod čoveka, etarsko ulje ruzmarina popravlja raspoloženje i poboljšava kognitivne funkcije. U jednoj placebo kontrolisanoj studiji, primena etarskog ulja ruzmarina je dovela do značajnog poboljšanja memorije ispitanika. Poboljšanje pažnje i koncentracije, takođe je značajno jače izraženo kod grupe ispitanika koja je uzimala etarsko ulje ruzmarina, u odnosu na grupu koja je dobijala placebo [22,23].

Poboljšanje kognitivnih funkcija i mentalnog statusa pacijenata pomoću vizuelno-analogne skale je dokazano i posle aromaterapije tj. inhalacijom etarskog ulja ruzmarina [24].

1.4.2. Analgetsko delovanje

Analgetsko i antiinflamatorno delovanje etarskog ulja ruzmarina su dokazani u brojnim literaturnim navodima. Etarsko ulje ruzmarina značajno smanjuje broj grčeva izazvanih intraperitonealnom primenom sirćetne kiseline Swiss albino miševima [25], dok u formalinskom testu, sprovedenom na belim laboratorijskim pacovima soja Wistar, izaziva inhibiciju i rane (neurogene) i kasne (inflamatorne) komponente bola [25]. Pored toga, u drugim studijama je utvrđeno da i pojedinačne komponente etarskog ulja, 1,8-cineol, kamfor i α -pinen, imaju analgetički potencijal [26]. Mehanizam analgetskog delovanja etarskog ulja ruzmarina još uvek nije potpuno razjašnjen, ali se smatra da se javlja kao posledica njegovog delovanja na jonske kanale, u literaturi poznate pod nazivom receptori „TRP” tipa (“transient receptor potential (TRP) ion channels”), koji su odgovorni za prenošenje bola izazvanog stimulusima sa periferije u centralni nervni sistem [26,27,28]. Imajući u vidu da su ovi receptori značajni i u etiopatogenezi neuropatskog bola, etarsko ulje ruzmarina se ispituje i kao preparat koji može doprineti otklanjanju ne samo nociceptivnog, već i bola nastalog strukturnim i funkcionalnim poremećajima somatosenzornog neurona. Komponenta etarskog ulja ruzmarina, koja poseduje najizraženije delovanje u smislu otklanjanja ili ublažavanja neuropatskog bola je 1,8- cineol [29].

Rezultati ispitivanja analgetskog delovanja etarskog ulja ruzmarina ukazuju da aciklični monoterpeni, mircen i linalol, analgeziju izazivaju moduliranjem efekata opioidnih receptora, dok monociklični i biciklični monoterpeni (monociklični: γ -terpinen, α -terpinen i p-cimen; biciklični: 1,8-cineol, kamfor, α -pinen), pored delovanja na „TRP“ kanale, dovode

do analgetskog efekta i blokadom cikloksigenaze i sinteze prostaglandina, čijim delovanjem se pojačava osetljivost perifernih senzitivnih vlakana na nociceptivne stimulse [30] .

Antiinflamatorno delovanje etarskog ulja ruzmarina je takođe ispitivano na životinjskim laboratorijskim modelima. Smanjenjem migracije leukocita i eksudacije, etarsko ulje smanjuje edem šapa pacova izazvan karagenom [31]. Tokom *in vitro* ispitivanja na humanim monocitima, 1,8-cineol inhibira stvaranje citokina i arahidonske kiseline, pa je najverovatniji mehanizam antiinflamatornog delovanja etarskog ulja ruzmarina, inhibicija metaboličkih puteva arahidonske kiseline (ciklooksigenaznog, kojim se sprečava sinteza prostaglandina i lipooksigenaznog, kojim se sprečava nastanak i oštećenje tkiva leukotrienima) [30,32].

Na antiinflamatorno delovanje etarskog ulja ruzmarina ukazuju i rezultati ispitivanja sprovedenom na eksperimentalnom modelu kolitisa pacova, izazvanog primenom trinitrobenzensulfonske kiseline. Pretretman etarskim uljem ruzmarina je u pomenutom ispitivanju doveo do skoro potpunog povlačenja oštećenja sluznice kolona izazvanog trinitrobenzensulfonskom kiselinom [33].

1.4.3. Hepatoprotektivno delovanje

Oksidativni stres kao disbalans između endogenog stvaranja reaktivnih kiseoničnih grupa i aktivnosti antioksidativnih enzimskih sistema je ključni faktor u nastanku oštećenja jetre [34,35].

Upotreba prirodnih antioksidativnih preparata, u koje spada i etarsko ulje ruzmarina, je sve češća u prevenciji i lečenju poremećaja jetre, izazvanih oksidativnim stresom [36]. Hepatoprotektivni efekat ruzmarina je potvrđen na različitim eksperimentalnim modelima oštećenja jetre. Tako je u studiji sprovedenoj na pacovima, metanolni ekstrakt ruzmarina sprečio kako akutna, tako i hronična oštećenja jetre izazvana primenom ugljentetrahlorida [37].

Preparati ruzmarina sprečavaju oštećenja jetre izazvana lekovima. Primenom vodenog ekstrakta ruzmarina sprečava se akutno oštećenje jetre izazvano imunosupresivnim lekom, azatioprinom, a hepatoprotektivni efekat etarskog ulja ruzmarina je posledica njegovog antioksidativnog delovanja [38].

Antikoksidativno delovanje etarskog ulja ruzmarina je značajno i uporedivo je sa antioksidativnim efektom vitamina E [39,40,41]. Najveći antioksidativni potencijal etarskog

ulja ruzmarina poseduju monoterpenska komponenta 1,8-cineol i seskviterpenska komponenta kadinen [42].

U prilog antioksidativnog i hepatoprotektivnog delovanja etarskog ulja ruzmarina ukazuju rezultati *in vitro* pretretmana ćelija jetre karnozinskom kiselinom, polifenolnom komponentom ruzmarina, kojim se značajno redukuje nivo slobodnih kiseoničnih grupa, nastalih usled delovanja aflatoksina B1 na izolovane hepatocite [43].

1.4.4. Uticaj na funkciju kardiovaskularnog sistema i krvi

Ruzmarin i njegovi ekstrakti deluju na funkciju kardiovaskularnog sistema ispoljavanjem diuretičkog delovanja, inhibicijom aktivnosti sistema renin-angiotenzin-aldosteron i direktnim vazodilatatornim delovanjem. Zbog toga, pri istovremenoj primeni ove biljke ili njenih ekstrakata sa lekovima koji deluju na kardiovaskularni sistem, ne mogu se isključiti potencijalno značajne interakcije. Prema rezultatima Haloui i sar, kod pacova tretiranih vodenim ekstraktom ruzmarina, došlo je do značajnog diuretičkog delovanja zbog povećanja izlučivanja natrijuma, kalijuma i hlorida putem tubula bubrega [44]. Rezultati drugih istraživanja pokazuju da je vodeni ekstrakt ruzmarina inhibisao aktivnost angiotenzin konvertujućeg enzima i tako otklonio vazokonstriktorni efekat angiotenzina II i sprečio njegov stimulatívni efekat na lučenje aldosterona [45].

Etarsko ulje ruzmarina, sa visokim sadržajem bicikličnog monoterpena 1,8-cineola, primenjeno kod pacova, izaziva direktnu vazodilataciju i sniženje krvnog pritiska tretiranih životinja [46].

U prospektivnoj, placebo kontrolisanoj kliničkoj studiji, sprovedenoj na pacijentima sa dijagnostikovanom primarnom hipotenzijom, ispitivan je uticaj etarskog ulja ruzmarina na vrednosti krvnog pritiska ali i na kvalitet života ispitanika koji pate od niskog krvnog pritiska. Marokansko-tunižanski tip etarskog ulja je primenjivan na osam sati u dozi od 1 ml, tokom 72 nedelje, u skladu sa vodičem Svetske zdravstvene organizacije (SZO) o metodologiji ispitivanja tradicionalnih lekova. Evaluacija uticaja etarskog ulja ruzmarina na krvni pritisak je sprovedena prema standardima Američkog društva za hipertenziju, a kvalitet života ispitanika je procenjivan pomoću upitnika standardizovanog od strane Evropske Agencije za lekove i Federalne agencije za lekove i hranu. Prema rezultatima studije, etarsko ulje ruzmarina je ispoljilo klinički značajno antihipotenzívno delovanje i dovelo je do poboljšanja kvaliteta života ispitanika koji pate od primarne hipotenzije. Pri tome, etarsko ulje ruzmarina nije izazvalo ubrzanje srčane frekvence. Prema autorima studije, ispoljeno antihipotenzívno

delovanje etarskog ulja ruzmarina je posledica njegovog uticaja na tonus krvnih sudova, bez ispoljenog uticaja na snagu kontrakcije i frekvencu srčanog mišića [47].

U ispitivanju sprovedenom na C57BL/6 miševima muškog pola, podvrgnutim režimu ishrane koji je podrazumevao dijetu bogatu mastima sa prisutnim osušenim ruzmarinom (0,5 – 5%) tokom 12 nedelja, utvrđeno je izraženo antiagregaciono delovanje ruzmarina, sprečavanje nastanka tromba u arterijskim krvnim sudovima i vazodilatacija [48,49].

1.4.5. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na homeostazu glukoze

Uticaj preparata ruzmarina na glikoregulaciju zavisi od tipa ekstrakcije ove biljne droge. U studiji na pacovima, etarsko ulje ruzmarina je nakon intramuskularne primene, dovelo do porasta nivoa glukoze kod zdravih životinja. Povećanje je iznosilo 55% u odnosu na vrednosti kontrolne grupe. Kod istih životinja došlo je do smanjenja oslobađanja insulina za 30%. U istoj studiji, kod životinja sa indukovanim dijabetesom, nivo glukoze u serumu je porastao za 17%, u odnosu na kontrolnu grupu [50]. Nasuprot ovim rezultatima, etanolni ekstrakt ruzmarina ispoljava hipoglikemijsko delovanje i povećava koncentraciju insulina u krvi normoglikemičnih i dijabetičnih pacova [51].

U komparativnoj, kohortnoj studiji, sprovedenoj na 59 pacijenata obolelih od dijabetesne nefropatije, poređeni su efekti standardne terapije dijabetesa i ACE inhibitora (kontrolna grupa) sa kombinacijom standardne terapije, ACE inhibitora i biljnog preparata koji je sadržao list ruzmarina (studijska grupa ispitanika). Posle šestomesečnog praćenja, mikroalbuminurija i lipidna peroksidacija su značajno redukovane kod studijske u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika [52].

1.4.6. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na endokrini sistem

Ruzmarin utiče na funkciju nadbubrežne žlezde i efekte polnih hormona. U ispitivanju sprovedenom na zdravim, odraslim dobrovoljcima, aromaterapija etarskim uljem ruzmarina je dovela do sniženja nivoa hormona stresa, kortizola, u plazmi ispitanika [53].

Komponente etarskog ulja ruzmarina 1,8 – cineol i kadinen u ispitivanju na pacovima, dovele su do značajnog pojačanja hidrosilacije testosterona, indukcijom aktivnosti CYP 2B1 i CYP 3A2 [42].

Kod ženki miševa, dijeta sa 2% metanolnim ekstraktom ruzmarina, ispoljila je izražen efekat na metabolizam endogenih estrogena, stimulišući njihovu hidrosilaciju i

glukuronidaciju. Na taj način je smanjena koncentracija cirkulišućih estrogena i umanjen je njihov stimulišući efekat na endometrijum [54].

1.4.7. Antimikrobna svojstva etarskog ulja ruzmarina

Mikrodilucionom metodom, u *in vitro* studiji, ispitan je uticaj etarskog ulja ruzmarina, koje u najvećem procentu sadrži kamfor i verbenon (oksidovane monoterpene), na mikroorganizme odgovorne za nastanak karijesa. U ovom ispitivanju pojedinačne, izolovane komponente su bile efikasnije od samog ulja. Najveću osetljivost na komponente etarskog ulja ruzmarina je pokazao *Streptococcus mitis*, dok je *Enterococcus faecalis* na ispitivane supstance bio najotporniji [55].

Rezultati *in vitro* ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskog ulja ruzmarina, pokazali su da je ono aktivno protiv više od 60 klinički značajnih sojeva *Escherichia coli* [56,57]. Takođe, samo etarsko ulje ruzmarina pokazuje visoku aktivnost protiv *Staphylococcus aureus*-a, *Salmonella-e typhi*, *Salmonella-e enteritidis* i *Shigella-e sonei*. Pri tome, etarsko ulje ruzmarina ispoljava baktericidno delovanje i na sojeve bakterija koje produkuju β -laktamazu [58]. Ispitivanja ukazuju i na činjenicu da etarsko ulje ruzmarina ispoljava veći antimikrobni potencijal protiv sojeva Gram pozitivnih u poređenju sa delovanjem na Gram negativne bakterije [59].

Ispitivanjem antibakterijskog efekta pojedinačnih komponenti etarskog ulja ruzmarina, najjaču antimikrobnu aktivnost imale su komponente borneol, kamfor i verbenon [60].

Pored delovanja na bakterije, etarsko ulje ruzmarina ispoljava i antigljivično delovanje, izraženo posebno na sojeve *Candida albicans* [59], *Trichophyton tonsurans* i *Trichophyton rubrum*. U poređenju sa bifonazolom, antigljivičnim lekom iz grupe azola, za pomenute sojeve gljivica, etarsko ulje ruzmarina ima nižu minimalnu inhibitornu koncentraciju [57].

Lokalno primenjeno na kožu pacova inficiranu *Aspergillus spp.*, u koncentraciji 0,2-1%, etarsko ulje ruzmarina inhibira sintezu aflatoksina i sprečava micelarni rast aspergilusa [61,62].

Kada se primenjuje u kombinaciji sa antibakterijskim i antigljivičnim lekovima, delovanje etarskog ulja ruzmarina na mikroorganizme zavisi prvenstveno od sastava tj. od vrste preparata i koncentracije aktivnih komponenti u njima. U studiji sprovedenoj od strane van Vuuren-a i sar, preparati etarskog ulja ruzmarina su u kombinaciji sa ciprofloksacinom, ispoljili sinergističko baktericidno delovanje na sojeve *Klebsiella pneumoniae*. Međutim, u

istoj studiji, primenjeno etarsko ulje ruzmarina je antagonizovalo baktericidno delovanje na sojeve *Staphylococcus aureus-a*. U istom ispitivanju, delovanje amfotericina B na *Candida albicans* je umanjeno, kada se lek primenjuje u kombinaciji sa etarskim uljem ruzmarina [63].

1.5. Interakcije etarskog ulja ruzmarina sa klasičnim lekovima

Postoje podaci o klinički značajnim interakcijama koje se javljaju pri istovremenoj primeni ruzmarina i konvencionalnih lekova. Tako, etanolni ekstrakt ove biljke, bogat fenolnim komponentama, karnozolom, karnozinskom i rozmarinskom kiselinom, koji se koristi kao dodatak hrani u svojstvu antioksidansa, smanjuje procenat resorpcije gvožđa iz intestinalnog trakta [64].

U ispitivanju na izolovanim ćelijama raka dojke koje poseduju efluksni P-glikoprotein, metanolni ekstrakt ruzmarina povećava intracelularnu kumulaciju doksorubicina i vinblastina. Inhibicijom aktivnosti P-glikoproteina, ekstrakt ruzmarina značajno povećava osetljivost malignih ćelija na pomenute lekove i sprečava nastanak multirezistencije malignih ćelija na njih [65].

Brojni literaturni podaci potvrđuju uticaj etarskog ulja ruzmarina na aktivnost mikrozomalnih enzima. Same komponente etarskog ulja ruzmarina podležu biotransformaciji i pri tome indukuju aktivnost enzima kojima se metabolišu [66,67]. Komponente 1,8-cineol, α -pinen i kadinen prvenstveno indukuju aktivnost enzima I faze biotransformacije lekova, pre svega CYP3A4, CYP2B1 i CYP3A2, CYP1A, CYP2B i CYP2E1, ali isto tako, pojačavaju i aktivnost enzima uključenih u drugu fazu metabolizma ksenobiotika, kao što je uridildifosfat-glukuronil transferaza (UDP-glukuronil transferaza) [42,68,69,70].

Pomoću ELISA metode, u *in vitro* uslovima, uz dodatak etarskog ulja ruzmarina, spektrofotometrijski su merene aktivnosti acetilholin (AChE) i butirilholinesteraze (BChE). Rezultati ove studije su pokazali da etarsko ulje ruzmarina inhibira aktivnost AChE do 64%, a BChE i do 74%. Ovaj efekat se pripisuje najzastupljenijim komponentama u etarskom ulju, 1,8-cineolu i α -pinenu [71] i njihovom međusobnom sinergističkom delovanju na enzim.

S obzirom da aktivni principi etarskog ulja ruzmarina, 1,8-cineol i α -pinen, inhibišu aktivnost acetilholin i butirilholin esteraze, ne može se isključiti mogućnost stupanja u klinički značajne interakcije sa lekovima koji su supstrat ova dva enzima koji vrše procese hidrolize estarskih jedinjenja [72].

1.6. *Odobrene indikacije za etarsko ulje ruzmarina*

Evropska Agencija za lekove je 2010. godine dala preporuke za korišćenje etarskog ulja ruzmarina. Sistemski, u obliku kapi za unutrašnju primenu, etarsko ulje ruzmarina je odobreno za lečenje dispepsije i spazama gastrointestinalnog trakta. Prema Evropskoj Agenciji za lekove, etarsko ulje ruzmarina se preporučuje za spoljašnju primenu u lečenju umereno jakih bolova u zglobovima i mišićima kao i u lečenju poremećaja periferne cirkulacije [72].

Sistemska primena etarskog ulja ruzmarina je kontraindikovana kod obolelih od epilepsije, u trudnoći i periodu dojenja, kao i kod osoba mlađih od 18 godina. Takođe, etarsko ulje ruzmarina ne bi trebalo primenjivati kod opstrukcije žučnih puteva, kao i kod prisustva kamenaca u žuči i bubregu [73].

Prema Evropskoj Agenciji za lekove, preporučena dnevna doza etarskog ulja ruzmarina za peroralnu primenu iznosi 2 kapi/dan, a u preparatima za spoljašnju primenu se preporučuje koncentracija 6-10% [72].

Neželjena delovanja koja se mogu javiti pri sistemske primeni etarskog ulja ruzmarina su stimulacija centralnog nervnog sistema i pojava epileptiformnih napada [3]. S obzirom da je kamfor komponenta etarskog ulja ruzmarina koja je odgovorna za smanjenje praga nadražaja centralnog nervnog sistema, prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (EFSA - European Food Safety Agency), određivanje koncentracije ove supstance je ključno za bezbednost sistemske primene etarskog ulja ruzmarina. Ni u jednoj starosnoj grupi, sistemska izloženost kamforu ne bi smela da pređe 2 mg/kg tm na dan [74]. Primenom kamfora u dozi većoj od 5 mg/kg tm kod ljudi, pored stimulacije centralnog nervnog sistema, može doći do nadražaja i iritacije sluznice usne duplje i želuca, mučnine i povraćanja, uzbuđenja, halucinacija, delirijuma i prenadraženosti skeletne muskulature [74]. Ekscitatorno delovanje ruzmarina na centralni nervni sistem se dovodi u vezu sa efektima 1,8-cineola i kamfora, koji izazivaju hiperekscitabilnosti neurona sprečavanjem preuzimanja kiseonika i gubitkom elektrohemijjskog gradijenta za Na^+ i K^+ [75,76].

Neželjena delovanja etarskog ulja ruzmarina, koja se mogu javiti pri lokalnoj primeni uobičajenih terapijskih koncentracija, kod ljudi su iritacija kože, konjunktiva i sluznice respiratornog trakta [69].

Na osnovu ograničenog broja ispitivanja na životinjama, nisu utvrđena kancerogena, genotoksična svojstva, kao ni reproduktivna i razvojna toksičnost etarskog ulja ruzmarina, primenjenog u dozama koje su ekvivalentne preporučenim dozama za humanu upotrebu [73].

S obzirom da etarsko ulje ruzmarina pored primene u lečenju dispepsije, spazama gastrointestinalnog trakta i bola mišićno-zglobnog sistema, poseduje i druga farmakološka i toksikološka delovanja, u ovom istraživanju ona su detaljnije ispitana, u cilju jasnijeg uvida u potencijalno nova indikaciona područja, bezbednost primene kao i u interakcije koje mogu biti klinički značajne, ukoliko se etarsko ulje ruzmarina primenjuje istovremeno sa klasičnim lekovima.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je bio da se primenom odgovarajućih metoda ispita:

1. Analgetsko delovanje etarskog ulja ruzmarina;
2. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na farmakodinamske osobine paracetamola, kodeina, diazepama i pentobarbitala;
3. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetičke osobine paracetamola;
4. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na parametre toksičnosti kod životinja izloženih oksidativnom stresu.

3. RADNE HIPOTEZE

Na osnovu prethodno definisanih ciljeva istraživanja postavljene su sledeće hipoteze:

1. Primena preparata etarskog ulja ruzmarina ispoljava analgetičko delovanje na oglednim životinjama.
2. Etarsko ulje ruzmarina utiče na farmakološke osobine paracetamola, kodeina, diazepama i pentobarbitala.
3. Etarsko ulje ruzmarina utiče na farmakokinetičke osobine paracetamola.
4. Primena etarskog ulja ruzmarina sprečava toksične promene kod životinja izloženih oksidativnom stresu.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. *Eksperimentalne životinje*

Farmakodinamska ispitivanja su izvedena na polno zrelim belim laboratorijskim miševima, soja NMRI-Haan, oba pola, telesne mase 20-35 gr, odabranih metodom slučajnog uzorka iz okota sa Vojno-tehničkog instituta u Beogradu.

Za biohemijske, toksikološke analize i za farmakokinetska ispitivanja korišćeni su zdravi beli laboratorijski pacovi, oba pola, soja Wistar, telesne mase 150–300 grama, odabrani metodom slučajnog izbora iz okota sa Vojno-tehničkog instituta u Beogradu.

