

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BENJAMIN JUSTIN

## MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BENJAMIN JUSTIN

Analiza sestave smrekove smole, ugotavljanje njenih  
antioksidativnih in protibakterijskih lastnosti ter njenega delovanja  
na fibroblaste in keratinocite *in vitro*

Spruce resin composition analysis, assessment of its antioxidative  
and antibacterial characteristics, and its action on fibroblasts and  
keratinocytes *in vitro*

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Benjamin Justin: Analiza sestave smrekove smole, ugotavljanje njenih antioksidativnih in protibakterijskih lastnosti ter njenega delovanja na fibroblaste in keratinocite in vitro

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm., in somentorstvom izr. prof. dr. Nine Kočevar Glavač, mag. farm. Poskuse s celicami sva izvedla z izr. prof. dr. Matjažem Jerasom, mag. farm.

GC-MS analize terpentinov so opravili na inštitutu Luke na Finskem (Natural Resources Institute Finland (Luke), Latokartanonkaari 9, FI-00790 Helsinki).

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za korektno in strokovno vodenje, prijetno sodelovanje in poučne razprave tekom procesa nastajanja magistrske naloge.

Zahvaljujem se somentorici, izr. prof. dr. Nini Kočevar Glavač, mag. farm., da mi je priskočila na pomoč pri izvedbi eksperimentov, kadar je bilo to potrebno.

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., za sodelovanje in vodenje pri izvedbi poskusov na celicah.

Zahvaljujem se strokovni sodelavki Ireni Klančnik Mavec, dipl. ing. lab. biomed., za njeno prijazno pomoč, ko ni bilo steklovine, reagentov in druge opreme, brez katere ne bi mogel izvesti laboratorijskega dela.

Zahvaljujem se Tinetu Oblaku, ki je priskrbel izhodni material; vzorce terpentinov, za raziskavo.

Zahvaljujem se inštitutu Luke na Finskem za izvedbo GC-MS analize terpentinov.

## IZJAVA

**Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm., in somentorstvom izr. prof. dr. Nine Kočevar Glavač, mag. farm.**

**Benjamin Justin**

## KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	V
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VI
1. UVOD .....	1
1.1. Uporaba smrekove smole za zdravljenje ran .....	1
1.2. Sestava smrekove smole .....	2
1.3. Zgradba kože.....	3
1.4. Proces celjenja rane .....	4
1.5. Upočasnitev celjenja rane zaradi patogenih mikroorganizmov .....	7
1.6. Reaktivne kisikove zvrsti v procesu celjenja rane .....	10
2. NAMEN DELA.....	12
3. MATERIALI IN METODE .....	13
Izhodni material, uporabljene kemikalije, aparature in oprema .....	13
3.1. Frakcioniranje terpentina na kislino in nevtralno frakcijo kolofonije in terpeninovo eterično olje .....	14
3.2. Analiza kemijske sestave terpeninovega eteričnega olja z GC-MS .....	15
3.3. Analiza kemijske sestave terpentina z GC-MS.....	16
3.4. Meritve antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo ABTS .....	17
3.5. Meritve antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo DPPH .....	19
3.6. Preverjanje protibakterijske učinkovitosti terpentina .....	21
3.7. Ugotavljanje vpliva terpentina na rast keratinocitov in fibroblastov <i>in vitro</i> .....	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	26
4.1. Pregled pripravljenih vzorcev .....	26
4.2. Rezultati analize kemijske sestave terpeninovega eteričnega olja z GC-MS .....	30
4.3. Rezultati analize kemijske sestave terpentina z GC-MS .....	34
4.4. Rezultati meritev antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo ABTS.....	36
4.5. Rezultati meritev antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo DPPH.....	38
4.6. Protibakterijska učinkovitost terpentina .....	40
4.7. Vpliv terpentina na rast keratinocitov in fibroblastov <i>in vitro</i> .....	42
5. SKLEP.....	46
6. LITERATURA.....	47
PRILOGE .....	49

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Načrt nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo za testiranje vpliva terpentina na rast keratinocitov. ....	23
Preglednica II: Načrt nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo za testiranje vpliva terpentina na rast fibroblastov. ....	24
Preglednica III: Pregled pripravljenih nevtralnih in kislih frakcij kolofonije. ....	26
Preglednica IV: Pregled pripravljenih eteričnih olj. ....	27
Preglednica V: Ocena deleža izgub pri pripravi vzorcev. ....	28
Preglednica VI: Vzorci vključeni v nadaljnje raziskave. ....	29
Preglednica VII: Rezultati GC-MS analize eteričnih olj. ....	30
Preglednica VIII: Pregled glavnih spojin eteričnih olj. ....	32
Preglednica IX: Rezultati GC-MS analize derivatiziranih spojin terpentinov. ....	34
Preglednica X: Relativna antioksidativna aktivnost terpentinov in frakcij izmerjena z metodo ABTS. ....	36
Preglednica XI: Relativna antioksidativna aktivnost terpentinov in frakcij izmerjena z metodo DPPH. ....	38
Preglednica XII: Primerjava vrednosti relativne antioksidativne aktivnosti terpentinov in frakcij izračunanih po dveh metodah za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti. ....	39
Preglednica XIII: Rezultati preizkusa mešanja terpentina, raztopljenega v različnih topilih, z medijem za gojenje celic, z dodatkom in brez dodatka seruma. ....	42
Preglednica XIV: Prisotnost usedline po centrifugiranju obetavnih vzorcev. ....	43
Preglednica XV: Povzetek rezultatov testiranja vpliva terpentina in vehikla na celice. ....	44
Preglednica XVI: Vrednosti absorbance formazana po 48 urni inkubaciji keratinocitov z vzorci terpentina in vehikla. ....	49
Preglednica XVII: Vrednosti absorbance formazana po 72 urni inkubaciji keratinocitov z vzorci terpentina in vehikla. ....	50
Preglednica XVIII: Vrednosti absorbance formazana po 48 urni inkubaciji fibroblastov z vzorci terpentina in vehikla. ....	51
Preglednica XIX: Vrednosti absorbance formazana po 72 urni inkubaciji fibroblastov z vzorci terpentina in vehikla. ....	52

## KAZALO SLIK

Slika 1: Aktivacija molekule ABTS in reakcija $ABTS^{\bullet+}$ z antioksidantom. ....	19
Slika 2: Reakcija molekule DPPH $^{\bullet}$ z antioksidantom. ....	20
Slika 3: Na primeru MTS prikazan način delovanja uporabljenih barvil za spremljanje metabolne aktivnosti celic. ....	25

