



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Миона Љ. Вулетић

**Ефекти формулација на бази *Galium
verum L.* у терапији афтозног
стоматитиса код пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2023. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Miona Lj. Vuletić

**Efekti formulacija na bazi *Galium verum* L.
u terapiji aftoznog stomatitisa kod pacova**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2023. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Miona Lj. Vuletic

**The Effects of formulations based on
Galium verum L. in the therapy of
aphthous stomatitis in rats**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023

Аутор
Име и презиме: Миона Вулетић
Датум и место рођења: 23.09.1991. године у Крагујевцу
Садашње запослење: асистент за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Ефекти формулација на бази <i>Galium verum L.</i> у терапији афтозног стоматитиса код пацова
Број страница: 108
Број слика: 14 слика, 32 графика и 20 табела
Број библиографских података: 227
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: доц. др Јована Брадић, доцент за ужу научну област Фармацеутска технологија, Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 18.01.2022. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-57/21 од 04.02.2022. год.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"> 1. Доц. др Раша Младеновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, председник; 2. Доц. др Ана Барјактаревић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија члан; 3. Проф. др Биљана Божин, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакогнозија и фитотерапија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Miona Vuletić
Datum i mesto rođenja: 23.09.1991. godine u Kragujevcu
Sadašnje zaposlenje: asistent za užu naučnu oblast Dečja i preventivna stomatologija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Efekti formulacija na bazi <i>Galium verum L.</i> u terapiji aftoznog stomatitisa kod pacova
Broj stranica: 108
Broj slika: 14 slika, 32 grafika i 20 tabela
Broj bibliografskih podataka: 227
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: doc. dr Joavan Bradić, docent za užu naučnu oblast Farmaceutska tehnologija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 18.01.2022. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-57/21 od 04.02.2022. god.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"> 1. doc. dr Raša Mladenović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Dečja i preventivna stomatologija, predsednik; 2. doc. dr Ana Barjaktarević, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska tehnologija, član; 3. prof. dr Biljana Božin, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu za užu naučnu oblast Farmakognozija i fitoterapija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Miona Vuletic
Date and place of birth: 23.09.1991. Kragujevac
Current employment: assistant, Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: The Effects of formulations based on Galium verum L. in the therapy of aphthous stomatitis in rats
No. of pages: 108
No. of images: 14 images, 32 graphs and 20 tables
No. of bibliographic data: 227
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Asst. Prof. Jovana Bradic, Assistant Professor, Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 18.01.2022.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: IV-03-57/21 from 04.02.2022.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none"> 1. Asst. Prof. Rasa Mladenovic, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Pediatric and Preventive Dentistry, President; 2. Asst. Prof. Ana Barjaktarevic, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Pharmaceutical Technology, member; 3. Assoc. Prof. Biljana Bozin, Full Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Novi Sad, for the narrow scientific field of Pharmacognosy and phytotherapy, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral:
Date of Dissertation Defense:

Посебну захвалност дугујем својој менторки, доц. др Јовани Брадић на знању, помоћи и подрици током израде докторске дисертације.

Захвалност за огромну помоћ, подрику, и савете при експерименталном раду у пријатељском окружењу дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу, проф. др Владимиру Живковићу и њиховом истраживачком тиму.

Огромну захвалност дугујем др сци. мед. Сузани Живановић, др сци. мед. Милошу Папићу и др. спец. Мирјани Папић на искреној подрици и пријатељству, разумевању и неизмерној помоћи током свих фаза израде ове докторске дисертације. Без таквог тима ова дисертација не би била иста.

Искрено се захваљујем својим пријатељима, професорима и колегама са Катедре за стоматологију на разумевању и подрици током израде докторске дисертације.

Хвала мојој породици, мом сину Василију и супругу Бобану на разумевању, љубави и подрици.

САЖЕТАК

Увод: Афтозни стоматитис је најчешће хронично обољење оралне мукозе. Постоје три клиничка облика афтозног стоматитиса у зависности од карактеристика улцерације. Терапија се најчешће огледа у сузбијању симптома, и углавном се примењују антисептички раствори. Фитотерапија се већ дуже време примењује као алтернативна метода у третману афтозног стоматитиса. Широки спектар дејства *Galium verum L.* као и улога ове биљне врсте у зарастању рана пружа основ за потенцијалну примену у терапији афтозног стоматитиса.

Циљ: Циљ нашег истраживања је био испитати ефекат екстракта *Galium verum L.* у терапији афтозног стоматитиса код пацова.

Материјал и методе: У истраживање је укључено 80 пацова соја *Wistar albino*, којима је индукован афтозни стоматитис. Животиње су подељене у четири групе. Развој и зарастање лезија је праћено свакодневно. Жртвовање је спроведено 0., 3., 6. и 10. дана третмана након чега су узети узорци крви и букалног ткива како би се спровеле даље анализе. Ефекти примењених формулација су поред клиничке евалуације, одређени хистолошком анализом, праћењем параметара инфламације и оксидационог стреса методом квантитативне реакције ланчане полимеризације у реалном времену и спектрофотометријски.

Резултати: Примена формулација на бази екстракта *G. verum* довела је до значајно смањења величине лезије, патохистолошког скорa и степена инфламације у афтозним лезијама. Ефекти примењених формулација нису имали утицај редокс статус у системској циркулацији док је њихов утицај у букалном ткиву био значајан.

Закључак: Примена *G. verum* у терапији афтозног стоматитиса има значајну улогу у бржем зарастању афтозне лезије и може служити као потенцијално средство у терапији оралних улцерација.

Кључне речи: Афтозни стоматитис, оралне улцерације, *Galium verum L.*

ABSTRACT

Introduction Aphthous stomatitis is the most common chronic oral ulcer disease. Three clinical types of aphthous stomatitis are described depending on characteristics of ulcer. The therapy is reflected in the suppression of symptoms, and antiseptics are usually used. Phytotherapy has been used for a long time as an alternative method in the treatment of aphthous stomatitis. The wide range of effects of the species *Galium verum L.* and its role in wound healing provides a basis for potential use in the therapy of aphthous stomatitis.

Aim The aim of our research was to examine the effect of the extract of *Galium verum L.* in therapy of aphthous stomatitis in rats.

Material and methods Research included 80 Wistar albino rats with aphthous stomatitis. The animals were divided into four groups. The evolution and healing of the aphthous lesion were followed every day. Animals were sacrificed on day 0, 3, 6 and 10, and blood and buccal samples were collected for further analysis. In addition to clinical evaluation, the effects of the applied formulations were determined by histological analysis, by monitoring the parameters of inflammation and oxidative stress using PCR and spectrophotometric analysis.

Results Application of formulations based on *G. verum* extract showed a significant reduction in ulcer size, pathohistological score and degree of inflammation in aphthous lesions. Applied formulations had no influence on systemic redox status, while their effects in the buccal tissue was significant.

Conclusion Application of *G. verum.* in the therapy of aphthous stomatitis plays a significant role in reduction of healing time of the aphthous lesion and can serve as a potential tool in the therapy of oral ulcerations.

Key words Aphthous stomatitis; Oral ulcerations; *Galium verum L.*;

САДРЖАЈ

1.	УВОД.....	2
1.1.	АФТОЗНИ СТОМАТИТИС.....	2
1.2.	ЕПИДЕМИОЛОГИЈА И ЕТИОЛОГИЈА АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА.....	2
1.2.1.	Локални фактори.....	2
1.2.2.	Системска обољења.....	3
1.2.3.	Микробиолошки фактори.....	3
1.2.4.	Нутритивни фактори.....	4
1.2.5.	Алергијски фактори.....	5
1.2.6.	Имунолошки фактори.....	5
1.2.7.	Оксидациони стрес.....	6
1.2.8.	Остали фактори.....	6
1.3.	КЛИНИЧКА СЛИКА АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА.....	6
1.3.1.	Зарастање ране на оралној мукози.....	7
1.4.	ДИЈАГНОЗА АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА.....	11
1.5.	ТЕРАПИЈСКИ МОДАЛИТЕТИ У ЛЕЧЕЊУ АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА.....	11
1.5.1.	Локална терапија афтозног стоматитиса.....	11
1.5.2.	Системска терапија афтозног стоматитиса.....	12
1.5.3.	Фитотерапија у лечењу афтозног стоматитиса.....	13
1.6.	<i>GALIUM VERUM</i>	14
1.6.1.	Распрострањеност, назив и употреба ивањског цвећа.....	14
1.6.2.	Хемијски састав <i>G. verum</i>	15
1.6.3.	Полифеноли.....	15
1.6.4.	Терапеутска примена полифенола.....	17
1.6.5.	Садржај полифенола у ивањском цвећу.....	18
1.6.6.	Иридоиди.....	19
1.6.7.	Биолошка улога иридоида.....	21
1.6.8.	Друге биоактивне компоненте ивањског цвећа.....	23
1.6.9.	Фармаколошко дејство ивањског цвећа.....	23
2.	ЦИЉ СТУДИЈЕ.....	27
2.1.	РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ.....	27
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	29
3.1.	ПРИКУПЉАЊЕ И ПРИПРЕМА БИЉНОГ МАТЕРИЈАЛА.....	29
3.2.	ПОСТУПАК ПРИПРЕМЕ ЕКСТРАКТА.....	29
3.3.	ФИТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЕКСТРАКТА.....	30
3.3.1.	Укупан садржај фенола.....	30
3.3.2.	Укупан садржај флавоноида.....	30
3.4.	ПРИПРЕМА РАСТВОРА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА ДОБИЈЕНОГ ИЗ НАДЗЕМНОГ ДЕЛА БИЉКЕ <i>G. VERUM</i>	31
3.5.	ПРИПРЕМА ГЕЛА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА НАДЗЕМНОГ ДЕЛА БИЉКЕ <i>G. VERUM</i>	31
3.6.	ИСПИТИВАЊЕ УЛОГЕ ЕКСТАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА У ЗАРАСТАЊУ ОРАЛНИХ УЛЦЕРАЦИЈА.....	31
3.6.1.	Експерименталне животиње.....	31
3.6.2.	Индукција анималног модела афтозног стоматитиса.....	31
3.6.3.	Примена формулација на бази екстракта ивањског цвећа.....	32
3.6.4.	Дневни унос хране и воде.....	32
3.6.5.	Одређивање величине и процента зарастања лезије.....	32

3.6.6.	Жртвовање експерименталних животиња и прикупљање узорака	33
3.7.	ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА УЗОРАКА БУКАЛНОГ ТКИВА	33
3.7.1.	Фиксација и парафинизација ткивних узорака	33
3.7.2.	Бојење узорака хематоксилин-еозин техником (H&E)	33
3.8.	ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА УЗОРАКА БУКАЛНОГ ТКИВА	34
3.8.1.	Имунохистохемијско бојење ткивних исечака	34
3.8.2.	Бојење узорака Picro-Sirius Red техником	35
3.9.	ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА НА СИСТЕМСКИ И ЛОКАЛНИ НИВО ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА	35
3.9.1.	Мерење нитрита (NO ₂ ⁻)	35
3.9.2.	Мерење индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS).....	36
3.9.3.	Мерење водоник пероксида (H ₂ O ₂)	36
3.9.4.	Мерење супероксид анјон радикала (O ₂ ⁻).....	36
3.9.5.	Мерење супероксид дисмутазе (SOD)	37
3.9.6.	Мерење каталазе (CAT).....	37
3.9.7.	Мерење редукованог глутатиона (GSH).....	37
3.10.	ТКИВНА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА АНАЛИЗИРАНА МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ	38
3.10.1.	Поступак изолације RNA и реверзне транскрипције комплементарне DNA	38
3.10.2.	Одређивање релативне експресије гена	38
3.11.	СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА.....	40
3.12.	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	40
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	43
4.1.	ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕКСТРАКТА <i>G. VERUM</i>	43
4.1.1.	HPLC-DAD анализа етанолног екстракта <i>G. verum</i>	43
4.1.2.	Укупан садржај фенола и флавоноида.....	44
4.2.	ЕФЕКАТ ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА НА ДЕНВНИ УНОС ХРАНЕ И ВОДЕ	44
4.3.	ВЕЛИЧИНА И ЗАРАСТАЊЕ АФТОЗНЕ ЛЕЗИЈЕ	46
4.4.	ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА АФТОЗНИХ ЛЕЗИЈА	50
4.5.	УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА <i>G. VERUM</i> НА РЕДОКС СТАТУС У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ ПАЦОВА	59
4.5.1.	Ефекти гела на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво прооксиданаса у системској циркулацији пацова.....	59
4.5.2.	Ефекти гела на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво антиоксиданаса у системској циркулацији пацова.....	61
4.5.3.	Ефекти раствора на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво прооксиданаса у системској циркулацији пацова.....	62
4.5.4.	Ефекти раствора на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво антиоксиданаса у системској циркулацији пацова.....	64
4.5.5.	Поређење ефеката формулација на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво прооксиданаса у системској циркулацији пацова	65
4.5.6.	Поређење ефеката формулација на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво антиоксиданаса у системској циркулацији пацова.....	66
4.6.	УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА <i>G. VERUM</i> НА ЛОКЛАНИ РЕДОКС СТАТУС У ТКИВУ ОБРАЗА КОД ПАЦОВА	67

4.6.1.	Ефекти гела на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво прооксиданаса и антиоксиданаса у букалном ткиву пацова.....	67
4.6.2.	Ефекти раствора на бази екстракта <i>G. verum</i> на ниво прооксиданаса и антиоксиданаса у букалном ткиву пацова.....	69
4.6.3.	Упоређивање ефеката формулација на бази екстракта <i>G. verum</i> у облику гела и раствора на ниво прооксиданаса и антиоксиданаса у букалном ткиву пацова	70
4.7.	АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА КОД ЖИВОТИЊА СА АФТОЗНИМ СТОМАТИТИСОМ	71
4.7.1.	Ефекти формулација на бази екстракта <i>G. verum</i> на експресију гена укључених у процес инфламације.....	71
4.7.2.	Ефекти формулација на бази <i>G. verum</i> на експресију гена укључених у процес оксидационог стреса	77
5.	ДИСКУСИЈА.....	82
5.1.	КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА И ПРИПРЕМЉЕНИХ ФОРМУЛАЦИЈА	82
5.2.	ЕФЕКАТ ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА НА ДНЕВНИ УНОС ХРАНЕ И ВОДЕ	83
5.3.	ВЕЛИЧИНА И ПРОЦЕНАТ ЗАРАСТАЊА ЛЕЗИЈЕ	83
5.4.	ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА АФТОЗНИХ ЛЕЗИЈА	84
5.5.	УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА <i>G. VERUM</i> НА РЕДОКС СТАТУС У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ ПАЦОВА	86
5.7.	ЕФЕКТИ ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА <i>G. VERUM</i> НА ЕКСПРЕСИЈУ ГЕНА КОД ЖИВОТИЊА СА АФТОЗНИМ СТОМАТИТИСОМ	88
5.7.1.	Ефекти формулација на бази екстракта <i>G. verum</i> на експресију гена укључених у процес инфламације.....	88
5.7.2.	Ефекти формулација на бази екстракта <i>G. verum</i> на експресију гена укључених у процес оксидационог стреса	91
6.	ЗАКЉУЧАК	94
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	96



УВОД

1. УВОД

1.1. АФТОЗНИ СТОМАТИТИС

Рекурентни афтозни стоматитис је једно од најчешћих обољења усне дупље које се карактерише рекурентним епизодама солитарних или мултиплих болних улцерација. Сам назив ”афте” је први пут користио Хипократ како би описао бол која се јавља у присуству улцерација на оралној мукози (1). Локализација афти може бити различита али најчешће се јавља на букалној и лабијалној мукози и језику, док су палатум и гингива ређе захваћени. Сматра се да је афтозни стоматитис хронично обољење које се јавља у око 20% одрасле популације, док је учесталост у дечјем добу значајно већа (2,3).

1.2. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА И ЕТИОЛОГИЈА АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА

Учесталост афтозног стоматитиса у укупној популацији износи око 20%, али на овај број значајно утичу разни фактори као што су етничке карактеристике и социоекономски фактори (4). У млађем добу, највећу учесталост достиже у периоду између 10. и 19. године живота (5). Позитивна породична анамнеза такође има удела у развоју, па тако деца чија су оба родитеља некада имала афтозни стоматитис имају шансу од 90% за развој овог обољења, док овај број код деце са негативном породичном анамнезом износи око 20% (6). Различити облици афтозног стоматитиса су повезани са одређеним периодом живота, па се сматра да се велике афте тзв. *Aphthae major*, чешће јављају у дечјем добу, док се херпетиформне афте у већем броју јављају у старијој популацији. Постоји и разлика између полова која се односи на већу учесталост афтозног стоматитиса код особа женског пола (57%) (7).

Различити предиспонирајући фактори могу допринети развоју афтозног стоматитиса, иако тачан узрок настанка овог обољења и даље није у потпуности разјашњен. Значајну улогу у етиопатогенези афтозног стоматитиса има интеракција између имунског система, генетских фактора и фактора спољашње средине. Локални и системски, микробиолошки, нутритивни и остали фактори, примена различитих лекова као и алергијске реакције се такође доводе у везу са развојем афтозног стоматитиса (8,9).

1.2.1. Локални фактори

Трауматско оштећење у усној дупљи је најчешћи локални фактор који доводи до развоја афтозних лезија. Оно може настати приликом прања зуба, коришћења неадекватних средстава за оралну хигијену, ношења неодговарајућих протеза или давања анестезије у току стоматолошких интервенција (10). Постојање лоших навика у виду грицкања усне или образа, као и бруксизам, такође представљају факторе који директно доводе до трауматског оштећења оралне слузокоже (11).

Постоје различити подаци о утицају саливарног кортизола на развој афтозног стоматитиса. Поједини аутори су показали да пацијенти са афтозним стоматитисом имају значајно виши ниво кортизола у пљувачци (12), док неки резултати говоре супротно и показују снижен ниво кортизола код ових пацијента, и у активној фази улцерација и фази зарастања, у поређењу са контролом (13).

Утицај конзумирања цигарета на настанак афтозног стоматитиса је веома често предмет данашњег истраживања. Показано је да хронично излагање никотину доводи до појачане кератинизације стварајући протективну и механичку баријеру и на тај начин штити оралну мукозу од оштећења и дејства микроорганизама (14).

1.2.2. Системска обољења

Многа системска обољења се доводе у везу са настанком афтозног стоматитиса, али појава афти се у највећем броју случајева јавља у склопу Бехчетове болести тј. Бехчетовог синдрома. Ова болест се карактерише променама на оралној и гениталној мукози као и лезијама на очима. Најчешће је јавља у одраслој популацији, али постоје случајеви када обољевају и деца (15). Болест настаје као последица васкулитиса малих и средњих крвних ћелија и инфламације у епителу. Испитивани су различити тестови како би се направила јасна разлика између Бехчетове болести и афтозног стоматитиса као самосталног обољења, међутим разлика и даље у потпуности није разјашњена (16).

Целијакија, аутоимунска болест која настаје као последица реакције организма на егзогено унети глутен, представља још један предиспонирајући фактор за настанак афтозног стоматитиса. Сматра се да афте у усној дупљи, у великом броју случајева, могу представљати знак целијачне болести у фази када још увек не постоје гастроинтестинални знаци овог обољења. Управо из тог разлога се свим пацијентима са учесталом појавом афтозног стоматитиса препоручује дијагностичка процедура за потврђивање целијакије (17).

Многе болести црева, инфламаторног порекла, се врло често манифестују екстраинтестиналним променама, посебно у усној дупљи. Међу њима се често наводи улцерозни колитис. Такође, код око 10% пацијената са Кроновом болешћу афтозне лезије претходе цревним показатељима болести, међутим постоје и аутори који сматрају да су те лезије последица грануломатозног запаљења (18). Макроскопски не постоји разлика између оралних улцерација код пацијената са Кроновом болешћу и здравих пацијената, док се тип запаљења између ове две групе разликује. Орална мукоза пацијената са инфламаторном болешћу црева показује високу инфилтрацију макрофага и Т лимфоцита, док код здравих пацијената преовладава фиброзни тип запаљења (4).

Пацијенти позитивни на вирус хумане имунодефицијенције (енг. *Human Immunodeficiency Virus*, HIV) представљају популацију код које је учесталост афтозног стоматитиса значајно већа у односу на здраве пацијенте. Клиничка слика је код њих израженија, афтозне лезије дуже трају, болније су и процес зарастања је спорији. Овакво стање се повезује са ослабљеним имунским системом услед HIV инфекције (19). Улцерације могу бити толико прогресивне и деструктивне да доводе до дисфагије и последичне малнутриције. Аутори истичу важност броја CD4⁺ лимфоцита који може бити индикатор оралних обољења и потребе за лечењем, јер је показано да се оралне улцерације у највећем броју случајева јављају када је број CD4⁺ лимфоцита испод 100 ћелија/mm³ (20).

1.2.3. Микробиолошки фактори

Различити вируси и бактерије се доводе у везу са етиопатогенезом афтозног стоматитиса, међутим постоје и супротна мишљења о томе.

Сматра се да Херпес вирус (енг. *Herpes simplex virus*, HSV) игра важну улогу у развоју афтозног стоматитиса што су показале студије у којима пацијенти са антителима на HSV имају већу инциденцу овог обољења у поређењу са пацијентима који су негативни на HSV (21,22). Студије које говоре супротно су показале да ниво интерферона у серуму није повишен код пацијента са афтозним стоматитисом, као и да антиген HSV није пронађен у узорцима ткива након биопсије (23,24). Такође, анализом ткивне експресије гена методом PCR (*Quantitative Real-time PCR*, qRtPCR) показано је

да вируси као што су Цитомегаловирус, вирус Варичела Зостер и Епштајн - Бар вирус немају улогу у патогенези афтозног стоматитиса (25). У циљу адекватне и правовремене терапије, диференцијална дијагноза између афтозног стоматитиса и других инфективних обољења вирусне етиологије које се у усној дупљи слично манифестују има велики значај. Скорија истраживања су се бавила утицајем вируса Ковид - 19 на развој афти. Иако ова повезаност још увек није у потпуности разјашњена, постоји значајно виша преваленца афтозног стоматитиса код Ковид позитивних пацијената у односу на здраву популацију (26).

Обзиром да је *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) бактерија која доводи до стварања улцерација у желуцу и дуоденуму, поставља се питање да ли има утицаја и на настанак афти у усној дупљи. Поједина истраживања показују да, након примене комерцијалних тестова за детекцију *H. pylori* у субгингивалном и супрагингивалном плаку, постоји значајна позитивност код скоро 90% пацијената са афтозним стоматитисом (27). Овоме у прилог говори и студија у којој је ерадикација *H. pylori* довела до значајне редукције у броју афти (28). Међутим поједини аутори су показали да нема значајне разлике између серопозитивности на *H. pylori* антиген између пацијената са афтозним стоматитисом, пацијената са улцерацијама друге етиологије и здравих пацијената (29).

Бактерије из групе стрептокока су често одговорне за настанак афтозног стоматитиса, посебно *S. Sanguis* која је прва изолована из афтозне лезије. Међутим утврђено је да се заправо ради о соју *S. Mitis*, бактерији која је саставни део денталног плака код пацијената са Бехчетовом болешћу (30).

1.2.4. Нутритивни фактори

Верује се да фолати, цинк, гвожђе и витамини попут Б1, Б2, Б6 и Б12 имају улогу у патогенези афтозног стоматитиса (31,32). *Vao* и сарадници (33) су испитивали утицај витамина Б12, феритина и фолата одређивањем њиховог нивоа у серуму код пацијената са афтозним стоматитисом и здравих контрола. Потврдили су значајно нижи ниво витамина Б12 у серуму у групи са афтозним стоматитисом, док у нивоу серумског феритина и фолата између групе пацијената са афтозним стоматитисом и контролне групе није било никакве разлике. Недостатак калцијума и витамина Ц се такође повезује са афтозним стоматитисом, што би могло бити последица недостатка витамина Б1, обзиром на нутритивни недостатак код ових пацијената (34). Смањен ниво цинка се такође наводи као предиспонирајући фактор за афтозни стоматитис, јер је код пацијената који су на супституционој терапији постигнут значајан успех. Поред тога, цинк стимулише продукцију протеина и колагена и на тај начин доприноси бржем зарастању ране (34). Смањен ниво витамина Д у серуму такође може бити фактор ризика за настанак афтозног стоматитиса (35). Витамин Ц модулира стварање реактивних врста кисеоника и стимулише апоптозу неутрофила. На тај начин спречава ослобађање потенцијално токсичног интрацелуларног садржаја и одржава нормалну структуру и функцију ткива. Показано је да свакодневна примена витамина Ц значајно смањује појаву оралних улцерација и бол код пацијената са афтозним стоматитисом, али је потребно додатно истраживање које би потврдило потенцијалну улогу витамина Ц у настанку овог обољења (36).

1.2.5. Алергијски фактори

Алергије као и преосетљивост на одређене намирнице као што су бадеми, чоколада, кафа, парадајз, јагоде или пшенично брашно које садржи глутен, су одувек сматране могућим узроком афтозног стоматитиса (37). Код 30% испитаника који су конзумирали храну која не доводи до ослобађања хистамина дошло је до регресије болести. Међутим, контролисана исхрана није у потпуности елиминисала оралне лезије. На основу ових резултата, аутори закључују да преосетљивост на храну ипак нема значајну улогу у развоју афтозног стоматитиса (38).

Натријум лаурил сулфат који се налази у пасти за зубе се често наводи као могући узрок афтозног стоматитиса. Верује се да, због свог денатуришућег дејства, деградира слој муцина у усној дупљи остављајући експониран епителни слој који је подложнији настанку улцерација (39). Међутим, распрострањена употреба пасти за зубе које садрже натријум лаурил сулфат говори супротно (39).

1.2.6. Имунолошки фактори

Бројне студије говоре о повезаности имунског одговора и развоја афтозног стоматитиса. Сматра се да афтозни стоматитис настаје као последица цитотоксичности Т лимфоцита на орални епител, дефекта у субпопулацији лимфоцита или као резултат аутоимунизације на орални епител (40). Током развоја афтозног стоматитиса, имунски одговор на одређени окидач бива нарушен, активирају се урођени и адаптивни механизми који се манифестују повећаним бројем НК ћелија и В лимфоцита, реактивацијом неутрофила, поремећеним односом CD4/CD8 и повећаним бројем CD25⁺ ћелија у периферној крви. На основу цитокиноског профила код ових пацијената, верује се да је Th1 имунски одговор најзначајнији у развоју афтозног стоматитиса (41). Многе студије су показале повишен ниво проинфламаторних цитокина, интерлеукина - 2 (енг. *interleukin*, IL), интерферона - γ (енг. *interferon* - γ , IFN- γ) као и фактора некрозе тумора - α (енг. *tumor necrosis factor* - α , TNF- α) у лезијама афтозног стоматитиса као и повишен ниво имуноглобулина (енг. *immunoglobulin*, Ig) А у серуму, затим смањење нивоа имунорегулаторних цитокина, као што су трансформишући фактор раста β (енг. *transforming growth factor*- β , TGF- β) и IL-10 (40,42,43). Дисбаланс између инфламаторних цитокина би могао довести до развоја афтозног стоматитиса и аутоимунизације код предиспонираних особа. Th1 имунски одговор је такође примећен у појединим аутоимунским обољењима као што су Кронова болест, целијакија и друга (44). Важан маркер разликовања афтозног стоматитиса и аутоимунских болести може бити присуство депозита имунских комплекса у оралној слузокожи пацијената са везикулобулозним болестима, попут *Pemphigus Vulgaris*-а или *Pemphigoid*-а, који су потврђени применом имунофлуоресцентних метода. Ови депозити нису били присутни код пацијената са афтозним стоматитисом. Нека физиолошка стања, као што су трудноћа или терапија тетрациклинима, представљају инхибиторе Th1 имунског одговора и могу утицати на ток афтозног стоматитиса (45).

TNF- α као проинфламаторни цитокин игра важну улогу у патогенези афтозног стоматитиса стимулишући експресију главног комплекса хистокompatбилности (енг. *Major histocompatibility complex* - МНС) класе I који доприноси обележавању локалног мукозног ткива за дејство цитотоксичних Т ћелија. Ово потврђују студије које су показале повећан ниво експресије МНС антигена у акутним стадијумима афтозног стоматитиса, док у периоду зарастања експресија МНС антигена није постојала (10,46).

1.2.7. Оксидациони стрес

Сви претходни фактори могу пореметити равнотежу редокс статуса код појединца и стимулирати стварање слободних радикала. Повећање њихове концентрације може изазвати оштећење ћелија које смањује одбрамбену способност имунског система. Штетни ефекат слободних радикала на ћелије може се постићи пероксидацијом протеина, липида или ДНК (47). *Bagan* и сарадници (48) су показали да су нивои малондиалдехида (енг. *Malondialdehyde*, MDA) и оксидисаног глутатиона (енг. *Oxidized glutathione*, GSSG) били значајно виши код пацијената са акутним афтозним стоматитисом него у контролној групи, док је глутатион (енг. *Glutathione*, GSH) био нижи. Постојале су и незнатне разлике у нивоима MDA и GSSG код пацијената са различитом величином афти и тежином обољења. Упоредјујући серумске нивое MDA и GSSG код пацијената са афтозним стоматитисом у зависности од присуства лезија, показано је да је постојање улцерације повезано са још вишим нивоима MDA и GSSG и нижим концентрацијама GSH, што указује на улогу оксидативног стреса у патогенези афтозног стоматитиса. Студије су такође испитивале укупан оксидациони статус у серуму, укупни антиоксидативни статус, индекс оксидационог стреса, нивое пролидазе и параоксоназе, показујући да су укупни оксидациони статус и индекс оксидационог стреса били значајно виши код пацијената са афтозним стоматитисом (49).

1.2.8. Остали фактори

Постоје подаци о утицају појединих лекова на развој афтозног стоматитиса. Као предиспонирајући фактор најчешће се наводи употреба нестероидних антиинфламаторних лекова и β -блокатора (50).

Никорандил, вазодилататор који се у великој мери користи за лечење ангине, као и инхибитори калцинеурина и mTOR инхибитори, који се користе као имуносупресиви су повезани са тежим облицима афтозног стоматитиса (51,52). Управо из тих разлога је неопходно пажљиво испитати тренутну примену лекова код пацијената са афтозним стоматитисом како би се идентификовао било који могући фактор повезан са учесталашћу и трајањем лезија.

1.3. КЛИНИЧКА СЛИКА АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА

Афтозни стоматитис се карактерише рекурентним појавама једне или више овалних или округлих болних улцерација у интервалима од неколико месеци до неколико дана. Лезије су еритематозним халоом јасно ограничене од околне слузокоже, а дно им је прекривено жућкасто - сивкастим фибринским ексудатом (53). Прва епизода афтозног стоматитиса се најчешће јавља у другој деценији живота и значајно утиче на квалитет живота угрожавајући основне дневне функције као што су исхрана, говор и одржавање оралне хигијене (54). Промене су локализоване на некератинизованој слузокожи образа и усана, вентралној и бочној страни језика, поду усне дупље или меком непцу. Пре појаве улцерација, врло често постоји продромални стадијум који се карактерише пецањем на месту на коме ће се афта појавити. Овај стадијум траје 2 до 48 сати (55). Током иницијалног периода долази до појаве еритема, а затим у року од неколико сати, формира се бела папула која улцерише и постепено се повећава у наредних 48-72 сата. Код већине пацијената улцерације зарастају спонтано у периоду од две недеље (56).

У зависности карактеристика лезија, разликују се три клиничка типа афтозних улцерација: 1) *Aphthae minor*, тзв. мале афте представљају најчешћи облик који се јавља код 80% пацијената са афтозним стоматитисом, пречника су до 10mm и обично се налазе на букалној и лабијалној мукози, као и на поду уста; зарастају спонтано у року од 14 дана без остављања ожиљка (57); 2) *Aphthae major* или велике афте, најчешће захватају слузокожу усана, меког непца и грла; достижу пречник већи од 10mm и могу бити присутне у устима до 6 недеља; први пут се јављају након пубертета, постају хроничне и трају 20 или више година; при зарастању остављају ожиљно ткиво; 3) *Herpetiform aphthae*, херпетиформне афте се карактеришу појавом неколико мањих лезија, неправилног облика, груписаних на једној локализацији; имају тенденцију ка спајању и формирању једне велике лезије која перзистира до 30 дана; карактеристичне су за особе женског пола и при зарастању не остављају ожиљак (58).



Слика 1. Клинички изглед афтозних лезија: А) Мале афте (*Aphthae minor*); Б) Велике афте (*Aphthae major*).

Микроскопске карактеристике афтозних лезија су неспецифичне. У преулцерозном стадијуму је присутан ћелијски инфламаторни инфилтрат са фокалном вакуолизацијом епитела, праћен дегенерацијом супрабазалних епителних ћелија. Доминантне су инфламаторне мононуклеарне ћелије, претежно мастоцити, едем везивног ткива и бројни неутрофили у периферном делу лезије. Оштећење епитела обично почиње у базалном слоју и напредује кроз површинске слојеве, што на крају доводи до улцерације и површинске ексудације. Површински слој се састоји од фибринског ексудата инфилтрираног полиморфонуклеарним леукоцитима. Током фазе зарастања долази до регенерације епитела (59).

1.3.1. Зарастање ране на оралној мукози

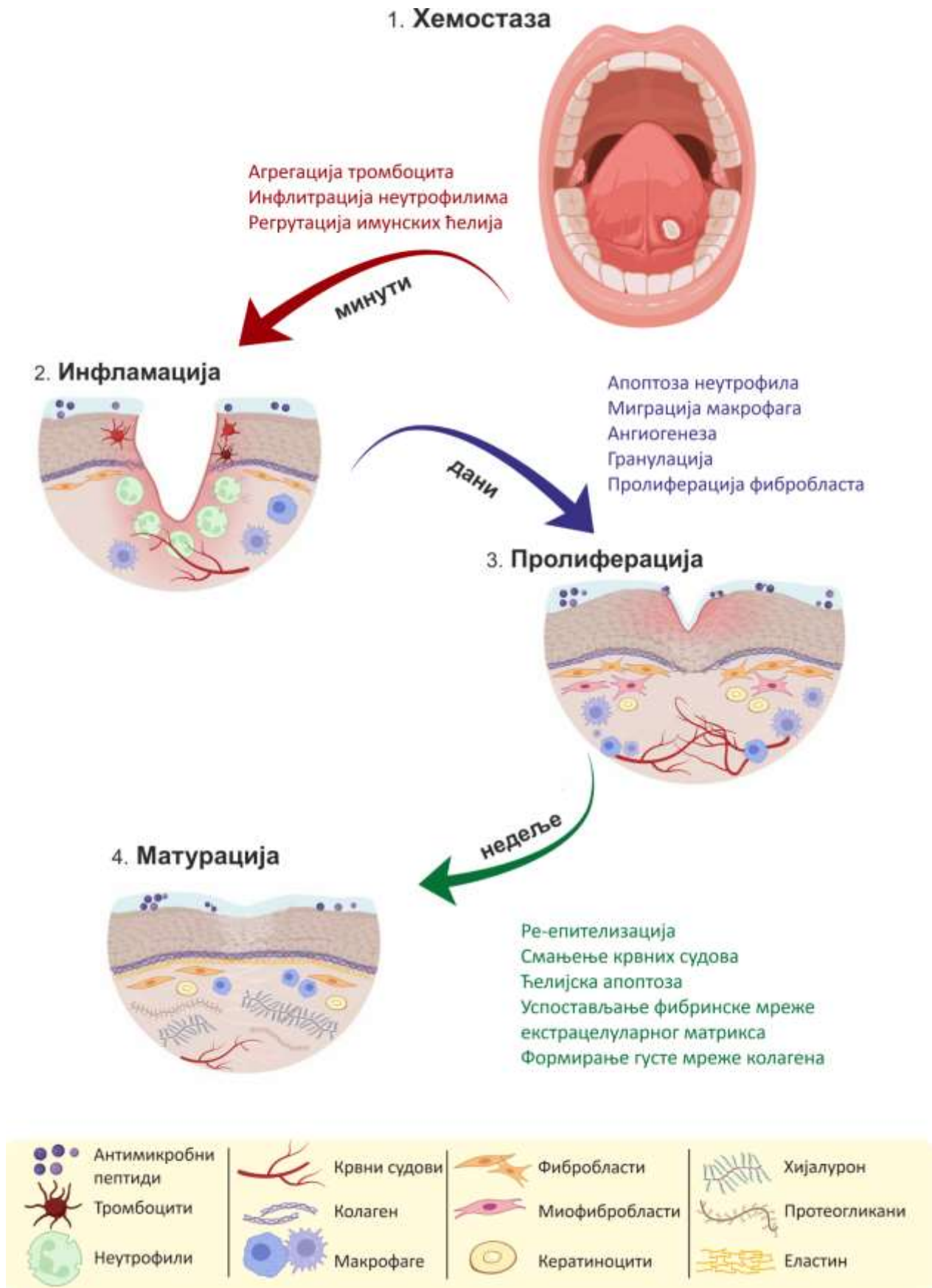
Последње деценије су унапредиле наше знање о механизмима зарастања оралних рана чиме смо допринели данашњем концепту клиничког лечења разних болести. Зарастање рана у усној дупљи није ограничено само на зарастање након случајне трауме или оперативних захвата, већ обухвата и биолошке механизме који прате низ патолошких стања као што су различити тумори и инфекције. Процес зарастања није

увек по типу *"restitutio ad integrum"*, већ често може бити праћен стварањем ожиљног ткива (60).

Постоје четири просторно и временски различите фазе карактеристичне за зарастање свих типова ткива:

- 1) **Хемостаза** – након повреде ткива наступа процес хемостазе у циљу заустављања крварења и спречавања даљег губитка крви. Само неколико секунди касније долази до активације имунског система као резултат оштећења ендотела крвних судова и последичне активације циркулишућих тромбоцита који покрећу хемостатску каскаду. Тромбоцити ослобађају биолошки активне производе као што су вазоактивни медијатори и протеазе, цитокини и фактори раста чије ослобађање је посредовано хемотактичким сигнаlima. Долази до вазоконстрикције крвних судова, а тромбоцити заједно са другим ћелијама крви као што су неутрофили и еритроцити формирају тромбоцитне чепове ојачане фибринском мрежом како би се створио крвни угрушак. Главна компонента екстрацелуларног матрикса је новоформирана фибринска мрежа која такође садржи друге протеине одговорне за ћелијску адхезију као што су фибронектин и витронектин. Овај конгломерат ћелија и матрикс богат фибрином је често назван „привремени екстрацелуларни матрикс” јер касније бива замењен гранулационим ткивом. Формирање крвног угрушка представља основ за регрутовање инфламаторних ћелија на место оштећења ткива (61).
- 2) **Инфламација** – паралелно са фазом хемостазе почиње да се одвија и следећа фаза, инфламација. Као одговор на хемокине на месту повреде долази до инфилтрације инфламаторних ћелија која достиже врхунац 24 до 48 сати након оштећења. У раној фази инфламације је присутно мање резидентних цитокина, мање крвних судова и формирање фибробласта на ивици ране. У овој фази прво се промовише уклањање остатака и патогена посредовано имунским ћелијама како би се матрикс ремоделиовао у ново ткиво. Неутрофили први мигрирају на место оштећења, врше дебридман оштећених компоненти екстрацелуларног матрикса и луче протеазе као што је матриксна металопротеиназа (енг. *matrix metalloproteinase*, ММР). Након тога, они иницирају каскаду секреције цитокина и фактора раста које повлаче друге имунске ћелије укључујући моноците, који помажу у започињању реепителизације. Након што се са површине ране уклоне микроорганизми, неутрофили напуштају место оштећења екструзијом, апоптозом и фагоцитозом. У случају продуженог зарастања рана, неутрофили абнормално перзистирају у овој фази, стварајући хронично оштећење кроз континуирано ослобађање протеазе. Два до три дана након повреде, моноцити мигрирају у рану, диференцирају се у макрофаге и представљају доминантни тип ћелија током инфламаторне фазе зарастања рана. Макрофаги луче цитокине као што су IL-1, IL-6, фактор раста фибробласта (енг. *fibroblast growth factor*, FGF), а такође и фактор раста изведен из тромбоцита (енг. *platelet-derived growth factor*, PDGF), епидермални фактор раста (енг. *epidermal growth factor*, EGF) и TGF- β који доводе до ћелијске миграције кератиноцита и фибробласта ка месту оштећења. Током касне фазе инфламације макрофаги индукују пролиферативно зарастање кроз „анти-инфламаторну” поларизацију M2 макрофага и настављају да секретују регенеративне цитокине попут IL-10. Након уклањања патогена посредовано имунским ћелијама, долази до повећања пермеабилности крвних судова и изласка трансудата из капилара, што доводи до фазе пролиферације (61,62).

- 3) **Пролиферација** – фаза пролиферације почиње након инфламаторне фазе и може трајати до три недеље као одговор на регенеративне цитокине и факторе раста. Током ове фазе започиње процес реепителизације са ивица ране. Поновно успостављање постојећих васкуларних мрежа и формирање нових крвних судова су обележја успешног зарастања ране. Ангиогенеза је процес којим нови крвни судови ничу из постојећих васкуларних мрежа како би се обновила перфузија ткива, успоставила микроциркулација и повећала оксигенација. На тај начин омогућава се формирање колагена и сазревање ране. Један од проангиогених регулатора, доминантан у овој фази зарастања, је фактор раста васкуларног ендотела (енг. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), протеин који стимулише формирање крвних судова и помаже у пролиферацији, диференцијацији и миграцији ендотелних ћелија. Како фаза пролиферације одмиче, долази до повећања капилара по ивицама ране који допремају хранљиве материје и ћелије одговорне за зарастање. Поред тога, „привремени екстрацелуларни матрикс” је замењен високо васкуларизованом стромом која доводи до формирања гранулационог ткива. Ремоделовање гранулационог ткива се врши захваљујући активности М2 макрофага који обезбеђују про-регенеративне факторе раста као што су: FGF, EGF и VEGF. Фибробласти полажу матрикс протеине, укључујући колаген и фибронектин, и обезбеђују структурни интегритет ткива. Миграторни фибробласти се диференцирају у миофибробласте чиме започињу процес контракције ране и воде ка фази сазревања (63).
- 4) **Матурација и ремоделовање ткива** - у последњој фази зарастања ране, репарирани ткиво пролази кроз фазу ремоделовања и сазревања која почиње око три недеље након оштећења ткива и може да траје до две године. Активност ММР даље помаже зарастање током фазе сазревања обезбеђујући равнотежу између таложења и деградације екстрацелуларног матрикса. Током сазревања ране, активирани миофибробласти престају да обезбеђују матрикс и гранулационо ткиво почиње да ремоделује место оштећења. Фибробласти и макрофаги подлежу апоптози и остаје све мање ћелија. Претходно слабе мреже фибронектинског ткива постају јаче формирањем већих и гушћих снопова колагена. Током времена, резидентне ћелије попут кератиноцита и макрофага настављају да ремоделују преостали трајни екстрацелуларни матрикс и на тај начин се репарирани ткиво враћа у хомеостазу (64).
На слици 2 је приказана схема зарастања рана на оралној мукози.



