

**MEDICINSKI
FAKULTET**

Adresa: Kruševac bb
81000 PODGORICA
CRNA GORA
Tel: +382 20 246 651
Fax: +382 20 243 842
www.ucg.ac.me/med
infomedf@ucg.ac.me



**FACULTY OF
MEDICINE**

Address: Krusevac bb
81000 PODGORICA
MONTENEGRO
Phone: +382 20 246 651
Fax: +382 20 243 842
www.ucg.ac.me/med
infomedf@ucg.ac.me

Broj: 377/8-1
Podgorica, 05.03.2024. godine

**Univerzitet Crne Gore
Odbor za doktorske studije
n/r predsjedniku – prof. dr Borisu Vukićeviću**

Poštovani,

U skladu sa stavom 3 člana 35 i tačkom 3.6. Vodiča za doktorske studije, dostavljamo Odluku Vijeća Medicinskog fakulteta o usvajanju Izvještaja Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije (obrazac D1) i inoviranu prijavu teme doktorske disertacije, doktoranda dr pharm Miloša Luburića.

S poštovanjem,

**MEDICINSKI FAKULTET
DEKAN,**

Prof. dr Miodrag Radunović

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET
Broj: 377/8
Podgorica, 29.02.2024. godine

Na osnovu člana 64 stav 2 tačka 9 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u skladu sa članom 35 Pravila doktorskih studija (Bilten UCG broj: 513/20 i 561/22), Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 29.02.2024. godine donijelo je

ODLUKU

1. Usvaja se Izvještaj Komisije za ocjenu prijave doktorske disertacije kandidata dr pharm Miloša Luburića broj: 1904/7-1 od 25.12.2023. godine.
2. Predlaže se Senatu UCG da prihvati kao podobnu doktorsku tezu pod nazivom „**Formulacija i farmaceutsko-tehnološko ispitivanje polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima (*Salvia officinalis* L.) iz Crne Gore i procjena njegovog uticaja na procese zarastanja rana i starenja kože**“ kandidata dr pharm Miloša Luburića.
3. Odluka Vijeća, Izvještaj Komisije iz tačke 1 ove odluke i inovirani obrazac Prijave teme doktorske disertacije (obrazac PD broj: 1904/7-2 od 25.12.2023. godine), dostavlja se Centru za doktorske studije i Senatu Univerziteta Crne Gore, na dalju realizaciju.

OBRAZLOŽENJE

Dr pharm Miloš Luburić podnio je prijavu teme doktorske disertacije pod nazivom „**Formulacija i farmaceutsko-tehnološko ispitivanje polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima (*Salvia officinalis* L.) iz Crne Gore i procjena njegovog uticaja na procese zarastanja rana i starenja kože**“ dana 31.08.2023. godine (Broj prijave: 1151).

Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 29.11.2023. godine imenovalo je Komisiju za ocjenu prijave doktorske disertacije, kandidata dr pharm Miloša Luburića u sastavu: prof. dr Ljiljana Vučković, doc. dr Tanja Vojinović i doc. dr Mihailo Vukmirović.

Kandidat je pred navedenom Komisijom javno obrazložio ciljeve i očekivane rezultate, odnosno izložio istraživački program doktorske teze, dana 20.12.2023. godine. Komisija je podnijela Vijeću Medicinskog fakulteta Izvještaj o ocjeni podobnosti doktorske disertacije broj:1904/7-1 od 25.12.2023. godine i predložila određene korekcije, koje je kandidat ispoštovao i dostavio novu Prijavu teme, broj: 1904/7-2 od 25.12.2023. godine.

Vijeće Medicinskog fakulteta na sjednici održanoj 29.02.2024. godine, nakon razmatranja izvještaja Komisije broj: 1904/7-1 od 25.12.2023. godine, odlučilo je kao u dispozitivu ove odluke.

VIJEĆE MEDICINSKOG FAKULTET
PREDSJEDAVAJUĆI,
Prof. dr Miodrag Radunović, dekan

OCJENA PRIJAVE DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	dr pharm Miloš Luburić
Fakultet	Medicinski Fakultet
Studijski program	Farmacija
Broj indeksa	12/21
Podaci o magistarskom radu	/
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Formulacija i farmaceutsko-tehnološko ispitivanje polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima (<i>Salvia officinalis</i> L.) iz Crne Gore i procjena njegovog uticaja na procese zarastanja rana i starenja kože
Na engleskom jeziku	Formulation and pharmaceutical-technological study of a semi-solid preparation containing essential oil of sage (<i>Salvia officinalis</i> L.) from Montenegro and evaluation of its effect on wound healing and skin aging processes
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	29.02. 2024.godine
Naučna oblast doktorske disertacije	Farmaceutska tehnologija i kozmetologija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
<p>Javna odbrana polaznih istraživanja na temu: „Formulacija i farmaceutsko-tehnološko ispitivanje polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima (<i>Salvia officinalis</i> L.) iz Crne Gore i procjena njegovog uticaja na procese zarastanja rana i starenja kože“, kandidata dr pharm Miloša Luburića, održana je dana 20.12.2023. godine u 10,00 časova, u Sali za sastanke Medicinskog fakulteta, pred Komisijom za ocjenu prijave doktorske disertacije, u sastavu:</p> <ul style="list-style-type: none"> • dr Ljiljana Vučković – vanredna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, predsjednik • dr Tanja Vojinović – docentkinja Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, mentor • dr Mihailo Vukmirović – docent Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član <p>Odbrana polaznih istraživanja je počela saopštavanjem biografskih podataka i drugih podataka od značaja iz priložene dokumentacije, poslije čega je uslijedilo izlaganje istraživačkog plana doktorske disertacije od strane kandidata. Na početku izlaganja, kandidat je dao obrazloženje predložene teme, sa osvrtom na dosadašnje ostvarene rezultate u oblasti istraživanja. Kandidat je članovima komisije predstavio plan istraživanja koji će sprovoditi u nastavku rada na doktorskoj disertaciji, iznio je jasno definisane ciljeve i hipoteze istraživanja i objasnio metodologiju predloženog istraživanja. U zaključku, kandidat je naveo da predloženo istraživanje ima značajan naučni potencijal iz kojeg će proistekli rezultati biti publikovani u prestižnim naučnim časopisima i tako dati očekivani naučni doprinos.</p>	

Članovi Komisije su nakon izlaganja kandidata dali komentare i sugestije, i postavili su pitanja na koja je kandidat uspješno odgovorio (Prilog).

Komisija je jednoglasno donijela odluku da je kandidat dr pharm Miloš Luburić sa uspjehom odbranio polazna istraživanja doktorske disertacije.

B. OCJENA PRIJAVE TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

B1. Obrazloženje teme

Salvia officinalis L. (pelim, žalfija, kadulja) je višegodišnji polužbun koji pripada rodu *Salvia*, porodici *Lamiaceae* (1). Vrsta vodi porijeklo iz Mediterana, a u Crnoj Gori je široko rasprostranjena, naročito u primorskom i submediteranskom dijelu zemlje(2).

Pelim se u medicinske svrhe koristi od davnina. Najveći sadržaj etarskog ulja se nalazi u listu, a prema Tucakovu, najčešće tradicionalne primjene preparata od pelima su ispiranje usta i grla prilikom upala, protiv znojenja tuberkuloznih pacijenata, jačanje organizma, te kao sastojak čaja protiv upale mokraćnih puteva (3). Herbalna monografija Evropske agencije za lijekove navodi četiri indikacije tradicionalne upotrebe lista pelima: olakšanje blagih simptoma dispepsije, kao što su gorušica i nadimanje; olakšanje prekomjernog znojenja; olakšanje upala u ustima i grlu; olakšanje manjih upala kože (4).

Predmet dosadašnjih istraživanja etarskog ulja pelima je najčešće bila opravdanost tradicionalne upotrebe, dok će ovo istraživanje pružiti dublje razumijevanje mogućeg uticaja polučvrstih preparata koji sadrže etarsko ulje pelima na procese zarastanja rana i starenja kože. Rezultati istraživanja bi doprinijeli preliminarnoj procjeni potencijala primjene preparata u svrhu zarastanja rana i *anti-age* terapije.

Dodatno, prethodna istraživanja pelima u Crnoj Gori su uglavnom bila usmjerena na analizu hemijskog sastava etarskog ulja i identifikaciju hemotipova koji se javljaju u Crnoj Gori, ali fokus istraživanja nije bio na razvoju preparata namijenjenih primjeni na koži, niti je ispitivano kako sastav etarskog ulja utiče na proces formulacije preparata i područje terapijske primjene.