## **POVZETEK**

Klinične študije in izkušnje iz preteklosti pričajo o učinkovitosti smrekove smole pri zdravljenju ran. Z nalogo smo želeli preveriti vpliv smrekove smole na ključne procese celjenja rane; odstranjevanje presežka radikalov, preprečevanje mikrobiološke okužbe rane in pospeševanje delitve in rasti celic v koži. Antioksidativne lastnosti smo ugotavljali s testoma ABTS in DPPH, zbrali smo podatke o protimikrobni učinkovitosti in izvedli test na celičnih kulturah keratinocitov in fibroblastov. Izvedli smo GC-MS analizo kemijske sestave smrekove smole in eteričnega olja. Ugotovili smo, da ima smrekova smola šibko antioksidativno aktivnost. Ima protibakterijske lastnosti in lahko prepreči okužbo rane. Vpliva smrekove smole na rast in delitev keratinocitov in fibroblastov nismo ugotovili, zaradi omejitev uporabljene metode. Na podlagi rezultatov in dejstev zaključujemo, da smrekova smola ima potencial za izboljšanje celjenja ran. Z njeno uporabo bi lahko pomagali ljudem, ki trpijo za kroničnimi ranami, zato so nadaljnje raziskave zaželeno in smiselne.

**Ključne besede:** smrekova smola, fitokemijska sestava, antioksidativna aktivnost, protimikrobna učinkovitost, celjenje ran

## **ABSTRACT**

Clinical studies and experiences from the past bear witness to effectiveness of spruce resin in wound healing. With this work we wanted to examine the impact of spruce resin on key processes of wound healing; removal of free radicals excess, prevention of microbiological contamination and facilitation of skin cells division and growth. We examined antioxidative properties with ABTS and DPPH tests, collected antimicrobial effectiveness data and carried out tests on keratinocytes and fibroblasts cell cultures. We performed GC-MS analyses of chemical composition of spruce resin and ethereal oil. We found out that spruce resin possesses mild antioxidative activity. It does have antimicrobial properties and the ability to prevent infection. The impact of spruce resin on keratinocytes and fibroblasts was unable to evaluate due to method used limitations. On the basis of results and facts we conclude that spruce resin has a potential to improve wound healing. With its use we could help those ones that suffer from chronic wounds so further researches are welcome and reasonable.

**Key words:** spruce resin, phytochemical composition, antioxidative activity, antimicrobial action, wound healing

## SEZNAM OKRAJŠAV

AA – antioksidativna aktivnost

ABTS – diamonijeva sol 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline)

CFU – colony forming units – enota, ki tvori kolonijo – oznaka v mikrobiologiji za štetje mikroorganizmov

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – medij za gojenje celic

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin

EO – eterično olje

FBS – fetalni goveji serum – dodatek mediju za gojenje celic

GC-MS – plinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

MRSA – methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NOX – NADPH oxidase enzymes – družina encimov NADPH oksidaz

RNS – reactive nitrogen species – reaktivne dušikove zvrsti

ROS – reactive oxygen species – reaktivne kisikove zvrsti



## 1. UVOD

### 1.1. Uporaba smrekove smole za zdravljenje ran

Terapija s smrekovo smolo se v ljudski medicini uporablja že stoletja in obstaja mnogo empiričnih dokazov o njeni učinkovitosti. Mazilo iz smrekove smole so ljudje pripravljali z maslom ali maščobo, in sicer za zdravljenje ran, kožnih okužb in abscesov [2]. V Starem Egiptu so mazilo iz smrekove smole uporabljali za zdravljenje opeklin. V nordijskih državah so si z njim pomagali pri zdravljenju akutnih, kroničnih in inficiranih ran, vnetij, razjed, gnojnih vnetij, opeklin, glivic na nohtih in vnetjih obnohtnega tkiva (zаноhtnica) [1]. Ugodne lastnosti smrekove smole pri celjenju ran so v zgodovini medicine poznali tudi nekateri zdravniki. Švedski zdravnik Benedictus Olai je leta 1578, v prvo medicinsko knjigo v Švedskem kraljestvu, zapisal recept za zdravljenje starih ran na nogi. Mazilo je bilo sestavljeno iz voska, smole bele jelke, masti, lesnega katrana in olivnega olja [2].

V začetku 21. stoletja se je začelo zanimanje za terapijo s smrekovo smolo tudi v znanstvenih krogih. Takrat so začeli raziskovalci izvajati sistematične študije njene učinkovitosti in mehanizma delovanja [1]. Zanimiva sta dva dokumentirana primera pacientov s hudimi razjedami na koži z zelo obetavnim kliničnim izidom. 61-letni moški je trpel zaradi štiri centimetrov velike, globoke razjede na trtici. Po sedmih mesecih terapije z mazilom iz smrekove smole se je rana popolnoma zaprla. 100-letna ženska je imela šest centimetrov veliko, gnojno razjedo na peti. Tudi pri njej se je po šestih mesecih terapije rana popolnoma zaprla [1].

Zdravljenje kroničnih ran predstavlja zdravnikom velik izziv, saj gre za težak in dolgotrajen proces, za katerega sodobna medicina nima na voljo dovolj učinkovitih metod. Ljudje s kroničnimi ranami trpijo zaradi velikega poslabšanja kakovosti življenja [1]. Prevalenca bolnikov s kroničnimi ranami pa se povečuje. Zato je še toliko bolj upravičeno iskanje učinkovitih terapij za zdravljenje kroničnih ran in obujanje starih, pozabljenih načinov ljudske medicine [2].

Zdravniki na Finskem v svoji klinični praksi zdravljenja bolnikov z različnimi vrstami ran na koži občasno uporabijo smrekovo smolo. Sipponen in sodelavci so pri svojem kliničnem delu opazili nekaj primerov presenetljivo uspešnega celjenja ran in razjed na koži pri uporabi mazila s smrekovo smolo, kar jih je spodbudilo, da so začeli s projektom raziskave učinkovitosti smrekove smole pri celjenju ran. Namen projekta je bil raziskati učinkovitost in mehanizem delovanja smrekove smole pri celjenju ran in razjed na koži [2].

Klinična študija, ki so jo izvedli Sipponen in sodelavci leta 2008, je potrdila učinek smrekove smole pri celjenju razjed nastalih zaradi pritiska. V raziskavo je bilo vključenih 37 pacientov iz enajstih bolnišnic na Finskem. Razjeda se je popolnoma zaprla pri 96 % tistih, ki so si razjedo mazali z 10-odstotnim mazilom iz smrekove smole. Pri kontrolni skupini pacientov, ki so jim rane oskrbovali z natrijevim karboksimetilceluloznim hidrokolooidnim polimerom (Aquacel® ali Aquacel Ag®; ConvaTec Ltd., London), so se rane zaprle le pri 36 % obravnavnih [1].