Слика 2. Схематски приказ зарастања ране на оралној мукози.

1.4. ДИЈАГНОЗА АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА

Обзиром на недовољно разјашњену етиопатогенезу обољења, дијагноза афтозног стоматитиса се поставља на основу анамнезе и клиничког прегледа. Позитивна породична анамнеза, присуство одређених општих обољења, примена медикамената, појава сличних лезија у прошлости, трајање и учесталост ових промена олакшавају постављање дијагнозе. До сада није дефинисан специфичан дијагностички тест за афтозни стоматитис, а биопсија није оправдана сем у случајевима када постоји сумња на премалигна стања, уколико улцерације не зарастају у очекиваном периоду. Провера комплетне крвне слике, хемоглобина, С-реактивног протеина, седиментације еритроцита и нивоа витамина Б12 може указивати на афтозни стоматитис (65).

1.5. ТЕРАПИЈСКИ МОДАЛИТЕТИ У ЛЕЧЕЊУ АФТОЗНОГ СТОМАТИТИСА

Лечење афтозног стоматитиса се заснива на уклањању симптома и скраћивању периода зарастања. Разликује се у зависности од тежине обољења, учесталости, величине и броја улцерација. Код пацијената са постојањем неког општег обољења, терапија је специфична и односи се на лечење примарне болести што доводи до ремисије оралних улцерација (5).

Без обзира на тип улцерација, свим пацијентима се препоручује атрауматско одржавање оралне хигијене, одређен хигијенско дијететски режим у циљу избегавања киселе хране и пића који се наводе као окидачи. Примена оралних антисептика представља први терапијски избор код ових пацијената. У комплекснијим случајевима који трају дуже од две недеље, локално се могу применити препарати на бази кортикостероида. Упркос дугогодишњој употреби кортикостероида у терапији афтозног стоматитиса, још увек недостају апсолутни докази о њиховој ефикасности након локалне примене (66).

1.5.1. Локална терапија афтозног стоматитиса

Локална примена одређених медикамената је најчешће довољна у терапији спорадичних епизода мањих афти, са благом клиничком сликом.

Студије су показале да орални антисептици, најчешће на бази хлорхексидин-диглуконата, смањују учесталост, трајање лезије и интензитет бола (67,68). Због својих нежељених ефеката, осећаја горког укуса у устима и пребојавање оралне слузокоже и зуба, њихова примена је ограничена. Употреба лидокаина је такође оправдана код пацијента са афтозним стоматитисом, мада је показано да анестетик ропивакаин има продужено аналгетско дејство због чега има предност у сузбијању бола код оралних улцерација (69). Антибиотски препарати, као што су 0,2% раствор миноциклина или раствор тетрациклина, су ефикасни у редукцији трајања болних улцерација, при чему нема нежељених ефеката након њихове употребе. Примењују се неколико пута дневно (70). Кортикостероиди се већ дуго примењују у терапији афтозног стоматитиса смањујући период зарастања и интензитет бола. У зависности од тежине клиничке слике користе се триамцинолон ацетонид, флуоцинолон ацетонид или клобетазол пропионат, редом од мање ка већој потенцији, у виду крема или раствора. Могу бити различите концентрације, од 0,05% до 0,5% и препоручује се њихова примена директно на лезије при чему се избегава унос хране и пића у наредних 30 минута како би дејство било ефикасније. Клобетазол се примењује код пацијената са тежом клиничком сликом у концентрацији од 0,025% као алтернатива пре преписивања системске терапије (71).

Дексазон је такође показао позитивне ефекте у зарастању и смањењу бола, али могућност настанка псеудодмембранозне кандидијазе ограничава његову употребу. Амлексанокс, антиинфламаторни лек, инхибира синтезу и ослобађање медијатора запаљења, леукотријена и хистамина из мастоцита, неутрофила и мононуклеарних ћелија, поспешујући зарастање улцерација и смањење бола. У терапији афтозног стоматитиса препоручује се његова безбедна примена у облику 5% пасте, у трајању од 5 дана (72). Триклосан, антибактеријски агенс који се налази у саставу пасти за зубе и средстава за испирање уста, има антиинфламаторна и аналгетска својства. Показано је да има потенцијалну улогу у редукацији броја лезија као и смањењу учесталости афтозног стоматитиса (9). Употреба конусне оловке чија је активна супстанца 1-2% сребро-нитрат, једном у току дана, је показала значајан аналгетски ефекат у трајању од 24 сата. Као могуће нежељено дејство се наводе мукокутана реакција и пребојавање слузокоже (73). Примена ласера постаје све популарнија у општој стоматологији због њених терапеутских ефеката, као што су аналгезија, зарастање рана и антиинфламаторно дејство. Сматра се да делују кроз различите механизме као што су ефекти на метаболизам лимфоцита, модулација хистамина, простагландина, IL-а, IFN-а и TNF-а (74). Ласери мале снаге поспешују реепителизацију повећањем респираторног метаболизма који регулише митотску активност, синтезу колагена и пролиферацију епитела. У зависности од врсте примењеног ласера, време зрачења може представљати недостатак јер може утицати на здравље пацијента и терапеута (75).

1.5.2. Системска терапија афтозног стоматитиса

Код мањег броја пацијената, који имају честе епизоде мањих улцерација или пацијенте са великим улцерацијама, треба узети у обзир системску терапију. С друге стране, овакав начин примене медикамената повећава ризик од могућих нежељених ефеката.

Системска примена кортикостероида као што је преднизон, је индикована код пацијената са тешком клиничком сликом великих афти. *Sharda N.* је са сарадницима показао да је примена левамизола (50mg) у комбинацији са малим дозама преднизона (5mg) у трајању од три недеље довела до статистички значајне редукације у интензитету бола, броју улцерација и временском периоду зарастања, док величина лезија није значајно смањена (76). Препоручена је комбинована употреба преднизона у мањој дози управо због могућих нежељених ефеката: депресија, хипергликемија и супресија спреге хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда (77). Како би се избегли озбиљни нежељени ефекти системских кортикостероида, испитивана је употреба других медикамената. Пентоксифилин, Колхицин, Дапсон и Талидомид могу имати потенцијалну улогу у спречавању настанка нових афтозних лезија. Пентоксифилин смањује инфламацију делујући на ћелије беле крвне лозе и њихове цитокине. Пацијенти третирани пентоксифилином имају значајни мањи број лезија и смањен интензитет бола (78). Колхицин је такође ефикасна у терапији афтозног стоматитиса али због хепатотоксичности и интеракције са другим лековима његова употреба је ограничена (79). Употреба имуномодулатора је индикована у изузетно ретким случајевима када није могуће постићи контролу обољења на други начин. Талидомид у дневној дози од 50–100mg је најефикаснији у сузбијању тежине клиничке слике афтозног стоматитиса али се његова примена такође ограничава због могућих озбиљних штетних ефеката (80). У системској терапији афтозног стоматитиса је описана и дуготрајна ефикасна примена цинк-сулфата која доводи до значајног смањења величине и броја улцерација без икаквих нежељених ефеката (81). Велику пажњу у медицини и стоматологији привукла је терапија озоном. Озон представља моћан оксиданс са јаким антимикробним и

аналгетским дејством, могућношћу стимулације циркулације и имунског одговора (82). Примена озона у лечењу афтозног стоматитиса доводи до смањења бола, величине улцерација и трајања болести код пацијената различитог узраста, без разлике између полова. Поред бенефита у клиничкој слици, показано је да терапија озоном доводи до смањења инфламације и едема у ткиву, инхибиције некробиотских процеса, епителизације улкуса, смањења броја инфламаторних ћелија и регенерације ћелијских слојева у епителу (83). Промене уочене приликом клиничког прегледа као и на микроскопском нивоу, указују на ефикасност озонотерапије у лечењу афтозног стоматитиса. Поред великих предности у терапији, у случају удисања озона у великим дозама, може изазвати алергију и астму због иритативног дејства на респираторни систем (84).

1.5.3. Фитотерапија у лечењу афтозног стоматитиса

Употреба природних биљних препарата као алтернативна терапија афтозног стоматитиса је већ деценијама широко прихваћена у многим земљама. Фитотерапија се примењује у циљу смањења интензитета бола и времена зарастања оралних улцерација без могућности настанка нежељених ефеката или резистенције на одређене лекове. Ефекат већине испитиваних биљних препарата се заснива на дејству биоактивних једињења као што су: полифеноли и иридоиди.

Алоје вера (енг. *Aloe vera*) се користила за лечење оралног лихен плануса и афтозног стоматитиса. Биолошки ефекти ове биљке се односе на антифунгално, антиинфламаторно, антиканцерогено дејство и имуномодулаторну активност (85). Истраживања су показала да ферментациони гел алоја вера ефикасно олакшава процес зарастања и ремети метаболизам микроорганизама изолованих из афтозних лезија. На тај начин спречава штетно дејство оралних бактерија као што су *Actinomyces*, *Granulicatella* и *Peptostreptococcus* и побољшава квалитет живота пацијента са афтозним стоматитисом (86). Дамаск ружа (лат. *Rosa damascena*) се такође користи у традиционалној медицини у терапијске сврхе захваљујући свом антиинфламаторном, антиоксидативном и антибактеријском својству која поспешују процес зарастања улкуса (87). Камиљи трн (енг. *Camel thorn*), род биљака из породице махунарки које расту у пустињама и могу да издрже најнеповољније услове животне средине, има антиинфламаторне и заштитне мембранске карактеристике. Може да делује као инхибитор хистидин декарбоксилазе и на тај начин спречава настанак улцерација. Описана је његова примена у терапији афтозног стоматитиса (88). Куркума (енг. *Turmeric*) је сува ризоматозна биљка са антиинфламаторним и антиоксидативним дејством која сузбија инфламаторни процес и има потенцијалну улогу у смањењу броја и величине оралних улцерација као и интензитета бола (89). Тинктура камилице (енг. *Chamomile*) је биљни препарат који има широку примену. Његова употреба у терапији оралних обољења је индикована за лечење афтозног стоматитиса, гингивитиса и ларингитиса. Поседује антиинфламаторно, антибактеријско, антифунгално и аналгетско дејство. Своје позитивне ефекте остварује захваљујући флавоноидима и есенцијама који представљају главне активне супстанце камилице. *Martins* и сарадници су описали дејство камилице након локалне примене у терапији трауматски индукованог улкуса на језику пацова. Резултати су показали да је до комплетног зарастања у експерименталној групи дошло након 5 дана третмана, док је за потпуно зарастање у контролној групи третираној кортикостероидима, било потребно 14 дана (90).

У последње време се све већи број истраживача окреће ка испитивању лековитих биљака у терапији афтозног стоматитиса првенствено због њиховог антиоксидативног и антиинфламаторног ефекта. Актуелни подаци у литератури који говоре о улози

лековитих биљака и фитотерапијских средстава у лечењу афтозног стоматитиса указују на ефикасност и безбедност њихове примене уз значајан ефекат у смањењу бола и периода зарастања улцерација.

1.6. *GALIUM VERUM*

Galium verum L. (*G. verum*) још назван броћац, Иванова трава, жуто ивањско цвеће, је вишегодишња зељаста биљка из породице *Rubiacea*. Ове биљна врста се карактерише четвороугластом усправном стабљиком која може достићи висину од 60 до 120 cm. Листови су тамно зелене боје, широки око 2 mm, дужине око 1-3 cm, глатког и сјајног лица, док им је наличје длакаво. Златно жути цветови су груписани у велике цвасти, а црн плод је ситан. Надземни делови ове биљке се дуги низ година користе у терапији разних обољења. Прикупљање ове биљне врсте врши се у летњем периоду, најчешће између јула и септембра, када је време сунчано и суво. Сматра се симболом здравља и дуговечности (91).



Слика 3. Ивањско цвеће.

1.6.1. Распрострањеност, назив и употреба ивањског цвећа

Ивањско цвеће је пореклом из Европе и Азије, где се и најчешће примењује у традиционалној медицини, док је великој мери распрострањено и у северној Америци и Африци. Постоји око 650 врста рода *Galium* који расту на надморској висини између 0 и 1800 m, на различитим стаништима укључујући ливаде са сувим песком, стеновита узвишења, ивице путева, дине и морске обале. Назив рода потиче од грчког израза „gala“

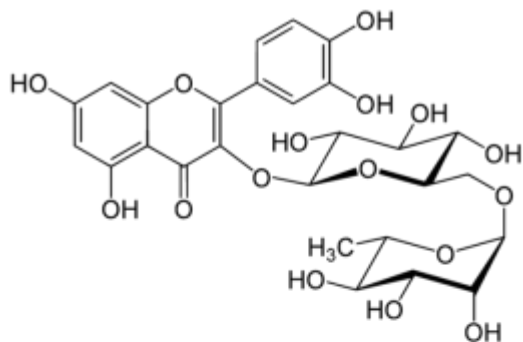
што значи млеко, и говори о уобичајеној употреби ове биљне врсте за сирење млека и производњи сира, и латинске речи ”*verus*“ која значи прави. Такође је познато да су се листови *G. verum* користили за пуњење душека. Поред тога, жути пигмент који дају цветови ове биљке се традиционално употребљавао за бојење хране, а црвена боја из корена се користила за бојење вуне. Традиционална медицинска употреба ивањског цвећа у улози диуретика и спазмолитика је одавно описана (92).

1.6.2. Хемијски састав *G. verum*

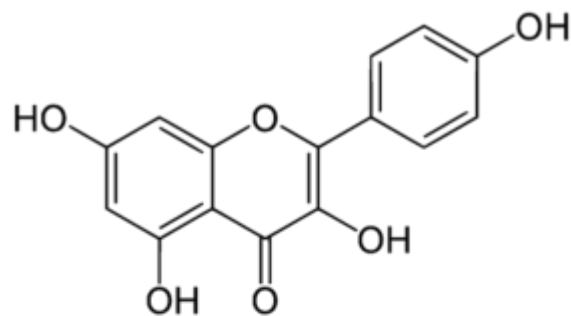
Иако је стара стотинама година, традиционална медицина са модерном медицином дели једну од најважнијих компоненти у терапији различитих обољења, а то је извор биоактивних једињења. Примена биљака је најстарији облик здравствене заштите познат човечанству и у поређењу са синтетским лековима има предност због мале вероватноће нуспојава и значајне количине биоактивних супстанци. *Galium* врста као лековита биљка има дугу историју и последњих година привлачи пажњу многих истраживача због тога што је лако доступна, безбедна и ефикасна. Истраживачки рад је посебно интензиван у областима са аутохтоном флором богатом овом биљном врстом као што су Србија, Словачка, Румунија и Украјина (93). Лековита својства ивањског цвећа се огледају у фармаколошкој активности једињења добијених из надземног дела биљке. Фитохемијском анализом је показано да су у највећој мери изолована следећа биоактивна једињења: полифеноли, иридоидни гликозиди, тритерпени и антрахинони, док су сапонини, етарска уља, витамин Ц, пигменти, танини и алкалоиди присутни у мањим количинама. Полифеноли и иридоиди представљају једињења која су доминантна у екстрактима *G. verum* и она су највише изучавана (94).

1.6.3. Полифеноли

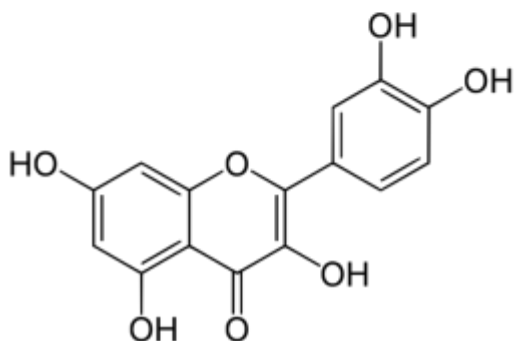
Биљке су извор биолошки активних производа класификованих као секундарни метаболити, међу којима су фенолна и полифенолна једињења најзначајнија. Ова једињења карактерише присуство једног или више ароматичних прстенова који садрже хидроксилне групе и/или функционалне деривате (етри, естри и гликозиди) (95). Велики број различитих полифенола се налази у биљној храни, укључујући поврће: броколи, лук и купус; воће: грожђе, крушке, јабуке, трешње и бобичасто воће; махунарке (соја), житарице, пића биљног порекла и чоколаду. Такође су присутни и у кафи, чају и црном вину (96). На основу хемијске структуре, природни полифеноли се могу поделити у пет класа: флавоноиде, фенолне киселине, лигнане, стилбене и остале полифеноле. Флавоноиди и фенолне киселине су најзаступљеније класе и чине око 60% и 30% свих природних полифенола (97). Њихова структура је приказана на слици 4. Класификација природних полифенола је приказана у Табели 1.



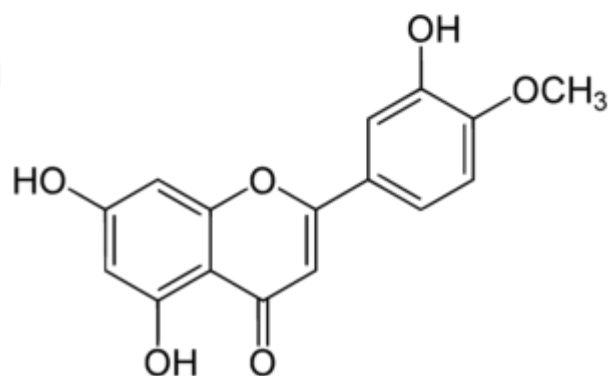
Рутин



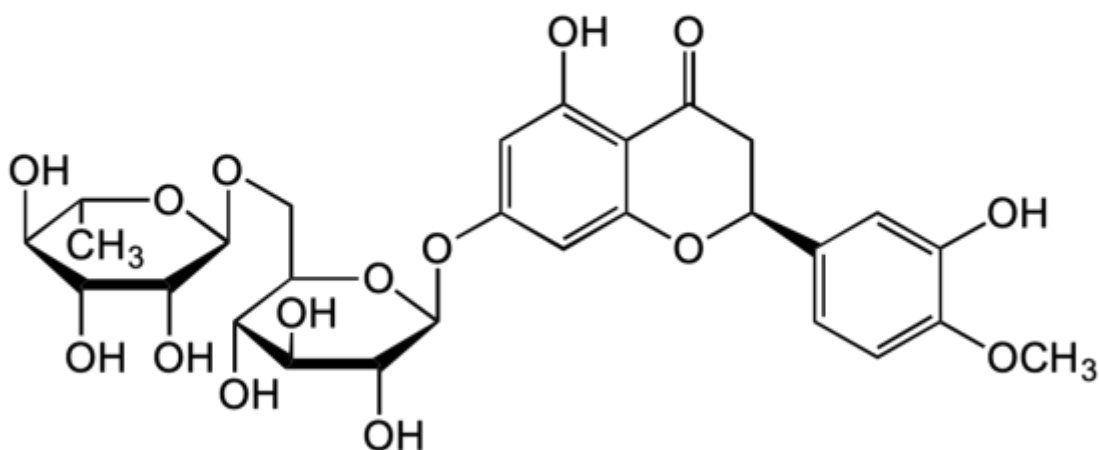
Кемферол



Кверцетин



Диосметин



Хесперидин

Слика 4. Хемијска структура најзначајнијих флавоноида

Табела 1. Класификација природних полифенола

Класе	Репрезентативни чланови класе	
Флавоноиди	Антоцијани	Делфинидин, пелергонидин, цианидин, малвидин
	Флаваноли	Епикатехин, епигалокатехин, процианидин
	Флаванони	Хесперидин, нарингенин
	Изофлавоноли	Генистеин, даидзеин
	Флавоноли	Апигенин, лутеолин, кризин
	Флавоноли	Кверцетин, кемферол, изорхамнетин, мирицетин, галангин
Фенолне киселине	Хидроксибензоева киселина	Елагинска киселина, гална киселина
	Хидроксициметна киселина	Ферулинска, хлорогена киселина
Лигнани	Сесамин, секоизолакирирезинол диглукозид	
Стилбени	Резвератрол, претостилбен, пицеатанол	

1.6.4. Терапеутска примена полифенола

Велики број истраживања спроведених на животињама и људима указују на антиоксидациона и антиинфламаторна својства полифенола која могу потенцијално служити у третману различитих болести. Показано је да дугорочно конзумирање хране богате полифенолима има протективан ефекат у настанку одређених карцинома, развоја кардиоваскуларних обољења, дијабетеса типа 2, остеопорозе, панкреатитиса, гастроинтестиналних поремећаја, обољења плућа и неуродегенеративних болести (98–104).

Антиоксидациона својства полифенола и секундарних метаболита зависе од хемијске структуре и везаних функционалних група, тј. пермутација функционалних група и нуклеарне структуре. Број хидроксилних остатака такође у великој мери утиче на антиоксидациону активност уклањањем слободних радикала и нарушавањем хелације металних јона. Поред тога, друге структуре попут О-метилације, присуства више двоструких веза и степена полимеризације доприносе антиоксидационој улози полифенола (105). Вредност рН средине такође утиче на антиоксидациону активност полифенола. Доступни подаци указују да је у киселој средини нижи антиоксидациони капацитет полифенола, док је у базној средини виши, па сходно томе они имају различиту улогу у зависности од делова тела у којима се примењују (106). Најчешће се помињу два механизма одговорна за ову улогу полифенола. Један је директно "хватање" слободних радикала и формирање стабилних комплекса чиме се спречавају даљи

оксидациони процеси, а други стварање водоник пероксида који регулише активност имунског одговора.

Биолошке карактеристике полифенолних екстраката се добијају коришћењем антиоксидационих тестова и хроматографском анализом HPLC (енг. *High-performance liquid chromatography*).

Улога полифенола у заштити од неуродегенеративних болести, укључујући Алцхајмерову и Паркинсонову болест је такође описана. Сматра се да епикатехин галат, из класе полифенола инхибира дејство неуротоксина укљученог у патогенезу Паркинсонове болести и на тај начин спречава развој овог обољења (107).

Бројна истраживања на ћелијском нивоу, као и на животињама и људима, су спроведена у циљу испитивања утицаја полифенола на статус телесне тежине. Сама чињеница да су намирнице богате полифенолима богате и хранљивим, а не енергетским састојцима, говори о смањеном уносу калорија код пацијената који конзумирају исхрану која садржи висок ниво полифенола па је и ризик од гојазности мањи. Такође је показано да полифеноли инхибирају генезу, диференцијацију и пролиферацију адипоцита, превенирају инфламацију и стимулишу липолизу (108,109).

Полифеноли инхибирају проинфламаторне транскрипционе факторе и интерагују са протеинима укљученим у експресију гена и ћелијску сигнализацију и остварујући протективни ефекат у настанку многих хроничних обољења изазваних инфламацијом (110).

Механизам дејства полифенола код пацијената са дијабетесом тип 2 се огледа у заштити бета ћелија панкреаса од процеса оксидације, антиоксидационом и антиинфламаторном ефекту, смањеној дигестији скроба због супресије активности ензима и инхибицији повишеног стварања глукозе (111).

Антиканцерогени ефекат полифенола се огледа у инхибицији ћелијског раста и индукцији апоптотске смрти туморских ћелија због чега имају широку примену у терапији карцинома (112,113). Предност њихове примене се заснива на лакој доступности, ниској токсичности и разним биолошким ефектима. Комбинација цитопротективних ефеката на здравим ћелијама и цитотоксичних ефеката на канцерогеним ћелијама представља главну специфичност полифенола у антиканцерогеној улози.

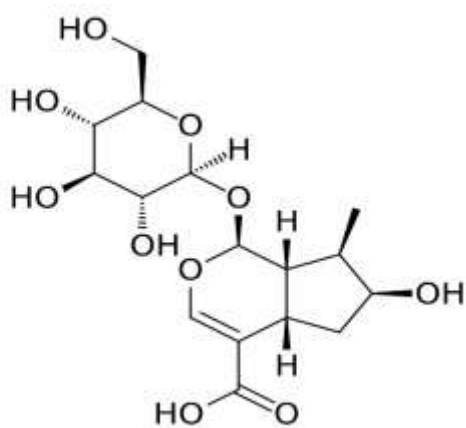
1.6.5. Садржај полифенола у ивањском цвећу

Различити фактори утичу на садржај полифенола у биљним екстрактима. Избор метода екстракције, хемијска структура екстрахованог једињења, трајање процеса екстракције, поларност растварача, температура и одабрано подручје за сакупљање материјала су неки од најважнијих фактора. Метода екстракције под рефлуксом се наводи као најпогоднија због изразите растворљивости флавоноида и фенола у растварачу (114). Традиционалне методе за припрему узорака, одвајање, детекцију и идентификацију се све више замењују савременим техникама. Време екстракције, температура, врста растварача за пуњење, број поновљених екстракција, као и избор растварача за екстракцију су кључни параметри који утичу на принос. Виша температура истовремено повећава растворљивост, смањује вискозитет и површински напон растварача доприносећи већој брзини екстракције. Пре екстракције, материјал се претходно обрађује млевењем, сушењем и поступком хомогенизације. Избор сушења такође значајно утиче на укупан садржај фенола у биљном екстракту. Показано је да сушење процесом замрзавања доприноси вишем нивоу фенола у узорцима у поређењу са сушењем на ваздуху (115).

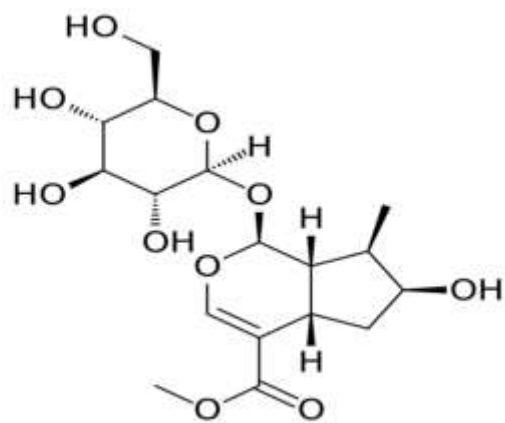
Слободни полифеноли заједно са гликозидима и олигомерима могу се лако екстраховати растварачима као што су метанол, етанол, ацетонитрил и ацетон или комбинацијом ових растварача са водом. Циљ је одабрати растварач ниског вискозитета како би се убрзао пренос масе и добио већи принос. Вода као самостални растварач поред својих предности, има ограничену примену због немогућности изоловања полифенола везаних за биомолекуле као што су терпена, липида, полисахарида и др. У процесу растварања предност се даје металнолним и етанолним растварачима због могућности изоловања значајно веће количине полифенола (116).

1.6.6. Иридоиди

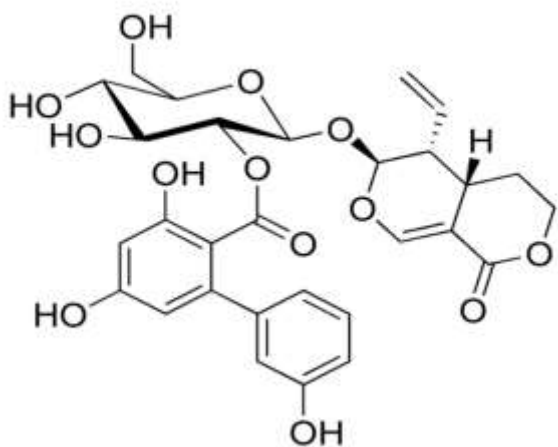
Иридоиди представљају велику класу монотерпена који се састоје од метилциклопентан-[С]-пиранског скелета (117). У највећем делу су присутни у биљним врстама, а могу се наћи и код животиња. Према хемијској структури, могу се поделити у четири групе: иридоидни гликозиди, секоиридоидни гликозиди, негликозидни иридоиди и бис-иридоиди. Најчешће су у облику гликозида и комбинују се са глукозом на С-1 хидроксилној групи. Већина гликозида поседује слична својства као што су изразита модификација и брза апсорпција. Њихово терапеутско дејство у третману разних болести довело је до пораста интересовања у овој сфери истраживања. Хемијска структура најзначајнијих иридоида је приказана на слици 5.



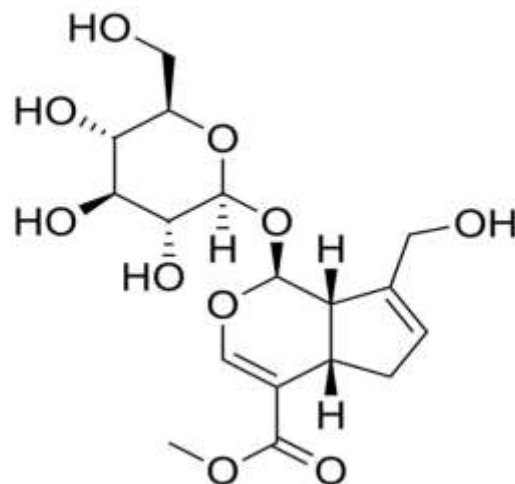
Логанска киселина



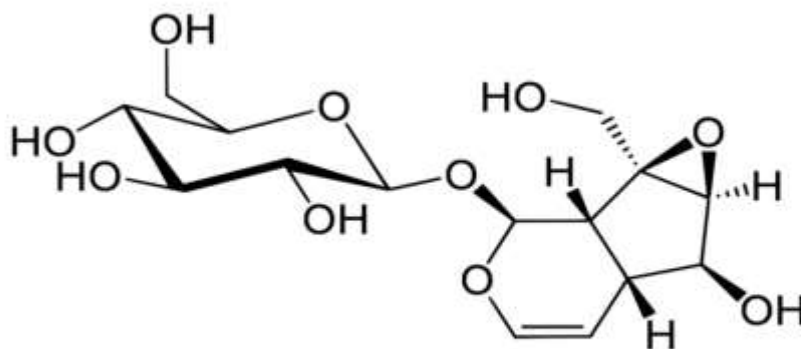
Логанин



Амарогентин



Генипозид



Каталпол

Слика 5. Хемијска структура најзначајнијих иридоида

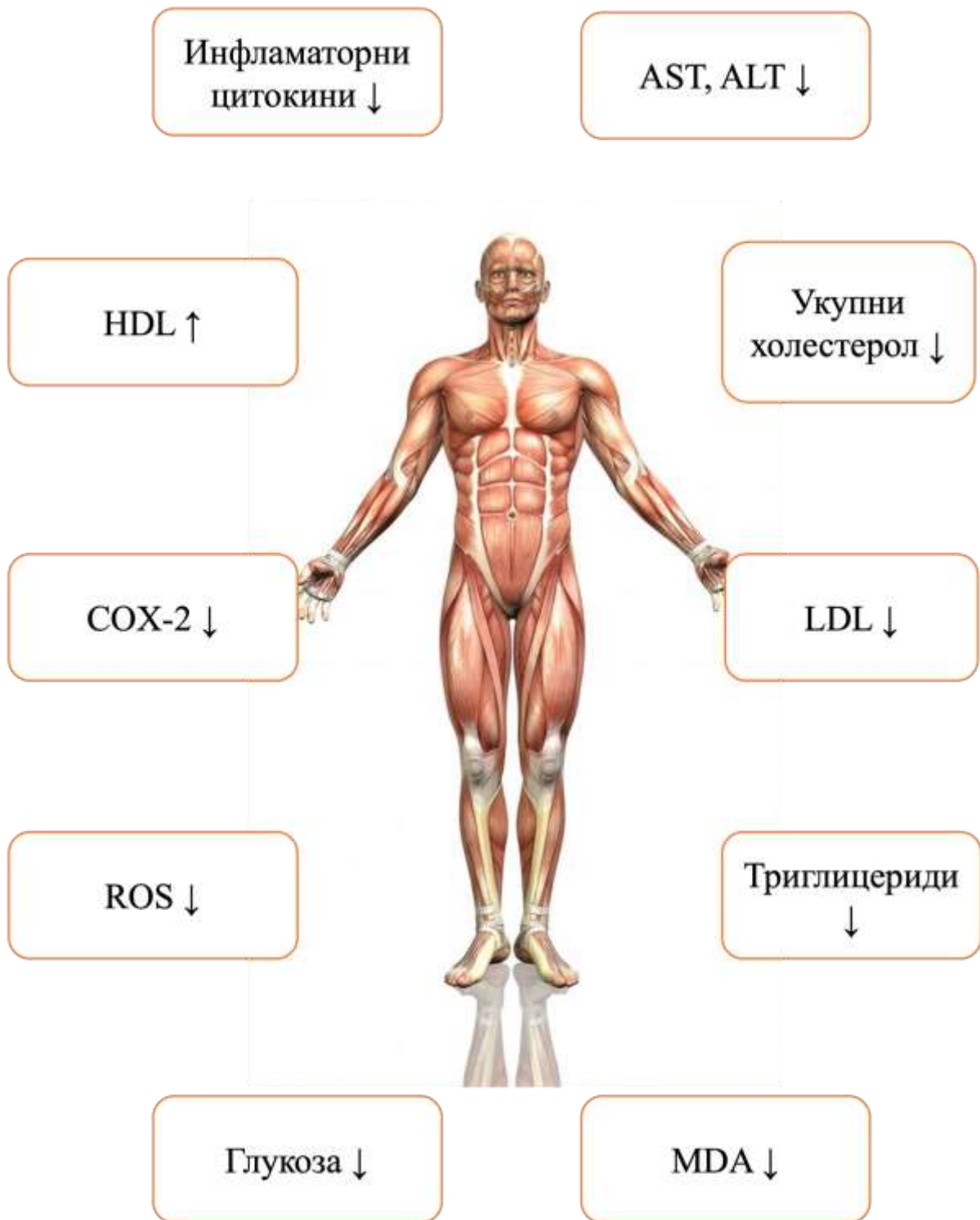
1.6.7. Биолошка улога иридоида

Током бројних студија о биолошкој активности иридоида, откривен је широк спектар њиховог дејства на људско тело. Највећи број студија се односи на кардиоваскуларни, хипогликемијски, хиполипидемијски, хепатопротективни, антиинфламаторни, антитуморски, антивирусни и имуномодулаторни ефекат (118–120). Улога иридоида у промоцији здравља се заснива на антиоксидационој и антиинфламаторној активности. Антиинфламаторно дејство остварују инхибицијом циклооксигеназе 2 (енг. *Cyclooxygenase*, COX-2), проинфламаторних цитокина и простагландина E2 (енг. *Prostaglandin E2*, PGE2) (121). Такође је показано да иридоиди могу повећати експресију транскрипционих фактора укључених у регулацију метаболизма липида, као што су рецептор активирањем пролифератором пероксизома (енг. *peroxisome proliferator-activated receptors*, PPARs) и протеини који везују регулаторне елементе стерола (енг. *Sterol regulatory element-binding proteins*, SREBPs). Описана је улога иридоидних гликозида у контроли хипергликемије и хиперлипидемије. Њихови ефекти су проучавани на експерименталном мишјем моделу дијабетеса. *Kang J.* је у својој студији показао да иридоидни гликозиди значајно утичу на толеранцију на глукозу, као и на експресију протеина везаних за сигнални пут PI3K-Akt/PKB који је одговоран за метаболизам инсулина (122). На основу тога можемо претпоставити да контрола хипергликемије и хиперлипидемије може бити побољшана применом иридоида.

Међу различитим иридоидима са антиинфламаторним својствима, посебно је занимљива логанска киселина, због свог потенцијалног терапеутског дејства са високом ефикасношћу инхибиције COX-2. Поред високог афинитета за COX-2, смањује експресију одређених проинфламаторних цитокина: TNF- α , IL-1 β и IL-6 (123).

Истраживачи су дуго покушавали да пронађу природно липофилно једињење са својствима ендогених неуротропних фактора које би могло да индукује диференцијацију неурона и регенерацију нервног ткива. Данас сви доступни подаци сугеришу да су управо иридоиди класа природних једињења са таквим својствима и да се потенцијално могу примењивати у терапији неуродегенеративних обољења (124).

Најзначајнији биолошки ефекти иридоида у људском организму су приказани на слици 6.



Слика 6. Улоге иридоида у људском организму

1.6.8. Друге биоактивне компоненте ивањског цвећа

Полифеноли и иридоиди представљају процентуално најзаступљенија једињења у ивањском цвећу и управо из тог разлога су и заслужна за већину њиховог ефекта. Поред наведених једињења, у мањој мери су присутни фитостероли, антрахинони и монотерпени (94).

Фитостероли означавају биљне стероле и њихове засићене облике. У исхрани се могу наћи у нерафинисаним биљним уљима, орасима, семенкама и махунаркама. Називају их "биљним холестеролом" због њихове структурне сличности холестеролу (125). Најзначајнија улога фитостерола се огледа у смањењу концентрације холестерола у крви снижавањем серумског LDL без утицаја на концентрацију HDL холестерола. Поседују антиинфламаторно дејство, регулишу раст и промовишу синтезу протеина и имају улогу у регулисању имунског одговора (126).

Данас је познато да су у надземном делу жутог ивањског цвећа присутни монотерпени бетулалбузид А и (2E)-2,6-диметил-2,7-октадиен-1,6-диол-6O- β -глукопиранозид (127). Њихова најзначајнија, антимикуробна улога се огледа у могућности дисрупције ћелијске мембране (128).

У доступној литератури је описано различито фармаколошко дејство антрахинона које подразумева антиканцерогене, антиинфламаторне, антиоксидационе, антибактеријске, антивирусне и имunosупресивне ефекте. Због тога се све више пажње посвећује њиховој примени у превентивне и терапијске сврхе различитих обољења код људи (129).

1.6.9. Фармаколошко дејство ивањског цвећа

Једињења *Galiuma* су први пут доживела медицинску примену касних 1960-их година када је откривено да се ⁶⁷Ga-цитрат, убризган у животиње са одређеним врстама тумора, концентрише на местима активних туморских ћелија (130). Накнадне студије на људима потврдиле су ове налазе и поменуто једињење је уведено у званичну употребу као средство за идентификацију и снимање тумора код пацијената. Развојем софистицираније технологије снимања у Сједињеним Америчким Државама, ова врста скенирања је замењена скенирањем позитронске емисионе томографије (енг. *Positron emission tomography*, PET), међутим, ⁶⁷Ga скенирање и даље остаје модалитет снимања у деловима света где савременије методе нису доступне (131).

1.6.9.1. Антиоксидациона улога

Антиоксидациона својства метанолних екстраката ивањског цвећа са два различита локалитета у Србији су испитивана. Резултати оба истраживања су показала веома битну улогу ове биљне врсте као "чистача", неутрализацијом 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикала, хидроксилних радикала (OH) и водоник пероксида (H₂O₂). Антиоксидационе активности надземног дела *G. verum* су испитиване коришћењем различитих *in vitro* тестова. За способност уклањања радикала DPPH, екстракт је показао снажну редукциону моћ која упоредива са витамином Ц. Такође је запажена значајна ефикасност у уклањању азот оксида и водоник пероксида (132). Укупна количина фенолних једињења у екстракту била је одређена као еквиваленти галне киселине, а укупни садржај флавоноида је био израчунат као еквивалент кверцетина.

Обзиром да је највећи број истраживања заснован на *in vitro* тестовима, било је потребно спровести испитивање и на експерименталним животињама па је недавно спроведена студија која је испитивала антиоксидациону улогу ивањског цвећа код

пацова који су били изложени стресу. Фитохемијском анализом је показано да су преобладајуће биоактивне компоненте хлорогена киселина, рутин и кверцетин, и да је третман ивањским цвећем допринео значајном порасту антиоксидационе активности ензима у односу са контролу (133).

У погледу садржаја антиоксиданаса, одређених као флавоноиди и укупни полифеноли, екстракт *G. verum* се показао као задовољавајући и одговара идеји замене хемијских средства природним у формулацији одређених дерматокосметичких препарата. Увођење екстракта *G. verum* у припрему дерматокосметичких препарата омогућава да се добију препарати fine текстуре чије компоненте су стабилне у погледу механичких и физичких својстава и биокомпатибилности (93).

1.6.9.2. Имуномодулаторна улога

Доступни подаци о имуномодулаторној улози ивањског цвећа су оскудни. *Shinkovenko IL* и аутори су проучавали хемијски састав и имуномодулаторну активност етанолног екстракта *G. verum*. Резултати су показали да етанолни екстракт ивањског цвећа значајно стимулише трансформациону активност имунокомпетентних крвних ћелија при чему је у концентрацији од 96% етанола екстракт најактивнији. Процент пролиферације лимфоцита под утицајем 96% етанолног екстракта је повећана за 8,04–6,77 пута у поређењу са спонтаном трансформацијом и за 1,36–1,14 пута у поређењу са стимулацијом фитохамаглутином (134). Исти истраживачи су у свом другом истраживању испитивали утицај полисахаридних и фенолних комплекса на имуномодулаторну активност воденог раствора ивањског цвећа. Показали су да је најнижа имуномодулаторна активност у полифенолним комплексима док су полисахаридни комплекси били значајно активнији. Највећа имуномодулаторна активност утврђена је за течни екстракт у разблажењу 1:20. Његова активност је већа за 59,4% у поређењу са спонтаном трансформацијом лимфоцита и за 18,5% већа од референтне супстанце фитохамаглутина. Добијени резултати говоре о могућем синергистичком дејству полифенола и полисахарида у екстракту ивањског цвећа на потенцијал његове имуномодулаторне активности (135).