Laboratorijske životinje su boravile u Uni-Protect (Ehret, Emendingen, Nemačka) ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja sa filterskim sistemom za protok vazduha, na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. U ormarima je temperatura vazduha održavana između 20 i 25⁰C, uz kontrolu vlažnosti vazduha i održavanje cirkadijalnog ritma (smena dana i noći u trajanju od 12^h). Životinje su imale slobodan pristup vodi i standardnoj hrani za sitne laboratorijske životinje (Veterinarski institut Zemun, Srbija).

Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje ogleada je odobrila Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost sa planom ovog ispitivanja, broj odobrenja IV-2011-01.

4.2. *Etarsko ulje ruzmarina i izračunavanje doza*

Etarsko ulje ruzmarina, *Aetheroleum Rosmarini*, korišćeno za ispitivanja, dobijeno je iz Instituta za lekovite biljke "Dr Josif Pančić". Iz droge ruzmarina *Rosmarinus officinalis* L. (*Lamiaceae*) osušene na vazduhu, dobijeno je etarsko ulje ruzmarina destilacijom pomoću vodene pare, prema važećoj Ph Eur 7. Hemijski sastav etarskog ulja je određen na Institutu za lekovite biljke "Dr Josif Pančić" u Beogradu.

Identifikacija i kvantifikacija hemijskih komponenti etarskog ulja je izvršena gasnom hromatografijom sa plameno jonizujućim detektorom (GC/FID) i sa spektrofotometrijskom analizom masa (GC/MS). Analiza ulja metodom GC/FID je obavljena na Hewlett-Packard HP 5890 series II hromatografu, opremljenom autosemplerom i split injekcionim sistemom.

Korišćena je kapilarna kolona HP-5 (25 m × 0.32 mm; debljine filma 0.52 μm), povezana sa plameno jonizujućim detektorom (FID). Temperatura injektora i detektora je bila podešena na 250°C i 300°C, a temperatura kolone je programirana od 40 do 260°C sa brzinom zagrevanja od 4°C/min. Brzina protoka nosećeg gasa, vodonika, bila je 1 ml/min. Uzorak pripremljen kao 1% rastvor ulja u etanolu (1 μl) injektovan je po split modelu (split ratio, 1:30). GC/MS analiza je izvršena na Hewlett-Packard HP G1800C series II GCD sistemu u istim analitičkim uslovima kao GC/FID. Kolona korišćena za ovu analizu bila je HP-5MS (30 m × 0.25 mm; debljine filma GC/FID 0.25 μm), a noseći gas je bio helijum. Temperatura linije je podešena na 260°C. Maseni spektri su snimani pri elektronskoj jonizaciji od 70eV, u masenom spektru (m/z) 40-450 Da.

Identifikacija komponenata etarskog ulja je izvršena poređenjem masenih spektara i retencionih indeksa sa referentnom supstancom, kamforom i literaturnih podataka o masenim spektrima [77]. Kvantitativna analiza etarskog ulja ruzmarina u procentima je izračunata normalizacijom površina ispod pika dobijenih metodom FID.

Etarsko ulje ruzmarina je primenjivano per os, pomoću gastrične sonde u obliku odgovarajuće suspenzije u fiziološkom rastvoru.

Primenjivane doze etarskog ulja ruzmarina su dobijene preračunavanjem preporučene terapijske doze za čoveka [72], pomoću formule za preračunavanje doza za eksperimentalne životinje [78].

Etarsko ulje ruzmarina, *Aetheroleum Rosmarini*, primenjivano je u dozama 10 i 20 mg/kg tm/dan, za miševe, tokom 7 dana i u jednokratnom režimu; i 5 i 10 mg/kg tm/dan za pacove, tokom 7 dana.

4.3. Lekovite supstance korišćene u ogledu

Sledeće lekovite supstance su korišćene u ispitivanju:

- Aminofenazon, Aminophenazone 98% powder (Sigma-Aldrich, Nemačka);
- Kodein, Codeine, raw powder 99,96% (Lewis Chemicals Ltd., Turska);
- Diazepam, 10 mg/2 ml, ampula (Galenika, Srbija);
- Pentobarbital, Pentobarbital sodium (Sigma-Aldrich, Nemačka);
- Fiziološki rastvor 500 ml (Hemofarm, Srbija);
- Sirćetna kiselina, Acidum Aceticum 99% (J.T. Baker, USA);
- Ugljen tetrahlorid, Carbon tetrachloride 99,9% (Sigma-Aldrich, Nemačka);
- Maslinovo ulje (Sinefarm, Beograd, Srbija);
- Uretan, Urethan (Sigma Chemicals Co, St Louis, USA).

4.4. *Tretman i podela eksperimentalnih grupa*

U okviru ispitivanja za praćenje efekata etarskog ulja ruzmarina, životinje su bile podeljene u grupe u odnosu na ispitivanu dozu etarskog ulja ruzmarina i u odnosu na lek koji su primile neposredno pre odgovarajućeg eksperimenta. Ispitivane životinje su nasumično podeljene na eksperimentalne i kontrolne grupe, pri čemu je svaka grupa brojala po 6 životinja. Sve životinje su bile podvrgnute merenju telesne mase pre tretmana i nakon tretmana etarskim uljem ruzmarina.

Farmakodinamska ispitivanja su vršena na miševima.

Doze primenjenih lekova u pretretmanu bile su:

- fiziološki rastvor u zapremini 10 ml/kg tm, per os;
- etarsko ulje ruzmarina (EUR) 10 mg/kg tm, per os;
- etarsko ulje ruzmarina (EUR) 20 mg/kg tm, per os.

Doze lekova korišćenih u farmakodinamskim ogledima bile su sledeće:

- paracetamol 60 mg/kg tm, intraperitonealno;

- kodein 30 mg/kg tm, intraperitonealno;
- sirćetna kiselina 1% rastvor u zapremini od 10 ml/kg tm, intraperitonealno;
- diazepam 2,5 mg/kg tm, intramuskularno;
- pentobarbital 40 mg/kg tm, intraperitonealno.

Eksperimentalne životinje bile su podeljene na osnovu pretretmana na sledeće grupe:

1. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, **KON₇**,
2. Kontrolna grupa tretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 1 dan, **Eur20₁**,
3. Kontrolna grupa tretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 7 dana, **Eur20₇**,
4. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i paracetamolom, **KON₁+Par**
5. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol **KON₇+Par**,
6. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i kodeinom, **KON₁+Kod**,
7. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila kodein, **KON₇+Kod**,
8. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i sirćetnom kiselinom , **KON₁+Acet**
9. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila sirćetnu kiselinu, **KON₇+Acet**,
10. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i diazepamom, **KON₁+Diaz**,
11. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila diazepam, **KON₇+Diaz**,
12. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 1 dan i pentobarbitalom, **KON₁+Pentb**,
13. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila pentobarbital, **KON₇+Pentb**,
14. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 1 dan i paracetamolom, **Eur10₁+Par**,

15. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 1 dan i paracetamolom, **Eur20₁+Par**,
16. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol, **Eur10₇+Par**,
17. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol, **Eur20₇+Par**,
18. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 1 dan i kodeinom, **Eur10₁+Kod**,
19. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 1 dan i kodeinom, **Eur20₁+Kod**,
20. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi od 10 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila kodein, **Eur10₇+Kod**,
21. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila kodein, **Eur20₇+Kod**,
22. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 1 dan i sirćetnom kiselinom, **Eur10₁+Acet**,
23. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 1 dan i sirćetnom kiselinom, **Eur20₁+Acet**,
24. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila sirćetnu kiselinu, **Eur10₇+Acet**,
25. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila sirćetnu kiselinu, **Eur20₇+Acet**,
26. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 1 dan i diazepamom, **Eur10₁+Diaz**,
27. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 1 dan i diazepamom, **Eur20₁+Diaz**,
28. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila diazepam, **Eur10₇+Diaz**,

29. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila diazepam, **Eur20₇+Diaz**,

30. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 1 dan i pentobarbitalom, **Eur10₁+Pentb**,

31. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 1 dan i pentobarbitalom, **Eur20₁+Pentb**,

32. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 10 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila pentobarbital, **Eur10₇+Pentb**,

33. Eksperimentalna grupa pretretirana EUR u dozi 20 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila pentobarbital, **Eur20₇+Pentb**.

Biohemijska, toksikološka i farmakokinetička ispitivanja su vršena na pacovima.

Doze primenjenih lekova u pretretmanu bile su:

- fiziološki rastvor 1 ml/kg tm, per os;
- etarsko ulje ruzmarina 5 mg/kg tm, per os;
- etarsko ulje ruzmarina 10 mg/kg tm, per os.

Supstance korišćene u ovim ispitivanjima primenjene su u sledećim dozama.

- ugljen tetrahlorid 50% rastvor u maslinovom ulju, 1 ml/kg tm, per os;
- uretan 25% rastvor, 5 ml/kg tm, intraperitonealno;
- paracetamol 20 mg/kg tm, intravenski i per os.

Eksperimentalne životinje bile su podeljene na osnovu pretretmana na sledeće grupe:

I Grupe životinja za farmakokinetička ispitivanja

1. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol p.o., **KON₇+PAR_{p.o.}**,

2. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol i.v., **KON₇+PAR_{i.v.}**,

3. Eksperimentalna grupa tretirana EUR 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tm 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol p.o., **Eur5₇+PAR_{p.o.}**,
4. Eksperimentalna grupa tretirana EUR 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tm 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol i.v., **Eur5₇+PAR_{i.v.}**,
5. Eksperimentalna grupa tretirana EUR 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tm 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol p.o., **Eur10₇+PAR_{p.o.}**,
6. Eksperimentalna grupa tretirana EUR 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tm 7 dana, koja je sedmog dana primila paracetamol i.v., **Eur10₇+PAR_{i.v.}**.

II Grupe životinja za biohemijska i toksikološka ispitivanja

1. Kontrolna grupa koja je primala fiziološki rastvor 7 dana,, **KON₇**,
2. Kontrolna grupa tretirana fiziološkim rastvorom 7 dana, koja je sedmog dana primila ugljentetrahlid, **KON₇+CCl₄**,
3. Kontrolna grupa koja je tretirana EUR u dozi od 5 mg/kg tm 7 dana, **Eur5₇**,
4. Kontrolna grupa koja je tretirana EUR u dozi od 10 mg/kg tm 7 dana, **Eur10₇**,
5. Eksperimentalna grupa tretirana EUR u dozi od 5 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila ugljen tetrahlid, **Eur5₇+CCl₄**,
6. Eksperimentalna grupa tretirana EUR u dozi od 10 mg/kg tm 7 dana, koja je sedmog dana primila ugljen tetrahlid, **Eur10₇+CCl₄**.

4.5. Farmakodinamska ispitivanja

Analgetsko svojstvo etarskog ulja ruzmarina je ispitivano testom sa sirćetnom kiselinom ("testom uvijanja"). Uticaj etarskog ulja ruzmarina na analgetski efekat kodeina i paracetamola ispitivan je metodom vrele ploče. Farmakodinamskim testom rotirajućeg štapa ispitivan je uticaj etarskog ulja ruzmarina na poremećaj motorne koordinacije nakon primene diazepama. Merenjem dužine vremena spavanja ispitivan je uticaj etarskog ulja ruzmarina na hipnotičko delovanje pentobarbitala.

4.5.1. Metod vrele ploče

Analgetsko dejstvo paracetamola i kodeina je ispitivano metodom vrele ploče zagrejane na 52,5°C [79]. Kodein je primenjen u dozi od 30 mg/kg tm, intraperitonealno, a paracetamol u dozi 60 mg/kg tm, takođe intraperitonealno, i to 30 minuta nakon davanja zadnje doze etarskog ulja ruzmarina sedmog dana tretmana. Pre primene lekova merena su 2 kontrolna reakciona vremena, u razmaku od 10 minuta, a potom i reakciona vremena 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minuta nakon injektovanja leka. Maksimalno dozvoljeno reakciono vreme je 2 vrednosti srednjeg kontrolnog vremena.

Analgetski efekat kodeina i paracetamola izračunavan je kao postotak promene reakcionog vremena (produženje ili skraćenje) prema jednačini:

$$(A-B)/B \cdot 100 = \% \text{ efekta}$$

A – mereno reakciono vreme

B – srednja vrednost kontrolnog reakcionog vremena

4.5.2. Test sa sirćetnom kiselinom („test uvijanja“)

Ovom metodom se ispituju slabi analgetici [78]. Bolna draž se izaziva hemijskim sredstvom, sirćetnom kiselinom, i to u rastvoru koncentracije od 1%, tako što se ubrizga u peritoneum miša u zapremini od 10 ml/kg tm. Sirćetna kiselina se daje 10 minuta nakon poslednje doze etarskog ulja, a 5 minuta kasnije se počinje sa brojanjem grčeva. Grčevi su brojani od petog do dvadeset i petog minuta nakon primene sirćetne kiseline (prvi period) i od dvadeset i petog minuta do četrdeset i petog minuta (drugi period).

Analgetski efekat etarskog ulja ruzmarina izražavan je kao procenat inhibicije broja grčeva prema obrascu:

Analgetski efekat (%) = 100 – (broj grčeva u oglednoj grupi / broj grčeva u kontrolnoj grupi) x 100

4.5.3. Metod rotirajućeg štapa

Depresija motorne koordinacije izazvana diazepamom ispitivana je metodom rotirajućeg štapa [79]. Doza diazepamata iznosila je 2,5 mg/kg tm, i.m., a primenjivana je 30 minuta posle zadnje doze etarskog ulja, sedmog dana tretmana. Kontrolno vreme bilo je 300 s, a vreme održavanja životinja na štapu u sekundama mereno je 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 35 minuta nakon primene leka. Maksimalno dozvoljeno vreme koje su životinje provodile na štapu bilo je 300 s.

Depresivno-hipnotički efekat diazepamata izračunat je kao postotak promene vremena (s) provedenog na rotirajućem štapu prema jednačini:

$$100 - (A * 100) / B = \% \text{ depresije,}$$

A je mereno vreme, a B je kontrolno-maksimalno vreme (300 s).

4.5.4. Vreme trajanja spavanja

Hipnotičko dejstvo pentobarbitala je ispitivano merenjem trajanja spavanja životinja [79]. Doza datog rastvora pentobarbitala, intraperitonealno, bila je 40 mg/kg tm i to 30 minuta nakon primene zadnje doze etarskog ulja ruzmarina, sedmog dana tretmana. Mereno je vreme od primene leka do gubitka refleksa uspravljanja, odnosno indukciono vreme, i od gubitka refleksa uspravljanja do njegovog ponovnog uspostavljanja, odnosno vreme spavanja, u minutima.

4.6. Ispitivanje uticaja etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetičke osobine paracetamola

4.6.1. Prikupljanje uzoraka krvi

U svim eksperimentalnim grupama uzorkovanje krvi iz repne vene je započinjano pre aplikacije paracetamola (nulti uzorak, bez prisustva leka). Paracetamol je primenjen 30 minuta nakon poslednje doze etarskog ulja ruzmarina, a vreme uzorkovanja krvi računalo se od momenta aplikacije leka. Uzorkovano je ukupno 10 uzoraka krvi po životinji. Uzorci su uzimani u 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 i 300 minuta nakon davanja paracetamola p.o. ili i.v.. Nakon aplikacije paracetamola životinje su stavljane u imobilizacioni kavez za

pacove. Rep im je potom potapan u posudu sa toplom vodom kako bi se izazvala hiperemija. Rep koji je posušen papirnim ubrusom mazan je vazelinom i masiran u svrhu izazivanja dodatne hiperemije. Potom je 1 cm od vrha repa, lancetom pravljena perforacija kože i u adekvatno obeleženu mikroeprevetu iz repne vene pacova uzorkovano je oko 200 μ L krvi. Potom su uzorci krvi centrifugirani 10 minuta na 6000 obr/min. Nakon centrifugiranja pipetiran je supernatant i prenesen u nove pravilno obeležene mikroeprevete. Do momenta analitičke obrade, uzorci seruma su odlagani u obeleženim mikroeprevetama u zamrzivač i čuvani na temperaturi od -80°C . Detekcija lekova u uzorcima seruma izvršena je HPLC metodologijom [80].

4.6.2. Standardi i hemikalije

Svi vodeni rastvori pripremani su korišćenjem vode HPLC stepena čistoće – JT Baker. Korišćene hemikalije bile su najvišeg dostupnog stepena čistoće i nisu dodatno prečišćavane. Svi korišćeni rastvarači bili su HPLC stepena čistoće – JT Baker. Stock rastvor pravljen je u koncentraciji 1mg/ml.

4.6.3. Aparatura

Analiza uzoraka vršena je na Dionex HPLC uređaju sa UV detektorom. Sistem za separaciju i hromatografsku detekciju paracetamola sastojao se iz sledećih elemenata: kolona ZORBAX Extend C-18 Narrow-Bore 2.1 x 150 mm 5-Micron; pretkolona ZORBAX Eclipse Plus-C 18, Analytical Guard Column 4.6x12.5 mm 5-Micron.

U ispitivanju je korišćen je izokratski tip elucije sa konstatnim protokom tečne faze od protok 0.4 ml/min. Mobilnu fazu činila je mešavina vode i acetonitrila u odnosu $\text{H}_2\text{O} : \text{ACN} = 88 : 12$.

Uzorci su injektovani korišćenjem autosamplera ASI 100 autosampler plus. Volumen injekta iznosio je 20 μ l. Kompartman sa kolonom održavan je na konstatnoj temperaturi od 20°C . U analiziranim uzorcima paracetamol je detektovan je UV DAAD detektorom na talasnoj dužini od $\lambda=254$ nm. Retenciono vreme paracetamola u biološkim uzorcima iznosilo je 2.2 minuta, a ukupno trajanje analize iznosilo je 8 minuta.

Kontrola HPLC uređaja i obrada dobijenih podataka – hromatograma vršena je pomoću programskog paketa CHROMELEON v.6.70, Chromatography management syste, Dionex, 2005.

4.6.4. Priprema uzorka

Serum je u obeleženim krioepurvetama čuvan u zamrzivaču na temperaturi od -80 C° do trenutka analize.

Priprema uzorka za analizu obavljena je metodom precipitacije acetonitrilom. Nakon odmrzavanja uzorka, $80\ \mu\text{l}$ preneto je u epruvetu. Uzorku seruma dodavano je $160\ \mu\text{l}$ acetonitrila. Ovako dobijena smeša je izmešana na „vorteks“ mešalici 2 puta po 15 sekundi. Nakon toga uzorci su centrifugirani u trajanju od 2.5 minuta brzinom od 3200 obrtaja u minutu. Nakon centrifugiranja, supernatant u količini $120\ \mu\text{l}$ je prenet u „vijale“. Automatskim putem $20\ \mu\text{l}$ supernatanta je injektovano direktno u uređaj, nakon čega je merena koncentracija paracetamola u svakom od pripremljenih uzoraka.

U uzorcima krvi životinja pre tretmana paracetamolom (blank) na hromatogramu nije bilo pika na retencionom vremenu paracetamola.

Linearnost metode ispitivana je i potvrđena ubrizgavanjem 5 različitih koncentracija standarda paracetamola u serumu u rasponu doza 0.5 do $200\ \mu\text{g/ml}$, sa koeficijentom korelacije $r=0.99$.

Koncentracija paracetamola u uzorku automatski je izračunavana na osnovu površina pikova različitih koncentracija eksternog standarda.

4.7. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na parametre toksičnosti

4.7.1. Biohemijski parametri

Od biohemijskih parametara u serumu je određivana koncentracija lipida, odnosno lipidni status. Takođe, u cilju praćenja jetrene i bubrežne funkcije u serumu ispitivanih životinja je određivana enzimska aktivnost aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT), nivo ukupnog i direktnog bilirubina i koncentracija uree, kreatinina i mokraćne kiseline. Sve analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka).

4.7.2. Procena in vitro antioksidativne aktivnosti

4.7.2.1. Procena antioksidativne aktivnosti etarskog ulja ruzmarina DPPH testom

Antioksidativna aktivnost etarskog ulja ruzmarina je određivana kao kapacitet za neutralisanje slobodnih radikala, odnosno slobodnih kiseoničnih grupa (FRSC). Ispitivana je sposobnost etarskog ulja ruzmarina da donira elektron i stabilizuje 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal [81]. Uzorak i metanolni rastvor α -tokoferola, kao pozitivne kontrole, pomešan je sa rastvorom DPPH i nakon 60 minuta, preostala količina ljubičasto obojenog rastvora DPPH određivana je spektrofotometrijski na 515 nm.

Kapacitet za neutralisanje slobodnih radikala (RSC) izračunat je na sledeći način:

$$RSC = 100 - 100 * A_{uzorka} / A_{slepe\ probe}$$

$A_{slepe\ probe}$ je apsorbanca razblaženog rastvora DPPH, dok je A_{uzorka} apsorbanca etarskog ulja, odnosno referentnog rastvora.

Sva ispitivanja su izvedena po tri puta i uzeta je srednja vrednost za izračunavanje. Vrednost srednje inhibitorne koncentracije (IC50), koja predstavlja koncentraciju uzorka koja je potrebna da izazove inhibiciju 50% količine DPPH radikala, procenjena je linearnom regresionom analizom dobijene RSC vrednosti i izražena je u μ l etarskog ulja po ml.

4.7.2.2. Ukupni sadržaj fenola u etarskom ulju ruzmarina

Ukupni sadržaj fenola u etarskom ulju ruzmarina ispitivan je Folin-Ciocalteu reagensom [82]. Etarsko ulje ruzmarina je pomešano sa reagensom i rastvorom natrijum karbonatom u test epruveti. Nakon mešanja vortex mešalicom i inkubacije na tamnom u toku 2 sata, merena je apsorbanca na 740 nm. Procena ukupnog sadržaja fenolnih komponenti je vršena tri puta i rezultat je izražen kao mg ekvivalentni sadržaju galne kiseline (GAE) po litru.