Salvia officinalis L. je višegodišnji polužbun, visok 50-90 cm. Stabljika je drvenasta, višegodišnja i četvorouglasta. Starije grane su razgranate, polegle ili se uzdižu. Kora je sivo mrka i ljušti se. Jednogodišnji izdanci su sivo-zeleni, pokriveni bijelim mehničkim i žljezdanim dlakama i uzdižu se. Listovi su naspramno raspoređeni, sa lisnom drškom koja je duga 0-3 cm. Liska je izduženo jajasta, eliptična do lancetasta, dugačka 2 – 9 cm, široka do 3.5 cm, pri osnovi zaokrugljena, okrugla ili zašiljena na vrhu, papirnata, fino nabrana, nazubljene ivice. Mlade liske su prekrivene velikim brojem dlaka, dok su razvijene liske na licu slabije dlakave a na naličju gušće dlakave. Cvjetovi su plavo-ljubičasti, dvousnati i nalaze se u pršljenovima (4 – 16 cvjetova u pršljenju), koji formiraju terminalni prividni grozd. Plod je merikarpium od 4 tamno smeđa loptasta oraščića, veličine 2-3 mm u dijametru. Biljka cvjeta u periodu od maja do jula (1, 3, 5).

Najveća koncentracija etarskog ulja se nalazi u listovima biljke. Pretragom literature moguće je zaključiti da postoji variranje u rezultatima istraživanja vezano za prinos etarskog ulja iz listova. Prema Stešević i saradnicima, prinos se kreće u opsegu od 1.84% do 2.84% (6), prema Couladis i saradnicima u opsegu od 1.16% do 1.68% (7), a rezultat istraživanja koje su sproveli Damjanović Vratnica i saradnici je 2.4% prinosa etarskog ulja (8). Glavni sastojci etarskog ulja pelima sa staništa u Crnoj Gori su: cis-tujon, trans-tujon, kamfor, kamfen, 1,8-cineol, viridiflorol, limonen, alfa-pinen i alfa-humulen (6).

Pregledom literature konstatovano je da postoje dokazi o antikancerogenom, antiinflamatornom, antinociceptivnom, antioksidativnom, antimikrobnom, hipoglikemijskom, hipolipidemijskom dejstvu preparata na bazi pelima. Antinociceptivni, hipolipidemijski i efekat poboljšanja pamćenja su dokazani u kliničkim ispitivanjima (9).

Keshavarz i saradnici su ukazali na antiangiogenetsko dejstvo etarskog ulja pelima (10), a Farahpour, Karimzadeh i saradnici na poboljšano zarastanje rana nakon topikalne primjene polučvrstih preparata sa etarskim uljem pelima sa staništa u Iranu (u koncentracijama od 1% do

5%) (11, 12). Dodatno, Grdiša i saradnici navode istorijsku primjenu pelima za liječenje rana (13). Güzel i saradnici su dokazali pozitivan uticaj preparata sa etarskim uljem vrsta iz roda *Salvia*, *Salvia kronenburgii* Rech. f. i *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* na zarastanje rana (14).

Rezultati istraživanja koje su sproveli Khare i saradnici upućuju na to da postoje preliminarni podaci o djelotvornosti etarskog ulja pelima sa staništa Indije na proces starenja kože izloženoj UV zracima (15). Tran i saradnici su dokazali da kamfor indukuje proliferaciju primarnih humanih dermalnih fibroblasta, smanjuje aktivnost β -galaktozidaze, inhibira aktivnost elastaze, te povećava ukupnu količinu kolagena u kulturi dermalnih fibroblasta (16).

Geni koji imaju najveći uticaj na proces starenja kože su geni zaduženi za sintezu kolagena (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL4A1* i *COL7A1*), geni koji kodiraju sintezu enzima koji razgrađuju proteine ekstracelularnog matriksa (*MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP10*, *MMP12*, *MMP13* i *MMP14*), geni zaduženi za inhibiciju metaloproteinaza (*TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* i *TIMP4*), geni koji učestvuju u inflamatornim procesima (*IL-1 β* , *IL-1 α* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10* i *PTGS2*), kao i *TP53* (marker ćelijske diobe), *CASP3* (ima ulogu u procesu apoptoze), *LMNA* (učestvuje u prijevremenom starenju), te *SIRT1* (značajan za dugovječnost i starenje) (17). Matriksne metaloproteinaze su cink zavisne endopeptidaze koje imaju značajnu ulogu u procesima zarastanja rana i starenja kože iz razloga što doprinose cijepanju komponenti ekstracelularnog matriksa, uključujući kolagen (18). Ekspresija matriksne metaloproteinaze-1 (MMP-1) je izuzetno visoka čak i u nestimulisanim fibroblastima, dok kolagen tip I predstavlja najzastupljeniji tip kolagena u ljudskom organizmu, te će ovo istraživanje obuhvatiti ispitivanje uticaja izrađenog preparata na ekspresiju gena *MMP1* i *COL1A1*, kao i na količinu MMP1 i tip 1 kolagena.

Antioksidativna, antielastazna, antihijaluronidazna, antikolagenazna, i antitirozinazna aktivnost su od esencijalnog značaja u procjeni uticaja na proces starenja kože (19, 20, 21). Istraživanje će obuhvatiti ispitivanje antielastazne aktivnosti izrađenog preparata spektrofotometrijskim metodama.

Zaključuje se da literaturni podaci ukazuju na preliminarno postojanje pozitivnog efekta etarskog ulja pelima na procese zarastanja rana i starenja kože, ali i na potrebu za dodatnim istraživanjima koja bi doprinijela evaluaciji primjene polučvrstih preparata u te svrhe.

B2. Cilj i hipoteze

Ciljevi istraživanja:

- Izolacija i ispitivanje etarskog ulja pelima sa staništa u Crnoj Gori
- Formulacija polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima
- Ispitivanje farmaceutsko-tehnoloških karakteristika izrađenog preparata
- Ispitivanje uticaja izrađenog preparata na proces zarastanja rana
- Ispitivanje uticaja izrađenog preparata na proces starenja kože

Hipoteze istraživanja:

H1: Moguće je uspješno formulirati polučvrsti preparat sa etarskim uljem pelima.

H2: Polučvrsti preparati sa etarskim uljem pelima su kvalitetni preparati za primjenu na koži.

H3: Polučvrsti preparati sa etarskim uljem pelima imaju pozitivan uticaj na proces zarastanja rana.

H4: Polučvrsti preparati sa etarskim uljem pelima imaju pozitivan uticaj na proces starenja kože.

B3. Metode i plan istraživanja

Za postizanje navedenih ciljeva i hipoteza, istraživanje će obuhvatiti sljedeće faze:

1) Izolacija i ispitivanje etarskog ulja

U toku istraživanja biće korišćeno etarsko ulje dobijeno parnom destilacijom iz populacija *Salvia officinalis* na lokalitetu Paštrovačka gora, u blizini Petrovca. Parna destilacija predstavlja hidrodestilaciju tokom koje će se usitnjeni biljni materijal nalaziti u kotlu na rešetki podignutoj od dna, a vodena para dolaziti iz generatora pare smještenog izvan kotla i prolaziti kroz biljnu masu. Karakterizacija sastava eteričnog ulja vršiće se na gasnom hromatografu Shimadzu QP2020 sa SSL injektorom, kuplovanim sa tripl-kvadrupol masenim spektrometrom. Komponente će biti razdvojene na koloni ZB-5MSplus (30 m x 0,25mm; 0,25µm debljina filma) sa helijumom kao nosećim gasom. Uzorci će biti puštani po SCAN metodi pri konstantnom protoku od 2.40 ml/min, snimanjem opsega masa m/z 50-500 (EI 70eV). Program analize etarskog ulja će trajati 58 min.

Organoleptički izgled (miris, boja i homogenost uzorka) pratiće se vizuelnim pregledom ekstrakata. Za ispitivanje će biti korišćene identične epruvete od bezbojnog, prozirnog, neutralnog stakla. Boje su uređene posmatranjem pri difuznoj dnevnoj svjetlosti, horizontalno prema bijeloj pozadini.

2) Formulacija polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima

U drugoj fazi istraživanja, sastav formulacije će biti razmotren, nakon čega će biti formulisan polučvrsti preparat, koji će sadržati 1% etarskog ulja pelima.