1.6.9.3. Антитуморска улога

Упркос значајном напретку у дијагностици и лечењу малигнитета, болест и даље представља главни здравствени проблем у свету. Хемотерапија је врста лечења која делује цитотоксично на малигне ћелије и један је од најефикаснијих третмана за метастатске туморе. Основни проблем у лечењу оболелих од карцинома су нежељена дејства и резистенција на лекове. Истраживачи су све више покушавали да пронађу једињења која утичу на природни процес апоптотске смрти ћелије и која имају мање нежељених ефеката. Традиционална употреба ивањског цвећа је већ дуго година оправдана у терапији малигну болести и тако представља основ у овој сфери истраживања. *Schmidt M* и аутори су испитивали утицај декокта ивањског цвећа на хемосензитивне и хеморезистентне ћелијске линије карцинома ларинкса. Показали су да је водени екстракт деловао цитотоксично на обе ћелијске линије, посебно на хеморезистентне. Такође активност ММР-2 је значајно снижена у три од четири ћелијске линије, док утицаја на ангиогенезу није било. Добијени резултати говоре у прилог могуће употребе биљних лекова као превентивног и/или пратећег терапијског модалитета код тумора главе и врата. Додатно, *in vitro* тестовима је показано да метанолни екстракт ивањског цвећа у високој концентрацији индукује апоптозу туморских ћелија колоне преко *Wax* сигналног пута, као и да доводи до повећања

интрацелуларног нивоа слободних врста кисеоника сугеришући да екстракт *G. verum* има улогу у третману карцинома колона (136).

1.6.9.4. Антимикробна улога

Потрага за агенсима биљног порекла који имају антибактеријско и антифунгицидно дејство је међу актуелним питањима са којима се фармацеутска индустрија стално суочава. Познато је да биљке из рода *Galium* имају широку примену у лечењу кожных обољења, респираторних и урогениталних поремећаја (91,132,137). Бројне експерименталне студије спроведене широм света указују на антимикробна својства ове биљне врсте. Међу њима треба издвојити *G. verum*, чије липофилне фракције показују широк спектар антимикробне и антифунгалне активности. Група аутора је показала да водени и етанолни екстракти ивањског цвећа у концентрацијама од 20%, 60% и 96% остварују значајан ефекат на *Escherichiu coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и *Candidu albicans* (138).

1.6.9.5. Ефекат на централни нервни систем

Надземни делови биљке *G. verum* дуго су примењивани као агенси са седативним дијафоретичним, депуративним, антиконвулзивним дејством, у третману нервозе и фобије (139). Студија аутора из Румуније је испитивала ефекте ивањског цвећа на функцију хипоталамусно-хипофизно-надбубрежну осовину. Показали су да је примена 25 mg екстракта ивањског цвећа на 100 g телесне тежине у условима анакинетичког стреса довела до важних морфолошких промена на нивоу целе осовине. Неуросекреторна активност у магноцелуларној области, као и у парвоцелуларној области паравентрикуларних једара је била изражена (140).

Излагање животиња анакинетичком стресу допринело је стимулативном ефекту биоактивних једињења садржаних у екстракту *G. verum* и дејству на морфологију и функцију мозга, хипофизе и надбубрежних жлезди.

Обзиром да у доступној литератури није описан утицај ивањског цвећа на афтозни стоматитис, остаје непознат његов утицај на редокс статус код пацијената са афтозним стоматитисом као и да ли екстракт ове биљке може да ублажи хистолошке и инфламаторне промене изазване индукцијом оралних улцерација.



ЦИЉ

СТУДИЈЕ

2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ нашег истраживања је испитати ефекат екстракта надземног дела биљке *G. verum* на карактеристике афтозног стоматитиса код пацова.

На основу претходно наведеног циља постављени су следећи експериментални задаци:

1. Утврдити макроскопски присуство лезије афтозног стоматитиса
2. Испитати утицај третмана раствором и гелом на бази екстракта добијеног из надземног дела биљке *G. verum* на хистолошке промене узорака букалне слузнице код пацова са афтозним стоматитисом
3. Дефинисати и квантификовати инфламаторне промене у изолованим лезијама афтозног стоматитиса третираних раствором и гелом на бази екстракта надземног дела биљке *G. verum*
4. Утврдити концентрацију параметара оксидационог стреса у системској циркулацији и лезијама афтозног стоматитиса код пацова третираних раствором и гелом на бази екстракта из надземног дела биљке *G. verum*
5. Утврдити корелацију између хистопатолошких и биохемијских промена код пацова са афтозним стоматитисом третираних раствором и гелом на бази екстракта биљке *G. verum*

2.1. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Терапија афтозног стоматитиса раствором и гелом на бази екстракта добијених из надземног дела биљке *G. verum* може да ублажи хистолошке промене карактеристичне за афтозни стоматитис
2. Терапија раствором на бази екстракта *G. verum* може да ублажи инфламаторне промене карактеристичне за афтозни стоматитис
3. Терапија гелом на бази екстракта *G. verum* може да ублажи инфламаторне промене карактеристичне за афтозни стоматитис
4. Терапија раствором и гелом на бази екстракта *G. verum* може да смањи број ћелија и продукцију медијатора инфламације у лезијама афтозног стоматитиса
5. Терапија раствором и гелом на бази екстракта *G. verum* утиче на концентрацију параметара оксидационог стреса у системској циркулацији и лезијама афтозног стоматитиса
6. Постоји корелација између хистопатолошких и биохемијских промена код пацова са афтозним стоматитисом третираних екстрактом из надземних делова биљке *G. verum*

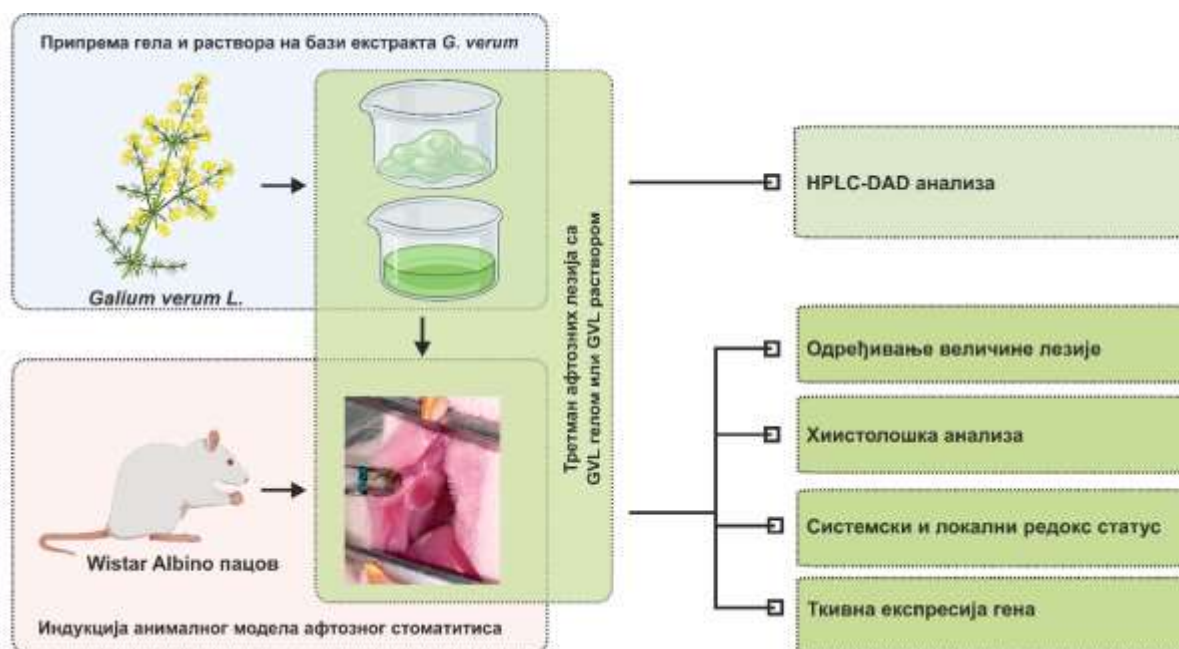
МАТЕРИЈАЛ

И МЕТОДЕ



3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Студија је експерименталног типа *in vivo* на животињама. Током експерименталног рада поштоване су одредбе прописаних аката и принципа етичности (директива Европске уније за заштиту лабораторијских животиња коришћених у експерименталне и научне сврхе 86/609/ЕЕС). Експериментално истраживање је спроведено у јануару 2022. године уз одобрење Етичког одбора за добробит експерименталних животиња од стране Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (бр. одобрења: 01-205). Графички приказ основних делова истраживања је приказан слици 7.



Слика 7. Графички приказ методологије истраживања

3.1. ПРИКУПЉАЊЕ И ПРИПРЕМА БИЉНОГ МАТЕРИЈАЛА

Прикупљање биљног материјала је вршено 5. јула 2021. у општини Чајетина која припада Златиборском округу. Материјал је идентификован на Институту за ботанику и чуван у хербаријуму ботаничке баште "Јевремовац", Београд. Осушен на промајном месту и у хладу, биљни материјал је сачуван у папирним кесама до припреме екстракта.

3.2. ПОСТУПАК ПРИПРЕМЕ ЕКСТРАКТА

Осушени надземни део ивањског цвећа је уситњен у прах помоћу млина и просејан кроз сито 0,75. Етанолни екстракт је припремљен методом екстракције под рефлуксом. Екстракција је вршена са 100 g биљке и 500 ml 70% етанола, који је коришћен као растварач, на температури од 60°C у временском интервалу од 2 сата, како би се припремио етанолни екстракт. Након тога, извршена је филтрација кроз филтер папир и сушење под сниженим притиском на ротационом упаривачу (RV05 basic; ИКА, Bitterfeld-Wolfen, Немачка) како би се добио суви екстракт. Екстракт је чуван у тамним стакленим бочицама на температури од +4°C до даље употребе (140).

3.3. ФИТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЕКСТРАКТА

За квантитативну и квалитативну хемијску анализу добијеног екстракта примењена је претходно описана аналитичка метода заснована на течној хроматографији високих перформанси (HPLC-DAD, HPLC 1100, Agilent Technologies, Немачка). Вршена је идентификација и анализа следећих једињења: гална, кафеинска, транс-циметна, р-кумаринска, хлорогена, рузмаринска и ферулинска киселина, као и анализа кверцетина, рутина и кверцитрина. Једињења од интереса су раздвојена на Nucleosil C18 колони (величина честица од 5 μm , колона 250 mm \times 4,6 mm) при чему је температура била константна и износила је 30°C. Мобилна фаза се састојала од 1% (v/v) воденог раствора HCOOH (А) и метанола (В). Примењен је градијентни режим према следећем програму: 0 мин 10% метанола, 10 мин 25% метанола, 20 мин 45% метанола, 35 мин 70% метанола, 40 мин 100% метанола и 46 мин 10% метанола, док је брзина протока била променљива (од 0 до 10 мин, 1 ml/min; временски период од 10–20 мин, 0,8 ml/min; затим 20–30 мин, 0,7 ml/min; и 30–46 мин 1 ml/min). Елуирање једињења из колоне је праћено на 280 nm (гална, кафеинска и транс-циметна киселина), 330 nm (р-кумаринска, хлорогена, рузмаринска и ферулна киселина, као и кверцетин) и 350 nm (рутин и кверцитрин), док је квантификација заснована на калибрационим кривама добијеним за анализиране хемијске стандардне супстанце под истим експерименталним условима.

3.3.1. Укупан садржај фенола

Укупна количина растворљивих фенолних једињења у етанолном екстракту ивањског цвећа одређена је коришћењем Folin–Ciocalteu (FC) реагенса према претходно коришћеној методи (141). За конструисање калибрационе криве коришћена је серија стандардних раствора галне киселине (тј. 1000, 500, 400, 200, 100, 50 и 25 $\mu\text{g/mL}$). Укратко, 50 μL тест екстракта или стандарда је разблажено са 150 μL дестиловане воде, и додато 1 mL FC реагенса. Након интензивног мешања, смеша је остављена на собној температури у трајању од пет минута, након чега је пипетирано 800 μL натријум карбоната (7,5%). Епрувете су затим остављене да се инкубирају један сат у мраку уз повремено мућкање. Коришћена вредност за мерење апсорбанце је 760 nm, а садржај фенола изражен је у милиграму еквивалената галне киселине по граму сувог екстракта у складу са претходно утврђеним протоколом (mg GAE/g сувог екстракта). Количина фенолних једињења читава се са калибрационе криве чија је једначина дата следећом једначином:

$$\text{Апсорбанца} = 0.0028 * \text{Укупни феноли} + 0.0813 \text{ (R}^2=0.9984\text{)}$$

3.3.2. Укупан садржај флавоноида

Укупна количина флавоноида мерена је по већ испитаној методи Hudz-а (142). Метода се базира на реакцији флавоноида и AlCl_3 при чему настаје комплекс који је жуте боје. Укратко, 200 μL 10% раствора AlCl_3 у метанолу, 200 μL 1M раствора калијум ацетата и 5,6 mL дестиловане воде је доливано у 1 mL раствора испитиваног екстракта или стандарда различитих концентрација (тј. 1000, 500, 250, 125, 62,5 и 31,25 $\mu\text{g/mL}$). Инкубација је спроведена на собној температури, 30 минута, после чега је мерена апсорбанца при вредности од 415 nm у поређењу са слепом пробом. Рутин и кверцетин су коришћени као стандарди, а резултати су изражени у милиграмима еквивалената

кверцетина и милиграмима еквивалената рутина по једном граму сувог екстракта у складу са претходно утврђеним протоколом (mg QE/g сувог екстракта или mg RE/g сувог екстракта). Добијене су две калибрационе криве и то једна са коришћењем кверцетина као стандарда, а друга са коришћењем рутина као стандарда.

$$\text{Апсорбанца} = 0.0020 * \text{Укупан садржај флавоноида} + 0.0568 (R^2=0.9975)$$

$$\text{Апсорбанца} = 0.0013 * \text{Укупан садржај флавоноида} + 0.0268 (R^2=0.9981)$$

3.4. ПРИПРЕМА РАСТВОРА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА ДОБИЈЕНОГ ИЗ НАДЗЕМНОГ ДЕЛА БИЉКЕ *G. VERUM*

Раствор за третман животиња је припремљен растварањем сувог екстракта надземног дела биљке *G.verum* у пречишћеној води (*Aquae purificatae*) непосредно пре почетка третмана. Добијени раствор био је бистар, бледо браон боје која потиче од екстракта и био је стабилан током периода коришћења.

3.5. ПРИПРЕМА ГЕЛА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА НАДЗЕМНОГ ДЕЛА БИЉКЕ *G. VERUM*

База гела је припремљена коришћењем карбомера 934, пропилен гликола, раствора триетаноламина и воде као што је претходно описала наша истраживачка група (143). Натријум бензоат као конзерванс је растворен у пречишћеној води на 40°C. У дефинисану количину карбомера 934 је додата водена фаза уз мешање коришћењем магнетне мешалице (1200 обртаја у периоду од једног минута (енг. *revolutions per minute*, rpm) током 30 мин) и остављена до формирања хомогене дисперзије. Након тога је додат раствор триетаноламина како би се добила база гела са рН од ~6. Тестирана формулација, односно гел на бази екстракт *G.verum*, припремљен је додатком сувог екстракта (20% w/w) у базу гела. Добијени гел био је хомоген, бледо браон боје која потиче од екстракта.

3.6. ИСПИТИВАЊЕ УЛОГЕ ЕКСТАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕТА У ЗАРАСТАЊУ ОРАЛНИХ УЛЦЕРАЦИЈА

3.6.1. Експерименталне животиње

Истраживање је спроведено на пацовима добијеним из одгајалишта за пацове Војномедицинске академије, Београд. Коришћен је *Wistar albino* сој мушких пацова, (n=80), који су стари шест недеља, уз просечну телесну масу од 200 g). Животиње су одгајане под стандардним условима, уз слободан приступ води и храни, чуване у прописаним условима узгоја, уз температуру од 22°C и смењивањем светлости и таме: 12:12 часова.

3.6.2. Индукција анималног модела афтозног стоматитиса

Улцерације на букалној слузници су индуковане, након анестезирања пацова комбинацијом кетамина и ксилазина, апликацијом 99,7% сирћетне киселине на букалну

слузницу левог образа. Сирћетна киселина је апликована коришћењем пластичног штапића чији је врх обложен ватом, дијаметра 4 mm, у трајању од 20 секунди. Овај поступак је изазвао површинску некрозу ткива која ће се развити у хроничну улцерацију са јасно одређеним границама два дана касније (нулти дан) (144). Развој лезије и макроскопске карактеристике су праћене свакодневно, при чему је вршено мерење лезије.

Свим животињама је индукован модел афтозног стоматитиса према претходно описаном протоколу, након чега су сврстане у следеће групе:

1. **GVL раствор** – животиње којима је индукован афтозни стоматитис на терапији 20% раствором *G. verum*, три пута дневно– експериментална група (n=20)
2. **Растварач** (пречишћена вода) – животиње којима је индукован афтозни стоматитис и којима је рана третирана вехикулумом за израду раствора *G. Verum* – контролна група (n=20)
3. **GVL гел** – животиње којима је индукован афтозни стоматитис на терапији 20% гелом *G. verum*, три пута дневно – експериментална група (n=20)
4. **Гел база** – животиње којима је индукован афтозни стоматитис и којима је рана третирана подлогом за израду гела *G. verum* – контролна група (n=20)

3.6.3. Примена формулација на бази екстракта ивањског цвећа

Администрација раствора и гела у концентрацији од 20% вршена је у експерименталним групама три пута дневно. Након примене ових формулација животињама је био онемогућен приступ води и храни у периоду од 60 минута како бисмо омогућили неометано дејство испитиваног екстракта.

Гел на бази ивањског цвећа локално је апликован, коришћењем пластичног штапића са ватом на врху, у количини од 0,5 g, док је формулација у виду раствора апликована помоћу пипете, nanoшењем три капи директно на улцерацију. Администрација формулација на бази ивањског цвећа вршена је свакодневно у периоду од 10 дана.

3.6.4. Дневни унос хране и воде

Количина воде и хране коју су животиње конзумирале у току дана, мерена је свакодневно и израчуната према појединачној телесној тежини пацова.

3.6.5. Одређивање величине и процента зарастања лезије

Развој и зарастање лезије су праћени и фотографисани сваког дана почевши од нултог дана до потпуног зарастања, док је величина улцерације одређена коришћењем софтвера *Image J* (верзија која је коришћена била је 1.53; *National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*). Степен зарастања је представљен процентуално, као контракција површине улцерације, а израчунат је за сваку животињу према следећој формули:

$$\text{Стопа зарастања улкуса (\%)} = (A_0 - A_t) \times 100/A_0,$$

где A_0 представља почетну површину улкуса измерену нултог дана, а A_t површину улкуса у тренутку посматрања.

3.6.6. Жртвовање експерименталних животиња и прикупљање узорака

Животиње су жртвоване у различитим временским интервалима у периоду од 10 дана. Пет животиња по групи је жртвовано нултог дана, као и након 3, 6 и 10 дана. Након краткотрајне анестезије кетамин/ксилазином, пацови су жртвовани цервикалном дислокацијом. После жртвовања прикупљени су узорци свеже крви и одлагани у епрувете са средством против коагулације до тренутка одређивања системског редокс статуса. Узорци букалних ткива су узети за даље хистопатолошке анализе као и одређивање редокс статуса у ткиву образа.

3.7. ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА УЗОРАКА БУКАЛНОГ ТКИВА

Спроведена хистолошка анализа је имала за циљ процену одговора (инфламације и репарације) ткива образа пацова на дејство формулација на бази ивањског цвећа.

3.7.1. Фиксација и парафинизација ткивних узорака

Узорци изолованих афтозних лезија су фиксирани у 4% формалину током 24 часа. Након тога, узорци ткива су подвргнути дехидратацији користећи концентрације алкохола од 70 до 100%, затим су у ксилолу просветљени и укалупљени у парафин. Сечењем ткива у мезио-дисталном смеру добијени су 5 μm пресеци уз коришћење ротирајућег микротом. Затим су пренесени у водено купатило на 45°C. Узорци коришћени за хистолошку анализу су из воденог купатила прикупљени стандардним предметним стаклима (*Epredia, Breda, Netherlands*), док су узорци за имунохистохемијску анализу прикупљени адхезивним стаклима која су позитивно наелектрисана (*Superfrost-OT Ultra Plus; Gerhard Menzel, Braunschweig, Germany*). Након тога се приступило сушењу узорака коришћењем термостата уз температуру од 56°C, које је трајало 12 сати.

3.7.2. Бојење узорака хематоксилин-еозин техником (H&E)

Како бисмо верификовали морфолошке промене у ткиву образа, узорци су бојени хематоксин/еозин методом. Након хидратације, пресеци ткива су 5 минута бојени Мајеровим раствором хематоксилина (*Sigma Aldrich*), испрани у дестилованој води, а затим је уследило и испирање 2 минута 2% раствором еозина (*Sigma Aldrich*). Затим је дехидратација пресека вршена у алкохола растућих концентрација (96%; 100%), просветљавање пресека потапањем у раствор ксилола (2 x 5 минута). Уследило је монтирање плочица наношењем DPX-а и стављањем покровних стакала. Наредних 24 сата су пресеци остављени на сушење при собној температури. Препарати су након сушења анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus BX-51, Japan*) на увећањању 100x и 200x. Морфолошка анализа ткивних узорака вршена је коришћењем следећег протокола на основу кога је одређен хистолошки скор (Табела 2.) (145).

Табела 2. Критеријуми за одређивање хистолошког скорa

Хистолошки скор	
Вредност	Опис
0	Присуство некрозе епитела без знакова инфламације
1	Почетак инфламаторне реакције, без капиларне пролиферације
2	Проминентна инфламаторна реакција са капиларном пролиферацијом у бази улцерације, али без епителизације на површини лезије
3	Смањена инфламаторна реакција, пролиферација нових капилара и почетак епителизације на површини лезије
4	Комплетна епителизација

3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА УЗОРАКА БУКАЛНОГ ТКИВА

Имунохистохемијска анализа спроведена је у циљу испитивања дистрибуције ћелија букалног ткива позитивних на експресију СОХ-2. За ову анализу су коришћени изоловани узорци букалног ткива.

3.8.1. Имунохистохемијско бојење ткивних исечака

Након депарафинизације и рехидратације уз етанол опадајуће концентрације (од 100% до 70%), узорци су термички обрађени у цитратном пуферу на температури која је износила 95°C, при рН вредности од 6,0 током 20 минута. Исечци ткива су охлађени током 15 минута на собној температури, након чега је спроведено блокирање ендogene пероксидазе (коришћењем водоник пероксида у концентрацији од 3%) током десет минута и испирање уз коришћење PBS-а (енг. *phosphate buffered saline*) током пет минута. Исечци су инкубирани са протеин блоком (*Ultravision Protein Block, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) током пет минута, а затим примарним антителом СОХ-2 (1:100) од интереса (*Novocastra, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK*) током једног сата, на собној температури. Потом је вршено испирање од 5 минута у PBS-у које је понављано још два пута. Након тога је уследила инкубација са примарним појачивачем антитела (*Qvanto, Thermo Scientific, USA*) 10 минута, испирање у PBS-у (5 мин) праћено додавањем HRP (*HRP Polymer Quanto*) током 10 мин, и затим још једно испирање пет минута у PBS-у. Места везивања су визуелизована додавањем 0,05% DAB (енг. *3,3'-diaminobenzidine, Serva, Heidelberg, Germany*). Исечци су потопљени у раствор хематоксилина, рехидрирани у растућој концентрацији алкохола (од 70 до 100%), затим просветљени у ксилолу па након тога монтирани са DPX у складу са дефинисаним протоколом (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Узорци су фотографисани дигиталном камером причвршћеном на Olympus BX51 светлосни микроскоп (*Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg, Germany*) на увеличању 200x. Морфометријска анализа имунопозитивности на СОХ-2 у улцерацијама спроведена је помоћу софтверског програма Image Pro-Plus који је релевантан и широко коришћен (*Media Cybernetics, Rockville, MD, USA*) (146). Резултати имунопозитивности на СОХ-2 су представљени у процентима.

3.8.2. Бојење узорака Picro-Sirius Red техником

Узорци букалне слузнице су подвргнути и Picro-Sirius Red бојењу у циљу квантификације колагених влакана.

Након депарафинизације, ткивни узорци су хидратисани, затим испрани у дестилованој води и бојени раствором Picro-Sirius црвеном бојом у трајању од 60 минута. После тога, узорци су испрани у 2% сирћетној киселини и у дестилованој води у трајању од 2 минута. Вишак воде је физички уклоњен протресањем узорака. Након тога је уследила дехидратација ткивних пресека у 96% и у 100% алкохолу, просветљавање у ксилолу (2 x 5 минута) и монтирање узорака помоћу DPX-а. Као резултат бојења добијена је црвена боја обојених колагених влакана. Фотографије ткивних пресека су добијене коришћењем микроскопа (Olympus BX51, Јапан) при увећањима 100x и 200x. Морфометријска анализа добијених пресека вршена је у софтверском програму *Image Pro-Plus*. Резултати анализе колагених влакана су представљени у процентима.

3.9. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА НА СИСТЕМСКИ И ЛОКАЛНИ НИВО ПРООКСИДАЦИОНИХ И АНТИОКСИДАЦИОНИХ ПАРАМЕТАРА

У тренутку жртвовања експерименталних животиња, из југуларне вене су прикупљени узорци крви у циљу одређивања системског редокс статуса. Крв је центрифугирана како би се одвојили крвна плазма и еритроцити. Из узорака крвне плазме мерени су прооксиданси: азот моноксид, у форми нитрита (NO_2^-), индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS, (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)), водоник пероксид (H_2O_2) и супероксид анјон радикал (O_2^-). Из узорака еритроцита одређивани су следећи антиоксиданси: супероксид-дисмутаза (SOD), редуковани глутатион (GSH) и каталаза (CAT). Како бисмо испитали утицај формулација на бази ивањског цвећа на ниво прооксидационих и антиоксидационих параметара у самој лезији на букалном ткиву, одређени су и нивои следећих параметара: SOD, CAT, GSH и TBARS.

Након жртвовања животиња, афтозне лезије су изоловане и остављене на температури од -80°C до поступка хомогенизације. 0,5 g сваког изолованог узорка букалног ткива је механички хомогенизовано у 5 mL PBS-а (pH 7.4). Уследило је центрифугирање хомогената 15 минута, на 4°C и на $10,000\times g$. За анализирање редокс статуса у ткиву коришћен је супернатант.

Спектрофотометар UV-1800 (*Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*) је коришћен за одређивање свих наведених параметара.

3.9.1. Мерење нитрита (NO_2^-)

Одређивање нитрита у узорку представља погодан начин за индиректно мерење ослобођеног азот монооксида.

У *Eppendorf* епрувете је додато 100 μl перхлорне киселине, затим 400 μl 20mM ЕДТА (етилendiаминтетрасирћетне киселине) и 100 μl крвне плазме. Епрувете су стављене на вортекс а затим на лед још 15 минута. Након 15 минута центрифугирања на 6000 rpm, супернатант је одливен и 220 μl калијум карбоната је додато у талог. 200 μl претходно направљене смеше је додато у нове епендорф епрувете са још 250 μl *Griess-*

овог реагенса, који се припрема *ex tempore*, и 125 μl амонијачног пуфера. Епрувете су остављене на собној температури 15 минута па је после тога вршено спектрофотометријско мерење апсорбанце на $\lambda=550\text{ nm}$. Дестилована вода је коришћена за припему следеће пробе. Вредности су изражене у $\text{nmol NO}_2^-/\text{ml}$ плазме.

3.9.2. Мерење индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS)

Индекс липидне пероксидације мерен је индиректним методом, одређивањем нивоа TBARS односно продуката који настају у реакцији липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином. За одређивање нивоа TBARS коришћени су ТВА (2-тиобарбитурна киселина), 28% ТСА (трихлорсирћетна киселина) и NaOH.

У епрувете је додато 400 μl крвне плазме и 200 μl 28% ТСА. Након вортексовања и остављања епрувета на леду 15 минута, вршено је центрифугирање од 15 минута уз 6000 обртаја у минути. У 400 μl супернатанта из претходно добијене смеше је додато 100 μl 1% ТВА и NaOH. Добијени узорци су инкубирани коришћењем воденог купатила (температура је подешена на 100°C) у временском периоду од 15 минута. Након спроведеног поступка, узорци су током 10 минута одложени на собној температури. Спектрофотометријско мерење апсорбанце је вршено при вредности од 530 nm. Дестилована вода је употребљена за припему следеће пробе. Вредности наведеног маркера у испитиваним узорцима су изражене у $\text{nmol TBARS}/\text{ml}$ плазме.

За мерење нивоа TBARS у афтозним лезијама коришћен је супернатант букалног хомогената, а поступак је био исти као и за одређивање у системској циркулацији.

3.9.3. Мерење водоник пероксида (H_2O_2)

За одређивање концентрације водоник пероксида су коришћени следећи реагенси: калијум хидрогенфосфат дихидрат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), натријум хлорид (NaCl), D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), водоник пероксид (H_2O_2), HRPO (енгл. *peroxidase from horse radish*) и фенол црвено (енгл. *phenol red*).

Најпре је издвојен узорак плазме у запремини од 200 μl у који је додато 10 μl HRPO као и 800 μl фенол црвеног. Након инкубације на собној температури (током 15 минута) приступило се мерењу апсорбанце на вредности таласне дужине од 610 nm. Дестилована вода је коришћена као слепа проба.

За израчунавање концентрације водоник пероксида у крвној плазми коришћена је стандардна крива која је формирана на основу раствора водоник пероксида. У епрувете је стављено 5, 10 и 20 μl стандарда за водоник пероксид, затим 200 μl дестиловане воде, 10 μl пероксидазе из коњске ротквице и 800 μl фенол црвеног. Мерење коначних концентрација је вршено након што је прошао десетоминутни период инкубације на собној температури. Фактор апсорбанце је израчунат на основу односа стандардне криве и финалне апсорбанце узорка. Коначне вредности су добијене на основу односа фактора апсорбанце и финалне апсорбанце узорка и приказане су као $\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{ml}$ плазме.

3.9.4. Мерење супероксид анјон радикала (O_2^-)

За одређивање нивоа O_2^- коришћени су следећи реагенси: 37% HCl, TRIS (Трис (хидроксиетил) аминетан), Na_2EDTA , нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT) и желатин.

У пластичне епрувете је додато 50 μl крвне плазме са 950 μl есејне смеше (енг. "assay mixture") која представља 50 mM TRIS-HCl пуфера, 0,1 mg/ml желатина, 0,1 mM Na₂EDTA и 0,1 mM NBT. На таласној дужини $\lambda=550$ nm, апсорбанца је мерена након сваких 60 секунди у трипликату. Дестилована вода је употребљена за слепу пробу. Вредности су представљене у nmol O₂⁻/ml плазме.

3.9.5. Мерење супероксид дисмутазе (SOD)

У циљу одређивања активности наведеног маркера одмерен је лизат еритроцита у запремини од 100 μl , а затим је додато 1 ml карбонатног пуфера. Приступа се вортексовању ове смеше, а затим се додаје још 100 μl епинефрина. Као слепа контрола је коришћена смеша претхно описаних супстанци, али без узорка. Мерења апсорбанце су вршена у дупликату при вредности од 470 nm и изражена су као U/g Hb $\times 10^3$.

За одређивање нивоа SOD у афтозним лезијама коришћен је супернатант ткивног хомогената при чему је поступак вршен на претходно описан начин.

3.9.6. Мерење каталазе (CAT)

Разблажен лизат еритроцита је коришћен за одређивање активности каталазе. Додавањем 10 ml дестиловане воде и 100 μl 70% етанола у 100 μl лизата постигнуто је разблажење. 100 μl припремљеног разблажења и 1ml 10mM H₂O₂ је додато у 50 μl пуфера за CAT. Дестилована вода је употребљена за слепу пробу. Сваки узорак је мерен 6 пута, користећи кварцне кивете, уз таласну дужину од 230 nm. Апсорбанца је представљена као јединица активности по једном граму хемоглобина у складу са дефинисаним протоколом (U/g Hb $\times 10^3$).

За одређивање нивоа CAT у афтозним лезијама коришћен је супернатант ткивног хомогената при чему је поступак вршен на претходно описан начин.

3.9.7. Мерење редукованог глутатиона (GSH)

За одређивање нивоа GSH коришћени су следећи реагенси: 5,5–дитио–бис–6,2–нитробензоева киселина (DTNB), 0,1% раствор етилендиаминтетраацетатне киселине (EDTA), преципитациони пуфер и динатријум хидроген фосфат.

У епрувету је додато 50 μl узорка, 385 μl преципитационог пуфера и 200 μl раствора EDTA у концентрацији од 0,1%. Смеша је стављена на лед 15 минута, а потом је 10 минута центрифугирана на 4000 обртаја у минути. Добијени екстракт је употребљен за наредну анализу. Екстракт у запремини од 300 μl је одмерен, затим је додато 750 μl динатријум хидроген фосфата, а након тога и DTNB (100 μl). Смеша је инкубирана у временском периоду од 10 минута на собној температури, а затим је мерење апсорбанце вршено при вредности од $\lambda=412$ nm. Вредности су изражене у nmol GSH/ml еритроцита.

За одређивање нивоа GSH у афтозним лезијама коришћен је супернатант ткивног хомогената при чему је поступак вршен на претходно описан начин.

3.10. ТКИВНА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА АНАЛИЗИРАНА МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ

За одређивање експресије гена укључених у процес инфламације (TNF- α , IL-1 β , IL-6, као и IL-10) и оксидационог стреса (SOD1, SOD2) у афтозним лезијама примењена је квантитативна реакције ланчане полимеризације у реалном времену према претходно утврђеном протоколу (*Quantitative Real-time PCR*, qRtPCR).

3.10.1. Поступак изолације RNA и реверзне транскрипције комплементарне DNA

Из узорка левог образа изоловане су афтозне лезије и постављене у *Eppendorf* епрувете (у епрувете је доливен *RNAlater Stabilization Solution - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*). Узорци су тако чувани до процеса хомогенизације на -20°C . Након дубоког замрзавања у течном азоту, вршена је механичка хомогенизација ткива. По упутству произвођача је уследила изолација RNA коришћењем *TRIzol Reagent-a* у запремини од 1 ml (*Thermo Fisher Scientific*).

Узорци су затим инкубирани у трајању од пет минута на собној температури, а затим је 0,2 ml хлороформа (*Serva, Heidelberg, Germany*) додато у 1ml *TRIzol Reagent-a* након чега је 15 минута вршено центрифугирање на $+4^{\circ}\text{C}$ при 15000 g (RCF). Добијене су јасно уочљиве три фазе узорка. Бистра фаза, која се налазила на површини, је одмерена у додатне епрувете, након чега је додато 0,5 ml изопропанола. Узорци су затим инкубирани на собној температури (трајање 10 минута), а затим је уследио поступак хладног центрифугирања на вредностима 12000 g (RCF) током додатних 10 минута. Након одливања супернатанта, на заосталу RNA додато је 1 ml 70% етанол алкохола. Центрифугирање је вршено 5 минута на $+4^{\circ}\text{C}$ на 7500 g (RCF). Након што је одливан супернатант, узорци су постављени у водено купатило како би преостали алкохол испарио. RNA из епрувета је растворена у 20 μl воде, и добијени раствори су чувани до даљих анализа на температури од -80°C .

Процена приноса RNA вршена је оценом чистоће и спектрофотометријским мерењем концентрације коришћењем узорка у запремини 3 μl (*Multiskan SkyHigh UV/VIS, Thermo Fisher Scientific*). Сматра се да је успостављен оптималан принос када је однос A260/A280 између 1,75 и 2,00.

Коришћењем одговарајућих китова (*RevertAid and First Strand cDNA Synthesis, Thermo Fisher Scientific*), комплементарна ДНК (енг. *complementary DNA*, cDNA) синтетисана је из укупне РНК уз присуство *oligo(dT)* прајмера по протоколу произвођача. РНК узорци са прајмерима инкубирани су на 42°C током 60 минута, а затим у циљу деактивације ензима још пет минута на 70°C коришћењем апарата *MultiGene OptiMax Thermal Cycler (Labnet International, Edison, NJ, USA)*.

3.10.2. Одређивање релативне експресије гена

Релативна експресија информационе RNA (енг. *messenger RNA*, mRNA) је коришћена у циљу одређивања експресије гена од интереса и упоређивана са *housekeeping* геном у сваком изолованом узорку.

Смеси за квантитативну реакцију ланчане полимеризације у реалном времену редом су додате следеће супстанце: *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* у запремини од 10 μl (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*) а затим одговарајући

прајмери (Табела 3.) у концентрацији која је износила 500 nM (*Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA*). Такође је додато и 100 ng *cDNA* узорка и воде без нуклеаза (*Sigma-Aldrich*) до постизања запремине од 20 μ l у складу са препорукама. Као *housekeeping* ген је коришћен β -*actin*. Цео процес је спроведен у систему Gentier 96E qRT-PCR (*Xi'an Tianlong Science and Technology, Xi'an City, China*). На почетку је вршена денатурација у трајању од 30 секунди на 95°C која је праћена са 40 циклуса у две фазе: денатурација 15 секунди на 95°C и анилинг и елонгација 30 секунди при температури од 60°C. По завршетку описаних циклуса, анализиране су криве топљења, а контрола реакције је вршена применом NTC (енг. *No Template Control*). Релативна експресија гена одређена је коришћењем $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Представљени резултати су приказивали средњу вредност узорка мереног у дуплику, а релативна експресија *mRNA* приказана је као однос експресије *housekeeping* гена и гена од интереса (147).

Табела 3. Прајмери који су употребљени у анализи qRT-PCR

Назив прајмера	Секвенца (5' - 3')
TNF-α	F: GTAGCCCACGTCGTAGCAAA R: CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC
IL-1β	F: TGATGTTCCCATTAGACAGC R: GAGGTGCTGATGTACCAGTT
IL-6	F: CTCCAGCCAGTTGCCTTCT R: GACAGCATTGGAAGTTGGGG
IL-10	F: CAGTCAGCCAGACCCACAT R: GCTCCACTGCCTTGCTTT
β-actin	F: ACGGTCAGGTCATCACTATCG R: GGCATAGAGGTCTTTACGGATG
SOD-1	F: TGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC R: CACACGATCTTCAATGGACACA
SOD-2	F: AATCAACAGACCCAAGCTAGGC R: CACAATGTCACCTCCTCCGAA

F – *forward*; R – *reverse*

3.11. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Како би се дефинисала величина узорка коришћене су информације о разликама у величини оралних лезија између група пацова третираних различитим облицима препарата меда у студији сличног дизајна (148). Користећи $\alpha = 0,05$, као и снагу студије од 0,80 за Т -тест, међусобним поређењем група (у оба смера) израчунат је студијски узорак у статистичком програму *G*Power 3* (149). Пратећи најмању разлику између група у посматраним параметрима и претпоставку која захтева највећи узорак, одређен је потребан број животиња у свакој групи који износи 20. За потребе овог истраживања укључено је укупно 80 пацова.

3.12. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Како би подаци статистички били обрађени употребили смо статистички програм *Statistical Package for Social Sciences* верзија 23.0. Да бисмо испитали нормалност расподеле користили смо тестове Kolmogorov Smirnov, Shapiro Wilk, а такође и хистограм и normal QQ plot. У зависности од природе параметара, за приказивање међусобних разлика, користили смо непараметарске Mann–Whitney U или Kruskal-Wallis H тестове, или параметарске Independent Samples T-test и One-Way ANOVA тестови. Добијене вредности представљају средњу вредност (\bar{X}) \pm стандардну грешку (енг. *Standard error, SE*). Статистички значајна разлика између добијених вредности по групама сматра се када је $p < 0,05$, док статистички веома значајну разлику представља $p < 0,01$.

4

РЕЗУЛТАТИ



4. РЕЗУЛТАТИ

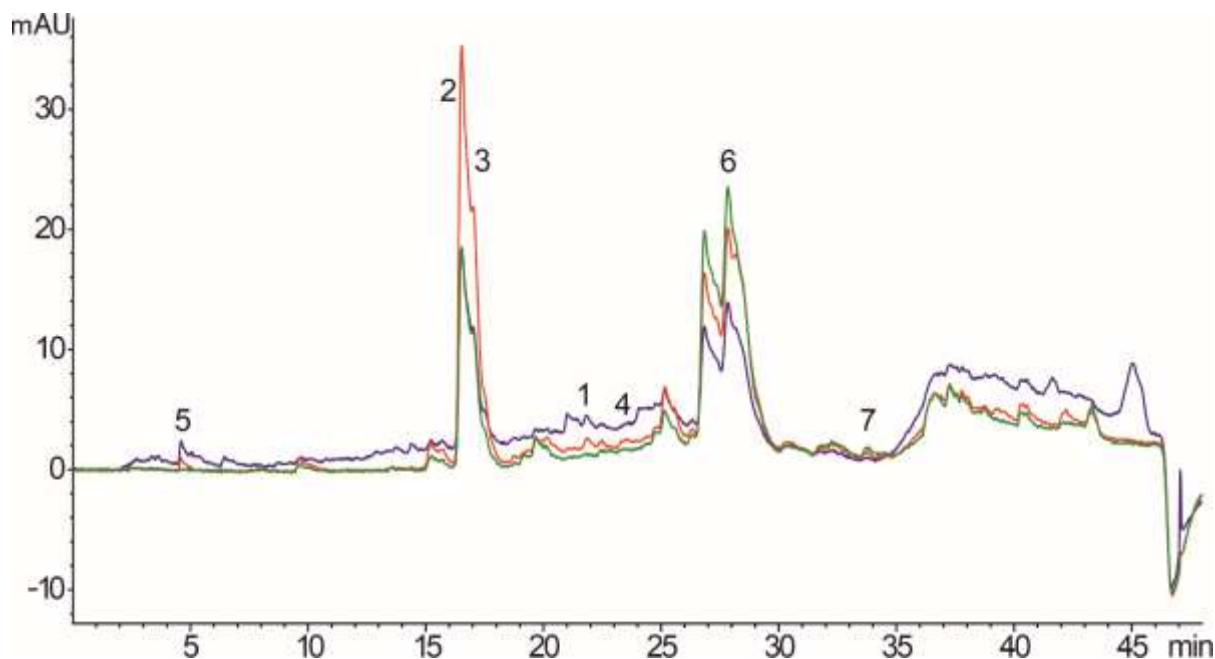
4.1. ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕКСТРАКТА *G. VERUM*

4.1.1. HPLC-DAD анализа етанолног екстракта *G. verum*

Хемијски састав екстракта *G. verum* анализиран је течном хроматографијом високог приноса са "diode array" детекцијом (HPLC-DAD) и представљен је у Табели 4 као и на Слици 8. Идентификовано је неколико биоактивних једињења међу којима су најзаступљенија рутин, р-кумаринска киселина, кверцетин, кверцитрин, гална, кафеинска и хлорогена киселина, док су ферулинска, транс-циметна и рузмаринска киселина биле испод нивоа детекције.