4.7.3. Procena in vivo antioksidativne aktivnosti

Uljani rastvor ugljentetrahlorida, 50%, u maslinovom ulju, primenjen je intraperitonealno, u dozi 1 ml/kg tm sedmog dana tretmana etarskim uljem, 30 minuta nakon zadnje doze etarskog ulja, a 24 sata pre žrtvovanja životinja. Osmog dana životinje su

anestezirane 25% rastvorom uretana, u dozi od 5 ml/kg tm intraperitonealno. Nakon gubitka refleksa uspravljanja, životinje su žrtvovane kardiopunkcijom u cilju uzimanja uzoraka krvi i jetre za dalja ispitivanja.

Homogenat jetre je pripremljen od 1gr tkiva jetre i TRIS-HCl pufera, pH=7,4; u odnosu 1:3 (w/v) na temperaturi od 4°C, koristeći električni homogenizator tipa B. Braun, Potter S (Melsungen, Nemačka). Određivanje parametara oksidativnog stresa u homogenatu tkiva je vršeno spektrofotometrom Agilent 8453 UV/Vis (Santa Klara, SAD) prema procedurama opisanim u literaturi.

Od parametara oksidativnog stresa spektrofotometrijski su određivani:

1. Intenzitet lipidne peroksidacije je meren na osnovu koncentracije malonilaldehida koji je krajnji produkt lipidne degradacije sastojaka ćelijske membrane (LPx) [83],
2. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GSH-Px) [84],
3. Aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) [85],
4. Aktivnost peroksidaze (Px) [86],
5. Aktivnost katalaze (CAT) [87],
6. Aktivnost ksantin oksidaze (XOD) [88],
7. Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) [89].

4.8. Statistička obrada podataka

Rezultati dobijeni tokom farmakodinamskih, biohemijskih i toksikoloških ispitivanja, obrađeni su statističkim programom MedCalc 9.2.0.1. software. Kao mera srednje vrednosti neke grupe podataka određena je aritmetička sredina m , a mera varijacije među podacima izražena je standardnom devijacijom Sd . Statistička značajnost razlika određenih grupa sa verovatnoćom $p < 0.05$, ispitivana je Student t-testom za male nezavisne uzorke.

Rezultati su prikazani tabelarno ili grafički.

Rezultati farmakokinetskih ispitivanja obrađeni su u statističkom paketu SPSS statistics, ver. 17, programom Winonline verzija 4.. Rezultati su podvrgnuti nekompartmanskoj analizi. Određena je aritmetička sredina m , a mera varijacije među podacima izražena je standardnom devijacijom Sd , $m \pm Sd$.

5. REZULTATI

5.1. Hemijska analiza etarskog ulja ruzmarina

Hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina određen metodom gasne hromatografije, prikazan je u **tabelama 1, 2, 3 i 4.**

Tabela 1. Ukupan sadržaj identifikovanih komponenti u ispitivanom uzorku etarskog ulja ruzmarina (% m/m)

Komponenta	Broj identifikovanih komponenti	Sadržaj, procenat %(m/m)
Monoterpenski ugljovodonici	14	31.22
Oksidovani monoterpeni	9	63.88
Seskviterpenski ugljovodonici	6	4.77
Ukupan broj/sadržaj identifikovanih komponenti	29	99.87
Sadržaj neidentifikovanih komponenti		0.13

Ukupan broj identifikovanih komponenti je 29, što iznosi 99.87% ispitivanog uzorka ulja. Etarsko ulje ruzmarina se sastoji od kompleksne mešavine monoterpenskih ugljovodonika (31.22%), oksidovanih monoterpena (63.88%) i seskviterpenskih komponenti (4.77%).

Tabela 2. Sastav i sadržaj monoterpenkih ugljovodonika u ispitivanom uzorku etarskog ulja ruzmarina (% m/m)

Komponente	RT-FID ^a	RT-MS ^b	RRT ^c	Sadržaj, procenat (% m/m)
Monoterpenki ugljovodonici				31.22
triciklen	12.640	6.82	0.579	0.23
α-tujen	12.777	7.00	0.585	0.13
α-pinen	13.100	7.19	0.600	11.51
kamfen	13.737	7.62	0.629	4.55
sabinen	14.697	8.47	0.673	0.05
β-pinen	14.887	8.50	0.681	8.16
β-mircen	15.292	9.04	0.700	0.99
α-felandren	15.955	9.43	0.730	0.19
δ^3-karen	16.212	9.62	0.742	0.13
α-terpinen	16.456	9.85	0.753	0.14
p-cimen	16.782	10.13	0.768	1.23
limonen	16.970	10.25	0.777	2.80
γ-terpinen	18.178	11.30	0.832	0.92
α-terpinolen	19.416	12.31	0.889	0.19

^aRT-FID – retenciono vreme u GC/FID sistemu;

^bRT-MS – retenciono vreme u GC/MS sistemu;

^cRRT – relativno retenciono vreme u odnosu na kamfor.

Ukupni udeo monoterpenkih ugljovodonika u ispitivanom uzorku etarskog ulja je 31.22%. Najveći udeo u smeši monoterpenkih ugljovodonika čine α -pinen, 11.51%; β -pinen, 8.16%; kamfen, 4.55%; limonen, 2.80% i p-cimen, 1.23%. U ovoj smeši su prisutni i β -mircen, 0.99% i γ -terpinen, 0.92%, kao i drugi monoterpenki ugljovodonici u manjim procentima (triciklen, 0.23%; α -felandren, 0.19%; α -terpinolen, 0,19%; α -terpinen, 0.14%; α -tujen, 0.13%; δ^3 -karen, 0.13%) i u tragovima sabinen, 0.05%.

Tabela 3. Sastav i sadržaj oksidovanih monoterpena u ispitivanom uzorku etarskog ulja ruzmarina (% m/m)

Komponente	RT-FID ^a	RT-MS ^b	RRT ^c	Sadržaj, procenat (% m/m)
Oksidovani monoterpeni				63.88
1,8-cineol	17.124	10.43	0.784	43.77
linalol	19.746	12.82	0.904	0.46
kamfor	21.845	14.30	1.000	12.53
izoborneol	22.318	14.71	1.022	0.53
borneol	22.655	15.05	1.037	2.97
terpinen-4-ol	23.059	15.44	1.056	0.56
α-terpineol	23.548	15.93	1.078	1.53
γ-terpineol	23.802	16.17	1.090	0.40
bornil-acetate	27.185	19.14	1.244	1.13

^aRT-FID – retenciono vreme u GC/FID sistemu;

^bRT-MS – retenciono vreme u GC/MS sistemu;

^cRR – relativno retenciono vreme u odnosu na kamfor.

Oksidovani monoterpeni čine 63.88% ispitivanog uzorka etarskog ulja.

Najzastupljenije komponente u smeši oksidovanih monoterpena su 1,8-cineol, 43.77%; kamfor, 12.53%; borneol, 2.97% ; α -terpineol, 1.53% i bornilacetat, 1.13%, dok su u nižem procentu zastupljeni linalol, 0.46%; izoborneol, 0.53%; terpinen-4-ol, 0.56% i γ -terpineol, 0.40% .

Tabela 4. Sadržaj seskviterpenskih ugljovodonika u uzorku ispitivanog etarskog ulja ruzmarina (% m/m)

Komponente	RT-FID ^a	RT-MS ^b	RRT ^c	Sadržaj, procenat (% m/m)
Seskviterpenski ugljovodonici				4.77
α-kopaen	30.598	22.03	1.401	0.12
longifolen	31.866	22.93	1.459	0.18
β-kariofilen	32.240	23.41	1.476	3.93
α-humulen	33.406	24.45	1.529	0.36
germakren D	34.029	25.18	1.558	0.08
δ-kadinen	35.528	26.59	1.626	0.10

^aRT-FID – retenciono vreme u GC/FID sistemu;

^bRT-MS – retenciono vreme u GC/MS sistemu;

^cRR – relativno retenciono vreme u odnosu na kamfor.

U ispitivanom uzorku etarskog ulja seskviterpenski ugljovodonici čine ukupno 4.77%. U najvećem procentu je zastupljena komponenta β -kariofilen, 3.93%; u nešto manjem procentu je prisutna komponenta α -humulen, 0.36%; dok su komponente α -kopaen, 0.12%; longifolen, 0.18% i δ -kadinen, 0.10%, zastupljene u približnom odnosu, a u tragovima je prisutan germakren D, 0.08%.

5.2. Parametri farmakodinamskih ispitivanja

Ispitivanje uticaja etarskog ulja ruzmarina na efekte paracetamola, kodeina, diazepama i pentobarbitala, kao i ispitivanje analgetskog efekta etarskog ulja ruzmarina nakon primene sirćetne kiseline kao izvora bolne draži, dovelo je do promene ispitivanih parametara u primenjenim farmakodinamskim testovima.

5.2.1. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na analgetski efekat paracetamola i kodeina

5.2.1.1. Analgetski efekat etarskog ulja ruzmarina

Tabela 5. Trajanje reakcije na toplotni stimulus nakon sedmodnevnog tretmana u grupama KON₇, Eur20₇, KON₇+Kod i KON₇+Par (m±Sd,sec)

Interval merenja [min] Grupe životinja	0	5	10	15	20	30	40	50	60
KON₇	10.91± 2.61	11.11± 4.52	9.87± 2.17	12.47± 3.27	10.06± 1.84	10.91± 2.87	10.27± 1.91	11.58± 1.64	11.88± 2.70
Eur20₇	10.91± 2.80	12.92± 3.30 [#]	13.85± 7.70	15.21± 3.00	14.17± 3.20 ^{*#}	14.66± 7.50	14.24± 6.50	15.58± 3.10 ^{*#}	14.44± 3.90
KON₇+Kod	10.91± 2.87	20.08± 8.74	20.78± 12.80 [*]	21.11± 14.20 [*]	15.92± 5.06 [*]	12.92± 4.78	15.36± 5.81	15.69± 3.01 [*]	14.92± 3.90
KON₇+Par	10.91± 2.61	10.34± 1.05	12.38± 3.97	11.73± 2.32	11.08± 3.85	11.56± 2.92	12.42± 1.80 [*]	13.32± 2.28	12.10± 5.08

(*) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₇, $p < 0.05$,

(#) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₇+Par, $p < 0.05$,

(q) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₇+Kod, $p < 0.05$.

Tokom našeg ispitivanja, korišćeni su paracetamol i kodein kao referentni lekovi koji ispoljavaju analgetičko delovanje. Etarsko ulje ruzmarina primenjeno tokom sedam dana u dozi od 20 mg/kg, grupa Eur20₇, dovelo je do statistički značajno dužeg zadržavanja miševa na vreloj ploči u 20om i 50om minutu testa, u poređenju sa kontrolnom grupom (KON₇). Reakciono vreme u grupi životinja koje su tretirane paracetamolom je bilo statistički značajno duže u 40om minutu testa u odnosu na kontrolnu grupu.

Primena kodeina je statistički značajno produžila reakciono vreme u odnosu na kontrolu u 10om, 15om, 20om i 50om minutu eksperimenta.

Rezultati pokazuju da je analgetski efekat etarskog ulja ruzmarina, grupa Eur20₇, izraženiji od analgetskog efekta paracetamola (KON₇+Par), sa dostignutom statističkom značajnošću u 5om, 20om i 50om minutu testa.

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike analgetičkog delovanja etarskog ulja ruzmarina primenjenog sedam dana u odnosu na analgetički efekat kodeina.

5.2.1.2. Interakcija etarskog ulja ruzmarina sa paracetamolom

Tabela 6. Trajanje reakcije na toplotni stimulus nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene paracetamola u grupama KON₇, Eur20₇, KON₇+Par, Eur10₇+Par i Eur20₇+Par (m±Sd,sec)

Interval merenja [min] Grupe životinja	0	5	10	15	20	30	40	50	60
KON₇	11.63± 2.57	11.11± 4.52	9.87± 2.17	12.47± 3.27	10.06± 1.84	10.91± 2.87	10.27± 1.91	11.58± 1.64	11.88± 2.70
Eur20₇	10.91± 2.80	12.92± 3.30	13.85± 7.70	15.21± 3.00	14.17± 3.20	14.66± 7.50	14.24± 6.50	15.58± 3.10	14.44± 3.90
KON₇+ Par	10.91± 2.61	10.34± 1.05	12.38± 3.97	11.73± 2.32	11.08± 3.85	11.56± 2.92	12.42± 1.80	13.32± 2.28	12.10± 5.08
Eur10₇+ Par	10.91± 2.61	10.91± 2.61	11.97± 2.55	13.08± 4.00	12.63± 2.26*	12.20± 3.15	13.68± 2.04*	11.93± 1.40*	13.41± 3.85
Eur20₇+ Par	10.91± 2.61	13.17± 3.18#	11.53± 7.59	14.45± 8.80	13.25± 4.19*	16.53± 5.35##	15.48± 5.57*	18.50± 6.40*	12.78± 3.25

(*) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₇, $p < 0,05$;

(#) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₇+Par, $p < 0,05$.

Etarsko ulje ruzmarina primenjeno sedam dana u dozi od 10 mg/kg, dovelo je do statistički značajnog produženja reakcionog vremena miševa tretiranih paracetamolom, u odnosu na kontrolu, u 20om, 40om i 50om minutu eksperimenta.

Etarsko ulje ruzmarina primenjeno sedam dana u dozi od 20 mg/kg, dovelo je do statistički značajnog produženja reakcionog vremena miševa tretiranih paracetamolom, u odnosu na kontrolu, u 20om, 30om, 40om i 50om minutu eksperimenta.

Sedmodnevni pretretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg, potencirao je analgetičko delovanje paracetamola i doveo do statistički značajnog produženja reakcionog vremena u 5om i 30om minutu eksperimenta, u odnosu na grupu KON₇+Par.

Tabela 7. Procenat depresije bola nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene paracetamola u grupama KON₇, Eur20₇, KON₇+Par, Eur10₇+Par, Eur20₇+Par (m±Sd, %)

Interval merenja [min] Grupe životinja	5	10	15	20	30	40	50	60
KON₇ %	-0.0017 ±23.02	1.51± 21.41	8.53± 25.71	0.06± 17.71	20.68± 12.22	-1.19± 13.91	10.72± 7.82	4.80± 14.50
Eur20₇ %	-0.005± 25.82	10.74± 54.19	0.013± 19.90	6.89± 29.22	0.13± 26.66	5.68± 42.42	4.72± 12.85	0.02± 26.71
KON₇+ Par %	1.76± 11.56	1.74± 32.39	-0.00± 19.82	-0.002± 34.82	-0.00± 20.97	-0.002 ±14.54	0.00± 17.12	0.00± 41.98
Eur10₇+ Par %	0.06± 23.96	9.72± 23.42	19.92± 36.70	15.61± 20.76	11.86± 28.90	28.43± 19.97 [#]	24.64± 12.85 ^{#x}	22.97± 14.89
Eur20₇+ Par %	20.72± 29.22	7.24± 69.56	32.47± 80.73	21.44± 38.40	52.91± 47.14 ^{#x}	48.66± 32.50 [#]	75.40± 49.45 ^{#x}	6.24± 29.07

(*) vrednosti statistički značajno različite u odnosu na grupu KON₇, $p < 0,05$;

(#) vrednosti statistički značajno različite u odnosu na grupu KON₇+Par, $p < 0,05$;

(x) vrednosti statistički značajno različite u odnosu na grupu Eur20₇, $p < 0,05$.

Procenat depresije bola kod grupe miševa koja je sedam dana pretretirana etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg i potom primila paracetamol, statistički je značajno veći u odnosu na grupu tretiranu samo paracetamolom u 30om, 40om i 50om minutu testa. U odnosu na grupu miševa koja je tokom sedam dana tretirana samo etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg (grupa Eur20₇), kod grupe pretretirane sedam dana etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg i potom paracetamolom, zabeležen je statistički značajno veći procenat depresije bola u 30om i 50om minutu.

Etarsko ulje ruzmarina u dozi od 10 mg/kg nakon primene paracetamola (grupa Eur10₇+Par), značajno povećava procenat depresije bola u odnosu na kontrolu i grupu tretiranu samo paracetamolom (KON₇+Par) i u odnosu na kontrolnu grupu (KON₇), u 40om i 50om minutu, dok je u poređenju sa grupom miševa koja je sedam dana pretretirana etarskim

uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg (Eur20₇) povećanje depresije bola bilo značajno samo u 50om minutu testa.

Tabela 8. Trajanje reakcije na toplotni stimulus nakon jednokratnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene paracetamola u grupama KON₁, Eur20₁, KON₁+Par, Eur10₁+Par, Eur20₁+Par (sec, m±Sd)

Interval merenja [min] / Grupe životinja	0	5	10	15	20	30	40	50	60
KON₁	11.63± 2.57	11.11± 4.52	9.87± 2.17	12.47± 3.27	10.06± 1.84	10.91± 2.87	10.27± 1.91	11.58± 1.64	11.88± 2.70
Eur20₁	10.38± 2.37	8.63± 2.08 [#]	12.29± 4.50	12.83± 2.43	13.07± 3.20	10.47± 2.46	12.54± 3.47	14.05± 3.38	14.37± 2.06
KON₁+ Par	11.63± 2.29	13.06± 4.23	9.91± 2.52	11.38± 1.67	12.93± 2.35 [*]	12.09± 3.41	14.12± 2.44 [*]	16.44± 3.51 [*]	13.84± 4.46
Eur10₁+ Par	13.36± 3.41	12.74± 4.54	13.78± 2.54 ^{*#}	12.14± 2.67	14.54± 4.38 [*]	12.68± 4.74	13.41± 3.76	14.66± 2.68 [*]	15.37 ± 3.88
Eur20₁+ Par	13.75± 3.84	14.28± 3.39 ^x	14.62± 4.06 ^{*#}	12.98± 3.82	13.21± 2.38 [*]	13.01± 2.46	14.08± 2.18 [*]	15.71± 5.72	14.90 ± 2.80 [*]

(*) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₁, $p < 0,05$;

(#) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₁+Par, $p < 0,05$;

(x) vrednosti statistički značajno različite od grupe Eur20₁, $p < 0,05$.

Etarsko ulje ruzmarina, primenjeno kod miševa u dozi od 10 mg/kg, tokom sedam dana, koji su potom primili paracetamol, dovelo je do statistički značajnog produženja vremena zadržavanja na vreloj ploči u 10om, 20om i 50om minutu testa u odnosu na kontrolnu grupu.

Etarsko ulje ruzmarina, primenjeno kod miševa u dozi od 20 mg/kg, tokom sedam dana, koji su potom primili paracetamol, dovelo je do statistički značajnog produženja vremena zadržavanja na vreloj ploči u 10om, 20om, 40om i 60om minutu testa u odnosu na kontrolnu grupu.

Jednokratni pretretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 i 20 mg/kg, značajno je potencirao analgetičko delovanje paracetamola. U poređenju sa grupom tretiranom samo paracetamolom, obe doze etarskog ulja ruzmarina su značajno produžile vreme zadržavanja miševa na vreloj ploči u 10om minutu eksperimenta.

U grupi tretiranoj samo etarskim uljem ruzmarina, Eur20₁, primećuje se značajno kraće reakciono vreme u 5om minutu u odnosu na grupu koja je primila samo paracetamol

(KON₁+Par). Značajno duže zadržavanje miševa na vreloj ploči nakon primene paracetamola (KON₁+Par), izmereno je u 20om, 40om i 50om minutu testa u odnosu na kontrolnu grupu (KON₁).

Jednokratni pretretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg, nakon primene paracetamola, doveo je do značajnog produženja reakcionog vremena u 5om minutu eksperimenta, u odnosu na grupu tretiranu samo etarskim uljem ruzmarina u dozi 20 mg/kg.

5.2.1.3. Interakcija etarskog ulja ruzmarina sa kodeinom

Tabela 9. Trajanje reakcije na toplotni stimulus nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene kodeina u grupama KON₇, Eur20₇, KON₇+Kod, Eur10₇+Kod, Eur20₇+Kod (sec, m±Sd)

Interval merenja [min]	0	5	10	15	20	30	40	50	60
KON₇	11.63± 2.57	11.11± 4.52	9.87± 2.17	12.47± 3.27	10.06± 1.84	10.91± 2.87	10.27± 1.91	11.58± 1.64	11.88± 2.70
Eur20₇	10.91± 2.80	12.92± 3.30	13.85± 7.70	15.21± 3.00	14.17± 3.20	14.66± 7.50	14.24± 6.50	15.58± 3.10	14.44± 3.90
KON₇+ Kod	10.91± 2.87	20.08± 8.74	20.78± 12.80	21.11± 14.20	15.92± 5.06	12.92± 4.78	15.36± 5.81	15.69± 3.01	14.92± 3.90
Eur10₇+ Kod	10.91± 2.61	18.28± 3.97 ^{*x}	18.74± 13.10	16.90± 5.69 ^x	15.94± 5.82 [*]	16.87± 7.51	13.36± 3.54	12.75± 2.98	14.20± 1.18 [*]
Eur20₇+ Kod	10.91± 2.61	16.93± 6.78	22.78± 3.22 ^{*x}	22.68± 7.51 ^{*x}	19.00± 5.32 [*]	18.18± 4.40 ^{*x}	14.26± 4.22 [*]	16.00± 4.76 [*]	16.91± 4.69 [*]

(*) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₇, $p < 0,05$;

(q) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₇+Kod, $p < 0,05$;

(x) vrednosti statistički značajno različite od grupe Eur20₇, $p < 0,05$.

U eksperimentalnim grupama višestruko tretiranim etarskim uljem ruzmarina u dozama 10 i 20 mg/kg, došlo je do statistički značajnog produženja reakcionog vremena u odnosu na kontrolnu grupu (KON₇), i to u grupi Eur10₇+Kod u 5om, 20om i 60om minutu testa, dok se u grupi Eur20₇+Kod isti efekat ispoljilo u periodu od 10og do 60og minuta eksperimenta.

Poređenjem reakcionih vremena eksperimentalnih grupa sa pozitivnom kontrolom KON₇+Kod, nije dostignuta statistička značajnost razlika izmerenih vrednosti.

U odnosu na grupu višekratno tretiranu etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg, višekratna primena etarskog ulja ruzmarina u dozi od 10 mg/kg i kodeina, značajno je produžila reakciono vreme u 5om i 15om minutu eksperimenta, dok je višekratna primena etarskog ulja ruzmarina u dozi od 20 mg/kg i kodeina, značajno je produžila reakciono vreme u 10om, 15om i 30om minutu eksperimenta.