Planirani sastav podloge (INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) naziv):

- Stearinska kiselina 12,0 g – Stearic Acid (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Pčelinji vosak 4,0 g – Beeswax (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Bijeli vazelin 4,0 g – White Petrolatum (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Trietanolamin 10% seu 16,0 g – Triethanolamine (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Trometamol 10% - Tromethamine (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Propilenglikol 10,0 g – Propylene Glycol (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Prečišćena voda 54,0 g – Purified Water (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

3) Ispitivanje farmaceutsko-tehnoloških karakteristika izrađenog preparata

Treća faza istraživanja će obuhvatiti farmaceutsko-tehnološka ispitivanja, u okviru kojih će biti sprovedeno više testova, uključujući izgled formulacije, test razmazivosti, reološke karakteristike (konzistentnost i viskoznost), mjerenje pH vrijednosti, ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta, te ispitivanje stabilnosti izrađenog preparata. Ovi koraci su neophodni kako bi se osigurala adekvatna formulacija preparata i postigla stabilnost i kompatibilnost sa kožom.

Ispitivanje formulacije će obuhvatiti sljedeće testove:

- Izgled formulacije

U svrhu praćenja izgleda, boje i aplikativnih karakteristika krema sa etarskim uljem pelima biće sprovedena organoleptička ispitivanja uzoraka, inicijalno, 7 dana nakon izrade, kontrolno mjerenje nakon 1 mjeseca i poslije 3 mjeseca čuvanja na sobnoj temperaturi ($20 \pm 3^\circ\text{C}$).

- Ispitivanje razmazivosti

Ispitivanje će se vršiti ekstenziometrom tako što će se uzorak polučvrstog preparata određenog volumena postaviti između dvije staklene ploče ovog uređaja i gornjoj ploči će se povećavati težina, stavljanjem tega u određenim vremenskim intervalima.

- Ispitivanje reoloških osobina (konzistentnost i viskoznost)

U cilju dobijanja podataka koji bi ukazivali na promjene u fizičkoj stabilnosti uzoraka i sagledavanja aplikativnih karakteristika kremova sa etarskim uljem pelima, biće sprovedena reološka karakterizacija. Kontinualna reološka mjerenja biće sprovedena na reometru Paar Physica (Njemačka) primjenom kupa-ploča mjernog sistema. Sva mjerenja biće ponovljena tri puta, pod sljedećim uslovima: kupa-ploča mjerni sistem (dijametar kupa 25 mm, ugao 1°), debljina mjerenog uzorka 0,05 mm, temperatura $20 \pm 0,1$ °C, brzina smicanja 0 do 200 s⁻¹ (120 s, uzlazna kriva) i 200 do 0 s⁻¹ (120 s, silazna kriva).

- Mjerenje pH vrijednosti

Mjerenje pH preparata vršiće se potenciometrijskom metodom (2.2.3. Ph. Eur. 10.0), direktnim uranjanjem elektrode pH-metra u ispitivane uzorke. Prije početka radni aparat će biti baždaren na propisan način. Oprema koja će biti korišćena je pH metar, Hanna Instruments, H 8417, SAD.

- Električna provodljivost

U cilju određivanja tipa emulzije raspodjele vode u emulzionom sistemu i praćenja promjena stabilnosti uzoraka, biće sprovedena mjerenja električne provodljivosti na uređaju Konduktometar CDM 230 (Meterlab, Radiometer, Danska). Mjerenja će biti sprovedena inicijalno 7 dana po pripremi uzoraka i nakon 1 i 3 mjeseca, direktnim uranjanjem staklene elektrode pH metra u uzorke.

- Test centrifugiranja

U cilju sveobuhvatne procjene fizičke stabilnosti ispitivanih kremova biće sproveden test centrifugiranja na centrifugi (Tehtnica, Zelezniki, Slovenija) pod sljedećim stres uslovima: 3000 obrt/min u trajanju od 15 minuta, dva puta za redom, inicijalno 7 dana po pripremi uzorka i nakon 1 i 3 mjeseca.

- Ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta biće sprovedeno određivanjem:

- Ukupnog broja aerobnih mikroorganizama (TAMC)
- Ukupnog broja kvasaca i plijesni (TYMC)
- Odsustva *Staphylococcus aureus*
- Odsustva *Pseudomonas aeruginosa*
- Sadržaja *Endobacteria* i ostalih gram-negativnih bakterija

4) Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost pripremljenog preparata će biti ispitana *in vitro* dilucionom metodom u cilju potvrđivanja literaturnih navoda o antimikrobnoj aktivnosti preparata sa etarskim uljem pelima (22).

5) Ispitivanje dermalnih fibroblasta

Nakon farmaceutsko-tehnoloških ispitivanja, biće sprovedena procjena uticaja izradenog polučvrstog preparata na procese zarastanja rana i starenja kože, na kulturi dermalnih fibroblasta. U toku istraživanja biće korišćena komercijalno nabavljena kultura humanih dermalnih fibroblasta izolovanih iz humanog epidermalnog tkiva i komercijalno nabavljeni kit za formiranje medijuma za

fibroblaste.

Komercijalne kulture humanih dermalnih fibroblasta se dostavljaju u zamrznutim bočicama, u insuliranim pakovanjima namijenjenim održavanju temperaturnih uslova.

U okviru pete faze istraživanja biće sprovedena sljedeća ispitivanja:

i. Ispitivanje vijabilnosti dermalnih fibroblasta nakon primjene izrađenog preparata

Ispitivanje vijabilnosti dermalnih fibroblasta nakon primjene izrađenog preparata biće sprovedeno pomoću metode redukcije MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid). Žive ćelije s aktivnim metabolizmom pretvaraju MTT u ljubičasto obojeni formazan, s apsorpcionim maksimumom blizu 570 nm. Priprema MTT supstrata će biti izvedena u fiziološki balansiranom rastvoru, koji će biti dodat kulturi ćelija, u finalnoj koncentraciji od 0,2 - 0,5 mg/ml, te biti inkubiran 1 do 4 sata. Količina formazana (proporcionalna broju živih ćelija) biće mjerena bilježenjem promjene apsorpcije na 570 nm pomoću spektrofotometra. Formazan ima tendenciju taloženja unutar ćelija i u medijumu kulture, te će biti rastvoren prije mjerenja apsorpcije (20).

ii. Ispitivanje uticaja izrađenog preparata na ekspresiju gena *COL1A1* i *MMP1*

U cilju utvrđivanja da li izrađeni preparat utiče na transkripciju gena *COL1A1* i *MMP1*, podjednak broj uzoraka dermalnih fibroblasta tretiranih izrađenim preparatom i uzoraka dermalnih fibroblasta koji nijesu tretirani izrađenim preparatom će biti podvrgnuti izolovanju RNK, a zatim će biti sprovedena RT-PCR.

Ekstrakcija RNK iz uzoraka dermalnih fibroblasta će biti sprovedena koristeći komercijalno nabavljeni Trizol reagens (500 µl) – monofazni rastvor fenola i gvanidinijum izotiocijanata, koji će istovremeno rastvoriti biološke materije i denaturisati proteine. Nakon homogenizacije, biće dodat hloroform (100 µl), koji će uzrokovati razdvajanja faza, pri čemu će se proteini nalaziti u hidrofobnoj fazi, DNK na granici faza, a RNK u hidrofilnoj fazi (21). Sljedeći korak će biti taloženje uzoraka na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Nakon toga, RNK talog će biti odvojen centrifugiranjem pri 12,000×g 10 minuta na 4 °C i ispran sa 1 mL 70% hladnog etanola. Nakon centrifugiranja (7500×g 5 minuta na 4 °C), uzorci će biti sušeni na vazduhu, a talozi rastvoreni u vodi oslobođenoj RNAza. Zatim će uslijediti reverzna transkripcija: cDNA će biti sintetisana u reakcionoj smješi od 20 µl, koja će sadržati RNA (1 µg), oligo (dT) prajmer (1 µl), reakcioni puffer (4 µl), inhibitor RNAza (1 µl), 10 mM dNTP smješe (2 µl) i M-MuLV reverznu transkriptazu (1 µl). Nakon reverzne transkripcije uslijediće *real-time* PCR. *Real-time* PCR (qPCR) je metoda izbora za kvantifikaciju ekspresije gena. Za detekciju proizvoda qPCR-a biće korišćena DNK sonda koja funkcioniše po principu generisanja fluorescentnog signala. Reakciona smješa za PCR će se sastojati od cDNA uzorka (0.5 µL, odnosno oko 5-10 ng), 10 µL *SYBR GREEN master mix* (sastav: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 400 µM dNTP, 0.1 U/µl Taq DNK polimeraza, 1x SYBR zeleno i puferska komponenta) i 0.5 µL (600 nM) svakog *reverse* i *forward* prajmera gena *MMP1* (F: 5'-GTACTGATATAATTTAGTTC-3', R: 5'-GTTATCCCTTGCCCTATCTAG-3', temperatura 45°C) i *COL1A1* (F: 5'-GACGAAGACATCCCACCAAT-3', R: 5'-TCGGTGGGTGACTCTGAG-3', temperatura 57.90°C). PCR će biti sproveden u sljedećim koracima: denaturacija na temperaturi od 95°C tokom 5 minuta, komplementarno vezivanje prajmera (*annealing*), te produžavanje lanca na temperaturi od 72°C (18). Relativna kvantifikacija će

biti sprovedena u cilju analiza podataka.