Naslednja klinična študija, ki so jo izvedli Sipponen in sodelavci leta 2012, je vključevala 23 pacientov z ranami, ki so se slabo celile. Pacientom so predpisali uporabo mazila z 10 % smrekove smole. Rane so se zacelile pri vseh pacientih v povprečno 43 dneh [1].

10-Odstotno mazilo iz smrekove smole ima protimikrobni učinek proti širokemu spektru bakterij in gliv. Smola blaži vnetje. Ima močno inhibitorno delovanje na interlevkin-1-beta, matrično metaloproteinazo-3 in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ). Njen učinek je celo boljši kot učinek 0,5- $\mu$ M deksametazona. Rezultati kažejo, da je mazilo s smrekovo smolo zelo obetavno za zdravljenje akutnih, kroničnih, inficiranih in neinficiranih ran ter razjed na koži, nastalih zaradi pritiska [1].

Mazilo pripravljeno iz smrekove smole se lahko nanese neposredno na rano. Rano se nato prekrije s povojem. Če je stanje takšno, da je neposreden nanos tvegan, se mazilo nanese preko gaze. Odvisno od sekrecije rane se povoj zamenja vsak dan ali na en do tri dni. Zelo redko se lahko po uporabi smrekove smole pojavi kontaktni dermatitis, na kar je treba biti pozoren pri nanašanju pripravkov iz smrekove smole na kožo [1].

## 1.2. Sestava smrekove smole

V zgoraj omenjenih raziskavah so uporabili smrekovo smolo iz norveške navadne smreke. Navadna smreka (*Picea abies* (L.) H. Karst.) je igličastolistna golosemenka (Coniferophytina) in sodi v družino borovk (Pinaceae). Smrekova smola (oleorezin) se izloča ob poškodbi debla in ščiti rane drevesa pred okužbami z mikroorganizmi in pred vdorom parazitov. Zaradi hidrofobnih lastnosti prepreči izgube vode zaradi izhlapevanja [1]. V začetku je tekoča, strdi se, ko izhlapi eterično olje.

Različne rastline uporabljajo različne izločke, s katerimi se zaščitijo v primeru poškodbe. V zvezi s smolo iglavcev so v uporabi naslednji izrazi, ki opredelijo frakcijo in delno tudi

sestavo rastlinskega izločka. **Oleorezin** je zmes smole (kolofonije) in eteričnega olja, mehke, poltrdne konsistence, značilen zlasti za iglavce in nekatere dvokaličnice. Za oleorezin iglavcev uporabljamo tudi izraz **terpentin**. Terpentin se izloča iz smolnih kanalov ob poškodbi debla. **Smola** je v vodi netopen produkt, ki ostane po destilaciji oleorezina. Za smolo iglavcev uporabljamo tudi izraz **kolofonija**. Hlapna frakcija oleorezina iglavcev je **terpentinovo eterično olje**. **Z destilacijo terpentina pridobimo kolofonijo in terpentinovo eterično olje** [3]. V besedilih, ki obravnavajo učinkovitost smrekove smole, se ta večinoma nanaša na terpentin (oleorezin) – izloček v celoti, kakršen priteče iz drevesa in ga uporabljamo za namene zdravljenja.

Terpentin vsebuje hlapne in nehlapne terpene [2]. Hlapna frakcija, terpentinovo eterično olje, je sestavljena pretežno iz monoterpenov:  $\alpha$ - in  $\beta$ -pinena, kamfena,  $\beta$ -felandrena,  $\delta$ -karena, limonena, mircena in bornilacetata [3]. Prisotna sta tudi seskviterpena:  $\delta$ -kadinen in  $\alpha$ -murolen [4]. Nehlapna frakcija, kolofonija, je zmes diterpenskih smolnih kislin (abietinska, neoabietinska, dehidroabietinska, dihidroabietinska, pimarna, izopimarna, levopimarna, sandrakopimarna in palustrinska kislina) in lignanov (pinorezinol, laricirezinol, izolalicirezinol, sekoizolalicirezinol, matairezol in *p*-hidroksicimetna kislina) ([1], [4]). Abietinska kislina nastane z izomerizacijo pimarne kisline pri destilaciji oleorezina [3].

V nadaljevanju se bo izraz smrekova smola nanašal na terpentin (oleorezin), za nehlapno frakcijo pa bomo uporabljali izraz kolofonija.

### 1.3. Zgradba kože

Za boljšo predstavbo in razumevanje procesa celjenja ran sledi kratka predstavitev zgradbe kože. Koža leži nad plastjo podkožja (hipodermis). Sestavljata jo spodnja plast, usnjica (dermis), in zgornja plast, povrhnjica (epidermis). V dermisu so znojnice, lojnice, dišavnice, živčni končiči, krvne žile, mezgovnice in dlake. Epidermis je sestavljen iz keratinocitov. V njem so še pigmentne celice (melanociti), Merklve celice (mehanoreceptorji) in Langerhansove celice (antigen predstavitvene celice). Glede na faze zorenja keratinocitov se epidermis deli na več plasti. V spodnjem delu se keratinociti mitotično delijo, od tam naprej pa samo še zorijo do faze roževinastih lusk, presnovno neaktivnih celic imenovanih korneociti. Korneociti so zapolnjeni s keratinom in drugimi beljakovinami.

Melanociti so v spodnji, bazalni plasti epidermisa. Vsebujejo zelo specifične organele melanosome, ki sintetizirajo melanin. Melanociti v procesu citokrine sekrecije izločajo melanin v okolne keratinocite, kjer pokrije zgornji pol jedra keratinocitov. S tem zaščitijo dedni material pred učinki ultravijoličnega sevanja. Langerhansove celice izvirajo iz kostnega mozga in so del makrofagnega sistema. Požirajo in predelujejo antigene iz kože. Lahko potujejo do bezgavk in jih predstavljajo limfocitom T. Merklve celice ležijo v bazalni plasti. Imajo vlogo senzoričnih mehanoreceptorjev, občutljivih na dotik [5].

## **1.4. Proces celjenja rane**

Poškodba kože sproži kaskado fizioloških odzivov, ki zaprejo rano in obnovijo tkivo. Akutne rane so tiste, pri katerih se ta kaskada odvije nemoteno, v ustreznem zaporedju, in se zaključi z obnovitvijo poškodovanega tkiva. Kronične rane pa nastanejo, če je proces moten zaradi okužbe ali drugih patofizioloških stanj v organizmu [6]. Celjenje akutne rane vključuje procese hemostaze, vnetja, proliferacije in zorenja novonastalega tkiva [7].