Tabela 10. Procenat depresije bola nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene kodeina u grupama KON₇, Eur20₇, KON₇+Kod, Eur10₇+Kod, Eur20₇+Kod (m±Sd,%)

Interval merenja [min] Grupe životinja	5	10	15	20	30	40	50	60
KON ₇ %	-0.0017 ±23.02	1.51± 21.41	8.53± 25.71	0.06± 17.71	20.68± 12.22	-1.19± 13.91	10.72± 7.82	4.80± 14.50
Eur20 ₇ %	-0.005± 25.82	10.74± 54.19 ^q	0.013± 19.90	6.89± 29.22	0.13± 26.66	5.68± 42.42	4.72± 12.85	0.02± 26.71
KON ₇ + Kod %	5.68± 30.71	0.01± 61.67	0.03± 67.53	0.04± 31.83	0.04± 34.82	0.04± 37.86	0.01± 19.16	1.38± 29.82
Eur10 ₇ + Kod %	67.56± 36.43 ^{*q}	20.75± 42.18	31.75± 7.57	46.1± 53.34	54.63± 68.81	22.45± 32.51	19.84± 25.00	30.15± 16.39 [*]
Eur20 ₇ + Kod %	55.20± 62.10	99.26± 20.24 ^{*qx}	85.27± 45.87 ^{*qx}	74.14± 48.75 ^{*qx}	49.88± 43.67 ^{qx}	30.76± 38.68	30.18± 37.26	55.05± 43.02 ^{*qx}

(*) vrednosti statistički značajno različite u odnosu na grupe KON₇, $p < 0,05$;

(q) vrednosti statistički značajno različite u odnosu na grupu KON₇+Kod, $p < 0,05$;

(x) vrednosti statistički značajno različite u odnosu na grupu Eur20₇, $p < 0,05$.

Primena kodeina u grupi višekratno tretiranoj etarskim uljem ruzmarina u dozi 20 mg/kg nakon jednokratne primene kodeina značajno produžava odgovor miševa na toplotni stimulus, grupa Eur20₇+Kod, u poređenju sa kontrolnom grupom tretiranom samo kodeinom (KON₇+Kod) u 10om, 15om, 20om, 30om i u 60om minutu testa. Isti efekat se uočava u ovoj grupi (Eur20₇+Kod) i u odnosu na grupu višekratno tretiranu etarskim uljem ruzmarina u dozi 20 mg/kg, koja nije primila kodein (Eur20₇). Pretretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 mg/kg (Eur10₇+Kod) u odnosu na grupu tretiranu samo kodeinom (KON₇+Kod), u 5om minutu testa statistički značajno pojačava analgetički efekat kodeina. Ne postoji statistički značajna razlika depresije bola između grupe tretirane etarskim uljem u dozi od 10 mg/kg i kodeinom u odnosu na grupu koja je višekratno (tokom sedam dana) tretirana samo etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg (Eur20₇).

Poređenjem analgetičkog efekta u grupama tretiranim samo etarskim uljem u dozi od 20 mg/kg (Eur20₇) i samo kodeinom (KON₇+Kod), značajno izraženije analgetičko delovanje je izmereno grupi Eur20₇ u 10om minutu testa.

U grupi Eur20₇+Kod u odnosu na kontrolnu grupu KON₇, procenat depresije bola je bio statistički značajno veći u 10om, 15om, 20om i 60om minutu testa. U grupi Eur10₇+Kod procenat depresije bola je bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu KON₇, u 5om i 60om minutu testa.

Tabela 11. Trajanje reakcije na toplotni stimulus nakon jednokratnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina, i jednokratne primene kodeina u grupama KON₁, Eur20₁, KON₁+Kod, Eur10₁+Kod, Eur20₁+Kod (m±Sd,sec)

Interval merenja [min] Grupe životinja	0	5	10	15	20	30	40	50	60
KON₁	11.63± 2.57	11.11± 4.52	9.87± 2.17	12.47± 3.27	10.06± 1.84	10.91± 2.87	10.27± 1.91	11.58± 1.64	11.88± 2.70
Eur20₁	10.38± 2.37	8.63± 2.08	12.29± 4.50	12.83± 2.43	13.07± 3.20	10.47± 2.46	12.54± 3.47	14.05± 3.38	14.37± 2.06
KON₁+ Kod	11.63± 2.87	13.59± 3.91	16.20± 3.54*	13.61± 2.63 ^x	15.49± 3.81*	15.98± 3.60*	12.54± 3.67	14.00± 2.06*	14.92± 3.90
Eur10₁+ Kod	11.11± 4.53	13.32± 3.86 ^x	18.18± 3.23 ^{*x}	21.54± 4.80 ^{q*x}	21.16± 5.70 ^{*x}	16.27± 5.92 ^x	17.38± 1.72 ^{q*x}	16.46± 5.19*	14.54± 3.71*
Eur20₁+ Kod	9.88± 2.17	15.25± 7.40	15.57± 2.99*	16.07± 6.50	13.40± 2.64*	13.73± 2.75 ^x	13.93± 5.36	16.36± 9.97	13.83± 8.12

(*) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₁, $p < 0,05$;

(q) vrednosti statistički značajno različite od grupe KON₁+Kod, $p < 0,05$;

(x) vrednosti statistički značajno različite od grupe Eur20₁, $p < 0,05$.

Etarsko ulje ruzmarina, jednokratno primenjeno u dozi od 10 mg/kg, grupa Eur10₁+Kod, dovodi do značajno dužeg zadržavanja životinja na vreloj ploči u odnosu na kontrolnu grupu, KON₁, u 10om, 15om i 20om minutu, i u 40om, 50om i 60om minutu testa; dok je statistički značajna razlika u produženju vremena reakcije dostignuta u 15om i 40om minutu eksperimenta u poređenju sa grupom tretiranom samo kodeinom KON₁+Kod.

U dozi od 20 mg/kg etarsko ulje ruzmarina, u grupi Eur20₁+Kod, značajno produžava vreme zadržavanja miševa na vreloj ploči u 10om i 20om minutu, u odnosu na kontrolnu

grupu, KON₁. Primenjeno u dozi od 20 mg/kg etarsko ulje u grupi Eur20₁+Kod, nije dovelo do statistički značajne promene vremena zadržavanja miševa na vreloj ploči u odnosu na grupu tretiranu samo kodeinom, KON₁+Kod.

U grupi tretiranoj samo kodeinom (KON₁+Kod), vreme zadržavanja životinja na vreloj ploči je statistički značajno duže u 10om, 20om, 30om i 50om minutu testa, u odnosu na kontrolnu grupu (KON₁).

U 15om minutu testa u grupi tretiranoj samo kodeinom (KON₁+Kod), ispoljio se značajno jači analgetski efekat u odnosu na grupu jednokratno pretretiranu etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg (Eur20₁).

Etarsko ulje ruzmarina u dozi od 10 mg/kg zajedno sa kodeinom, Eur10₁+Kod, produžava reakciono vreme životinja u 5om, 10om, 15om, 20om, 30om i 40om minutu, u odnosu na vreme boravka na vreloj ploči životinja iz grupe Eur20₁, dok u grupi Eur20₁+Kod isti efekat postiže u 30om minutu.

5.2.2. Test sa sirćetnom kiselinom („test uvijanja“)

Tabela 12. Broj grčeva izazvanih jednokratnom primenom sirćetne kiseline nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina u grupama KON₇+Acet, Eur10₇+Acet i Eur20₇+Acet (m±Sd)

<i>Period brojanja grčeva</i>	<i>Grupe životinja</i>		
	KON₇+Acet	Eur10₇+Acet	Eur20₇+Acet
<i>Prvi period/broj grčeva</i>	52.67± 9.05	39.17±6.99*	43±5.42*
<i>Drugi period/broj grčeva</i>	28.67±6.77	24± 5.69	26±8.41

(*) vrednosti satistički značajno različite od kontrolne grupe KON₇+Acet, $p < 0.05$.

Intraperitonealna primena 1% rastvora sirćetne kiseline u fiziološkom rastvoru u zapremini ekvivalentnoj 10 ml/kg telesne mase, izazvala je grčeve kod svih eksperimentalnih životinja.

U prvom periodu brojanja grčeva, od 5og do 25og minuta nakon primene sirćetne kiseline, kod obe grupe životinja pretretiranih etarskim uljem ruzmarina Eur10₇+Acet i Eur20₇+Acet, došlo je do statistički značajnog smanjenja broja grčeva u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇+Acet. Ovaj efekat je izraženiji u grupi životinja tretiranoj etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 mg/kg telesne mase, Eur10₇+Acet.

U drugom periodu brojanja grčeva, od 25og do 45og minuta nakon primene sirćetne kiseline, nije dostignuta statistički značajna razlika u reakciji u odnosu na grupu KON₇+Acet.

Tabela 13. Broj grčeva izazvanih jednokratnom primenom sirćetne kiseline nakon jednokratnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina u grupama KON₁+Acet, Eur10₁+Acet i Eur20₁+Acet (m±Sd)

<i>Period brojanja grčeva</i>	<i>Grupe životinja</i>		
	KON₁+Acet	Eur10₁+Acet	Eur20₁+Acet
<i>Prvi period/broj grčeva</i>	38.00±9.48	42.17±12.64	48.77±12.44
<i>Drugi period/broj grčeva</i>	13.40±5.32	28.17±5.88*	23.83±11.12

(*) vrednosti satistički značajno različite od kontrolne grupe KON₁+Acet, $p < 0.05$.

Nakon jednokratnog tretmana životinja etarskim uljem ruzmarina, u prvom periodu brojanja grčeva, od 5og do 25og minuta od primene sirćetne kiseline, u grupama Eur10₁+Acet i Eur20₁+Acet, nije se ispoljila statistički značajna razlika u broju grčeva u odnosu na kontrolnu grupu KON₁+Acet.

U drugom periodu brojanja grčeva u grupi Eur10₁+Acet, broj grčeva je statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu, KON₁+Acet.

5.2.3. Efekat diazepama na motornu koordinaciju (test rotirajućeg štapa)

Tabela 14. Uticaj sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina na psihomotornu koordinaciju miševa nakon jednokratne primene diazepama u grupama KON₇+Diaz, Eur10₇+Diaz i Eur20₇+Diaz. Vreme zadržavanja životinja na rotirajućem štapu je izraženo u sekundama (m±Sd, sec)

<i>Vremenski interval od trenutka davanja diazepama</i>	<i>Grupe životinja</i>		
	KON₇+Diaz	Eur10₇+Diaz	Eur20₇+Diaz
5 min.	27.0 ±12.99	117.17±73.18*	106.83 ± 57.81*
20 min.	300±0.00	300±0.00	300±0.00
35 min.	300±0.00	300±0.00	300±0.00

(*) statistički značajno različite vrednosti od KON₇+Diaz grupe, $p < 0.05$.

U prvom merenom intervalu tj. 5 minuta nakon primene diazepama u kontrolnoj grupi, dolazi do značajnog skraćanja zadržavanja miševa na rotirajućem štapu u odnosu na kontrolno vreme (300 s). Kod životinja koje su pre diazepama pretretirane sedam dana etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 i 20 mg/kg, 5 minuta posle primene diazepama je takođe skraćeno zadržavanje miševa na rotirajućem štapu u odnosu na kontrolno vreme, ali je skraćenje značajno manje u odnosu na ono koje postoji kod grupe koja je tretirana samo diazepamom.

Ne postoji značajna razlika vremena zadržavanja miševa na rotirajućem štapu u druga dva merena intervala tj. u 20om i 35om minutu nakon primene diazepama između kontrolne grupe, tretirane samo diazepamom i grupa koje su pre diazepama pretretirane sedam dana etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 i 20 mg/kg.

Tabela 15. Uticaj jednokratnog tretmana etarskim uljem ruzmarina na psihomotornu koordinaciju miševa nakon jednokratne primene diazepama u grupama KON₁+Diaz, Eur10₁+Diaz i Eur20₁+Diaz, izraženu kao vreme zadržavanja miševa na rotirajućem štapu (m ± Sd, sec)

<i>Vremenski interval od trenutka davanja diazepama</i>	<i>Grupe životinja</i>		
	KON₁+Diaz	Eur10₁+Diaz	Eur20₁+Diaz
5 min.	35.35±24.60	72.33±84.48	21.38±88.22
20 min.	300±0.00	300±0.00	300±0.00
35 min.	300±0.00	300±0.00	300±0.00

Jednokratni tretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 i 20 mg/kg nije izazvao statistički značajnu promenu vremena zadržavanja životinja na rotirajućem štapu u eksperimentalnim grupama Eur10₁+Diaz i Eur20₁+Diaz, u odnosu na kontrolnu grupu KON₁+Diaz.

Tabela 16. Depresija psihomotorne koordinacije miševa izazvana diazepamom nakon višekratnog i jednokratnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina u grupama KON₇+Diaz, Eur10₇+Diaz, Eur20₇+Diaz, KON₁+Diaz, Eur10₁+Diaz i Eur20₁+Diaz, izražena u %

	<i>Višekratni pretretman</i>			<i>Jednokratni pretretman</i>		
<i>Interval merenja</i>	KON₇+Diaz	Eur10₇+Diaz	Eur20₇+Diaz	KON₁+Diaz	Eur10₁+Diaz	Eur20₁+Diaz
5-10 min	91.00%	60.94 % *	64.39% *	88.22 %	75.89%	92.87%

(*) statistički značajno različite vrednosti od KON₇+Diaz grupe, $p < 0.05$.

Statistički značajno smanjenje depresije psihomotorne aktivnosti miševa izazvane primenom diazepamom, izraženo u %, uočava se u obe eksperimentalne grupe, Eur10₇+Diaz i Eur20₇+Diaz, u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇+Diaz, nakon višekratnog tretmana etarskim uljem ruzmarina.

Nije bilo značajnije razlike u depresiji psihomotorne aktivnosti životinja izazvane diazepamom između eksperimentalnih grupa jednokratno tretiranih etarskim uljem ruzmarina, Eur10₁+Diaz i Eur20₁+Diaz u odnosu na kontrolu.

5.2.4. Hipnotički efekat pentobarbitala (vreme spavanja)

Tabela 17. Uticaj sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina na indukciono vreme i vreme trajanja spavanja izazvano jednokratnom primenom pentobarbitala u grupama KON₇+Pentb, Eur10₇+Pentb i Eur20₇+Pentb (m±Sd, min)

<i>Grupe životinja</i>	<i>Indukciono vreme</i>	<i>Vreme trajanja spavanja</i>
KON₇+Pentb	4.20±0.83	65.10±10.48
Eur10₇+Pentb	5.16±1.60	28.80±8.58*
Eur20₇+Pentb	5.00±1.40	43.60±28.65

(*) statistički značajno različite vrednosti od KON₇+Pentb grupe, $p < 0.05$.

Intraperitonealna primena pentobarbitala u dozi od 40 mg/kg, dovela je do uspavljivanja većine životinja, dok su životinje koje nisu zaspale isključene iz ispitivanja ili zamenjene drugima, tako da je broj ispitivanih životinja u grupi ostao isti (n=6).

Ne postoji statistički značajna razlika trajanja indukcionog vremena između kontrolne grupe, tretirane samo pentobarbitalom i eksperimentalnih grupa, koje su pre hipnotika pretretirane sedam dana etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 i 20 mg/kg.

Vreme trajanja spavanja životinja je statistički značajno skraćeno u grupi Eur10₇+Pentb u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇+Pentb. Sedmodnevni tretman etarskim uljem ruzmarina u grupi Eur20₇+Pentb, nije statistički značajno promenio vreme trajanja spavanja u odnosu na kontrolu.

Tabela 18. Uticaj jednokratnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina na indukciono vreme i vreme trajanja spavanja izazvano jednokratnom primenom pentobarbitala u grupama KON₁+Pentb, Eur10₁+Pentb i Eur20₁+Pentb (m±Sd, min)

<i>Grupe životinja</i>	<i>Indukciono vreme</i>	<i>Vreme trajanja spavanja</i>
KON₁+Pentb	4.20±1.44	65.00±12.75
Eur10₁+Pentb	5.40±1.52	60.80±15.75
Eur20₁+Pentb	4.83±1.17	86.60±14.76*

(*) statistički značajno različite vrednosti od KON₁+Pentb grupe, $p < 0.05$.

Jednokratni pretretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 i 20 mg/kg produžio je indukciono vreme u grupama Eur10₁+Pentb i Eur20₁+Pentb u odnosu na kontrolnu grupu KON₁+Pentb, ali bez dokazane statističke značajnosti. U grupi Eur10₁+Pentb nije došlo do značajnije promene trajanja spavanja izazvanog pentobarbitalom, u poređenju sa kontrolnom grupom laboratorijskih životinja KON₁+Pentb.

Međutim, etarsko ulje ruzmarina u grupi Eur20₁+Pentb je dovelo do statistički značajnog produženja spavanja životinja, u odnosu na kontrolnu grupu KON₁+Pentb.

Jednokratna primena etarskog ulja ruzmarina u dozi od 20 mg/kg, grupa Eur20₁+Pentb, statistički je značajno produžila vreme trajanja spavanja u odnosu na primenu iste doze etarskog ulja tokom sedam dana, Eur20₇+Pentb.

5.3. Rezultati ispitivanja uticaja etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetičke osobine paracetamola

Tabela 19. Uticaj etarskog ulja ruzmarina primenjenog per os, tokom sedam dana u dozi od 5 i 10 µg/kg, na farmakokinetičke osobine paracetamola primenjenog intravenski, 20 mg/kg, kod belih laboratorijskih pacova ($\bar{x} \pm Sd$)

Farmakokinetički parametri	KON₇+PAR_{i.v.}	Eur5₇+PAR_{i.v.}	Eur10₇+PAR_{i.v.}
konstanta 1/min	.0159200±.00328512	.0198000±.01152302	.0168800±.00281993
t 1/2 min	45.4219±11.53134	43.5469±19.69024	42.1651±8.48182
C₀ µg/ml	47.6536±18.38939	24.2481±11.34083*	27.6276±12.81024
AUC 0-t min*ug/ml	1256.6926±441.40337	1001.3590±428.61705	982.5832±502.43821
Vd ml/kg	3917.89404±1319.236619	5283.79093±4060.844931	5188.55392±2164.924006
Cl ml/min/kg	60.35664±19.717386	76.13328±30.517755	87.22034±39.834617
MRT o-t Min	34.6609±5.55932	51.2963±18.71620	42.9908±11.28523
MRT inf Min	46.0397±17.75112	66.5937±32.76246	52.9279±7.54134
Vss ml/kg	2673.2749±958.17128	5662.0444±4834.81689	4435.3853±1588.72057

(*) vrednosti statistički značajno različite od vrednosti u kontrolnoj grupi KON₇+PAR(i.v.)

U odnosu na kontrolnu grupu životinja tretiranu sedam dana fiziološkim rastvorom, vrednost konstante eliminacije paracetamola (1/min), je povećana u eksperimentalnim grupama koje su pre paracetamola, tokom sedam dana, pretretirane etarskim uljem ruzmarina, u dozi od 5 µg/kg i 10 µg/kg, ali bez dostizanja statističke značajnosti. Poluvreme eliminacije paracetamola (t_{1/2}), u eksperimentalnim grupama je kraće u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijene razlike u odnosu na kontrolnu grupu su naročito izražene kod grupe pretretirane etarskim uljem ruzmarina u dozi od 5 µg/kg, međutim, statistička značajnost nije postignuta.

Koncentracija paracetamola u nultom vremenu (C_0), je statistički značajno niža u eksperimentalnoj grupi tretiranoj etarskim uljem ruzmarina, $5\mu\text{g}/\text{kg}$, u odnosu na kontrolnu grupu, $p=0.044$. U grupi tretiranoj etarskim uljem ruzmarina, $10\mu\text{g}/\text{kg}$, vrednosti C_0 su takođe niže u poređenju sa kontrolom, bez dostizanja statističke značajnosti.

Vrednosti površina ispod krive koncentracije paracetamola od prvog do zadnjeg uzorkovanja krvi (AUC_{0-t}), su smanjene u obe eksperimentalne grupe, bez dostignute statističke značajnosti. Površine ispod krive koncentracije paracetamola ekstrapolirane u beskonačnost ($\text{AUC}_{0-\infty}$), su niže u poređenju sa kontrolom, bez dostizanja statističke značajnosti. Razlika vrednosti površina ispod krive AUC_{0-t} i $\text{AUC}_{0-\infty}$ nije bila viša od 10%.

Vrednosti volumena distribucije paracetamola (V_d), su povećane u grupama pretretiranim sedam dana etarskim uljem ruzmarina (najveća vrednost je izmerena u grupi pretretiranoj nižom dozom etarskog ulja ruzmarina, $5\mu\text{g}/\text{kg}$). Ipak, statistička značajnost nije postignuta.

Vrednosti klirensa paracetamola (Cl), su povećane posle pretretmana etarskim uljem ruzmarina, u odnosu na kontrolnu grupu, bez dostignute statističke značajnosti.

Vrednosti srednjih vremena zadržavanja (MRT), su više kod eksperimentalnih u odnosu na kontrolnu grupu. Statistička značajnost razlike nije postignuta.

Volumen distribucije u stanju ravnotežne koncentracije paracetamola (V_{ss}), je povećan u grupama pretretiranim etarskim uljem ruzmarina u odnosu na kontrolu, bez dostizanja statističke značajnosti.