iii. Ispitivanje uticaja izradenog preparata na količinu tip I kolagena i MMP-1

Koristeći Western blot metodu biće određena količina kolagena tip I i matriksne metaloproteinaze-1 u uzorcima dermalnih fibroblasta nakon tretiranja uzoraka izradenim preparatom. Čelije će biti lizirane puferom (100 mM Tris-HCl, pH 8, 250 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, i 1× koktel inhibitora proteaze), zatim nekoliko puta sonirane, a potom inkubirane na ledu 30 minuta, nakon čega će lizati biti centrifugirani (13000 rpm, 30 minuta na 4°C). Supernatanti će biti prikupljeni i biće određena koncentracija proteina testom bihinske kiseline. Za detekciju MMP1 i tipa I kolagena medijumi će biti sakupljeni i centrifugirani na 400×g tokom 1h na 4°C, a određivanje koncentracije proteina će biti obavljeno pomoću Bradfordove metode. Alikvoti lizata će biti razdvojeni 10% SDS-PAGE gelom i preneseni na PVDF membranu pomoću pufera za transfer na bazi glicina (192 mM glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20% v/v metanol). Nakon blokiranja sa 5% obranim mlijekom preko noći na 4°C, membrane će biti inkubirane sa primarnim antitijelima 1 sat na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4°C, a zatim 1 sat sa sekundarnim antitijelima. Primarna antitijela (anti-MMP-1 i anti-Col1A1) će biti razrijeđena 1:1000, a sekundarna antitijela 1:10.

iv. Ispitivanje antielastazne aktivnosti izradenog preparata

Za ispitivanje antielastazne aktivnosti izradenog preparata biće korišćena komercijalno nabavljena svinjska pankreasna elastaza i supstrat N-sukcinil-tri-L-alanin-4-nitroanilid. Elastaza će razložiti supstrat, pri čemu će se osloboditi nitroanilin. Reakcija će biti sprovedena pod eksperimentalnim uslovima: pH 8.0, 0.8 mM supstrata i 5 µg/ml elastaze. Različite količine izradenog preparata će biti dodavane reakcionoj smješi, a mjerenje apsorbance će biti sprovedeno na čitaču mikrotitar ploča sa 96 udubljenja na 25°C i pri 410 nm. Step en inhibicije elastaze će biti određen mjerenjem razlike u absorbanci uzorka sa i bez izradenog preparata sa etarskim uljem pelima (16).

Podaci će biti prikazani tekstualno, tabelarno i grafički, uz upotrebu MS Excela, dok će statističke analize biti izvršene pomoću softvera GraphPad.

B4. Naučni doprinos

Iako je uloga pelima u herbalnoj medicini dobro poznata i dokumentovana, dosadašnja istraživanja su uglavnom bila usmjerena na proučavanje antimikrobnog, antiinflamatornog, antioksidativnog i antitumorskog djelovanja etarskog ulja pelima, dok uticaj preparata sa etarskim uljem pelima na procese zarastanje rana i starenja kože nije dovoljno ispitan.

Važno je naglasiti da su prethodna istraživanja pelima u Crnoj Gori uglavnom bila usmjerena na određivanje hemijskog sastava etarskog ulja i identifikaciju hemotipova koji se javljaju u crnogorskoj populaciji. Međutim, fokus dosadašnjih istraživanja nije bila formulacija preparata za primjenu na koži, niti proučavanje kako specifični hemijski sastav etarskog ulja pelima iz Crne Gore može uticati na terapijsku primjenu ovih preparata.

Rezultati istraživanja će pružiti bolje razumijevanje procesa zarastanja rana i starenja kože na molekularnom nivou, te doprinijeti preliminarnoj procjeni efekta preparata sa etarskim uljem pelima na profil ekspresije gena u humanim fibroblastima.

Sve navedeno će doprinijeti potencijalnom proširenju terapijskih indikacija etarskog ulja pelima i omogućiti bolje razumijevanje farmaceutsko-tehnološkog postupka formulacije preparata sa

etarskim uljem pelima.

B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja

Kandidat će troškove istraživanja finansirati lično iz sopstvenih prihoda, pošto Medicinski fakultet u Podgorici ne posjeduje aparaturu kao ni hemikalije za sprovođenje planiranih istraživanja.

B6. Spisak referenci

1. World Flora Online. (2023). *Salvia officinalis* L. Preuzeto sa internet adrese: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000301765>.
2. Damjanovic-Vratnica, B., Dakov, T., Šukovic, D., & Damjanovic, J. (2008). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Wild-Growing *Salvia officinalis* L. from Montenegro. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1), 79–89. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643602>
3. Tucakov, J. (1984). *Lečenje Biljem*. Beograd, Srbija: Izdavačka radna organizacija “RAD”.
4. EMA, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2016). *EMA/HMPC/277152/2015 European Union herbal monograph on Salvia officinalis L., folium*. Preuzeto sa internet adrese: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-salvia-officinalis-l-folium-revision-1_en.pdf
5. Stojanović, D. (2014). *Starost i poreklo populacija vrste Salvia officinalis L. (Lamiaceae) u centralnom delu Balkanskog poluostrva – morfometrijski i molekularni pokazatelji* (doktorska disertacija). Univerzitet u Beogradu. Beograd.
6. Stešević, D., Ristić, M., Nikolić, V., Nedović, M., Čaković, D., & Šatović, Z. (2014). Chemotype diversity of indigenous Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) populations in Montenegro. *Chemistry & biodiversity*, 11(1), 101-114. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300233>
7. Couladis, M., Tzakou, O., Mimica-Dukić, N., Jančić, R., & Stojanović, D. (2002). Essential oil of *Salvia officinalis* L. from Serbia and Montenegro. *Flavour and fragrance journal*, 17(2), 119-126. <https://doi.org/10.1002/ffj.1065>
8. Damjanovic-Vratnica, B., Dakov, T., Šukovic, D., & Damjanovic, J. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild-growing *Salvia officinalis* L. from Montenegro. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1), 79-89. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643602>
9. Ghorbani, A., & Esmacilizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>
10. Keshavarz, M., Mostafaie, A., Mansouri, K., Bidmeshkipour, A., Motlagh, H. R. M., & Parvaneh, S. (2010). In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytotherapy research*, 24(10), 1526-1531. <https://doi.org/10.1002/ptr.3168>
11. Farahpour, M. R., Pirkhezr, E., Ashrafi, A., & Sonboli, A. (2020). Accelerated healing by topical administration of *Salvia officinalis* essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infected wound model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110120>
12. Karimzadeh, S., & Farahpour, M. R. (2017). Topical application of *Salvia officinalis* hydroethanolic leaf extract improves wound healing process. *Indian Journal of Experimental Biology*, 55(2), 98-106.
13. Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., Lončarić, M., Carović-Stanko, K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I. & Šatović, Z. (2015). Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agriculturae Conspectus*

Scientificus, 80(2), 69-78.