### **Faza hemostaze**

Ob nastanku rane pride do poškodbe žilja mikrocirkulacije, zaradi česar vdre kri v področje rane. V fazi hemostaze se zaprejo poškodovane žile iz katerih izteka kri, kar prepreči nadaljnje izgube krvi iz organizma. Prekinitev integritete žil povzroči vazokonstrikcijo, ki zmanjša pretok krvi [7]. Trombociti iz razlite krvi pridejo v stik s subendotelijem kolagenom in sprostijo vsebino zrnca iz svoje notranjosti [5]. Aktivira se koagulacijska kaskada; intrinzična in ekstrinzična pot koagulacije, in nastane trombocitni čep [6]. Trombocitni čep in agregacija trombocitov zapreta poškodovano žilo in preprečita nadaljnjo izgubo krvi [7]. Trombociti so ključni za proces hemostaze in normalen vnetni odziv. Snovi, ki jih sprostijo ob degranulaciji, kemotaktično privabijo fibroblaste in makrofage na mesto poškodbe. Trombociti na mestu poškodbe sprostijo tudi vazoaktivne amine, ki povečajo prepustnost mikrožil, zaradi česar pride do izločanja eksudata v ekstravaskularni prostor [7]. Lokalno vazodilatacijo in povečano prepustnost kapilar povzročijo tudi tkivni bazofilci z izločanjem vazoaktivnih citokinov. Namen je olajšati diapedezo; prehajanje levkocitov v tkivo. Povečana prepustnost kapilar omogoča prehajanje iz krvi v tkivo tudi serozni tekočini, zaradi česar nastane oteklina [6].

### **Faza vnetja**

V zgodnji fazi vnetja se nevtrofilni granulociti adherirajo na endotelijske celice žil v bližini mesta poškodbe in začnejo s procesom diapedeze prehajati stene žil. Na mestu poškodbe potem fagocitirajo bakterije in druge artefakte in jih uničujejo s pomočjo encimov in reaktivnih kisikovih zvrsti. V tej fazi se začne intenzivna delitev bazalnih celic epidermisa, ki z delitvijo migrirajo od robov proti središču preko površine dermisa in odlagajo sestavine bazalne membrane. Aktivnost nevtrofilnih granulocitov se zmanjša, ko odstranijo bakterije, ki so kontaminirale rano. Drugi artefakti se odstranijo na način, da se jih iztisne na površino rane v krasto ali pa s pomočjo fagocitoze z makrofagi [7].

V pozni fazi vnetja se monociti iz krvi, ki pridejo na mesto rane, preobrazijo v tkivne makrofage. Ti so ključni pri procesu fagocitoze odmrlih celic, prav tako pa izločajo rastne dejavnike, ki so odgovorni za proliferacijo fibroblastov (sintetizirajo zunajcelični matriks), gladkih mišičnih in endotelijskih celic (odgovorne za angiogenezo) [7]. Makrofagi fagocitirajo odmrle celice, bakterije, nevtrofilce, ki so fagocitirali bakterije, poškodovan zunajcelični matriks in druge tujke. Naloga faze vnetja je čiščenje rane [6].

### **Faza proliferacije**

Faza proliferacije se odvija že med fazo vnetja in vključuje migracijo fibroblastov, depozicijo zunajceličnega matriksa in formiranje novonastalega tkiva, ki se imenuje granulacijsko tkivo. V tej fazi se rana polni z močno ožiljenim vezivnim tkivom [6]. Z napredovanjem proliferativne faze se začasen fibrinski/fibronektinski matriks zamenja z novonastalim granulacijskim tkivom. Proliferativna faza se zaključi z epitelizacijo rane. Fibroblasti se delijo in producirajo fibronectin, hialuronan, kasneje pa kolagen in proteoglikane. Te sestavine pomagajo pri izgradnji zunajceličnega matriksa. Interakcije med fibroblasti in zunajceličnim matriksom uravnavajo nadaljnjo sintezo in preoblikovanje nastalega matriksa preko povratnih zank. Zunajcelični matriks predstavlja ogrodje za adhezijo celic in odločilno vpliva na rast, premikanje in diferenciacijo celic. Ekstracelularni matriks je sestavljen iz kolagena in elastina ter intersticijskega matriksa iz adhezivnih glikoproteinov, obdanih s proteoglikani in glukozaminoglikanskim gelom. Intersticijski matriks se organizirano razporedi okrog epiteljskih, endotelijskih in gladkih mišičnih celic. Na ta način se formira bazalna membrana, ki uravnava polarizacijo celic in je nujna za pravilno obnovo epiteljskega tkiva.

Granulacijsko tkivo je zgrajeno iz delečih se fibroblastov in prepleta kapilar v rahlem zunajceličnem matriksu. Takšno stanje omogoča angiogenezo z namenom neovaskularizacije formiranega tkiva (formiranje novega žilnega prepleta iz obstoječih žil na področju poškodbe). Ta proces je zaporedje dogodkov: proteolitične razgradnje bazalne membrane obstoječe žile, migracije endotelijske celice v zunajcelični matriks, proliferacije endotelijske celice in organizacije nastalih endotelijskih celic v kapilarno cevko [7]. Endotelijske celice sosednjih venul v področju rane indicirajo nastanek kapilar s pomočjo psevdopodijev. Endotelijske celice nastajajočih kapilar si s pomočjo encimov utirajo pot v nastajajoče granulacijsko tkivo [6]. Kapilarne cevke, katerih izvori so na različnih mestih obstoječih žil, se uredijo v mikrovaskularni preplet skozi granulacijsko tkivo [7]. Tam izoblikujejo preplet kapilar, iz česar se kasneje formirajo arteriole in tako regenerirajo prekinjeno mikrocirkulacijo [6]. Nastajajoče granulacijsko tkivo začnejo preraščati epiteljske celice. Te se delijo in potujejo od robov do središča [7]. Epiteljske celice lahko rastejo samo preko vlažne in ožiljene površine, suha in nekrotična površina pa inhibira njihovo rast [6]. Lateralna migracija se nadaljuje, dokler ni površina v celoti preraščena, zaustavi pa se s kontaktno inhibicijo med epiteljskimi celicami. Potem se začnejo celice deliti, rasti v višino in diferencirati, dokler nista dosežena navadna debelina in plastovitost epidermisa [6]. Za epitelizacijo je pogoj vlažno okolje, ustrezna oskrba s hranili in bakteriološka kontrola [7]. Med fazo proliferacije pa je zelo pomembna tudi kontrakcija tkiva, ki skrči obseg rane. Nekateri fibroblasti se strukturno in funkcionalno transformirajo v miofibroblaste, ki s pomočjo interakcij med aktinom in miozinom ustvarijo kontraktilno silo, ki skrči obseg rane tako, da privede robove rane bližje skupaj. Ta proces pospeši zapiranje rane in tako zaščiti globlja tkiva pred dejavniki iz okolja [8].