Tabela 20. Uticaj etarskog ulja ruzmarina primenjenog per os, tokom sedam dana, u dozi od 5 i 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, na farmakokinetičke osobine paracetamola primenjenog per os, 20 mg/kg , kod belih laboratorijskih pacova ($\bar{x}\pm\text{Sd}$, min;max)

<i>Farmakokinetički parametri</i>	KON₇+PAR_{p.o.}	Eur5₇+PAR_{p.o.}	Eur10₇+PAR_{p.o.}
<i>konstanta 1/min</i>	.00910000 \pm .004189670	.00732000 \pm .001866012	.01013333 \pm .004427038
<i>t 1/2 min</i>	89.7655 \pm 39.57825	101.6538 \pm 34.48685	78.1277 \pm 28.28341
<i>t max min</i>	41.2500 \pm 18.87459	36.0000 \pm 8.21584	35.0000 \pm 12.24745
<i>Cmax ug/ml</i>	3.2047 \pm .44277	2.3763 \pm .85913	2.7991 \pm .74478
<i>Cmax/D ug/mg*ml</i>	.0446 \pm .00801	.0335 \pm .01117	.0373 \pm .01064
<i>AUC 0-t min*ug/ml</i>	354.1204 \pm 101.99869	262.1137 \pm 68.71719	272.0571 \pm 72.09058
<i>Vd /F ml/kg</i>	20295.32605 \pm 9874.253398	31557.88736 \pm 8648.047692	25370.30527 \pm 8838.719778
<i>Cl /F ml/min/kg</i>	160.90530 \pm 51.643215	225.05086 \pm 68.813578	231.07888 \pm 63.769635
<i>AUMC min*min*ug/ml</i>	34122.9239 \pm 17934.04361	24866.7109 \pm 6442.28592	20562.0000 \pm 6860.45097
<i>MRT o-t Min</i>	91.8948 \pm 22.32940	95.1266 \pm 9.68864	74.6699 \pm 12.84300
<i>MRT inf Min</i>	159.5440 \pm 48.07526	158.4141 \pm 43.01127	122.8457 \pm 36.38651

(*) vrednosti statistički značajno različite od vrednosti u kontrolnoj grupi KON₇+PAR(p.o.)

U odnosu na kontrolnu grupu životinja, vrednosti konstante eliminacije paracetamola su povećane u eksperimentalnoj grupi pretretiranoj etarskim uljem ruzmarina, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a poluvreme eliminacije je duže. Statistička značajnost razlike nije postignuta.

Nasuprot tome, kod grupe pretretirane etarskim uljem ruzmarina, 5 μg , konstanta eliminacije je niža, a poluvreme izlučivanja produženo u poređenju sa kontrolom. Statistička značajnost nije postignuta. Vreme za koje se postižu maksimalne koncentracije paracetamola u serumu (t_{max}) je kraće u grupama pretretiranim etarskim uljem ruzmarina u odnosu na kontrolu, bez statističke značajnosti razlike. Vrednosti postignutih maksimalnih koncentracija

paracetamola su niže u grupama pretretiranim etarskim uljem ruzmarina u odnosu na kontrolnu grupu.

Površina ispod krive koncentracije paracetamola od prvog do poslednjeg uzorkovanja seruma AUC_{0-t} , pokazuje tendenciju smanjenja u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolu, što je jače izraženo u grupi pretretiranoj sa 5 μg etarskog ulja ruzmarina. Isti efekat se primećuje i kod površine ispod krive ekstrapolirane u beskonačnost ($AUC_{0-\infty}$). Razlika vrednosti površina ispod krive AUC_{0-t} i $AUC_{0-\infty}$ nije bila viša od 10%.

Vrednost volumena distribucije paracetamola primenjenog per os je viša kod grupa pretretiranih etarskim uljem ruzmarina, u odnosu na kontrolu.

Vrednosti klirensa paracetamola su više kod grupa pretretiranih etarskim uljem ruzmarina u odnosu na kontrolu, bez statističke značajnosti razlike.

Vrednost srednjeg vremena zadržavanja (MRT_{0-t}) veća je u eksperimentalnoj grupi tretiranoj nižom dozom etarskog ulja ruzmarina, 5 μg , u odnosu na kontrolnu grupu, a niža je u grupi tretiranoj većom dozom etarskog ulja ruzmarina, 10 μg , bez dostignute statističke značajnosti.

Tabela 21. Bioraspoloživost paracetamola (F,%), izračunata kao odnos srednjih vrednosti površina ispod krive nakon per os i intravenske primene (AUC_{po} i AUC_{iv}), u kontrolnoj grupi i eksperimentalnim grupama tretiranim etarskim uljem ruzmarina u dozi od 5 μg i 10 μg

GRUPE	$AUC_{p.o.}/AUC_{i.v.}$	F(%)
KONTROLA	0.2818± 0.2000	28.18
Eur10μg +paracetamol	0.2769± 0.1604	27.69
Eur5μg +paracetamol	0.2618± 0.1434	26.18

Vrednosti biološke raspoloživosti paracetamola su niže kod grupa pretretiranih etarskim uljem ruzmarina, u odnosu na kontrolnu grupu. Iako nema statistički značajne razlike između biološke raspoloživosti paracetamola, ona je najniža kod grupe tretirane

etarskim uljem ruzmarina u dozi od 5 µg. Vrednosti standardnih devijacija pokazuju da su velike interindividualne razlike unutar kontrolne i eksperimentalnih grupa.

5.4. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na parametre toksičnosti

5.4.1. Biohemijski pokazatelji funkcije jetre

Tabela 22. Koncentracija triglicerida, holesterola, ukupnog i direktnog bilirubina; i aktivnost enzima AST i ALT, u serumu zdravih pacova, nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene ugljen-tetrahlorida u grupama KON₇, KON₇+CCl₄, Eur5₇, Eur10₇, Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄ (m±Sd)

Grupe životinja	TG	Holesterol	Ukupni bilirubin	Direktni bilirubin	AST	ALT
KON ₇	0.81± 0.08	1.56± 0.08	2.05± 0.15	0.35± 0.03	125.30± 4.20	49.70± 1.70
KON ₇ +CCl ₄	0.52± 0.04	1.38± 0.08	4.02± 0.35*	1.32± 0.24*	3185.00± 477.90*	966.80± 244.40*
Eur5 ₇	0.79± 0.06	1.39± 0.03	2.24± 0.06 [#]	0.38± 0.05 [#]	130.20± 6.20 [#]	63.80± 4.30 [#]
Eur10 ₇	1.03± 0.10 [#]	1.68± 0.06	2.55± 0.07 [#]	0.55± 0.02 [#]	143.70± 7.90 [#]	65.70± 2.10 [#]
Eur5 ₇ +CCl ₄	0.63± 0.09	1.54± 0.06	3.94± 0.35*	1.16± 0.15 ^{*y}	2701.70± 583.00*	595.40± 143.70
Eur10 ₇ +CCl ₄	0.42± 0.03*	1.31± 0.13 ^{*x}	4.22± 0.48 ^{*#x}	1.81± 0.24 ^{*#}	1648.60± 104.40 ^{*#x}	893.50± 200.80 ^{*x}

(*) statistički značajno različite vrednosti od KON₇ grupe, $p < 0.05$;

(#) statistički značajno različite vrednosti od KON₇+CCl₄ grupe, $p < 0.05$;

(x) statistički značajno različite vrednosti od Eur10₇ grupe, $p < 0.05$;

(y) statistički značajno različite vrednosti od Eur5₇ grupe, $p < 0.05$.

TG - trigliceridi (mmol/l),

Holesterol (mmol/l),

Ukupni bilirubin (µmol/l),

Direktni bilirubin (µmol/l),

AST – aspartat aminotransferaza (U/l),

ALT – alanin aminotransferaza (U/l).

Statistički značajno sniženje nivoa triglicerida (TG) u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇, dostignuto je u eksperimentalnoj grupi, Eur10₇+CCl₄. Ista tendencija postoji i u grupi Eur5₇+CCl₄, ali bez dostignute statističke značajnosti. Vrednosti TG u grupi tretiranoj samim etarskim uljem ruzmarina u dozi 10 mg/kg, Eur10₇, su značajno veće u odnosu na grupu KON₇+CCl₄. Kod grupe pacova višekratno pretetiranih etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 mg/kg koja je potom dobila ugljentetrahlorid, koncentracija ukupnog holesterola je značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom.

Koncentracija ukupnog holesterola je značajno viša kod grupe pacova koja je višekratno tretirana etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 mg/kg u odnosu na grupu koja je nakon višekratnog pretretmana istom dozom etarskog ulja dobila i ugljen tetrahlorid.

U eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄, kao i u grupi KON₇+CCl₄, došlo je do statistički značajnog porasta koncentracije ukupnog bilirubina, u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇. U grupama višekratno tretiranim etarskim uljem ruzmarina u dozama 5 i 10 mg/kg, Eur5₇ i Eur10₇, statistički su značajno niže koncentracije bilirubina u odnosu na grupu KON₇+CCl₄. Takođe, u eksperimentalnoj grupi Eur10₇+CCl₄ je značajno povećana koncentracija ukupnog bilirubina, u odnosu na grupu višekratno tretiranu etarskim uljem ruzmarina u dozi 10mg/kg, Eur10₇.

Statistički značajan porast koncentracije direktnog bilirubina, u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇, ispoljen je u eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄, kao i u kontrolnoj grupi KON₇+CCl₄. U grupama pretretiranim tokom sedam dana etarskim uljem ruzmarina u dozama 5 i 10 mg/kg, Eur5₇ i Eur10₇, značajno su niže koncentracije direktnog bilirubina u odnosu na grupu tretiranu ugljen tetrahloridom nakon pretretmana fiziološkim rastvorom, KON₇+CCl₄. Takođe, u eksperimentalnoj grupi, Eur5₇+CCl₄ povećana je koncentracija direktnog bilirubina, u odnosu na grupu tretiranu samo etarskim uljem ruzmarina 5mg/kg, Eur5₇.

Povećanje aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST) u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇, sa dostizanjem statističke značajnosti, ispoljeno je u grupi KON₇+CCl₄, kao i u eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄. U odnosu na KON₇+CCl₄ grupu, aktivnost AST u grupama Eur5₇, Eur10₇ i Eur10₇+CCl₄ je niža, sa dostizanjem statističke značajnosti. U odnosu na grupu Eur10₇, u eksperimentalnoj grupi Eur10₇+CCl₄, značajno je povećana aktivnost AST.

Statistički značajno povećanje aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇, ispoljeno je u grupi KON₇+CCl₄, kao i u grupi Eur10₇+CCl₄. U odnosu na KON₇+CCl₄ grupu, aktivnost u grupama Eur5₇ i Eur10₇ značajno je niža. Poređenjem sa grupom Eur10₇, statistički značajno povećanje aktivnosti ALT je dostignuto u grupi Eur10₇+CCl₄.

5.4.2. Parametri bubrežne funkcije

Tabela 23. Koncentracija uree, kreatinina i mokraćne kiseline u serumu zdravih pacova, nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene ugljen tetrahlorida u grupama KON₇, KON₇+CCl₄, Eur₅₇, Eur₁₀₇, Eur₅₇+CCl₄ i Eur₁₀₇+CCl₄ (m±Sd)

<i>Grupe životinja</i>	Urea	Kreatinin	Mokraćna kiselina
KON₇	7.28±0.25	46.00±1.18	62.00±1.73
KON₇+CCl₄	7.72±0.17	53.20±0.70 [*]	104.00±12.02 [*]
Eur₅₇	7.65±0.08	44.20±1.14 [#]	53.00±2.86 [#]
Eur₁₀₇	7.45±0.24	50.30±0.42	60.70±3.69 [#]
Eur₅₇+CCl₄	7.98±0.29	51.50±1.59 ^{*y}	74.30±5.86 ^{#y}
Eur₁₀₇+CCl₄	6.33±0.29 ^{#x}	47.70±0.99 ^{#x}	79.20±6.65 ^x

(*) statistički značajno različite vrednosti od KON₇ grupe, $p < 0.05$;

(#) statistički značajno različite vrednosti od KON₇+CCl₄ grupe, $p < 0.05$;

(x) statistički značajno različite vrednosti od Eur₁₀₇ grupe, $p < 0.05$;

(y) statistički značajno različite vrednosti od Eur₅₇ grupe, $p < 0.05$.

Urea (mmol/l),

Kreatinin (μmol/l),

Mokraćna kiselina (μmol/l).

Poređenjem vrednosti uree u eksperimentalnim grupama sa kontrolnom grupom, KON₇, nije dostignuta statistički značajna razlika. U odnosu na grupu KON₇+CCl₄, u grupi Eur₁₀₇+CCl₄ je došlo do statistički značajnog sniženja koncentracije uree u serumu. Takođe, koncentracija uree u grupi Eur₁₀₇+CCl₄ je značajno niža i u poređenju sa grupom pretretiranom samo etarskim uljem ruzmarina u dozi 10 mg/kg, Eur₁₀.

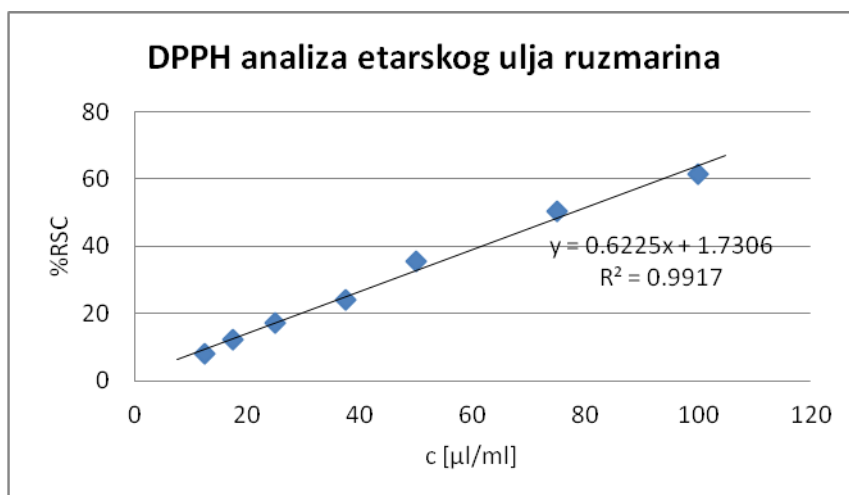
Koncentracija kreatinina je značajno povećana u grupama KON₇+CCl₄ i Eur₅₇+CCl₄ u odnosu na kontrolnu grupu (KON₇). Poređenjem vrednosti koncentracije kreatinina u grupi KON₇+CCl₄ sa drugim grupama, statistički značajno niže koncentracije kreatinina su izmerene u grupama Eur₅₇ i Eur₁₀₇+CCl₄. U odnosu na grupu Eur₅₇, u grupi Eur₅₇+CCl₄ vrednosti kreatinina su statistički značajno veće; dok su vrednosti Eur₁₀₇+CCl₄, u odnosu na grupu Eur₁₀₇ statistički značajno niže.

U odnosu na kontrolnu grupu, KON₇, sadržaj mokraćne kiseline je značajno veći u grupi KON₇+CCl₄. U odnosu na grupe Eur5₇ i Eur10₇, porast sadržaja mokraćne kiseline se uočava u obe eksperimentalne grupe koje su primile ugljen tetrahlorid Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄.

Poređenjem sa grupom koja je tretirana samo ugljen tetrahloridom, KON₇+CCl₄, u grupama Eur5₇, Eur10₇ i Eur5₇+CCl₄, sadržaj mokraćne kiseline u serumu je statistički značajno niži.

5.5. Rezultati procene in vitro antioksidantne aktivnosti etarskog ulja ruzmarina

5.5.1. Rezultat DPPH testa



Slika 3. DPPH analiza etarskog ulja ruzmarina

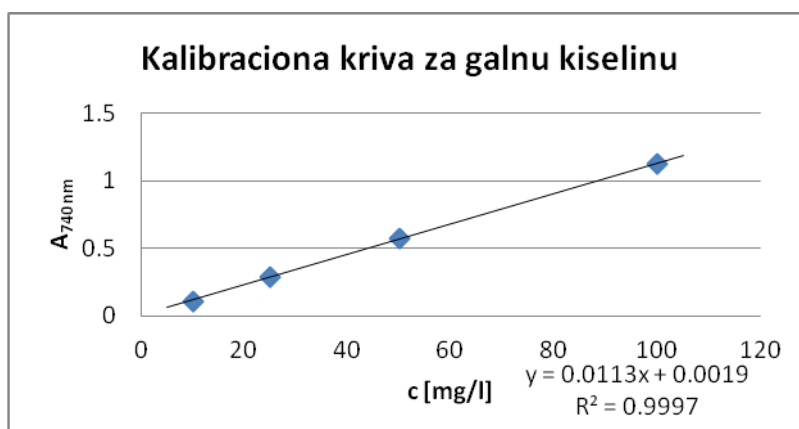
Rezultati DPPH testa su izraženi kroz vrednost srednje inhibitorne koncentracije IC₅₀, koja predstavlja koncentraciju antioksidansa potrebnu da stabilizuje 50% prisutnog DPPH radikala u testiranom rastvoru.

Tabela 24. Vrednosti srednje inhibitorne koncentracije IC₅₀ (µl/ml) etarskog ulja ruzmarina i metanolnog rastvora vitamina E

	<i>Etarsko ulje ruzmarina</i>	<i>Metanolni rastvor vitamina E</i>
IC ₅₀ (µl/ml)	77.60	25.30

Rezultati pokazuju da etarsko ulje ima visoku aktivnost neutralisanja slobodnih radikala sa IC₅₀ vrednošću od 77.6 µl/ml. Poređenje je vršeno sa α-tokoferolom (vitamin E), koji je dobro poznat, vrlo efikasan antioksidans i hvatač slobodnih radikala, koji ispoljava IC₅₀ vrednost od 25.3 µg/ml. Prema tome, 1 µg α-tokoferola je ekvivalentan 3.1 µl ispitivanog etarskog ulja ruzmarina.

5.5.2. Ukupni sadržaj fenola u etarskom ulju ruzmarina



Slika 4. Kalibraciona kriva za galnu kiselinu

Na slici je prikazana kalibraciona kriva galne kiseline, dobijena tokom određivanja sadržaja ukupnih fenola u uzorku etarskog ulja ruzmarina, Folin-Ciocalteu metodom.

Tabela 25. Sadržaj ukupnih fenola (TPC, mg GAE/l) ispitivanog uzorka etarskog ulja ruzmarina

	<i>Etarsko ulje ruzmarina</i>
TPC , mg GAE/l	153.35

Ukupan sadržaj fenola u ispitivanom uzorku EUR, koji je određen pomoću Folin-Ciocalteu metoda je 153.35 mg GAE.

5.6. Procena in vivo antioksidativne aktivnosti

Da bi se ispitao antioksidativni potencijal etarskog ulja ruzmarina i sposobnost sprečavanja patoloških promena na jetri pacova izloženih ugljen-tetrahloridu, u homogenatu jetre je meren nivo malondialdehida (MDA) i redukovano glutaciona (GSH), kao i aktivnost katalaze (CAT) i peroksidaze (Px), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR) i ksantin oksidaze (XOD), kao pokazatelja antioksidantnog i hepatoprotektivnog efekta EUR.

Tabela 26. Nivo LPx, GSH-Px, GSH, GR, Px, XOD i CAT u homogenatu jetre zdravih pacova nakon sedmodnevnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina i jednokratne primene ugljen tetrahlorida u grupama KON₇, KON₇+CCl₄, Eur5₇, Eur10₇, Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄ (m±Sd)

Grupe životinja	LPx	GSH-Px	GSH	GR	Px	XOD	CAT
KON ₇	2.84± 2.13	8.54 ± 0.23	1.71 ± 0.42	5.24 ± 0.82	10.46± 0.39	1.24± 0.18	9.41± 0.20
KON ₇ + CCl ₄	9.82 ± 0.74*	21.63± 1.09*	0.73± 0.13*	1.25± 0.10*	4.07± 0.49*	2.07± 0.15*	2.92± 0.53*
Eur5 ₇	4.26± 2.56 [#]	9.45 ± 0.71 [#]	1.04 ± 0.36*	3.02 ± 1.14 [#]	10.53± 0.84 [#]	1.23± 0.06 [#]	9.06± 0.28 [#]
Eur10 ₇	4.96 ± 1.78 [#]	7.37± 0.49 [#]	2.51 ± 0.74 [#]	3.63 ± 0.56 [#]	12.65± 0.97 [#]	1.21± 0.16 [#]	9.98± 0.74 [#]
Eur5 ₇ + CCl ₄	8.19± 0.92 ^{*#y}	16.78± 1.02 ^{*#y}	1.00± 0.24 ^{*#}	1.94± 0.29 ^{*#y}	6.73± 0.39 ^{*#y}	1.90± 0.09 ^{*#y}	4.62 ± 0.37 ^{*#y}
Eur10 ₇ + CCl ₄	6.69± 2.15 ^{*#}	8.24± 0.58 ^{*#x}	2.08 ± 1.12 [#]	1.54± 0.34 ^{*x}	9.92± 0.82 ^{*#x}	1.45± 0.12 ^{*#x}	8.10 ± 0.71 ^{*#x}

(*) statistički značajno različite vrednosti od KON grupe, $p < 0.05$;

(#) statistički značajno različite vrednosti od KON+CCl₄ grupe, $p < 0.05$;

(x) statistički značajno različite vrednosti od Eur10 grupe, $p < 0.05$;

(y) statistički značajno različite vrednosti od Eur5 grupe, $p < 0.05$.

LPx – Lipidna peroksidaza (nmol MDA/mg proteina),

GSH-Px – Glutation peroksidaza (nmol/mg proteina/min),

GSH – Glutation (nmolGSH/mg proteina),

GR – Glutation reduktaza (nmol/mg proteina/min),

Px – Peroksidaza (nmol/mg proteina/min),

XOD – Ksantin oksidaza (nmol/mg proteina/min),

CAT – Katalaza (nmol/mg proteina/min).

Intenzitet lipidne peroksidacije meren koncentracijom malondialdehida (MDA) statistički je značajno povišen u grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄, u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇. U grupama koje su pretretirane samim etarskim uljem ruzmarina, Eur5₇ i Eur10₇, nije došlo do statistički značajnog povećanja lipidne peroksidacije u odnosu

na kontrolnu grupu KON₇, iako se uočava porast koncentracije MDA. Lipidna peroksidacija u grupama Eur10₇+CCl₄ i Eur5₇+CCl₄, statistički je značajno niža u odnosu na grupu tretiranu samo ugljen tetrahloridom, KON₇+CCl₄. Statistički značajno niža koncentracija malondialdehida je izmerena i u grupama Eur5₇ i Eur10₇, u odnosu na istu grupu, KON₇+CCl₄. U grupi Eur5₇+CCl₄, u odnosu na grupu tretiranu samim etarskim uljem u dozi od 5 mg/kg (Eur5₇), lipidna peroksidacija je bila statistički značajno povećana.

