

# Topikalna primjena ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.)

---

**Dorić, Paula**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:150255>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Paula Dorić

Topikalna primjena ružmarina (*Salvia  
rosmarinus* Spenn.)

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Opći botanički podatci .....	1
1.2. Bioaktivne sastavnice ružmarina.....	2
1.2.1. Polifenoli .....	3
1.2.2. Terpeni .....	4
1.3. Eterično ulje ružmarina .....	5
1.4. Tradicionalna upotreba.....	6
1.5. Antioksidativni učinak ružmarina .....	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	11
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	12
4.1. Upotreba ružmarina u liječenju alopecije.....	12
4.1.1. Alopecija.....	12
4.1.2. Ispitivanja topikalne primjene ružmarina u liječenju alopecije.....	14
4.2. Uporaba ružmarina u liječenju atopijskog dermatitisa.....	18
4.2.1. Atopijski dermatitis .....	18
4.2.2. Ispitivanja topikalne primjene ružmarina u liječenju atopijskog dermatitisa.....	19
4.3. Protuupalna topikalna primjena ružmarina .....	20
4.3.1. Upala .....	20
4.3.2. Ispitivanja protuupalne topikalne primjene ružmarina.....	21
4.4. Upotreba ružmarina za cijeljenje rana.....	25
4.4.1. Cijeljenje rana .....	25
4.4.2. Ispitivanja primjene ružmarina za cijeljenje rana.....	25
4.5. Upotreba ružmarina u sprječavanju starenja kože.....	32
4.5.1. Starenje kože.....	32
4.5.2. Ispitivanja primjene ružmarina u prevenciji starenja kože.....	33
4.6. Pregled mehanizama djelovanja u podlozi topikalnih učinaka ružmarina.....	41
5. ZAKLJUČCI.....	45
6. LITERATURA .....	47
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	53
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	55

# 1. UVOD

## 1.1. Opći botanički podatci

Ružmarin (*Salvia rosmarinus* Spenn. syn. *Rosmarinus officinalis* L.; Slika 1) je zimzeleni grm koji može narasti do 2 metra visine (Grlić, 2005). Jednostavni listovi su linearni i vrlo uski, duljine 2-3 centimetra, posloženi nasuprotno na četverobridnoj stabljici. Na licu su glatki i kožasti tamnozeleno boje, dok je naličje sivkasto zbog dlaka i žlijezda s eteričnim uljem, a na rubovima su blago savijeni. Cvijet je modroljubičast, sastavljen od pet latica sraslih u cijev od kojih su dvije razdijeljene u oblik usana. Cvate već od veljače, a nekada čak i cijele godine. Biljku možemo prepoznati i po vrlo aromatičnom eteričnom ulju koje joj daje karakterističan oštar miris. Eterično ulje izlučuje se u žljezdastim dlakama koje se nalaze na listovima (Grlić, 2005).



Slika 1. Morfološka obilježja biljne vrste *Salvia rosmarinus* Spenn. (preuzeto s <https://alternativa-za-vas.com/>)

Već po nekim morfološkim karakteristikama jasno je da ružmarin spada u porodicu Lamiaceae (= Labiatae) ili usnače. Ovaj naziv su dobile upravo zbog već gore opisanog cvijeta koji je srastao tako da čini oblik usana. Ova porodica je jedna od većih i obuhvaća vrlo velik broj rodova i oko 7000 biljnih vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu (Andrade i sur., 2018). U Tablici 1 prikazana je taksonomija vrste *S. rosmarinus*.

Stari znanstveni naziv ružmarina bio je *Rosmarinus officinalis* L. što je podrazumijevalo da je to predstavnik roda *Rosmarinus*, ali u nedavnoj filogenetskoj analizi taj je rod zbog srodnosti uvršten u rod *Salvia* te je novi naziv *Salvia rosmarinus* Spenn. (Hong Wu i sur., 2021).

Tablica 1. Taksonomija vrste *Salvia rosmarinus*.

Carstvo	Viridiplantae - zelene biljke
Infracarstvo	Streptophyta - Embryophyta - kopnene biljke
Divizija	Tracheophyta - vaskularne biljke
Poddivizija	Spermatophyta - sjemenjače
Koljeno	Angiospermae - kriosjemenjače
Razred	Magnoliopsida - dvosupnice
Red	Lamiales – medicolike
Porodica	Lamiaceae – usnače
Potporodica	Nepetoideae
Tribus	Mentheae
Pottribus	Salviinae
Rod	<i>Salvia</i>
Vrsta	<i>Salvia</i> subgen. <i>rosmarinus</i>

Iako je primarno stanište ružmarina područje Mediterana, zbog svoje prilagodljivosti vremenskim i okolišnim uvjetima ovu biljku danas nalazimo široko rasprostranjenu po cijelom svijetu (Grlić, 2005). Rado se kultivira i uzgaja kao ukrasna biljka, zbog svoje upotrebe kao začim, u industriji, ali i u terapijske i kozmetičke svrhe.

## 1.2. Bioaktivne sastavnice ružmarina

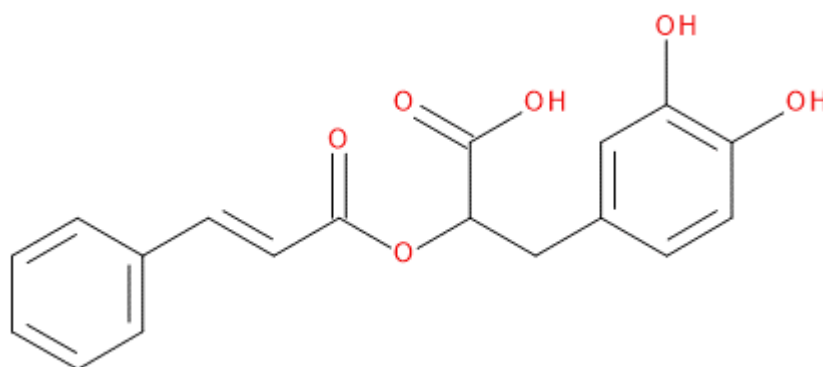
Najvažnije sastavnice biljne vrste *S. rosmarinus* su polifenoli i terpeni (Oalđe Pavlović i sur., 2021). Izolacija bioaktivnih sastavnica uvelike ovisi o metodi i otapalu korištenom za ekstrakciju. Najčešće korištene metode su maceracija, destilacija i ekstrakcija superkritičnim fluidom (Andrade i sur., 2018). S obzirom da se biljne droge vrlo često koriste u obliku tinktura i čajeva, voda i etanol nametnuli su se kao logični izbori otapala pri ekstrakciji, dok se metanol koristi zbog dokazane dobre ekstrakcije spojeva s antioksidativnim djelovanjem (Oalđe Pavlović i sur., 2021). Osim razlika u metodama ekstrakcije, razlike u sastavu mikro i makronutrijenata biljke ovise i o razlikama u uvjetima rasta, sastavu tla, klimatskim razlikama te geografskim posebnostima (Ribeiro-Santos i sur., 2019).

Prema 10. izdanju Europske farmakopeje listovi ružmarina moraju sadržavati najmanje 12 mililitara eteričnog ulja po kilogramu droge, te minimalno 3 % hidrosicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina.

### 1.2.1. Polifenoli

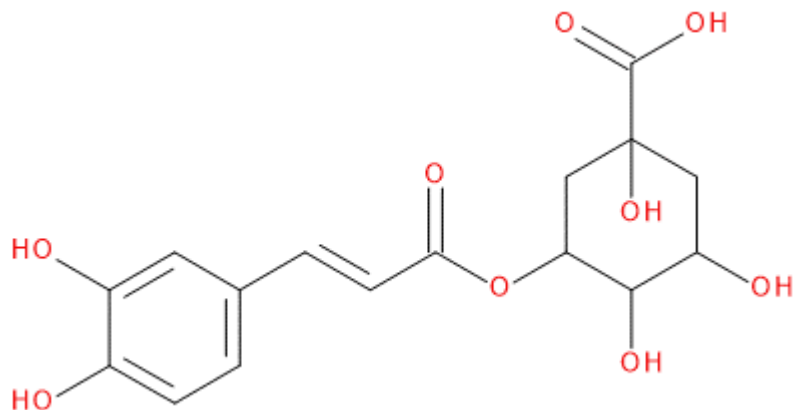
Polifenoli su glavna sastavnica ružmarina te su odgovorni za njegovu antioksidativnu aktivnost. Nedavno je provedeno istraživanje u kojem su iz ružmarina uzgojenog na Institutu za ljekovito bilje u Pančevu (Srbija), pripremljeni metanolni, etanolni i vodeni ekstrakti te su analizirani na ukupni udio polifenola, udio polifenolnih kiselina, ukupnih flavonoida i flavonola koji su izraženi kao ekvivalenti standarda po gramu suhog ekstrakta (Oalđe Pavlović i sur., 2021). Udio ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu ružmarina bio je  $79,40 \pm 3,78$  mg/g, u etanolnom ekstraktu  $70,30 \pm 1,52$  mg/g, a u vodenom ekstraktu  $74,22 \pm 1,39$  mg/g. Što se tiče sadržaja polifenolnih kiselina on je bio najveći u etanolnom ekstraktu ( $67,89 \pm 1,92$  mg/g), a slijedili su metanolni i vodeni ekstrakti s koncentracijama  $58,26 \pm 8,34$  mg/g i  $40,48 \pm 2,31$  mg/g (Oalđe Pavlović i sur., 2021).

Od fenolnih kiselina prisutnih u ružmarinu ističe se ružmarinska kiselina (Slika 2) koja je karakteristična za porodicu Lamiaceae, a za koju su dokazana protuupalna i antioksidativna svojstva (Malvezzi de Macedo i sur., 2020). Osim nje, u listovima ružmarina nalazimo i klorogensku kiselinu (Slika 3) i kavenu kiselinu (Slika 4). Kavena kiselina je derivat hidrosicimetne kiseline, dok je klorogenska kiselina zapravo ester kavene i kina kiseline (Vladimir-Knežević, 2021).

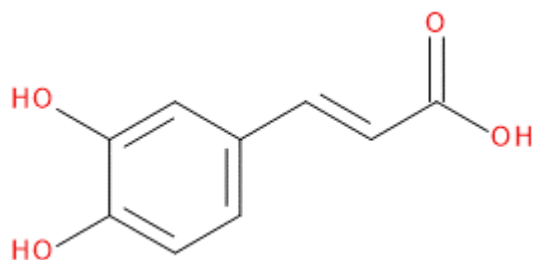


Slika 2. Kemijska struktura ružmarinske kiseline

Od ostalih polifenola prisutnih u ružmarinu ističu se derivati luteolina, a jedna studija je pokazala i vrlo visok sadržaj rutina u vodenom ekstraktu ružmarina od 10,84 mg/g suhe tvari (Oalđe Pavlović i sur., 2021).



Slika 3. Kemijska struktura klorogenske kiseline

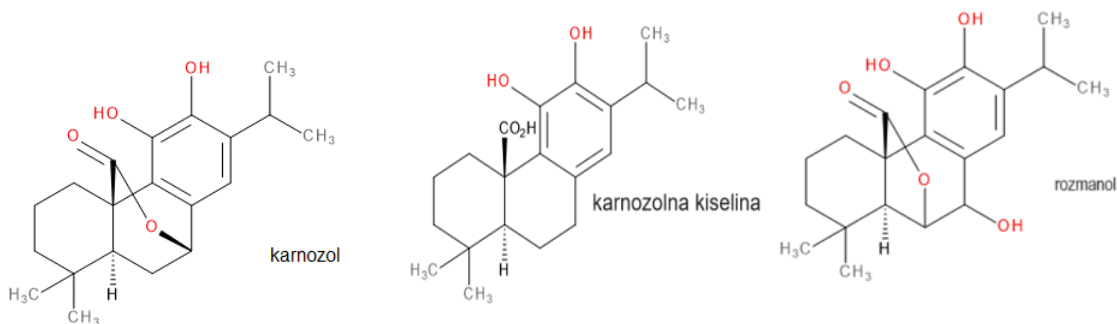


Slika 4. Kemijska struktura kavene kiseline

### 1.2.2. Terpeni

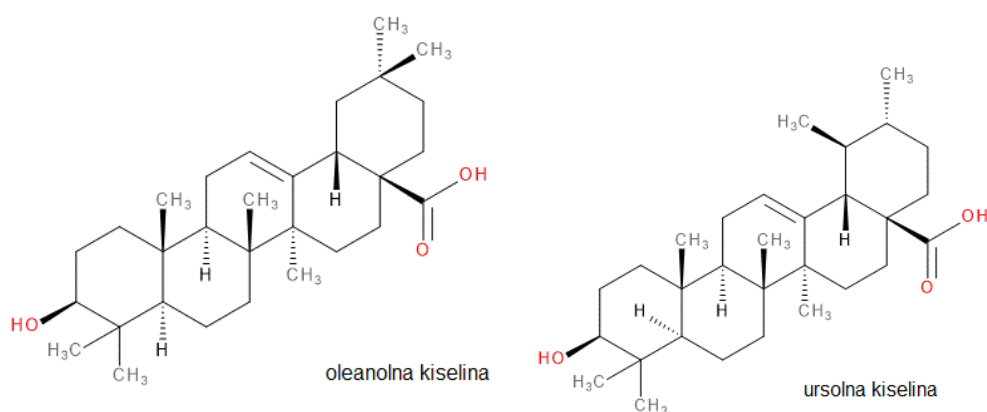
Terpeni su velika skupina spojeva koja se dijeli na mono-, di-, tri- i seskviterpene, ovisno o broju atoma u molekuli, odnosno o broju izoprenskih jedinica od kojih je molekula sastavljena (Vladimir-Knežević, 2021). U ružmarinu su najzastupljeniji karnozol i karnozolna kiselina te rozmanol i njegov izomer epirozmanol koji po svojoj strukturi spadaju u tricikličke diterpene (Vladimir-Knežević, 2021; Slika 5).





Slika 5. Kemijske strukture tricikličkih diterpena iz ružmarina

Od triterpena u ružmarinu najzastupljenije se ursolna kiselina i oleanolna kiselina (Slika 6) koje su zaslužne za jaki protuupalni učinak posebice zajedno s karnozolom i karnozolnom kiselinom s kojima djeluju sinergistički (Altinier i sur., 2007; de Macedo i sur., 2020).

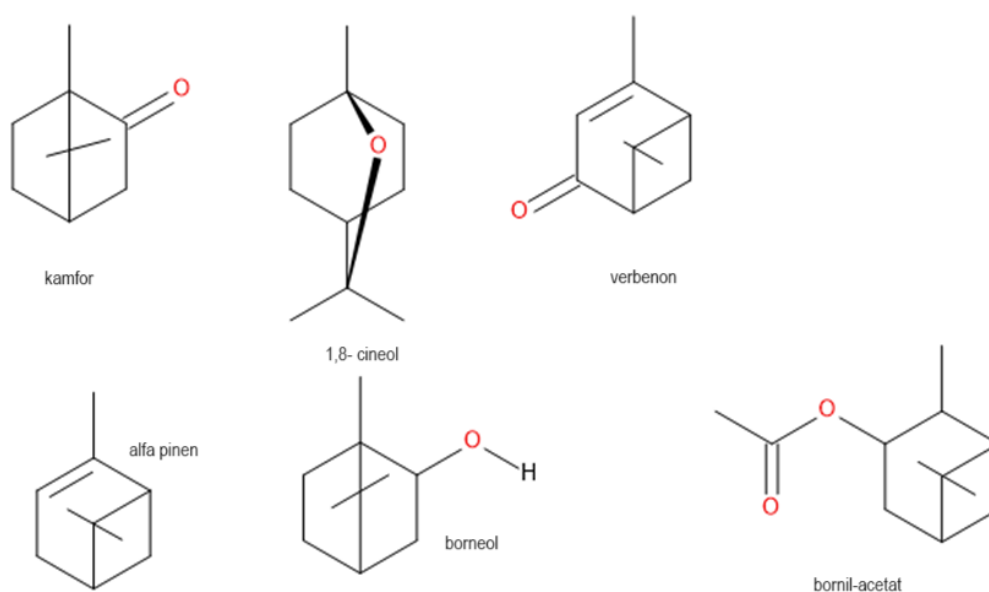


Slika 6. Kemijske strukture ursolne i oleanolne kiseline

### 1.3. Eterično ulje ružmarina

Kao i druge vrste porodice Lamiaceae ružmarin je bogat eteričnim uljem karakterističnog oštrog mirisa (Grlić, 2005). Eterično ulje je kompleksna mješavina sastavljena od stotinu spojeva te se najčešće dobiva parnom destilacijom listova ili vršnih dijelova biljke. Miris eteričnog ulja potječe upravo iz terpena koji su njegove najbrojnije sastavnice, a čini do 2,5 % ukupne mase biljke. Eterično ulje ružmarina je bezbojna ili blago žuta tekućina, netopiva u vodi. Glavne sastavnice eteričnog ulja ružmarina su kamfor, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pinen, borneol i bornil-acetat, kamfen,  $\beta$ -pinen i limonen (Andrade i sur., 2018). Kemijske strukture nekih od monoterpena iz eteričnog ulja ružmarina prikazani su na Slici 7. Udjeli variraju i ovise o

bioklimatskim uvjetima u kojima je biljka rasla. Tako primjerice eterično ulje iz Maroka i Tunisa često ima visok udio 1,8-cineola, dok eterično ulje iz Španjolske ima nizak udio ovog spoja, ali visoke koncentracije kamfora i borneola, a francusko eterično ulje pak ima visoke koncentracije verbenona (Borges i sur., 2019). Stoga se i eterična ulja mogu podijeliti prema kemotipovima ovisno o sastavnici s najvećim udjelom na:  $\alpha$ -pinenski kemotip te cineolni ili kamforni kemotip.



Slika 7. Kemijske strukture nekih monoterpena iz eteričnog ulja ružmarina

#### 1.4. Tradicionalna upotreba

Suhi listovi, ali posebno eterično ulje i ekstrakti (listova ili nadzemnog dijela biljke) ružmarina često su korišteni u tradicionalnoj biljnoj medicini. Zabilježena je upotreba oralnog pripravka pri olakšavanju renalnih kolika, kao spazmolitika, karminativa, pri liječenju dijabetesa, kao ekspektorans i za olakšavanje respiratornih poteškoća (Andrade i sur., 2018; Borges i sur., 2019; Diniz do Nascimento i sur., 2020). U tradicionalnoj kineskoj medicini ekstrakt ružmarina koristi se za glavobolje, a Grci i Rimljani upotrebljavali su ga kao tonik za poboljšanje pamćenja, kao stimulans i za liječenje živčanih napetosti (Diniz do Nascimento i sur., 2020). Topikalno, kao dodatak kupkama, korišten je za poboljšanje cirkulacije i zbog antireumatskog djelovanja (Vladimir-Knežević, 2021). Prepoznat je i njegov antimikrobni učinak te se stoga koristi kao konzervans u industriji hrane (Nieto i sur., 2018).

Ekstrakt ružmarina ovjeren je od Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) kao siguran dodatak hrani pod brojem E392 (<https://www.efsa.europa.eu>).

## 1.5. Antioksidativni učinak ružmarina

Ružmarin, kao i mnoge druge biljne vrste porodice Lamiaceae, ima visok sadržaj polifenola koji su nositelji antioksidativnog djelovanja. Ovaj učinak je vrlo bitan, kako zbog uporabe kao konzervans koja je vrlo dobro poznata i naširoko korištena, tako i zbog uporabe u liječenju i prevenciji mnogih bolesti i stanja povezanih s oksidativnim stresom kao što su karcinomi, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Andrade i sur., 2018). Reaktivni kisikovi spojevi (ROS), uključujući vodikov peroksid i slobodne radikale, kao superoksidni anion i hidroksilni radikal, neizbježno nastaju u živim organizmima kao rezultat metaboličkih procesa ili kao posljedica djelovanja vanjskih izvora. Kontinuirano izlaganje slobodnim radikalima može uzrokovati funkcionalna i strukturna oštećenja, starenje i staničnu smrt (Andrade i sur., 2018).