14. Güzel, S., Özay, Y., Kumaş, M., Uzun, C., Özkorkmaz, E. G., Yıldırım, Z., Ülger, M., Gülerh, G., Çelikh, A., Çamlıca, Y. & Kahraman, A. (2019). Wound healing properties, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia kronenburgii* Rech. f. and *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* on excision and incision wound models in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 1260-1276. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.038>
15. Khare, R., Upmanyu, N., & Jha, M. (2021). Exploring the potential effect of Methanolic extract of *Salvia officinalis* against UV exposed skin aging: In vivo and In vitro model. *Current Aging Science*, 14(1), 46-55. <https://doi.org/10.2174/1874609812666190808140549>
16. Tran, T. A., Ho, M. T., Song, Y. W., Cho, M., & Cho, S. K. (2015). Camphor Induces Proliferative and Anti-senescence Activities in Human Primary Dermal Fibroblasts and Inhibits UV-Induced Wrinkle Formation in Mouse Skin. *Phytotherapy Research*, 29(12), 1917–1925. <https://doi.org/10.1002/ptr.5484>
17. Lago, J. C., & Puzzi, M. B. (2019). The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLOS ONE*, 14(7), e0219165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219165>
18. Lee YH, Seo EK, Lee ST. (2019). Skullcapflavone II Inhibits Degradation of Type I Collagen by Suppressing MMP-1 Transcription in Human Skin Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2734. <https://doi.org/10.3390/ijms20112734>
19. Cruz, A. M., Gonçalves, M. C., Marques, M. S., Veiga, F., Paiva-Santos, A. C., & Pires, P. C. (2023). In Vitro Models for Anti-Aging Efficacy Assessment: A Critical Update in Dermocosmetic Research. *Cosmetics*, 10(2), 66. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10020066>
20. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Preuzeto sa internet adrese: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
21. Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
22. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Mišljenje i prijedlog komisije

Na osnovu uvida priložene dokumentacije i detaljne analize iste od strane komisije, izlaganja kandidata, diskusije, komisija je zaključila da je predložena tema naučno opravdana i originalna, plan istraživanja je precizno postavljen i definisan, metodologija je precizna i jasna. Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta i Senatu Univerziteta Crne Gore da prihvate ovaj Izvještaj i odobre nastavak istraživačkog rada na doktorskoj disertaciji dr pharm Miloša Luburića.

Prijedlog izmjene naslova

/

Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora

/



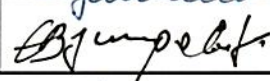


Planirana odbrana doktorske disertacije

2025. godina ljetnji semestar

Izdvojeno mišljenje

(popuniti ukoliko neki član komisije ima izdvojeno mišljenje)

Ime i prezime

Napomena		
/		
ZAKLJUČAK		
Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija.	DA	NE
Tema je originalan naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije.	DA	NE
Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze.	DA	NE
Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata		
dr Ljiljana Vučković – vanredna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, predsjednik		
dr Tanja Vojinović – docentkinja Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član		
dr Mihailo Vukmirović – docent Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član		
U Podgorici, 25.12.2023. godine		 DEKAN

PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PRIJAVE DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA	
dr Ljiljana Vučković – vanredna profesorica Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, predsjednik	Zašto je za sakupljanje biljnog materijala vrste <i>Salvia officinalis</i> izabran lokalitet Paštrovačka gora, u blizini Petrovca? Na koji način će se vršiti formulacija i ispitivanje preparata? Zašto ste se odlučili za predloženu metodologiju i kako će biti sprovedeno praktično izvođenje?
dr Tanja Vojinović – docentkinja Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član	/
dr Mihailo Vukmirović – docent Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, član	Da li će se vršiti upoređivanje rezultata hemijske analize etarskog ulja pelima sa hemijskim sastavom etarskog ulja pelima sa drugih lokaliteta?
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	/
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	
/	



MEDICINSKI FAKULTET			
Prijava	Broj	Prilog	Vrijednost
med	190417-2		

UNIVERZITET CRNE GORE
Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	dr pharm Miloš Luburić
Fakultet	Medicinski Fakultet
Studijski program	Farmacija
Broj indeksa	12/21
Ime i prezime roditelja	Milutin Luburić
Datum i mjesto rođenja	04.11.1996. Bar, Crna Gora
Adresa prebivališta	Petrovac, Blok II bb
Telefon	069066533
E-mail	milosluburic@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	<ul style="list-style-type: none">• Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore, studijski program Farmacija, jul 2020., srednja ocjena 9.08• Srednja škola, Gimnazija „Niko Rolović“ Bar, jun 2015., srednja ocjena 5.00• Osnovna škola „Mirko Srzentić“ Petrovac, jun 2011., srednja ocjena 5.00
Radno iskustvo	<ul style="list-style-type: none">• Institut za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore, Inspektorat (maj 2021. – trenutno)• PZU Pharmadiskont, pripravnički staž (oktobar 2020. – maj 2021.)
Popis radova	Barlović A, Burić V, Luburić M, Ognjenović N, Bojović D. Ljekovite biljke Bjelasice, III Kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, Bečići, Crna Gora, 2019.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Formulacija i farmaceutsko-tehnološko ispitivanje polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima (<i>Salvia officinalis</i> L.) iz Crne Gore i procjena njegovog uticaja na procese zarastanja rana i starenja kože
Na engleskom jeziku	Formulation and pharmaceutical-technological study of a semi-solid preparation containing essential oil of sage (<i>Salvia officinalis</i> L.) from Montenegro and evaluation of its effect on wound healing and skin aging processes
Obrazloženje teme	
<p><i>Salvia officinalis</i> L. (pelim, žalfija, kadulja) je višegodišnji polužbun koji pripada rodu <i>Salvia</i>, porodici <i>Lamiaceae</i> (1). Vrsta vodi porijeklo iz Mediterana, a u Crnoj Gori je široko rasprostranjena, naročito u primorskom i submediteranskom dijelu zemlje(2).</p> <p>Pelim se u medicinske svrhe koristi od davnina. Najveći sadržaj etarskog ulja se nalazi u listu, a prema Tucakovu, najčešće tradicionalne primjene preparata od pelima su ispiranje usta i grla prilikom upala, protiv znojenja tuberkuloznih pacijenata, jačanje organizma, te kao sastojak čaja protiv upale mokraćnih puteva (3). Herbalna monografija Evropske agencije za lijekove navodi četiri indikacije tradicionalne upotrebe lista pelima: olakšanje blagih simptoma dispepsije, kao što</p>	

su gorušica i nadimanje; olakšanje prekomjernog znojenja; olakšanje upala u ustima i grlu; olakšanje manjih upala kože (4).

Predmet dosadašnjih istraživanja etarskog ulja pelima je najčešće bila opravdanost tradicionalne upotrebe, dok će ovo istraživanje pružiti dublje razumijevanje mogućeg uticaja polučvrstih preparata koji sadrže etarsko ulje pelima na procese zarastanja rana i starenja kože. Rezultati istraživanja bi doprinijeli preliminarnoj procjeni potencijala primjene preparata u svrhu zarastanja rana i *anti-age* terapije.

Dodatno, prethodna istraživanja pelima u Crnoj Gori su uglavnom bila usmjerena na analizu hemijskog sastava etarskog ulja i identifikaciju hemotipova koji se javljaju u Crnoj Gori, ali fokus istraživanja nije bio na razvoju preparata namijenjenih primjeni na koži, niti je ispitivano kako sastav etarskog ulja utiče na proces formulacije preparata i područje terapijske primjene.

Pregled istraživanja

Salvia officinalis L. je višegodišnji poluzbun, visok 50-90 cm. Stabljika je drvenasta, višegodišnja i četvorouglasta. Starije grane su razgranate, polegale ili se uzdižu. Kora je sivo mrka i ljušti se. Jednogodišnji izdanci su sivo-zeleni, pokriveni bijelim mehaničkim i žljezdanim dlakama i uzdižu se. Listovi su naspramno raspoređeni, sa lisnom drškom koja je duga 0-3 cm. Liska je izduženo jajasta, eliptična do lancetasta, dugačka 2 – 9 cm, široka do 3.5 cm, pri osnovi zaokrugljena, okrugla ili zašiljena na vrhu, papirnata, fino nabrana, nazubljene ivice. Mlade liske su prekrivene velikim brojem dlaka, dok su razvijene liske na licu slabije dlakave a na naličju gušće dlakave. Cvjetovi su plavo-ljubičasti, dvousnati i nalaze se u pršljenovima (4 – 16 cvjetova u pršljenu), koji formiraju terminalni prividni grozd. Plod je merikarpium od 4 tamno smeđa loptasta orašića, veličine 2-3 mm u dijametri. Biljka cvjeta u periodu od maja do jula (1, 3, 5).

Najveća koncentracija etarskog ulja se nalazi u listovima biljke. Pretragom literature moguće je zaključiti da postoji variranje u rezultatima istraživanja vezano za prinos etarskog ulja iz listova. Prema Stešević i saradnicima, prinos se kreće u opsegu od 1.84% do 2.84% (6), prema Couladis i saradnicima u opsegu od 1.16% do 1.68% (7), a rezultat istraživanja koje su sproveli Damjanović Vratnica i saradnici je 2.4% prinosa etarskog ulja (8). Glavni sastojci etarskog ulja pelima sa staništa u Crnoj Gori su: cis-tujon, trans-tujon, kamfor, kamfen, 1,8-cineol, viridiflorol, limonen, apinen i alfa-humulen (6).