U eksperimentalnoj grupi Eur5₇+CCl₄, kao i u grupama Eur5₇, Eur10₇ i KON₇+CCl₄, aktivnost GSH-Px je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolnu grupu KON₇. U grupi životinja pretretiranoj etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 mg/kg i ugljen tetrahloridom (Eur10₇+CCl₄), sprečen je porast aktivnosti enzima glutation peroksidaze i izmerena aktivnost je skoro identična aktivnosti ovog enzima u kontrolnoj grupi, pretretiranoj samo fiziološkim rastvotrom (KON₇) (8.54 ±0.23 vs 8.24±0.58, *p*<0.05). U isto vreme, aktivnost glutation peroksidaze je statistički značajno povećana u grupi KON₇+CCl₄ u odnosu na kontrolnu grupu KON₇.

Aktivnost GSH-Px je statistički značajno niža u eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄ u odnosu na grupu tretiranu ugljen tetrahloridom (KON₇+CCl₄). Aktivnost GSH-Px u grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄ je bila statistički značajno viša u odnosu na grupe-koje su primile samo etarsko ulje, Eur5₇ i Eur10₇.

Nivo glutationa je statistički značajno manji u grupama Eur5₇, Eur5₇+CCl₄ i KON₇+CCl₄ u odnosu na kontrolnu grupu KON₇, dok je nivo glutationa značajno povećan u grupama Eur10₇ i Eur10₇+CCl₄. U isto vreme vrednosti glutationa u grupama Eur10₇, Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄ u poređenju sa grupom, KON₇+CCl₄, su značajno više i dostižu statističku značajnost.

Aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) u svim eksperimentalnim grupama je statistički značajno niži od nivoa u kontrolnoj grupi, KON₇. U odnosu na grupu KON₇+CCl₄ aktivnost GR u eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄, kao i Eur5₇ i Eur10₇, je statistički značajno povećana. Aktivnost enzima u grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄, u odnosu na grupe tretirane sedam dana samo etarskim uljem ruzmarina, Eur5₇ i Eur10₇, značajno se smanjila.

Aktivnost enzima peroksidaze (Px) je u eksperimentalnoj grupi Eur5₇+CCl₄, kao i u grupi KON₇+CCl₄, statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇, dok je u odnosu na istu grupu, u grupi Eur10₇ aktivnost enzima peroksidaze statistički značajno veća.

Poređenjem aktivnosti enzima Px u kontrolnoj grupi KON₇+CCl₄, sa aktivnošću enzima u kontrolnim i eksperimentalnim grupama, uočava se statistički značajno povećanje aktivnosti Px u svim grupama. Aktivnost enzima u grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄, u odnosu na grupe Eur5₇ i Eur10₇, značajno je smanjena.

U eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄, u odnosu na kontrolnu grupu, KON₇, aktivnost ksantin oksidaze je statistički značajno povećana. Statistički značajno povećanje aktivnosti je uočeno i u grupi KON₇+CCl₄, dok je aktivnost ksantin oksidaze u grupama pretretiranim etarskim uljem ruzmarina u dozi od 5 i 10 mg/kg, Eur5₇ i Eur10₇, na nivou približnom aktivnosti enzima u kontrolnoj grupi. U odnosu na KON₇+CCl₄ grupu u svim eksperimentalnim grupama došlo je do reverzije aktivnosti enzima u statistički značajnoj meri.

Aktivnost enzima ksantin oksidaze u eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+CCl₄, u odnosu na grupe tretirane sedam dana samo EUR 5 i 10 mg/kg, značajno se povećala.

Aktivnost CAT je u svim eksperimentalnim grupama je statistički značajno povećana u odnosu na KON₇+CCl₄ grupu, dok je aktivnost enzima u poređenju sa kontrolnom grupom, KON₇, statistički značajno smanjena u svim grupama osim u grupi pretretiranoj samim etarskim uljem ruzmarina u dozi 10 mg/kg, Eur10₇. U ovoj grupi aktivnost CAT je povećana u odnosu na grupu KON₇, ali bez dostignute statističke značajnosti. Aktivnost enzima u eksperimentalnim grupama Eur5₇+CCl₄ i Eur10₇+ CCl₄, u odnosu na grupe tretirane sedam dana samo etarskim uljem ruzmarina u dozi od 5 i 10 mg/kg, Eur5₇ i Eur10₇, značajno je smanjena.

6. DISKUSIJA

6.1. *Hemijski sastav etarskog ulja*

Ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae) je višegodišnja biljka, poreklom iz Mediteranskog područja, koja se sada gaji širom sveta kao ukrasna i aromatična biljka. Listovi ruzmarina se obično koriste za začinjavanje hrane, kao dodatak jelima, ali isto tako, ova biljka se često primenjuje i u medicinske svrhe. U tradicionalnoj medicini, ruzmarin se primenjuje kao analgetik i smatra se jednom od najefikasnijih biljaka čiji se delovi koriste za lečenje glavobolje, loše cirkulacije, zapaljenskih procesa, zamora i mentalne slabosti. U narodnoj medicini, ruzmarin se empirijski koristi kao holeretik i hepatoprotektiv [90,91].

Prema preporukama Evropske Agencije za lekove (EMA), etarsko ulje ruzmarina se primenjuje u lečenju dispepsije i gastrointestinalnih poremećaja praćenih spazmima i kao pomoćna terapija u lečenju bolova u mišićima i zglobovima i poremećajima periferne cirkulacije [72]. U ispitivanjima etarskog ulja ruzmarina, pored antinociceptivnog i antiinflamatornog, dokazano je nekoliko drugih, značajnih farmakoloških efekata, kao što su antidepresivno delovanje i poboljšanje kognitivnih funkcija, antikancersko i DNK zaštitno delovanje [20,24,32]. Zbog izraženog antioksidativnog delovanja, danas se često sprovode ispitivanja vezana za potencijalno nova područja terapijske primene etarskog ulja ruzmarina [90].

Najzastupljeniji sastojci etarskog ulja ruzmarina su monoterpeni 1,8-cineol, kamfor i α -pinen. Na osnovu njihovog odnosa, određuje se hemotip etarskog ulja ruzmarina.

Evropska farmakopeja propisuje da se identifikacija ulja vrši pomoću gasne hromatografije, pri čemu je neophodno iz gasno hromatografskog profila odrediti minimalno 12 komponenti, a klasifikacija etarskog ulja ruzmarina se vrši na osnovu sadržaja najzastupljenijih komponenti u dva osnovna hemotipa. U Marokansko/Tunižanskom hemotipu ulja, odnos jedinjenja je sledeći: 1,8-cineol (38-55%), α -pinen (9-14%) i kamfor (5-15%); dok su u Francusko/Španskom hemotipu najzastupljeniji α -pinen (18-26%) i 1,8-cineol (16-25%), a potom kamfor (13-21%) [18]. Metodom gasno-masene hromatografije, u našem uzorku etarskog ulja ruzmarina je određen kvantitativni sastav, a najzastupljenije komponente su oksidovani monoterpeni 1,8-cineol (43.77%) i kamfor (12.53%) kao i monoterpenski ugljovodonik, α -pinen (11.51%). Na osnovu sadržaja najzastupljenijih komponenti, uzorak etarskog ulja ruzmarina korišćen u ovom ispitivanju pripada Marokansko/Tunižanskom hemotipu.

6.2. Analgetsko delovanje etarskog ulja ruzmarina i interakcija sa paracetamolom i kodeinom

Od kako je izolovan iz čaura maka (*Papaver somniferum* L.), 1832 godine, kodein se primenjivao kao analgetik, antitusik i lek za lečenje dijareje. Razmatrajući njegov analgetički efekat, kodein je prolek koji se reakcijama O-demetilacije citohromom CYP2D6 metaboliše u morfin, a N-demetilacijom u norkodein, pomoću izoenzima CYP3A4. Deo kodeina koji nije podlegao demetilaciji, kao i njegovi aktivni metaboliti, morfin i norkodein, potom podležu glukuronidaciji i u obliku neaktivnih glukuronida se izlučuju bubrezima. Analgetičko delovanje morfina je najvećim delom posledica agonističkog delovanja morfina na μ -opioidnim receptorima [92]. Genetski polimorfizam CYP2D6 može značajno uticati na terapijske efekte kodeina. Smanjena aktivnost citohroma 2D6 ima za posledicu izostanak analgetičkog efekta kodeina, dok se kod ljudi sa pojačanom aktivnošću ovog izoenzima povećava rizik ispoljavanja opioidnih neželjenih delovanja pri upotrebi uobičajenih terapijskih doza kodeina [93].

Drugi analgetik, čija interakcija sa etarskim uljem ruzmarina je ispitivana u našoj studiji je paracetamol, efikasan analgetik u lečenju akutnog i hroničnog bola. Za razliku od drugih analgo-antipiretika, paracetamol ne poseduje značajnije antiinflamatorno delovanje. Svoja farmakodinamska delovanja ostvaruje prvenstveno centralnim mehanizmima (inhibicijom ciklooksigenaze u hipotalamusu) [94,95]. Noviji literaturni podaci ukazuju da je analgetičko delovanje paracetamola posledica njegovog efekta i na kanabinoidni sistem, vezujući se za kanabinoidne CB₁ receptore. Kada se primenjuje u terapijskim dozama, najveći deo leka se konjuguje sa glukuronskom kiselinom i u manjem obimu sa sulfatima i cisteinom. Oko 5 do 15% unetog paracetamola se oksidiše izoenzimima citohroma CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 i CYP2A6 pri čemu nastaje visoko reaktivan i hepatotoksičan metabolit, N-acetil-p-benzohinonimin (NAPQI), koji se potom brzo konjuguje sa glutationom i formira netoksične konjugate sa cisteinom i merkaptopurnom kiselinom [96]. Povećanje aktivnosti mikrozomalnih enzima može potencirati hepatotoksičnost paracetamola i zato potencijal stupanja u interakcije između biljnih lekova i ovog leka mora biti pažljivo razmotren.

Ispitivanjem analgetskog efekta etarskog ulja ruzmarina metodom vrele ploče, sedmodnevna primena etarskog ulja ruzmarina miševima u dozi od 20 mg/kg, ispoljila je značajno analgetsko delovanje; što je pokazano i u prethodnim ispitivanjima u kojima je analgetsko dejstvo etarskog ulja ruzmarina potvrđeno različitim nociceptivnim eksperimentalnim modelima. Primena etarskog ulja ruzmarina je inhibisala nastanak edema

šapa pacova izazvanog karagenom i pri tome ispoljila dozno zavisno analgetičko delovanje, značajno je smanjila broj grčeva miševa koji su intraperitonealno primili rastvor sirćetne kiseline i inhibisala je ranu, neurogenu i kasnu, inflamatornu fazu bola tokom formalinskog testa, što sve potvrđuje izražen antinociceptivni i antiinflamatorni efekat etarskog ulja ruzmarina [25]. Pored toga, etarsko ulje ruzmarina je ispoljilo dozno zavisan antinociceptivni efekat na modelu bolom izazvanog funkcionalnog oštećenja kod pacova (PIFIR model) [96]. Pored etarskog ulja, literaturni navodi potvrđuju i analgetičko delovanje različitih monoterpena, koji čine više od 90% etarskog ulja ruzmarina [30], kao i etanolnog ekstrakta ruzmarina [98], u kome se u najvećem procentu nalazi karnozol [99] i triterpena izdvojenih iz ekstrakta ruzmarina [100]. Gasno masenom hromatografijom uzorka etarskog ulja ruzmarina korišćenog u ovom ispitivanju, nije utvrđeno postojanje karnozola i triterpena, tako da se dobijeni rezultati analgetskog delovanja mogu objasniti činjenicom da su u primenjenom uzorku etarskog ulja ruzmarina monoterpeni (monoterpenski ugljovodonici i oksidovani monoterpeni), koji su činili više od 90% etarskog ulja, nosioci antinociceptivnog delovanja.

Ispoljen analgetski efekat etarskog ulja ruzmarina tokom testa vrele ploče, ukazuje na centralni mehanizam analgezije, jer su lizanje zadnjih šapa i njihovo karakteristično podizanje sa vrele ploče refleksni pokreti integrisani u višim sferama mozga, kao odgovor na toplotnu draž [101]. Rezultati istraživanja drugih autora ukazuju da su serotoninergički i opioidni endogeni sistemi takođe uključeni u mehanizam antinociceptivnog delovanja etarskog ulja izolovanog iz ruzmarina [97]. Takođe, GABA-ergički sistem bi mogao biti sledeći mehanizam kojim se ostvaruju farmakološki efekti etarskog ulja ruzmarina [98].

Analgetsko delovanje monoterpena je dokazano u nekoliko studija u kojima su različiti nociceptivni *in vivo* modeli [102]. Prema rezultatima ovih studija, sva tri glavna konstituenta etarskog ulja ruzmarina koji je korišćen u našoj studiji (1,8-cineol, kamfor i α -pinen) su ispoljili analgetičko delovanje u testu grčenja miševa izazvanim sirćetnom kiselinom [26]. Tačan mehanizam antinociceptivnog delovanja monoterpena je još uvek nejasan u potpunosti, ali se pretpostavlja da je posledica delovanja na tzv. TRP jonske kanale, koji neselektivno propuštaju katjone kalcijuma, magnezijuma i natrijuma i čijom blokadom se postiže analgetički efekat. Delovanje na ove kanale je potvrđeno za kamfor [27]. Pretpostavlja se da aciklični monoterpeni (mircen i linalol) primarno moduliraju aktivnost opioidnog sistema, dok monociklični i biciklični monoterpeni (prisutni u najvećem procentu u uzorku korišćenom u našem ispitivanju) analgetičko delovanje ostvaruju perifernim mehanizmima [30]. Izraženo analgetičko i antiinflamatorno delovanje 1,8-cineola, kao jedne

od dominantnih komponenti etarskog ulja ruzmarina, ostvaruje se inhibicijom ciklooksigenaze i sprečavanjem oslobađanja citokina, interleukina IL-1 β i faktora tumorske nekroze (TNF α) [103].

Rezultati naše studije su pokazali da sedmodnevna primena etarskog ulja ruzmarina u dozi od 20 mg/kg, ispoljava analgetsko delovanje koje je jače u odnosu na paracetamol, a slabije u poređenju sa kodeinom. Pored analgetičkog delovanja, etarsko ulje ruzmarina utiče i na aktivnost mikrozomalnih enzima, a time i na biotransformaciju lekova sa kojima se istovremeno primenjuje. Etarsko ulje ruzmarina bogato 1,8-cineolom indukuje aktivnost mikrozomalnih enzima, posebno citohroma CYP2B1, 3A2, 2E1, 1A2 i UDP-glukuroniltransferaze, zbog čega može stupiti u interakciju sa kodeinom i paracetamolom [42,68,104,105].

Etarsko ulje ruzmarina je u kombinaciji sa kodeinom i paracetamolom ispoljilo različit efekat u zavisnosti od doze u kojoj je primenjeno. Etarsko ulje ruzmarina primenjeno u dozi od 20 mg/kg, tokom sedam dana, pokazalo je značajno veći uticaj na farmakodinamske osobine i kodeina i paracetamola u odnosu na dozu od 10 mg/kg. Analgetsko delovanje oba leka je značajno pojačano. Dobijeni rezultati ukazuju da je doza ta koja određuje da li će etarsko ulje ruzmarina prvenstveno uticati na aktivnost mikrozomalnih enzima ili će ispoljiti analgetički efekat i delovati sinergistički sa primenjenim antinociceptivnim lekovima. Ipak, rezultati drugih autora ukazuju na dozno nezavisan antinociceptivni efekat monoterpena, zbog čega je za ispoljavanje efikasnog analgetskog delovanja etarskog ulja ruzmarina neophodno odrediti raspon doza u kojima se primenjuje [106]. Uzimajući u obzir nelinearni odnos doze i analgetskog efekta monoterpena, kao i potencijal stupanja u značajne interakcije sa analgeticima sa kojima se istovremeno primenjuje, neophodno je utvrditi u kojoj dozi etarsko ulje ruzmarina može poboljšati farmakodinamski odgovor analgetika, a da pri tome ne dođe do neželjenih reakcija usled interakcije.

S obzirom da u literaturi postoje podaci o značajnim farmakološkim efektima jednokratnog pretretmana etarskim uljem ruzmarina [46], u našem ispitivanju, pored sedmodnevnog, ispitan je i uticaj jedne doze EUR na farmakodinamske osobine kodeina i paracetamola. Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da nema značajnije promene analgetskog delovanja kodeina i paracetamola kod miševa jednokratno pretretiranih etarskim uljem ruzmarina.

U ovom ispitivanju, analgetsko delovanje etarskog ulja ruzmarina je potvrđeno i u modelu izazivanja bolnog nadražaja intraperitonealnom primenom sirćetne kiseline. Pri tome, sedmodnevna primena obe doze etarskog ulja je značajno smanjila broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom. Sirćetna kiselina dovodi do oslobađanja medijatora zapaljenja, faktora tumorske nekroze (TNF- α), interleukina 1 β i IL-8 iz makrofagnih ćelija peritoneuma i time izaziva bolni nadražaj eksperimentalnih životinja [107]. Komponente etarskog ulja ruzmarina posle intraperitonealne primene sirćetne kiseline ispoljavaju analgetski i antiinflamatorni efekat sprečavajući sintezu i oslobađanje citokina, inhibišući aktivnost enzima ciklooksigenaze [103]. U ispitivanjima sprovedenim na istom eksperimentalnom modelu od strane drugih autora, potvrđeno je da je analgetsko delovanje ekstrakta ruzmarina uporedivo sa antinociceptivnim delovanjem ketorolaka, heterocikličnog derivata sirćetne kiseline [100]. Pored toga, za sve tri najzastupljenije komponente u uzorku etarskog ulja korišćenog u našoj studiji (1,8-cineol, kamfor i α -pinen) je utvrđeno postojanje značajnog analgetskog efekta u testu sa sirćetnom kiselinom [26,32].

Za razliku od višekratne primene etarskog ulja ruzmarina koja je značajno smanjila broj grčeva nakon intraperitonealne primene sirćetne kiseline, jednokratni pretretman je doveo do pojave hiperalgezije, tj. broj grčeva je bio značajno veći kod grupa životinja koje su jednokratno pretretirane etarskim uljem u odnosu na kontrolu. U literaturi nisu pronađeni podaci o hiperalgeziji izazvanoj jednokratnom primenom etarskog ulja ruzmarina. Prema podacima dobijenim u studijama drugih autora, jednokratni pretretman etanolnim ekstraktom ruzmarina je ispoljio izraženo antinociceptivno delovanje procenjeno „writhing“ testom [100], ali su dominantne komponente korišćenog ekstrakta bili triterpeni, koji nisu bili prisutni u našem uzorku etarskog ulja ruzmarina.

6.3. Uticaj etarskog ulja ruzmarina na farmakokinetiku paracetamola

S obzirom da je u radu dokazan značajan uticaj etarskog ulja ruzmarina na farmakodinamske osobine paracetamola, tj. analgetičko delovanje paracetamola je značajno povećano posle pretretmana etarskim uljem ruzmarina, u drugom delu studije je ispitan uticaj etarskog ulja na farmakokinetičke osobine ovog leka.

Kod čoveka, biološka raspoloživost per os preparata paracetamola je 80 i više procenata, zavisno od farmaceutskog oblika u kome se lek primenjuje [108]. Imajući u vidu

da je biološka raspoloživost procenat doze oralno primenjenog leka koji dospe u sistemsku cirkulaciju, na njene vrednosti utiče intestinalna resorpcija leka, aktivnost tzv. „efluksnih“ transportera prisutnih u sluznici intestinalnog trakta, biotransformacija leka u samom intestinalnom traktu koja može biti pod uticajem enzima sluznice ili bakterijske mikroflore i metabolizam pri prvom prolasku leka u jetri. Svi pobrajani faktori su razlog značajnih interindividualnih razlika bioraspoloživosti, ali i mogućnosti uticaja hrane, lekova i spoljašnjih faktora na biološku raspoloživost leka [109].

Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da su površine ispod krive koncentracije paracetamola u serumu pacova (AUC) više od tri puta niže kod per os, u poređenju sa intravenskom primenom ovog leka tj. da je biološka raspoloživost paracetamola kod pacova soja Wistar značajno niža u poređenju sa oralnom biološkom raspoloživosti paracetamola kod ljudi. Dobijeni rezultati bi se mogli objasniti različitom aktivnosti humanih u odnosu na mikrozomalne enzime pacova, uključene u biotransformaciju paracetamola [110].

Biološka raspoloživost paracetamola kod grupa pacova prethodno pretretiranih etarskim uljem ruzmarina je niža u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati bi mogli biti posledica uticaja etarskog ulja ruzmarina na procenat resorpcije paracetamola i na pojačanje presistemskog metabolizam leka u neaktivne metabolite. Prema literaturnim podacima [111], paracetamol je supstrat P-glikoproteina, a ekstrakt ruzmarina značajno utiče na aktivnost ovog transportnog proteina [65]. Smanjenje biološke raspoloživosti paracetamola nakon pretretmana etarskim uljem ruzmarina se može objasniti i uticajem monoterpena 1,8-cineola, jednog od najzasupljenijih aktivnih principa u korišćenom preparatu u našoj studiji, na aktivnost mikrozomalnih enzima, sulfotransferaze, UDP-glukuronil transferaze i citohroma CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, uključenih u biotransformaciju paracetamola [30,72,112,113]. Ipak, smanjenje bioraspoloživosti paracetamola nakon pretretmana etarskim uljem ruzmarina u odnosu na kontrolnu grupu je svega 2% i ne može se smatrati značajnom.

Zanimljivo je da se vrednosti maksimalnih koncentracija paracetamola u serumu pacova razlikuju između sojeva iste vrste. Tako su u našem ispitivanju, nakon oralne primene ovog leka kod pacova soja Wistar, vrednost maksimalne koncentracije (c_{max}) i površine ispod krive (AUC_{0-t}) značajno niže u poređenju sa vrednostima ovih parametra kod Sprague-Dawley soja [114].