Provedene su brojne studije kojima je dokazan antioksidativni učinak pojedinih sastavnica ružmarina, prvenstveno onih polifenolnih (Diniz do Nascimento i sur., 2020; Oalde Pavlović i sur., 2021). Bitno je istaknuti i da odabir otapala ima važan utjecaj na antioksidativni učinak. Iako su polarna otapala, poput etanola i metanola, bolja za ekstrakciju polifenola, n-heksanski ekstrakt ružmarina pokazao je veću *in vitro* aktivnost pri testiranju antioksidativnog učinka (Ibrahim i sur., 2022). Antioksidativna aktivnost n-heksanskog ekstrakta ružmarina testirana je *in vitro* pomoću DPPH testa uklanjanja slobodnih radikala, a za usporedbu koristio se trolox, koji je analog vitamina E topljiv u vodi. U tom istraživanju n-heksanski ekstrakt ružmarina pokazao je nešto manju antioksidativnu aktivnost od eteričnog ulja ružmarina i troloxa, ali ta aktivnost je bila viša od aktivnosti nekih drugih, prethodno objavljenih istraživanja, primjerice n-heksanskog ekstrakta Kyoho grožđa. Ispitivanja s druga dva testa, ABTS test uklanjanja slobodnih radikala i FRAP test koji se temelji na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$  iona pokazala su da ekstrakt ružmarina ima antioksidativnu učinkovitost sličnu troloxu (Ibrahim i sur., 2022). Različiti rezultati dobiveni DPPH, ABTS i FRAP testovima ukazuju na različit kapacitet spojeva ekstrakta u hvatanju slobodnih radikala ili redukciju oksidiranih vrsta.

Kako bi se dobile pouzdanije informacije, antioksidativnu aktivnost bolje je proučavati u cijelom organizmu (*in vivo*), a ne *in vitro* (Ibrahim i sur., 2022). Stoga je antioksidativna aktivnost ekstrakta ružmarina ispitana *in vivo*, mjerenjem neenzimatskih antioksidansa poput reduciranog glutationa (GSH), ali i enzimatskih antioksidansa kao što su superoksid dismutaza

(SOD) i katalaza (CAT) na štakorima (Ibrahim i sur., 2022). Iz uparenog n-heksanskog ekstrakta listova ružmarina pripremljene su lipidne nanokapsule koje su sadržavale 4 % ili 10 % n-heksanskog ekstrakta ružmarina (m/m). Životinjama je obrijana dorzalna strana te su im sat vremena prije 30 minutnog UVB zračenja (UVB zračenje je korišteno kako bi se izazvao oksidacijski stres) nanoseni n-heksanski ekstrakt ružmarina, lipidne nanokapsule s 4% n-heksanskog ekstrakta te lipidne nanokapsule s 10 % n-heksanskim ekstraktom. Nakon 10 dana uočeno je da su n-heksanski ekstrakt ružmarina i lipidne nanokapsule s ekstraktom ružmarina dovele do porasta antioksidansa u koži u usporedbi sa životinjama koje su bile samo izložene UVB zračenju (Ibrahim i sur., 2022). To istraživanje je dokazalo antioksidativnu aktivnost ružmarina *in vivo*. Napravljena je i analiza heksanskog ekstrakta ružmarina plinskom kromatografijom povezanom s masenim spektrometrom (GC-MS) te je pokazano da su najzastupljeniji metaboliti u ekstraktu triterpenoidi (45,2 %) od kojih su dominirali  $\alpha$ -amirin (24,4 %) i  $\beta$ -amirin (14,4 %) te se antioksidativni učinak može pripisati njima.

Brojne su studije ispitale antioksidativni učinak eteričnog ulja vrste *S. rosmarinus*. Mezza i suradnici (2018) prikupili su frakcije eteričnog ulja ružmarina dobivene molekularnom destilacijom te su ispitali njihov učinak na stabilnost suncokretova ulja. Zaključeno je da dodatak eteričnog ulja ružmarina smanjuje lipidnu oksidaciju i poboljšava stabilnost suncokretova ulja. Pistelli i suradnici (2018) procjenjivali su razlike između antioksidativne aktivnosti eteričnih ulja pripremljenih iz različitih kultivara ružmarina: *R. officinalis* 'Alba'; *R. officinalis* 'Corsican Blue'; *R. officinalis* 'Israeli'; *R. officinalis* 'Blue Rain'; *R. officinalis* 'Majorca Pink' i *Rosmarinus x lavandulaceus* Noë (hibrid ružmarina) koristeći FRAP i DPPH testove. Korištenjem oba testa eterično ulje hibrida je pokazalo najveću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostala ispitivana eterična ulja. Analiza pripremljenih eteričnih ulja plinskom kromatografijom (GC-MS) pokazala je da eterično ulje hibrida sadrži visoke razine kamfora (24,2%  $\pm$  0,5%), mircena (15,3%  $\pm$  0,6%) i  $\alpha$ -pinena (10,8%  $\pm$  0,4%) kojima se može pripisati antioksidativna aktivnost hibrida (Diniz do Nascimento i sur., 2020).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Topikalna primjena lijekova obuhvaća pripravke nanesene na kožu ili sluznice (<http://struna.ihjj.hr>). Koža je naš najveći organ i u stalnom je kontaktu s okolinom (Li Pomi i sur., 2023). Sastoji se od tri sloja: epidermisa, dermisa i subkutisa. Iako joj je primarna funkcija upravo zaštita od oštećenja i ulaska stranih tvari u organizam, ipak omogućuje prolazak nekih supstanci te upravo na taj način topikalni pripravci ostvaruju svoje djelovanje. Topikalna primjena vrlo je važna za liječenje lokalnih kožnih bolesti jer smanjuje mogućnost sistemske apsorpcije lijeka te samim time i težih sistemskih nuspojava. Postoji složeno međudjelovanje kože i aktivnih komponenti uklopljenih u nosač čime se optimizira dostava djelatne tvari na željeno mjesto u koži ili sistemska apsorpcija (Otto i sur., 2009). S time u svezi danas se razmatraju brojni pristupi i formulacije poput mikro i nanoemulzija, liposoma i lipidnih nanočestica kako bi se unaprijedio važan aspekt primjene lijekova i kozmetike kroz kožu (Otto i sur., 2009).

Bolesti kože su vrlo česte i zahvaćaju između 30 i 70 % svjetske populacije (Richard i sur., 2022). U 10 najučestalijih bolesti u svijetu 2010. godine su se našle čak tri kožne bolesti. To su gljivične kožne bolesti (4. mjesto), druge kožne i subkutane bolesti (5. mjesto) te akne (8. mjesto) (Richard i sur., 2022). Kožne bolesti su četvrti vodeći uzrok nefatalnog opterećenja izraženog kao izgubljene godine zbog invaliditeta (Richard i sur., 2022). S obzirom na često benigni karakter ovih bolesti, odnos koristi i rizika za razvoj i primjenu topikalnih pripravaka za liječenje i prevenciju kožnih bolesti vrlo je visok, posebno unatoč činjenici da postoje brojne nove metode modifikacije strukture i uklapanja lijekova u nosače što dodatno povećava sigurnost dostupnih lijekova, no i dalje je potreban oprez primarno zbog visoke stope samoliječenja kožnih bolesti (Meena i sur., 2023).

Također, moderno društvo pridaje veliku važnost vanjskom izgledu i mladolikosti. Kozmetički pripravci pomažu usporiti starenje i podići samopouzdanje. Oni uključuju pripravke za njegu kože i kose, dekorativnu kozmetiku, dezodoranse i parfeme. Upravo zbog toga je kozmetička industrija jedna od najbrže rastućih sektora u globalnoj ekonomiji s prihodom od 100,49 milijardi USD diljem svijeta, a pretpostavlja se i njen daljnji rast na globalnoj razini (<https://www.statista.com>). Ovaj brzi trend rasta preplavljuje tržište brojnim pripravcima za njegu kože i usporavanje starenja u čemu se teško snaći. Novi zahtjevi korisnika su i korištenje prirodnih sastojaka u proizvodnji kozmetičkih proizvoda. Prirodni sastojci daju osjećaj sigurnosti, ali i ekološke osviještenosti. Osim u kozmetici, ovaj trend snažnog porasta

interesa javnosti za prirodne pripravke vidljiv je i u rastu interesa za komplementarnu medicinu, u što spada i fitoterapija, odnosno biljna medicina.

Zbog velikog rasta zanimanja javnosti za uporabu biljnih pripravaka na koži u zdravstvene, ali i kozmetičke svrhe, znanstvenici širom svijeta ispituju pripremu i učinke različitih biljnih preparata za topikalnu primjenu. Ta ispitivanja trebala bi dovesti do rezultata koji će dati smjernice za bolje razumijevanje kliničkih indikacija, učinkovitosti i sigurnosti tih pripravaka te odabir najboljeg tehnološkog oblika koji bi polučio sve potrebne učinke u najvećoj mogućoj mjeri. Ružmarin se od davnina koristi u ljekovite svrhe te je poznat njegov antioksidativni, protuupalni i antimikrobni učinak, a također poznata je njegova topikalna primjena. Stoga je cilj ovog diplomskog rada pregledati dostupnu literaturu novijih istraživanja te sistematično prikazati dokazane učinke *S. rosmarinus* za liječenje i prevenciju kožnih oboljenja, ali i u kozmetičke svrhe.

### 3. MATERIJALI I METODE

Za izradu ovog diplomskog rada pretraživane su bibliografske *on line* baze podataka „PubMed“, „ScienceDirect“ i „Google Scholar“. Ključne riječi koje su korištene za pretraživanje baza podataka bile su: „rosemary“, „Rosmarinus officinalis“, „Salvia rosmarinus“ i „topical application“. Unatoč promjeni nomenklature, *Rosmarinus officinalis* je i dalje učestalije korišten naziv za ružmarin. Obuhvaćene su studije koje su istraživale razne aspekte topikalne primjene ružmarina, a uključene su i one koje su promatrale utjecaj eteričnog ulja ružmarina, uključivo pojedinih sastavnica biljne vrste te kombinacija ružmarina s drugim biljnim vrstama. Odabir se temeljio na radovima objavljenim na engleskom jeziku i prvenstveno onima koji imaju dostupan slobodan pregled cijelog rada, iznimno uzimale su se u obzir studije kojima je dostupan samo sažetak. Također, cilj je bio i koristiti literaturu koja je što recentnija, odnosno što novijeg datuma izdavanja kako bi se dobili što relevantniji podatci o temi istraživanja. Dodatne informacije prikupljene su iz knjiga slične tematike te internetske stranice relevantnih institucija poput Europske agencije za lijekove (*European Medicines Agency*) i Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Pregledom znanstvene literature dostupne putem *on line* baza podataka „PubMed“, „ScienceDirect“ i „Google Scholar“ ustanovljeno je da je topikalna primjena pripravaka ružmarina najviše ispitivana u liječenju alopecije, atopijskog dermatitisa, smanjenju lokalne upale kože, cijeljenju rana te u kozmetičkim pripravcima.

### 4.1. Upotreba ružmarina u liječenju alopecije

#### 4.1.1. Alopecija

Dlake spadaju u kožne adneксе, odnosno to su koži pridružene strukture, zajedno s noktima, žljezdama lojnicama i znojnicama (Filipović-Grčić i Pepić, 2023.). Dlaka raste iz dlačnog folikula koji je smješten duboko u dermisu kože. Najdonji dio folikula je dermalna papila koja sadrži brojne matične stanice iz kojih nastaje nova dlaka. Folikul dlake je dobro opskrbljen krvnim žilama koje su važne za rast dlake i opskrbu kisikom. Ljudske dlake zapravo su mrtve strukture sastavljene prvenstveno od proteina od kojih je najvažniji keratin. Od ostalih komponenti sadržanih u dlaci ističu se voda, lipidi, melanin te elementi u tragovima poput selena, cinka, željeza, bakra i dr. Na staničnoj razini to su mrtvi keratinociti. Dlake prekrivaju cijelo tijelo, a funkcija im je zaštitna te su osjetljive na vrlo lagan dodir.

Kosa raste u prirodnom ciklusu koji se stalno ponavlja. Čim jedna dlaka ispadne, nova krene nastajati i diferencirati iz dermalne papile. Ta faza rasta zove se još i anagena faza i može trajati i do šest godina. Slijedeća je katagena faza u kojoj rast prestaje i dolazi do odvajanja korijena dlake od dermalne papile. Ovo je ujedno i najkraća faza te traje između dva i tri tjedna. Posljednja faza je telogena faza ili faza mirovanja koja traje između dva i tri mjeseca (Vusić, 2023). Jedan od glavnih problema vezanih uz kosu je njeno pretjerano ispadanje i gubitak. Stanje koje je predstavljeno gubitkom dlaka s jednog ili više područja na tijelu naziva se alopecija. Gubitak kose povezan je sa psihološkim smetnjama i gubitkom samopouzdanja. Brojni su uzroci, a jedan od najčešćih je androgena alopecija koja pogađa više od 80 % muškaraca dobi do 70 godina (York i sur., 2020; Vusić, 2023). Zbog toga postoji i karakteristični muški tip koji zahvaća tjeme i frontalni dio vlasišta. Androgena alopecija je oblik koji se lako liječi bezreceptnim preparatima. Zapravo je došlo do skraćivanja anagene faze i produljenja katagene i telogene faze pri čemu dlake rastu sve kraće i tanje. Ovaj proces naziva se minijaturizacija i ne uzrokuje ireverzibilno oštećenje folikula. Podloga je hormonalna,



odnosno enzim 5  $\alpha$ -reduktaza koji potiče nastajanje potentnog androgena dihidrotestosterona koji skraćuje anagenu fazu. Bitno je znati prepoznati vrste ćelavosti jer postoje mnoge vrste koje u pozadini imaju teže uzroke poput upala ili autoimunih bolesti (Phillips i sur., 2017; York i sur., 2020).

Alopeciju prvenstveno dijelimo na ožiljnu i neožiljnu alopeciju. Ožiljna alopecija nastaje kao posljedica pojedinih bolesti koje uništavaju ili oštećuju dlačne folikule te zbog toga nema mogućnosti ponovnog rasta dlaka. Najčešći uzroci su sifilis, sarkoidoza, lichen planus, psorijaza i slične bolesti ljuškanja kože ili gljivična oboljenja kao što je *Tinea capitis* (Vusić, 2023). Kod neožiljne alopecije bitno je istaknuti da postoji mogućnost ponovnog rasta kose jer nije došlo do nepovratnog oštećenja folikula. Osim već navedene androgene alopecije treba istaknuti i alopeciju areatu koju karakteriziraju potpuno ćelava područja obično promjera oko jedan do dva centimetra na normalnom području. Ova vrsta još se može podijeliti ovisno o lokalizaciji na alopeciju totalis (potpuno ćelavo vlasništvo) i universalis (gubitak svih dlaka na tijelu). U podlozi ove vrste alopecije je autoimuni proces koji često može biti prouzrokovan nekom upalom u organizmu primjerice odontogenim procesom. Telogeni efluvium je potaknut prijelazom velikog broja dlaka u pasivnu fazu rasta pri čemu dolazi do stanjivanja dlaka, ali folikuli nisu trajno oštećeni te se najčešće radi o metaboličkom ili hormonalnom disbalansu. Dok kod telogenog efluvija postoji difuzni i polaganiji proces gubitka kose, kod anagenog efluvija proces je nagliji i često prouzrokovan kemoterapijom ili radijacijskim zračenjem (Phillips i sur., 2017).

Postoji i psihički poremećaj trichotillomania zbog kojeg ljudi čupaju dlake, svjesno ili nesvjesno (Phillips i sur., 2017). Neki lijekovi isto tako mogu dovesti do oštećenja i ispadanja kose poput ACE inhibitora, nekih antikonvulziva ili lijekova s androgenim učinkom (Vusić, 2023).

Prva linija liječenja androgene alopecije je lokalna topikalna primjena minoksidila koji pomaže u prokrvljenosti folikula dlake te produljuje anagenu fazu rasta. Minoksidil je odobren preparat za liječenje alopecije od FDA, a u prometu je i u Hrvatskoj u obliku dermalne otopine što je odobrio i HALMED. Nedostak minoksidila je dugo vrijeme potrebno da se upije u kožu tijekom kojega treba izbjegavati sušenje tjemena ili kose fenom te izbjegavati nanošenja drugih kozmetičkih proizvoda na tretirano područje. Također, nije preporučljivo niti spavati jer to može dovesti do razlijevanja pripravka i upijanja u posteljinu ili jastučnicu umjesto u kožu zbog čega može doći do nepravilne primjene od strane nedovoljno informiranih pacijenata te se može smanjiti njegova učinkovitost. Nuspojave koje se mogu javiti često su lokalne u vidu osipa, svrbeža ili pečenja kože, ali mogu biti i teže poput bolova u prsištu i sniženja krvnog tlaka

(<https://www.halmed.hr>). S obzirom na navedeno potrebno je razmatrati nove i bolje terapijske opcije antialopecika pri čemu treba uzeti u obzir i lijekove koji potiču iz biljnih izvora poput ružmarina.

#### 4.1.2. Ispitivanja topikalne primjene ružmarina u liječenju alopecije

Istraživanje koje je provedeno na pokusnim miševima pokazalo je da se ekstrakt ružmarina može koristiti za liječenje androgene alopecije te da je mehanizam djelovanja ekstrakta ružmarina inhibicija 5  $\alpha$ -reduktaze (Murata i sur., 2013). U tom istraživanju korišteni su C3H/He miševi kojima je dlaka s dorzalne strane bila samo obrijana. U istraživanje su bili uključeni i C57BL/6NCrSlc miševi kojima je prvo dorzalno dlaka obrijana te je potom nanosena otopina testosterona kako bi se inhibirao rast dlake. Ekstrakt listova ružmarina pripremljen je u 50 % etanolu, uparen te je potom otopljen u 80 % etanolu. 100  $\mu$ l ekstrakta je nanoseno na obrijanu kožu miševa svakodnevno kroz 30 dana u koncentraciji 2 mg/mišu/danu. U grupi životinja koje su bile samo obrijane tretman s ekstraktom ružmarina poboljšao je rast dlake te je rast dlake bio bolji u odnosu na kontrolu, ali podjednak pozitivnoj kontroli (2 % minoksidil). U životinja koje su tretirane testosteronom tretman s ekstraktom ružmarina poboljšao je rast dlake te je ona rasla podjednako kao i kod kontrolnih životinja (koje nisu bile tretirane testosteronom), ali bolje nego u grupi koja je tretirana samo testosteronom. U tom istraživanju ispitana je i *in vitro* inhibicija 5  $\alpha$ -reduktaze s pripremljenim ekstraktom ružmarina. Rezultati su pokazali da ekstrakt ružmarina u koncentraciji od 200  $\mu$ g/ml inhibira aktivnost 5  $\alpha$ -reduktaze za 82,4 %, a u koncentraciji od 500  $\mu$ g/ml za 94,6 % te da je učinak na rast dlake ekstrakta ružmarina povezan s inhibicijom 5  $\alpha$ -reduktaze. Autori su pretpostavili da je došlo do inhibiranja vezanja dihidrotestosterona na androgene receptore što otvara priliku za dodatno proučavanje ekstrakta ružmarina kao lijeka za androgenu alopeciju. Kao glavna komponenta pripremljenog ekstrakta izolirana je 12-metoksikarnozolna kiselina kojoj je pripisan zabilježeni učinak (Murata i sur., 2013).