Pregledom literature konstatovano je da postoje dokazi o antikancerogenom, antiinflamatornom, antinociceptivnom, antioksidativnom, antimikrobnom, hipoglikemijskom, hipolipidemijskom dejstvu preparata na bazi pelima. Antinociceptivni, hipolipidemijski i efekat poboljšanja pamćenja su dokazani u kliničkim ispitivanjima (9).

Keshavarz i saradnici su ukazali na antiangiogenetsko dejstvo etarskog ulja pelima (10), a Farahpour, Karimzadeh i saradnici na poboljšano zarastanje rana nakon topikalne primjene polučvrstih preparata sa etarskim uljem pelima sa staništa u Iranu (u koncentracijama od 1% do 5%) (11, 12). Dodatno, Grdiša i saradnici navode istorijsku primjenu pelima za liječenje rana (13). Güzel i saradnici su dokazali pozitivan uticaj preparata sa etarskim uljem vrsta iz roda *Salvia*, *Salvia kronenburgii* Rech. f. i *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* na zarastanje rana (14).

Rezultati istraživanja koje su sproveli Khare i saradnici upućuju na to da postoje preliminarni podaci o djelotvornosti etarskog ulja pelima sa staništa Indije na proces starenja kože izloženoj UV zracima (15). Tran i saradnici su dokazali da kamfor indukuje proliferaciju primarnih humanih dermalnih fibroblasta, smanjuje aktivnost β -galaktozidaze, inhibira aktivnost elastaze, te povećava ukupnu količinu kolagena u kulturi dermalnih fibroblasta (16).

Geni koji imaju najveći uticaj na proces starenja kože su geni zaduženi za sintezu kolagena (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL4A1* i *COL7A1*), geni koji kodiraju sintezu enzima koji

razgrađuju proteine ekstracelularnog matriksa (*MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13 i MMP14*), geni zaduženi za inhibiciju metaloproteinaza (*TIMP1, TIMP2, TIMP3 i TIMP4*), geni koji učestvuju u inflamatornim procesima (*IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 i PTGS2*), kao i *TP53* (marker ćelijske diobe), *CASP3* (ima ulogu u procesu apoptoze), *LMNA* (učestvuje u prijevremenom starenju), te *SIRT1* (značajan za dugovječnost i starenje) (17). Matriksne metaloproteinaze su cink zavisne endopeptidaze koje imaju značajnu ulogu u procesima zarastanja rana i starenja kože iz razloga što doprinose cijepanju komponenti ekstracelularnog matriksa, uključujući kolagen (18). Ekspresija matriksne metaloproteinaze-1 (*MMP-1*) je izuzetno visoka čak i u nestimulisanim fibroblastima, dok kolagen tip I predstavlja najzastupljeniji tip kolagena u ljudskom organizmu, te će naše istraživanje obuhvatiti ispitivanje uticaja izrađenog preparata na ekspresiju gena *MMP1* i *COL1A1*, kao i na količinu *MMP1* i tip 1 kolagena.

Antioksidativna, antielastazna, antihijaluronidazna, antikolagenazna, i antitirozinazna aktivnost su od esencijalnog značaja u procjeni uticaja na proces starenja kože (19, 20, 21). Naše istraživanje će obuhvatiti ispitivanje antielastazne aktivnosti izrađenog preparata spektrofotometrijskim metodama.

Zaključuje se da literaturni podaci ukazuju na preliminarno postojanje pozitivnog efekta etarskog ulja pelima na procese zarastanja rana i starenja kože, ali i na potrebu za dodatnim istraživanjima koja bi doprinijela evaluaciji primjene polučvrstih preparata u te svrhe.

Cilj i hipoteze

Ciljevi:

- Izolacija i ispitivanje etarskog ulja pelima sa staništa u Crnoj Gori
- Formulacija polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima
- Ispitivanje farmaceutsko-tehnoloških karakteristika izrađenog preparata
- Ispitivanje uticaja izrađenog preparata na proces zarastanja rana
- Ispitivanje uticaja izrađenog preparata na proces starenja kože

Hipoteze:

H1: Moguće je uspješno formulisati polučvrsti preparat sa etarskim uljem pelima.

H2: Polučvrsti preparati sa etarskim uljem pelima su kvalitetni preparati za primjenu na koži.

H3: Polučvrsti preparati sa etarskim uljem pelima imaju pozitivan uticaj na proces zarastanja rana.

H4: Polučvrsti preparati sa etarskim uljem pelima imaju pozitivan uticaj na proces starenja kože.

Materijali, metode i plan istraživanja

Za postizanje navedenih ciljeva i hipoteza, istraživanje će obuhvatiti sljedeće faze:

1) Izolacija i ispitivanje etarskog ulja

U toku našeg istraživanja koristićemo etarsko ulje dobijeno parnom destilacijom iz populacija *Salvia officinalis* na lokalitetu Paštrovačka gora, u blizini Petrovca. Parna destilacija predstavlja hidrodestilaciju tokom koje će se usitnjeni biljni materijal nalaziti u kotlu na rešetki

podignutoj od dna, a vodena para dolaziti iz generatora pare smještenog izvan kotla i prolaziti kroz biljnu masu. Karakterizacija sastava eteričnog ulja vršiće se na gasnom hromatografu Shimadzu QP2020 sa SSL injektorom, kuplovanim sa tripl-kvadrupol masenim spektrometrom. Komponente će biti razdvojene na koloni ZB-5MSplus (30 m x 0,25mm; 0,25µm debljina filma) sa helijumom kao nosećim gasom. Uzorci će biti puštani po SCAN metodi pri konstantnom protoku od 2.40 ml/min, snimanjem opsega masa m/z 50-500 (EI 70eV). Program analize etarskog ulja će trajati 58 min.

Organoleptički izgled (miris, boja i homogenost uzorka) pratiće se vizuelnim pregledom ekstrakata. Za ispitivanje koristićemo identične epruvete od bezbojnog, prozirnog, neutralnog stakla. Boje su uređene posmatranjem pri difuznoj dnevnoj svjetlosti, horizontalno prema bijeloj pozadini.

2) Formulacija polučvrstog preparata sa etarskim uljem pelima.

U drugoj fazi istraživanja, sastav formulacije će biti razmotren, nakon čega će biti formulisan polučvrsti preparat, koji će sadržati 1% etarskog ulja pelima.

Planirani sastav podloge (INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) naziv):

- Stearinska kiselina 12,0 g – Stearic Acid (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Pčelinji vosak 4,0 g – Beeswax (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Bijeli vazelin 4,0 g – White Petrolatum (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Trietanolamin 10% seu 16,0 g – Triethanolamine (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Trometamol 10% - Tromethamine (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Propilenglikol 10,0 g – Propylene Glycol (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)
- Prečišćena voda 54.0 g – Purified Water (proizvođač Meilab, Beograd, Srbija)

3) Ispitivanje farmaceutsko-tehnoloških karakteristika izrađenog preparata

Treća faza istraživanja će obuhvatiti farmaceutsko-tehnološka ispitivanja, u okviru kojih će biti sprovedeno više testova, uključujući izgled formulacije, test razmazivosti, reološke karakteristike (konzistentnost i viskoznost), mjerenje pH vrijednosti, ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta, te ispitivanje stabilnosti izrađenog preparata. Ovi koraci su neophodni kako bi se osigurala adekvatna formulacija preparata i postigla stabilnost i kompatibilnost sa kožom.