U našem ispitivanju, vrednosti farmakokinetičkih parametara koji opisuju izlučivanje leka, (poluvreme eliminacije, konstanta eliminacije, klirens leka i srednje retenciono vreme) posle intravenske primene paracetamola, ukazuju na ubrzanje eliminacije paracetamola kod grupa pacova prethodno pretretiranih etarskim uljem ruzmarina u poređenju sa kontrolnom grupom. Iako statistička značajnost nije postignuta, može se pretpostaviti da pretretman etarskim uljem ruzmarina ubrzava metabolički klirens paracetamola i tako ubrzava eliminaciju leka iz centralnog kompartmana. U prilog ovoj pretpostavci idu i vrednosti površine ispod krive (AUC_{0-t}) i "nultih" koncentracija (c_0), koje su značajno niže kod grupa pretretiranih etarskim uljem u odnosu na kontrolu.

Kod per os primene paracetamola, u ovom ispitivanju, vrednosti površine ispod krive, kao i maksimalne koncentracije paracetamola posle primene etarskog ulja ruzmarina su bile niže u odnosu na kontrolnu grupu, dok se parametri koji opisuju eliminaciju nisu značajnije razlikovali u odnosu na kontrolu. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da je smanjenje koncentracije paracetamola u grupama pacova pretretiranih etarskim uljem posledica interakcije na nivou enzima koji učestvuju u biotransformaciji paracetamola, što je u skladu sa literaturnim podacima po kojima etarsko ulje ruzmarina poseduje značajan potencijal za promenu aktivnosti mikrozomalnih enzima [30,72,112,113].

U našim prethodnim ispitivanjima uticaja biljnih preparata na farmakokinetičke parametre paracetamola, višekratni pretretman kantaronom je statistički značajno pojačao eliminaciju paracetamola iz seruma Swiss albino miševa i slično kao i u ovoj studiji, smanjio koncentracije leka u serumu [115].

Na osnovu svega proizilazi da biljni lekovi, stupanjem pre svega u metaboličke i farmakodinamske interakcije sa klasičnim lekovima, mogu značajno menjati njihove farmakološke osobine ali i bezbednost primene u humanoj populaciji.

6.4. Interakcija etarskog ulja ruzmarina sa diazepamom i pentobarbitalom

Etarsko ulje ruzmarina ispoljava uticaj na funkciju centralnog nervnog sistema što je potvrđeno kako u pretkliničkim, tako i u kliničkim studijama. Stimulišući transmisiju dopamina, serotonina i noradrenalina, izaziva psihostimulatorni i antidepresivni efekat [103,116,117]. Inhalacija etarskog ulja poboljšava raspoloženje i kognitivne funkcije zdravih, odraslih dobrovoljaca [24]. Pomenuta svojstva etarskog ulja ruzmarina su posledica

delovanja monoterpena kamfora, α -pinena i 1,8-cineola, koji oslobađaju monoamine iz vezikula neurona u centralnom nervnom sistemu [116,117].

U studiji Alnamera i saradnika [117], mereno je indukciono vreme i vreme spavanja izazvano tiopentalom (barbiturat ultrakratkog delovanja). Studija je pokazala statistički značajno produženje indukcionog vremena, a skraćenje trajanja spavanja miševa koji su per os višekratno tretirani različitim dozama etarskog ulja ruzmarina.

Cilj našeg ispitivanja je bio da se ispita interakcija etarskog ulja ruzmarina sa lekovima koji depresivno delovanje na centralni nervni sistem ispoljavaju prvenstveno potenciranjem transmisije gama-amino buterne kiseline (GABA), benzodiazepinima i barbituratima [118]. Poznato je da barbiturati pored delovanja na GABA receptore, svoje farmakološke efekte ostvaruju i antagonizovanjem ekscitatornih efekata glutamata [119].

S obzirom na visoku upotrebu benzodiazepina u Srbiji [120], kako u bolničkim, tako i u vanbolničkim uslovima, u radu smo se opredelili za ispitivanje interakcije diazepama, čija je upotreba i zloupotreba visoka u našoj sredini, sa etarskim uljem ruzmarina. Iako primenjen u terapijskim dozama i za odgovarajuće indikacije, diazepam izaziva predvidiva, poznata neželjena delovanja, još uvek je nepoznata njegova bezbednost kada se istovremeno primenjuje sa biljnim preparatima koji mogu uticati na farmakološke osobine ovog leka.

Diazepam podleže oksidativnom metabolizmu putem demetilacije posredovane citohromima 2C9, 2C19, 2B6 i 3A4 i hidrosilacije posredovane citohromima 3A4 i 2C19 u farmakološki aktivne metabolite, desmetildiazepam, temazepam i oksazepam, koji se nakon glukuronidacije u obliku neaktivnih glukurokonjugata izlučuju bubrezima [113,122].

Slično rezultatima do kojih su došli Alnamer i saradnici [117], i u našem ispitivanju, višekratna primena obe doze etarskog ulja, 10 i 20 mg/kg, sprečila je poremećaj motorne koordinacije miševa izazvan diazepamom, procenjivan metodom rotirajućeg štapa. Pri tome, etarsko ulje u dozi od 10 mg/kg u većoj meri umanjuje farmakološke osobine diazepama u odnosu na dozu od 20 mg/kg.

Smanjenje efekta diazepama posle višekratne primene etarskog ulja ruzmarina, može se objasniti indukcijom aktivnosti glukuronil-transferaze, čijim delovanjem se diazepam metaboliše u neaktivne metabolite, što je pokazano i u studijama sprovednim od strane drugih autora [122]. U jednokratnom tretmanu etarsko ulje ruzmarina nije ispoljilo značajan uticaj na efekte diazepama.

Drugi lek koji svoje farmakološke osobine ostvaruje delovanjem na GABA receptore, čija interakcija sa etarskim uljem ruzmarina je ispitivana u našem istraživanju je pentobarbital, barbiturat kratkog delovanja, koji se danas ne primenjuje u farmakoterapiji s obzirom da se kao lekovi prvog izbora u lečenju nesаницe koriste nebarbituratni hipnotici [123]. Ipak, pentobarbital je značajan u eksperimentalnoj farmakologiji, za izvođenje testa vremena trajanja spavanja („sleeping time test“). Ksenobiotici sa kojima se pentobarbital primenjuje istovremeno mogu značajno uticati na aktivnost mikrozomalnih enzima i tako menjati osobine ovog leka, što se u pomenutom testu odražava na vrednosti indukcionog vremena kao i na trajanje spavanja [78].

Pentobarbital se gotovo u potpunosti metaboliše reakcijama hidrosilacije, koje se odvijaju izoenzimima citohroma CYP2B6 i CYP2D6 i pri čemu nastaju neaktivni metaboliti ovog leka [124].

U našem ispitivanju, obe doze etarskog ulja ruzmarina, 10 mg/kg i 20 mg/kg, primenjene tokom sedam dana, produžile su indukciono vreme, a skratile vreme trajanja spavanja, izazvanog pentobarbitalom, pri čemu je efekat doze od 10 mg/kg bio izraženiji u odnosu na dozu od 20 mg/kg. Kao što je već pomenuto ranije, ekscitatorni efekti etarskog ulja na centralni nervni sistem mogu biti razlog dobijenih rezultata. Isto tako, s obzirom da komponente etarskog ulja 1,8-cineol, α -pinen i kadinen, značajno indukuju aktivnost citohroma uključenih u hidrosilaciju pentobarbitala (CYP2B6 i CYP2D6) pri čemu nastaju neaktivni metaboliti, ne može se isključiti da je smanjenje farmakodinamskog efekta ovog leka bar jednim delom posledica farmakokinetičke interakcije pentobarbitala i etarskog ulja ruzmarina [42].

Jednokratni pretretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 20 mg/kg značajno je produžio trajanje spavanja u odnosu na kontrolnu grupu. Različiti efekti jednokratne i višekratne primene etarskog ulja ruzmarina na hipnotičko dejstvo pentobarbitala se objašnjavaju činjenicom da je za postizanje indukcije mikrozomalnih enzima potrebno značajno duže vremena u odnosu na inhibiciju [125]. Rezultati pojedinih studija ukazuju na uticaj dužine tretmana na procese biotransformacije lekova, odnosno, da akutna primena ksenobiotika izaziva inhibiciju, dok hroničan tretman istom supstancom izaziva indukciju mikrozomalnih enzima [126,127]. Zbog toga se može pretpostaviti da je jednokratna primena etarskog ulja ruzmarina inhibisala aktivnost citohroma kojima se pentobarbital metaboliše i usled toga potencirala njegovo farmakološko delovanje.

6.5. Antioksidativna aktivnost i hepatoprotektivno delovanje etarskog ulja ruzmarina

Jetra je organ koji ima centralnu ulogu u metabolizmu i detoksikaciji ksenobiotika. Metaboličke transformacije toksičnih materija putem jetrenih enzima, citohroma P-450, zahtevaju prisustvo molekuskog kiseonika. Od ukupne količine kiseonika u ćeliji, jedan mali deo (2-3%) se uobičajeno transformiše u reaktivne oblike, kao što su hidrosil radikal, superoksid anjon i vodonik peroksid. Ove aktivne forme kiseonika, u stanju su da reaguju sa osnovnim sastojcima ćelije i izazovu promenu njihove strukture i funkcije [128]. Da bi se zaštitila i održala homeostaza, živi organizmi su razvili endogenu antioksidativnu zaštitu u vidu enzimskih i neenzimskih sistema, koji neutrališu stvorene reaktivne kiseonične vrste i sprečavaju ulazak u stanje oksidativnog stresa. Oksidativni stres se može definisati kao ćelijsko oštećenje prouzrokovano reaktivnim radikalima, a proizilazi iz poremećene ravnoteže prooksidantnih i antioksidativnih činilaca. Brojne studije pokazuju da su upravo oštećenja nastala usled oksidativnog stresa od prvorazrednog značaja za razvoj patofizioloških promena koje su u osnovi različitih jetrenih oboljenja: nekrotičnog inflamatornog hepatitisa, ciroze jetre, hepatocelularnog karcinoma [34,35].

Hepatoprotektivni efekti biljke ruzmarina su ispitivani na različitim eksperimentalnim modelima hemijski-indukovane hepatotoksičnosti. Metanolni ekstrakt ruzmarina se pokazao kao efikasna preventiva hepatotoksičnosti izazvanoj ugljen-tetrahloridom [129], a vodeni ekstrakt ruzmarina je pokazao zaštitni efekat kod hepatotoksičnosti nakon primene azatioprina kod pacova [38]. Prema našim saznanjima, međutim, hepatoprotektivni potencijal izolovanog etarskog ulja ruzmarina do sada nije testiran na *in vivo* modelima.

6.5.1. Biohemijski parametri u serumu pacova

U našoj studiji pretretman etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 mg/kg ispoljio je hepatoprotektivni efekat, smanjenjem aktivnosti i alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze, u odnosu na grupu životinja tretiranu samo ugljen-tetrahloridom. Slično, u studijama Sotelo-Felix-a i saradnika [129], i Gutiérrez-a i saradnika [37], metanolni ekstrakt ruzmarina u dozi od 200 mg/kg, normalizovao je aktivnost alanin transaminaze u serumu u dva eksperimentalna modela: u slučaju ugljen-tetrahlorid-indukovane hepatotoksičnosti i indukovane akutne ciroze jetre [129,37].

Tretman životinja ugljen-tetrahloridom dovodi do statistički značajnog porasta nivoa ukupnog, kao i direktnog bilirubina u serumu, što ukazuje na oštećenu ekskretornu funkciju jetre. Ovaj poremećaj je izostao kod grupa koje su pre ugljen-tetrahlorida pretretirane etarskim uljem ruzmarina. Takođe, vrednosti ukupnog bilirubina kod životinja pretretiranih samim etarskim uljem ruzmarina su bile identične vrednostima kontrolne grupe. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora, po kojima je vodeni ekstrakt ruzmarina ispoljio značajno hepatoprotektivno delovanje, ispitivano na pacovima sa streptozotocin izazvanim dijabetesom [130].

Određivanjem koncentracije holesterola i triglicerida u serumu pacova, procenjivan je uticaj etarskog ulja ruzmarina na metaboličku funkciju jetre. U našem ispitivanju, ugljen-tetrahlorid je doveo do blagog pada nivoa triglicerida i holesterola, a njihove koncentracije su povećane kod grupa pacova koje su pre ugljen-tetrahlorida tretirane etarskim uljem ruzmarina. Sedmodnevna primena samog etarskog ulja nije značajnije uticala na koncentraciju lipida u serumu pacova. U ispitivanju sprovedenom na pacijentima obolelim od bronhijalne astme sa povišenim koncentracijama lipida u krvi i poremećajem odnosa pojedinih frakcija holesterola, etarska ulja bogata α - i β -pinenom i kamforom, značajno popravljaju antioksidantni i lipidni status ispitanika [131].

Serumska koncentracija uree, kreatinina i mokraćne kiseline kao biomarkera bubrežne funkcije, takođe su ispitivane u našoj studiji. Ovi biohemijski parametri su povećani u grupi tretiranoj ugljen-tetrahloridom i ukazuju na njegovu nefrotoksičnost, ali je višekratna primena etarskog ulja ruzmarina sprečila porast njihove koncentracije. Normalizaciju vrednosti ovih parametara izaziva doza od 10 mg/kg etarskog ulja ruzmarina, pri čemu pad nivoa uree i kreatinina dostiže visoku statističku značajnost. Ovakvi rezultati sugerišu sposobnost etarskog ulja ruzmarina da oporavi oštećenu bubrežnu ekskretornu funkciju i u skladu su sa rezultatima koje su dobili u svojoj studiji Sakr i Lamfon [132], gde je vodeni ekstrakt ruzmarina smanjio koncentraciju uree i kreatinina u serumu pacova, u poređenju sa grupom životinja tretiranom ugljen-tetrahloridom.

6.5.2. *In vitro antioksidativna aktivnost i ukupni sadržaj fenola*

In vitro ispitivanjem utvrđen je relativno visok antioksidativni kapacitet etarskog ulja, sa vrednošću inhibitorne koncentracije IC_{50} od 77,6 μ l/ml. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa prethodno objavljenim studijama o antioksidativnoj aktivnosti etarskih ulja bliskih

po hemijskom sastavu i hemotipu onom koji je testiran u našoj studiji [133]. Takođe, procenjeni sadržaj ukupnih fenola u etarskom ulju Folin-Ciocalteu metodom, sličan je rezultatima do kojih su došli drugi autori [133].

6.5.3. Parametri antioksidativne aktivnosti etarskog ulja ruzmarina ispitivane in vivo na pacovima nakon primene ugljentetrahlorida

S obzirom da je poznat mehanizam kojim slobodni radikali dovode do razvoja oksidativnog stresa i posledično različitih oboljenja jetre, opredelili smo se za eksperimentalni model ugljen-tetrahloridom indukovane hepatotoksičnosti. Ovo jedinjenje se metaboliše u jetri dehalogenovanjem koje je praćeno oksidacijom, pod dejstvom cithroma P-450. U toku metabolisanja dolazi do formiranja CCl_3^{\bullet} i Cl_3COO^{\bullet} radikala, koji dovode do lipidne peroksidacije membrane hepatocita. Malondialdehid (MDA) je jedan od najvažnijih sekundarnih proizvoda peroksidacije lipida, te se zato određuje kao pokazatelj oksidativnog oštećenja hepatocita [37,129]. Etarsko ulje ruzmarina primenjeno pre ugljen-tetrahlorida preveniralo je porast malondialdehida u homogenatu jetre, odnosno, ispoljilo je značajnu sposobnost očuvanja ćelijskog integriteta hepatocita. Ovaj efekat inhibicije lipidne peroksidacije je najverovatnije posledica visokog kapaciteta hvatanja slobodnih radikala, tj. „scavenger“ aktivnosti komponenata etarskog ulja, koja je potvrđena DPPH testom, kao i *in vitro* studijama sprovedenim od strane drugih autora [134].

Oštećenje jetre počinje oksidativnim stresom, a to je ujedno i tačka kada se može sprečiti dalja progresija njenog oštećenja. Jetru od oštećenja brani čitav sistem antioksidativne zaštite. Glutation je glavni neenzimski endogeni antioksidans u hepatocitima. Antioksidativni enzimi peroksidaza, glutacion peroksidaza i katalaza katalizuju redukciju potencijalno opasnih peroksida u vodu ili alkohol. Redukcijom peroksida nastaje disulfidni oblik glutaciona (GS-SG), a njega enzim glutacion reduktaza (GR) ponovo redukuje u sulfhidrilnu formu (GSH). Enzim ksantin oksidaza (XOD) deluje prooksidativno. Ona transformiše hipoksantin u ksantin, odnosno ksantin u mokraćnu kiselinu, formirajući pritom reaktivne kiseonične vrste (ROS), superoksid-anjon radikal i vodonik-peroksid [35].

Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da ugljen-tetrahlorid troši redukovani glutacion. Glutation je kofaktor antioksidativnih enzima u jetri, ali je poznato da može i direktno da reaguje sa reaktivnim kiseoničnim vrstama, pa se troši i inhibišući radikale koji nastaju u toku metabolizma ugljen-tetrahlorida u jetri. Takođe, u našem ispitivanju, pored redukovaog glutaciona, došlo je i do statistički značajnog smanjenja aktivnosti katalaze, peroksidaze i

glutation reduktaze. Razlog smanjene aktivnosti ovih enzima je njihova inaktivacija zbog prekomernog stvaranja reaktivnih kiseoničnih radikala, koja daleko prevazilazi antioksidativni kapacitet enzima. Zanimljivo je da rezultati pokazuju istovremeno statistički značajno povećanje aktivnosti antioksidativnog enzima glutacion peroksidaze nakon primene ugljen-tetrahlorida. To se može objasniti pozitivnom regulacijom (povećanom sintezom) enzima, kao adaptivnog odgovora hepatocita na oksidativno oštećenje. Ukupno posmatrano, biohemijski pokazatelji oksidativnog stresa u jetri su u značajnoj meri normalizovani nakon pretretmana etarskim uljem ruzmarina u dozi od 10 mg/kg. Ovakvi rezultati su potvrda da ispitivano etarsko ulje poseduje potencijal sprečavanja oštećenja hepatocita slobodnim kiseoničnim vrstama i prooksidativnim radikalima.

Hepatoprotektivna aktivnost ispitivanog uzorka etarskog ulja izolovanog iz ruzmarina može se pripisati 1,8-cineolu, kao njegovoj najzastupljenijoj komponenti. U modelu septičnog šoka *in vivo*, indukovano D-galaktozamin lipopolisaharidom, na miševima, koji se karakteriše početkom apoptoze, a kasnije lizom hepatocita; 1,8-cineol je u poređenju sa deksametazonom u značajno većoj meri doveo do smanjenja porasta mase jetre, smanjio aktivnost transaminaza u serumu i sprečio nekrozu i hemoragiju jetrenog parenhima. Hepatoprotektivni efekat etarskog ulja ruzmarina je praćen smanjenjem serumske koncentracije faktora tumorske nekroze α (TNF- α) [135].

Rezultati drugih studija su pokazali da su kod pacova tretiranih zagađivačem životne sredine 2,3,7,8-tetrahlorodibenzo-p-dioksinom (TCDD) tokom 30 dana, aktivnost antioksidantnih enzima glutacion peroksidaze (GSH-Px) i katalaze (CAT) i nivo redukovanog glutationa (GSH) u jetri značajno smanjeni, a koncentracija malondialdehida (MDA) značajno povišena u odnosu na netretiranu grupu. Kada se primenjuje zajedno sa TCDD, 1,8-cineol značajno povećava aktivnost GSH-Px, CAT i nivo GSH, uz smanjenje koncentracije MDA skoro do nivoa kontrolne grupe, sugerišući aktiviranje antioksidantnih sistema odbrane kao jedan od hepatoprotektivnih mehanizama pokrenutih 1,8-cineolom [136].

Slično tome, utvrđeno je da tretman kolona 1,8-cineolom poboljšava oksidativnu ravnotežu kod pacova sa TNBS-indukovanim kolitisom, jer je u stanju da smanji aktivnost mijeloperoksidaza koje su markeri akumulacije polimorfonuklearnih leukocita i može da uravnoteži nivo GSH u ćelijama [135].

U *in vitro* studiji koju su sprovedi Berreta i sar [134], potvrđeno je da etarsko ulje ruzmarina pokazuje različitu aktivnost neutralisanja reaktivnih kiseoničnih grupa, u zavisnosti od hemijskog sastava i sadržaja pojedinih monoterpena. Na eksperimentalnom

modelu ćelijske membrane utvrđeno je da linalol, terpinen-4-ol (u našem uzorku zastupljeni 0,46% i 0,56%), orjentišu svoje polarne grupe, prema vodenim slojevima membrane iz kojih dolaze radikali OH^\bullet , koje monoterpeni heliraju. Takođe je utvrđeno da 1,8-cineol i borneol (u našem uzorku zastupljeni 43,77% i 2,97%), svoje polarne grupe postavljaju tako da su okrenute prema polarnim delovima lipidnog dvosloja, i tako lakše mogu da neutrališu lipidne peroksil radikale ROO^\bullet i RO^\bullet . Na taj način ove komponente mogu sinergistički dovesti do efikasnog neutralisanja reaktivnih kiseoničnih grupa različitog porekla [134].

Ovakvi nalazi podržavaju rezultate našeg ispitivanja gde je etarsko ulje ruzmarina sprečilo lipidnu peroksidaciju izazvanu primenom ugljen-tetrahlorida.

Jedini ispitivani monoterpen [134], koji nije imao stabilnu poziciju u membrani već se ona menjala tokom trajanja eksperimenta je bio kamfor, koji nije ispoljio antioksidativni efekat. Ovakvi rezultati sugerišu da njegovo kretanje kroz membranu izaziva nestabilnost membranske strukture, koja za posledicu može imati pojačanu ekscitativnost membrane. Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima studija koje navode kamfor kao uzrok pojačane ekscitativnosti membrane neurona [76, 137].

Manje zastupljene komponente u etarskom ulju ruzmarina mogu biti važne za ispoljavanje efekata našeg uzorka etarskog ulja ruzmarina na jetru, tako da rezultati ispitivanja, koje su sprovedi Baratta i sar [134], mogu pomoći u razjašnjavanju mehanizama delovanja i pojedinih komponenti etarskog ulja ruzmarina, ali i ulja u celini.