Табела 4. Квантитативна и квалитативна анализа одређених једињења из екстракта *G. verum* представљена у mg/g сувог екстракта.

Назив једињења	Етанолни екстракт <i>G. verum</i>
Рутин	23.81 ± 1.90
Р-кумаринска киселина	9.35 ± 0.93
Кверцетин	0.76 ± 0.05
Кверцитрин	0.72 ± 0.04
Гална киселина	0.53 ± 0.08
Кафеинска киселина	0.12 ± 0.01
Хлорогена киселина	0.16 ± 0.01
Ферулинска киселина	< 0.1
Транс-циметна киселина	< 0.03
Рузмаринска киселина	< 0.02



Слика 8. Хроматограм етанолног екстракта *G. verum* са детекцијом на 280 nm (плава линија), 330 nm (црвена линија) и 350 nm (зелена линија). Детектована једињења: 1- кафеинска киселина, 2- р-кумаринска киселина, 3- квецетин, 4- хлорогена киселина, 5- гална киселина, 6- рутин и 7- кверцитрин.

4.1.2. Укупан садржај фенола и флавоноида

Резултати који се односе на укупан садржај фенола и флавоноида у етанолном екстракту ивањског цвећа приказани су у Табели 5.

Табела 5. Укупан садржај фенола и флавоноида у етанолном екстракту ивањског цвећа

	TPC (mg GAE/g DE)	TFC Q (mg QE/g DE)	TFC R (mg RE/g DE)
GVEA	138,92 ± 0,77	163,65 ± 0,85	295,33 ± 1,39

GVEA – етанолни екстракт ивањског цвећа; **TPC** – Укупан садржај фенола; **TFC** – Укупан садржај флавоноида; **GAE** – еквивалент галне киселине; **QE** – еквивалент квецетина; **RE** – еквивалент рутина; **DE** – суви екстракт; **AA** – аскорбинска киселина.

4.2. ЕФЕКАТ ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА НА ДЕНВНИ УНОС ХРАНЕ И ВОДЕ

Дневни унос хране код животиња третираних формулацијама на бази екстракта ивањског цвећа је био значајно већи у периоду од 2. до 6. дана праћења у односу на контролне животиње (График 4).

Количина воде коју су животиње конзумирале у току дана, такође је била већа у групи животиња третираних гелом и раствором током првих шест дана праћења у поређењу са животињама које су третиране гел базом и растварачем (График 5).

Разлике у дневном уносу хране и воде између упоређиваних група могу се уочити у Табелама 6 и 7, и на Графику 1 и 2.

Табела 6. Дневни унос хране код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролних животиња изражен у g хране на 100g телесне масе (ТМ) животиња

Дан	GVL раствор	Растварач	GVL гел	Гел база
1.	9,70±1,03	8,08±0,76	9,30±0,60	8,34±0,7
2.	11,24±0,85*	9,5±0,71	12,04±1,43**	8,16±0,27
3.	12,40±0,85*	9,6±0,46	13,42±1,25**	9,44±0,35
4.	13,84±1,17*	9,92±0,43	12,08±0,91**	8,96±0,32
5.	13,3±1,21*	10,08±0,56	12,48±1,03**	9,60±0,50
6.	13,5±1,41*	10,44±0,89	13,34±0,66**	9,10±0,43
7.	13,75±1,82	11,88±1,21	13,26±1,23	10,80±0,73
8.	14,92±1,58	11,48±0,32	12,86±0,61	12,50±0,51
9.	13,02±1,43	14,2±2,12	13,08±1,31	13,60±1,14
10.	13,80±1,30	13,0±0,72	13,18±0,76	13,32±0,96

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

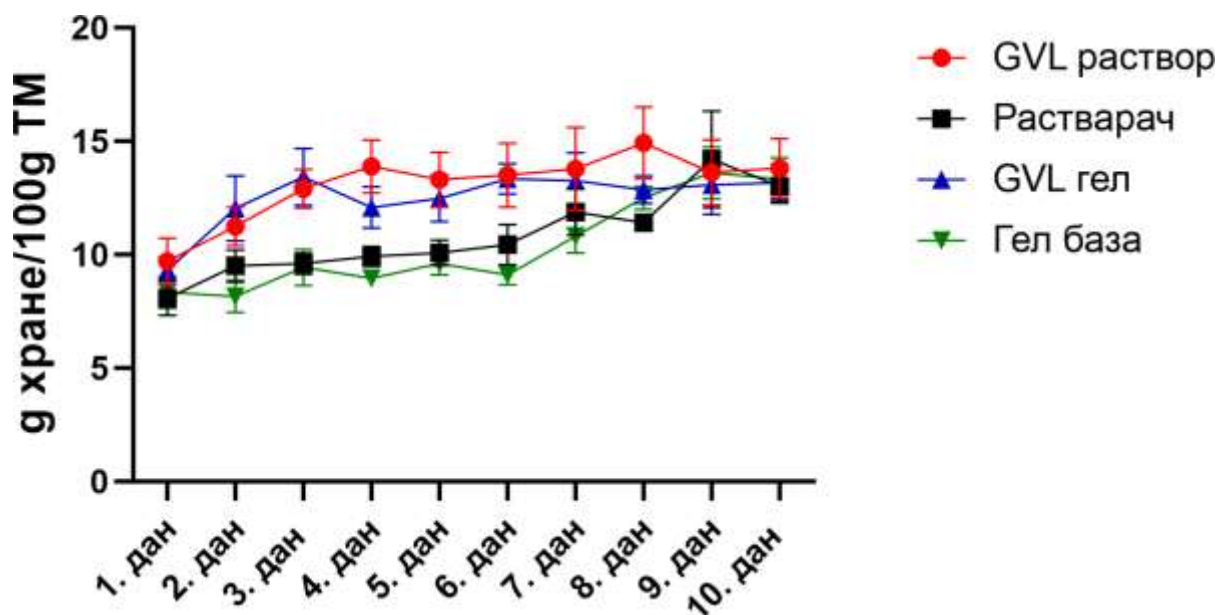


График 1. Ефекти формулација на бази екстракта *G. verum* на дневни унос хране током десетодневног третмана експерименталних животиња. Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;

Табела 7. Дневни унос воде код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролних животиња изражен у ml воде на 100g телесне масе животиња

Дан	GVL раствор	Растварач	GVL гел	Гел база
1.	10,1±1,027	9,98±0,63	10,38±0,82	9,58±0,82
2.	11,36±0,77*	10,36±0,70	12,61±0,79**	10,10±0,46
3.	17,14±1,08*	11,89±0,51	17,2±0,71**	12,49±0,34
4.	17,25±0,77*	13,18±0,78	17,32±0,88**	12,80±0,84
5.	17,72±0,94*	15,51±0,57	18,28±0,40**	14,89±0,60
6.	18,2±0,73*	16,84±0,68	18,40±0,49**	15,98±0,48
7.	18,9±0,95	18,28±0,25	18,38±0,72	17,68±0,40
8.	19,0±0,58	19,70±0,68	18,6±0,64	18,44±0,49
9.	18,82±0,88	19,42±0,82	18,45±0,85	18,50±1,18
10.	18,47±0,61	19,52±0,84	18,7±0,38	18,42±1,03

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

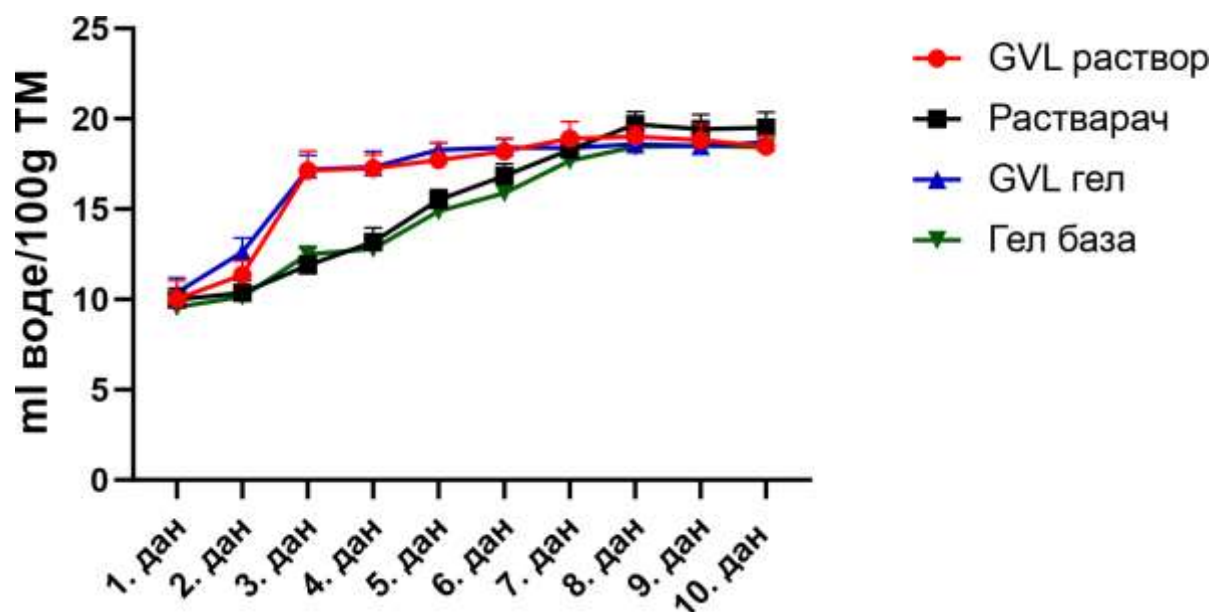
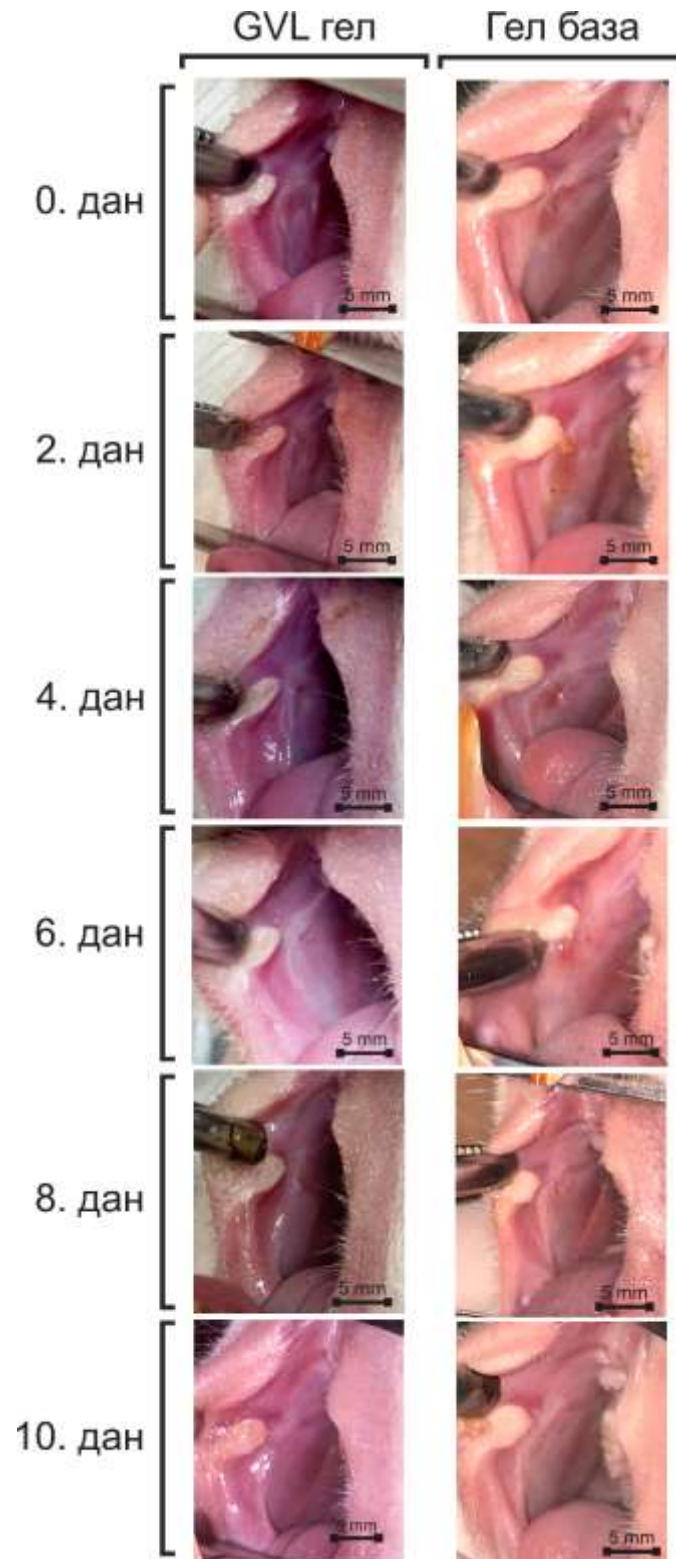


График 2. Ефекти формулација на бази екстракта *G. verum* на дневни унос воде током десетодневног третмана експерименталних животиња. Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;

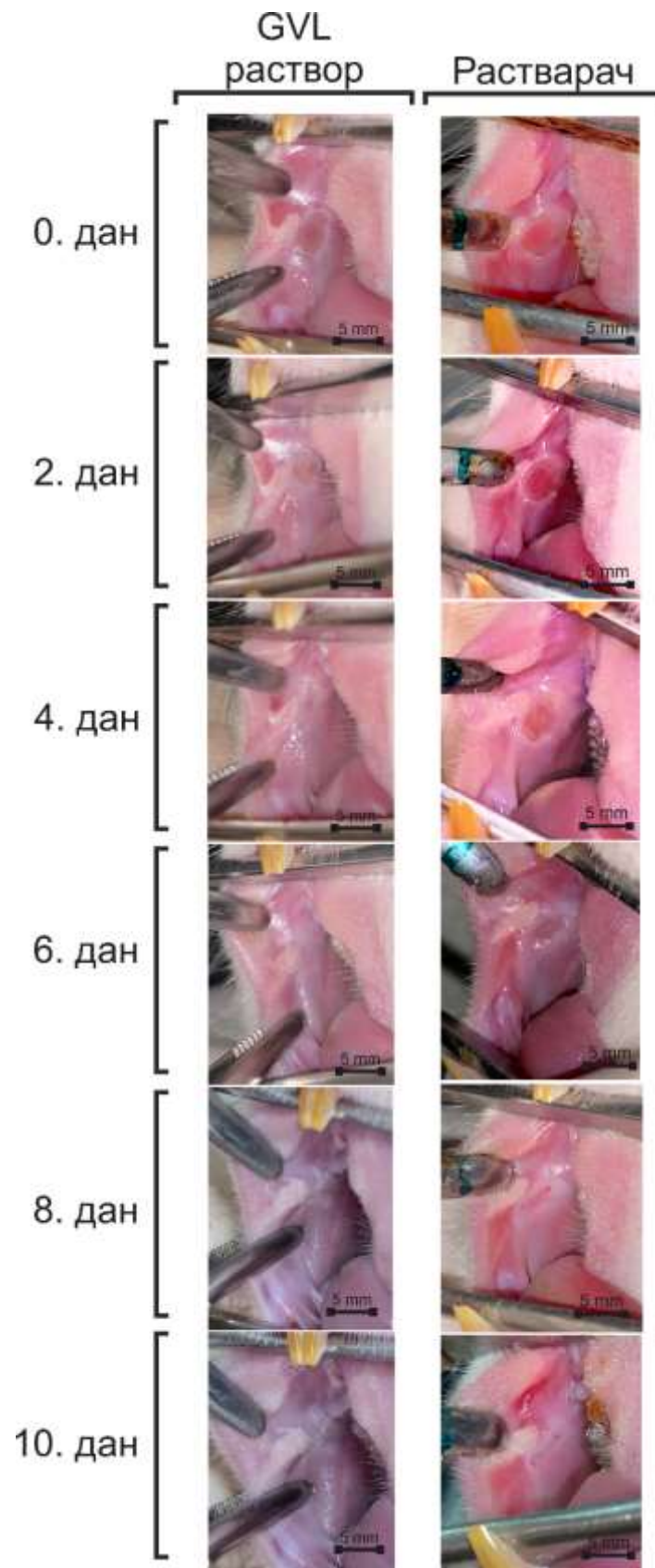
4.3. ВЕЛИЧИНА И ЗАРАСТАЊЕ АФТОЗНЕ ЛЕЗИЈЕ

Ефекти формулација на бази екстракта *G. verum* у зарастању афтозних улцерација је испитивана током апликације у трајању од 10 дана. Величина лезије је мерена свакодневно на основу чега је израчунат проценат зарастања. Примена раствора и гела у концентрацији од 20% је довела до значајно бржег зарастања улцерације у односу на контролне групе.

Макроскопске карактеристике афтозних лезија и ток зарастања након третмана формулацијама на бази ивањског цвећа су приказане на Слици 9 и 10.



Слика 9. Утицај гела на бази екстракта *G.verum* на макроскопске карактеристике оралних улцерација у различитим временским интервалима.



Слика 10. Утицај раствора на бази екстракта *G.verum* на макроскопске карактеристике оралних улцерација у различитим временским интервалима.

Ефекти гела на бази екстракта *G. verum* су уочени већ након примене у трајању од два дана, када је проценат зарастања износио чак 61% (График 3). Потпуно зарастање улцерације (100%) постигнуто је шестог дана, са статистичком значајношћу у поређењу са контролом у којој је у том тренутку проценат зарастања износио 54% (График 3).

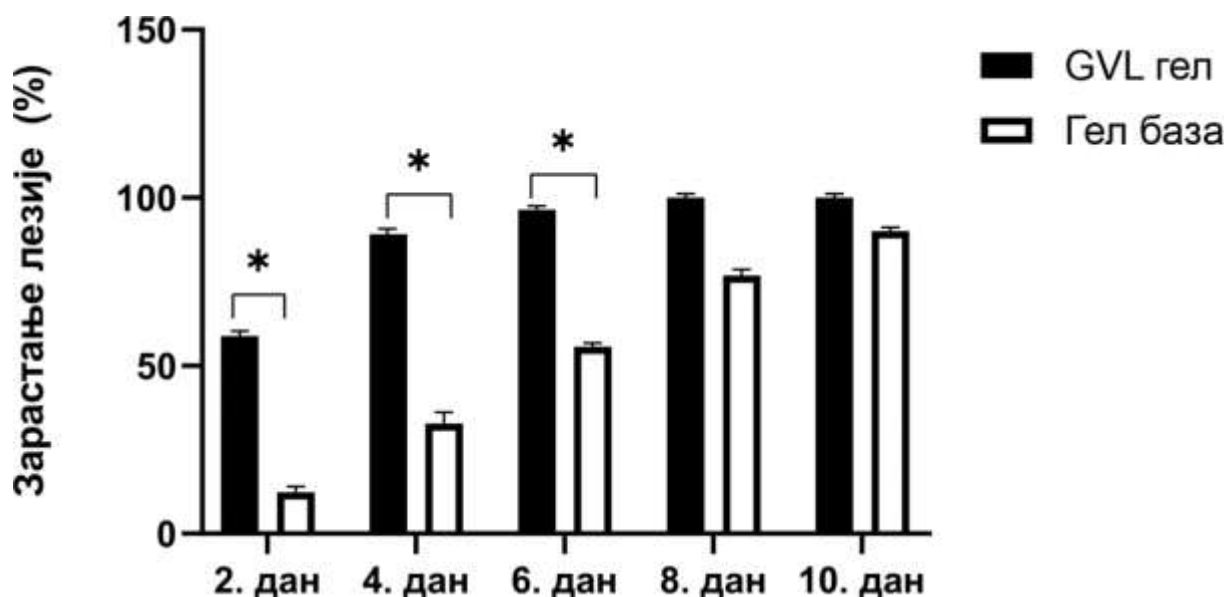


График 3. Ефекат третмана гелом на бази екстракта *G. verum* на процес зарастања афтозне лезије. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;

* статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

Ефикасност примене раствора је такође била значајна већ након два дана третмана када је проценат зарастања је износио 33%. Зарастање од 97% је регистровано шестог дана третмана што је значајно брже у односу на групу третирану растварачем (График 4).

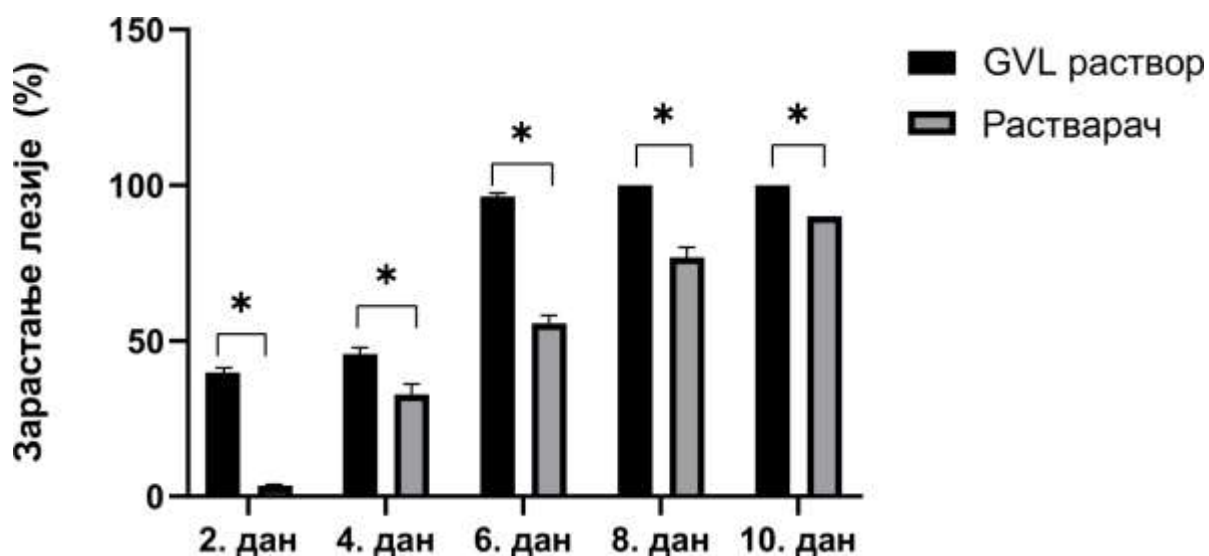


График 4. Ефекат третмана раствором на бази екстракта *G. verum* на процес зарастања афтозне лезије. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;

* статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

Током упоређивања ефеката гела и раствора на зарастање афтозних лезија, примећена је значајна разлика 2. и 4. дана праћења, када је проценат зарастања у групи третираној гелом износио 61% и 92%, док је у групи животиња које су третиране раствором био 33% и 45%. Третман афтозних лезија гелом на бази екстракта *G. verum* је достигао већу ефикасност у односу на примену раствора током првих пар дана зарастања (График 5).

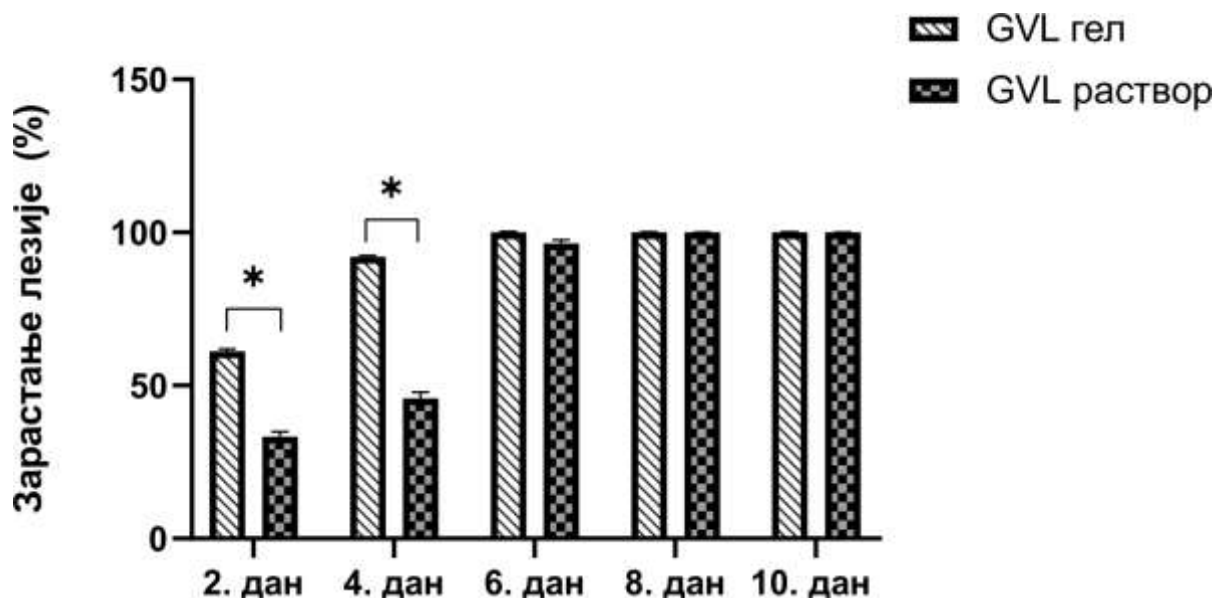


График 5. Ефекат третмана гелом и раствором на бази екстракта *G. verum* на процес зарастања афтозне лезије. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;
* статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.4. ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА АФТОЗНИХ ЛЕЗИЈА

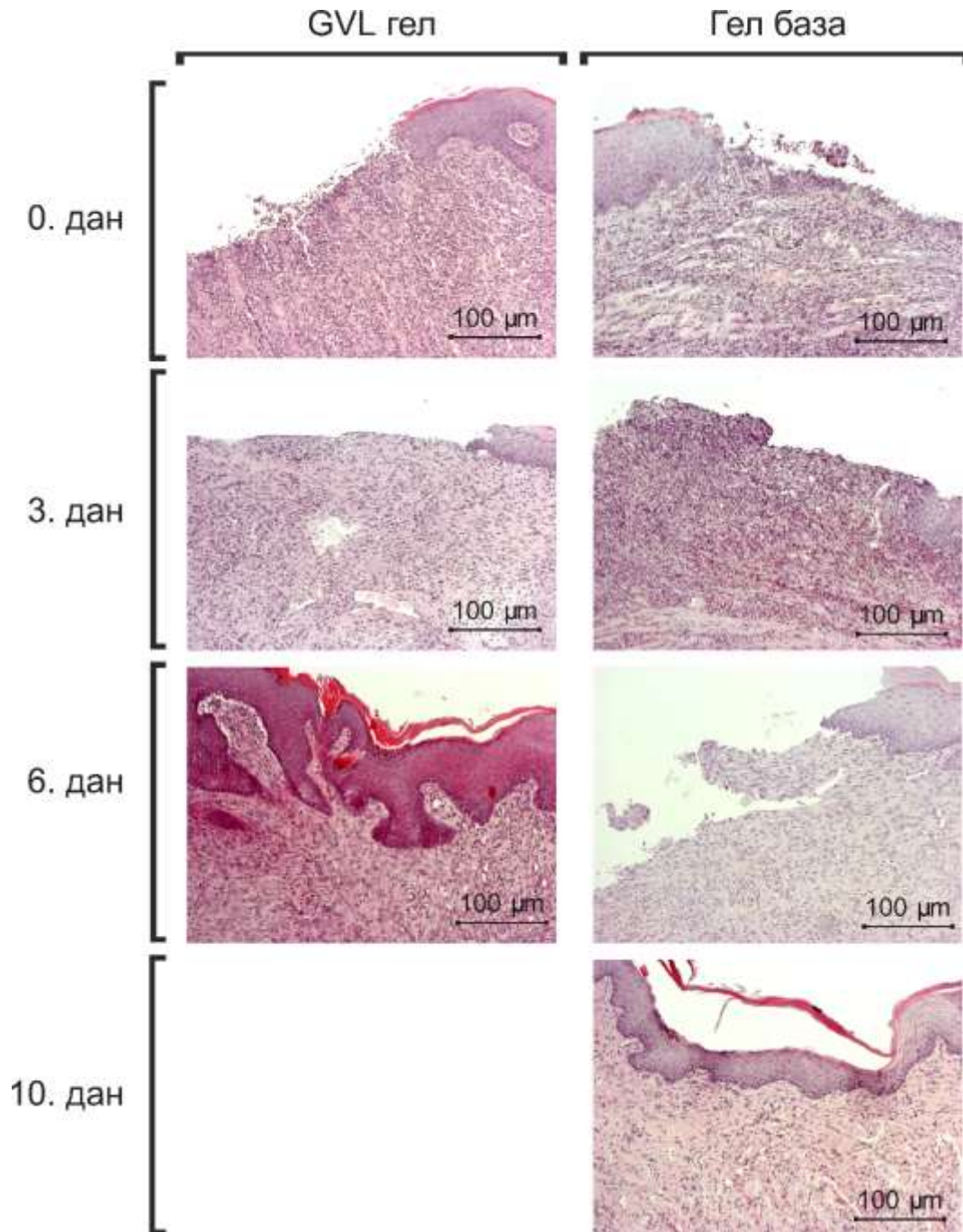
Хистолошка евалуација узорака букалног ткива је вршена на свака три дана почевши од нултог дана третмана и обухватала је Н&Е бојење, одређивање имунопозитивности СОХ-2 и садржај колагена. Микроскопска анализа афтозних лезија (Табела 8, Слика 11 и 12) на букалном ткиву указује на присуство некрозе епитела, субендотелијалног акутног инфламаторног инфилтрата са преминацијом неутрофила и улцерација са дилатацијом крвних судова у свим тестираним групама 3. дана. Умерен хронични инфламаторни процес са пролиферацијом фибробласта и организованим колагеним влакнима је запажен у обе контролне групе 6. дана, док је у експерименталним групама третираним раствором и гелом, истог дана уочено обновљено везивно ткиво без присуства улцерације. Комплетно зарастање које се карактерише присуством обновљеног везивног ткива у контролним групама је постигнуто 10. дана. Хистолошки скор израчунат на основу микроскопских промена у свим временским пресецима је приказан у Табели 8, где се уочава значајна разлика између експерименталних и контролних група 6 дана након третмана ивањским цвећем.

Табела 8. Хистолошки скор зарастања свих тестираних група 0., 3., 6. и 10. дана

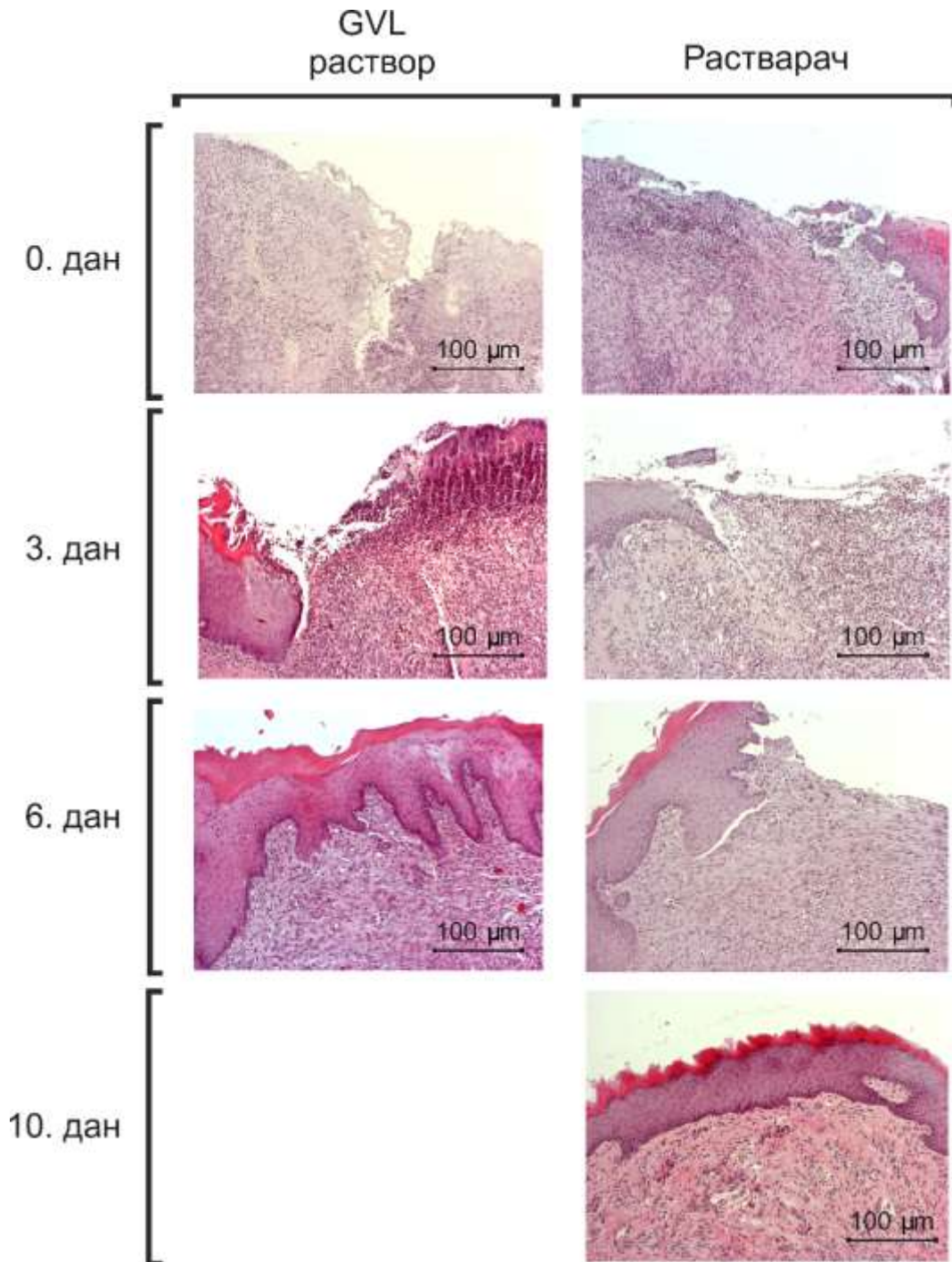
	1. дан	1. дан	6. дан	10. дан
GVL раствор	2,49 ± 0,45	3,78 ± 0,03	5 ± 0,00*	/
Растварач	2 ± 0,00	3 ± 0,00	4,16 ± 0,41	4,83 ± 0,41
GVL гел	2,67 ± 51	4 ± 0,00	5 ± 0,00**	/
Гел база	2.33 ± 0,82	3.16 ± 0,41	4,33 ± 0,52	5 ± 0,00

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).



Слика 11. Репрезентативне фотографије Н&Е бојења букалног ткива након третмана гелом на бази екстракта *G. verum*.



Слика 12. Репрезентативне фотографије Н&Е бојења букалног ткива након третмана раствором на бази екстракта *G. verum*.

Имунопозитивност СОХ-2 је приказана на графику 6 и 7, и сликама 13 и 14. СОХ-2 имунопозитивност расте током инфламације док у процесу зарастања ране она опада. У нашем истраживању нултог дана није постојала разлика између група у експресији СОХ-2, док је 3. и 6. дана запажена значајна разлика ($p < 0,05$; График 6 и 7) између експерименталних и контролних група. СОХ-2 имунопозитивност је 10. дана била слична у групи третираној растварачем и гел базом. Са друге стране, третман формулацијама на бази раствора и гела је значајно смањило СОХ-2 имунопозитивност у односу на одговарајуће контроле ($p < 0,05$; График 6 и 7).

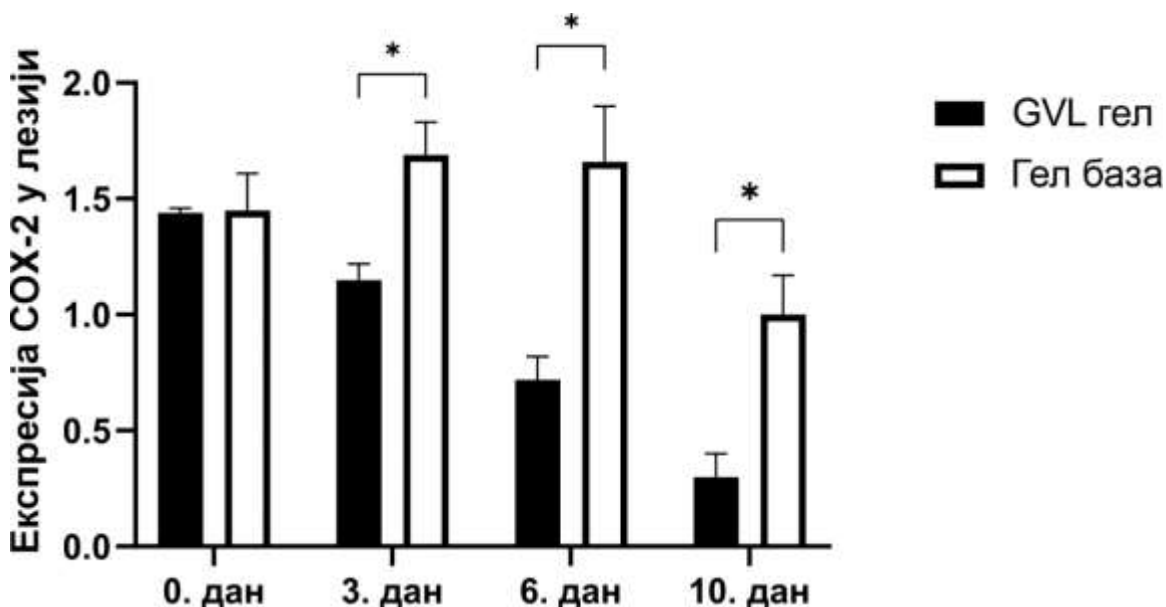


График 6. Ефекат примењеног гела на бази екстракта *G. verum* на имуопозитивност СОХ-2 у афтозној лезији. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; * статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

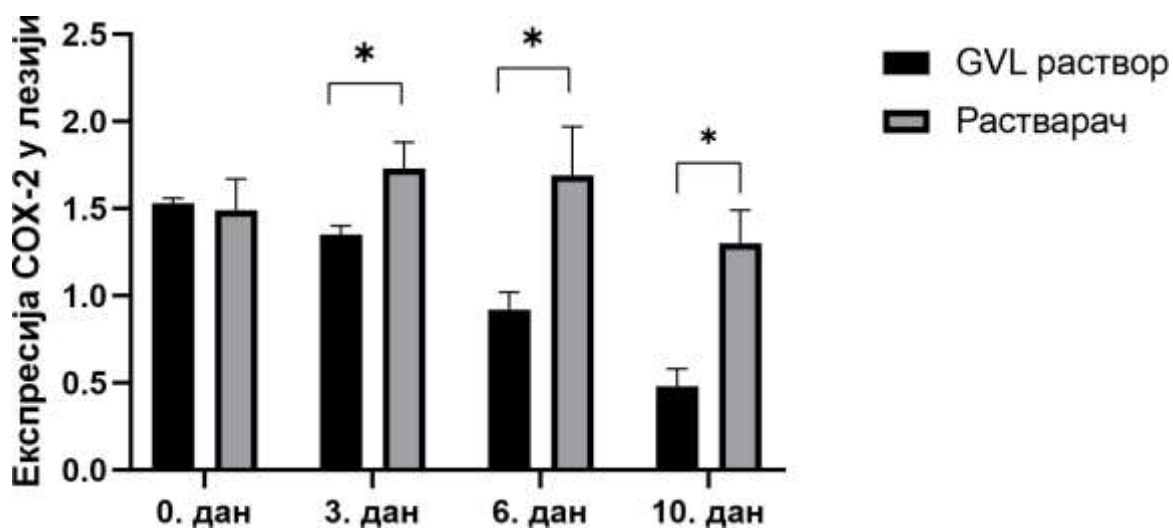


График 7. Ефекат примењеног раствора на бази екстракта *G. verum* на имуопозитивност СОХ-2 у афтозној лезији. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; * статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

При упоређивању ефеката испитиваних формулација на имунопозитивност СОХ-2 у афтозној лезији није било статистички значајне разлике током периода праћења (График 8).