### **Faza zorenja novonastalega tkiva**

Ta faza traja še dolgo po tem, ko je rana na videz zaceljena. V tej fazi fibroblasti razgrajujejo zunajcelični matriks, ki je nastal zaradi zapolnitve rane, in formirajo zunajcelični matriks, kakršen je prisoten v nepoškodovanem tkivu. Razgradnja proteinov se odvija s pomočjo reguliranega delovanja matričnih metaloproteinaz. Kolagen tipa I se zamenja s kolagenom tipa III [8]. Na ta način se povečuje natezna trdnost nastajajočega tkiva. Fibroblasti, makrofagi in druge celice imunskega sistema zapustijo mesto rane ali pa vstopijo v proces apoptoze in programirane celične smrti.

Površinske rane se navadno zacelijo brez vidnih poškodb na koži. Globoke rane ali pa rane pri katerih pride do motenj v fazi zorenja novonastalega tkiva, pa lahko na koži pustijo brazgotine [6]. Natezna trdnost novonastalega tkiva se s časoma povečuje, vendar tkivo, ki zapolnjuje brazgotine, tudi po daljšem obdobju zorenja doseže le 80 % natezne trdnosti zdravega tkiva [9].

Kronične rane nastanejo kot posledica motenj v eni ali več fazah v procesu normalnega celjenja rane [7]. Zaradi motenj se proces celjenja ne more zaključiti, rana se ne zapre in tkivo se ne obnovi v celoti. Motnje lahko nastanejo na molekularnem nivoju zaradi patofizioloških stanj v organizmu, lahko pa je razlog tudi okužba [10].

## **1.5. Upočasnitev celjenja rane zaradi patogenih mikroorganizmov**

Koža je pomembna bariera, ki preprečuje vstop mikroorganizmov v notranja tkiva. Poškodba kože prekine bariero in omogoči vdor mikroorganizmom. Človeški organizem ima številne mehanizme, s katerimi se brani pred njimi, vendar pa se mikroorganizmi včasih izognejo obrambnim mehanizmom. Takrat začnejo kolonizirati rano, se množiti in povzročati škodljive učinke.

Okužba lahko poslabša in upočasni celjenje rane. Neustrezno zdravljenje okužbe rane ima lahko hude posledice; bakteriemijo in sepsa. Bakterijsko okužbo lahko smatramo kot prisotnost bakterij v takem številu, da fiziološki obrambni mehanizmi gostitelja ne zmorejo več uspešno obvladovati njihove prisotnosti, kar ima za gostitelja škodljive posledice in onemogoči normalno celjenje rane ter poškoduje celitveno tkivo. Kvantitativno lahko okužbo opredelimo kot stanje, ko je na kvadratni centimeter tkiva prisotnih več kot  $10^5$  CFU (*colony forming units*) bakterij. Ko bakterije presežejo to število, ni več mogoča tvorba zdravega granulacijskega tkiva, vendar je to zelo odvisno tudi od stanja organizma posameznika in moči njegovega imunskega sistema. Razvoj okužbe je odvisen od stanja rane, stanja v organizmu gostitelja in lastnosti gostujočih bakterij. Okužbo lahko smatramo tudi kot poslabšanje celjenja rane zaradi bakterij [11].

Okužene rane so navadno kolonizirane z več bakterijskimi vrstami. Ločimo okužbe kože in okužbe mehkih tkiv. Če ni pravočasnega ustreznega zdravljenja, lahko okužba kože napreduje v okužbo mehkih tkiv [12].

Bakterije uporabljajo različne načine, s katerimi si povečajo možnosti obstoja v rani in okužbe gostitelja. *Pseudomonas aeruginosa* se ovije s kapsulo, ki prepreči aktivacijo komplementa in fagocitozo. *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* se s pilusi pritrdita na celice gostitelja. Vrste *Staphylococcus* in *Streptococcus* imajo v celični steni polisaharide, s katerimi se adherirajo na tkiva. Bakterije porabljajo kisik in hranila, izločajo encime, ki uničujejo rastne dejavnike in spodbujajo pretirano tvorbo matričnih metaloproteinaz, zaradi česar je zavrto celjenje rane. Eksotoksini so proteini, ki jih izločajo bakterije in povzročijo celično smrt. Endotoksini pa so lipopolisaharidi, ki se sprostijo ob smrti bakterijske celice po Gramu negativnih bakterij – ti so sicer manj toksični od eksotoksinov, vendar jih je težje odstraniti. Uničenje po Gramu negativnih bakterij z antibiotikom sicer zmanjša izločanje njihovih eksotoksinov, vendar se zaradi smrti celic poveča izločanje endotoksinov. Zaradi bakterij je lahko motena epitelizacija tkiva, saj proteaze, ki jih izločajo nevtrofilci za boj proti bakterijam, povzročajo lizo epiteljskih celic [11].

Dejavniki, ki vplivajo na izid kolonizacije rane z bakterijami, so število in virulentnost bakterij. Virulentnost bakterij variira med vrstami in tudi znotraj vrste – različni sevi so lahko različno virulentni. Zelo pomembna je imunska odpornost gostitelja. Na učinkovitost imunskega sistema gostitelja vplivajo stres, prehransko stanje organizma, vitalnost krvožilnega sistema, metabolno stanje, sočasne okužbe in druge bolezni. Na dovzetnost za okužbo vpliva tudi globina rane. Dlje kot je rana nezaceljena, večje število mikroorganizmov jo kolonizira. Vrsta mikroorganizma, ki kolonizira rano, vpliva na potek celjenja. Na potek vpliva tudi nastanek biofilma [11].

Rano navadno najprej kolonizirajo bakterije, ki so del normalne bakterijske flore kože. Te bakterije imajo tudi pomembno vlogo pri preprečevanju kolonizacije rane z bolj virulentnimi bakterijami. Prvi kolonizatorji so navadno po Gramu pozitivne aerobne bakterije ali pa fakultativno anaerobne bakterije, ki lahko preživijo v aerobnih razmerah.



Najpogostejši povzročitelj okužbe ran je *Staphylococcus aureus*. Sledijo bakterije iz rodu *Streptococcus* in *Pseudomonas aeruginosa*. Pogoste aerobne bakterije v ranah so tudi *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* in *Streptococcus pyogenes*. Aerobne bakterije, npr. *Escherichia coli*, porabljajo kisik iz rane, zaradi česar nastane hipoksija in s tem idealne razmere, da rano kolonizirajo anaerobne bakterije. Večina bakterij začne kolonizacijo rane tako, da se znajdejo v rani same in nepritrjene. V rani se potem pritrdijo in ustvarijo razmere, v katerih se delijo in privabljajo druge bakterije. Ko je dosežena kritična gostota, začnejo bakterije izločati polimerne snovi, s katerimi obdajo celotno kolonijo in se zaščitijo pred okolico. Nastali biofilm negativno vpliva na proces celjenja rane, saj bakterije izločajo encime in toksine in povzročajo kronično vnetje. Bakterije v biofilmu imajo majhno presnovno aktivnost, zaradi česar jih gostitelji imunski sistem ne prepozna kot grozečo nevarnost. Posledica je odsotnost vidnih, klasičnih znakov okužbe. Kljub temu pa biofilm porablja hranila in gradnike, ki so sicer namenjeni za celjenje rane, in s tem zavira proces celjenja [11].