Etarsko ulje ruzmarina svoje hepatoprotektivne efekte ostvaruje ne samo sposobnošću neutralisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta („scavenger activity“), već i aktivacijom fizioloških odbrambenih mehanizama u jetri, dejstvom na antioksidativne enzime. Ipak, upotreba etarskog ulja ruzmarina u prevenciji i/ili terapiji oboljenja jetre zahteva prethodnu identifikaciju aktivnih sastojaka, razjašnjenje mehanizma njihovog delovanja, kao i podatke koji se odnose na pretkliničku i kliničku procenu bezbednosti.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da:

1. Etarsko ulje ruzmarina ispoljava značajno antinociceptivno delovanje i potencira efekat lekova koji analgetiski efekat ostvaruju centralnim i perifernim mehanizmima.
2. Etarsko ulje ruzmarina značajno smanjuje visceralnu bol izazvanu nadražajnim delovanjem sirćetne kiseline.
3. Primena etarskog ulja ruzmarina ne utiče značajno na biološku raspoloživost paracetamola.
4. Etarsko ulje ruzmarina je značajno smanjilo depresivni efekat diazepama i pentobarbitala na centralni nervni sistem.
5. Višekratna primena različitih doza etarskog ulja ruzmarina ne izaziva toksične promene u krvi i jetri ispitivanih životinja.
6. Primena etarskog ulja ruzmarina štiti životinje od reaktivnih kiseoničnih vrsta, umanjuje posledice izloženosti oksidativnom stresu i ispoljava značajno hepatoprotektivno delovanje.

8. LITERATURA

1. Wold RS, Lopez ST, Yau CL, Butler LM, Pareo-Tubbeh SL, Waters DL et al. Increasing trends in elderly persons' use of nonvitamin, nonmineral dietary supplements and concurrent use of medications. *Journal of the American Dietetic Association*. 2005;105(1):54–63.
2. Barnes PM, Powel-Griner E, McFann K, Nahin RL. Complementary and alternative medicine use among adults: United States, 2002. *Seminars in Integrative Medicine*. 2004;2(2):54-71.
3. Petrović S, Kukić-Marković J, Pavlović-Drobac M. Biljni lekoviti proizvodi: uslovi za bezbednu primenu. *Arhiv za farmaciju*. 2012;62(2)119-136.
4. Bent S. Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation. *Journal of General Internal Medicine*. 2008;23(6):854-59.
5. Williamson E M. Drug Interactions Between Herbal and Prescription Medicines. *Drug Safety*. 2003;26(15):1075-1092.
6. Institute of Medicine, National Academies Press. Dietary Supplements: A Framework for Evaluating Safety. Washington, DC: National Academies Press, 2005.
7. Blumenthal M, Hall T, Goldberg A, Kunz T, Dinda K, eds. The ABC clinical guide to herbs. 1st ed. Austin, Texas: American Botanical Council; New York: Thieme New York; Stuttgart: Thieme International, 2003.
8. Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima. Službeni glasnik Republike Srbije. br. 30/2010, 7.05.2010.
9. Pravilnik o bližim uslovima i načinu upisa leka u Registar tradicionalnih biljnih, odnosno homeopatskih lekova. Službeni glasnik RS 100/2011.
10. Bojanin S. Lečenje biljem u srednjovekovnoj Srbiji: osnovni pregled. *Godišnjak za društvenu istoriju*. 2012;19(1):7-34.
11. Tucakov J. Lečenje biljem. Rad, Beograd, 1997.
12. Lukić PB. Farmakognozija, V izdanje. Farmaceutski fakultet u Beogradu, 1992.
13. Kovačević N. Osnovi farmakognozije, 3 izdanje. Srpska školska knjiga, Beograd, 2004.
14. Ulbricht C, Abrams TR, Bringham A, Ceurvels J, Clubb J, Curtiss W et al. An Evidence-Based Systematic Review of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of dietary supplements*. 2010;7(4)351-413.
15. Rosemary Bush. Preuzeto sa: fir0002 | flagstaffotos.com.au Canon 20D+Tamron 28-75mmf/2.8 – Own Work.

16. Pharmacopoea Jugoslavica 2000. Savezni Zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja i Savremena administracija, Beograd, Jugoslavija, 2000.
17. Babović NV, Petrović SD. Izolovanje antioksidanasa postupkom natkritične ekstrakcije. *Hemijska industrija*. 2011;65(1):79–86.
18. European Pharmacopoeia, 7th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM); 2010.
19. Djilani A, Dicko A. The therapeutic benefits of essential oils. Nutrition, well-being and health. Dr Jaouad Bouayed ed. In Tech. 2012:155-178.
20. Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla A, Bettio LEB et al. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L.. *Food Chemistry*. 2013;136: 999–1005.
21. Seol GH, Shim HS, Kim P-J, Moon HK, Lee KH, Shim I et al. Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;130:187–190.
22. Pengelly A, Snow J, Mills SY, Scholey A, Wesnes K, Butler LR. Short-Term Study on the Effects of Rosemary on cognitive Function in an Elderly Population. *Journal of Medicinal Food*. 2012;15(1):10-17.
23. Kennedy DO, Scholey AB. The psychopharmacology of european herbs with cognition-enhancing properties. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12(35):4613-4623.
24. Moss M, Cook J. Aromas of Rosemary and Lavander essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *Int J Neurosci*. 2003;113(1):15-38.
25. de Faria LRD, Lima CS, Perazzo FF, Carvalho JCT. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2011;7:1-8.
26. Radulović NS, Randjelović PJ, Stojanović NM, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Ilić IR et al. Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;58:37-49.
27. Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. *The Journal of Neuroscience*. 2005;25(39):8924–8937.
28. Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*. 2007;448:204-208.
29. Langley-Brady D. Neuropathies: Essential oils show promising results in the fight against symptoms. Advanced Graduate Paper for The East West School of Herbal and Aromatic Studies, 2010. Dostupno na: <http://theida.com/ew/wp->

<content/uploads/2010/10/Neuropathies-Essential-oils-show-promising-results-in-the-fight-against-symptoms.pdf>.

30. Guimarães AG, Quintans JSS, Quintans-Júnior LJ. Monoterpenes with Analgesic Activity—A Review. *Phytotherapy research*. 2013;27:1-15.
31. Nogueira de Melo G A, Grespan R, Pitelli Fonseca J, Oliveira Farinha T, Leite Silva E, Lopes Romero A, et al. Rosmarinus officinalis L. Essential oil inhibits in vivo and in vitro Leukocyte migration. *J Med Food*. 2011;20(10):1-6.
32. Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A, Sartoreto SM, Diniz SP, Bersani-Amado CA et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil in Experimental Animal Models. *J Med Food*. 2008;11(4):741-746.
33. Minaiyan M, Ghannadi AR, Agoharipour M, Mahzourni P. Effects of extract and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. on TNBS-induced colitis in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2011;6(1):13-21.
34. Tanikawa K, Torimura T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Medical Molecular Morphology*. 2006;39:22-27.
35. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research*. 2012;42:741-749.
36. Zhang A, Sun H, Wang X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;63:570-577.
37. Gutiérrez R, Alvarado JL, Presno M, Pérez-Veyna O, Serrano C J, Yahuaca P. Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced liver cirrhosis. *Phytotherapy Research*. 2010;24:595-601.
38. Amin A, Hamza AA. Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences*. 2005;77:266-278.
39. Wang W, Wu N, Zu YG. Antioxidative activity of rosmarinus officinalis. *Food Chemistry*. 2008;108(3):1019-22.
40. Zhao B, Li X, He R, Cheng S, Waujuan X. Scavenging effects of extracts of green tea and natural antioxidants on active radicals. *Cell Biophysics*. 1989;14:175-185.
41. Horváthová E, Slameňová D, Navarová J. Administration of rosemary essential oil enhances resistance of rat hepatocytes against DNA-damaging oxidative agents. *Food Chemistry*. 2010;123:151-156.
42. Hiroi T, Miyazaki Y, Kobayashi Y, Imaoka S, Funae Y. Induction of hepatic P450s in rat by essential wood and leaf oils. *Xenobiotica*. 1995;25(5):457-467.

43. Costa S, Utan A, Speroni E, Cervellati R, Piva G, Prandini A et al. Carnosic acid from rosemary extracts a potential chemoprotective agent against aflatoxin β 1, in vitro study. *Journal of Applied Toxicology*. 2007;27(2):152-159.
44. Haloui M, Louedec L, Michel J-B, Lyoussi B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71:465-472.
45. Kwon Y-I, Vatter DA, Kalidas S. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2006;15(1):107-117.
46. Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhaes PJC, Leal-Cardoso JH. Cardiovascular effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils in normotensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2002;80(12):1125-1131.
47. Fernández LF, Palomino OM, Frutos G. Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypertensive agent in primary hypertensive patients and its influence on health-related quality of life. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;151(1):509-516.
48. Naemura A, Ura M, Yamashita T, Arai R, Yamamoto J. Long-term intake of rosemary and common thyme herbs inhibits experimental thrombosis without prolongation of bleeding time. *Thrombosis Research*. 2008;122:517-522.
49. Yamamoto J, Path FRC, Yamada K, Naemura A, Yamashita T, Arai R. Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition*. 2005;21:580-587.
50. Al-Hader AA, Z.A. Hasan ZA, Aqelb MB. Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects of *Rosmarinus officinalis*. *Journal of ethnopharmacology*. 1994;43:217-221.
51. Bakirel T, Bakirel U, Ustuner Keles O, Gunes Ulgen S, Yardibi H. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;116:64-73.
52. Martynyuk L, Ruzhitska O, Martynyuk O. Effect of the herbal combination Canephron N on diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus: results of a comparative cohort study. *J Altern Complement Med*. 2014;20(6):472-8.
53. Atsumi T, Tonosaki K. Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. *Psychiatry Research*. 2007;150:89-96.
54. Zhu BT, Loder DP, Cai MX, Ho CT, Huang MT, Conney AH. Dietary administration of an extract from rosemary leaves enhances the liver microsomal metabolism of endogenous estrogens and decreases their uterotrophic action in CD-1 mice. *Carcinogenesis*. 1998;19(10):1821-1827.

55. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Flauzino LG, Souza MG, Turatti IC, Andrade e Silva ML, Martins CH, da Silva Filho AA, Cunha WR. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Journal of Bioscience*. 2010;65(9-10):588-93.
56. Gachkar L, Yadegari D, Reyaei MB, Taghiyadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. 2007;102:898–904.
57. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage essential oils. *J Agric Food Chem*. 2007;55:7879-85.
58. Sienkiewicz M, Lysakowska M, Pastuszka M. The potential of use basil and rosemary oils as effective antibacterial agents. *Molecules*. 2013;18(8):9334-51.
59. Luqman S, Dwivedi G, Darokar M, Kaira A, Khanuja SPS. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Alternative therapies*. 2007;13(5):54-59.
60. Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Food Protection*. 2005;68(4):790–795.
61. Tantaoui-Elaraki A, Beraoud L. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1994;13(1):67-72.
62. Braun L, Cohen M. Herbs&Natural Supplements, An Evidence-based Guide, 2nd Ed., Accompanying CD, Churchill Livingstone, Elsevier Australia, 2007.
63. van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;48:440-446.
64. Samman S, Sandstrom B, Bjorndal Toft M, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS. Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:607–12.
65. Plouzek CA, Ciolino HP. Inhibition of P-Glycoprotein activity and reversal of multidrug resistance in vitro by rosemary extract. *Eur J Cancer*. 1999;35(10):1541-45.
66. Miyazawa M, Shindo M, Shimada T. Oxidation of 1,8-cineole, the monoterpene cyclic ether originated from *Eucalyptus polybractea*, by cytochrome p450 3a enzymes in rat and human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*. 2001;29(2):200-6.
67. Meharena Y, Li H, Hawkes DB, Pearson AG, De Voss J, Poulos TL. Crystal Structure of P450cin in a Complex with Its Substrate, 1,8-Cineole, a Close Structural Homologue to D-Camphor, the Substrate for P450cam. *Biochemistry*. 2004;43:9487-9494.

68. Debersac P, Heydel JM, Amiot MJ, Goudonnet H, Artur Y, Suschetet M, Siess MH. Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: description of specific patterns. *Food Chem Toxicol.* 2001;39(9):907-918.
69. Barceloux DG. Medical toxicology of natural substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomouse animals. Wiley, A John Wiley& Sons, Inc., Publication, 2008.
70. Offord EA, Mace K, Ruffieux C, Malnoe A, Pfeifer AMA. Rosemary components inhibit benzo[a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis.* 1995;16(9):2057-2062.
71. Orhan I, Aslan S, Kartal M, Sener B, Can Baser HK. Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry.* 2008;108:663–668.
72. European Medicines Agency. Community herbal monograph on *Rosmarinus officinalis* L., aetheroleum, 2010. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2011/01/WC500101493.pdf.
73. Ferreira HP. Assessment report on *Rosmarinus officinalis* L., aetheroleum and *Rosmarinus officinalis* L., folium. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). July 2010.
74. Aguilar F, Autrup H, Barlow S, Castle L, Crebelli R, Dekant W. Use of rosemary extracts as a food additive: Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *The EFSA Journal.* 2008;721:1-29.
75. Steinmetz MD, Vial M, Mullet Y. Action of essential oils of rosemary and certain of its constituents on the cerebral cortex of the rat in vitro. *J toxicol Clin Exp.* 1987;7(4): 259-71.
76. Burkhard P R, Burkhardt K, Haenggeli C-A, Landis T. Plant-induced seizures: reappearance of an old proble. *J Neurol.* 1999;246:667-70.
77. NIST Standard Reference Database: NIST mass spectra library (IBM-AT, version 2, 1990) U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program. Gaithersburg, MD 20899, 1990.
78. Jakovljević V. Eksperimentalna farmakologija u naučno-istraživačkom radu. Alfagraf, Novi Sad, 2006.
79. Vogel HG & Vogel WH (eds.). Drug discovery and evaluation, Pharmacological assays. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, 2008.
80. Soysa P, Kolambage S. Rapid HPLC/UV method for analysis of urinary and plasma/serum paracetamol concentrations. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka.* 2010;38(2):131-137.

81. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28:25-30.
82. Kroyer GT: Red Clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2004;5:101-105.
83. Buege AJ, Aust DS: Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology.* Edited by Fleischer S, Parker L. New York: Academic Press; 1978.
84. Chin PTY, Stults FH, Tappel AL. Purification of Rat Lung Soluble Glutathione Peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1976;445:558-660.
85. Glatzle D, Vuillenmir K. Glutathione Reductase Test with Whole Blood a Convenient Procedure for the Assessment of the Riboflavine Status in Human. *Experimentia.* 1974;30:565-638.
86. Simon LM, Fatrai Z, Jonas DE, Matkovics B: Study of metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 1974;166:389-393.
87. Beers RFJ, Sizer JW: Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1950;195:133-140.
88. Bergmayer UH. *Methoden Der Enzymatischen Analyse*; Verlag Chemie: Weinheim, Germany, 1970;483-4.
89. Kapetanović IM, Mיעyal JJ: Inhibition of acetaminophen-induced hepatotoxicity by phenacetin and its alkoxy analogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979;209:25-30.
90. Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P: Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol.* 1999;37:124-130.
91. Yu MH, Choi JH, Chae IG, Im HG, Yang SA, More K, et al. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem.* 2013;136:1047-1054.
92. Mikus G, Weiss J. Influence of CYP2D6 genetics on opioid kinetics, metabolism and response. *Curr Pharmacogenomics.* 2005;3:43-52.
93. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism.* 2008;5(27): doi: 10.1186/1743-7075-5-27.
94. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology.* 2013;21(3):201-232.
95. Franceschi F, Iacomini P, Marsiliani D, Cordischi C, Antonini EF, Alesi A, Giacobelli D, Zuccalà G. Safety and efficacy of the combination acetaminophen-codeine in the treatment of pain of different origin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:2129-2135.
96. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* 2006;12:250-275.

97. Martínez AL, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ, Navarrete A. Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. *Planta Med.* 2009;75(5):508-511.
98. Gonzalez-Trujano M E, Pena E I, Martinez A L, Moreno J, Guevara-Fefer P, Deciga-Campos M, et al. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2007;111:476–482.
99. Emami F, Ali-Beig H, Farahbakhsh S, Mojabi N, Rastegar-Moghadam B, Arbabian S, et al. Hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its constituent carnosol inhibit formalin-induced pain and inflammation in mice. *Pak J Biol Sci.* 2013;16:309-316.
100. Martinez AL, Gonzales-Trujano M E, Chavez M, Pellicer F. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *Journal of Ethnopharmacology.* 2012;142:28–34.
101. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):597-652.
102. de Sousa DP. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules.* 2011;16(3):2233-2252.
103. Santos FA, Rao VS. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res.* 2000;14:240-244.
104. Debersac P, Vernevaut M-F, Amiot M-J, Suschetet M, Siess M-H. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food and Chemical Toxicology.* 2001;39:109–11.
105. Metwally NS, Hamed MA, Ahmed SA. Association between efficiency of certain medicinal plants and severity of renal disorders in rats. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4:432-438.
106. Almeida RN, Navarro S, Barbosa-Filho JM. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine.* 2001;8(4):310–322.
107. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Adriana B.P. Paschoalato ABP, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology.* 2000;387:111–118.
108. Ameer B, Divoll M, Abernethy DR, Greenblatt DJ, Shargel L. Absolute and relative bioavailability of oral acetaminophen preparations. *J Pharm Sci.* 1983;72(8):955-8.
109. Benet LZ, Wacher VJ, Benet MR. Patent title: Use of essential oils to increase bioavailability of oral pharmaceutical compounds. Inventors: Assignes: Eastman Chemical Company; Origin: Kingsport, TN U.S. patent No 5.716.928.; 1998-02-10.

110. Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Endo T, Koga N. Species difference in the metabolism of 2, 2', 3, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (CB146) by animal and human liver microsomes. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2013;104(4):161-9.
111. Manov I, Bashenko Y, Hirsh M, Iancu TC. Involvement of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Acetaminophen-Induced Toxicity in Hepatoma-Derived HepG2 and Hep3B Cells. *Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology*. 2006;99:213–224.
112. Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juarez MA, Moreno S: New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*. 2013;31:189–195.
113. Tisserand R, Young R: *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. 2nd edition. London: Churchill Livingstone; 2013.
114. Yamasaki I, Uotsul N, Yamaguchi K, Takayanagi R, Yamada Y. Effects of kale ingestion on pharmacokinetics of acetaminophen in rats. *Biomedical Research*. 2011;32(6):357-362.
115. Rašković A, Stilinović N, Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S, Mikov M. The Protective Effects of Silymarin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity in Rats. *Molecules*. 2011;16:8601-8613.
116. Machado DG, Bettio LEB, Cunha MP, Capra JC, Dalmarco JB, Pizzolati MG, et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuro-Psychoph*. 2009;33:642-650.
117. Alnamer R, Alaoui K, Boudida EH, Benjouad A, Cherrah Y. Psychostimulant activity of *Rosmarinus officinalis* essential oils . *Journal of Natural Products*. 2012;5:83-92.
118. Bateson AN. The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential? *Sleep Med*. 2004;5:9-15.
119. Zhu H, Cottrell JE, Kass IS. The Effect of Thiopental and Propofol on NMDA- and AMPA- mediated Glutamate Excitotoxicity. *Anesthesiology*. 1997;87(4):944-951.
120. Divac N, Tiosevski DL, Babić D, Djurić D Prostran M, Samardžić R. Trends in consumption of psychiatric drugs in Serbia and Montenegro 2000-2004. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2006;15(11):835-8.
121. Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol Scand*. 2008;118:69–86.
122. Abe Y, Fujiwara R, Oda S, Yokoi T, Nakajima M. Interpretation of the effects of protein kinase C inhibitors on human UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) proteins in cellulo. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2011;26:256-265.
123. Rang HP (et al.). *Farmakologija, Prvo srpsko izdanje*. Data status, Beograd, 2005.

124. Tsuji R, Isobe N, Kurita Y, Hanai K, Yabusaki Y, Kawasaki H. Species difference in the inhibition of pentobarbital metabolism by empenthrin. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1996;2:331–337.
125. Reitman ML, Chu X, Cai X, et al. Rifampin's acute inhibitory and chronic inductive drug interactions: Experimental and model-based approaches to drug-drug interaction trial design. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89:234-242.
126. Borrelli F, Izzo AA. Herb-drug interactions with St John's Wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *AAPS J.* 2009;11:710-727.
127. Madabushi R, Frank B, Drewelow B, Derendorf H, Butterweck V. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62:225–233.
128. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and do the results mean? *British Journal of Pharmacology.* 2004;142:231-255.
129. Sotelo-Félix JI, Martínez-Fong D, Muriel P, Santillán R L, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002;81:145-154.
130. Ramadan KS, Khalil OA, Danial EN, Alnahdi HS, Ayaz N. Hypoglycemic and hepatoprotective activity of *Rosmarinus officinalis* extract in diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 2013;69(4):779-83.
131. Siurin SA . Effects of essential oil on lipid peroxidation and lipid metabolism in patients with chronic bronchitis. *Klin Med (Mosk).* 1997;75(10):43-5.
132. Sakr SA, Lamfon HA. Protective effect of rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) leaves extract on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in albino rats. *Life Science Journal.* 2012;9:779-785.
133. Kadri A, Zarai Z, Ben Chobba I, Bekir A, Gharsallah N, Damak M, et al. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2011;5:5999-6004.
134. Beretta G, Artali R, Maffei Facino R, Gelmini F. An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2011;55:1255–1264.
135. Santos FA, Silva RM, Campos AR, De Araújo RP, Lima Júnior RC, Rao VS. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem Toxicol.* 2004;42:579-584.
136. Ciftci O, Ozdemir I, Tanyildizi S, Yildiz S, Oguzturk H: Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicol Ind Health.* 2011;27:447-453.

137. Bozorg A M, Benbadis S R. Essential oils as a cause of breakthrough after temporal lobectomy. *Seizure*. 2009;18:604-5.