U slijedećem istraživanju koje je također provedeno na miševima korišten je biljni losion za kosu koji je sadržavao 1 % metanolnog ekstrakta ružmarina (Begum i sur., 2023). Prvo je pripremljen metanolni ekstrakt ružmarina koji je uparen do suha te je kao dio vodene faze uklopljen u losion oblika U/V emulzije koji se zatim nanosio na eksperimentalne životinje. C57BL/6 muškim miševima obrijana je dorzalna površina tijela te su podijeljeni u tri grupe: prva grupa bila je kontrolna i tretirana samo vodom, druga grupa tretirana je s losionom koji je

sadržavao 1 % metanolnog ekstrakta ružmarina, a treća grupa tretirana je standardnom terapijom (2 % minoksidil). Životinje su tretirane dva puta dnevno u trajanju od 30 dana.

Na kraju četvrtoga tjedna tretmana duljina naraslih dlaka eksperimentalnih životinja tretiranih biljnim losionom koji je sadržavao 1 % metanolnog ekstrakta ružmarina bila je gotovo dvostruka u odnosu na životinje tretirane 2 % minoksidilom i kontrolne životinje. Također, grupa životinja kojima je nanesen losion s ružmarinom imala je najveću težinu novonaraslih dlaka, a grupa tretirana 2% minoksidilom imala je rezultate vrlo slične kontrolnoj skupini. Na miševima nisu primijećene nikakve nuspojave u vidu osipa, svrbeža ili upale, a dlake koje su rasle pod utjecajem losiona bile su zdrave i sjajne. Koža je pregledana i histološki te je promatrana indukcija anagene faze na tkivnoj razini. Već u prvom tjednu bio je vidljiv povećan broj dlačnih folikula kod životinja koje su tretirane losionom koji je sadržavao 1 % metanolnog ekstrakta ružmarina što ukazuje na prijelaz iz telogene u anagenu fazu. Histološka analiza kože životinja tretiranih 2% minoksidilom te kontrolnih životinja također je pokazala indukciju anagene faze, no znatno sporiju u odnosu na ispitivani pripravak. Bilo je vidljivo povećanje broja folikula, njihovo izduživanje i spuštanje u dublje slojeve kože prema kraju pokusa.

Pripremljen losion koji je sadržavao 1 % metanolnog ekstrakta ružmarina testiran je na viskoznost, stabilnost, sterilnosti, pH vrijednost te su provjerena organoleptička svojstva i mnoga druga od kojih su sva pokazala zadovoljavajuće rezultate (Begum i sur., 2023). Ova studija je vrlo značajna jer je istražila utjecaj ekstrakta ružmarina uklopljenog u gotovu formulaciju kakva je prikladna za svakodnevno korištenje kod ljudi te je dokazala da uklapanje ekstrakta u formulaciju jednostavnu za uporabu ne umanjuje djelovanje biljnih sastavnica na rast dlake.

Slijedeće istraživanje provedeno je na štakorima te je pratilo utjecaj eteričnog ulja ružmarina na rast dlake (Uronnachi i sur., 2022). Osim eteričnog ulja ružmarina ispitan je učinak eteričnog ulja cedra i kombinacija eteričnih ulja ružmarina i cedra. Prije samog ispitivanja provedena je GC-MS analiza eteričnih ulja te je ustanovljeno da cedrovo eterično ulje sadrži veće količine  $\alpha$ - i  $\beta$ - pinena,  $\alpha$ -cedrola,  $\gamma$ -terpena, dok je eterično ulje ružmarina sadržavalo veće količine 1,8-cineol, kamfor,  $\alpha$ - i  $\beta$ - pinen,  $\gamma$ -terpinen. Eterična ulja korištena su u koncentracijama od 10 % kada je izrađivan pripravak s pojedinačnim uljem te s po 5 % svakog od ulja kada su korištena u kombinaciji. Ulja su uklopljena u oleogelove jer je upravo taj tehnološki oblik idealan za uklapanje raznih lijekova za topikalnu primjenu. S obzirom da takav oblik ne sadrži vodenu fazu, mikrobiološki i kemijski je mnogo stabilniji od konvencionalnih formulacija za topikalnu primjenu, a proizvodni proces je vrlo jednostavan. Zapravo, radi se o lipofilnim tekućinama geliranim prikladnim gelirajućim sredstvom u koji se uklapaju lipofilni,

ali i hidrofilni lijekovi. U ovom istraživanju gelirajuće sredstvo bio je pčelinji vosak u koncentraciji od 20 % što je pokazalo optimalan odnos razmazivosti i čvrstoće. Ovaj oblik također odlikuju i izvrsna svojstva tiksotropije, mukoadhezivnosti i razmazivosti.

Svim štakorima dlaka je uklonjena pomoću komercijalno dostupne kreme za uklanjanje dlaka. Uz tretman s eteričnim uljem ružmarina i cedra (pojedinačno i u kombinaciji) u istraživanje je bila uključena pozitivna kontrola (2 % minoksidil), kontrola tretirana samo s oleogelom te negativna kontrola (bez tretmana). Proučavana je duljina novonaraslih dlaka i njihova gustoća u pravilnim razmacima u periodu od 6 tjedana. Tretman oleogelom s uljem ružmarina potaknuo je rast dlaka već u 2. tjednu, a duljina dlaka bila je slična pozitivnoj kontroli. U 6. tjednu bio je vidljiv izraženiji rast dlaka u skupini koja je bila tretirana oleogelom s kombinacijom ulja ružmarina i cedra, u skupini tretiranoj oleogelom s uljem ružmarina i pozitivnoj kontroli te je bio izraženiji u odnosu na negativnu kontrolu. Gustoća dlake također je bila povećana nakon nanošenja eteričnih ulja uklopljenih u oleogelove zajedno i pojedinačno nakon 6 tjedana tretmana. Gustoća dlake mjerena je na skali od 0 do 4 gdje je nula označavala da nije došlo do rasta dlake, 1 za do 25 posto rasta dlake; 2 za do 50%; 3 za do 75 posto te 4 za raspon od 75 % do potpunog rasta dlake. Skupina koja je tretirana uljem ružmarina uklopljenim u oleogel imala je rezultat 4 za ocjenu gustoće rasta dlake, dok je negativna kontrola imala rezultat 2. Grupe tretirane oleogelom s mješavinom ulja, eteričnim uljem cedra, ali i praznim oleogelovima imale su gotovo usporedan rezultat od 3.

Autori su zaključili da oleogel s uklopljenim ružmarinovim eteričnim uljem ima gotovo jednak učinak kao i komercijalni 2 % minoksidil, dok oleogel s uklopljenim cedrovim eteričnim uljem nije pokazao značajan učinak na rast dlake. Eterična ulja ružmarina i cedra uklopljena u oleogel nisu pokazala očekivani sinergistički učinak na rast dlake (Uronnachi i sur., 2022).

Uronnachi i suradnici (2022) koristili su tehnološki oblik oleogel koji je pokazao dobra tehnološka i organoleptička svojstva te se može smatrati kao dobar oblik za transdermalnu primjenu u liječenju gubitka kose. Također, pokazali su da eterično ulje ružmarina ima vrlo dobar učinak na rast i gustoću dlake. Zanimljivo je istaknuti da, iako je ispitano i cedrovo ulje koje se gotovo stoljećima koristi za liječenje gubitka kose, ono, u ovome istraživanju, nije pokazalo bolji učinak na rast dlake. Pored toga nije utvrđen sinergistički učinak kombinacije eteričnih ulja ružmarina i cedra, što navodi na zaključak da je eterično ulje ružmarina kao pripravak za poticanje rasta kose najbolje nastaviti ispitivati kao monopripravak jer u dosadašnjim ispitivanjima ima dokazane dobre učinke. Potrebno je daljnje razmotriti i ispitati optimalnu koncentraciju eteričnog ulja ružmarina koje posjeduje najbolji omjer učinkovitosti i

sigurnosti primjene. Ispitivanja učinka ekstrakta ružmarina ili eteričnog ulja ružmarina na rast dlake u pokusnim životinjama prikazana su Tablicom 2.

Tablica 2. Tablični prikaz provedenih istraživanja učinka pripravaka ružmarina na rast dlaka u pokusnih životinja.

<b>Autori</b>	<b>Pripravak ružmarina/ispitivanje</b>	<b>Rezultati istraživanja</b>
Murata i sur., 2013.	50 % etanolni ekstrakt listova ružmarina; (a) miševima obrijana dlaka, tretirani s 2 mg ekstrakta po danu kroz 30 dana (2% minoksidil pozitivna kontrola). (b) miševima ponovni rast dlake inhibiran testesteronom; tretirani s 2 mg ekstrakta po danu kroz 30 dana.	Ekstrakt ružmarina je pojačao rast dlake: (a) rast dlake podjednak pozitivnoj kontroli (2% minoksidil) (b) rast dlake podjednak kontroli koja nije tretirana testesteronom; mogući mehanizam: inhibicija 5 $\alpha$ -reduktaze.
Begum i sur., 2023.	Metanolni ekstrakt listova ružmarina u obliku U/V emulzije (losiona) u koncentraciji od 1%; miševima obrijana dlaka te su tretirani losionom 2 puta dnevno kroz 30 dana (pozitivna kontrola 2% minoksidil).	Losion s 1% ekstraktom ružmarina je pojačao rast dlake (dlaka duža, ima veću masu), učinak bolji od pozitivne kontrole (2% minoksidil), nema negativnih učinaka; povećan je broj folikula dlaka.
Uronnachi i sur., 2022.	Oleogelovi s uklopljenim: (a) 10 % eteričnim uljem ružmarina ili (b) 10% eteričnim uljem cedra ili (c) po 5% eteričnog ulja cedra i ružmarina; štakorima je uklonjena dlaka te su tretirani kroz 6 tjedana sa svakim od oleogelova (pozitivna kontrola 2% minoksidil).	Oleogel s eteričnim uljem ružmarina je potaknuo rast i gustoću dlake te je imao isti učinak kao i 2 % minoksidil na rast dlaka. Oleogel s cedrovim uljem ima slabiji učinak od ružmarinovog, a njihova zajednička primjena ne rezultira s boljim učinkom na rast dlake.

Provedeno je i kliničko istraživanje učinka pripravaka ružmarina na rast dlake. Panahi i suradnici (2015) proveli su randomiziranu studiju koja je usporedila učinke 2 % minoksidila (od FDA odobreni preparat za liječenje alopecije) i ulje ružmarina (losion ulja ružmarina imao je najmanje 3,7 mg 1,8-cineola u 1 ml) na pacijente oboljele od androgene alopecije. Od ukupno 100 ispitanika njih 50 nasumično je bilo raspodijeljeno u minoksidil grupu, dok je druga polovica ispitanika (n = 50) koristila losion ulja ružmarina tijekom 6 mjeseci. Na prvoj provjeri koja je uslijedila nakon tri mjeseca niti jedna grupa nije primijetila znatnije promjene, ali na kraju istraživanja (nakon 6 mjeseci) primijećeno je značajnije povećanje broja dlaka na vlasištu u obje grupe ispitanika, odnosno nije bilo bitnije razlike između grupa. Ispitanici su istaknuli da osjećaju svrbež vlasišta nešto učestalije nego na početku istraživanja, a ova nuspojava

istaknula se više kod grupe koja je koristila 2 % minoksidil nego kod grupe koja je koristila losion s uljem ružmarina (Panahi i sur., 2015).

Istraživanja pokazuju da pripravci ružmarina imaju pozitivan učinak na rast dlake, no znatnija razlika u odnosu na već komercijalno dostupni pripravak minoksidil nije zabilježena. Također, istraživanje na ljudima potvrdilo je sličnost rezultata kao onih dobivenih na pokusnim životinjama. S obzirom da nisu zabilježene nuspojave, svakako bi trebalo nastaviti istraživanja učinka ružmarina na rast dlaka. Daljnja istraživanja trebala bi se fokusirati na pronalaženje optimalne koncentracije pripravka ekstrakta ružmarina ili eteričnog ulja, utvrđivanje njihovog sastava kao i na njihovu toksičnost u usporedbi s komercijalno dostupnim pripravkom kao što je minoksidil. S obzirom da je izoliranoj 12- metoksikarnozolnoj kiselini pripisan učinak inhibicije enzima 5  $\alpha$ -reduktaze, moguće je da bi upravo etanolni ekstrakt bio bolji za nastavak razvitka pripravaka u liječenju androgene alopecije jer zbog svoje polarnosti može sadržavati veće udjele ovog metabolita nego lipofilno eterično ulje bogato monoterpenima. Također, istraživanja bi se trebala usmjeriti na pronalaženje aktivne sastavnice ekstrakta ružmarina ili eteričnog ulja koja ima pozitivan učinak na rast dlake, a nije toksična te odabir najprikladnijeg tehnološkog oblika za uklapanje pripravka s obzirom na organoleptička svojstva, stabilnost i jednostavnost izrade, ekonomsku isplativost, a naravno i učinkovitost transdermalnog prijenosa.

## **4.2. Uporaba ružmarina u liječenju atopijskog dermatitisa**

### **4.2.1. Atopijski dermatitis**

Atopijski dermatitis je kronična upalna bolest kože koja se javlja primarno u novorođenčadi i djetinjstvu, ali može se javiti i kod odraslih. Karakteriziraju ga ekcematozna područja, a jedna je od dermatoloških bolesti koju odlikuje najjači svrbež što je posljedica infiltracije upalnih stanica poput mastocita, eozinofila, makrofaga i T stanica (Lee i sur., 2016). Vrlo važan dijagnostički marker su povišene razine transduktora signala i aktivatora transkripcije 3 (STAT3) u djetinjstvu zbog aktivacije JAK/STAT signalnog puta u koži oboljelih od atopijskog dermatitisa (Lee i sur., 2016). STAT3 je uključen u degranulaciju mastocita, smanjuje diferencijaciju keratinocita te na taj način oslabljuje kožnu barijeru te potiče otpuštanje brojnih citokina poput interleukina-31 (IL-31). Razvoj protuupalnog pripravka koji bi djelovao i na koncentracije STAT3 bi uvelike pripomogao terapiji atopijskog dermatitisa.

#### 4.2.2. Ispitivanja topikalne primjene ružmarina u liječenju atopijskog dermatitisa

U istraživanju kojega su proveli Lee i suradnici (2017) proučavan je učinak karnozola, aktivne sastavnice ružmarina s izrazitim protuupalnim djelovanjem, na atopijski dermatitis. Atopijski dermatitis izazvan je 5% otopinom ftalnog anhidrida (PA) nanašanjem na kožu s dorzalne strane uha i na leđa ( $20 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) HR1 miševa. Miševi su podijeljeni u 4 grupe: kontrolna grupa (bez tretmana), kontrolna grupa koja je tretirana otapalom u kojem je pripremljen karnozol (DMSO), grupa koja je tretirana s 5% otopinom PA, i grupa tretirana s 5% otopinom PA te je nakon 3 sata na kožu nanoseno  $100 \mu\text{l}$   $10 \mu\text{M}$  karnozola ( $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Životinje su tretirane tri puta tjedno kroz četiri tjedna. U miševa nakon indukcije atopijskog dermatitisa praćeni su parametri poput debljine uha i njegove morfologije. Debljina uha bila je povećana kod grupe tretirane s 5% otopinom PA u odnosu na kontrolu. No, u grupi koja je bila tretirana s 5% otopinom PA i karnozolom debljina uha je bila smanjena u odnosu na grupu tretiranu samo s 5% otopinom PA. Kliničke slike jakosti dermatitisa kontrolne grupe i grupe tretirane otapalom bile su slične, a grupa tretirana karnozolom imala je značajnije manje izraženu jakost dermatitisa. Histološka analiza kože s leđa i dorzalne strane uha pokazala je jasnu morfološku sliku upaljenog tkiva u grupi tretiranoj samo s 5% otopinom PA, dok je debljina epidermisa i infiltracija upalnih stanica u dermis bila značajno manja u grupi tretiranoj karnozolom.

S obzirom da su veličina i težina limfnih čvorova osjetno povećani kod osoba koje pate od atopijskog dermatitisa (što je posljedica upale), u ovom je istraživanju ispitan učinak karnozola na morfologiju limfnih čvorova te koncentraciju imunoglobulina E (IgE) u serumu. Težina limfnih čvorova bila je veća u miševa tretiranih s 5% otopinom PA u odnosu na kontrolnu grupu i na miševe tretirane karnozolom. Tretman s 5% PA doveo je do porasta razine IgE u serumu koji je bio viši od kontrolne skupine, a tretman s karnozolom snizio je razinu IgE. Topikalna upotreba karnozola inducirala je i sniženje razine neutrofila u punoj krvi. U serumu su promatrani upalni citokini IL- $1\beta$  te TNF $\alpha$  čije su razine pokazale sličan obrazac ponašanja kao i IgE nakon tretmana s PA i karnozolom. Western blot analizom pokazano da je karnozol značajno inhibirao fosforilaciju STAT3, čije su razine bile povišene u životinja tretiranih s PA, ipak nisu uočene razlike u nefosforiliranom STAT3. Uz *in vivo* istraživanje računalno je ispitana mogućnost vezanja karnozola i STAT3 (*molecular docking*) te je utvrđeno kako se karnozol veže za više aminokiselinskih ostataka molekule STAT3. Rezultati ovog istraživanja

pokazuju da karnozol može imati pozitivne učinke na dermatitis, a njegov mogući mehanizam učinka je inhibicija STAT3 (Lee i sur., 2017).

Budući da su lijekovi na bazi kortikosteroida među prvim izborima u liječenju atopijskog dermatitisa, daljnje ispitivanje pripravaka na bazi ružmarina vrlo je važno. Kortikosteroidi su lijekovi prepoznati po širokom spektru raznolikih nuspojava koje mogu biti vrlo teške i sistemske čak i nakon topikalne primjene. Strah od ovakvih nuspojava vrlo je često i jedan od najvažnijih uzroka neadherencije propisanoj terapiji te lošoj kontroli bolesti. Posebice jer su pacijenti mala djeca, koji su u najvećem riziku od obolijevanja od atopijskog dermatitisa, čija je koža vrlo tanka i vrlo apsorptivna, a roditelji su upoznati s rizikom od nuspojava te su u strahu. Ukoliko bi se uspjela razviti i odobriti emolijentna krema na bazi ružmarina ona bi uvelike pomogla da se izbjegne uporaba kortikosteroida. Emolijentna krema s ružmarinom djelovala bi na više meta u patologiji bolesti te bi pomogla u kontroli i prevenciji simptoma, no naravno potrebne su još brojne studije. Bilo bi dobro ispitati bi li ekstrakt ružmarina ili pak eterično ulje pokazali cjelokupniji učinak od uporabe samog karnozola s obzirom na moguće aditivno djelovanje njihovih sastavnica.

### **4.3. Protuupalna topikalna primjena ružmarina**

#### **4.3.1. Upala**

Kao odgovor na ozljedu tkiva javlja se brz mehanizam popravka koji započinje povećanim dotokom krvi i povećanom vaskularnom permeabilnošću (Mengoni i sur., 2011). Leukociti, kao glavne stanice imunskog odgovora, privučeni su na mjesto povećanom ekspresijom staničnih adhezijskih molekula poput unutarstanične adhezijske molekule (ICAM-1). Od ostalih proupalnih medijatora najvažniji su citokini interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i faktor nekroze tumora (TNF $\alpha$ ). Vazodilatacija je posljedica, između ostaloga, i utjecaja dušikova oksida, kao još jednog posrednika upale, što rezultira edemom kože, a nastaje pod utjecajem inducibilne sintaze dušikova oksida (iNOS) (Mengoni i sur., 2011). Spojevi iz biljaka pokazali su se kao važna i obećavajuća grupa protuupalnih tvari te zbog svoje niske toksičnosti imaju potencijal u liječenju akutnih, ali i kroničnih upalnih bolesti. Među njima je i ružmarin čije se sastavnice, ali i ekstrakt istražuju u postizanju topikalno-primijenjenih protuupalnih učinaka. Najvažniji cilj protuupalnih lijekova je kontrola lučenja medijatora u upalnom procesu.