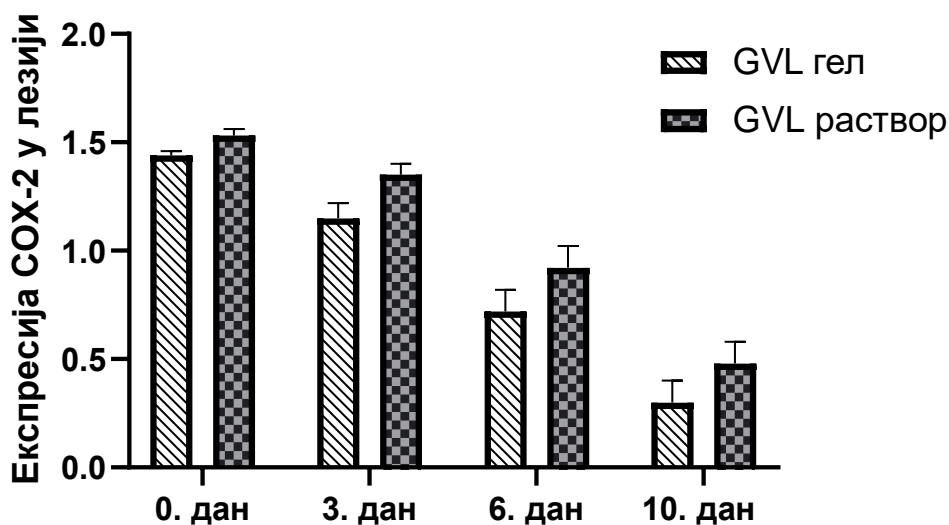
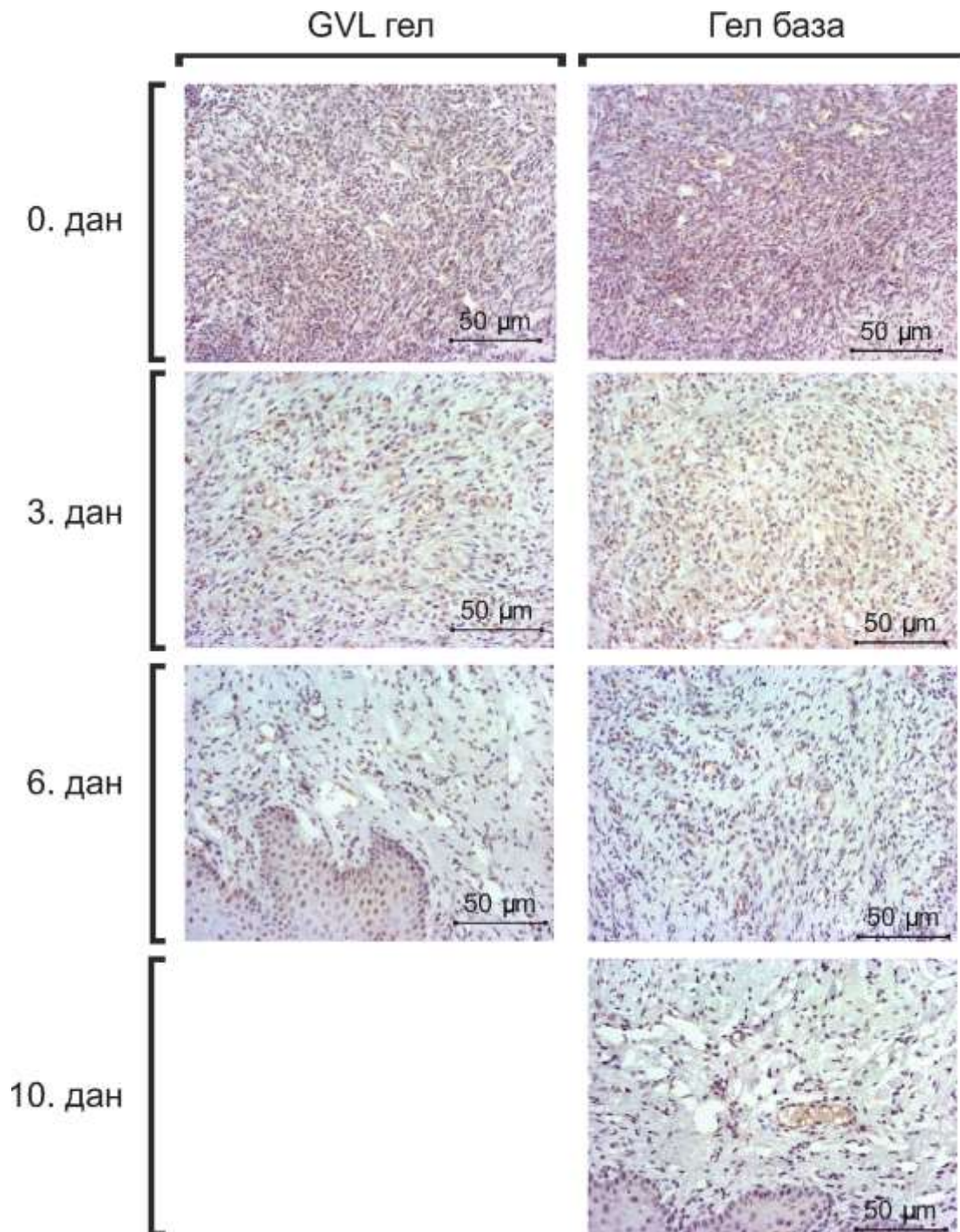
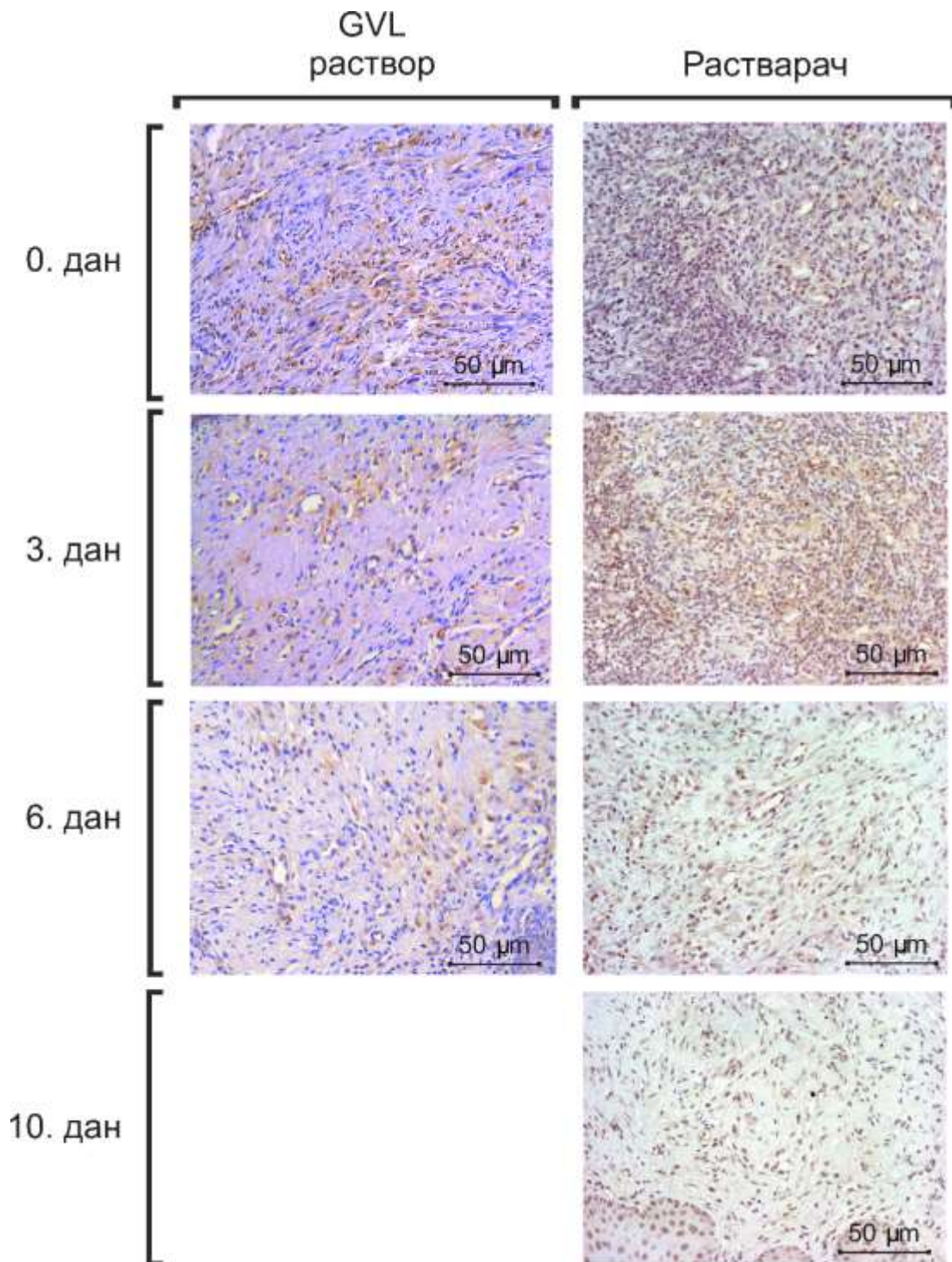


График 8. Упоређивање ефеката гела и раствора на бази екстракта *G. verum* на имунопозитивност СОХ-2 у афтозној лезији. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;
* статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);



Слика 13. Репрезентативне фотографије имунохистохемијског бојења имуопозитивности COX-2 у афтозној лезији након третмана гелом на бази екстракта *G. verum*.



Слика 14. Репрезентативне фотографије имунохистохемијског бојења имуопозитивности COX-2 у афтозној лезији након третмана раствором на бази екстракта *G. verum*.

Нултог дана такође није постојала разлика између група у садржају колагена. Значајно повећање количине колагена се уочава првенствено у групи третираној гелом 3. дана ($p < 0,05$, График 9), а затим и у групи третираној раствором 6. дана третмана ($p < 0,05$, График 10). Последњег дана праћења није било разлике између третираних и контролних група.

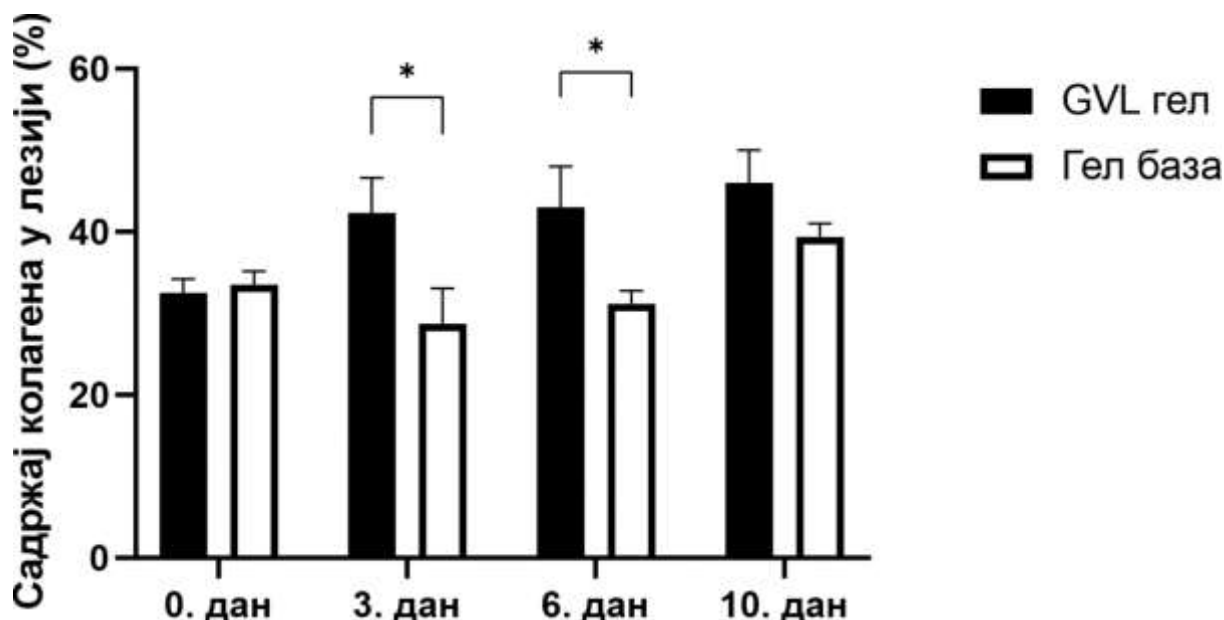


График 9. Ефекат примењеног гела на бази екстракта *G. verum* на садржај колагена у афтозној лезији. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;
* статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

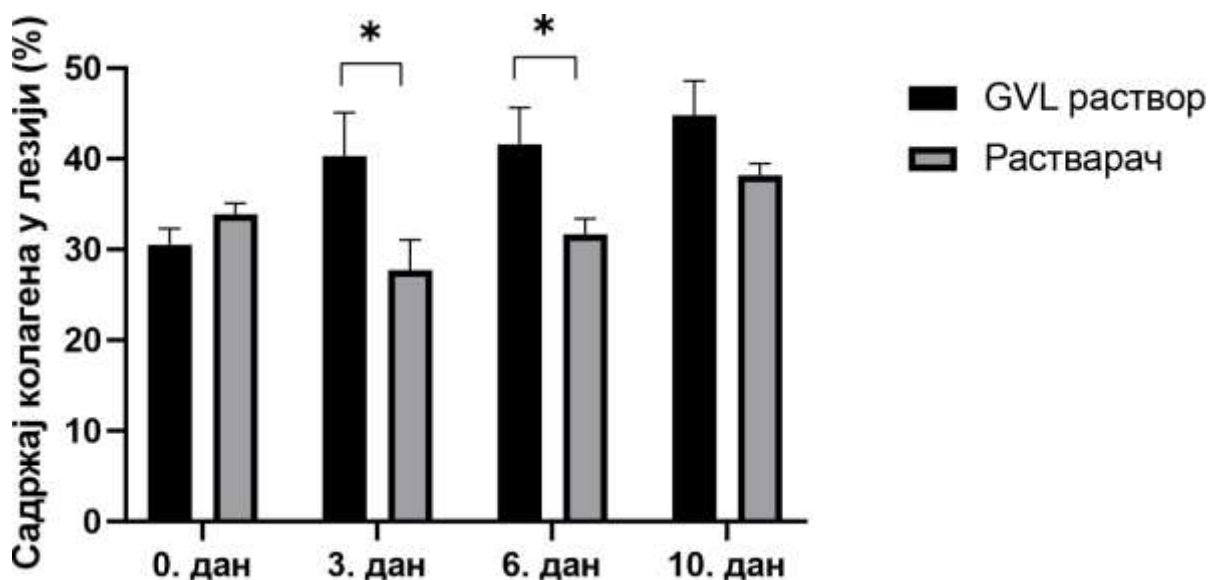


График 10. Ефекат примењеног раствора на бази екстракта *G. verum* на садржај колагена у афтозној лезији. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;
* статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

При упоређивању ефеката испитиваних формулација на садржај колагена у афтозној лезији није било статистички значајне разлике током периода праћења (График 11).

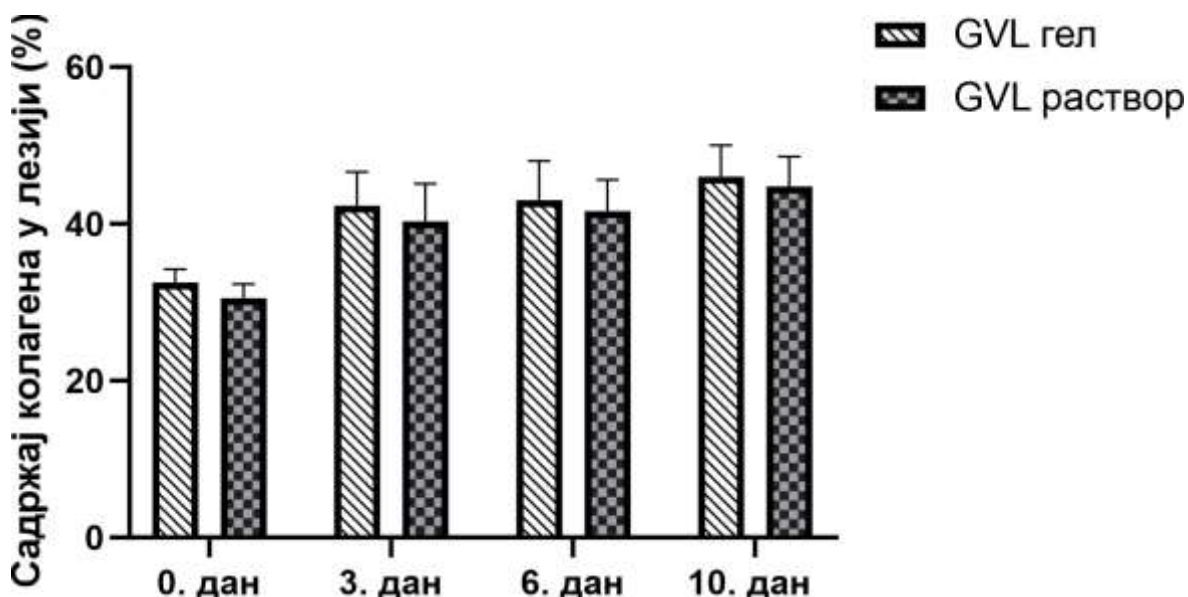


График 11. Упоређивање ефеката гела и раствора на бази екстракта *G. verum* на садржај колагена у афтозној лезији. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи;

* статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.5. УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА *G. VERUM* НА РЕДОКС СТАТУС У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ ПАЦОВА

4.5.1. Ефекти гела на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксиданаса у системској циркулацији пацова

Промене у нивоу прооксидационих параметара H_2O_2 , O_2^- , TBARS и NO_2^- мерених у системској циркулацији пацова третираних 20% гелом ивањског цвећа као и пацова третираних гел базом су приказане у Табели 9 и на Графику 12. Вредности представљају средња вредност \pm стандардна грешка ($mean \pm SE$) са статистичком значајношћу за вредност $p < 0,05$.

Добијени резултати не показују значајну разлику у нивоу испитиваних параметара већ говоре о сличним концентрацијама прооксиданаса у експерименталној и контролној групи (Табела 9, График 12).

Табела 9. Ефекти третмана гела на бази екстракта *G. verum* на прооксидационе параметре (H_2O_2 , O_2^- , TBARS и NO_2^-) у системској циркулацији пацова

		H_2O_2	O_2^-	TBARS	NO_2^-
GVL гел	3. дан	2,76±0,17	2,74±1,23	1,15±0,08	3,88±0,22
	6. дан	2,7±0,2	1,37±0,32	1,22±0,12	3,9±0,25
	10. дан	2,95±0,17	1,81±0,67	1,37±0,24	4,28±0,13
Гел база	3. дан	2,45±0,15	3,13±0,96	1,14±0,17	3,69±0,25
	6. дан	3,08±0,5	1,58±0,52	1,3±0,07	3,64±0,27
	10. дан	3,14±0,13	1,31±0,38	1,47±0,35	4,71±0,31

* статистичка значајност када се поређење спроводи са контролном групом ($p < 0,05$);

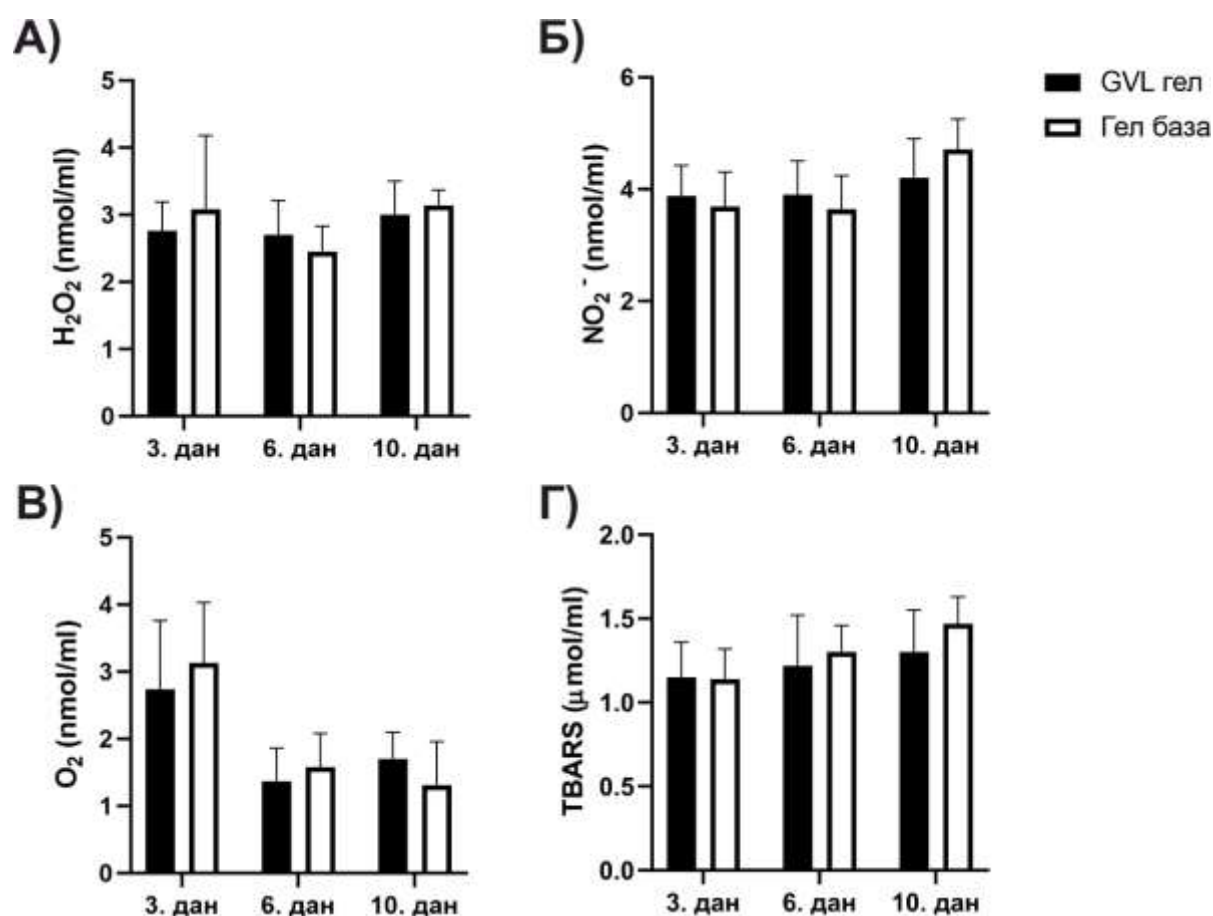


График 12. Ниво прооксидационих параметара у системској циркулацији пацова третираних гелом на бази екстракта *G. verum* и гел базом. А) H_2O_2 – водоник пероксид;

Б) NO_2^- - нитрити; В) O_2^- - супероксид анион радикали; Г) индекс липидне пероксидације мерен као TBARS; Добијени резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; * статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.5.2. Ефекти гела на бази екстракта *G. verum* на ниво антиоксиданаса у системској циркулацији пацова

Промене у нивоу антиоксиданаса CAT, SOD и GSH измерених у системској циркулацији пацова третираних 20% гелом ивањског цвећа као и пацова третираних гел базом су приказане у Табели 10. и на Графику 13. Вредности ових параметара представљају средњу вредност \pm стандардну грешку ($mean \pm SE$) са статистичком значајношћу за вредност $p < 0,05$.

Добијени резултати показују да нема разлике ни у нивоу антиоксидационих параметара (Табела 10, График 13).

Табела 10. Ефекти третмана гела на бази екстракта *G. verum* на антиоксидационе параметре (CAT, SOD и GSH) у системској циркулацији пацова

		CAT	SOD	GSH
GVL гел	3. дан	20,35 \pm 4,2	174,54 \pm 71,74	63113 \pm 6799,5
	6. дан	35,37 \pm 13,86	158,45 \pm 74,97	68156,38 \pm 3981,38
	10. дан	40,18 \pm 19,2	117,32 \pm 46,18	71835,58 \pm 3811,72
Гел база	3. дан	29,35 \pm 8,13	113,8 \pm 15,64	78835 \pm 5745,16
	6. дан	35,1 \pm 11,71	155,96 \pm 48,31	74845,94 \pm 4510,36
	10. дан	41,66 \pm 16,8	122,87 \pm 55,58	77130,18 \pm 7648,56

* статистичка значајност када се поређење спроводи са контролном групом ($p < 0,05$);

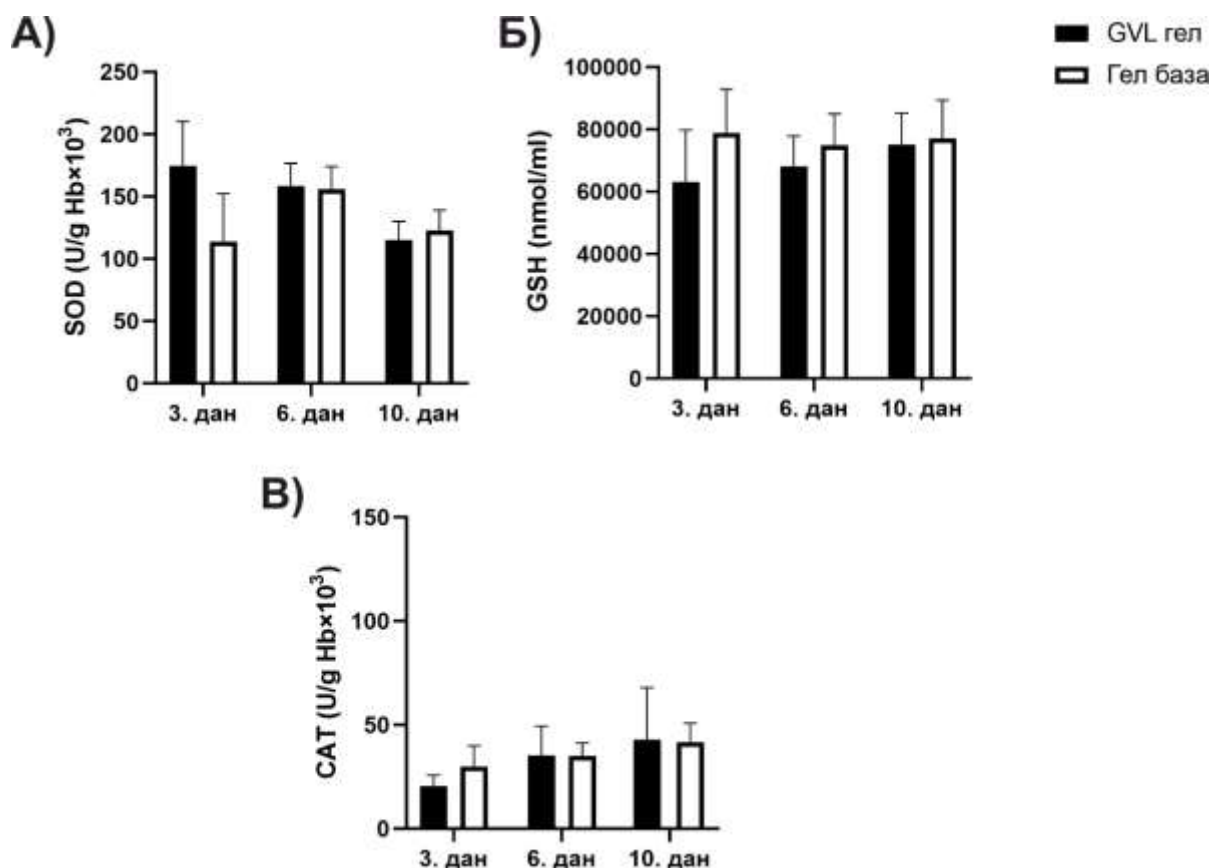


График 13. Ниво антиоксидационих параметара у системској циркулацији пацова третираних гелом на бази екстракта *G. verum*. **А)** SOD – супероксид дисмутаза; **Б)** GSH – редуковани глутатион; **В)** CAT – каталаза); Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.5.3. Ефекти раствора на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксиданаса у системској циркулацији пацова

У циљу испитивања ефеката примене раствора на бази екстракта ивањског цвећа на продукцију прооксиданаса у системској циркулацији експерименталних животиња, мерен је ниво следећих параметара: H_2O_2 , O_2^- , TBARS и NO_2^- .

Примена раствора у експерименталним групама пацова није довела до значајне разлике у нивоу прооксиданаса током третмана у односу на групу животиња које су третиране раствараче (График 14). Концентрација прооксиданаса у системској циркулацији пацова је приказана у Табели 11.

Табела 11. Ефекти третмана раствора на бази екстракта *G. verum* на прооксидационе параметре (H_2O_2 , O_2^- , TBARS и NO_2^-) у системској циркулацији пацова

		H_2O_2	O_2^-	TBARS	NO_2^-
GVL раствор	3. дан	3,20±0,17	2,31±0,20	1,52±0,08	4.12±0,24
	6. дан	3,06±0,26	1,12±0,20	1,62±0,10	4,20±0,19
	10. дан	2,71±0,20	1,90±0,32	1,05±0,05	4.32±0,41
Растварач	3. дан	2,83±0,13	2,81±0,23	4,51±0,25	7,41±0,19
	6. дан	3,10±0,13	1,80±0,23	2,50±0,16	6,40±0,67
	10. дан	3,23±0,28	2,12±0,41	1,08±0,06	5,50±0,09

* статистичка значајност када се поређење спроводи са контролном групом ($p < 0,05$);

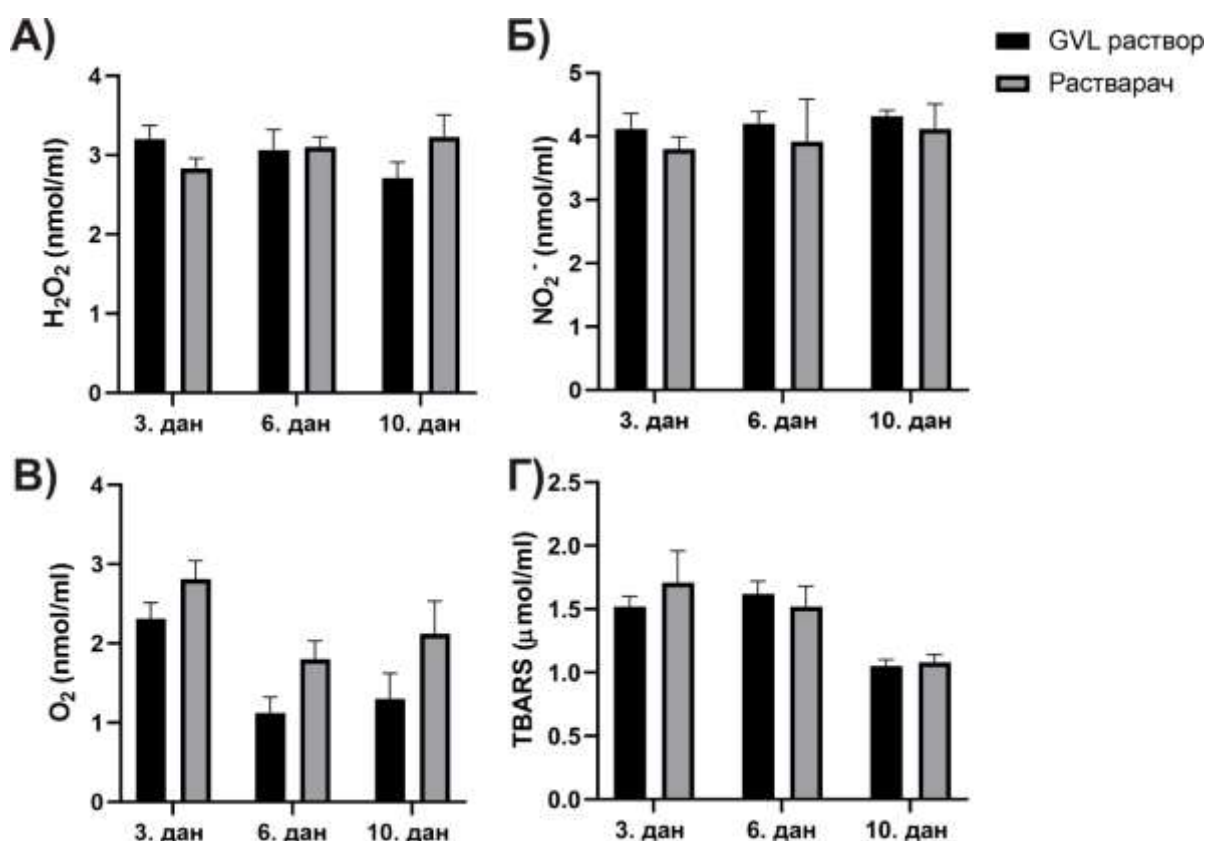


График 14. Ниво прооксидационих параметара у системској циркулацији пацова након примене раствора на бази екстракта *G. verum*. А) H_2O_2 – водоник пероксид; Б) NO_2^- - нитрити; В) O_2^- - супероксид анјон радикали; Г) индекс липидне пероксидације мерен као TBARS; Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.5.4. Ефекти раствора на бази екстракта *G. verum* на ниво антиоксиданаса у системској циркулацији пацова

У циљу испитивања ефеката примене раствора на бази екстракта ивањског цвећа на продукцију антиоксиданаса у системској циркулацији експерименталних животиња, мерен је ниво следећих параметара: SOD, CAT и GSH.

Примена раствора на бази екстракта *G. verum*. није довела до значајне разлике у нивоу антиоксидационих параметара током периода праћења. Све промене у концентрацијама антиоксидационих параметара су приказане у Табели 12 и на Графику 15.

Табела 12. Ефекти третмана раствора на бази екстракта *G. verum* на антиоксидационе параметре (SOD, CAT и GSH) у системској циркулацији пацова

		SOD	CAT	GSH
GVL раствор	3. дан	157,64±19,38	19,35±5,08	72101,76±3005,03
	6. дан	161,6±22,0	33,75±5,7	73730,44±3582,89
	10. дан	135,32±8,33	41,20±8,4	83211,88±2300,00
Растварач	3. дан	161,83±22,67	24,04±7,2	66009,78±1792,82
	6. дан	169,19±15,46	31,37±5,8	86244,15±4643,99
	10. дан	131,78±9,43	43,66±8,2	86536,88±2562,00

* статистичка значајност када се поређење спроводи са контролном групом ($p < 0,05$);

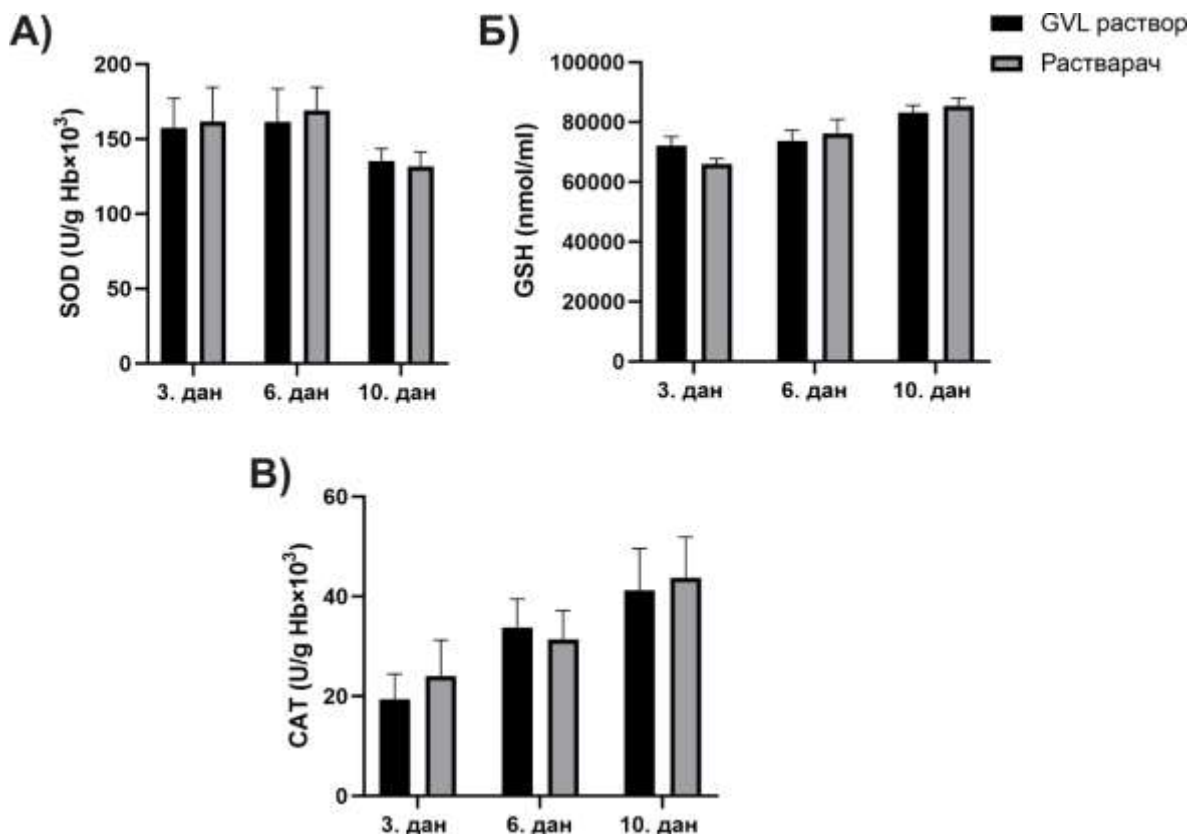


График 15. Ниво антиоксидационих параметара у системској циркулацији пацова након примене раствора на бази екстракта *G. verum*. **А)** SOD – супероксид дисмутаза; **Б)** GSH – редуковани глутатион; **В)** CAT – каталаза; Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.5.5. Поређење ефеката формулација на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксиданаса у системској циркулацији пацова

У циљу упоређивања ефеката екстракта ивањског цвећа у облику раствора и гела и утицаја на продукцију прооксиданаса у системској циркулацији експерименталних животиња, мерен је ниво следећих параметара: H_2O_2 , O_2^- , TBARS и NO_2^- .

При упоређивању ефеката формулација на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксиданаса у системској циркулацији пацова није уочена значајна разлика током читавог периода праћења. (График 16).

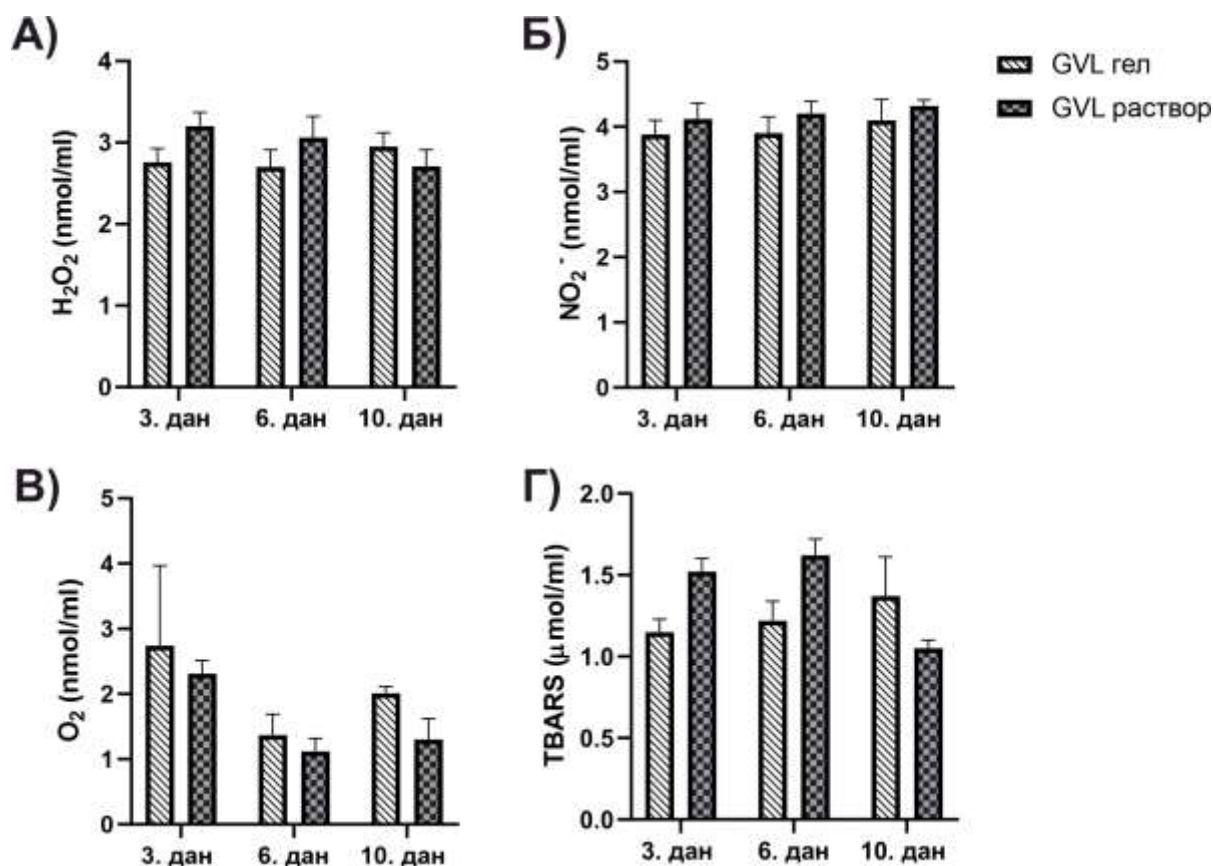


График 16. Ниво прооксидационих параметара у системској циркулацији пацова третираних гелом и раствором на бази екстракта *G. verum*. А) H_2O_2 – водоник пероксид; Б) NO_2^- - нитрити; В) O_2^- - супероксид анјон радикали; Г) индекс липидне пероксидације мерен као TBARS; Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.5.6. Поређење ефеката формулација на бази екстракта *G. verum* на ниво антиоксиданаса у системској циркулацији пацова

У циљу упоређивања ефеката екстракта ивањског цвећа у облику раствора и гела и утицаја на продукцију антиоксиданаса у системској циркулацији експерименталних животиња, мерен је ниво следећих параметара: SOD, CAT и GSH.

При упоређивању ефеката формулација на бази екстракта *G. verum* на ниво антиоксиданаса у системској циркулацији пацова није уочена значајна разлика (График 17). Разлике у концентрацијама антиоксидационих параметара након третмана гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа су приказане графички (График 17).

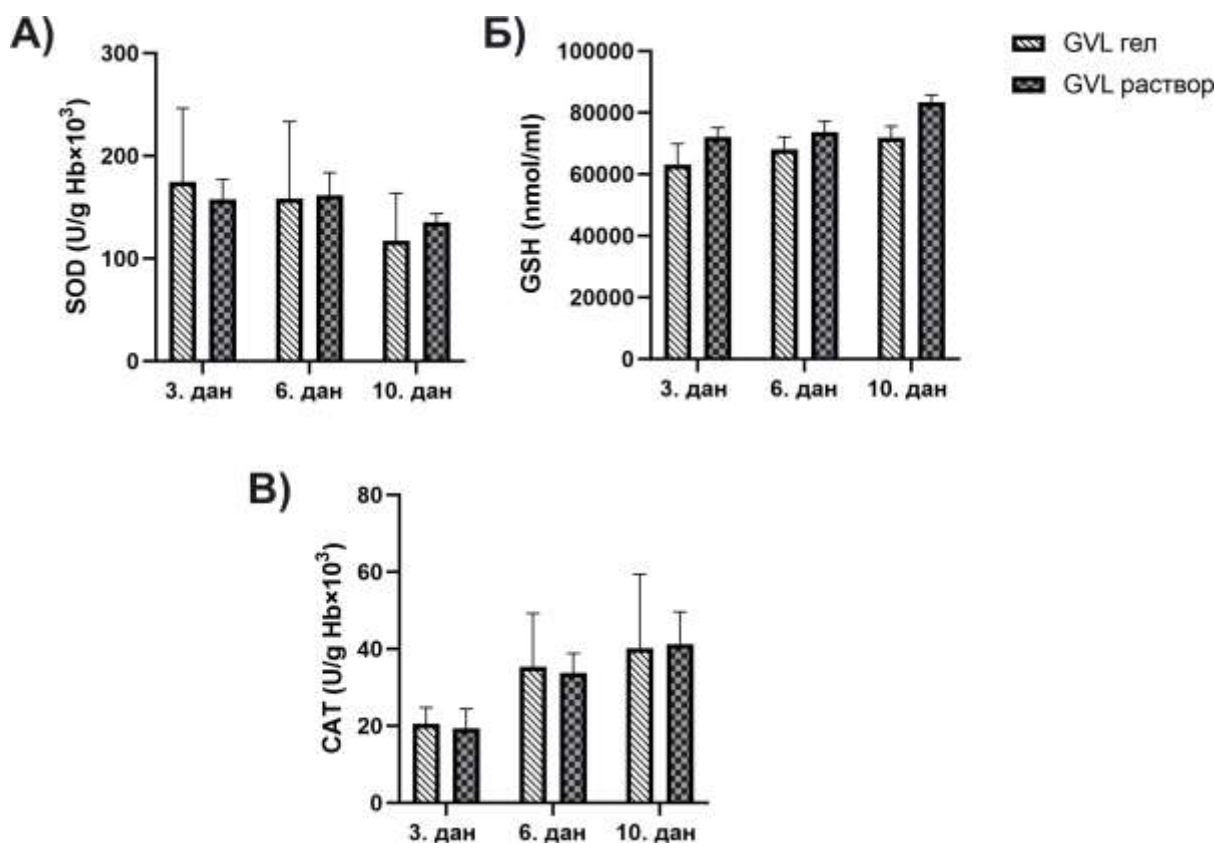


График 17. Ниво антиоксидационих параметара у системској циркулацији пацова након примене гела и раствора на бази екстракта *G. verum*. **А)** SOD – супероксид дисмутаза; **Б)** GSH – редуковани глутатион; **В)** CAT – каталаза; Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; * статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.6. УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА *G. VERUM* НА ЛОКЛАНИ РЕДОКС СТАТУС У ТКИВУ ОБРАЗА КОД ПАЦОВА

4.6.1. Ефекти гела на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксиданаса и антиоксиданаса у букалном ткиву пацова

Како бисмо испитали ефекте примене гела на бази екстракта ивањског цвећа на ниво параметара оксидационог стреса у афтозној лезији, одређене су вредности прооксидационих и антиоксидационих параметара (TBARS, SOD, GSH и CAT).