Navadno je prvi znak okužbe z bakterijami vidno vnetje. Drugi znaki so motnje v procesu celjenja, povečana količina eksudata in bolečina, preden se razvijejo bolj očitni znaki okužbe. Če okužba uide izpod nadzora, lahko pride do celulitisa – okužbe dermisa in podkožnih tkiv. Povzročitelji celulitisa so pogosto streptokoki, zlasti *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* in *Pseudomonas* [11]. Večina okužb ran je bakterijskih. Okužbe ran z glivicami so redkejše. Če že pride do okužbe z glivicami, so te navadno prisotne na koži v okolici ran, ki so bile dolgo prekrite z okluzivno obvezo [11].

Giacometti in sodelavci so leta 2000 izvedli raziskavo okužb kirurških ran, v kateri so določili povzročitelje. Retrospektivna raziskava je vključevala 676 pacientov. Vrste bakterij, ki so bile prisotne na ranah, so sledeče: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* in *Enterococcus faecalis* [12].

Gjodsbol in sodelavci so izvedli raziskavo, v kateri so proučevali mikrobnost kroničnih razjed ven na nogi. V raziskavo je bilo vključenih 46 pacientov. Bakterije, ki so jih našli, so bile sledeče: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris* in *Proteus mirabilis*. V nadaljevanju so ugotavljali, katere bakterije so bile v ranah stalno prisotne.

Najbolj pogosto so v ranah pacientov našli bakteriji *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*. Druge pogosto prisotne bakterije so bile *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*. V raziskavi so ugotovili, da so bile vse kronične razjede kolonizirane z bakterijami in da so rane v večini primerov kolonizirane z več bakterijskimi vrstami. Večina bakterij je ostala v rani, ko so jo enkrat kolonizirale [10].

*Pseudomonas aeruginosa* proizvaja encime metaloproteinaze, ki uničujejo tkivo. Te inducirajo razgradnjo zunajceličnega matriksa ter kožnih proteinov in inhibirajo rast fibroblastov. Na ta način ovirajo in zakasnijo proces celjenja kroničnih ran. Gjodsbol in sodelavci menijo, da prisotnost bakterije *Pseudomonas aeruginosa* v kroničnih venskih razjedah na nogi povzroči povečevanje rane in zakasnjeno celjenje [10].

## **1.6. Reaktivne kisikove zvrsti v procesu celjenja rane**

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so majhne molekule, ki služijo kot oksidacijski agensi, ali pa se pretvorijo v kisikove radikale. Imunske celice so v procesu celjenja rane sposobne kontrolirano proizvesti večje količine reaktivnih kisikovih zvrsti, kar ima velik pomen pri preprečevanju okužbe rane. Poleg tega imajo vlogo pri celični signalizaciji. ROS nastajajo v mnogih fizioloških procesih, lahko pa so proizvedeni namenoma s pomočjo encimov NOX. Ti encimi so na membrano vezani kompleksi in reducirajo kisik v superoksid ( $O_2^-$ ). Superoksid reagira in tvori vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), peroksidni anion ( $HO_2^-$ ) in hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ), ki so udeleženi v procesih diferenciacije, proliferacije in apoptoze. ROS igrajo pomembno vlogo že v procesu koagulacije. V fazi vnetja uporabljajo makrofagi in nevtrofilci reaktivne kisikove zvrsti za uničevanje bakterij. Z njimi uničijo tudi fagocitirane bakterije v fagosomih. Pod vplivom superoksida nastajajo tudi reaktivne dušikove zvrsti (RNS), ko superoksid reagira z dušikovim oksidom (NO).  $H_2O_2$  v majhnih koncentracijah stimulira angiogenezo. ROS vplivajo na migracijo keratinocitov in kontrakcijo rane, ki je ključna, da se zmanjša premer rane in se na ta način skrajša čas, ki je nujen, da se ponovno vzpostavi neprekinjena kožna bariera [13].

Večina kroničnih ran je povezana s kroničnim vnetjem. Faza proliferacije se lahko začne šele, ko se zmanjša število makrofagov. Dokler ti vztrajajo v rani, se nadaljuje faza vnetja, faza proliferacije pa je zakasnjena. Kronično vnetje inducira senescenco celic, kar dodatno onemogoča uspešno celjenje in pospešuje razraščanje fibroznega tkiva. ROS imajo pomembno vlogo pri celični signalizaciji, če pa se pojavijo v nenadzorovano preseženih količinah, imajo škodljive učinke. Preko lipidne peroksidacije, modifikacije proteinov in poškodb DNA vodijo v senescenco in apoptozo celic. Največ ROS proizvedejo med fazo vnetja nevtrofilci in makrofagi. Presežki se lahko pojavijo zaradi hiperprodukcije ali pa izostanka detoksifikacijskih mehanizmov. V kronični rani se pojavi začaran krog – če pride do faze kroničnega vnetja, ostaja konstantno povišan nivo ROS, ki poškodujejo celice, kar pa zopet povečuje vnetje. Oksidativni stres povzroča senescenco fibroblastov, kar vodi do nastanka kroničnih razjed [13].

V rani zaradi prekinitve žil nastane pomanjkanje kisika. Veliko kisika porabijo vnetne in reparativne celice rane. Akutna hipoksija stimulira migracijo fibroblastov in endotelijskih celic, sintezo proteinov in proliferacijo. Endotelijske celice zaradi hipoksije producirajo povečano število endotelijskih adhezijskih molekul, ki stimulirajo diapedezo nevtrofilcev in makrofagov ter ekstravazacijo. Tudi migracija in proliferacija keratinocitov je stimulirana zaradi akutne hipoksije. Med celjenjem se oksigenacija ponovno vzpostavi zaradi povečane permeabilnosti žil, vazodilatacije in angiogeneze. V primeru ishemije pa so ti procesi moteni, zato je tudi celjenje neuspešno. Kronične ishemične rane ostanejo v fazi vnetja, proliferacija in depozicija matriksa pa sta zavrti. Akutna hipoksija stimulira celjenje rane, kronična hipoksija pa močno zavre ključne procese proliferativne faze. Hipoksija vodi v povečano produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti, zato je v razmerah ishemije povečan oksidativni stres. Stanja, pri katerih je pogosta ishemija, so insuficienca ven, ateroskleroza in sladkorna bolezen. Kontradiktorno, reperfuzija hipoksičnega tkiva še poveča oksidativni stres, saj z njo pridejo na področje rane dodatni nevtrofilci, ki še povečujejo vnetni cikel. Zaradi povečanega števila vnetnih celic na mestu rane pride ob reperfuziji zaradi na novo prispelega kisika do tvorbe velikega števila ROS, ki lahko okvarijo tkivo [13].