Ispitivanje formulacije će obuhvatiti sljedeće testove:

- Izgled formulacije
U svrhu praćenja izgleda, boje i aplikativnih karakteristika krema sa etarskim uljem pelima biće sprovedena organoleptička ispitivanja uzoraka, inicijalno, 7 dana nakon izrade, kontrolno mjerenje nakon 1 mjeseca i poslije 3 mjeseca čuvanja na sobnoj temperaturi ($20 \pm 3^\circ\text{C}$).
- Ispitivanje razmazivosti
Ispitivanje će se vršiti ekstenziometrom tako što će se uzorak polučvrstog preparata određenog volumena postaviti između dvije staklene ploče ovog uređaja i gornjoj ploči će se povećavati težina, stavljanjem tega u određenim vremenskim intervalima.
- Ispitivanje reoloških osobina (konzistentnost i viskoznost)
U cilju dobijanja podataka koji bi ukazivali na promjene u fizičkoj stabilnosti uzoraka i sagledavanja aplikativnih karakteristika kremova sa etarskim uljem pelima, biće sprovedena reološka karakterizacija. Kontinualna reološka mjerenja biće sprovedena na reometru Paar Physica (Njemačka) primjenom kupa-ploča mjernog sistema. Sva mjerenja biće ponovljena tri puta, pod sljedećim uslovima: kupa-ploča mjerni sistem (dijametar kupe 25 mm, ugao 1°), debljina mjerenog uzorka 0,05 mm, temperatura $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$, brzina smicanja 0 do 200

s-1 (120 s, uzlazna kriva) i 200 do 0 s-1 (120 s, silazna kriva).

- Mjerenje pH vrijednosti
Mjerenje pH preparata vršiće se potenciometrijskom metodom (2.2.3. Ph. Eur. 10.0), direktnim uranjanjem elektrode pH-metra u ispitivane uzorke. Prije početka radni aparat će biti baždaren na propisan način. Oprema koja će biti korišćena je pH metar, Hanna Instruments, H 8417, SAD.
- Električna provodljivost
U cilju određivanja tipa emulzije raspodjele vode u emulzionom sistemu i praćenja promjena stabilnosti uzoraka, biće sprovedena mjerenja električne provodljivosti na uređaju Konduktometar CDM 230 (Meterlab, Radiometer, Danska). Mjerenja će biti sprovedena inicijalno 7 dana po pripremi uzoraka i nakon 1 i 3 mjeseca, direktnim uranjanjem staklene elektrode pH metra u uzorke.
- Test centrifugiranja
U cilju sveobuhvatne procjene fizičke stabilnosti ispitivanih kremova biće sproveden test centrifugiranja na centrifugi (Tehtnica, Zelezniki, Slovenija) pod sljedećim stres uslovima: 3000 obrt/min u trajanju od 15 minuta, dva puta za redom, inicijalno 7 dana po pripremi uzorka i nakon 1 i 3 mjeseca.
- Ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta biće sprovedeno određivanjem:
 - Ukupnog broja aerobnih mikroorganizama (TAMC)
 - Ukupnog broja kvasaca i plijesni (TYMC)
 - Odsustva *Staphylococcus aureus*
 - Odsustva *Pseudomonas aeruginosa*
 - Sadržaja *Endobacteria* i ostalih gram-negativnih bakterija

4) Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost pripremljenog preparata će biti ispitana *in vitro* dilucionom metodom u cilju potvrđivanja literaturnih navoda o antimikrobnoj aktivnosti preparata sa etarskim uljem pelima (22).

5) Ispitivanje dermalnih fibroblasta

Nakon farmaceutsko-tehnoloških ispitivanja, biće sprovedena procjena uticaja izrađenog polučvrstog preparata na procese zarastanja rana i starenja kože, na kulturi dermalnih fibroblasta. U toku istraživanja korišćićemo komercijalno nabavljenu kulturu humanih dermalnih fibroblasta izolovanih iz humanog epidermalnog tkiva i komercijalno nabavljeni kit za formiranje medijuma za fibroblaste.

Komercijalne kulture humanih dermalnih fibroblasta se dostavljaju u zamrznutim bočicama, u insuliranim pakovanjima namijenjenim održavanju temperaturnih uslova.

U okviru pete faze istraživanja biće sprovedena sljedeća ispitivanja:

i. Ispitivanje vijabilnosti dermalnih fibroblasta nakon primjene izrađenog preparata

Ispitivanje vijabilnosti dermalnih fibroblasta nakon primjene izrađenog preparata biće sprovedeno pomoću metode redukcije MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid). Žive ćelije s aktivnim metabolizmom pretvaraju MTT u ljubičasto obojeni formazan, s apsorpcionim maksimumom blizu 570 nm. Priprema MTT supstrata će biti izvedena u fiziološki balansiranom rastvoru, koji će biti dodat kulturi ćelija, u finalnoj koncentraciji od 0,2 - 0,5 mg/ml, te biti inkubiran 1 do 4 sata. Količina formazana (proporcionalna broju živih ćelija) biće

mjerena bilježenjem promjene apsorpcije na 570 nm pomoću spektrofotometra. Formazan ima tendenciju taloženja unutar ćelija i u medijumu kulture, te će biti rastvoren prije mjerenja apsorpcije (20).

ii. Ispitivanje uticaja izrađenog preparata na ekspresiju gena *COL1A1* i *MMP1*

U cilju utvrđivanja da li izrađeni preparat utiče na transkripciju gena *COL1A1* i *MMP1*, podjednak broj uzoraka dermalnih fibroblasta tretiranih izrađenim preparatom i uzoraka dermalnih fibroblasta koji nijesu tretirani izrađenim preparatom će biti podvrgnuti izolovanju RNK, a zatim će biti sprovedena RT-PCR.

Ekstrakcija RNK iz uzoraka dermalnih fibroblasta će biti sprovedena koristeći komercijalno nabavljeni Trizol reagens (500 μ l) – monofazni rastvor fenola i gvanidinium izotiocijanata, koji će istovremeno rastvoriti biološke materije i denaturisati proteine. Nakon homogenizacije, biće dodat hloroform (100 μ l), koji će uzrokovati razdvajanja faza, pri čemu će se proteini nalaziti u hidrofobnoj fazi, DNK na granici faza, a RNK u hidrofilnoj fazi (21). Sljedeći korak će biti taloženje uzoraka na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Nakon toga, RNK talog će biti odvojen centrifugiranjem pri 12,000 \times g 10 minuta na 4 °C i ispran sa 1 mL 70% hladnog etanola. Nakon centrifugiranja (7500 \times g 5 minuta na 4 °C), uzorci će biti sušeni na vazduhu, a talozi rastvoreni u vodi oslobođenoj RNAza. Zatim će uslijediti reverzna transkripcija: cDNA će biti sintetisana u reakcionoj smješi od 20 μ l, koja će sadržati RNA (1 μ g), oligo (dT) prajmer (1 μ l), reakcioni puffer (4 μ l), inhibitor RNAza (1 μ l), 10 mM dNTP smješe (2 μ l) i M-MuLV reverznu transkriptazu (1 μ l). Nakon reverzne transkripcije uslijediće *real-time* PCR. *Real-time* PCR (qPCR) je metoda izbora za kvantifikaciju ekspresije gena. Za detekciju proizvoda qPCR-a biće korišćena DNK sonda koja funkcioniše po principu generisanja fluorescentnog signala. Reakciona smješa za PCR će se sastojati od cDNA uzorka (0.5 μ L, odnosno oko 5-10 ng), 10 μ L SYBR GREEN *master mix* (sastav: 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dNTP, 0.1 U/ μ l Taq DNK polimeraza, 1x SYBR zeleno i puferska komponenta) i 0.5 μ L (600 nM) svakog *reverse* i *forward* prajmera gena *MMP1* (F: 5'-GTACTGATATAATTTAGTTC-3', R: 5'-GTTATCCCTTGCCTATCTAG-3', temperatura 45°C) i *COL1A1* (F: 5'-GACGAAGACATCCCACCAAT-3', R: 5'-TCGGTGGGTGACTCTGAG-3', temperatura 57.90°C). PCR će biti sproveden u sljedećim koracima: denaturacija na temperaturi od 95°C tokom 5 minuta, komplementarno vezivanje prajmera (*annealing*), te produžavanje lanca na temperaturi od 72°C (18). Relativna kvantifikacija će biti sprovedena u cilju analiza podataka.

iii. Ispitivanje uticaja izrađenog preparata na količinu tip I kolagena i MMP-1

Koristeći Western blot metodu odredićemo količinu kolagena i matriksne metaloproteinaze-1 u uzorcima dermalnih fibroblasta nakon tretiranja uzoraka izrađenim preparatom. Ćelije će biti lizirane puferom (100 mM Tris-HCl, pH 8, 250 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, i 1 \times koktel inhibitora proteaze), zatim nekoliko puta sonirane, a potom inkubirane na ledu 30 minuta, nakon čega će lizati biti centrifugirani (13000 rpm, 30 minuta na 4°C). Supernatanti će biti prikupljeni i biće određena koncentracija proteina testom biohinonske kiseline. Za detekciju MMP1 i tipa I kolagena medijumi će biti sakupljeni i centrifugirani na 400 \times g tokom 1h na 4°C, a određivanje koncentracije proteina će biti obavljeno pomoću Bradfordove metode. Alikvoti lizata će biti razdvojeni 10% SDS-PAGE gelom i preneseni na PVDF membranu pomoću pufera za transfer na bazi glicina (192 mM glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20% v/v metanol). Nakon blokiranja sa 5% obranim mlijekom preko noći na 4°C, membrane će biti inkubirane sa primarnim antitijelima 1 sat na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4°C, a zatim 1 sat sa sekundarnim antitijelima. Primarna antitijela (anti-MMP-1 i anti-Col1A1) će biti razrijeđena 1:1000, a sekundarna antitijela 1:10.