Концентрација TBARS у букалном ткиву животиња са индукованим афтозним лезијама значајно је смањена у поређењу са контролом у свим временским пресецима (График 18). Такође, приказана је појачана активност SOD, CAT и GSH у групи животиња третираних гелом током читавог периода праћења (Табела 13, График 18).

Табела 13. Ефекти третмана гела на бази екстракта ивањског цвећа на прооксидационе и антиоксидационе параметре (TBARS, SOD, GSH и CAT) у букалном ткиву пацова

		TBARS	SOD	GSH	CAT
GVL гел	3. дан	1,6473±0,11064*	106,98±36,30*	205219,16±3264,25*	50,10±1,05*
	6. дан	1,3453±0,0853*	45,36±3,53*	229602,75±2859,28*	22,12±1,394*
	10. дан	574,25±0,0574*	47,60±12,01	25894,36±1694,5*	9,5±5,77
Гел база	3. дан	2,2903±0,2558	21,243±2,98	176583,3±8824,31	25,1667±2,791
	6. дан	1,580±0,08602	13,7±2,024	19973,75±4000	9,90±0,50
	10. дан	1,433±0,1333	17,45±2,53*	244803,14±3333,3	4,92±0,20*

* статистичка значајност када се поређење спроводи са контролном групом (p<0,05);

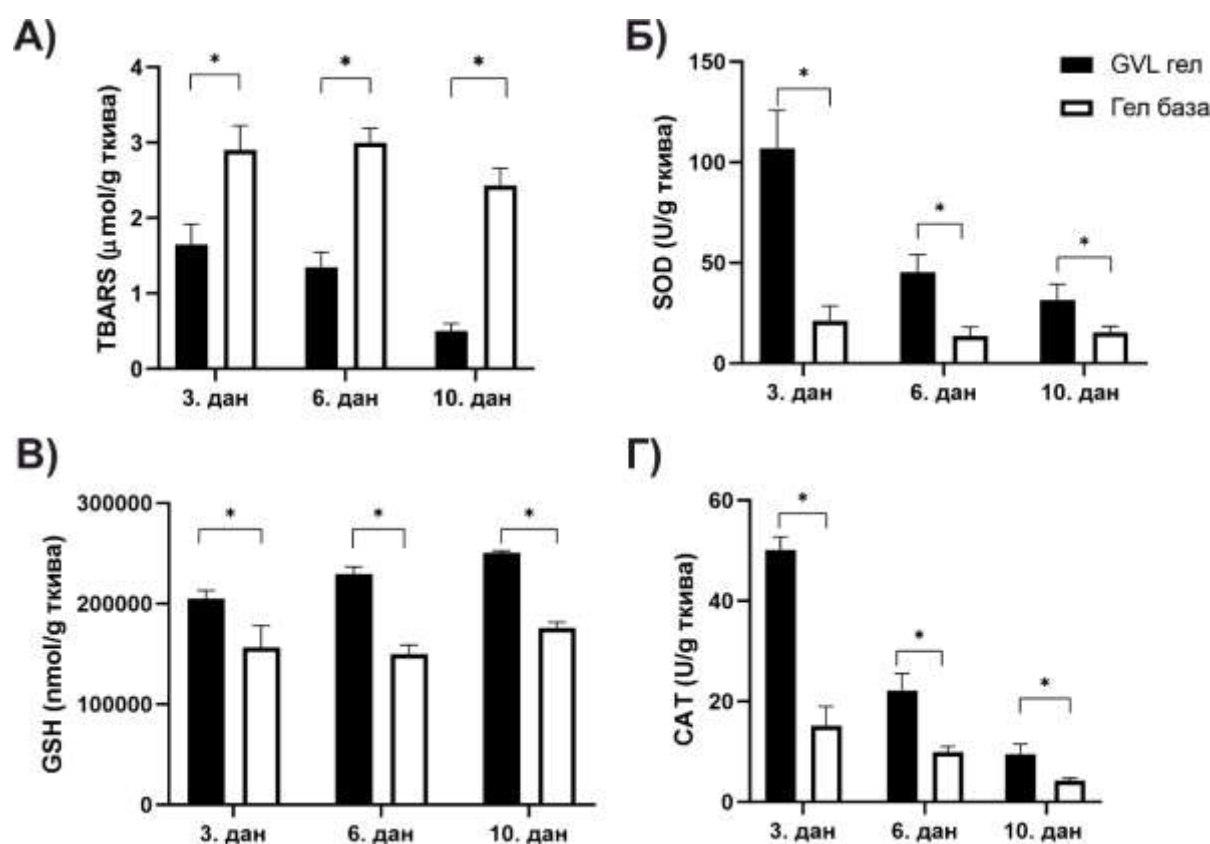


График 18. Ефекат гела на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксидационих и антиоксидационих параметара у букалном ткиву експерименталних животиња; **А)** индекс липидне пероксидације мерен као TBARS; **Б)** SOD – супероксид дисмутаза; **В)** GSH – редуковани глутатион; **Г)** CAT – каталаза; Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група (p<0,05);

4.6.2. Ефекти раствора на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксиданаса и антиоксиданаса у букалном ткиву пацова

Како бисмо испитали ефекте примене раствора на бази екстракта ивањског цвећа на ниво параметара оксидационог стреса у афтозној лезији, одређене су вредности прооксидационих и антиоксидационих параметара (TBARS, SOD, GSH и CAT).

Концентрација CAT у афтозним лезијама експерименталних животиња, након третмана раствором на бази екстракта ивањског цвећа, је значајно смањена у поређењу са контролом. Вредности SOD и GSH су више у експерименталној групи пацова током читавог периода праћења, док су вредности прооксидационог параметра TBARS након третмана раствором значајно ниже у односу на животиње третиране растварачем.

Утицај раствора на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксидационих и антиоксидационих параметара у букалном ткиву експерименталних животиња је приказан у Табели 14 и на Графику 19.

Табела 14. Ефекти третмана раствора на бази екстракта ивањског цвећа на прооксидационе и антиоксидационе параметре (TBARS, SOD, GSH и CAT) у букалном ткиву пацова

		TBARS	SOD	GSH	CAT
GVL раствор	3. дан	1,25±0,10*	32,56±4,69*	22769,36±1435,92*	10,37±0,51*
	6. дан	0,54±0,18*	27,62±3,5*	79253,01±228,5*	6,75±1,83*
	10. дан	0,47±0,10*	16,47±1,25*	275156,34±265,76*	4,21±0,35*
Раствара ч	3. дан	2,43±0,10	15,06±2,32	11589,04±589,92	29,62±1,2
	6. дан	2,047±0,14	13,65±1,7	21287,55±543,95	19,68±5,15
	10. дан	2,53±0,34	9,43±1,33	23701,02±555,36	7,41±1,21

* статистичка значајност када се поређење спроводи са контролном групом ($p < 0,05$);

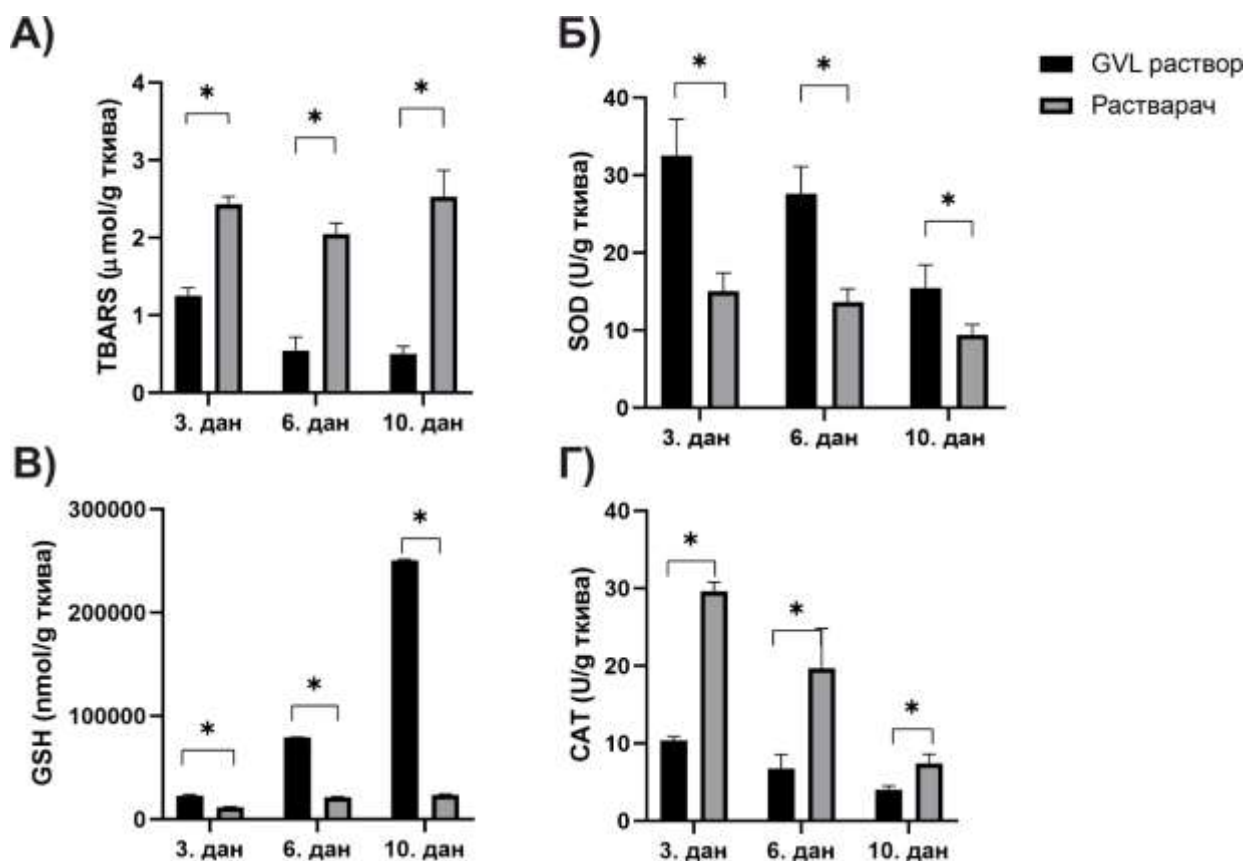


График 19. Ефекат раствора на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксидационих и антиоксидационих параметара у букалном ткиву експерименталних животиња. **А)** индекс липидне пероксидације мерен као TBARS; **Б)** SOD – супероксид дисмутаза; **В)** GSH – редуковани глутатион; **Г)** CAT – каталаза; Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група (p<0,05);

4.6.3. Упоређивање ефеката формулација на бази екстракта *G. verum* у облику гела и раствора на ниво прооксиданаса и антиоксиданаса у букалном ткиву пацова

Како бисмо испитали разлику у ефектима примене две различите формулације на бази екстракта ивањског цвећа на ниво параметара оксидационог стреса у афтозној лезији, одређене су вредности прооксидационих и антиоксидационих параметара (TBARS, SOD, GSH и CAT).

Концентрација CAT, GSH и SOD у афтозним лезијама експерименталних животиња, након третмана гелом на бази екстракта ивањског цвећа, мерена 3. дана третмана је значајно повишена у односу на групу третираном раствором. Вредности GSH су значајно повишене и 6. дана третмана у групи третираној гелом, док између осталих параметара није било значајне разлике у овом временском пресеку. Последњег дана праћења такође није било разлике између упоређиваних група.

Разлике између утицаја гела и раствора на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксидационих и антиоксидационих параметара у букалном ткиву експерименталних животиња су приказане на Графику 20.

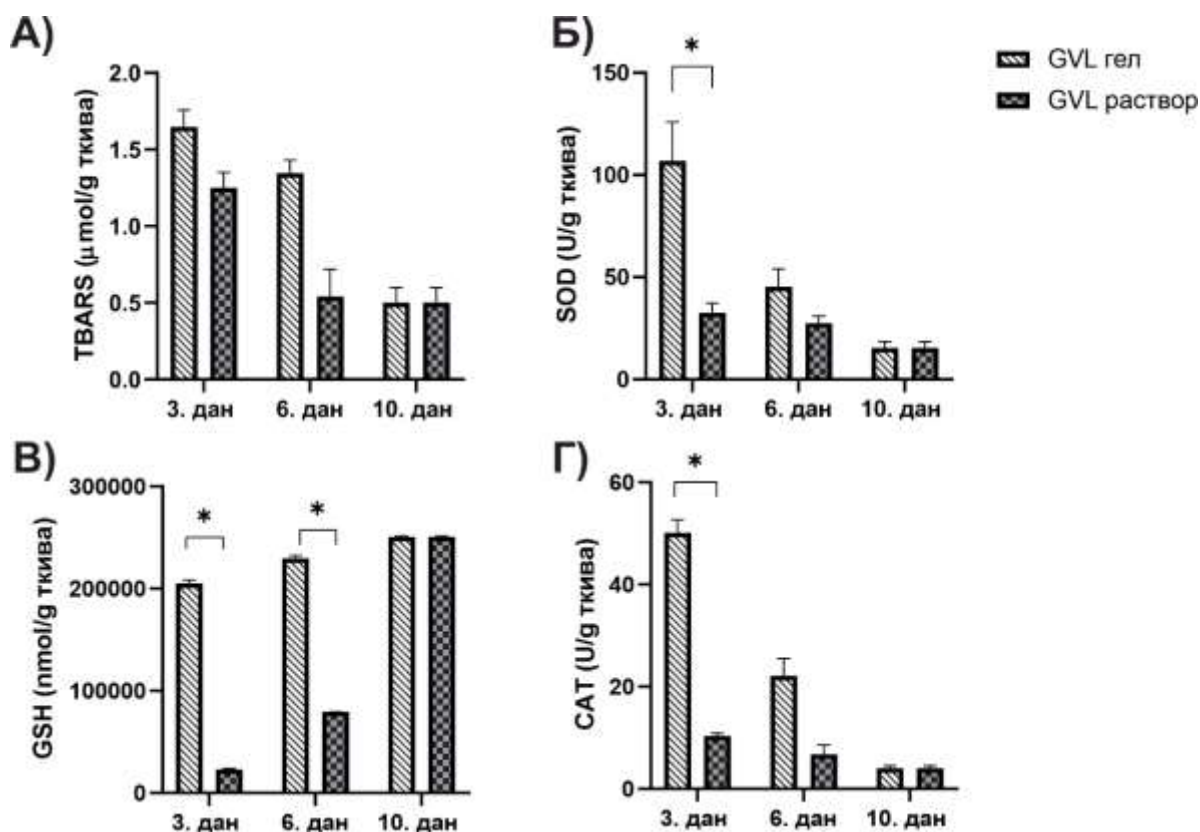


График 20. Ефекат гела и раствора на бази екстракта *G. verum* на ниво прооксидационих и антиоксидационих параметара у букалном ткиву експерименталних животиња. **А)** индекс липидне пероксидације мерен као ТВАРС; **Б)** SOD – супероксид дисмутаза; **В)** GSH – редуковани глутатион; **Г)** CAT – каталаза; Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.7. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА КОД ЖИВОТИЊА СА АФТОЗНИМ СТОМАТИТИСОМ

4.7.1. Ефекти формулација на бази екстракта *G. verum* на експресију гена укључених у процес инфламације

Коришћењем qRT-PCR анализе одређене су промене у нивоу релативне експресије испитиваних гена за TNF- α , IL-1 β , IL-6 као и IL-10 код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* и упоређиване су са контролним групама.

Експресија гена за TNF- α мерена 3. и 6. дана третмана је била значајно нижа у групи животиња третираних гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа у поређењу са контролним животињама. Резултати не показују статистички значајну разлику између упоређиваних група 10. третмана (Табела 15 и График 21).

Табела 15. Релативна експресија гена за TNF- α у групама третираним формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролним групама.

Ген од интереса - TNF- α			
	3. дан	6. дан	10. дан
GVL гел	25,31 \pm 5,77**	5,89 \pm 1,53**	20,58 \pm 7,20
Гел база	11099,34 \pm 2525,56	55,05 \pm 9,80	18,02 \pm 9,53
GVL раствор	95,56 \pm 26,54*	10,38 \pm 3,33*	33,86 \pm 5,12
Растварач	1786,94 \pm 818,52	53,32 \pm 11,83	31,15 \pm 8,81

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

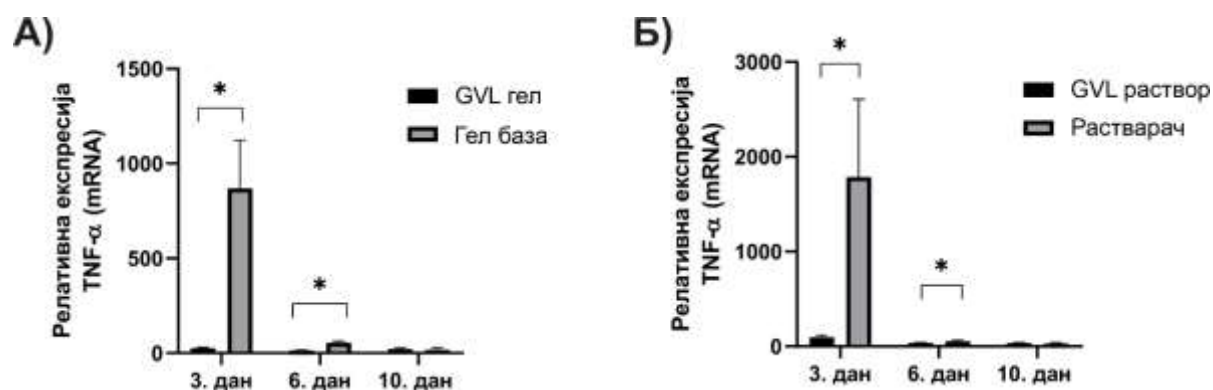


График 21. Релативна експресија гена за TNF- α код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* **А)** GVL гел; **Б)** GVL раствор; у односу на контролне групе. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

У поређењу релативне експресије гена за TNF- α у групи третираној GVL гелом и групи третираној GVL раствором, није било значајне разлике током читавог периода праћења (График 22).

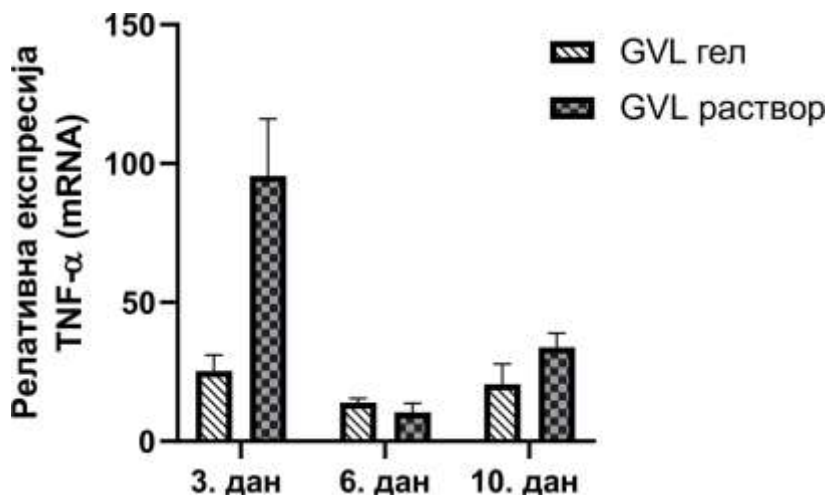


График 22. Релативна експресија гена за TNF- α код животиња на третману гелом и раствором на бази екстракта *G. verum*. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

Релативна експресија гена за маркер IL-1 β је бележила значајно ниже вредности у групи животиња третираних гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа у поређењу са контролним животињама 3. и 6. дана третмана. Последњег дана третмана није било значајне разлике у релативној експресији гена за IL-1 β између упоређиваних група (Табела 16 и График 23).

Табела 16. Релативна експресија гена за IL-1 β у групама третираним формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролним групама.

Ген од интереса - IL-1 β			
	3. дан	6. дан	10. дан
GVL гел	0,04 \pm 0,004*	0,12 \pm 0,03*	0,09 \pm 0,02
Гел база	1,48 \pm 0,26	0,88 \pm 0,04	0,85 \pm 0,29
GVL раствор	0,23 \pm 0,29**	0,16 \pm 0,19**	0,12 \pm 0,07
Растварач	1,33 \pm 0,28	1,533 \pm 0,20	1,36 \pm 0,18

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

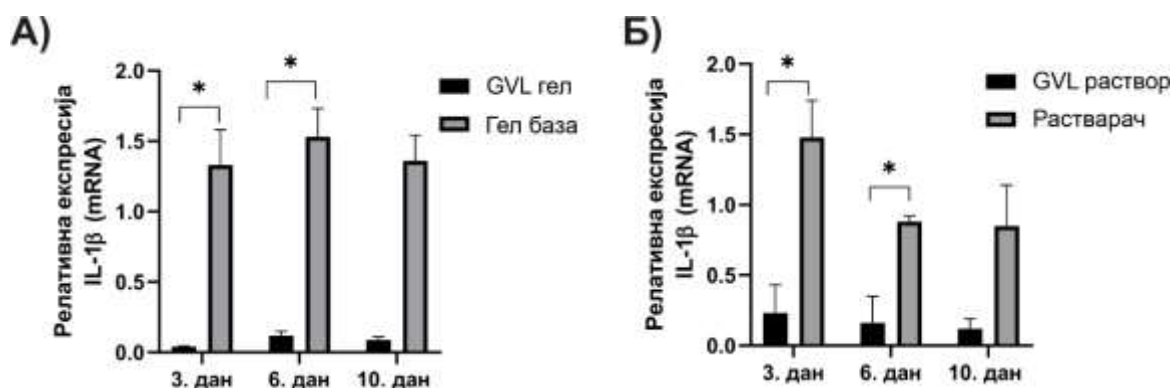


График 23. Релативна експресија гена за IL-1 β код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* **А)** GVL гел; **Б)** GVL раствор; у односу на контролне групе. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

У поређењу група GVL гел и GVL раствор, 3. дана третмана је постојала значајна разлика у релативној експресији гена за IL-1 β , при чему су више вредности забележене у групи животиња третираних GVL гелом (График 24).

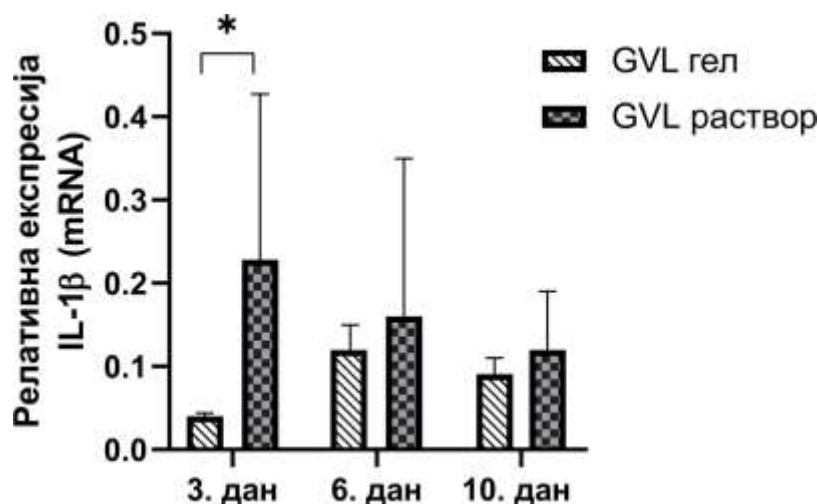


График 24. Релативна експресија гена за IL-1 β код животиња на третману гелом и раствором на бази екстракта *G. verum*. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

Релативна експресија гена за маркер IL-6 је бележила значајно ниже вредности у групи животиња третираних гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа у поређењу са контролним животињама 3. и 6. дана третмана. Такође није постојала значајност у разлици између релативне експресије гена за IL-6 у поређењу групе третиране гелом и групе третиране раствором последњег дана третмана (Табела 17 и График 25).

Табела 17. Релативна експресија гена за IL-6 у групама третираним формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролним групама.

Ген од интереса - IL-6			
	3. дан	6. дан	10. дан
GVL гел	32,45±5,6**	5,4±1,2**	2,38±0,5
Гел база	145,13±21,3	118,3±16,3	46,1±8,2
GVL раствор	45,6±10,4*	13,4±2,3*	7,42±1,8
Растварач	133,24±18,3	112,7±11,3	53,2±7,8

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

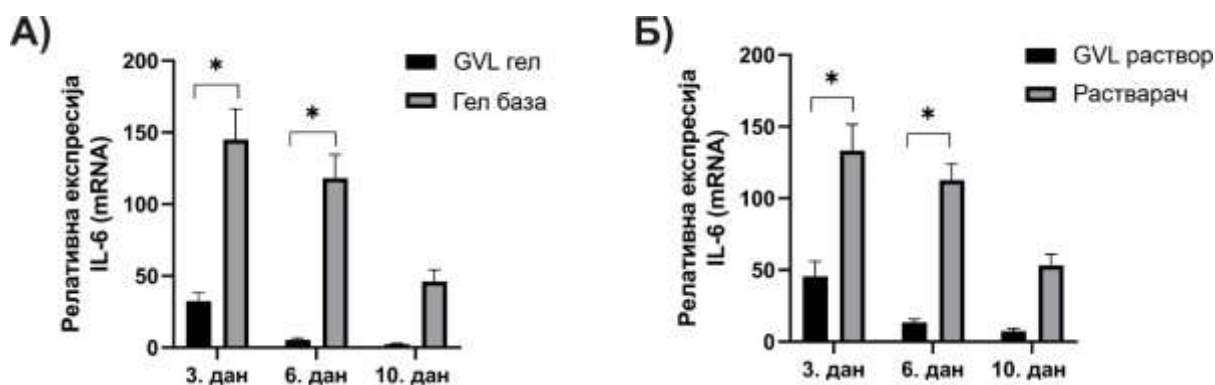


График 25. Релативна експресија гена за IL-6 код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* **А)** GVL гел; **Б)** GVL раствор; у односу на контролне групе. Резултати представљени као средња вредност ± стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

У поређењу група GVL гел и GVL раствор, није било разлике са статистичком значајношћу у релативној експресији гена за IL-6 (График 26).

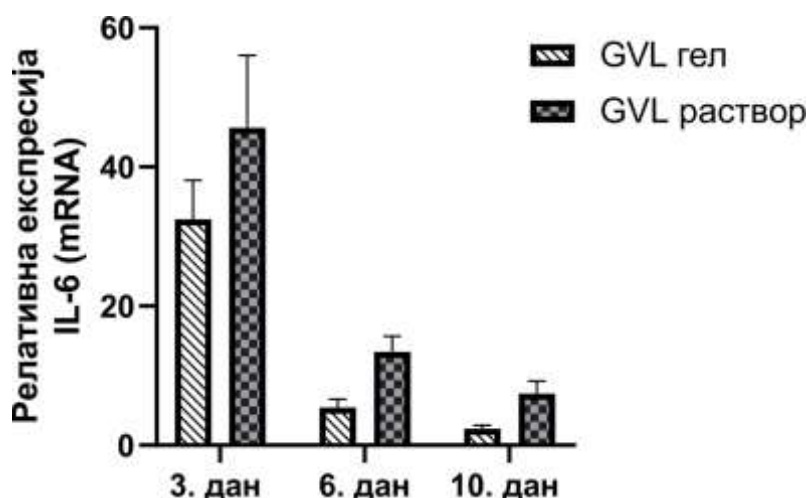


График 26. Релативна експресија гена за IL-6 код животиња на третману гелом и раствором на бази екстракта *G. verum*. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

Релативна експресија гена за IL-10 је у групи животиња третираних гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа била значајно виша у поређењу са контролним животињама 3. и 6. дана третмана. Вредности релативне експресије гена за IL-10 последњег дана третмана су биле без значајних разлика између упоређиваних група (Табела 18 и График 27).

Табела 18. Релативна експресија гена за маркер IL-10 у групама третираним формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролним групама.

Ген од интереса - IL-10			
	3. дан	6. дан	10. дан
GVL гел	1730,39 \pm 223,60**	118,59 \pm 49,19**	99,47 \pm 4,12
Гел база	0,13 \pm 0,01	66,31 \pm 18,38	93,36 \pm 5,77
GVL раствор	1093,0 \pm 415,85*	386,58 \pm 147,72*	114,56 \pm 4,89
Растварач	0,21 \pm 0,14	92,29 \pm 3,33	123,26 \pm 5,92

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

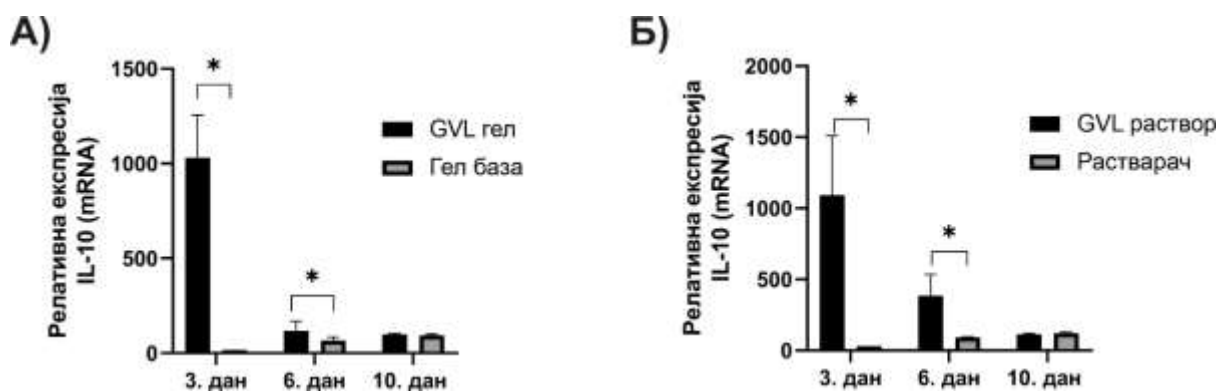


График 27. Релативна експресија гена за IL-10 код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* **А)** GVL гел; **Б)** GVL раствор; у односу на контролне групе. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

У поређењу група GVL гел и GVL раствор, није уочено постојање значајне разлике у релативној експресији гена за IL-10 (График 28).

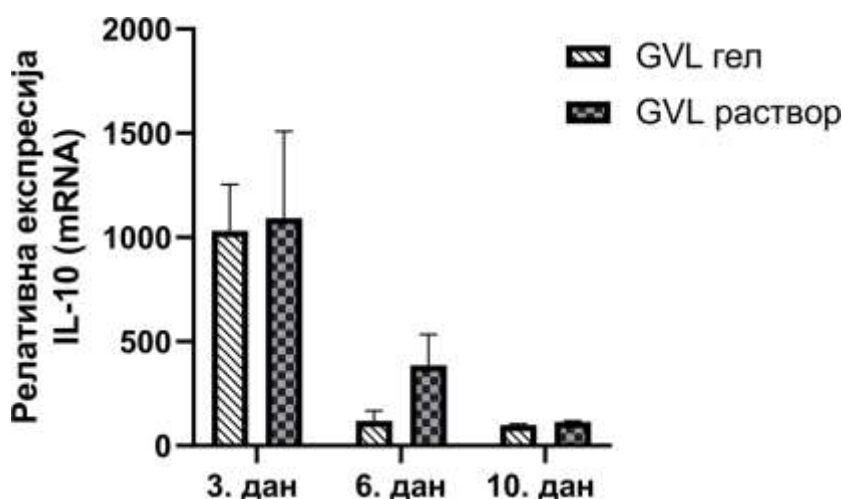


График 28. Релативна експресија гена за IL-10 код животиња на третману гелом и раствором на бази екстракта *G. verum*. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

4.7.2. Ефекти формулација на бази *G. verum* на експресију гена укључених у процес оксидационог стреса

Коришћењем qRT-PCR анализе одређене су промене у нивоу релативне експресије гена за SOD1 и SOD2 код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* у поређењу са контролним групама.

Релативна експресија гена за SOD1 3. и 6. дана третмана, је била значајно виша у групи животиња третираних гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа у поређењу са контролним животињама. Последњег дана третмана нису регистроване

значајне разлике у релативној експресији гена за SOD1 између упоређиваних група (Табела 19 и График 29).

Табела 19. Релативна експресија гена за SOD1 у групама третираним формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролним групама.

Ген од интереса - SOD1			
	3. дан	6. дан	10. дан
GVL гел	8277,25±1066,5**	974,17±208,02**	84,28±0,82
Гел база	30,75±12,69	6,05±0,29	98,12±3,09
GVL раствор	3027,97±307,94*	246,57±2,81*	101,45±0,25
Растварач	2,91±0,83	3,28±0,45	100,12±2,8

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

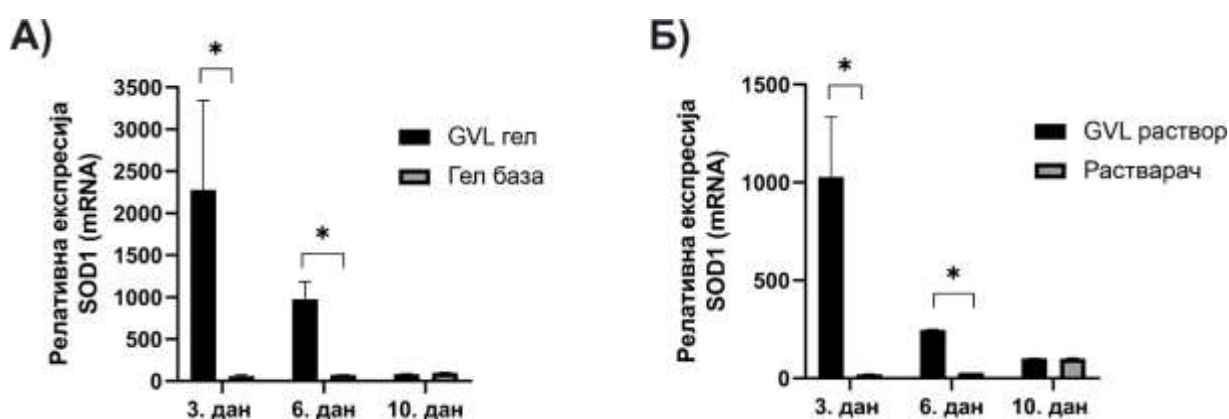


График 29. Релативна експресија гена за SOD1 код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* А) GVL гел; Б) GVL раствор; у односу на контролне групе. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

У поређењу група GVL гел и GVL раствор, 3. дана третмана је постојала разлика у релативној експресији гена за SOD1, при чему су значајно више вредности забележене у групи животиња третираних GVL гелом (График 30).

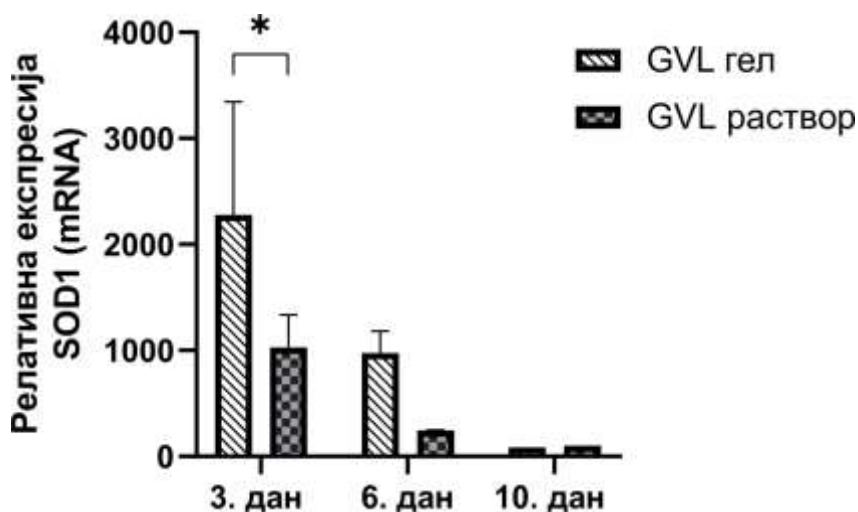


График 30. Релативна експресија гена за SOD1 код животиња на третману гелом и раствором на бази екстракта *G. verum*. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

Релативна експресија гена за SOD2 је такође била значајно виша у групи животиња третираних гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа у истим временским пресецима као и SOD1, у односу на контролне животиње. Последњег дана третмана није регистрована разлика у релативној експресији гена за SOD2 између упоређиваних група (Табела 20 и График 31).

Табела 20. Релативна експресија гена за SOD2 у групама третираним формулацијама на бази екстракта *G. verum* и контролним групама.

Ген од интереса – SOD2			
	3. дан	6. дан	10. дан
GVL гел	35314,34 \pm 327,69**	421,50 \pm 78,93**	200,45 \pm 18,68
Гел база	52,45 \pm 21,68	156,54 \pm 59,89	196,0 \pm 25,3
GVL раствор	32254,34 \pm 3280,13*	462,66 \pm 45,80*	127,68 \pm 3,25
Растварач	3,25 \pm 0,57	22,61 \pm 5,77	135,66 \pm 4,97

* Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Растварач ($p \leq 0,05$).

** Статистичка значајност када се поређење спроводи са групом Гел база ($p \leq 0,05$).

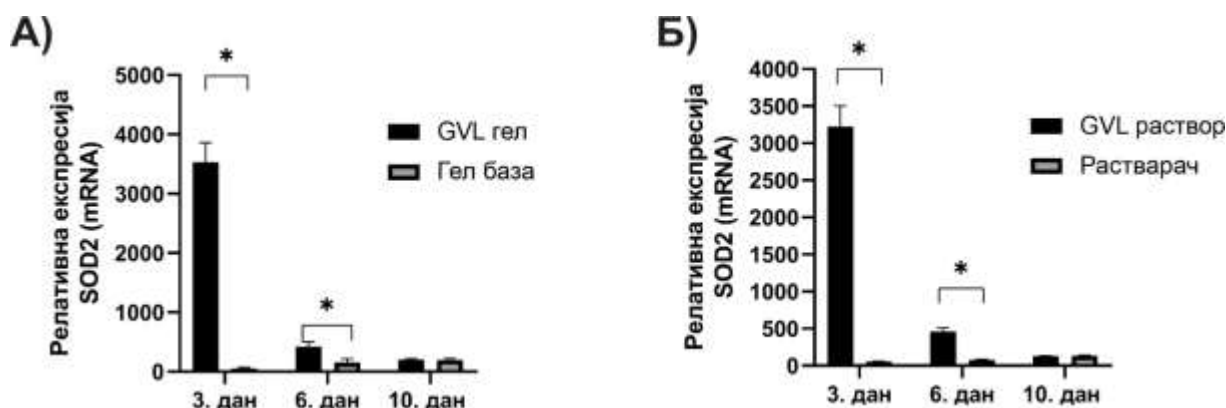


График 31. Релативна експресија гена за SOD2 код животиња на третману формулацијама на бази екстракта *G. verum* **А)** GVL гел; **Б)** GVL раствор; у односу на контролне групе. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

За разлику од SOD1, у поређењу група GVL гел и GVL раствор, није постојала разлика у релативној експресији гена за SOD2 током читавог периода третмана (График 32).

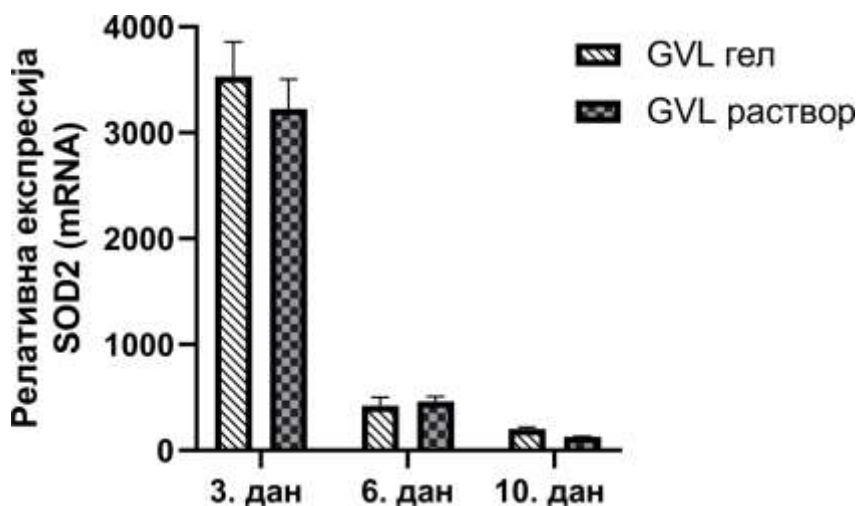


График 32. Релативна експресија гена за SOD2 код животиња на третману гелом и раствором на бази екстракта *G. verum*. Резултати представљени као средња вредност \pm стандардна грешка добијени на основу 5 животиња у свакој групи; *статистичка значајност између упоређиваних група ($p < 0,05$);

5

ДИСКУСИЈА

A large, bold, green number '5' is the central focus. Inside the bottom curve of the '5', there is a detailed illustration of a yellow flower with green stems and leaves. The word 'ДИСКУСИЈА' is written in a black, serif font across the middle of the number. A thin black horizontal line is positioned directly beneath the word.