#### 4.3.2. Ispitivanja protuupalne topikalne primjene ružmarina

Mengoni i suradnici (2011) proučavali su učinak ekstrakta ružmarina na upalu. Akutna upala u obje stražnje šape Balb/c miševa izazvana je injekcijom 20  $\mu$ l 3% formaldehida. Nakon dva sata, lijeve stražnje šape životinja tretirane su ekstraktom ružmarina (vodeni i etanolni u dozi od 12 mg/ml) i to: prva grupa topikalnom primjenom (10  $\mu$ l), druga grupa injekcijom u šapu, dok je treća grupa primila oba tretmana. Nakon 24 sata izmjereno je promjer šape kako bi se dobili rezultati o redukciji edema u odnosu na desnu, netretiranu šapu. Iako vodeni ekstrakt ružmarina nije pokazao protuupalno djelovanje, etanolni je pokazao snažni učinak u smanjenju edema što je vjerojatno povezano s činjenicom da alkoholni ekstrakti imaju vrlo visok sadržaj karnozola i karnozolne kiseline koje imaju dokazan jak protuupalni učinak. Injekcija etanolnog ekstrakta dovela je do redukcije edema za 22% u usporedbi s negativnom kontrolom, ali kad je ekstrakt nanošen topikalno upala je smanjena čak za 80%. Čak niti grupa koja je primila kombiniranu terapiju (topikalna primjena i injekcija) nije postigla ovako dobar rezultat kao sama topikalna primjena etanolnog ekstrakta. Kako bi se potvrdili rezultati ove studije napravljena je histološka analiza. U tkivu koje je topikalno tretirano ekstraktom ružmarina nađen je smanjen broj leukocita, posrednika dermalne upale. Ova studija je preliminarna, no njome je topikalna primjena odabrana kao put primjene za daljnje istraživanje učinka etanolnog ekstrakta ružmarina na inhibiciju kutane upale jer se pokazala učinkovitijom od primjene injekcijom.

Mengoni i suradnici (2011) dalje su ispitali protuupalni učinak etanolnog ekstrakta ružmarina te bioaktivnih komponenti dobivenih iz suhih listova ružmarina, točnije karnozola i karnozolne kiseline, u inhibiciji lučenja upalnih medijatora. Istraživanje su nastavili na muškim Balb/c miševima kojima je ovog puta izazvana kutana upala topikalnom aplikacijom phorbol 12-miristate 13-acetata (PMA). Miševima je na unutarnju stranu uha 30 minuta prije aplikacije PMA nanesen ili etanolni ekstrakt ružmarina (u dozama od 10 do 1000  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) ili karnozol (u dozama od 2 do 20  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) ili karnozolna kiselina (u dozama od 2 do 20  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>). Za usporedbu učinka grupa životinja tretirana je nesteroidnim protuupalnim lijekom indometacinom. Učinkovitost je izračunata kao postotak promijene mase uha, tj. smanjenja edema u odnosu na kontrolu. Po završetku pokusa, nakon 4 sata, ispitana je ekspresija gena uključenih u upalu te je pokazano da karnozolna kiselina i karnozol smanjuju ekspresiju IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$ , ali imaju manji učinak na ekspresiju fibronektina i ICAM-1. Također, inhibirali su COX-2, ali ne i COX-1. Etanolni ekstrakt ružmarina pokazao je učinkovitost sličnu indometacinu, dok su karnozol i karnozolna kiselina pokazali čak i nešto veću aktivnost od lijeka. Time je dokazano da upravo

te dvije komponente ekstrakta ružmarina imaju protuupalnu aktivnost. Histološka analiza ušiju životinja tretiranih ekstraktom ružmarina i karnozolnom kiselinom pokazala je znatno manji broj leukocita u tkivu i stupanj ulceracije u odnosu na uši životinja tretiranih samo s PMA.

Isti su istraživači proveli i *in vitro* istraživanje (Mengoni i sur., 2011). Ispitali su učinak etanolnog ekstrakta ružmarina, karnozola i karnozolne kiseline na razinu dušikovog oksida na RAW 264.7 stanicama. Stanice su pred-tretirane s etanolnim ekstraktom ružmarina (u koncentracijama: 12, 25 ili 50  $\mu\text{g/ml}$ ; 2 sata) ili karnozola ili karnozolne kiseline (u koncentracijama: 3,125; 6,25; 12,50 ili 50  $\mu\text{g/ml}$ ; 2 sata) i onda stimulirane na upalu s 1  $\mu\text{g/ml}$  lipopolisaharida (LPS) tijekom 24 sata. Tretman stanica etanolnim ekstraktom, karnozolom ili karnozolnom kiselinom značajno je snizio proizvodnju dušikova oksida u odnosu na kontrolu. Važno je napomenuti da tretman s etanolnim ekstraktom ili njegovim komponentama u ispitanim koncentracijama nije doveo do smanjenja vijabilnosti staničnih linija RAW 264.7 što potvrđuje da su u koncentracijama u kojima su doveli do smanjenja razine dušikovog oksida netoksični.

Inhibicija pojačane proizvodnje dušikova oksida ekstraktom ružmarina ispitana je u još jednoj studiji u kojoj je upala RAW 264.7 stanica inducirana pomoću LPS-a (Yimam i sur., 2017). Etanolni ekstrakt ružmarina pripremljen je iz suhih listova biljke. Ekstrakt je zatim ukoncentriran do prikladnog volumena te je nakon 24 sata odvojeni supernatant vakuumski osušen. Dobiven je ekstrakt ružmarina koji je sadržavao između 30% i 60% karnozolne kiseline. Stanice su stimulirane s LPS-om (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) tijekom 18 sati kako bi se izazvala pojačana produkcija dušikova oksida. Potom su stanice tretirane ekstraktom ružmarina u rasponu koncentracija (6,25–100  $\mu\text{g/ml}$ ) kako bi se utvrdio učinak na pojačanu produkciju dušikovog oksida. Kontrole su bile nestimulirane stanice koje su pokazale vrlo malu ili nikakvu proizvodnju dušikova oksida. Ovim istraživanjem dokazan je inhibitorni učinak etanolnog ekstrakta ružmarina na proizvodnju dušikovog oksida ovisan o dozi. Već pri niskim koncentracijama od 6,2  $\mu\text{g/ml}$  etanolnog ekstrakta ružmarina, došlo je do 71,8% inhibicije proizvodnje dušikova oksida. Potpunu inhibiciju proizvodnje dušikovog oksida uzrokovao je ekstrakt ružmarina pri višim koncentracijama od 12,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Za sastavnicu eteričnog ulja ružmarina eukaliptol (1,8- cineol) utvrđeno je dobro protuupalno i antinociceptivno djelovanje (Diniz do Nascimento i sur., 2020). Stoga su Khan i suradnici (2014) ispitali učinak pred-tretmana s 1,8-cineolom na upalu izazvanu amiloidom A $\beta$ (25-35) u diferenciranim PC12 stanicama. Stanice su tretirane s 1,8-cineolom u različitim koncentracijama tijekom 24 sata, nakon čega je dodan medij koji je sadržavao A $\beta$  (25-35) te su stanice ostavljene još 24 sata. U stanicama koje su bile tretirane samo s A $\beta$ (25-35) stanična

vijabilnost je bila značajno smanjena u odnosu na negativnu kontrolu. Pred-tretman s 1,8-cineolom doveo je do značajnog povećanja vijabilnosti stanica. Kao mehanizam protuupalne aktivnosti 1,8-cineola autori su utvrdili inhibiciju proizvodnje upalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6, sniženje razine dušikovog oksida, a također je zabilježena i smanjena ekspresija NOS-2, COX-2 i NF- $\kappa$ B u stanica koje su pred-tretirane s 1,8-cineolom. Također je utvrđeno da 1,8-cineol smanjuje razinu oksidativnog stresa regulacijom signalnih puteva i hvatanjem slobodnih radikala (Khan i sur., 2014).

Istraživanja učinka ekstrakta ružmarina i njegovih sastavnica ili eteričnog ulja ružmarina i njegovih sastavnica na upalu na pokusnim životinjama i na stanicama prikazani su Tablicom 3.

Tablica 3. Tablični prikaz istraživanja učinka ekstrakta ružmarina, njegovih sastavnica i sastavnice eteričnog ulja ružmarina na upalu na pokusnim životinjama i na stanicama.

<b>Autori</b>	<b>Pripravak ružmarina/ ispitivanje</b>	<b>Rezultati</b>
Yimam i sur., 2017.	Etanolni ekstrakt ružmarina s 30-60% karnozolne kiseline. RAW 264.7 stanice, upala stimulirana s LPS; tretman s ekstraktom ružmarina (6,25–100 $\mu$ g/ml), 24 sata.	Etanolni ekstrakt inhibirao je proizvodnju dušikovog oksida koja je bila ovisna o dozi, potpuna inhibicija pri koncentraciji ekstrakta ružmarina > 12,5 $\mu$ g/ml.
Mengoni i sur., 2011.	Etanolni ekstrakt ružmarina. RAW 264.7 stanice, pred-tretman s ekstraktom ružmarina (12-50 $\mu$ g/ml; 2 sata), karnozolom ili karnozolnom kiselinom (3,125-50 $\mu$ g/ml; 2 sata); upala izazvana s LPS-om.	Etanolni ekstrakt, karnozol i karnozolna kiselina značajno su snizili proizvodnju dušikovog oksida.
Khan i sur., 2014.	PC12 stanice pred-tretman s 1,8-cineolom (24 sata) i potom stimulirane na upalu s amiloidom A $\beta$ (25-35), 24 sata.	1,8-cineol je poboljšao vijabilnost stanica; inhibirao je proizvodnju upalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, snizio razinu dušikovog oksida, smanjio ekspresiju NOS-2, COX-2, NF- $\kappa$ B.
Mengoni i sur., 2011.	Pred-tretman miševa (topikalno) s etanolnim ekstraktom ružmarina (10-1000 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> ), jednokratno; nakon 30 min kutana upala izazvana s PMA.	Etanolni ekstrakt ružmarina smanjio je edem, učinak sličan kontroli (indometacin), smanjena infiltracija tkiva leukocitima, smanjena ekspresija IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ .
Mengoni i sur., 2011.	Pred-tretman miševa (topikalno) s karnozolom (2-20 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> ) ili karnozolnom kiselinom (2-20 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> ), jednokratno; nakon 30	Karnozol i karnozolna kiselina smanjile edem, učinak bolji od kontrole (indometacin), smanjena

	min kutana upala izazvana s PMA.	infiltracija tkiva leukocitima, smanjena ekspresija IL-1 $\beta$ i TNF $\alpha$ .
Lee i sur., 2017.	Dermatitis kod miševa izazvan s PA, nakon 3 sata topikalna primjena 10 $\mu$ M karnozol (0,05 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> ), 3x tjedno, 4 tjedna.	Karnozol je smanjio debljinu uha i doveo do blaže kliničke slike; smanjena je težine limfnih čvorova, snižena je razina neutrofila, IgE, citokina IL-1 $\beta$ i TNF $\alpha$ ; karnozol je inhibirao fosforilaciju STAT3.

Provedena je i klinička studija na zdravim pojedincima koja je ispitala protuupalni učinak ekstrakta ružmarina i usporedila ga s ekstraktom nevena (*Calendula officinalis* L.) (Fuchs i sur., 2005). Studija je dizajnirana kao placebo kontrolirana, randomizirana jednostruko slijepa studija u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Sudjelovalo je 20 pojedinaca (16 žena i 4 muškarca) u dobi između 18 i 40 godina. Ispitanici su se u tijeku istraživanja smjeli tuširati, ali kupanje te nanošenje detergenata ili emolijensa na leđa moralo se izbjegavati. Testirali su se obojeni i neobojeni ekstrakti ružmarina ili nevena koji su uklopljeni u baznu kremu u koncentraciji od 5%. Pozitivna kontrola bio je hidrokortizon (0,25%), a negativna kontrola samo bazna krema. Iritativni kontaktni dermatitis bio je induciran 0,5% natrijevim lauril sulfatom (SLS; 50  $\mu$ l) koji se nanosio dva puta dnevno tijekom 30 minuta u intervalima od 3 sata tijekom 4 dana studije uvijek u isto vrijeme, a mjesto nanošenja bila je sredina leđa uz kralježnicu. Deset minuta nakon nanošenja iritansa nanosili bi se tretmani (50  $\mu$ l svakog od pripravaka), a jedno mjesto ostavljeno je prazno kao kontrola. Peti dan ispitivanja provedena su završna mjerenja na ovim točkama. Rezultati su procjenjivani vizualno, tevametrijskim mjerenjem transepidermalnog gubitka vode koji je predstavljao funkcionalnost barijerne funkcije i intenziteta eritema kromametrijski. Sami pripravci nisu izazvali iritaciju. Svi ispitivani pripravci, uključujući baznu kremu bez ekstrakta i hidrokortizon, doveli su do značajnog suzbijanja iritacije izazvane SLS-om u usporedbi s netretiranom kontrolom. Najbolji učinak uočen je kod kreme s neobojeanim ekstraktom ružmarina i hidrokortizonom kao pozitivnom kontrolom. Kromametrijom je dokazano manje crvenilo, a tevametrijska analiza djelomično je potvrdila te rezultate. Transepidermalni gubitak vode bio je snižen kod svih testiranih pripravaka u odnosu na netretiranu kontrolu, a najbolji rezultat ponovno je pokazala krema s neobojeanim ekstraktom ružmarina te s obojenim ekstraktom nevena. Intenzitet eritema, koji reflektira upalu, mjeren kromametrijski bio je nešto značajnije snižen nakon nanošenja kreme s neobojeanim ekstraktom nevena, čak više nego kod pozitivne kontrole, hidrokortizona (Fuchs i sur., 2005).

Spomenuta istraživanja pokazuju da ekstrakt ružmarina ima protuupalni učinak, koji se očituje smanjenjem upalnih procesa i snižavanjem broja leukocita na mjestu upale. Mehanizam protuupalnog djelovanja ružmarina uključuje snižavanje razine upalnih citokina IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  i razine dušikovog oksida. Potvrđeno je da karnozol i karnozolna kiselina te 1,8-cineol prisutan u eteričnom ulju ružmarina imaju protuupalno djelovanje. Toksični učinci ekstrakta ružmarina, karnozola, karnozolne kiseline i 1,8-cineola nisu utvrđeni te stoga treba nastaviti daljnja istraživanja protuupalnog djelovanja ovih metabolita ružmarina.

## **4.4. Upotreba ružmarina za cijeljenje rana**

### **4.4.1. Cijeljenje rana**

Cijeljenje rana je dinamičan proces koji rezultira obnavljanjem anatomske barijere kože koja je bila oštećena zbog bolesti ili opekline (Lazarus i sur., 1994). Može se podijeliti u nekoliko faza koje su pažljivo usklađene inhibicijom ili aktivacijom određenih faktora. Odmah nakon ozljede započinje proces cijeljenja. Prva faza je upalna faza koju određuje aktivacija urođenog imuniteta. Slijedi proliferativna faza koja uključuje reepitelizaciju i angiogenezu. Posljednja faza je faza remodeliranja koja određuje izgled tkiva nakon zacjeljivanja. Patološka oštećenja ovog procesa mogu dovesti do perzistentnih ulceracija što je vrlo često kod dijabetičara (Kasuya i Tokura, 2014).

Mnogi su pripravci korišteni i ispitivani kako bi se proces cijeljenja rana ubrzao te kako bi se smanjile njegove moguće negativne posljedice. Topikalni antibiotici i antimikrobni lijekovi mogu smanjiti rizik infekcije tijekom cijeljenja rane. U posljednjih nekoliko godina antibiotici su postali manje učinkoviti zbog razvoja rezistentnih sojeva bakterija. Zbog toga je korištenje prirodnih antimikrobnih sredstava izoliranih iz biljaka vrlo dobra strategija za prevenciju bakterijskog rasta i poticanje zarastanja rane. Neven je biljka kod koje je taj učinak dokazan i klinički (Givol i sur. 2019). Uloga biljaka u procesu cijeljenja je dezinfekcija te stvaranje optimalnih uvjeta za prirodni proces cijeljenja. Također, što se tiče nuspojava prirodni lijekovi su bolja opcija za cijeljenje rana zbog svojih minimalnih nuspojava i isplativosti u odnosu na sintetske spojeve (Hadizadeh-Talasaz i sur., 2022).

### **4.4.2. Ispitivanja primjene ružmarina za cijeljenje rana**

Iako je provedeno nekoliko studija učinka pripravaka ružmarina na cijeljenje akutnih rana, u prvom redu opekline, većinom je fokus istraživača na kroničnim ranama poput dijabetičkih rana.

Ibrahim i suradnici (2022) proveli su *in vitro* ispitivanje procjene cijeljenja rana heksanskog ekstrakta ružmarina. Ekstrakt je pripremljen iz svježih listova te uparen do suha. Pokus je proveden na keratinocitima. Keratinociti su stanice koje se nalaze u epidermi te se koriste kao model koji predstavlja kožu. U pokusu keratinocitima je izazvana rana struganjem te su potom tretirani heksanskim ekstraktom ružmarina u koncentraciji od 10 µg/ml. Ekstrakt ružmarina doveo je do poboljšanja migracije i repopulacije keratinocita i značajno suzio zagrebanu površinu keratinocita u odnosu na kontrolu. Pri koncentraciji od 10 µg/ml heksanski ekstrakt ružmarina zatvorio je zagrebanu površinu  $91,85 \pm 5,1\%$ , u usporedbi s  $59,25 \pm 3,3\%$  kod kontrole. Autori su usporedili rezultate svog istraživanja s heksanskim ekstraktom ružmarina s dostupnim podacima za heksanski i etanolni ekstrakt nevena te zaključili da je ovo istraživanje pokazalo veću učinkovitost u zatvaranju rana heksanskog ekstrakta ružmarina u odnosu na heksanski i etanolni ekstrakt nevena (Ibrahim i sur., 2022).

Abu-Al-Basal (2010) je ispitala učinkovitost vodenog ekstrakta i eteričnog ulja vršnih dijelova ružmarina na cijeljenje dijabetičkih rana na BALB/c miševima. U tom istraživanju prvo je miševima aloksanom induciran dijabetes. Nakon što je potvrđena hiperglikemija napravljeni su rezovi promjera 4 milimetra na leđima miševa. U istraživanje su uključene netretirana grupa zdravih miševa te netretirana grupa miševa s dijabetesom. Rane miševa kojima je izazvan dijabetes tretirani su intraperitonealnom injekcijom s 10 % vodenog ekstrakta ružmarina jednom dnevno u trajanju od 3 dana, dok je eterično ulje nanošeno topikalnom primjenom (25 µl/rani 2x na dan kroz 3 dana). Ukupno trajanje pokusa bilo je 15 dana (3 dana tretmana i 12 dana promatranja). Nakon 15 dana rane su vizualno promatrane te su mjereni i drugi parametri poput razine glukoze u krvi, tjelesne težine i postotka kontrakcije rane. Histološke analize područja rana provedeno je 6. i 15. dana nakon izazivanja rana. Opažena je značajna pozitivna razlika u cijeljenju dijabetičke rane između tretiranih i kontrolnih grupa. Kod životinja koje su tretirane 10% vodenim ekstraktom ružmarina i eteričnim uljem uočeno je smanjenje upale te je potaknuta kontrakcija rane, reepitelizacija, angiogeneza i odlaganje kolagena. Važno je napomenuti da je u tom istraživanju eterično ulje pokazalo bolji učinak na cijeljenje rana od vodenog ekstrakta (Abu-Al-Basal 2010).

Bolji učinak eteričnog ulja na cijeljenje rana može se pripisati topikalnoj primjeni jer je na taj način postignut lokani učinak čime se ubrzalo djelovanje na cijeljenje rane jer se zaobilazi sistemsko kruženje lijeka do mjesta djelovanja. Također, eterično ulje, zbog svog lipofilnog

karaktera, lako penetrira rožnati sloj kože i brzo dolazi do mjesta djelovanja. Hidrofobna svojstva pomažu zadržati vlažnost kože što je pokazano kao vrlo važna strategija u procesu cijeljenja rana, a poznato je i njegovo antimikrobno djelovanje koje pomaže sprječavanju razvoja infekcije te potiče prelazak u proliferativnu fazu cijeljenja.