iv. Ispitivanje antielastazne aktivnosti izrađenog preparata

Za ispitivanje antielastazne aktivnosti izrađenog preparata koristićemo komercijalno nabavljenu svinjsku pankreasnu elastazu i supstrat N-sukciniil-tri-L-alanin-4-nitroanilid. Elastaza će razložiti supstrat, pri čemu će se osloboditi nitroanilin. Reakcija će biti sprovedena pod eksperimentalnim uslovima: pH 8.0, 0.8 mM supstrata i 5 µg/ml elastaze. Različite količine izrađenog preparata će biti dodavane reakcionoj smješi, a mjerenje apsorbance će biti sprovedeno na čitaču mikrotitar ploča sa 96 udubljenja na 25°C i pri 410 nm. Step en inhibicije elastaze će biti određen mjerenjem razlike u absorbanci uzorka sa i bez izrađenog preparata sa etarskim uljem pelima (16).

Podaci će biti prikazani tekstualno, tabelarno i grafički, uz upotrebu MS Excela, dok će statističke analize biti izvršene pomoću softvera GraphPad.

Očekivani naučni doprinos

Iako je uloga pelima u herbalnoj medicini dobro poznata i dokumentovana, dosadašnja istraživanja su uglavnom bila usmjerena na proučavanje antimikrobnog, antiinflamatornog, antioksidativnog i antitumorskog djelovanja etarskog ulja pelima, dok uticaj preparata sa etarskim uljem pelima na procese zarastanje rana i starenja kože nije dovoljno ispitan.

Važno je naglasiti da su prethodna istraživanja pelima u Crnoj Gori uglavnom bila usmjerena na određivanje hemijskog sastava etarskog ulja i identifikaciju hemotipova koji se javljaju u crnogorskoj populaciji. Međutim, fokus dosadašnjih istraživanja nije bila formulacija preparata za primjenu na koži, niti proučavanje kako specifični hemijski sastav etarskog ulja pelima iz Crne Gore može uticati na terapijsku primjenu ovih preparata.

Rezultati istraživanja će pružiti bolje razumijevanje procesa zarastanja rana i starenja kože na molekularnom nivou, te doprinijeti preliminarnoj procjeni efekta preparata sa etarskim uljem pelima na profil ekspresije gena u humanim fibroblastima.

Sve navedeno će doprinijeti potencijalnom proširenju terapijskih indikacija etarskog ulja pelima i omogućiti bolje razumijevanje farmaceutsko-tehnološkog postupka formulacije preparata sa etarskim uljem pelima.

Spisak objavljenih radova kandidata

Barlović A, Burić V, Luburić M, Ognjenović N, Bojović D. Ljekovite biljke Bjelasice, III Kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, Bečići, Crna Gora, 2019.

Popis literature

1. World Flora Online. (2023). *Salvia officinalis* L. Preuzeto sa internet adrese: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000301765>.
2. Damjanovic-Vratnica, B., Đakov, T., Šukovic, D., & Damjanovic, J. (2008). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Wild-Growing *Salvia officinalis* L. from Montenegro. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1), 79–89. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643602>
3. Tucakov, J. (1984). *Lečenje Biljem*. Beograd, Srbija: Izdavačka radna organizacija "RAD".
4. EMA, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2016). *EMA/HMPC/277152/2015 European Union herbal monograph on *Salvia officinalis* L., folium*. Preuzeto sa internet adrese: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-salvia-officinalis-l-folium-revision->

1_en.pdf

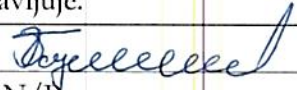
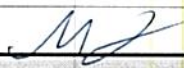
5. Stojanović, D. (2014). *Starost i poreklo populacija vrste Salvia officinalis L. (Lamiaceae) u centralnom delu Balkanskog poluostrva – morfometrijski i molekularni pokazatelji* (doktorska disertacija). Univerzitet u Beogradu. Beograd.
6. Stešević, D., Ristić, M., Nikolić, V., Nedović, M., Caković, D., & Šatović, Z. (2014). Chemotype diversity of indigenous Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) populations in Montenegro. *Chemistry & biodiversity*, 11(1), 101-114. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300233>
7. Couladis, M., Tzakou, O., Mimica-Dukić, N., Jančić, R., & Stojanović, D. (2002). Essential oil of *Salvia officinalis* L. from Serbia and Montenegro. *Flavour and fragrance journal*, 17(2), 119-126. <https://doi.org/10.1002/ffj.1065>
8. Damjanovic-Vratnica, B., Đakov, T., Šukovic, D., & Damjanovic, J. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild-growing *Salvia officinalis* L. from Montenegro. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1), 79-89. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643602>
9. Ghorbani, A., & Esmacilizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>
10. Keshavarz, M., Mostafaie, A., Mansouri, K., Bidmeshkipour, A., Motlagh, H. R. M., & Parvaneh, S. (2010). In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytotherapy research*, 24(10), 1526-1531. <https://doi.org/10.1002/ptr.3168>
11. Farahpour, M. R., Pirkhezr, E., Ashrafiyan, A., & Sonboli, A. (2020). Accelerated healing by topical administration of *Salvia officinalis* essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infected wound model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110120>
12. Karimzadeh, S., & Farahpour, M. R. (2017). Topical application of *Salvia officinalis* hydroethanolic leaf extract improves wound healing process. *Indian Journal of Experimental Biology*, 55(2), 98-106.
13. Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., Lončarić, M., Carović-Stanko, K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I. & Šatović, Z. (2015). Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 80(2), 69-78.
14. Güzel, S., Özay, Y., Kumaş, M., Uzun, C., Özkorkmaz, E. G., Yıldırım, Z., Ülger, M., Gülerh, G., Çelikh, A., Çamlıca, Y. & Kahraman, A. (2019). Wound healing properties, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia kronenburgii* Rech. f. and *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* on excision and incision wound models in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 1260-1276. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.038>
15. Khare, R., Upmanyu, N., & Jha, M. (2021). Exploring the potential effect of Methanolic extract of *Salvia officinalis* against UV exposed skin aging: In vivo and In vitro model. *Current Aging Science*, 14(1), 46-55. <https://doi.org/10.2174/1874609812666190808140549>
16. Tran, T. A., Ho, M. T., Song, Y. W., Cho, M., & Cho, S. K. (2015). Camphor Induces Proliferative and Anti-senescence Activities in Human Primary Dermal Fibroblasts and Inhibits UV-Induced Wrinkle Formation in Mouse Skin. *Phytotherapy Research*, 29(12), 1917–1925. <https://doi.org/10.1002/ptr.5484>
17. Lago, J. C., & Puzzi, M. B. (2019). The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLOS ONE*, 14(7), e0219165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219165>
18. Lee YH, Seo EK, Lee ST. (2019). Skullcapflavone II Inhibits Degradation of Type I Collagen by Suppressing MMP-1 Transcription in Human Skin Fibroblasts. *International*

Journal of Molecular Sciences, 20(11), 2734. <https://doi.org/10.3390/ijms20112734>

19. Cruz, A. M., Gonçalves, M. C., Marques, M. S., Veiga, F., Paiva-Santos, A. C., & Pires, P. C. (2023). In Vitro Models for Anti-Aging Efficacy Assessment: A Critical Update in Dermocosmetic Research. *Cosmetics*, 10(2), 66. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10020066>
20. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Preuzeto sa internet adrese: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
21. Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
22. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.

Prvi mentor	Doc. dr Tanja Vojinović	
Drugi mentor	N/P	N/P
Doktorand	Miloš Luburić	

IZJAVA

Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nijesam prijavio ni na jednom drugom fakultetu.

U Podgorici,
25.12.2023. godine

Ime i prezime doktoranda

Miloš Luburić