Smrekova smola vsebuje lignane. Ti imajo antioksidativne učinke in lahko zaščitijo celice v procesu celjenja rane pred škodljivimi učinki radikalov. Prispevajo k celjenju ran in so verjetno aktivne komponente smole [1].

## **2. NAMEN DELA**

Celjenje rane je kompleksen proces. V tem procesu se mora zaustaviti krvavitev, odstraniti tujke in mikroorganizme, ki vdrejo v rano, vzpostaviti nadzor in ravnovesje med koristnimi in neželenimi učinki kisikovih reaktivnih zvrsti, pripraviti in vzdrževati ustrezno okolje, ki omogoča razmnoževanje in rast različnih celic, nastati mora novo tkivo, se oblikovati in dozoreti. Oblikovati se morajo funkcionalne strukture kože, da se povrne njena fiziološka funkcija.

Izkušnje so pokazale, da je smrekova smola snov rastlinskega izvora, ki je sposobna skrajšati čas in uravnovesiti procese celjenja rane, da se ti zaključijo uspešno. Kompleksnost procesa celjenja rane že sama po sebi daje slutiti, da mora biti tudi mehanizem, po katerem smrekova smola uravnovesi fiziološko celjenje in popelje proces v želeno smer, zelo kompleksen. V tej nalogi se bomo osredotočili na analizo njene sestave, na ugotavljanje antioksidativnih lastnosti in aktivnosti proti patogenim mikroorganizmom ter na njen učinek pri rasti dveh ključnih vrst celic, udeleženih pri celjenju ran.

Pridobili bomo terpentin iz slovenskih, bosanskih in finskih smrek. Terpentin bomo z destilacijo ločili na kolofonijo in terpentinovo eterično olje (EO). Kolofonijo bomo frakcionirali na kislno in nevtralno frakcijo. Sestavo terpentina in terpentinovega eteričnega olja bomo analizirali z GC-MS. Antioksidativno učinkovitost EO in frakcij bomo preverili z dvema različnima metodama, ABTS in DPPH. Pridobili bomo podatke o protimikrobni učinkovitosti terpentina. Vpliv terpentina na rast celic bomo ugotavljali s pomočjo celičnih kultur keratinocitov in fibroblastov.

Na ta način želimo preveriti delovanje smrekove smole na ključne procese celjenja rane. V primeru, da ima smrekova smola protimikrobne lastnosti, da je sposobna odstranjevati presežek kisikovih radikalov in pospešuje rast keratinocitov ter fibroblastov, bi lahko zaključili, da pomembno prispeva k procesu celjenja rane.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### Izhodni material, uporabljene kemikalije, aparature in oprema

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazin, p. a., Fluka, Švica

2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT), p. a., Merck, Nemčija

Aceton, p. a., Carlo Erba reagents, Italija

Amonijev persulfat, p. a., Sigma-Aldrich, Nemčija

Brezvodni absolutni etanol, p. a., Carlo Erba reagents, Italija

Brezvodni natrijev sulfat, p. a., Riedel-de Haën, Nemčija

Cell Counting Kit-8 (CCK-8), B34304, bimake.com

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS - Promega, ZDA

Človeška keratinocitna linija NCTC 2544

Človeški dermalni fibroblasti (primarne celice)

Diamonijeva sol 2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline), p. a., Sigma-Aldrich, Nemčija

Dietileter, stabiliziran z etanolom, puriss p. a., Sigma Aldrich, Nemčija

Dimetilsulfoksid, p. a., Sigma Aldrich, Francija

DL- $\alpha$ -tokoferol  $\geq 96$  % Ph.EUR, Carl Roth, Nemčija

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, brez  $\text{Ca}^{++}$  in  $\text{Mg}^{++}$ , ThermoFisher scientific, ZDA

Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher scientific, ZDA

Flavoksan 14 – rožmarinov antioksidant – CO<sub>2</sub> ekstrakcija, Dragonspice Naturwaren, Nemčija

Galna kislina  $\geq 98,0$  %, purum ACS (HPLC), Sigma Aldrich, Španija

Koncentrirana klorovodikova kislina, 37 %, p. a., Merck, Nemčija

Metanol, p. a., Carlo Erba reagents, Italija

Metilensko modriilo – 0,4-odstotna raztopina, Trypan Blue Solution, Sigma Aldrich, ZDA

Natrijev hidroksid, peleti za analizo, p. a., Merck, Nemčija

n-Heksan 95 %, PA-ACS, Panreac, Španija

Prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo, Slovenija

Serum FBS, Gibco Life Technologies, ZDA

Terpentin smreke (*Picea abies*), Slovenija, Bosna, Finska

Analizna tehtnica, model XS205DU, Mettler Toledo, Švica

Avtomatske pipete, Biohit-Proline, Finska

Čitalec mikrotitrskih plošč, Synergy H4 Hybrid Reader SN252102, BioTek, ZDA

Digestorij, Pol-Eko Aparatura™, Anglija

Filter papir  $\phi$ 110, Macherey-Nagel, Nemčija

GC-MS HP6890-5973 GC-MSD, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, ZDA

GC-MS QP2010 Ultra 76029, Shimadzu, Japonska

Inkubator za celice Cytoperm 2, Heraeus, Nemčija

LAF komora MC15-2, Iskra Pio, Slovenija

Mikrotitrne plošče 96 vdolbin, nepirogene, sterilne, z ravnim dnom, Sarstedt, ZDA

Rotavapor Büchi, Švica

Spektrofotometer, Nanocolor UV/VIS NUV0753, Macherey-Nagel, Nemčija

Testni lističi pH 0-14, Merck, Nemčija

Ultracentrifuga, Centric 200R 950W 3A max. 16200 rpm, Tehnica, Slovenija

Vorteks, Vibromix 10 50W 0,2A, Tehnica, Slovenija

### **3.1. Frakcioniranje terpentina na kislino in nevtralno frakcijo kolofonije in terpentinske eterične olje**

Vzorci za raziskave smo pripravljali iz štirih terpentinov. Pridobili smo terpentine iz smrek, ki rastejo na treh rastiščih: v Sloveniji, Bosni in na Finskem. Za slovensko rastišče smo pridobili eno leto star terpentin in svež terpentin, nabran spomladi 2018.