Zanimljivo istraživanje proveli su Nejati i suradnici (2015). Pokus su proveli na Wistar štakorima kojima su operativno zarezali rane dimenzija 15 x 15 mm na leđima. Rane se dodatno inficirali s 0,5 ml otopine koja je sadržavala gljivicu vrste *Candida albicans* ( $1,5 \times 10^7$  CFU (*colony forming unit*)). *Candida albicans* je komenzalni patogen kože i mukoze, unatoč tomu stvara se sve veća rezistencija sintetskih lijekova na infekcije *Candidom* što je velik problem posebno kod imunokompromitiranih pacijenata te se stoga razmatraju druge opcije poput biljnih pripravaka kao prikladne alternative. Ova studija pokušala je zato ispitati učinak topikalno primijenjene kreme s uklopljenim eteričnim uljem ružmarina na kožne rane inficirane *Candidom albicans*. Eterično ulje pripremljeno je hidrodestilacijom iz osušenih listova ružmarina. Prethodno je pokazano da je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) eteričnog ulja ružmarina za *Candidu* 10 mg/ml. Štakori su raspoređeni u tri skupine i to: kontrolna skupina te dvije skupine kojima je na inficirane rane nanesena krema s eteričnim uljem ružmarina u koncentracijama od 2% odnosno 4%. Baza za kremu s eteričnim uljem bio je Eucerin, koji je ujedno bio i kontrolni pripravak. Kreme su nanošene jednom dnevno u trajanju od 20 dana.

Rezultati cijeljenja rana procijenjeni su s histološkog i mikrobiološkog gledišta te procjenom postotka smanjenja rane. Analiza ukupnog broja kvasaca provedena je 4., 8., 12., 16. i 20. dana eksperimenta. Broj CFU se smanjivao s vremenom u svakoj od grupa, ali značajno brže kod grupe koja je tretirana kremom s eteričnim uljem ružmarina u odnosu na kontrolu. Procjena kontrakcije rane pokazala je da cijeljenje rana u skupini kojoj su rane tretirane s kremom koja je sadržavala 4% ulja ružmarina bilo brže u odnosu na ostale skupine te je cijeljenje završeno u potpunosti već nakon 16. dana tretmana. Histološka analiza rana pokazala je povećan broj makrofaga i fibroblasta te pojačanu vaskularizaciju i odlaganje kolagena kod eksperimentalnih grupa (posebice kod grupe koja je tretirana s kremom koja je sadržavala 4% ulje ružmarina) u odnosu na kontrolu. Također, bila je vidljiva potpuna epitelizacija 20. dana nakon indukcije rane što nije bilo zapaženo kod kontrolne grupe (Nejati i sur., 2015).

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su da eterično ulje ružmarina ima antimikrobna svojstva te da osim djelovanje na *Candidu* pozitivno djeluje i na cijeljenje inficiranih rana, a učinak je bio ovisan o dozi. Histološkom analizom utvrđen je manji broj neutrofila kod tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno utvrđeno je da ulje ružmarina smanjuje broj upalnih stanica te tako smanjuje infekciju, koja inače može produljiti proces

cijeljenja, te ubrzava prelazak u proliferativnu fazu zacjeljivanja rane. S druge strane uočen je veći broj makrofaga, nakon tretmana kremom s uljem ružmarina, koji lučenjem faktora rasta i poticanjem angiogeneze potiču reepitelizaciju. Može se zaključiti da ulje ružmarina pokazuje čak dva mehanizma ubrzanja cijeljenja rana, inhibiciju upale te proliferaciju fibroblasta stimuliranih makrofagima (Nejati i sur., 2015).

Stoga je potrebno nastaviti istraživati ulogu eteričnog ulja ružmarina u cijeljenju rana. Nejati i suradnici (2015) uklopili su eterično ulje u oblik kreme te je ono i dalje zadržalo svoj učinak zacjeljivanja rane što je vrlo bitno ukoliko se misli nastaviti s ispitivanjem na ljudima jer su kreme gotov tehnološki oblik te puno lakše za korištenje od samog eteričnog ulja. Daljnja istraživanja trebalo bi usmjeriti prema ispitivanju različitih doza eteričnog ulja, koja bi imala učinak na cijeljenje rana, a da pritom nemaju štetne učinke.

Sljedeće istraživanje procjenjivalo je djelovanje eteričnog ulja ružmarina i čajevca (*Melaleuca alternifolia*) i njihovih kombinacija na cijeljenje rana u štakora (Labib i sur., 2019). Ova studija posebno je zanimljiva zato što su eterična ulja bila uklopljena u kitozanski topikalni pripravak što daje uvid u različite formulacije kojima je moguće poboljšati učinke samog eteričnog ulja te utjecaj tog tehnološkog oblika na učinak cijeljenja rane. Kitozan ima otprije poznate vrlo dobre učinke na proces cijeljenja rana. Pozitivno nabijena površina kitozana može vezati bakterijske negativno nabijene grupe čime postiže povoljan antibakterijski učinak. Zbog toga ima i sinergistički učinak s uklopljenim eteričnim uljem što ubrzava proces cijeljenja rane. U istraživanju eterično ulje ružmarina i čajevca bilo je u koncentraciji 10% (v/v). Analiza plinskom kromatografijom, GC/MS pokazala je da oba ulja imaju visok udio oksigeniranih monoterpena. U eteričnom ulju čajevca dokazano je 16 komponenti, terpinen-4-ol (45,23%),  $\gamma$ -terpinen (23,07%),  $\alpha$ -terpinen (10,84%), terpinolen (3,50%),  $\alpha$ -terpineol (2,95%), 1,8-cineol (2,88%) i  $\alpha$ -pinen (2,55%). Glavne komponente eteričnog ulja ružmarina bile su 1,8-cineol (53,67%),  $\alpha$ -pinen (13,94%), kamfor (10,43%) i kamfen (3,78%).

Prvo je štakorima načinjena rana od 2 cm<sup>2</sup> uklanjajući djelić kože na anteriornoj dorzalnoj strani tijela. Štakori su zatim podijeljeni nasumično u 6 grupa i to: negativna kontrola (s ranom), pozitivna kontrola (Nolaver, proizvod poznat po svojim svojstvima cijeljenja rana), grupa kojoj je nanesen samo kitozan, grupa kojoj je naneseno 10% eterično ulje čajevca uklopljeno u kitozanu, grupa kojoj je naneseno 10% eterično ulje ružmarina uklopljeno u kitozanu te posljednja grupa kojoj je nanošena 1:1 mješavina oba ulja u kitozanu. Svi pripravci naneseni su jedanput dnevno tijekom perioda od 14 dana. Postotak kontrakcije rane mjeren je 7. i 14. dana pokusa te je pokazano da su eterična ulja čajevca, ružmarina i mješavina eteričnih ulja dovela do povećanja postotka kontrakcije rane za 2,43, 2,41 odnosno 2,82 puta već 7. dana



eksperimenta što je bilo značajno više u odnosu na negativnu kontrolu, a značajno povećanje kontrakcije zabilježeno je i 14. dana u odnosu na negativnu kontrolu. Topikalna aplikacija oba eterična ulja uklopljena u kitozan uzrokovala je veći porast kontrakcije rane u odnosu na ostale grupe pa i pozitivnu kontrolu. Mikroskopska analiza uzoraka rane 7. dana pokusa kod pozitivne kontrole (Nolaver) pokazala je potpunu reepitelizaciju s velikom površinom dermalnog sloja građenog od staničnog granularnog tkiva, fokalnim infiltratima upalnih stanica, novostvorenim krvnim žilama i nekoliko aktiviranih dlačnih folikula. U rana životinja koje su tretirane s kitozonom, u koji su bila uklopljena 10 % eterična ulja (ili ružmarina ili čajevca), proces cijeljenja rane bio je usporeniji te je zabilježena nepotpuna reepitelizacija i nešto granulacijskog dermalnog tkiva, difuzne upalne stanice i mnogo krvnih žila. Kod grupe kojoj je nanesen kitozan s uklopljena oba eterična ulja rezultati su bili slični pozitivnoj kontroli. Na uzorcima kože pozitivne kontrole 14. dana uočena je potpuna reepitelizacija i ubrzano cijeljenje rane, visoka količina kolagenskih vlakana i aktiviranih folikula dlaka, a manja područja fibroznog granulacijskog tkiva. Uzorci kože grupe koja je tretirana kitozonom s uklopljenim uljem čajevca imali su potpunu reepitelizaciju, ali s širokim područjima staničnog, a ne fibroznog granulacijskog tkiva u dermisu i bogatstvo malih kapilara. Uočena su i fokalna područja subepitelarnih hemoragija. Zanimljivo je da grupa koja je tretirana kitozonom s uklopljenim eteričnim uljem ružmarina nije pokazala potpunu reepitelizaciju epidermalnog sloja. Dapače, uočeno je stvaranje ulkusa i infiltrata upalnih stanica i manje područje staničnog granulacijskog tkiva u dermalnom sloju, također bogato upalnim stanicama s fokalnim hemoragijama. Uzorci kože grupe tretirane s kitozonom s uklopljena oba eterična ulja imali su naprednije zarastanje rane slično pozitivnoj kontroli te je zabilježena potpuna reepitelizacija epidermalnog sloja s nekoliko degenerativnih promjena u nekim keratinocitima. Dermalni sloj pokazao je veliku površinu zrelih kolagenskih vlakana zajedno s mnogobrojnim aktiviranim dlačnim folikulima, a samo manji broj infiltrata upalnih stanica i granulacijskog tkiva s fibroblastima.

U ovom istraživanju, u ožiljnom tkivu praćeni su parametri oksidacijskog stresa. Razine GSH bile su značajno više u tkivima grupe životinja koje su tretirane s kitozonom u kojega su uklopljena oba eterična ulja. U ožiljnom tkivu životinja tretiranih mješavinom eteričnih ulja izmjerena je najviša razina GSH, 27,05 puta veća u odnosu na negativnu kontrolu. Važnost ovog istraživanja je što je, osim zacjeljivanja rana, pokazalo antioksidativnu aktivnost pripravaka kao važan aspekt procesa cijeljenja rane (Labib i sur., 2019.).

Rezultati ovog istraživanja upućuju na potrebu za istraživanjem mogućeg sinergističkog djelovanja ružmarina s drugim biljkama sličnog sastava, posebice onima koja sadržavaju

eterično ulje bogato oksigeniranim monoterpenima kao što je čajevac jer je moguće aditivno djelovanje sličnim mehanizmima koji bi poboljšali učinak pripravka.

Ispitivanja učinka ekstrakta ružmarina i eteričnog ulja na cijeljenje rana na pokusnim životinjama prikazani su Tablicom 4.

Tablica 4. Tablični prikaz provedenih istraživanja učinka ekstrakta ružmarina ili eteričnog ulja ružmarina na cijeljenje rana u pokusnih životinja.

Autor	Priprema ružmarina/ ispitivanje	Rezultati istraživanja
Abu-Al-Basal, 2010	Dijabetički miševi (dijabetes induciran s aloksanom); napravljene rane na leđima; tretman s (a) 10% vodeni ekstrakt ružmarina, i.p., 3 dana; (b) eterično ulje, topikalno, 25 µl/rani/2x na dan tijekom 3 dana.	Vodeni ekstrakt i eterično ulje potiču cijeljenje rane (bolji učinak od kontrole); uočeno smanjenje upale, bolja kontrakcija rane, reepitelizacija i odlaganje kolagena; eterično ulje ima bolji učinak od vodenog ekstrakta.
Nejati i sur., 2015	Štakorima zarezane rane na leđima i inficirane s <i>Candidom albicans</i> ; tretman s kremom s uklopljenim 2% i 4% eteričnim uljem; tretman rana jednom dnevno tijekom 20 dana.	Tretman s kremom s 2% i 4% eteričnog ulja s vremenom smanjio je broj kvasaca, poboljšao kontrakciju rana, povećao broj makrofaga, fibroblasta i pojačao vaskularizaciju i odlaganje kolagena; 20. dan potpuna epitelizacija. Krema s 4% eteričnog ulja učinkovitije je smanjila upalu i ubrzala cijeljenje rane.
Labib i sur., 2019	Štakorima napravljene rane uklanjanjem djelića kože; eterično ulje ružmarina i čajevca (a) pojedinačno (10%) i (b) u kombinaciji (5% +5%) uklopljeni u kitozanski pripravak; miševi tretirani 1x dnevno tijekom 14 dana.	Priprema s oba eterična ulja postigao je brže cijeljenje rane, reepitelizaciju epidermalnog sloja; zajednička primjena eteričnih ulja ružmarina i čajevca-sinergistički učinak.

Također, provedena je i klinička studija u kojoj je ispitan učinak kreme s ružmarinom na cijeljenje rane nakon epiziotomije prvorođkinja (Hadizadeh-Talasaz i sur., 2022). Epiziotomija je tip kirurškog reza kojim se povećava vaginalni otvor kako bi se potpomogao izlazak fetusa i spriječila teža oštećenja i cijepanja perinealnog područja. Utvrđeno je da ovaj tip reza uvelike povećava rizik od komplikacija poput perinealne rupture, boli, infekcije rane i slično. Tako da, iako je ovo najučestaliji kirurški zahvat u obstetriciji, ova metoda se danas sve manje koristi zbog smanjenja razine dokaza o protektivnim učincima. Ipak, i dalje se koristi u velikom broju zemalja u razvoju.

U Iranu, između 2014. i 2015. godine, provedena je trostruko slijepa randomizirana klinička studija na 80 trudnih prvotkinja koje su nasumično podijeljene u dvije grupe. Prva grupa nanosila je placebo, dok je druga grupa koristila kremu s ružmarinom u trajanju od 10 dana nakon poroda, dva puta dnevno. Nakon uklanjanja otapala iz alkoholnog ekstrakta ružmarina, suhi ostatak pomiješan je s baznom kremom kako bi se dobila 3% krema s ružmarinom. Placebo krema pripravljena je od iste bazne kreme s dodatkom nekoliko kapi smeđe jestive boje. Prema bolničkoj rutini majkama su dostupni bili i antibiotici i analgetici prema potrebi zbog pojave iscjetka ili boli čiju su upotrebu morale evidentirati. Ukoliko je došlo do pojave komplikacija, u vidu treskavice ili povišene tjelesne temperature, osjetljivosti na kremu, jakih bolova, osjećaja peckanja ili svrbeža, pojave gnojnog iscjetka i slično, majke bi bile isključene iz pokusa.

Cijeljenje rane uspoređivano je s REEDA (*redness, edema, ecchymosis, discharge, approximation of the wound edges*) skalom. To je alat, koji uzimajući u obzir crvenilo, edem, ekhimozu, iscjedak i približavanje rubova rane, procjenjuje cijeljenje epiziotomološke rane. Ovih pet faktora boduje se s maksimalno po tri boda svaki te se ukupni rezultat procjenjuje od 0 što odgovara maksimalnom poboljšanju do 15 što označava minimalno poboljšanje.

Na početku ispitivanja nije bilo osobitije razlike između REEDA ocjena obje grupe, dok je 10. dan studije uočeno veće smanjenje REEDA rezultata u majki koje su nanosile kremu s ružmarinom u odnosu na placebo skupinu. Srednja vrijednost REEDA bila je čak 4,4 puta manja kod grupe koja je koristila kremu s ružmarinom, u odnosu na placebo skupinu. Zanimljivo je istaknuti da je cijeljenje rane kod kontrolne grupe tek 10. dan bilo jednako kao kod grupe koja je nanosila kremu s ružmarinom već 4. dan, što znači da je krema s ružmarinom ubrzala cijeljenje rane za šest dana u odnosu na kontrolu. Četvrti dan nakon poroda, procjena 4 od 5 kriterija cijeljenja nije pokazala statistički značajnu razliku, ali došlo je do razlike u rezultatima iscjetka koji je pokazan kao manji kod grupe koja je primjenjivala kremu s ružmarinom. Nakon još šest dana tj. deseti dan eksperimenta došlo je do poboljšanja prema svim kriterijima, osim u usporedbi edema gdje nije bilo osjetne razlike između dvije grupe, što su autori zaključili da može biti i posljedica vrlo malog uzorka žena. Većina žena iz obje grupe koristila je prepisane antibiotike redovno tako da nije postojala drastična razlika u upotrebi i korištenju antibiotika ili analgetika između skupina. Također, nisu opažene nuspojave prilikom upotrebe kreme s ružmarinom, niti placebo kreme. Ovi pozitivni rezultati studije mogu se pripisati protuupalnim i antioksidativnim učincima ružmarina i njegovim metabolitima (Hadizadeh-Talasaz i sur., 2022).

## 4.5. Upotreba ružmarina u sprječavanju starenja kože

### 4.5.1. Starenje kože

Dermalni ekstracelularni matriks sastavljen je od kolagena, elastina i hijaluronske kiseline. Vlaknasti protein kolagen odgovoran je za čvrstoću kože, dok elastin daje elastičnost. Mukopolisaharidi, uključujući primarno i hijaluronsku kiselinu, koži omogućuju vlažnost i glatkoću. Starenje može biti intrinzično i ekstrinzično. Intrinzično ili prirodno starenje naziva se još i kronološko starenje jer nastaje pod utjecajem vremena. To je kontinuiran nepovratan fiziološki proces na koji ne možemo mnogo utjecati. Karakteriziran je tankom i atrofičnom kožom, gubitkom elastičnosti i vlažnosti kože. Ekstrinzično starenje složen je i multifaktorijalan proces prouzrokovan vanjskim utjecajima od kojih primarno sunčevim ultraljubičastim (UV) zračenjem, prvenstveno UVB zračenjem (280-315 nm) koje dovodi do značajnih promjena u izvanstaničnom matriksu. Fotoostarjela koža karakterizirana je zadebljanjem epidermisa i pojavom pigmentacijskih promjena. Promjene u dermisu su degeneracija kolagena i vezivnog tkiva te nakupljanje abnormalnih nakupina elastičnih vlakana i promjene u mikrovaskularizaciji. Sve to uvjetuje se pojavom bora i suhoće kože, gubitkom elastičnosti te teleangiektazijama (Džidić, 2022). Osim znakova fotostarenja, opetovano pretjerano izlaganje UV zračenju može dovesti i do opekline, eritema pa čak i kancerogeneze. Zračenje potiče oksidativni stres i nastajanje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva koji dovode do peroksidacije lipida i oštećenja DNA i proteina. Slobodni radikali, kisikovi i dušikovi spojevi, induciraju nastajanje matriksnih metaloproteinaza koje su ključni enzimi u degradaciji proteina, posebice kolagena. UVB zračenje djeluje i na koncentraciju antioksidansa u koži i time ograničava mogućnost kože da se obrani od novonastalih slobodnih radikala te zbog toga potiče proces upale.

Prva linija prevencije fotostarenja kože je izbjegavanje izlaganja suncu te uporaba krema za sunčanje obogaćenih fizičkim ili organskim filtrima ili njihovom kombinacijom. Ovi filtri reflektiraju ili apsorbiraju sunčevo zračenje, ali nedostaje im mogućnost djelovanja na biokemijske ili fiziološke patološke procese koji se odvijaju u pozadini izlaganja UV zračenju. U literaturi se polifenoli spominju kao mogući fotoprotektivni spojevi zbog svoje strukture i apsorptivnog spektra koji pokazuje mnoge sličnosti s organskim apsorbentima koji se koriste u komercijalnim kremama za sunce. Osim ovih svojstava, polifenoli posjeduju i brojne druge biološke učinke kao što su antioksidativni, protuupalni, imunomodulatorni i antikancerogeni koji su dodatni benefit u kontekstu minimiziranja štete prouzrokovane UV zračenjem (Takayama i sur., 2022).