5. ДИСКУСИЈА

Терапија афтозног стоматитиса која је тренутно доступна најчешће подразумева примену антибиотика и кортикостероида, при чему не обезбеђује потпуно зарастање улцерација, повећава ризик од микробиолошке резистенције, често доводи до појаве нежељених ефеката и последично води ка неуспешној регенерацији букалног ткива. У данашње време, фитотерапија у третману зарастања рана представља добро познату алтернативу синтетским препаратима. Биљне врсте коришћене у медицини садрже различите компоненте које им пружају антиоксидациона, антимикуробна и антиинфламаторна својства и тиме поспешују зарастање. Полифеноли су секундарни метаболити који представљају једне од најзначајнија компонента биљних врста која им омогућава третман различитих обољења. Међутим, потребно је додатно испитати велики број биљака које би потенцијално имале ефекат у зарастању оралних улцерација и тиме побољшале квалитет живота пацијената.

Јако антиоксидационо, антиинфламаторно и антимикуробно дејство ивањског цвећа, које је потврђено претходним истраживањима, као и традиционална примена у зарастању рана подстакли су нас да у оквиру ове докторске дисертације формулишемо препарате на бази екстракта ивањског цвећа и испитамо ефикасност у третману афтозног стоматитиса (150).

5.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА И ПРИПРЕМЉЕНИХ ФОРМУЛАЦИЈА

Посебна актуелност овог истраживања базира се на поређењу ефикасности течне и полуврсте формулације на бази екстракта ивањског цвећа у циљу издвајања оптималног носача на наведену биљну сировину. Обзиром да су за ефекат екстракта и фармаколошко дејство одговорна биоактивна једињења које се налазе у његовом саставу, први циљ нашег истраживања је био да се спроведе хемијска анализа етанолног екстракта ивањског цвећа. За одређивање количине тих једињења у екстракту коришћена је HPLC-DAD анализа. Хемијском анализом су, у највећем проценту, идентификовани рутин и р-кумаринска киселина, док су кверцетин, кверцитрин, гална, кофеинска и хлорогена киселина биле присутне у мањој количини. Наши резултати прате резултате других истраживача који су рутин такође изоловали као најзаступљенију компоненту, док су кверцетин и кверцитрин били присутни у мањој мери (151). Такође, наши налази одговарају литературним подацима који говоре да су фенолна једињења главни конституенти ивањског цвећа. Међутим, квантитативне и квалитативне разлике у саставу екстракта у односу на друга истраживања могу настати услед различитог географског порекла биљног материјала. Хемијски садржај је такође директно зависан од примењеног метода екстракције као и коришћеног растварача што доприноси различитој заступљености биоактивних једињења (151,152).

У нашем истраживању је за припрему гела коришћен синтетски полимер, карбомер гел, као један од система за администрацију екстракта због својих мукоадхезивних карактеристика која омогућавају продужени ефекат на месту примене и уједно представља једноставан препарат за наношење на оралне улцерације (153). Други изабрани облик примене екстракта је у виду раствора и он већ дуго представља уобичајени начин администрације медикамента у третману афтозног стоматитиса. Данас су орални раствори најчешће коришћени као средство за администрацију биљних или синтетских биоактивних компоненти због лаког наношења и ширења у усној дупљи. Раствори на бази екстракта биљке *Zataria multiflora* (73), дамск руже (87), етеричних

уља и млечне киселине (154) су само неки од описаних у доступној литератури. Међутим, недостаци раствора огледају се у краћем задржавању на месту примене у поређењу са получврстим облицима попут гела, што се директно одражава на ефикасност терапије.

5.2. ЕФЕКАТ ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА ИВАЊСКОГ ЦВЕЋА НА ДНЕВНИ УНОС ХРАНЕ И ВОДЕ

Током десетодневног третмана формулацијама на бази екстракта ивањског цвећа праћени су и мерени физиолошки параметри као што су унос хране и воде. Просечан унос код пацова износи око 10g хране и 12 до 24 ml воде на 100g телесне масе дневно (155). У нашим резултатима је приказано да је дневна потрошња хране за све групе пацова у границама оптималних вредности, од 8,08 до 14,2 g/ТМ. Благо повећање уноса хране код животиња са индукованим афтозним стоматитисом указује на могућност присуства бола који изазива стрес и повећава инстинкт да животиње једу више (156). Супротно томе, наши налази наводе да је дневни унос хране и воде код животиња у групама третираним гелом и раствором на бази екстракта ивањског цвећа повећан у периоду од 2. до 6. дана третмана у односу на контролне животиње. Овакав резултат иде у прилог теорији да терапија ивањским цвећем убрзава процес зарастања чиме омогућава неометан унос хране код експерименталних животиња што показују и резултати у студији *Wahyuni* и сар.(157). Значајна разлика у уносу хране први пут уочена 2. дана третмана је у корелацији и са макроскопским зарастањем улкуса у групама третираним ивањским цвећем што објашњава овакав резултат.

Унос воде код животиња у нашем истраживању је такође био у оквиру оптималних вредности и износио је од 9,58 до 19,7 ml/ТМ дневно. Унос воде је повезан и са здравственим стањем пацова, које је у нашој студији подразумевало улцерације на букалној слузници, које су могле стварати тешкоће или сметње пацовима при конзумирању воде. Међутим, постојање афтозних лезија није ограничавало кретање језика потребно за унос течности, тако да је потрошња воде била слична литературним подацима о дневном уносу код здравих животиња која износи 10-25 ml/ТМ (158). Уочена разлика између третираних група и контрола огледа се у већем уносу воде током првих шест дана третмана ивањским цвећем услед побољшања процеса зарастања и олакшавања конзумирања течности. Супротно нашим резултатима, истраживачи *Kang* и *Kim* су показали да нема велике разлике у уносу хране и воде у поређењу експерименталних и контролних група (159).

5.3. ВЕЛИЧИНА И ПРОЦЕНАТ ЗАРАСТАЊА ЛЕЗИЈЕ

Локални системи за испоруку лекова су данас значајно развијени и имају широку примену у лечењу обољења слузокоже. Гелови која испољавају мукоадхезивна својства имају директан утицај на оралне лезије, што их чини ефикаснијим у достизању терапијског ефекта у односу на друге препарате (160).

Након припреме топикалних формулација желели смо да проценимо њихову ефикасност на *in vivo* моделу афтозног стоматитиса код пацова кроз клиничка, биохемијска и хистолошка испитивања. Клиничка процена ефеката лечења гелом и раствором на бази ивањског цвећа се базирала на трајању процеса зарастања, као и мерењу површине афтозних лезија, и израчунавању процената контракције улкуса. Наши налази су открили да је локална терапија гелом значајно допринела оралном зарастању, што је потврђено најнижим просечним временом зарастања лезије, као и

најизраженијим смањењем величине улкуса у поређењу са другим групама. У овој студији, смањење површине лезије је примећено из дана у дан у свим групама. Међутим, динамика опоравка је била различита међу пацовима третираним GVL гелом и GVL раствором у односу на пацове третиране гел базом и растварачем. Улцерације су скоро у потпуности зарасле након 6 дана примене GVL гела и GVL раствора, док су код контролних група улкуси и даље били приметни. Највећи проценат контракције улкуса код пацова са локалном применом GVL гела и раствора указује на потенцијал ових формулација да значајно убрзају опоравак букалне слузокоже.

Да бисмо утврдили да ли постоји разлика између дејства екстракта *G. verum* у зависности од облика у ком се примењује, упоређивали смо ефекат гела у односу на раствор. Добијени резултати показују да је гел значајно ефикаснији током 2. и 4. дана зарастања у односу на раствор. Можемо претпоставити да је овакав резултат последица значајне карактеристике оралних гелова која подразумева добру адхезију на оралну слузокожу. Услед тога долази до дужег задржавања гела на месту примене, а продужени контакт са оралном слузокожом доводи до боље клиничке ефикасности (161).

Наши резултати, као и претходне студије, сугеришу да је време зарастања хемијски изазваног оралног улкуса око 10 дана без третмана и 4 до 6 дана након третмана биљним екстрактима који садрже полифеноле (162–164). Литературни подаци говоре о великој способности кофеинске киселине, р-кумаринске киселине, кверцетина, лутеолина, итд. у лечењу оралних улцерација (165). Стога се краће време за потпуно зарастање улцерација код пацова третираних GVL гелом и GVL раствором у нашем истраживању може приписати деловању биоактивних састојака који се налазе у великим количинама у нашем екстракту, као што су рутин, р-кумаринска киселина, кверцетин, кверцитрин и гална, кофеинска и хлорогена киселина.

Са друге стране неки налази показују да нема значајне разлике у степену зарастања улцерације између група третираних екстрактом неких биљних врста богатих фенолима, као што је ђумбир (166) или одређеним концентрацијама куркумина (167), у односу на плацебо групу. *Martin* је са својим сарадницима показао да је значајна разлика у степену зарастања афтозних лезија постигнута тек након осам дана третмана мукоадхезивом на бази екстракта сладића, што се не слаже са нашим резултатима (168). Разлике у ефикасности уочене у нашем истраживању у односу на претходна последица су примене биљака са различитим хемијским саставом.

Имајући у виду да се ефекат биљке у зарастању улцерација углавном заснива на дејству полифенола, можемо закључити да степен зарастања улцера директно зависи од процентуалне заступљености одређених биоактивних компоненти које потпомажу репараторне процесе и на тај начин скраћују време до потпуног опоравка.

5.4. ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА АФТОЗНИХ ЛЕЗИЈА

У циљу разумевања механизма одговорних за лековито дејство GVL гела и раствора, урађена је хистолошка анализа букалне слузокоже. Анимални модел болести индукован апликацијом сирћетне киселине у нашој студији је најчешће коришћен у истраживањима због велике сличности како у хистолошким, тако и клиничким карактеристикама, патолошким процесима и процесу зарастања. Н&Е бојењем је потврђено да формулације на бази екстракта ивањског цвећа у виду гела и раствора смањују трајање инфламаторног процеса и убрзавају време зарастања. Најизраженији терапијски ефекти постигнути су 6. дана третмана, што је на хистолошким препаратима приказано потпуно ремоделованим епителом и одсуством улцерације код пацова на третману ивањским цвећем. Ови резултати су у складу са макроскопским

карактеристикама, чиме се потврђује значајна улога ивањског цвећа у промовисању зарастања улцерација. Супротно томе, у контролним групама је у исто време још увек био присутан инфламаторни одговор који се карактерише запаљенским инфилтратом са присуством неутрофила, при чему се уочавају фибробласна пролиферација и организована колагена влакна. Овакав хистолошки налаз говори о хроничном типу запаљења средњег интензитета који претходи процесу ремоделације ткива. Наши резултати одговарају налазима других истраживача који потврђују редукцију инфламаторног процеса након третмана афтозних лезија екстрактима биљних врста богатих полифенолима (169–171).

Након повреде слузнице долази до различитих патофизиолошких промена које су укључене у процес зарастања ране и регенерације ткива. Процес зарастања, као и сваки други, може бити регулисан бројним биоактивним супстанцама као што су фактори раста, компоненте екстрацелуларног матрикса и еикозаноиди. Показано је су неки еикозаноиди, као што су простагландини, директно укључени у процес зарастања рана насталих на кожи, рожњачи и слузокожи гастроинтестиналног тракта (172). Њихова производња настаје као последица узајамног дејства фосфолипазе, која ослобађа арахидонску киселину, и циклооксигеназе која претвара ту киселину у простагландине. Познато је да ензими циклооксигеназе, поред стварања простагландина, имају есенцијалну улогу у процесу инфламације. Дефинисана су два облика овог ензима, COX-1 конститутивни облик и COX-2, индуцибилни облик који промовише инфламаторне простагландине на местима зарастања и инфламације. Обзиром на улогу COX-2 у процесу зарастања, желели смо да проценимо утицај GVL формулација на експресију COX-2 протеина у ткиву букалног улкуса. Наши налази сугеришу значајно смањење експресије COX-2 протеина 3. и 6. дана код пацова третираних формулацијама на бази GVL у поређењу са другим експерименталним групама. Смањење COX-2 имунопозитивности након примене ивањског цвећа указује на ублажен инфламаторни процес, што је кључни корак у промоцији лечења. Претходна истраживања су такође показала смањену експресију COX-2 протеина у мукозном улкусу након третмана биљкама богатим полифенолима (173). Антиинфламациони потенцијал ивањског цвећа, као активне компоненте у примењеним формулацијама, може се објаснити присуством фенолних киселина као што су р-кумаринска, кафеинска и хлорогена киселина, које су познате као селективни COX-2 инхибитори (174). Поред наведених фенолних киселина, показано је и да су биљни екстракти чије се дејство заснива на биоактивним супстанцама из групе флавонола као што су кверцетин и галангин, такође значајно допринели смањењу инфламације инхибицијом COX-2 (175). Наши резултати, заједно са резултатима других истраживача, показују капацитет формулација на бази екстракта GVL у зарастању који је делимично посредован смањењем експресије COX-2.

Колаген, основна компонента екстрацелуларног матрикса, има кључну улогу у регулацији фаза зарастања ране било у његовој природној, фибриларној конформацији или као растворљива компонента у миљеу ране. Поремећај било које од тих фаза доводи до хроничног стања без зарастања које обично захтева неки облик интервенције да би се процес зарастања успешно спровео до краја. Поред еластина, колаген представља комплексни макромолекул екстрацелуларног матрикса који заједно са гликопротеинима интерагују и покрећу процес раста и регенерације ткива (176). Као одговор на оштећење, колаген индукује активацију и агрегацију тромбоцита која резултује таложењем фибринског коагулума на месту повреде. Обзиром да након инфламације и пролиферације ћелија, следи контракција колагена као последња фаза зарастања, желели смо да откријемо да ли примена формулација на бази GVL може да промени садржај колагена у узорцима букалног ткива након индукције афтозних лезија. У нашем истраживању је показано да је након третмана лезија GVL гелом и раствором дошло до

значајног повећања садржаја колагена већ након 3 дана у поређењу са контролним групама. То повећање је уочено и 6. дана праћења што је допринело регенерацији букалне слузокоже. Фибробласти су хетерогена група ћелија, одговорна за производњу компоненти екстрацелуларног матрикса, посебно колагена. Њихова основна функција је да стварају структурну основу за ткива и органе и одржавају интегритет унутар везивног ткива. Стога имају веома важну улогу у процесу зарастања рана. *Tanaka* и сар. су показали да се функција ових ћелија након оштећења може обновити дејством фенолних једињења биљног порекла. Посебно се истиче повећана експресија колагена након излагања фенолима (177). *El-Zahar* и сар. су такође показали да долази до повећане продукције колагена, а тиме и бржег зарастања оралних улцерација, након третмана афтозних лезија биљним врстама богатим полифенолима (178). Претходне студије потврђују утицај флавоноида и других полифенола на очување структурног интегритета улцерација (179,180). Можемо претпоставити да активна једињења биљног екстракта у нашим формулацијама може повећати снагу колагених влакана, што доводи до веће синтезе ДНК, боље циркулације и смањења оштећења ћелија доприносећи бржем зарастању афтозних лезија.

5.5. УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА *G. VERUM* НА РЕДОКС СТАТУС У СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ ПАЦОВА

Као одговор на штетне ноксе, ћелије имунског система продукују реактивне врсте кисеоника (енг. *Reactive Oxygen Species*, ROS) и азота (енг. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) које поред ћелијске сигнализације имају важну улогу и у одржавању хомеостазе у организму. У процесу инфламације, заједно са органским материјама доводе до спречавања дејства патогена, али тиме могу да доведу и до оштећења околних здравих ћелија (181). Као природни оксиданти укључени су у бројне биохемијске процесе који су од суштинског значаја за живот, али у случају повећане продукције доприносе настанку оксидационог стреса. Тиме оштећују есенцијална биоједињења као што су ДНК, протеини и мембрански липиди узрокујући ћелијску смрт. Како би се спречио настанак оштећења, имунски одговор активира антиоксидациони систем који може бити ензимски (глутатион пероксидаза, мијелопероксидаза, супероксид дисмутаза, и каталаза) и неензимски (минерали, витамини, полифеноли и тиоли) (182).

Међу њима, САТ је кључни антиоксидациони ензим. На основу њихове структуре и функције, каталазе су класификоване у три типа: типичне каталазе, каталазе-пероксидазе и манган каталазе. Типичне каталазе се обично изолују из аеробних организама, укључујући животиње, биљке, гљиве и бактерије (183). Већина типичних каталаза је састављена од четири подјединице једнаке величине, са молекулском масом од 200–340kDa, и садржи четири протетичне групе. Обзиром да јој је најважнија улога у оксидационом стресу одбрана ћелија, каталаза је изражена у свим важним ткивима сисара, са највишом ензимском активношћу у јетри и еритроцитима. Релативно висока активност САТ је откривена у бубрезима и масном ткиву, затим у плућима и панкреасу, док је у срцу и мозгу веома ниска. Главна биолошка функција каталазе је дисмутација H_2O_2 до O_2 и H_2O . Због способности да утиче на ниво H_2O_2 , каталаза је укључена у многе физиолошке и патолошке процесе (184).

Супероксид дисмутазе су металоензими који представљају прву линију одбране против ROS-а. У зависности од металног кофактора постоје три изоформе SOD: цитоплазматски, екстрацелуларни и митохондријални. SOD катализује реакцију дисмутације супероксида (O_2^-) до H_2O_2 и молекуларног кисеоника у процесу од два корака. Први корак представља редукцију металног јона са истовременим ослобађањем кисеоника. Други корак се састоји од оксидације металног јона уз учешће супероксидног

радикала и кисеоника. У исто времена, долази до производње H_2O_2 (185). Дисмутаза штите ћелије од цитотоксичних ефеката супероксидног анјона који се формира само у присуству кисеоника.

Поред SOD, глутатион пероксидазе чине прву и другу линију одбране од ROS-а. Они смањују H_2O_2 и органске пероксиде уз помоћ редукованог глутатиона. Редуковани глутатион је главни пептид ниске молекуларне тежине који садржи тиол и присутан је у већини живих ћелија, од бактерија до сисара. Иако га скоро све ћелије синтетишу, сматра се да је јетра главни извор глутатиона у организму (186).

Описани ензимски антиоксиданси су били предмет нашег истраживања због веома важне улоге у одржавању редокс равнотеже у организму.

Претходне студије су показале да орална обољења, као што је афтозни стоматитис, ремете локални оксидациони статус, а да поједина могу довести и до поремећаја на системском нивоу (182,187–190). Такође, доступни подаци говоре о повишеним нивоима прооксидационих маркера код пацијената са активним оралним лезијама у односу на пацијенте у фази ремисије и здраве контроле (48,190). Обзиром да бројни подаци говоре у прилог чињеници да је оксидациони стрес укључен у прогресију афтозног стоматитиса, будући терапијски препарати би требало да делују на смањење штетних ефеката ROS-а.

Екстракти биљака богати фенолним једињењима имају велики потенцијал за уклањање ROS-а. Они стимулишу производњу колагена у фибробластима и супримирају експресију MMP и транслокацију NF- κ B (енг. *Nuclear factor- κ B*) што је праћено смањеним нивоом COX-2 и антиинфламационим ефектима у условима оксидационог стреса. Тиме, феноли појачавају антиоксидациону улогу ћелија и активности ензима одговорних за антиоксидациону заштиту. На тај начин локална примена одабраних екстраката спречава даља оштећења ткива и убрзава процес зарастања ране (191).

Стога смо претпоставили да екстракт GVL, као снажан антиоксиданс може убрзати процес зарастања оралне слузокоже путем ублажавања оксидационог стреса. Пошто је правилно разумевање редокс хомеостазе неопходно за проналажење оптималне стратегије, истраживањем смо желели да проценимо утицај ивањског цвећа на системски и локални редокс статус.

У нашим резултатима је показано да примена GVL није утицала на ниво прооксидационих и антиоксидационих маркера у узорцима крви, што указује да нема системских антиоксидационих ефеката ових формулација. Одсуство промена системске редокс равнотеже је очекивано у случају примене гела, јер карбомер као мукоадхезивни агенс, поседује способност да локализује апсорпцију лека, што доводи до повишене концентрације активних једињења на месту улцерације. Такође, локална примена раствора, иако се краће задржава на месту примене у односу на гел, омогућава хидратацију улкуса, делује као баријера за ублажавање симптома и побољшава испоруку и задржавање активних супстанци (192) што онемогућава промену оксидационог статуса у системској циркулацији. Zhang и сар. су у поређењу пацијената са активним афтозним лезијама и пацијената у фази ремисије или без лезија добили резултате који су у складу са нашим резултатима, без разлике у системском редокс статусу (193).

Приликом упоређивања ефеката две различите формулације, гела и раствора, на продукцију параметара оксидационог стреса у системској циркулацији показано је да је нема значајне разлике.

5.6. УТИЦАЈ ЕКСТРАКТА *G. VERUM* НА ЛОКЛАНИ РЕДОКС СТАТУС У ТКИВУ ОБРАЗА КОД ПАЦОВА

У циљу бољег разумевања дејства формулација на бази екстракта ивањског цвећа, поред биохемијске анализе у узорцима крви, пратили смо и нивое параметара оксидационог стреса у ткиву афтозне лезије.

Показано је да инфилтрација имунских ћелија у афтозну лезију доводи до повећане концентрације слободних радикала у ткиву (194). Повишен ниво SOD се објашњава потребом већег броја молекула SOD како би дошло до дисмутације супероксидних радикала. Ова реакција доводи до прекомерне производње H_2O_2 и потрошње GSH што је у корелацији са њиховим нивоом у афтозној лезији (195).

Наши резултати су открили да је примена GVL формулација утицала на значајно смањење нивоа TBARS у ткиву улкуса, што је било изражено 3. и 6. дана након почетка третмана. Штавише, постојале су значајне разлике у свим мереним антиоксидационим параметрима, који су значајно повећани у групи GVL гел и GVL раствор у поређењу са контролним групама, 3, 6. и 9. дана. Овакви резултати указују на важну улогу GVL екстракта на оксидациони стрес у погледу појачања капацитета антиоксидационог одбрамбеног система и смањења концентрације прооксидационих маркера. Резултати појединих студија, као и наши резултати, показују повећану активност антиоксидационих параметара у афтозним лезијама након третмана биљкама сличног фитохемијског профила (196,197).

Ранија хипотеза о директној антиоксидационој активности полифенола потенцијално објашњава њихово дејство у превенцији и терапији оралних обољења (198). Сматра се да полифеноли као биоактивне супстанце долазе у директан контакт са оралним ткивима пре него што се апсорбују и метаболишу активирајући агликоне у људским и бактеријским ензимима. Обзиром да достижу највећу концентрацију управо у оралној слузокожи која је константно изложена оксидационом стресу из околине и путем исхране, антиоксидационо дејство полифенола је најизраженије у оралним обољењима (199), а једно од тих је и афтозни стоматитис.

У складу са тим, терапија гелом на бази екстракта ивањског цвећа је довела до значајног повећања антиоксидационих параметара у ткиву образа 3. дана праћења, у поређењу са групом животиња третираних раствором.

5.7. ЕФЕКТИ ФОРМУЛАЦИЈА НА БАЗИ ЕКСТРАКТА *G. VERUM* НА ЕКСПРЕСИЈУ ГЕНА КОД ЖИВОТИЊА СА АФТОЗНИМ СТОМАТИТИСОМ

5.7.1. Ефекти формулација на бази екстракта *G. verum* на експресију гена укључених у процес инфламације

Иако су етиологија и патогенеза афтозног стоматитиса и даље у потпуности неразјашњене, чињенице указују да се ово обољење јавља као последица деструкције епитела посредоване ћелијским имунским одговором. Прихваћено је да се процес развоја афтозне лезије покреће дејством непознатих антигена на кератиноците, што доводи до стимулације Т ћелија и продукције различитих цитокина. Након тога, цитокини се ослобађају у периферну крв, а затим имају главну улогу у дисрегулацији имунског одговора посредованој Т ћелијама (200). Не може се са прецизношћу рећи који

citoкин у највећој мери доприноси развоју афтозног стоматитиса али увидом у резултате претходних студија можемо истаћи да је продукција одређених проинфламаторних цитокина, међу којима су TNF- α , IFN- γ , IL-12, као и IL-6 и IL-1 β , већа код пацијената са афтозним стоматитисом (42,201). Истовремено, у активној фази овог обољења долази до смањења нивоа антиинфламаторних цитокина као што је IL-10 (42).

Фактор некрозе тумора α (TNF- α) представља плеотропни цитокин, који има улогу главног регулатора имунског одговора и укључен је у патогенезу многих инфламаторних и аутоимунских болести (202). Производе га Т ћелије и макрофаги, и означен је као есенцијални цитокин који доводи до активације цитотоксичних Т лимфоцита и неутрофила доприносећи формирању улцерација у усној дупљи. Овај цитокин поседује јака имуномодулаторна својства која га доводе у везу са многим обољењима међу којима је и афтозни стоматитис. У литератури су забележени високи нивои TNF- α у букалном ткиву као и периферној крви пацијената са овим обољењем (203). Такође, код пацијената са оралним улцерацијама је примећена изразита деструкција епителних ћелија која се повезује са присуством TNF- α произведеним из моноклеарних ћелија периферне крви (204). Постојање разлике у експресији TNF- α зависно од начина детекција овог цитокина, као и врсте узорка из кога се он мери, су показали *Avcı* и *sar*. Упркос томе, било да је узорак салива, периферна крв или сама лезија, свакако постоји значајна разлика у експресији овог маркера када се упореди са здравом контролом (46) што говори о значају овог медијатора запаљења у патогенези афтозног стоматитиса. Претходним студијама је показано да третман афтозних лезија биљним екстрактима који су богати полифенолима значајно смањује експресију TNF- α у букалном ткиву (205–207).

Наши резултати потврђују налазе других истраживача који говоре да је третман гелом и раствором на бази екстракта *G. verum* допринео значајном смањењу проинфламационих цитокина у афтозној лезији међу којима је и TNF- α , посебно 3. и 6. дана третмана, (205–207). Смањење експресије TNF- α које настаје као последица дејства кверцетина, галне и кафеинске киселине и галангина, присутних у ивањском цвећу је већ описано и може објаснити резултате нашег истраживања (158,208,209).

Интерлеукин 1 (IL-1) је главни регулаторни цитокин инфламације који контролише низ процеса урођене имуности (210). Укључен је у пролиферацију, диференцијацију и апоптозу ћелија. Фамилија интерлеукина 1 обухвата 11 чланова са сличним или различитим биолошким функцијама. Интерлеукин 1 бета (IL-1 β), цитокин од интереса у нашем истраживању, је експримиран у различитим ткивима и ћелијама у организму, посебно у макрофагима лимфоидних органа. Поред тога, овај цитокин се експримира у ткивним макрофагима плућа и дигестивног тракта који подразумева и усну дупљу. Такође, забележена је експресија IL-1 β у специфичним типовима ћелија укључујући неутрофиле, лимфоците, кератиноците и фибробласте (211)b.

У литератури постоје различити подаци о повезаности IL-1 β и афтозног стоматитиса. По мишљењу неких аутора афтозни стоматитис је једно од обољења које настаје као последица поремећаја инфлазома услед неконтролисане продукције IL-1 β (212). *Vazrafshani* и *sar*. су истакли значај IL-1 β у патогенези афтозног стоматитиса на основу резултата који показују да прекомерна продукција IL-1 β и IL-6 као одговор на локални стимулус у усној дупљи може бити важан етиолошки фактор у настанку афтозног стоматитиса. Повишен ниво ових цитокина последично води ка производњи других медијатора запаљења, као што је TNF- α , који даље утичу на прогресију болести (213). Међутим постоје и супротна мишљења. Налази *Šlebić* и *sar*. испитујући генотип пацијената и повезаност са развојем различитих облика афтозног стоматитиса, сугеришу да полиморфизам гена IL-1 β не повећава ризик за развој овог обољења (214).

Показано је да биљни екстракти могу да утичу на смањење нивоа IL-1 β у серуму и ткиву код пацијената са оралним обољењима (215,216). Наши резултати показују да примена формулација на бази екстракта *G. verum* утиче на значајно смањење нивоа IL-1 β у букалном ткиву експерименталних животиња. Примена гела допринела је значајном смањењу проинфламационог цитокина IL-1 β током прва 3 дана третмана у односу на примену раствора, што се може очекивати услед дужег задржавања гела на оралној слузници и последичном ефикаснијем дејству у односу на раствор. Овакви налази су у складу другим истраживањима која потврђују смањење нивоа проинфламаторног цитокина IL-1 β након терапије хроничног гингивитиса биљним екстрактима богатим полифенолима (217), као и смањење IL-1 β и IL-6 приликом периодонталног зарастања након третмана биљкама сличног фитохемијског профила (218).

Интерлеукин 6 (IL-6) откривен 1986. године је плеиотропни цитокин са локалним и системским дејством током имунских и инфламаторних реакција. Поред тога укључен је и у процес хематопоезе, метаболизам костију, развој ембриона и друге фундаменталне процесе у организму (218)h. Његова активност у ткивним течностима и ћелијама при зарастању ране је описана кроз регулацију фибробласта у студији спроведеној на ћелијској култури (219). Сматра се да су полиморфонуклеарни леукоцити главни извор циркулишућег IL-6 присутног у оштећеном ткиву који индукује молекуларне сигнале за инхибицију пролиферације фибробласта при чему долази до поремећаја у нормалном процесу зарастања. Студијом Shen и сар. је показана разлика у серумском нивоу проинфламаторних цитокина (IL-2, TNF- α IL-6 и IFN- γ) код пацијента са афтозним стоматитисом у односу на здраве пацијенте (201), док разлика у нивоу IL-6 мереног у пљувачци између упоређиваних група не постоји (220). Имунохистохемијским анализама је утврђен значајно нижи ниво IL-6 у букалном ткиву експерименталних животиња након третмана традиционалном кинеском биљном формулом коју сачињавају различите биљне врсте богате флавоноидима, што потврђује наше налазе који показују значајно смањење IL-6 у букалном ткиву пацова третираних формулацијама на бази ивањског цвећа (189).

Реакција имунског одговора на патогене подразумева брзу активацију проинфламационих цитокина који служе за покретање имунског система у циљу одбране организма. Међутим, вишак инфламације може довести до системских метаболичких и хемодинамских поремећаја штетних за домаћина. Као резултат тога, имунски систем је развио паралелне, антиинфламационе механизме који служе за спречавање продукције проинфламационих молекула како би се ограничило оштећење ткива и успоставила хомеостаза (221).

Интерлеукин 10 (IL-10) је снажан антиинфламациони цитокин који је од нарочито значаја у превенцији инфламаторних и аутоимунских болести. Припада Th2 цитокинском профилу заједно са осталим антиинфламационим цитокинима: IL-4, IL-5 и IL-13. Недостатак или аберантна експресија IL-10 може појачати инфламаторни одговор организма на дејство патогена водећи ка развоју аутоимунских болести (41). Обзиром да има значајну улогу у посредовању антиинфламаторног одговора домаћина, идентификација ћелија које су извор IL-10, као и молекуларни механизми који регулишу његову експресију, кључни су за развој терапијских стратегија усмерених ка очувању ткивног интегритета.

Lewkowicz и сар. су описали значајно већу експресију Th1 цитокинског профила, који имају проинфламациона својства, код пацијената са афтозним стоматитисом у поређењу са контролом. Повећана продукција TNF- α , IFN- γ и IL-2 у мононуклеарним ћелијама периферне крви примећена је и у акутној фази болести и током ремисије (204). Истовремено, продукција антиинфламационих параметара IL-10 и TGF- β је значајно смањена код ових пацијената. Овакав налаз потврђује да дисбаланс у продукцији про- и

анти-инфламационих цитокина може допринети развоју аутоимунизације и афтозног стоматитиса код предиспонираних особа. *Vino* и сар. покушали су да одреде концентрацију проинфламационих цитокина у оралној слузокожи пацијената са афтозним стоматитисом и уочили значајно виши ниво TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 и IL-5, и смањену концентрацију антиинфламационог цитокина IL-10 у испитиваној групи у односу на здраве контроле (222). Овакви резултати указују на комплексну улогу имунског система у развоју афтозног стоматитиса. Повишен ниво проинфламационих цитокина у оралној слузокожи је очекиван, али са друге стране већа концентрација цитокина Th2 типа (IL-4, IL-5) је била изненађујућа.

Претходним студијама је показано да примена биљних екстраката у ћелијској култури макрофага утиче на секрецију антиинфламационог цитокина IL-10 у дозно зависном режиму. Ефекат рузмаринске киселине се огледа у повећању концентрације IL-10, док резвератрол у високој концентрацији смањује продукцију IL-10, а у ниској повећава (223). Биљни екстракти путем активације протеин киназе у макрофагима могу инхибирати проинфламационе процесе у организму. Такође, смањењем експресије проинфламационих цитокина регулисана је активност IL-10 који има регулаторну улогу у производњи Th1 цитокина у афтозним лезијама (224).

Повећање експресије IL-10 у експерименталним групама животиња у нашем истраживању, подржава претходно описану теорију о улози биљних екстраката богатих флавоноидима и стилбенима у регулацији имунског одговора стимулисањем продукције антиинфламационих цитокина и инхибицијом проинфламационих медијатора чиме доприносе смањењу инфламаторног процеса у афтозним лезијама.

5.7.2. Ефекти формулација на бази екстракта *G. verum* на експресију гена укључених у процес оксидационог стреса

Као што је већ поменуто, реактивне врсте кисеоника настају као последица аеробног метаболизма, а у циљу одржавања физиолошке хомеостазе, организам активира софистицирани антиоксидациони одбрамбени систем који се супротставља и контролише ниво ROS-а (195).

Сходно томе, истраживање експресије гена укључених у процес оксидационог стреса представља логичан наставак претходно описане анализе. Овом методом, заједно са спектрофотометријским анализама из крви и букалне слузнице пацова, смо употпунили резултате о ефектима формулација на бази екстракта ивањског цвећа на ниво маркера редокс статуса.

Супероксид дисмутазе су ензими који имају важну улогу да катализују конверзије супероксидних радикала у кисеоник и водоник пероксид. Њихова активност се заснива на специфичном каталитичком металном јону, који може бити: манган (MnSOD), гвожђе (FeSOD), никл (NiSOD) или бакар (Cu/ZnSOD) (225). Описане су три изоформе супероксид дисмутазе: цитоплазматски Cu/ZnSOD (SOD-1), митохондријални MnSOD (SOD-2) и екстрацелуларни Cu/ZnSOD (SOD-3).

У случају повреде букалног ткива долази до поремећаја равнотеже између про- и антиоксидационих параметара што за последицу има стварање слободних радикала и настанак оксидационог стреса. Повећана концентрација слободних радикала узрокује оштећење ћелија и формирање улцерација (195). У том случају се активира антиоксидациони систем који, између осталих параметара, подразумева активност ензима SOD-1 и SOD-2. Претходне студије су описале повишен ниво SOD у пљувачци пацијента са афтозним стоматитисом у поређењу са здравим контролама. Такође, након инфилтрације имунских ћелија у оштећено ткиво и повећане концентрације слободних

радикала се очекује и виши ниво антиоксидационих параметара како би се процес инфламације успешно сузбио. Овакав налаз, који подразумева повишен ниво SOD у ткиву афтозне лезије, је у својој студији описао *Ziaudeen* са сарадницима (194).

Многе биљне врсте су препознате као корисни антиоксиданси способни да уклоне штетне ROS, укључујући и супероксидни анјон. Њихов антиоксидациони потенцијал је повезан са присуством различитих хемијских једињења, најчешће фенола (226). Механизам антиоксидационе активности фенолних једињења је вишеструк јер директно и индиректно инхибирају реакције оксидације. Сходно томе, фенолна једињења могу да стимулишу активност антиоксидационих ензима и инхибирају ензиме укључене у формирање ROS (227). Присуство ових једињења, флавоноида и фенолних киселина, у екстрактима биљне врсте *G. verum*, објашњава његову потенцијалну антиоксидациону улогу у терапији афтозног стоматитиса. Анализом ткивне експресије гена за SOD-1 и SOD-2 смо показали да примена формулација на бази екстракта *G. verum* утиче на повећање нивоа ензима укључених у антиоксидационе процесе у букалном ткиву експерименталних животиња. Наши резултати истичу значајну разлику у нивоу SOD-1 у испитиваним групама након примене биљног екстракта у облику гела и раствора 3. и 6. дана третмана, као и постојање статистичке значајности у поређењу гела у односу на примену раствора 3. дана праћења. Ниво SOD-2 је такође био значајно виши 3. и 6. дана у групи животиња третираних формулацијама на бази екстракта *G. verum* у односу на контролне групе. У поређењу ефеката гела и раствора на ниво SOD-2 није било значајне разлике током десетодневног третмана.

ЗАКЉУЧАК



6. ЗАКЉУЧАК

Наше истраживање истиче значајну улогу формулација на бази екстракта *G.verum* у процесу зарастања оралних улцерација.

Овакав закључак изведен је на основу следећих резултата:

- HPLC-DAD анализом је идентификовано неколико биоактивних једињења међу којима су најзаступљенија рутин, р-кумаринска киселина, кверцетин, кверцитрин, гална, кафеинска и хлорогена киселина.
- Дневни унос хране и воде код животиња третираних формулацијама на бази екстракта ивањског цвећа је био значајно већи током првих пар дана праћења у односу на контролне животиње.
- Позитивни ефекти примене ових формулација се огледају у значајном повећању процента контракције улкуса током периода третмана.
- Хистолошком и имунохистохемијском анализом смо утврдили значајно смањење имунопозитивности COX-2 као и повећану продукцију колагена током третмана гелом и раствором на бази екстракта *G.verum*.
- Ефекти формулација на бази екстракта *G.verum* нису утицали на ниво параметара оксидационог стреса у системској циркулацији.
- Ефекти формулација на бази екстракта *G.verum* су допринели значајном смањењу нивоа прооксидационих, као и значајном повећању нивоа антиоксидационих параметара у букалном ткиву третираних животиња.
- Применом qRT-PCR анализе показано је да ивањско цвеће доводи до смањења релативне експресије TNF- α , IL-1 β , IL-6 и повећања релативне експресије IL-10 код третираних животиња у односу на одговарајуће контроле.

Значајан утицај гела и раствора на бази екстракта *G.verum* на зарастање оралних улцерација у моделу афтозног стоматитиса може се приписати адитивној и/или синергистичкој активности најзаступљенијих једињења у овом екстракту као што су рутин, р-кумаринска киселина, кверцетин, кверцитрин и гална, кафеинска и хлорогена киселина. Позитивни резултати наше студије истичу ивањско цвеће као потенцијално терапијско средство за контролу улцерација на оралној слузокожи.

7

ЛИТЕРАТУРА



7. ЛИТЕРАТУРА

1. Compilato D, Carroccio A, Calvino F, Di Fede G, Campisi G. Haematological deficiencies in patients with recurrent aphthosis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2010;24:667–73.
2. Edgar NR, Saleh D, Miller RA. Recurrent Aphthous Stomatitis: A Review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2017;10:26–36.
3. Wang A, Manthiram K, Dedeoglu F, Licameli GR. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) syndrome: A review. *World J Otorhinolaryngol - Head Neck Surg.* 2021;7:166–73.
4. Akintoye SO, Greenberg MS. Recurrent aphthous stomatitis. *Dent Clin North Am.* 2014;58:281–97.
5. Giannetti L, Murri Dello Diago A, Lo Muzio L. Recurrent aphtous stomatitis. *Minerva Stomatol.* 2018;67:125–8.
6. Ship JA, Chavez EM, Doerr PA, Henson BS, Sarmadi M. Recurrent aphthous stomatitis. *Quintessence Int.* 2000;31:95–112.
7. Koberová R, Merglová V, Radochová V. Recurrent Aphthous Stomatitis in Children: A Practical Guideline for Paediatric Practitioners. *Acta medica (Hradec Kral.* 2020;63:145–9.
8. Saikaly SK, Saikaly TS, Saikaly LE. Recurrent aphthous ulceration: a review of potential causes and novel treatments. *J Dermatolog Treat.* 2018;29:542–52.
9. Gasmi Benahmed A, Noor S, Menzel A, Gasmi A. Oral Aphthous: Pathophysiology, Clinical Aspects and Medical Treatment. *Arch Razi Inst.* 2021;76:1155–63.
10. Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. Number VI: Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis.* 2006;12:1–21.
11. Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Gombos F, Nunziata M, Piccolo S, Cirillo N. Guidelines for diagnosis and management of aphthous stomatitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:728–32.
12. Nadendla LK, Meduri V, Paramkusam G, Pachava KR. Relationship of salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015;19:56–9.
13. Polat C, Duzer S, Ayyıldız H, Sec S, Aksoy N, Sakallioğlu O, Akyigit A, Cetiner H. Association Between Anxiety, Depression, and Salivary Cortisol Levels in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *Turk Otolarengoloji Arsivi/Turkish Arch Otolaryngol.* 2018;56:166–9.
14. Sawair. Does smoking really protect from recurrent aphthous stomatitis? *Ther Clin Risk Manag.* 2010;573.
15. Kaneko F, Togashi A, Saito S, Sakuma H, Oyama N, Nakamura K, Yokota K, Oguma K. Behçet's disease (Adamantiades-Behçet's disease). *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:11–3.
16. Pekiner FN, Aytugan E, Demirel GY, Oğuz Borahan M. HLA-A, B (class I) and HLA-DR, DQ (class II) antigens in Turkish patients with recurrent aphthous ulceration and Behçet's disease. *Med Princ Pract.* 2013;22:464–8.
17. Rodrigo L, Beteta-Gorriti V, Alvarez N, de Castro CG, de Dios A, Palacios L, Santos-Juanes J. Cutaneous and mucosal manifestations associated with celiac disease. *Nutrients.* 2018;10:1–20.
18. Favia G, Limongelli L, Tempesta A, Maiorano E, Capodiferro S. Oral lesions as first clinical manifestations of Crohn's disease in paediatric patients: A report on 8 cases. *Eur J Paediatr Dent.* 2020;21:66–9.