#### 4.5.2. Ispitivanja primjene ružmarina u prevenciji starenja kože

Provedena su *in vitro* ispitivanja utjecaja heksanskog ekstrakta ružmarina na aktivnosti enzima elastaze, kolagenaze i hijaluronidaze koji posreduju u procesu starenja kože (Ibrahim i sur., 2022). Heksanski ekstrakt pripremljen je maceracijom svježih samljevenih listova biljke koja je nakon ekstrakcije uparena do čvrstog zelenog masnog ostatka (2,1% w/w). GC-MS analizom ekstrakta potvrđena je prisutnost oksigeniranih monoterpena, seskviterpena, dugolančanih alkana i triterpenoida. Od triterpenoida dominirali su  $\alpha$ -amirin (24,4%) i  $\beta$ -amirin (14,4%), a glavna monoterpenska komponenta bila je  $\alpha$ -pinen (1,73%). Utvrđeno je i prisustvo kamfora, 1,8- cineola, verbenona i borneola.

Inhibicija enzima elastaze i kolagenaze mjerena je fluorimetrijski, a hijaluronidaze turbidimetrijski. Pripremljeni heksanski ekstrakt inkubiran je s ispitivanim enzimom u različitim koncentracijama. Rezultati su prikazani kao  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) tj. koncentracija ekstrakta koja je potrebna da se inhibira 50 % aktivnosti enzima. Ekstrakt je pokazao dobru učinkovitost ovisnu o dozi za inhibiciju elastaze, gotovo usporednu s referentnim standardom, 1,10-fenantrolinom.  $IC_{50}$  anti-elastazna vrijednost heksanskog ekstrakta iznosila je 57,6  $\mu\text{g/ml}$ , dok je standard 1,10-fenantrolin imao  $IC_{50}$  od 25,6  $\mu\text{g/ml}$ . Zanimljivo je istaknuti da je pronađeno da enzim elastaza aktivira prekursore metaloproteinaze što dovodi do daljnjih oštećenja izvanstaničnog matriksa, također cijepa i proteoglikan dekorin koji inače štiti kolagen od metaloproteinaza što ga posljedično čini podložnijim razgradnji. U tome leži velika važnost elastaze u procesu starenja kože jer njezina inhibicija ne samo da sprječava razgradnju elastina, već i sprječava daljnje korake razgradnje ekstracelularnog matriksa. Anti-kolagenazni te anti-hijaluronidazni učinci ekstrakta bili su nešto slabiji.

U ovom istraživanju provedeno je i *in silico* ispitivanje vezanja između sastavnica ekstrakta ružmarina i ispitivanih enzima. Potvrđeno je da od devet sastavnica heksanskog ekstrakta ružmarina, dva imaju vrlo visoku učinkovitost vezanja za aktivno mjesto elastaze, čak bolje i od kontrole, 1,10-fenantrolina. Jedna od sastavnica koja se dobro veže za enzim elastazu je i verbenon, za kojeg je već otprije poznato da je inhibitor elastaze u pikomolarnim koncentracijama. Verbenon stvara vodikovu vezu preko karbonilne grupe s amidnim dušikom, a zbog svoje malene veličine lako ulazi u aktivno mjesto enzima i stvara nekovalentne Van der Waalsove veze. Kolagenaza je po svojoj strukturi cink metaloproteinaza te je keliranje cinka ključno za njenu inhibiciju pa iako je verbenon stvorio dvije vodikove veze s dušicima iz enzima te također dodatne nekovalentne veze, nije uspio dovesti do značajne inhibicije enzima. Što se tiče inhibicije hijaluronidaze, iako je nastala vodikova veza s hijaluronidazom jača nego

ona verbenona s elastazom, nije došlo do inhibicije enzima zbog nepovoljnog položaja unutar aktivnog mjesta enzima. Od ispitivanih sastavnica ekstrakta, kamfor je pokazao najbolju aktivnost vezanja za kolagenazu, no niti ona nije bila dovoljna za dostatnu inhibiciju (Ibrahim i sur., 2022.).

Ibrahim i suradnici (2022) osim spomenutih *in vitro* i *in silico* ispitivanja proveli su *in vivo* ispitivanje učinak lipidnih nanokapsula s uklopljenim heksanskim ekstraktom ružmarina na boranje kože nastalo pod utjecajem UVB zračenja. Pozitivna kontrola bila je grupa miševa koji su bili izloženi samo zračenju tijekom 10 uzastopnih dana. Ostale grupe životinja bile su tretirane jedan sat prije UVB zračenja ili s ekstraktom ružmarina, ili samo s gelom, ili s gelom s lipidnim nanočesticama s 4% ili 10% ekstraktom ružmarina. Ispitivanje je pokazalo da je nanošenje heksanskog ekstrakta ili gela s lipidnim nanokapsulama s 4 % i 10 % heksanskog ekstrakta ružmarina snizilo razine metaloproteinaze 1 (MMP1), elastaze i drugih upalnih markera poput neprilizina i granulocitno-makrofagnog stimulatornog faktora (GM-CSF) u odnosu na pozitivnu kontrolu. Histološkim pregledom kod životinja tretiranih UVB zračenjem utvrđene su promjene kao što su zadebljanje epidermisa i promjene u dermisu, kao i infiltracija upalnih stanica u odnosu na negativnu, neizloženu kontrolu. U životinja tretiranih ekstraktom ružmarina i lipidnim nanokapsulama s 4 % i 10 % heksanskog ekstrakta ružmarina uklopljenih u gel utvrđeno je poboljšanje tih parametara. Zanimljivo je istaknuti da  $\alpha$ -amirin (koji je u istraživanju GC-MS analizom utvrđen kao glavna sastavnica pripremljenog ekstrakta) u prethodnim istraživanjima nije pokazao ovaj učinak te se može zaključiti da je zabilježen učinak ekstrakta u ovom istraživanju rezultat sinergističkog djelovanja cjelokupnog ekstrakta pa čak i manje zastupljenih sastavnica (Ibrahim i sur., 2022.).

Takayama i suradnici (2022) fokusirali su se na učinak ružmarina na fotoostarjelu kožu i prevenciju oksidativnog stresa prouzrokovanog UVB zračenje. Nakon pripreme 80% etanolnog ekstrakta maceracijom iz suhih listova ružmarina, ekstrakt je podvrgnut testiranjima poput određivanja ukupnih polifenola, određivanja zaštitnog faktora (SPF, *sun protection factor*) metodom prema Mansuru te određivanja antioksidativnog kapaciteta. Potom je ekstrakt uklopljen u emugel u koncentraciji 5 % (m/m). Emugel je imao zadovoljavajuća senzorna i organoleptička svojstva, prije i nakon uklapanje biljnog ekstrakta, te pH od  $5,3 \pm 0,21$  što je prikladno za nanošenje na kožu. Bezdlaki miševi podijeljeni su u grupe i to: grupa koja nije izložena UVB zračenju, grupa izložena UVB zračenju, grupa izložena UVB zračenju nakon nanošenja kontrolnog emugela i grupa izložena UVB zračenju nakon nanošenja emugela s uklopljenim 5% ekstraktom ružmarina. Grupe koje su tretirane emugelom mazane su s 0,5 g emugela svakih 6 sati i to tri puta prije izlaganja UVB zračenju i jedanput nakon izlaganja.

UVB izvor svjetlosti bila je svjetlost koja emitira kontinuirani spektar valnih duljina u rasponu od 270 do 400 nm.

Radi otkrivanja mogućih edema nastalih pod utjecajem UVB zračenja prvo je procjena težina kože, a potom je analizirana aktivnost enzima mijeloperoksidaze. UVB zračenje uzrokovalo je 36 % povećanje težine kože u odnosu na kožu životinja koje nisu izložene UVB zračenju. Topikalno nanoseni ekstrakt ružmarina u emugelu doveo je do smanjenja upalnih parametara i edema na razinu gotovo jednaku koži neizloženih životinja. Slične je bilo i za broj neutrofila po miligramu kože. Broj neutrofila bio je znatno povećan nakon izlaganja UVB zračenju, ali emugel s ekstraktom ružmarina značajno je umanjio njihov broj. Ovime je dokazano protuupalno djelovanje topikalno nanesenog ekstrakta ružmarina, ali i njegov antiedematozni učinak. Također, UVB zračenje snizilo je razinu GSH za čak 45% nakon jednokratnog izlaganja. Kontrolni emugel nije uspio spriječiti smanjenje razine GSH, a emugel s uklopljenim ekstraktom jest, što se može pripisati ekstraktu ružmarina. Kako bi se potvrdio antioksidativni učinak ružmarina, dodatno su provedeni i ABTS i FRAP testovi na uzorcima kože životinja koji su pokazali da ekstrakt ružmarina ima dobra antioksidacijska svojstva. Potvrđeno je da uklopljen u emugel može vratiti razine antioksidansa na vrijednosti slične onima kod grupe koja nije bila izložena UVB zračenju (Takayama i sur., 2022). Može se zaključiti da ovakav topikalni oblik ekstrakta ružmarina može zaštititi kožu od oksidativnog stresa prouzrokovanog UV zračenjem.

Druga studija koja se bavila zaštitom kože od štetnih učinaka UVB zračenja ispitala je učinak kombinacije ekstrakta grejpa (*Citrus paradisi*) i ružmarina te njihovu aktivnost u prevenciji signalnih kaskada povezanih sa starenjem kože kao što su mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK), matriksne metaloproteinaze (MMP) i nuklearni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B) (Yoon i sur., 2019). Kombinacija ekstrakta grejpa i ružmarina mogla bi biti dobra u prevenciji i liječenju kožnih problema i bolesti posebice povezanih s izloženošću sunčevom UVB zračenju, no mehanizam djelovanja nije prepoznat, iako je vjerojatno on posljedica antioksidativne aktivnosti polifenola kojima su bogate obje biljke.

Iz suhih listova ružmarina i grejpa pripremljeni su etanolni ekstrakti te kasnije pomiješani u omjeru 1:1. HPLC analiza pokazala je da je karnozolna kiselina glavna fenolna sastavnica ekstrakta ružmarina, a kao sljedeći važan metabolit ističe se karnozol. U ekstraktu grejpa glavna sastavnica bio je narginin.

U *in vitro* dijelu studije najprije je ispitan učinak biljnog pripravka na vijabilnost HaCaT stanica. Stanice su tretirane s ekstraktom ružmarina i grejpa (10, 25, 50 i 100  $\mu$ g/ml) te inkubirane tijekom 24 sata. Učinak ekstrakta prikazan je kao postotak vijabilnih stanica u

odnosu na kontrolu. Stanična vijabilnost bila je veća od 80% za sve koncentracije do 50 µg/ml ekstrakta. Potom su stanice bile pred-tretirane s ekstraktom te izložene UVB zračenju jakosti 80 mJ/cm<sup>2</sup> koje je odgovaralo 50% staničnom oštećenju. Kombinacija ekstrakta ružmarina i grejpa pokazala je o dozi ovisan zaštitni učinak na HaCaT stanice smanjenjem UVB inducirane stanične smrti. Koncentracija od 50 µg/ml pokazala je protektivni učinak na stanice usporediv s pozitivnom kontrolom, epigalokatehin galat (EGCG) u koncentraciji od 50 µg/ml.

Pokazano je da u HaCaT stanica UVB zračenje izaziva indukciju ekspresije MMP 1, 2 i 8. Pred-tretman s 10, 25 i 50 µg/ml pripremljenog ekstrakta grejpa i ružmarina značajno je umanjilo ekspresiju tih metaloproteinaza. Također, dovelo je i do inhibicije ekspresije NF-κB prouzrokovane UVB zračenjem. Učinak je bio ovisan o dozi, a koncentracija od 50 µg/ml pokazala je učinak sličan onomu pozitivne kontrole. MAPK, uključujući Erk, JNK i P38, dokazano aktiviraju NF-κB. Za učinak protiv starenja važna je smanjena fosforilacija MAPK signalnog puta koja je i postignuta nakon pred-tretmana s ekstraktom ružmarina i grejpa (Yoon i sur., 2019).

Isti pripravak, kombinacija ekstrakta ružmarina i grejpa (1:1) korišten je i u *in vivo* studiji na muškim BALB/c miševima (Choi i sur., 2019). Za ispitivanje učinka topikalne primjene miševima je dorzalna površina tretirana s 150 µl uzorka biljnog pripravka u koncentraciji od 10 mg/ml, odnosno 50 mg/ml nakon čega je slijedilo UVB zračenje koje je postupno pojačano od MED 1 do MED 4. Kao pozitivna kontrola korišten je EGCG (10 mg/ml), a jedna grupa miševa tretirana je samo nosačem 1,3- butilen glikol s fiziološkom otopinom (3:7, v/v), dok je jedna skupina životinja bila izložena samo UVB zračenju. UVB zračenje izazvalo je pojavu bora, gruboću, suhoću, ljuskanje i crvenilo kože. Topikalna primjena pripravka ekstrakta grejpa i ružmarina prevenirala lezije prouzrokovane starenjem kože pod utjecajem UVB zračenja. Zadebljanje kože značajno je smanjeno u odnosu na grupu tretiranu samo nosačem. Također, znakovi eritema su značajno ublaženi kao i transepidermalni gubitak vode. Nadalje, određen je inhibitorni učinak na kolagenazu. Iako je izlaganje UVB zračenju dovelo do niske gustoće kolagena, tretman biljnim pripravkom pomogao je obnoviti smanjenje sadržaja kolagena u dermisu prouzrokovano zračenjem. Imunohistološka analiza provedena je kako bi se procijenila ekspresija pojedinih citokina i proteina u kožnim tkivima. Ekspresija MMP-1 i IL-1β bila je znatno manja u epidermisu uz tretman biljnim pripravkom, nego bez njega. Učinak je potvrđen i RT-PCR metodom te Western blot analizom koje su dokazale učinak inhibicije ovisan o dozi. Ovi podatci upućuju da je pripravak ekstrakta ružmarina i grejpa uspio smanjiti ekspresiju proteina povezanih s fotostarenjem, mehanizmom inhibicije MMP i IL-1β. Kako bi se razjasnio točan mehanizam učinka pripravka ekstrakta grejpa i ružmarina na



prevenciju fotostarenja, procijenjena je i fosforilacija mitogen aktiviranih protein kinaza (ERK, JNK i P38). UVB zračenje pojačalo je fosforilaciju P38, a ekstrakt ružmarina i grejpa u višoj koncentraciji je doveo do njenog smanjenja. Osim toga, tretman biljnim ekstraktom utjecao je i na fosforilaciju ERK i JNK, sugerirajući da je MAPK signalizacija izravno povezana sa zaštitom koju pruža pripravak ekstrakta ružmarina i grejpa.

Napravljen je i test inhibicije elastaze s pripravkom ekstrakta grejpa i ružmarina (1, 3, 10, 30  $\mu\text{g/ml}$ ). Rezultati su pokazali da pripravka značajno inhibira elastazu. Koncentracija od 30  $\mu\text{g/ml}$  ekstrakta pokazala je aktivnost inhibicije usporednu s EGCG koji je korišten kao pozitivna kontrola.

Istraživanja učinka ekstrakta ružmarina na starenje kože inducirano UVB zračenjem na pokusnim životinjama i *in vitro* prikazani su Tablicom 5.

Tablica 5. Tablični prikaz provedenih istraživanja učinka ekstrakta ružmarina na fotostarenje kože.

<b>Autori</b>	<b>Pripravak ružmarina/ispitivanje</b>	<b>Rezultati istraživanja</b>
Ibrahim i sur., 2022.	Heksanski ekstrakt ružmarina ( $\alpha$ -amirin glavna komponenta) inkubiran s enzimima: elastaza, kolagenaza i hijaluronidaza.	Heksanski ekstrakt inhibirao je enzim elastazu, slabiji učinci na inhibiciju kolagenaze i hijaluronidaze; utvrđeno da verbenon inhibira elastazu.
Ibrahim i sur., 2022.	Heksanski ekstrakt ružmarina uklopljen u lipidne nanočestice (4% i 10%); miševi tretirani jednom dnevno jedan sat prije izlaganja UVB zračenju tijekom 10 dana.	Ekstrakt je snizio razinu MMP i upalnih markera, smanjio zadebljanost kože i infiltraciju upalnih stanica. Inhibicija nije uočena prilikom primjene samog $\alpha$ -amirina.
Takayama i sur., 2022.	Etanolni ekstrakt uklopljen u emugel (5%), bezdlaki miševi zračeni s UVB, tretiran s 0,5 g emugela svakih 6 sati, 3 puta prije izlaganje zračenju i jedanput nakon.	Antiedematozni učinak, smanjenje upalnih parametara i broja neutrofila te smanjenje oksidativnog stresa.
Yoon i sur., 2019.	HaCaT stanice inkubirane s etanolnim ekstraktima ružmarina i grejpa (1:1) (10, 25, 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$ , 24 sata), stanice su izložene UVB zračenju (80 $\text{mJ/cm}^2$ )	Pripravak ružmarina i grejpa poboljšao vijabilnost stanica, inhibirao ekspresiju MMP, NF- $\kappa\text{B}$ te smanjio fosforilaciju MAPK (ERK, JNK i p38).
Choi i sur., 2019.	Etanolni ekstrakti ružmarina i grejpa (10 i 50 $\text{mg/ml}$ ), BALB/c miševima dorzalna površina tretirana s 150 $\mu\text{l}$ pripravka te zračeni s UVB.	Pripravak ružmarina i grejpa doveo do smanjenja zadebljanja kože, transepidermalnog gubitka vode i eritema kože. Smanjenje ekspresije MMP-1 i IL-1 $\beta$ te inhibicija elastaze.

Montenegro i suradnici (2017) proveli su epidemiološko istraživanje učinka eteričnog ulja ružmarina na hidrataciju i elastičnost kože nakon topikalne primjene. Eterično ulje ružmarina uklapalo se u nanostrukturirane lipidne nosače (NLC) kako bi se poboljšale karakteristike eteričnog ulja za topikalnu primjenu. NLC su pripravljene iz vodene i uljne faze. Eterično ulje sadržavalo je najveći udio 1,8- cineola, a od ostalih monoterpena ističu se još i  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen te kamfor. Kao kontrola korištene su čvrste lipidne nanočestice (*solid lipid nanoparticles*, SLN) s cetilnim palmitatom kao lipidnom komponentom. Testirane su dvije grupe NLC s uklopljenim eteričnim uljem ružmarina: one s konstantnim udjelom lipidne faze (7% m/m; kako je povećavan udio eteričnog ulja-tekuća lipidna komponenta, smanjivan je udio cetilnog palmitata-čvrsta lipidna komponenta) te one s konstantnim udjelom čvrste lipidne komponente (7% m/m) i promjenjivim udjelom eteričnog ulja (1 do 3%). Testovi disperzije veličine čestica pokazali su da su najuniformnije one NLC s konstantnim udjelom čvrste lipidne faze i 3% uklopljenog eteričnog ulja ružmarina te su zbog toga i odabrane kao najpovoljnije za uklapanje u gel i nastavak testiranja. NLC s 3% eteričnog ulja ružmarina pokazale su uniformnost veličine sa srednjom vrijednošću od oko 30 nm, a veći udio eteričnog ulja nije djelovao na raspršenost veličine čestica na skupinu većih i manjih kao što je kod ostalih bio slučaj. Zeta potencijal svih ispitivanih NLC bio je približno jednak te udio uklopljenog eteričnog ulja nije pokazao utjecaj na površinski naboj čestica.

Kao najprikladnija podloga odabran je gel kako bi se izbjegla mogućnost interferiranja i interakcija komponenti NLC s podlogom, što bi mogao biti slučaj kod složenijih podloga kao što su emulzije. Pripravljeno je šest gelova. Svi su gelovi izrađeni s karbopolom kao gelirajućim agensom i trietanolamin (TEA) kao sredstvom za neutralizaciju. Kao kontrola pripremljen je gel bez uklapanja eteričnog ulja ili NLC i jedan s uklopljenim SLN. Napravljena su dva gela s različitim koncentracijama slobodnog eteričnog ulja (1,5 % i 3%), te dva gela s različitim udjelom NLC s 3% eteričnog ulja (49,2% i 98,4%).

Istraživanje je provedeno na 10 zdravih ženskih osoba s normalnom do suhom kožom bez dermatoloških bolesti (prosječna dob  $53 \pm 4$  godine) tijekom jednog tjedna. Ispitivanje je bilo dvostruko slijepo, a ispitanice su gelove nanosile u približno jednakoj količini (2 mg) dva puta dnevno na stražnju stranu šake. U prvom dijelu ispitivanja nanosile su 4 od 6 gelova, a u drugom dijelu studije nakon mjesec dana preostala dva gela. Mjerenja elastičnosti i hidracije kože napravljena su prije ispitivanja te nakon tjedan dana tretmana. Rezultati istraživanja pokazali su da gel bez uklopljene aktivne sastavnice ili NLC nije pokazao razliku u hidraciji kože. Gelovi s uklopljenim slobodnim eteričnim uljem ružmarina imali su nešto bolje rezultate,

ali razlika u koncentraciji eteričnog ulja (1,5 % ili 3%) nije pokazala značajnu razliku u hidraciji. Topikalna primjena gela sa SLN pokazala je gotovo jednak učinak kao gelovi sa slobodnim eteričnim uljem što potvrđuje otprije poznate rezultate da SLN djeluju kao važni faktori hidracije kože mehanizmom stvaranja zaštitnog filma na površini kože sprječavajući isušivanje. Najbolje rezultate u povećanju hidracije pokazao je gel s uklopljenim NLC s uklopljenim eteričnim uljem, no ponovno nije bilo značajne razlike između udjela NLC u gelu. Ovi rezultati pokazuju učinkovitost uklapanja eteričnog ulja u nanostrukturirane lipidne nosače kako bi se pojačala dermalna aktivnost.

Rezultati promjene elastičnosti kože nisu zapaženi kod gelova bez obzira na to je li gel imao eteričnog ulja ili ne. Gelovi s uklopljenim NLC s eteričnim uljem pokazali su malu promjenu u elastičnosti kože, ali znatniju u odnosu na gelove bez uklopljenih NLC. Bitno je napomenuti da su sve ispitanice imale vrlo visoke vrijednosti elastičnosti kože i prije početka tretmana što može ukazati na slabije dobivene rezultate jer nije bilo moguće dobiti veliku promjenu u elastičnosti, nego samo manje povećanje vrijednosti. Nenapunjeni SLC pokazali su malu promjenu u elastičnosti kože, no znatno manju od gelova s NLC s uklopljenim eteričnim uljem ružmarina. Slično kao kod ispitivanja hidratacije kože, niti u ovom ispitivanju nije bilo značajne razlike u udjelu uklopljenih NLC u gelu. Ovi rezultati pokazuju da uklapanje eteričnog ulja ružmarina u NLC ima obećavajuće rezultate na hidraciju i elastičnost kože (Montenegro i sur., 2017).

Rezultati svih kliničkih ispitivanja pripravaka na bazi ružmarina koji su obrađeni u ovom diplomskom radu prikazani su Tablicom 6.

Tablica 6. Tablični prikaz obrađenih kliničkih istraživanja topikalnih učinaka pripravaka na bazi ružmarina.

<b>Autori</b>	<b>Pripravak ružmarina/ispitivanje</b>	<b>Rezultati istraživanja</b>
Panahi i sur., 2015.	Losion s eteričnim uljem ružmarina za tretman androgene alopecije (losion sadrži najmanje 3,7 mg 1,8-cineola u 1 ml); ispitivanje tijekom 6 mjeseci.	Losion je pokazao učinak usporediv s kontrolom (2 % minoksidil) te nije pokazao nuspojave.
Fuchs i sur., 2005.	Krema s 5% ekstraktom ružmarina; 50 µl kreme dva puta dnevno u liječenju i iritativnog kontaktnog dermatitisa izazvanog SLS-om tijekom 4 dana.	Krema s ekstraktom ružmarina pokazuje rezultate usporedive s pozitivnom kontrolom (hidrokortizon 0,25%) te vrlo dobre učinke u sprječavanju TEWL. Pripravak nije izazvao iritaciju.

Hadizadeh-Talasaz i sur., 2022.	Krema s 3 % alkoholnim ekstraktom ružmarina; utjecaj na cijeljenje epiziotomološke rane tijekom 10 dana (primjena 2x dnevno)	Cijeljenje rane uz uporabu kreme s ružmarinom je bolje i brže u odnosu na placebo. Nuspojave nisu opažene prilikom upotrebe kreme s ružmarinom.
Montenegro i sur., 2017.	Gel s uklopljenim eteričnim uljem ružmarina (1 i 3%) ili s NLC (49,2% i 98,4%) koje sadrže 3% eteričnog ulja. Primjena 2 puta dnevno tijekom 1 tjedna.	Gelovi s uklopljenim NLC s eteričnim uljem pokazali su najbolje rezultate povećanja hidracije kože te malo povećanje elastičnosti kože.

Iz rezultata obrađenih studija na pokusnim životinjama vidljivo je da ružmarin ima značajne učinke na prevenciju starenja kože, posebice ubrzanog starenja prouzrokovanog sunčevim zračenjem. Pozitivni učinci vidljivi su i nakon uporabe ekstrakta ružmarina, ali i eteričnog ulja. Posebno se ističe inhibicija enzima elastaze koji pridonosi gubitku elastičnosti kože. Računalnom analizom dokazano je da je za taj učinak odgovoran verbenon koji je, osim u ispitivanom heksanskom ekstraktu ružmarina, jedna od glavnih monoterpenskih sastavnica u određenim kemotipovima eteričnog ulja te bi upravo ti kemotipovi mogli biti temelj daljnjih studija. Od ostalih mehanizama djelovanja ističu se smanjenje transepidermalnog gubitka vode koji sprječava suhoću kože koja je jedan od glavnih znakova ostarjele kože, a smanjuje se i zadebljanje kože te ona izgleda mlađe i zategnutije. Brojne su sastavnice kojima se pripisuje ovakvo djelovanje. Pretpostavlja se da su najvažniji učinci koji su odgovorni za ovakvo djelovanje upravo protuupalno te antioksidativno djelovanje te bi s toga odgovorni metaboliti mogli biti polifenoli ili triterpeni. S obzirom da nisu uočene ozbiljnije nuspojave niti toksični učinci pri ispitivanim dozama svakako bi trebalo nastaviti ispitivanje ružmarina i njegovih pripravaka te mogućih povoljnih kombinacija, koje bi pospješile *anti-aging* učinak, kako bi se precizno odredila sastavnica koju je potrebno kvantificirati u kozmetičkim pripravcima protiv starenja kako bi se postigao optimalan učinak. Zanimljivo bi bilo i napraviti istraživanje u kojima bi se ispitaio učinak isključivo polifenolnih ili triterpenskih sastavnica iz biljke *S. rosmarinus* čime bi bilo moguće otkriti koji je učinak najzaslužniji za djelovanje ili je ipak najbitnije sinergističko djelovanje svih sastavnica zajedno. Potrebno je odrediti i najvišu moguću koncentraciju kako bi se dobio što jači učinak, ali istovremeno zadržala toksičnost pripravka na minimalnoj mogućoj razini. Nadalje, čak dvije studije su istaknule vrlo dobar učinak nakon uklapanja ovakvih pripravaka protiv starenja kože u lipidne nosače te bi stoga trebalo dokazati je li upravo ovaj oblik najpovoljniji za manifestiranje pozitivnih učinaka na kožu jer se čini da je to vrlo obećavajuća strategija u postizanju topikalnih benefita za tretman

kožnih stanja i promjena. Istraživanje na ljudima pokazalo je veću učinkovitost eteričnog ulja ružmarina u povećanju hidracije kože, ali i blage učinke na povećanje elastičnosti kože u odnosu na gel s uklopljenim SLN. Ispitivanje bi bilo dobro ponoviti na većem uzorku te u duljem trajanju jer su upravo ovo mogući razlozi nešto lošijih rezultata povećanja elastičnosti kože. Također, daljnje studije dale bi i nešto više podataka te bi pomogle da se rezultati dodatno potvrde. Pozitivni rezultati potiču i na daljnja klinička istraživanja koja bi trebala uvrstiti utjecaj UVB zračenja. Sve veća potražnja za kozmetičkim proizvodima prirodnog podrijetla dodatno povećava potrebu za ovim ispitivanjima. S obzirom na dosad dobivene rezultate, pripravak s ružmarinom imao bi cjelokupan učinak na prevenciju starenja kože te bi djelovao na brojne aspekte starenja kože što je vrlo povoljno jer bi bilo moguće razviti jedan pripravak s brojnim mehanizmima i metama djelovanja.

#### **4.6. Pregled mehanizama djelovanja u podlozi topikalnih učinaka ružmarina**

Pripravci ružmarina poticali su rasta dlaka i kod pokusnih životinja i u kliničkom ispitivanju. Moguće je da se djelovanje temelji na istom mehanizmu kao kod odobrenog lijeka minoksidila, a što je poboljšana prokrvljenost te dotok kisika i esencijalnih mikronutrijenata folikulu dlake što mu omogućuje bolji rast. Također u ispitivanju *in vitro* koje su proveli Murata i suradnici (2013) ekstrakt ružmarina inhibirao je enzim 5  $\alpha$ -reduktazu koja inhibira vezanje dihidrotestosterona za androgene receptore. Taj učinak pripisan je 12-metoksikarnozolnoj kiselini prisutnoj u ekstraktu. Ovi rezultati pokazuju da postoji potencijal za razvoj pripravaka na bazi ružmarina u indikaciji androgene alopecije, kod koje nije potrebno samo ubrzati rast kose, već spriječiti inhibiciju rasta i skraćivanje anagene faze pod utjecajem testosterona. Histološkom analizom kože eksperimentalnih životinja Begum i suradnici (2023) su dokazali da je metanolni ekstrakt ružmarina doveo do indukcije prelaska iz telogene u anagenu fazu što je još jedan vrlo bitan aspekt u liječenju alopecije. Bilo je vidljivo i povećanje broja folikula, njihovo izduživanje i spuštanje u dublje slojeve kože.

Protuupalno djelovanje pripravaka ružmarina temelji se na inhibiciji proupalnih citokina. U pregledanoj literaturi zabilježena je inhibicija proupalnih citokina IL-1 $\beta$  te TNF $\alpha$  koji potiču akutnu fazu upale. Ekstrakt ružmarina inhibirao je i COX-2, a slično djelovanje pripisuje se i jednom od glavnih monoterpena iz eteričnog ulja ružmarina, eukaliptolu ili 1,8-cineolu (Mengoni i sur., 2011; Khan i sur., 2014). Također, kao važan protuupalni mehanizam djelovanja, koji se pripisuje etanolnom ekstraktu ružmarina, ističe se i inhibicija sinteze

dušikova oksida putem enzima NOS čija je ekspresija bila snižena (Mengoni i sur., 2011; Yimam i sur., 2017). Zanimljivo je istaknuti da je eksperiment koji su proveli Mengoni i suradnici (2011) dokazao da je upravo topikalna primjena metanolnog ekstrakta ružmarina pokazala najjači učinak na smanjenje upale i edema. Protuupalna aktivnost pripisuje se triterpenskim sastavnicama ekstrakta, točnije karnozolu i karnozolnoj kiselini. Histološka analiza upalnog tkiva pokazala je smanjenu infiltraciju tkiva leukocitima nakon topikalne primjene etanolnog ekstrakta ružmarina ili njegovih metabolita, karnozola i karnozolne kiseline, što je mehanizam antiedematoznog učinka (Mengoni i sur., 2011).

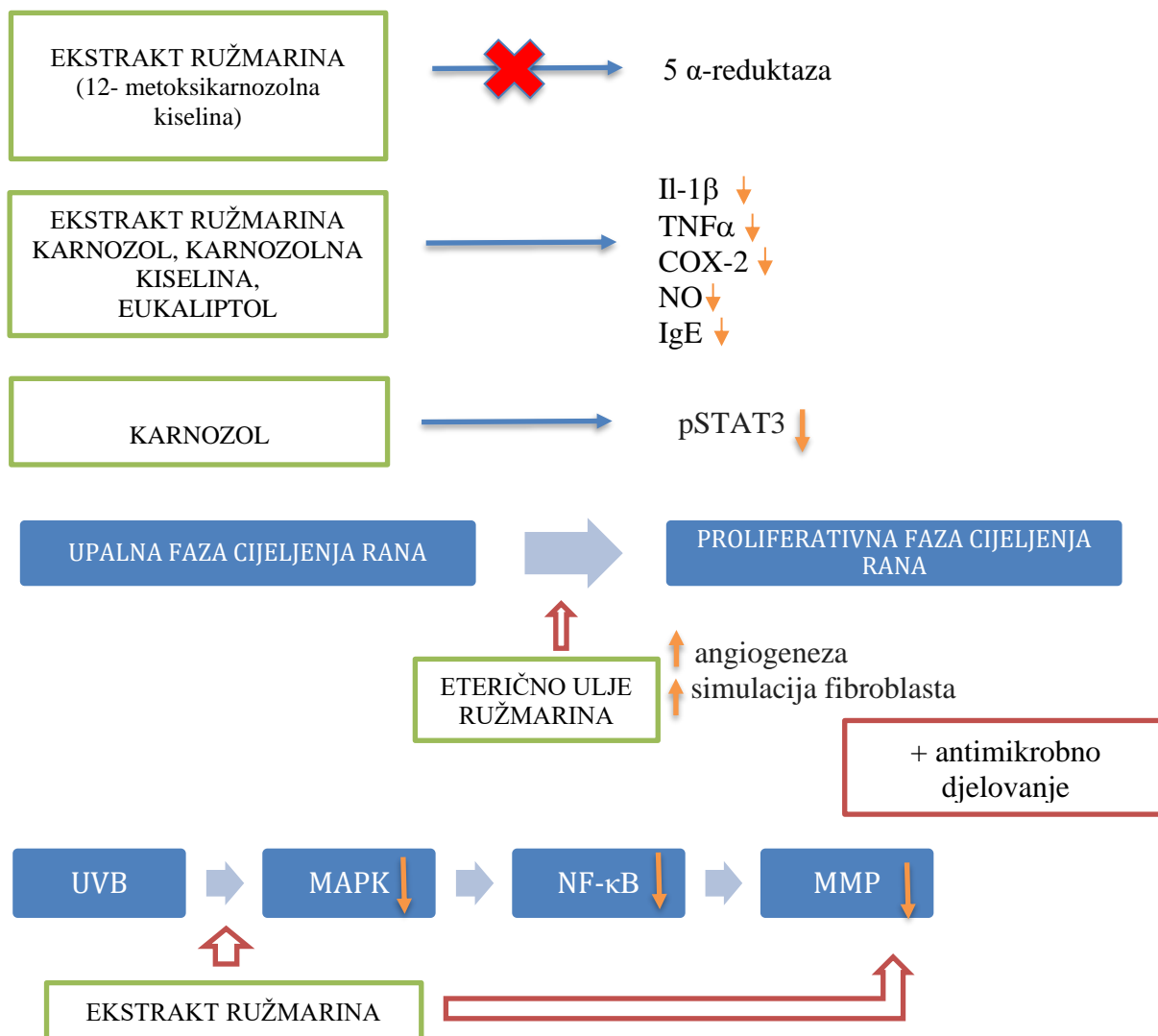
Zbog navedenog potrebna su daljnja istraživanja pripravaka ružmarina i njegovih metabolita u liječenju dermatitisa koji su vrlo česti oblici upalnih bolesti kože i samim time povoljni za liječenje topikalnom primjenom. Prilikom ispitivanja učinka karnozola, koji se pokazao kao jedna od najvažnijih protuupalnih sastavnica ekstrakta ružmarina, na atopijski dermatitis, uz smanjenje ekspresije proupalnih citokina, antiedematozni učinak te smanjenje broja upalnih infiltrata zabilježeno je djelovanje na STAT3 (Lee i sur., 2017). Topikalna primjena karnozola smanjila je razinu fosforiliranog STAT3, a računalnom analizom dokazano je da karnozol može vezati molekulu STAT3. STAT3 je značajan transduktor signala te posljedično potiče otpuštanje brojnih medijatora i interleukina koji dalje posreduju u patologiji atopijskog dermatitisa. U ovom je istraživanju dokazan i učinak na smanjenje broja IgE te samim time i na težinu i veličinu limfnih čvorova te broja neutrofila u krvi.

Ovi protuupalni mehanizmi imaju pozitivno djelovanje i na zacjeljivanje rana. Prva faza cijeljenja rana je upalna te djelovanje eteričnog ulja ružmarina potiče prelazak iz upalne u daljnju proliferativnu fazu i na taj način ubrzava zacjeljivanje. Pozitivno djelovanje u proliferativnoj fazi očituje se potaknutom angiogenezom i odlaganjem kolagena što omogućuje potpuniju reepitelizaciju te smanjuje mogućnost nastanka ožiljkastog fibroznog tkiva što je i potvrđeno histološkim analizama (Labib i sur., 2019). Kao bolji pripravak za cijeljenje rana istaknulo se topikalno naneseo eterično ulje u odnosu na vodeni ekstrakt primijenjen intraperitonealnom injekcijom (Abu-Al-Basal, 2010). Smatra se da je mehanizam u podlozi brže djelovanje topikalno nanesenog lipofilnog pripravka kroz keratinocite epidermalnog sloja kože te stvaranje hidrofobnog omotača koji sprječava transepidermalni gubitak vode te omogućuje vlažni okoliš kao dokazano važnu strategiju za zacjeljivanje rana. Još jedno važno djelovanje eteričnog ulja ružmarina je i antimikrobno djelovanje koje je posljedica visokog sadržaja oksigeniranih monoterpena koji pomažu stvoriti optimalne uvijete za cijeljenje rana i sprječavaju nastanak sekundarnih bakterijskih infekcija što je mehanizam kojim djeluju i komercijalno dostupni antiseptici koji su prvi korak u procesu zbrinjavanja rana. Nejati i

suradnici (2015) ističu dva najvažnija mehanizma eteričnog ulja ružmarina u procesu cijeljenja rana: inhibicija upale te proliferacija fibroblasta stimuliranih makrofagima.

Kao najvažniji mehanizam pripravaka s ružmarinom na prevenciju starenja kože ističe se smanjenje razina matriksnih metaloproteinaza koje su ključni enzimi u degradaciji ekstracelularnog matriksa koji dovode do stvaranja bora i smanjenja elastičnosti kože. Inhibicija elastaze, osim sprječavanja razgradnje elastina, djeluje i na način da štiti kolagen od daljnje razgradnje metaloproteinazama. Ovaj mehanizam potvrđen je *in silico* studijom koju su proveli Ibrahim i suradnici (2022), a dokazano je da je za taj učinak odgovorna sastavnica verbenon. Pretpostavljeni mehanizam inhibicije matriksnih metaloproteinaza je antioksidativni učinak ružmarina. Za antioksidativni učinak ružmarina najvažniji metaboliti su polifenoli. Mehanizam je hvatanje slobodnih radikala te sprječavanje oksidacije metalnih iona. Ovi učinci potvrđeni su brojnim *in vitro* testovima. U prevenciji procesa starenja pod utjecajem UVB zračenja, koje potiče stvaranje slobodnih radikala i oksidativnog stresa, dobra se pokazala zajednička primjena etanolnih ekstrakata grejpa i ružmarina, odnosno njihov sinergizam u sprečavanju tih procesa (Choi i sur., 2019; Yoon i sur., 2019). Pretpostavka je da smanjenje eritema u podlozi ima također djelovanje polifenolnih sastavnica koje fotoprotekciju ostvaruju na temelju strukturne sličnosti s komercijalno dostupnim apsorbentima valnih duljina iz sunčeva spektra (Takayama i sur., 2022). Osim polifenolnih sastavnica u ekstraktu ružmarina, ističe se i karnozol te karnozolna kiselina koji svojim protuupalnim učincima djeluju antiedematozno te je uočeno i smanjenje zadebljanja kože te stvaranje lezija pod utjecajem zračenja. Pored već opisanih protuupalnih mehanizama, navodi se i smanjenje fosforilacije MAPK signalnog puta koji posljedično prevenira aktivaciju NF- $\kappa$ B te zato ekstrakt ružmarina dovodi do njegove smanjene ekspresije (Yoon i sur., 2019).