19. Alegre M, Dalmau J, Domingo P, Roé E, Alomar A. Successful treatment of major oral aphthous ulcers in HIV-1 infection after highly active antiretroviral therapy. *Int J Infect Dis.* 2007;11:278–9.
20. Shu W, Li C, Du F, Bai J, Duan K. A real-world, cross sectional study of oral lesions and their association with CD4 cell counts and HIV viral load in Yunnan, China. *Medicine (Baltimore).* 2020;99:e22416.
21. Chiang CP, Yu-Fong Chang J, Wang YP, Wu YH, Wu YC, Sun A. Recurrent aphthous stomatitis – Etiology, serum autoantibodies, anemia, hematinic deficiencies, and management. *J Formos Med Assoc.* 2019;118:1279–89.
22. Porter SR, Hegarty A, Kaliakatsou F, Hodgson TA, Scully C. Recurrent aphthous stomatitis. *Clin Dermatol.* 18:569–78.
23. Hooks 1979. *N Engl J Med.* 1979;
24. Ito K, Okuno T, Sawada A, Sakai K, Kato Y, Muro K, Yanagita M, Teramoto Y, Yamasaki T, Inoue T, Ogawa O, Kobayashi T. Recurrent Aphthous Stomatitis Caused by Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus, and Candida Species in a Kidney Transplant Recipient: A Case Report. *Transplant Proc.* 2019;51:993–7.
25. Syrjänen S, Leimola-Virtanen R, Schmidt-Westhausen A, Reichart PA. Oral ulcers in AIDS patients frequently associated with cytomegalovirus (OMV) and Epstein-Barr virus (EBV) infections. *J Oral Pathol Med.* 1999;28:204–9.
26. Katz J, Yue S. Increased odds ratio for COVID-19 in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2021;50:114–7.
27. Gülseren D, Karaduman A, Kutsal D, Nohutcu RM. The relationship between recurrent aphthous stomatitis, and periodontal disease and Helicobacter Pylori infection. *Clin Oral Investig.* 2016;20:2055–60.
28. Karaca S, Seyhan M, Senol M, Harputluoglu MM, Ozcan A. The effect of gastric Helicobacter pylori eradication on recurrent aphthous stomatitis. *Int J Dermatol.* 2008;47:615–7.
29. Gomes CC, Gomez RS, Zina LG, Amaral FR. Recurrent aphthous stomatitis and Helicobacter pylori. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2016;21:e187–91.
30. Seoudi N, Bergmeier LA, Drobniowski F, Paster B, Fortune F. The oral mucosal and salivary microbial community of behçet’s syndrome and recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Microbiol.* 2015;7:1–9.
31. Wu YC, Wu YH, Wang YP, Chang JYF, Chen HM, Sun A. Hematinic deficiencies and anemia statuses in recurrent aphthous stomatitis patients with or without atrophic glossitis. *J Formos Med Assoc.* 2016;115:1061–8.
32. Wu YH, Yu-Fong Chang J, Wang YP, Wu YC, Chen HM, Sun A. Anemia and hematinic deficiencies in anti-gastric parietal cell antibody-positive and -negative recurrent aphthous stomatitis patients with anti-thyroid antibody positivity. *J Formos Med Assoc.* 2017;116:145–52.
33. Bao ZX, Shi J, Yang XW, Liu LX. Hematinic deficiencies in patients with recurrent aphthous stomatitis: Variations by gender and age. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2018;23:e161–7.
34. Xu K, Zhou C, Huang F, Duan N, Wang Y, Zheng L, Wang X, Wang W. Relationship between dietary factors and recurrent aphthous stomatitis in China: a cross-sectional study. *J Int Med Res.* 2021;49.
35. Öztekin A, Öztekin C. Vitamin D levels in patients with recurrent aphthous stomatitis. *BMC Oral Health.* 2018;18:186.
36. Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol.* 1995;6:385–93.
37. Article R, Medicine O, Natah SS, Kontinen YT, Enattah NS, Ashammakhi N, Sharkey

- KA, Häyryinen-Immonen R. Recurrent aphthous ulcers today : a review of the growing knowledge. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33:221–34.
38. Wray D, Vlagopoulos TP, Siraganian RP. Food allergens and basophil histamine release in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1982;54:388–95.
39. Healy CM, Paterson M, Joyston-Bechal S, Williams DM, Thornhill MH. The effect of a sodium lauryl sulfate-free dentifrice on patients with recurrent oral ulceration. *Oral Dis.* 1999;5:39–43.
40. Borra RC, Andrade PM, Silva IDCG, Morgun A, Weckx LLM, Smirnova AS, Franco M. The Th1/Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:140–6.
41. Slebioda Z, Szponar E, Kowalska A. Etiopathogenesis of recurrent aphthous stomatitis and the role of immunologic aspects: literature review. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62:205–15.
42. Bhosale SS, Rajput BS, Takkar H, Bhagat S V., Vagger RM, K Shaikh MI. Establishment of role of IL-2, IL-10 and IL-12 in patients with recurrent aphthous stomatitis-A clinical study. *J Contemp Dent Pract.* 2018;19:1242–5.
43. Ruan HH, Li GY, Duan N, Jiang HL, Fu YF, Song YF, Zhou Q, Wang X, Wang WM. Frequencies of abnormal humoral and cellular immune component levels in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulceration. *J Dent Sci.* 2018;13:124–30.
44. Huang L jie, Mao X tao, Li Y yuan, Liu D dan, Fan K qi, Liu R bei, Wu T ting, Wang H li, Zhang Y, Yang B, Ye C qi, Zhong J yan, Chai R jie, Cao Q, Jin J. Multiomics analyses reveal a critical role of selenium in controlling T cell differentiation in Crohn's disease. *Immunity.* 2021;54:1728-1744.e7.
45. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. *Front Immunol.* 2020;11:1–14.
46. Avci E, Akarslan ZZ, Erten H, Coskun-Cevher S. Oxidative stress and cellular immunity in patients with recurrent aphthous ulcers. *Brazilian J Med Biol Res.* 2014;47:355–60.
47. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4:89–96.
48. Bagan J, Saez G, Tormos C, Gavaldà C, Sanchis JM, Bagan L, Scully C. Oxidative stress and recurrent aphthous stomatitis. *Clin Oral Investig.* 2014;18:1919–23.
49. Bilgili SG, Ozkol H, Takci Z, Ozkol HU, Karadag AS, Aslan M. Assessment of the serum paraoxonase activity and oxidant/antioxidant status in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Int J Dermatol.* 2013;52:1259–64.
50. Boulinguez S, Reix S, Bedane C, Debrock C, Bouyssou-Gauthier ML, Sparsa A, Le Brun V, De Vencay P, Bernard P, Bonnetblanc JM. Role of drug exposure in aphthous ulcers: A case-control study. *Br J Dermatol.* 2000;143:1261–5.
51. Berkenstadt M, Weisz B, Cuckle H, Di-Castro M, Guetta E, Barkai G. Chromosomal abnormalities and birth defects among couples with colchicine treated familial Mediterranean fever. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1513–6.
52. Boulinguez S, Sommet A, Bédane C, Viraben R, Bonnetblanc JM. Oral nicorandil-induced lesions are not aphthous ulcers. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:482–5.
53. Shulman JD. An exploration of point, annual, and lifetime prevalence in characterizing recurrent aphthous stomatitis in USA children and youths. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:558–66.
54. Rivera C, Muñoz-Pastén M, Núñez-Muñoz E, Hernández-Olivos R. Recurrent Aphthous Stomatitis Affects Quality of Life. A Case-Control Study. *Clin Cosmet*

- Investig Dent. 2022;14:217–23.
55. Chavan M, Jain H, Diwan N, Khedkar S, Shete A, Durkar S. Recurrent aphthous stomatitis: a review. *J Oral Pathol Med.* 2012;41:577–83.
 56. Riera Matute G, Riera Alonso E. La aftosis oral recurrente en Reumatología. *Reumatol Clin.* 2011;7:323–8.
 57. Boras VV, Savage NW. Recurrent aphthous ulcerative disease: Presentation and management. *Aust Dent J.* 2007;52:10–5.
 58. M O, O I. Presentation of reccurent aphthous ulcer among patients in a tertiary hospital. *African J Oral Heal .* 2019;8:8–12.
 59. Field EA, Allan RB. Review article: Oral ulceration - Aetiopathogenesis, clinical diagnosis and management in the gastrointestinal clinic. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:949–62.
 60. Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol.* 2014;41:S6–22.
 61. Toma AI, Fuller JM, Willett NJ, Goudy SL. Oral wound healing models and emerging regenerative therapies. *Transl Res.* 2021;236:17–34.
 62. Hamzani Y, Chaushu G. Evaluation of early wound healing scales/indexes in oral surgery: A literature review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018;20:1030–5.
 63. Pereira D, Sequeira I. A Scarless Healing Tale: Comparing Homeostasis and Wound Healing of Oral Mucosa With Skin and Oesophagus. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:1–29.
 64. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The bigger picture: Why oral mucosa heals better than skin. *Biomolecules.* 2021;11:1–22.
 65. Tarakji B, Gazal G, Al-Maweri SA, Azzeghaiby SN, Alaizari N. Guideline for the diagnosis and treatment of recurrent aphthous stomatitis for dental practitioners. *J Int oral Heal JIOH.* 2015;7:74–80.
 66. Altenburg A, El-Haj N, Micheli C, Puttkammer M, Abdel-Naser MB, Zouboulis CC. The treatment of chronic recurrent oral aphthous ulcers. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111:665–73.
 67. Soyly Özler G, Okuyucu Ş, Akoğlu E. The Efficacy of Sucralfate and Chlorhexidine as an Oral Rinse in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *Adv Med.* 2014;2014:1–3.
 68. Chen Y, Fang L, Yang X. Cyclic neutropenia presenting as recurrent oral ulcers and periodontitis. *J Clin Pediatr Dent.* 2013;37:307–8.
 69. Gasparini G, Saponaro G, Gasparini D, Foresta E, Azzuni C, Adduci A, Boniello R, Moro A, De Angelis P, Di Nardo F, Damato G, Doneddu P, Todaro M, Garagiola U, Pelo S. The Use of Ropivacaine in Therapeutic Treatment of Oral Aphthosis. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
 70. Messadi D V., Younai F. Aphthous ulcers. *Dermatol Ther.* 2010;23:281–90.
 71. Belenguer-Guallar I, Jiménez-Soriano Y, Claramunt-Lozano A. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. *J Clin Exp Dent.* 2014;6:168–74.
 72. Liu H, Tan L, Fu G, Chen L, Tan H. Efficacy of Topical Intervention for Recurrent Aphthous Stomatitis: A Network Meta-Analysis. *Med.* 2022;58.
 73. Alidaee MR, Taheri A, Mansoori P, Ghodsi SZ. Silver nitrate cautery in aphthous stomatitis: A randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2005;153:521–5.
 74. Suter VGA, Sjölund S, Bornstein MM. Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2017;32:953–63.
 75. Akerzoul N, Chbicheb S. Low laser therapy as an effective treatment of recurrent aphtous ulcers: A clinical case reporting two locations. *Pan Afr Med J.* 2018;30:1–8.

76. Sharda N, Shashikanth MC, Kant P, Jain M. Levamisole and low-dose prednisolone in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2014;43:309–16.
77. rangnath S prasad. Is Optimal Management of Recurrent Aphthous Stomatitis Possible? A Reality Check. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;10:8–13.
78. Mimura MAM, Hirota SK, Sugaya NN, Sanches JA, Migliari DA. Systemic treatment in severe cases of recurrent aphthous stomatitis: an open trial. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64:193–8.
79. Yu C, Abbott P V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007;52:S4–6.
80. Hello M, Barbarot S, Bastuji-Garin S, Revuz J, Chosidow O. Use of thalidomide for severe recurrent aphthous stomatitis: A multicenter cohort analysis. *Medicine (Baltimore).* 2010;89:176–82.
81. Ghorbani A, Akbari J, Boorboor M, Nekoukar Z, Eslami G. Evaluation of zinc sulfate mucoadhesive formulation on recurrent aphthous stomatitis: a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *BMC Oral Health.* 2020;20:1–6.
82. Naik S V., K R, Kohli S, Zohabhasan S, Bhatia S. Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth????? *Open Dent J.* 2016;10:196–206.
83. Kovach I, Kravchenko L, Khotimska Y, Nazaryan R, Gargin V. Influence of Ozone Therapy on Oral Tissue in Modeling of Chronic Recurrent Aphthous Stomatitis. *Georgian Med News.* 2017;115–9.
84. Sun N, Niu Y, Zhang R, Huang Y, Wang J, Qiu W, Zhang X, Han Z, Bao J, Zhu H, Duan Y, Kan H. Ozone inhalation induces exacerbation of eosinophilic airway inflammation and Th2-skew immune response in a rat model of AR. *Biomed Pharmacother.* 2021;137:111261.
85. Salehi B, Albayrak S, Antolak H, Kręgiel D, Pawlikowska E, Sharifi-Rad M, Uprety Y, Fokou PVT, Yousef Z, Zakaria ZA, Varoni EM, Sharopov F, Martins N, Iriti M, Sharifi-Rad J. Aloe genus plants: From farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19.
86. Shi Y, Wei K, Lu J, Wei J, Hu X, Chen T. A Clinic Trial Evaluating the Effects of Aloe Vera Fermentation Gel on Recurrent Aphthous Stomatitis. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2020;2020.
87. Mahboubi M. Rosa damascena as holy ancient herb with novel applications. *J Tradit Complement Med.* 2016;6:10–6.
88. Baccaglioni L, Lalla R, Bruce A, Sartori-Valinotti J, Latortue M, Carrozzo M, Rogers R. Urban legends: Recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis.* 2011;17:755–70.
89. Guest PC. Studies on Biomarkers and New Targets in Aging Research in Iran : Focus on Turmeric and Curcumin. 2021.
90. Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MAT, Pavesi VCS, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS. Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. *Phyther Res.* 2009;23:274–8.
91. Schmidt M, Polednik C, Roller J, Hagen R. Galium verum aqueous extract strongly inhibits the motility of head and neck cancer cell lines and protects mucosal keratinocytes against toxic DNA damage. *Oncol Rep.* 2014;32:1296–302.
92. Galium L, Opiz C, Tava A, Biazzi E, Ronga D. Identification of the Volatile Components of from the Western Italian Alps. *Molecules.* 2020;25:1–11.
93. Turcov D, Barna AS, Trifan A, Blaga AC, Tanasă AM, Suteu D. Antioxidants from Galium verum as Ingredients for the Design of New Dermatocosmetic Products. *Plants.* 2022;11.
94. Bradic J, Zivkovic V, Srejsovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, Turnic TN, Jeremic J,

- Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective effects of *Galium verum* L. extract against cardiac ischemia/reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
95. Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, Li H Bin. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*. 2016;8.
96. Kim YA, Keogh JB, Clifton PM. Polyphenols and glycémie control. *Nutrients*. 2016;8.
97. Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*. 2010;2010:1–9.
98. Montané X, Kowalczyk O, Reig-Vano B, Bajek A, Roszkowski K, Tomczyk R, Pawliszak W, Giamberini M, Mocek-Płóćiniak A, Tylkowski B. Current perspectives of the applications of polyphenols and flavonoids in cancer therapy. *Molecules*. 2020;25.
99. Alotaibi BS, Ijaz M, Buabeid M, Kharaba ZJ, Yaseen HS, Murtaza G. Therapeutic effects and safe uses of plant-derived polyphenolic compounds in cardiovascular diseases: A review. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:4713–32.
100. Kang GG, Francis N, Hill R, Waters D, Blanchard C, Santhakumar AB. Dietary polyphenols and gene expression in molecular pathways associated with type 2 diabetes mellitus: A review. *Int J Mol Sci*. 2020;21.
101. Chiu HF, Venkatakrishnan K, Golovinskaia O, Wang CK. Gastroprotective effects of polyphenols against various gastro-intestinal disorders: A mini-review with special focus on clinical evidence. *Molecules*. 2021;26.
102. Fu YS, Kang N, Yu Y, Mi Y, Guo J, Wu J, Weng CF. Polyphenols, flavonoids and inflammasomes: the role of cigarette smoke in COPD. *Eur Respir Rev*. 2022;31.
103. Yan L, Guo MS, Zhang Y, Yu L, Wu JM, Tang Y, Ai W, Zhu FD, Law BYK, Chen Q, Yu CL, Wong VKW, Li H, Li M, Zhou XG, Qin DL, Wu AG. Dietary Plant Polyphenols as the Potential Drugs in Neurodegenerative Diseases: Current Evidence, Advances, and Opportunities. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022.
104. Martiniakova M, Babikova M, Mondockova V, Blahova J, Kovacova V, Omelka R. Polyphenols in the Prevention and Treatment of Osteoporosis. 2022;1–30.
105. Liu K, Luo M, Wei S. The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
106. Dueñas M, González-Manzano S, González-Paramás A, Santos-Buelga C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51:443–9.
107. Wang Y, Wu S, Li Q, Lang W, Li W, Jiang X, Wan Z, Chen J, Wang H. Epigallocatechin-3-gallate: A phytochemical as a promising drug candidate for the treatment of Parkinson’s disease. *Front Pharmacol*. 2022;13:1–13.
108. Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, Bapat P, Kwun IS, Shen CL. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem*. 2014;25:1–18.
109. Ohishi T, Fukutomi R, Shoji Y, Goto S, Isemura M. The beneficial effects of principal polyphenols from green tea, coffee, wine, and curry on obesity. *Molecules*. 2021;26:1–22.
110. Shakoор H, Feehan J, Apostolopoulos V, Platat C, Dhaheri AS Al, Ali HI, Ismail LC, Bosevski M, Stojanovska L. Immunomodulatory effects of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2021;13:1–18.
111. Santangelo C, Zicari A, Mandosi E, Scazzocchio B, Mari E, Morano S, Masella R. Could gestational diabetes mellitus be managed through dietary bioactive compounds?

- Current knowledge and future perspectives. *Br J Nutr.* 2016;115:1129–44.
112. Long J, Guan P, Hu X, Yang L, He L, Lin Q, Luo F, Li J, He X, Du Z, Li T. Natural Polyphenols as Targeted Modulators in Colon Cancer: Molecular Mechanisms and Applications. *Front Immunol.* 2021;12:1–10.
113. Arora I, Sharma M, Tollefsbol TO. Combinatorial epigenetics impact of polyphenols and phytochemicals in cancer prevention and therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20.
114. Jiménez-Moreno N, Volpe F, Moler JA, Esparza I, Ancín-Azpilicueta C. Impact of extraction conditions on the phenolic composition and antioxidant capacity of grape stem extracts. *Antioxidants.* 2019;8.
115. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules.* 2016;21.
116. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal.* 2014;22:296–302.
117. Kou Y, Li Z, Yang T, Shen X, Wang X, Li H, Zhou K, Li L, Xia Z, Zheng X, Zhao Y. Therapeutic potential of plant iridoids in depression: a review. *Pharm Biol.* 2022;60:2167–81.
118. Akihisa T, Kojima N, Kikuchi T, Yasukawa K, Tokuda H, Masters ET, Manosroi A, Manosroi J. Anti-inflammatory and chemopreventive effects of triterpene cinnamates and acetates from shea fat. *J Oleo Sci.* 2010;59:273–80.
119. Wang C, Gong X, Bo A, Zhang L, Zhang M, Zang E, Zhang C, Li M. Iridoids: Research advances in their phytochemistry, biological activities, and pharmacokinetics. *Molecules.* 2020;25.
120. A. Viljoen, N. Mncwangi, I. Vermaak. Anti-Inflammatory Iridoids of Botanical Origin. *Curr Med Chem.* 2012;19:2104–27.
121. Aničić N, Gašić U, Lu F, Ćirić A, Ivanov M, Jevtić B, Dimitrijević M, Anđelković B, Skorić M, Živković JN, Mao Y, Liu J, Tang C, Soković M, Ye Y, Mišić D. Antimicrobial and immunomodulating activities of two endemic nepeta species and their major iridoids isolated from natural sources. *Pharmaceuticals.* 2021;14.
122. Kang J, Guo C, Thome R, Yang N, Zhang Y, Li X, Cao X. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of iridoid glycosides extracted from: *Corni fructus*: Possible involvement of the PI3K-Akt/PKB signaling pathway. *RSC Adv.* 2018;8:30539–49.
123. Ramírez-Cisneros MÁ, Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB, Rao PPN, Aburto-Amar R, Rodríguez-López V. In vitro COX-1 and COX-2 enzyme inhibitory activities of iridoids from *Penstemon barbatus*, *Castilleja tenuiflora*, *Crescentia alata* and *Vitex mollis*. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2015;25:4505–8.
124. Ahamad J, Toufeeq I, Khan MA, Ameen MSM, Anwer ET, Uthirapathy S, Mir SR, Ahmad J. Oleuropein: A natural antioxidant molecule in the treatment of metabolic syndrome. *Phyther Res.* 2019;33:3112–28.
125. Poli A, Marangoni F, Corsini A, Manzato E, Marrocco W, Martini D, Medea G, Visioli F. Phytosterols, cholesterol control, and cardiovascular disease. *Nutrients.* 2021;13:1–13.
126. Sharma N, Tan MA, An SSA. Phytosterols: Potential metabolic modulators in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22.
127. Tomovic M, Bradic J, Petkovic A, Bradić J, Petković A, Tomović M. Phytochemical and Pharmacological Properties of Some Species of the Genus *Galium L.* □*Galium Verum* and *Mollugo* □ Fitohemijiske I Farmakološke Karakteristike Nekih Vrsta Iz Roda *Galium L.* □Belo I Žuto Ivanjsko Cveće □. *Clin Res.* 2017;1–1.

128. Bergman ME, Davis B, Phillips MA. Occurrence , and Mechanism of Action. *Molecules*. 2019;3961.
129. CUI Y, CHEN LJ, HUANG T, YING JQ, LI J. The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chin J Nat Med*. 2020;18:425–35.
130. Ogura I, Oda T, Sue M, Sasaki Y, Hayama K. Gallium-67 Scintigraphy in Differential Diagnosis of Malignant Tumours from Non-Tumorous Lesions of the Maxilla. *Chin J Dent Res*. 2017;20:219–23.
131. Chitambar CR. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863:2044–53.
132. Lakić NS, Mimica-Dukić NM, Isak JM, Božin BN. Antioxidant properties of Galium verum L. (Rubiaceae) extracts. *Cent Eur J Biol*. 2010;5:331–7.
133. Farcas AD, Mot AC, Zagrean-Tuza C, Toma V, Cimpoiu C, Hosu A, Parvu M, Roman I, Silaghi-Dumitrescu R. Chemo-mapping and biochemical-modulatory and antioxidant/prooxidant effect of galium verum extract during acute restraint and dark stress in female rats. *PLoS One*. 2018;13:1–18.
134. Shinkovenko IL, Kashpur N V., Ilyina T V., Kovalyova AM, Goryacha O V., Koshovyi OM, Toryanyk EL, Kryvoruchko O V. The immunomodulatory activity of the extracts and complexes of biologically active compounds of Galium verum L. herb. *Ces a Slov Farm*. 2018;67:25–9.
135. Schmidt M, Scholz CJ, Gavril GL, Otto C, Polednik C, Roller J, Hagen R. Effect of Galium verum aqueous extract on growth, motility and gene expression in drug-sensitive and -resistant laryngeal carcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 2014;44:745–60.
136. Pashapour S, Heshmati M. The Apoptotic Effect of Methanolic Extract of Galium verum on HT29 Cell Line 1 Introduction 2 Materials and Methods Study Area.
137. Ge A, Liu Y, Zeng X, Kong H, Ma Y, Zhang J, Bai F, Huang M. Effect of diosmetin on airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47:604–11.
138. Shynkovenko IL, Ilyina T V., Goryacha O V., Kovalyova AM, Osolodchenko TM, Komisarenko AM. The phytochemical profile and antibacterial activity of fluid extracts of Galium verum L. herb. *Visnik Farm*. 2017;0:25–8.
139. Zabihi A, Pashapour S. Therapeutic effects of the Galium verum. *Food Ther Heal Care*. 2022;4:14.
140. Roman I, Toma V AI, Farcaş AD. Protective effects of galium verum l. Extract on the hypothalamic – pituitary – adrenal axis under anakinetic stress conditions, in rats. histological aspects. *Stud Univ Vasile Goldis Arad, Ser Stiint Vietii*. 2015;25:207–14.
141. Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am J Enol Vitic*. 1977;28:49–55.
142. Hudz N, Yezerska O, Grygorieva O, Felsociova S, Brindza J, Wieczorek PP, Kacaniova M. Analytical procedure elaboration of total flavonoid content determination and antimicrobial activity of bee bread extracts. *Acta Pol Pharm - Drug Res*. 2019;76:439–52.
143. Andjić M, Božin B, Draginić N, Kočović A, Jeremić JN, Tomović M, Milojević Šamanović A, Kladar N, Čapo I, Jakovljević V, Bradić J V. Formulation and Evaluation of Helichrysum italicum Essential Oil-Based Topical Formulations for Wound Healing in Diabetic Rats. *Pharmaceuticals*. 2021;14:813.
144. Ayoub N, Badr N, Al-Ghamdi SS, Alsanosi S, Alzahrani AR, Abdel-Naim AB, Nematallah KA, Swilam N. Hplc/msn profiling and healing activity of a muco-adhesive formula of salvadora persica against acetic acid-induced oral ulcer in rats. *Nutrients*. 2022;14:1–17.

145. Karavana SY, Sezer B, Güneri P, Veral A, Boyacıoğlu H, Ertan G, Epstein JB. Efficacy of topical benzydamine hydrochloride gel on oral mucosal ulcers: An in vivo animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40:973–8.
146. Sretenovic J, Ajdzanovic V, Zivkovic V, Srejovic I, Corbic M, Milosevic V, Jakovljevic V, Milosavljevic Z. Nandrolone decanoate and physical activity affect quadriceps in peripubertal rats. *Acta Histochem*. 2018;120:429–37.
147. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25:402–8.
148. Khounganian R, Auda S, Al-Zaqzouq R, Al-Zaqzouq R, Al-Semari H, Shakeel F. Effect of two different delivery systems of honey on the healing of oral ulcer in an animal model. *J Food Sci Technol*. 2020;57:4211–9.
149. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175–91.
150. Laanet PR, Saar-Reismaa P, Jõul P, Bragina O, Vaher M. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Selected Estonian Galium Species. *Molecules*. 2023;28:1–17.
151. Vlase L, Mocan A, Hanganu D, Gheldiu A, Crişan G. Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four Galium species (Rubiaceae). *Dig J Nanomater Biostructures*. 2014;9:1085–94.
152. Cavalcante GM, Paula RJS de, Souza LP de, Sousa FB, Mota MRL, Alves APNN. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cir Bras*. 2011;26:227–34.
153. Suharyani I, Mohammed AFA, Muchtaridi M, Wathoni N, Abdassah M. Evolution of drug delivery systems for recurrent aphthous stomatitis. *Drug Des Devel Ther*. 2021;15:4071–89.
154. Sharquie KE, Mashhadani SA Al, Noaimi AA, Al-hayani RK, Shubber SA. Lactic Acid 5 % Mouthwash is an Effective Therapeutic and Prophylactic Agent in Treatment of Recurrent Aphthous Ulcer (Single blind placebo controlled therapeutic study). 2012;11:363–70.
155. Toth LA, Gardiner TW. Food and Water Restriction Protocols: Physiological and Behavioral Considerations. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2000;39:9–17.
156. Yau YHC, Potenza MN. Stress and eating behaviors. *Minerva Endocrinol*. 2013;38:255–67.
157. Wahyuni IS, Sufiawati I, Nittayananta W, Levita J. Anti-Inflammatory Activity and Wound Healing Effect of Kaempferia galanga L. Rhizome on the Chemical-Induced Oral Mucosal Ulcer in Wistar Rats. *J Inflamm Res*. 2022;15:2281–94.
158. Zuhendri F, Lesmana R, Tandean S, Christopher A, Chandrasekaran K, Irsyam I, Suwantika AA, Abdulah R, Wathoni N. Recent Update on the Anti-Inflammatory Activities of Propolis. *Molecules*. 2022;27:1–61.
159. Kang MH, Kim BH. Oral wound healing effects of acai berry water extracts in rat oral mucosa. *Toxicol Res*. 2018;34:97–102.
160. Patel RS, Poddar SS. Development and characterization of mucoadhesive buccal patches of salbutamol sulphate. *Curr Drug Deliv*. 2009;6:140–4.
161. Aslani A, Ghannadi A, Najafi H. Design, formulation and evaluation of a mucoadhesive gel from *Quercus brantii* L. and *coriandrum sativum* L. as periodontal drug delivery. *Adv Biomed Res*. 2013;2:21.
162. Amanlou M, Babae N, Saheb-Jamee M, Salehnia A, Farsam H, Tohidast Akrad Z. Efficacy of *Satureja khuzistanica* extract and its essential oil preparations in the management of recurrent aphthous stomatitis. *Daru*. 2007;15:231–5.

163. Romero-Cerecero O, Zamilpa A, Tortoriello J. Pilot study that evaluated the clinical effectiveness and safety of a phytopharmaceutical elaborated with an extract of *Ageratina pichinchensis* in patients with minor recurrent aphthous stomatitis. *J Ethnopharmacol.* 2015;173:225–30.
164. Pourahmad M, Rahiminejad M, Fadaei S, Kashafi H. Effects of camel thorn distillate on recurrent oral aphthous lesions. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft.* 2010;8:348–52.
165. Arafa MG, Ghalwash D, El-Kersh DM, Elmazar MM. Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. *Sci Rep.* 2018;8:1–14.
166. Haghpanah P, Moghadamnia AA, Zarghami A, Motalebnejad M. Muco-bioadhesive containing ginger officinale extract in the management of recurrent aphthous stomatitis: A randomized clinical study. *Casp J Intern Med.* 2015;6:3–8.
167. Kia SJ, Mansourian A, Basirat M, Akhavan M, Mohtasham-Amiri Z, Moosavi MS. New concentration of curcumin orabase in recurrent aphthous stomatitis: A randomized, controlled clinical trial. *J Herb Med.* 2020;22:100336.
168. Martin MD, Sherman J, Van Der Ven P, Burgess J. A controlled trial of a dissolving oral patch concerning glycyrrhiza (licorice) herbal extract for the treatment of aphthous ulcers. *Gen Dent.* 2008;56:206–10.
169. Klein M, de Quadros De Bortolli J, Guimarães FS, Salum FG, Cherubini K, de Figueiredo MAZ. Effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, on oral wound healing process in rats: Clinical and histological evaluation. *Phyther Res.* 2018;32:2275–81.
170. Liao Z, Zeng R, Hu L, Maffucci KG, Qu Y. Polysaccharides from tubers of *Bletilla striata*: Physicochemical characterization, formulation of buccoadhesive wafers and preliminary study on treating oral ulcer. *Int J Biol Macromol.* 2019;122:1035–45.
171. Md Ismail NH, Nik Mohd Alwi NA. The effect of piper sarmentosum aqueous extract on buccal ulcer healing. *J Heal Transl Med.* 2019;22:13–9.
172. Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Investig.* 2002;82:1503–13.
173. Liang N, Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients.* 2015;8:1–20.
174. Abdelgawad MA, Musa A, Almalki AH, Alzarea SI, Mostafa EM, Hegazy MM, Mostafa-Hedeab G, Ghoneim MM, Parambi DGT, Bakr RB, Al-Muaikel NS, Alanazi AS, Alharbi M, Ahmad W, Bukhari SNA, Al-Sanea MM. Novel Phenolic Compounds as Potential Dual EGFR and COX-2 Inhibitors: Design, Semisynthesis, in vitro Biological Evaluation and in silico Insights. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:2325–37.
175. Asgharpour F, Moghadamnia AA, Motalebnejad M, Nouri HR. Propolis attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through intracellular ROS and NO levels along with downregulation of IL-1 β and IL-6 expressions in murine RAW 264.7 macrophages. *J Food Biochem.* 2019;43:1–10.
176. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in wound healing. *Bioengineering.* 2021;8.
177. Tanaka H, Okada T. Effect of Reactive Oxygen Species on Collagen Metabolism in Cultured Human Dermal fibroblasts. *J Soc Cosmet Chem Japan.* 1994;28:172–7.
178. El-Zahar H, Menze ET, Handoussa H, Osman AK, El-Shazly M, Mostafa NM, Swilam N. UPLC-PDA-MS/MS Profiling and Healing Activity of Polyphenol-Rich Fraction of *Alhagi maurorum* against Oral Ulcer in Rats. *Plants.* 2022;11:1–20.
179. Shirwaikar A, Shenoy R, Udupa AL, Udupa SL, Shetty S. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant

- enzymes. *Indian J Exp Biol.* 2003;41:238–41.
180. Manjunatha BK, Vidya SM, Krishna V, Mankani KL, Singh SDJ, Manohara YN. Comparative evaluation of wound healing potency of *Vitex trifolia* L. and *Vitex altissima* L. *Phytother Res.* 2007;21:457–61.
181. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng ZY. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
182. Kumar J, Teoh SL, Das S, Mahaknkrauh P. Oxidative stress in oral diseases: Understanding its relation with other systemic diseases. *Front Physiol.* 2017;8:1–15.
183. Zámocký M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* 2010;500:45–57.
184. Galasso M, Gambino S, Romanelli MG, Donadelli M, Scupoli MT. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. *Free Radic Biol Med.* 2021;172:264–72.
185. Cecerska-Heryć E, Surowska O, Heryć R, Serwin N, Napiontek-Balińska S, Dołęgowska B. Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients - A review. *Clin Biochem.* 2021;93:1–8.
186. Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 2018;7.
187. Gümüş S, Yarıktaş M, Nazıroğlu M, Cihangir Uğuz A, Aynali G, Başpınar Ş. Effect of corticosteroid (triamcinolone acetonide) and chlorhexidin on chemotherapy- induced oxidative stress in buccal mucosa of rats. *Ear, Nose Throat J.* 2020;95:36–42.
188. Karıncaoglu Y, Batcioglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Gene M. The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:7–12.
189. Chen P, Yao H, Su W, Zheng Y, Fan W, Zhang L, Chen T, Wu S, Zhang W, He Y, Yan Z, Wang Y, Li P. Pharmacodynamic and Metabolomics Studies on the Effect of Kouyanqing Granule in the Treatment of Phenol-Induced Oral Ulcer Worsened by Sleep Deprivation. *Front Pharmacol.* 2020;11.
190. Zhang Z, Li S, Fang H. Enzymatic antioxidants status in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2017;46:817–20.
191. Merez-Sadowska A, Sitarek P, Kucharska E, Kowalczyk T, Zajdel K, Cegliński T, Zajdel R. Antioxidant properties of plant-derived phenolic compounds and their effect on skin fibroblast cells. *Antioxidants.* 2021;10:1–24.
192. Radzki D, Wilhelm-Węglarz M, Pruska K, Kusiak A, Ordyniec-Kwaśnica I. A Fresh Look at Mouthwashes—What Is Inside and What Is It for? *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19.
193. Zhang Z, Zhang Q, Xue Y, Chen G, Wu Z, Fang H. Serum levels of total antioxidant status, nitric oxide and nitric oxide synthase in minor recurrent aphthous stomatitis patients. *Medicine (Baltimore).* 2019;98:e14039.
194. Ziaudeen S, Ravindran R. Assessment of oxidant-antioxidant status and stress factor in recurrent aphthous stomatitis patients: Case control study. *J Clin Diagnostic Res.* 2017;11:ZC01–4.
195. Sardaro N, della Vella F, Incalza MA, Stasio DDI, Lucchese A, Contaldo M, Laudadio C, Petrucci M. Oxidative stress and oral mucosal diseases: An overview. *In Vivo (Brooklyn).* 2019;33:289–96.
196. Kamolz LP, Luze H, Nischwitz SP, Kotzbeck P. Resveratrol promotes wound healing: A very short overview. *Burns.* 2021;47:972–3.
197. Ning S, Zang J, Zhang B, Feng X, Qiu F. Botanical Drugs in Traditional Chinese

- Medicine With Wound Healing Properties. *Front Pharmacol.* 2022;13:1–24.
198. Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil A Bin, Ansari MA, Alomary MN, Alshabrmi FM, Palai S, Deb PK, Devi R. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Front Pharmacol.* 2022;13:1–15.
199. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent.* 2009;37:413–23.
200. Xiao X, Deng Y, Long Y, Liu W, Shi H. Evaluation of cytokines as diagnostic and therapeutic indicators for recurrent aphthous stomatitis: A statistical study. *J Dent Sci.* 2022;18:883–8.
201. Shen C, Ye W, Gong L, Lv K, Gao B, Yao H. Serum interleukin-6, interleukin-17A, and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2021;50:418–23.
202. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1–16.
203. Natah SS, Häyrinen-Immonen R, Hietanen J, Malmström M, Kontinen YT. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions (RAU). *J Oral Pathol Med.* 2000;29:19–25.
204. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A, Tchórzewski H. Predominance of Type 1 cytokines and decreased number of CD4 +CD25+ high T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunol Lett.* 2005;99:57–62.
205. Wen SD, Sans-Serramitjana E, Santander JF, Sánchez MR, Salazar-Aguilar P, Zepeda AB, Alvarado SI, Miranda IB. Effects of natural extracts in the treatment of oral ulcers: A systematic review of evidence from experimental studies in animals. *J Clin Exp Dent.* 2021;13:1038–48.
206. Faruk EM, Nafea OE, Fouad H, Ebrahim UFA, Hasan RAA. Possible healing effects of *Salvadora persica* extract (MISWAK) and laser therapy in a rabbit model of a caustic-induced tongue ulcers: histological, immunohistochemical and biochemical study. *J Mol Histol.* 2020;51:341–52.
207. Lim YS, Kwon SK, Park JH, Cho CG, Park SW, Kim WK. Enhanced mucosal healing with curcumin in animal oral ulcer model. *Laryngoscope.* 2016;126:E68–73.
208. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, Kandaswami C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:319–28.
209. Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X, Zhang Y, Wang X, Meng X. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomed Pharmacother.* 2021;133:110985.
210. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen.* 2019;39:1–16.
211. Borthwick LA. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. *Semin Immunopathol.* 2016;38:517–34.
212. Soyly A, Yıldız G, Torun Bayram M, Kavukçu S. IL-1 β blockade in periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome: case-based review. *Rheumatol Int.* 2021;41:183–8.
213. Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WER, Thornhill MH. IL-1B and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Genes Immun.* 2002;3:302–5.

214. Ślebioda Z, Kowalska A, Rozmiarek M, Krawiecka E, Szponar E, Dorocka-Bobkowska B. The absence of an association between Interleukin 1 β gene polymorphisms and recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Arch Oral Biol.* 2017;84:45–9.
215. Zhou H, S. Beevers C, Huang S. The Targets of Curcumin. *Curr Drug Targets.* 2012;12:332–47.
216. Salehi B, Jornet PL, López EPF, Calina D, Sharifi-Rad M, Ramírez-Alarcón K, Forman K, Fernández M, Martorell M, Setzer WN, Martins N, Rodrigues CF, Sharifi-Rad J. Plant-derived bioactives in oral mucosal lesions: A key emphasis to Curcumin, Lycopene, chamomile, aloe Vera, green tea and coffee properties. *Biomolecules.* 2019;9.
217. Tavangar A, Soleymani B, Ghalayani P, Zolfaghary B, Farhad A. The efficacy of *Punica granatum* extract in the management of recurrent aphthous stomatitis. *J Res Pharm Pract.* 2013;2:88.
218. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol.* 2021;33:127–48.
219. Mateo RB, Reichner JS, Albina JE. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol.* 1994;266:R1840-4.
220. Boras VV, Lukač J, Brailo V, Picek P, Kordić D, Žilić IA. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med.* 2006;35:241–3.
221. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32:23–63.
222. Buño IJ, Clark Huff J, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor α , interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol.* 1998;134:827–31.
223. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem.* 2010;122:987–96.
224. Muthu K, Saravanan D, Rethinam S, Madeswaran S, Suresh N. Appraising the Clinical Efficacy of Herbal Topical Medications in the Treatment of Recurrent Aphthous Stomatitis - A Review. *J Young Pharm.* 2021;13:342–51.
225. Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 2021;697:108701.
226. Jabri-Karoui I, Bettaieb I, Msaada K, Hammami M, Marzouk B. Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *J Funct Foods.* 2012;4:661–9.
227. Davì F, Taviano MF, Acquaviva R, Malfa GA, Cavò E, Arena P, Ragusa S, Cacciola F, El Majdoub YO, Mondello L, Miceli N. Chemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Activity of a Phenolic-Rich Fraction from the Leaves of *Brassica fruticulosa* subsp. *fruticulosa* (Brassicaceae) Growing Wild in Sicily (Italy). *Molecules.* 2023;28:1–16.

БИОГРАФИЈА

Др Миона Вулетић рођена је 23.09.1991. године у Крагујевцу, Република Србија. Основну школу „Јован Поповић“ завршила је у Крагујевцу. Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2010/2011. године, а дана 27.06.2015. године завршила је Интегрисане академске студије стоматологије са просечном оценом 8,88 и стекла звање доктор стоматологије. Након завршених студија обавила је обавезан приправнички стаж и положила стручни испит 29.06.2016. године. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2015/2016. године, изборно подручје Истраживања у стоматологији. Специјалистичке студије из здравствене области Превентивна и дечја стоматологија уписала је 01.12.2017. године, и завршила 2022. године чиме је стекла звање специјалисте Превентивне и дечје стоматологије. У зимском семестру школске 2015/2016. године и у зимском семестру 2016/2017. године била је ангажована на студијском програму Интегрисаних академских студија стоматологије, Факултет медицинских наука у Крагујевцу, на месту факултатора за ужу научну област Болести зуба и ендодонција. Од школске 2016/2017. године запослена је као сарадник у настави, а од школске 2022/2023. као асистент за ужу научну област Превентивна и дечја стоматологија на Интегрисаним академским студијама стоматологије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Ефекти формулација на бази Galium verum L. у терапији афтозног стоматитиса код
пацова

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, _____, 2023. године,



потпис аутора

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

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

Ефекти формулација на бази Galium verum L. у терапији афтозног стоматитиса код
пацова

истоветне.

У Крагујевцу _____, _____ 2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Миона Вулетих,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Ефекти формулација на бази Galium verum L. у терапији афтозног стоматитиса код
пацова

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам


не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу _____, _____ 2023. године,


_____ потпис аутора

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