Slikom 8. grafički su prikazani mehanizmi djelovanja ekstrakta ružmarina, njegovog eteričnog ulja te sastavnica dokazani na eksperimentalnim životinjama ili stanicama.



Slika 8. Grafički prikaz dokazanih mehanizma djelovanja ekstrakta ružmarina, eteričnog ulja ružmarina ili njegovih sastavnica na pokusnim životinjama i stanicama



## 5. ZAKLJUČCI

Biljka *S. rosmarinus* od davnina ima prepoznat vrlo visok fitoterapijski potencijal koji se ispoljuje i nakon topikalne primjene pripravaka u kojima je biljka uklopljena, bilo u vidu ekstrakta, bilo eteričnog ulja. Nakon obrade literaturnih podataka vidljivo je da su učinci vrlo važni u prevenciji i liječenju brojnih kožnih bolesti i stanja te se može zaključiti:

1. Ekstrakt ružmarina i eterično ulje ružmarina pokazali su pozitivan učinak na povećanje broja dlaka i njihov brži rast na pokusnim životinjama te su imali isti učinak kao i odobreni lijek (2 % minoksidil). Kliničkom studijom dobiven je sličan rezultat. Pripravci ružmarina nisu pokazali znatnije nuspojave nakon primjene. Stoga ružmarin ima potencijal za razvoj preparata za liječenje alopecije, posebice jer učinak nije umanjen niti nakon uklapanja pripravka u gotove farmaceutske pripravke prikladne za primjenu.
2. Ekstrakt ružmarina, a ponajviše njegovi metaboliti karnozol i karnozolna kiselina pokazali su protuupalno djelovanje snižavanjem razine dušikovog oksida te inhibicijom ekspresije proupalnih citokina. Ovakav učinak vrlo je povoljan jer se upala javlja u podlozi mnogih bolesti. Važno je naglasiti i da je protuupalni učinak dokazano jače izražen nakon topikalne primjene etanolnim ekstraktom, nego što je to u slučaju primjene pripravka injekcijom. Stoga su potrebna daljnja ispitivanja topikalnih pripravaka biljke *S. rosmarinus* upravo u indikaciji upalnih bolesti kože kao što je atopijski dermatitis.
3. Eterično ulje ružmarina ima vrlo dobre učinke na ubrzavanje i poticanje cijeljenja rana. Protuupalno, antioksidativno i antimikrobno djelovanje potiče ubrzavanje procesa cijeljenja rane. Nakon nanošenja pripravaka s ružmarinom primijećena je potpunija reepitelizacija i kontrakcija rane. Može se zaključiti da je cijeljenje rana nakon uporabe topikalnih pripravaka s ružmarinom ubrzano i potpuniije te smanjuje rizik od stvaranja ožiljaka. Provedeno kliničko istraživanje pokazalo je dobre rezultate kreme s ružmarinom na cijeljenje epiziotomoloških rana.
4. Ekstrakt ružmarina pokazuje pozitivne preventivne učinke na ubrzano starenje inducirano UVB zračenjem. Zabilježeno je smanjenje ekspresije MMP, smanjenje upalnih parametara, antiedematozni učinak i smanjenje zadebljanja kože. Iako je najviše studija obrađeno o učinku prevencije starenja kože posredovanog UVB zračenjem, potencijal postoji i u prevenciji kronološkog starenja jer se povećava

hidracija kože i njena elastičnost, a prevenira se degeneracija ekstracelularnog matriksa. Posebice dobar učinak uočen je nakon uklapanja pripravak u lipidne nanonosae koji potenciraju učinak hidracije kože stvaranjem zaštitnog filma na površini kože. Potrebno je provesti daljnja detaljnija istraživanja i više kliničkih studija kako bi se učinci potvrdili i dobili opsežniji podatci.

## 6. LITERATURA

Abu-Al-Basal MA. Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131, 443-450.

Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Loggia RD, Tubaro A. Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 1718–1723.

Andrade JM, Faustino C, Garcia C, Ladeiras D, Reis CP, Rijo P. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Sci OA*, 2018, 4, FSO283.

Begum A, S S, N AK, Ali SS. Evaluation of Herbal Hair Lotion loaded with Rosemary for Possible Hair Growth in C57BL/6 Mice. *Adv Biomed Res*, 2023, 12, 60.

Bickers DR, Lim HW, Margolis D, Weinstock MA, Goodman C, Faulkner E, Gould C, Gemmen E, Dall T. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 55, 490-500.

Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol*, 2019, 229, 29-45.

Choi HJ, Alam MB, Zhao P, Cha YH, Kim TH, Lee SH. Inhibitory Effects of a Combination of Grapefruit and Rosemary Extracts for Alleviating UV-Induced Skin Ageing. *Korean J Plant Res*, 2019, 32, 207-219.

de Macedo LM, Santos ÉMD, Militão L, Tundisi LL, Ataíde JA, Souto EB, Mazzola PG. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review. *Plants*, 2020, 9, 651.

de Oliveira JR, Camargo SEA, de Oliveira LD. Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci*, 2019, 26, 5.

Diniz do Nascimento L, Moraes AAB, Costa KSD, Pereira Galúcio JM, Taube PS, Costa CML, Neves Cruz J, de Aguiar Andrade EH, Faria LJG. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. *Biomolecules*, 2020, 10, 988.

Džidić, M. Utjecaj topikalne primjene vitamina C na proces starenja kože, Završni specijalistički, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2022, citirano: 14.02.2024.

Filipović-Grčić J, Pepić I. Kozmetologija, nastavni materijali. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2023.

Fuchs S, Schliemann S, Fischer T, Elsner P. Protective Effects of Different Marigold (*Calendula officinalis* L.) and Rosemary Cream Preparations against Sodium-Lauryl-Sulfate-Induced Irritant Contact Dermatitis. *Skin Pharmacol Physiol*, 2005, 18, 195-200.

Givol O, Kornhaber R, Visentin D, Cleary M, Haik J, Harats M. A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound Repair Regen*, 2019, 27, 548-561.

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Rijeka, EX LIBRIS, 2005, str. 64, 291.

Hadizadeh-Talasaz F, Mardani F, Bahri N, Rakhshandeh H, Khajavian N, Taghieh M. Effect of Rosemary Cream on Episiotomy Wound Healing in Primiparous Women: A Randomized Clinical Trial. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22, 226.

Halmed Agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2024., <https://www.halmed.hr>, pristupljeno: 20.2.2024.

Ibrahim N, Abbas H, El-Sayed NS, Gad HA. Rosmarinus officinalis L. hexane extract: phytochemical analysis, nanoencapsulation, and in silico, in vitro, and in vivo anti-photoaging potential evaluation. *Sci Rep*, 2022, 12, 13102.

Kasuya A, Tokura Y. Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci*, 2014, 76, 169-72.

Khan A, Vaibhav K, Javed H, Tabassum R, Ahmed ME, Khan MM, Khan MB, Shrivastava P, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. 1,8-cineole (eucalyptol) mitigates inflammation in amyloid Beta toxicated PC12 cells: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 2014, 39, 344-352.

Labib RM, Ayoub IM, Michel HE, Mehanny M, Kamil V, Hany M, Magdy M, Moataz A, Maged B, Mohamed A. Appraisal on the wound healing potential of *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil-loaded chitosan topical preparations. *PLoS One*, 2019, 14, e0219561.

Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC. Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *JAMA Dermatol*, 1994, 130, 489–493.

Lee DY, Hwang CJ, Choi JY, Park MH, Song MJ, Oh KW, Son DJ, Lee SH, Han SB, Hong JT. Inhibitory Effect of Carnosol on Phthalic Anhydride-Induced Atopic Dermatitis via Inhibition of STAT3. *Biomol Ther*, 2017, 25, 535-544.

Li Pomi F, Papa V, Borgia F, Vaccaro M, Allegra A, Cicero N, Gangemi S. *Rosmarinus officinalis* and Skin: Antioxidant Activity and Possible Therapeutical Role in Cutaneous Diseases. *Antioxidants*, 2023, 12, 680.

Meena R, Sharma S, Sagar V. Self-medication practices in dermatological diseases: a cross-sectional questionnaire-based study. *Asian J Pharm Clin Res*, 2023, 16, 129-132.

Mengoni ES, Vichera G, Rigano LA, Rodriguez-Puebla ML, Galliano SR, Cafferata EE, Pivetta OH, Moreno S, Vojnov AA. Suppression of COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia*, 2011, 82, 414-421.

Mezza GN, Borgarello AV, Grosso NR, Fernandez H, Pramparo MC, Gayol MF. Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. *Food Chem*, 2018, 242, 9–15.

Mondello A, Salomone R, Mondello G. Exploring circular economy in the cosmetic industry: Insights from a literature review. *Environ Impact Assess Rev*, 2024, 105, 107443.

Montenegro L, Pasquinucci L, Zappalà A, Chiechio S, Turnaturi R, Parenti C. Rosemary Essential Oil-Loaded Lipid Nanoparticles: In Vivo Topical Activity from Gel Vehicles. *Pharmaceutics*, 2017, 9, 48.

Murata K, Noguchi K, Kondo M, Onishi M, Watanabe N, Okamura K, Matsuda H. Promotion of hair growth by *Rosmarinus officinalis* leaf extract. *Phytother Res*, 2013, 27, 212-217.

Nejati H, Farahpour M, Nagadehi MN. Topical Rosemary officinalis essential oil improves wound healing against disseminated *Candida albicans* infection in rat model. *Comp Clin. Pathol*, 2015, 24, 1377–1383.

Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines (Basel)*, 2018, 5, 98.

Oalđe Pavlović M, Kolarević S, Đorđević J, Jovanović Marić J, Lunić T, Mandić M, Kračun Kolarević M, Živković J, Alimpić Aradski A, Marin PD, Šavikin K, Vuković-Gačić B, Božić Nedeljković B, Duletić-Laušević S. A Study of Phytochemistry, Genoprotective Activity, and Antitumor Effects of Extracts of the Selected Lamiaceae Species. *Plants*, 2021, 10, 2306.

Otto A, Du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci*, 2009, 31, 1-19.

Panahi Y, Taghizadeh M, Marzony ET, Sahebkar A. Rosemary oil vs minoxidil 2% for the treatment of androgenetic alopecia: a randomized comparative trial. *Skinmed*, 2015, 13, 15-21.

Phillips TG, Slomiany WP, Allison R. Hair Loss: Common Causes and Treatment. *Am Fam Physician*. 2017, 96, 371-378.

Pistelli L, Giovanelli S, D'Angiolillo F, Karkleva K, Leonardi M, Ambryszewska K, Cervelli C, Pistelli L. Antioxidant activity of several essential oils from different *rosmarinus officinalis* cultivars grown in Sanremo (Italy) *Nat Prod Commun*, 2018, 13, 1167–1170.

Refined exposure assessment of extracts of rosemary (E 392) from its use as food additive, 2018., <https://www.efsa.europa.eu>, pristupljeno: 22.2.2024.

Revenue of the cosmetics market worldwide from 2018 to 2028, 2024, <https://www.statista.com>, pristupljeno: 21.2.2024.

Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C, Costa HS, Albuquerque TG, Castilho MC, Ramos F, Melo NR, Sanches-Silva A. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends Food Sci*, 2015, 45, 355-368.

Richard MA, Paul C, Nijsten T, Gisondi P, Salavastru C, Taieb C, Trakatelli M, Puig L, Stratigos A, EADV burden of skin diseases project team. Prevalence of most common skin diseases in Europe: a population-based study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2022, 36, 1088-1096.

Struna, hrvatsko strukovno nazivlje, 2024, <http://struna.ihjj.hr>, pristupljeno 21.2.2024.

Takayama KS, Monteiro MC, Saito P, Pinto IC, Nakano CT, Martinez RM, Thomaz DV, Verri WA Jr, Baracat MM, Arakawa NS, Russo HM, Zeraik ML, Casagrande R, Couto ROD, Georgetti SR. *Rosmarinus officinalis* extract-loaded emulgel prevents UVB irradiation damage to the skin. *An Acad Bras Cienc*, 2022, 94, 1678-2690.

Uronnachi E, Atuegwu C, Umeyor C, Nwakile C, Obasi J, Ikeotuonye C, Attama A. Formulation and evaluation of hair growth enhancing effects of oleogels made from Rosemary and Cedar wood oils. *Sci Afr*, 2022, 16, e01223.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I i II, nastavni materijal. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2021.

Vusić, L. 'Liječenje alopecija', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2023, citirano: 22.02.2024.

Wu H, Ma PF, Li HT, Hu GX, Li DZ. Comparative plastomic analysis and insights into the phylogeny of *Salvia* (Lamiaceae). *Plant Divers*, 2021, 43, 15-26.

Yimam M, Lee YC, Jiao P, Hong M, Brownell L, Jia Q. A Standardized Composition Comprised of Extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Annona squamosa* and *Zanthoxylum clavaherculis* for Cellulite. *Pharmacognosy Res*, 2017, 9, 319-324.

Yoon YC, Choi HJ, Park JH, Diniyah N, Shin HA, Kim MY. Combination of Grapefruit and Rosemary Extracts Has Skin Protective Effect through MMPs, MAPKs, and the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway In Vitro and In Vivo UVB-exposed Model. *Korean J Plant Res*, 2019, 32, 633-643.

York K, Meah N, Bhojrul B, Sinclair R. A review of the treatment of male pattern hair loss. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21, 603-612.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Problemi s kožom vrlo su česti te zahvaćaju ljude svih dobnih skupina. Stavljaju velik psihološki teret na pojedince i smanjuju kvalitetu života, a bolesti kože predstavljaju velik ekonomski teret za liječenje i prevenciju. Topikalna primjena lijekova najbolji je izbor za tretiranje ovakvih simptoma zbog svog brzog nastupa djelovanja te smanjenja mogućnosti sistemskih nuspojava, a biljni pripravci postaju sve popularniji izbor pacijenata prilikom liječenja benignijih stanja. Cilj ovog diplomskog rada bio je pregledati dostupnu literaturu o topikalnoj primjeni i učincima ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.) te utvrditi klinički značaj tih učinaka na kožne bolesti te potencijal uporabe u kozmetičkim pripravcima. Ružmarin je biljka s područja Mediterana, bogat je polifenolnim sastavnicama i triterpenima, a eterično ulje bogato mu je oksigeniranim monoterpenima. Poznat je po svojem antioksidativnom, antimikrobnom i protuupalnom djelovanju. Ovi učinci imaju velik potencijal u liječenju i prevenciji kožnih bolesti i stanja posebice nakon topikalne primjene pripravaka. U dostupnoj literaturi najviše se ističu studije koje su ispitivale učinak na alopeciju, upalne bolesti kože, dermatitise, uključujući i atopijski dermatitis, cijeljenje rana i starenje kože. Iako je provedeno čak i nekoliko kliničkih istraživanja koji potvrđuju dobar učinak pripravaka ružmarina u ovim indikacijama, daljnja opsežna istraživanja su potrebna kako bi se dodatno razjasnili mehanizmi djelovanja i sastavnice odgovorne za učinke.

Dermal problems are very common, and they affect people of all ages. They place a great psychological burden on the individual and reduce the quality of life, and skin diseases represent a great economic burden for treatment and prevention. Topical application of drugs is the best choice for the treatment of such symptoms due to its rapid onset of action and reduction of the possibility of systemic side effects, and herbal preparations are becoming an increasingly popular choice for patients when treating more benign conditions. The aim of this work was to review the literature on the topical application and effects of the rosemary (*Salvia rosmarinus* Spenn.) and determine the clinical significance of these effects on skin diseases and the potential for use in cosmetic preparations. Rosemary is a plant from the Mediterranean area, it is rich in polyphenolic components and triterpenes, and its essential oil is rich in oxygenated monoterpenes. It is known for its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects. These effects have great potential in the treatment and prevention of skin diseases and conditions, especially after topical application of the preparations. In the available literature, the most prominent are studies that examined the effect on alopecia, inflammatory skin

diseases, dermatitis, including atopic dermatitis, wound healing and skin aging. Although even a few clinical studies have been conducted that confirm positive effect of rosemary in these indications, further extensive research is needed to additionally clarify the mechanisms of action and the compounds responsible for the effects.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku botaniku  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Topikalna primjena ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.)

Paula Dorić

### SAŽETAK

Problemi s kožom vrlo su česti te zahvaćaju ljude svih dobnih skupina. Stavljaju velik psihološki teret na pojedince i smanjuju kvalitetu života, a bolesti kože predstavljaju velik ekonomski teret za liječenje i prevenciju. Topikalna primjena lijekova najbolji je izbor za tretiranje ovakvih simptoma zbog svog brzog nastupa djelovanja te smanjenja mogućnosti sistemskih nuspojava, a biljni pripravci postaju sve popularniji izbor pacijenata prilikom liječenja benignijih stanja. Cilj ovog diplomskog rada bio je pregledati dostupnu literaturu o topikalnoj primjeni i učincima ružmarina (*Salvia rosmarinus* Spenn.) te utvrditi klinički značaj tih učinaka na kožne bolesti te potencijal uporabe u kozmetičkim pripravcima. Ružmarin je biljka s područja Mediterana, bogat je polifenolnim sastavnicama i triterpenima, a eterično ulje bogato mu je oksigeniranim monoterpenima. Poznat je po svojem antioksidativnom, antimikrobnom i protuupalnom djelovanju. Ovi učinci imaju velik potencijal u liječenju i prevenciji kožnih bolesti i stanja posebice nakon topikalne primjene pripravaka. U dostupnoj literaturi najviše se ističu studije koje su ispitivale učinak na alopeciju, upalne bolesti kože, dermatitise, uključujući i atopijski dermatitis, cijeljenje rana i starenje kože. Iako je provedeno čak i nekoliko kliničkih istraživanja koji potvrđuju dobar učinak pripravaka ružmarina u ovim indikacijama, daljnja opsežna istraživanja su potrebna kako bi se dodatno razjasnili mehanizmi djelovanja i sastavnice odgovorne za učinke. Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranice, 8 grafičkih prikaza, 6 tablica i 50 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ružmarin, topikalna primjena, upala, cijeljenje rana, starenje kože

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Lovorka Vujić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of pharmaceutical botanics  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Topical application of rosemary (*Salvia rosmarinus* Spenn.)

**Paula Dorić**

#### SUMMARY

Dermal problems are very common, and they affect people of all ages. They place a great psychological burden on the individual and reduce the quality of life, and skin diseases represent a great economic burden for treatment and prevention. Topical application of drugs is the best choice for the treatment of such symptoms due to its rapid onset of action and reduction of the possibility of systemic side effects, and herbal preparations are becoming an increasingly popular choice for patients when treating more benign conditions. The aim of this work was to review the literature on the topical application and effects of the rosemary (*Salvia rosmarinus* Spenn.) and determine the clinical significance of these effects on skin diseases and the potential for use in cosmetic preparations. Rosemary is a plant from the Mediterranean area, it is rich in polyphenolic components and triterpenes, and its essential oil is rich in oxygenated monoterpenes. It is known for its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects. These effects have great potential in the treatment and prevention of skin diseases and conditions, especially after topical application of the preparations. In the available literature, the most prominent are studies that examined the effect on alopecia, inflammatory skin diseases, dermatitis, including atopic dermatitis, wound healing and skin aging. Although even a few clinical studies have been conducted that confirm positive effect of rosemary in these indications, further extensive research is needed to additionally clarify the mechanisms of action and the compounds responsible for the effects.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 8 figures, 6 tables and 50 references. Original is in Croatian language.

Keywords: rosemary, topical application, inflammation, wound healing, skin aging

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2024.