Bosanski in finski terpentini nista bila sveža. Imela sta vonj in na nekaterih predelih rdečkasto barvo, ki je verjetno posledica mikrobiološke razgradnje. Vsebovala sta primesi nečistot. Slovenska terpentina sta bila lepljive, poltrdne konsistence z mnogo primesmi lubja, vejic, iglic in drugih artefaktov. Terpentine smo prečistili in jih frakcionirali na hlapno, nevtralno in kislino frakcijo.

V 1000-mL bučko smo nalili 500 mL prečiščene vode in natehtali 50 g smole. Bučko smo postavili na grelno kaloto in nanjo namestili destilacijski nastavek *clevenger*. Destilacijo smo izvajali dve uri pri temperaturi grelne kalote 200 °C.

Po zaključeni destilaciji smo počakali, da se je sistem ohladil. Izmerili smo volumen eteričnega olja (EO). Iz bučke smo odklopili destilacijski nastavek in odlili vodo iz kolofonije. Kolofonijo smo raztopili v 200 mL dietiletra, z dodatnih 50 mL smo sprali steklovino. Raztopino smo očistili z dvakratnim filtriranjem pri znižanem tlaku. Stehtali smo maso lubja in artefaktov.

Postopek frakcioniranja kolofonije smo priredili po: Wiyono idr., 2006 [14]. V dietiletru raztopljeno kolofonijo smo ekstrahirali trikrat s po 50 mL 1 M NaOH. Etrno fazo z nevtralno frakcijo smo prelili v erlenmajerico, vodno fazo pa smo nakisali do pH 0 (HCl – fumigans  $M = 36,46 \text{ g/mL}$ ,  $\rho = 1,18 \text{ g/L}$ ,  $w = 37 \%$ ). Nakisano vodno fazo smo ekstrahirali trikrat s po 50 mL dietiletra. Etrno fazo s kislno frakcijo smo prelili v erlenmajerico, vodno fazo pa zavrgli. Nevtralno in kislno frakcijo smo sušili z brezvodnim natrijevim sulfatom. Frakcije smo na natrijevem sulfatu pustili čez noč, da je sušilno sredstvo vezalo vodo. Raztopine smo dvakrat filtrirali pri znižanem tlaku, da smo odstranili natrijev sulfat in jih prelili v 500-mL bučko.

Sledila je prva faza odparevanja pri 40 °C, tlaku 800 mbar in vrtenju na stopnji 6 ter s postopnim zniževanjem tlaka do 750 mbar. Gosto raztopino smo nato prelili v stehtano 100-mL bučko. Pri drugi stopnji odparevanja smo temperaturo nastavili na 80 °C, tlak na 800 mbar in stopnjo vrtenja na 4-5. Kasneje smo vzpostavili zračni tlak, stopnjo vrtenja zmanjšali na 1 in pri 80 °C počasi odparili topilo do suhega produkta. Pripravljene frakcije smo stehtali.

Med postopkom priprave kisle frakcije bosanske in finske smole se je po nakisanju bazične vodne raztopine oborila rdečkasta vlečljiva snov – domnevno fermentacijski produkti, ki smo jih med ekstrakcijo z dietiletrom v liju ločniku odstranili iz etrne faze, kar je vplivalo na maso in končni izplen.

### **3.2. Analiza kemijske sestave terpentinovnega eteričnega olja s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo**

GC-MS analizo eteričnih olj smo izvedli z aparaturo GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska). Uporabili smo nepolarno kapilarno kolono Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm,  $df = 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ , SF: 1,4-bis(dimetilsiloksi)fenilendimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, Pensilvanija, ZDA). Analizo smo izvedeli z računalniškim programom

GCMS Solution 4.2 s pomočjo podatkovne knjižnice FFNSC 3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska).

Uporabljen nosilni plin je bil helij s pretokom 1 mL/min (linearna hitrost). Uporabili smo »split« 1:100 način injiciranja vzorca. Temperatura injektorja je bila 250 °C, prav tako temperatura vmesnika. Temperatura ionskega izvora je bila 200 °C. Analiza je potekala pri temperaturnem programu od 40 °C do 220 °C s povečevanjem temperature 3 °C/min. Injicirali smo vzorec eteričnega olja s koncentracijo 10 µL/mL v heksanu. Volumen injiciranja je bil 1 µL, način ionizacije EI, energija ionizacije -70 eV, napetost na detektorju 1 kV ter frekvenca zajemanja podatkov 5 Hz. Relativno molekulsko maso (m/z) smo merili v območju od 40 do 400. Snemanje smo začeli pri 3,0 min, vklop filameta pri 2,8 min. Celoten čas analize je trajal 60,0 min.

Rezultate smo prikazali v preglednici VII, v poglavju 4.2., s pomočjo Kovatsovega retencijskega indeksa (I), ki je v našem primeru, ko smo analizo izvajali s temperaturnim programom, definiran z enačbo:

$$I = 100 \times \left[ n + (N - n) \frac{t_r(\text{spojina}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right]$$

Analizirano spojino primerjamo z alkani po retencijskem času.  $T_r(n)$  je retencijski čas bolj hlapnega alkana,  $t_r(N)$  pa retencijski čas manj hlapnega alkana. N in n sta števili ogljikovih atomov sosednjih alkanov. Med njunima vrednostma retencijskih časov leži vrednost retencijskega časa analizirane spojine.

Vsebnost posamezne spojine v eteričnem olju smo podali kot delež celotne vsebnosti in predstavljajo relativno površino v odstotkih, izračunano po naslednji enačbi:

$$\text{Relativna površina (\%)} = \frac{\text{površina pod krivuljo vrha}}{\text{površina pod vsemi krivuljami vrhov}} \times 100$$

### **3.3. Analiza kemijske sestave terpentina s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo**

Analize sestave terpentina so izvedli na inštitutu Luke na Finskem (Natural Resources Institute Finland (Luke), Latokartanonkaari 9, FI-00790 Helsinki). Terpentini so zmleli v terilnici v fin prah. Natehtali so 10 miligramov prahu in ga raztopili v acetonu. Vzorec so sušili s prepihavanjem z dušikom. Zatem so ga silanizirali z *N*-trimetilsililimidazolom



(TMSI) v piridinu. Silaniziran vzorec so analizirali z GC-MS (HP6890-5973 GC-MSD, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) inštrumentom, opremljenim z DB-5MS kapilarno kolono (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Temperatura injektorja je bila 280 °C, temperatura ploskve masnega spektrometra pa 300 °C. Analiza je potekala z gradientom temperature. Začetna temperatura je bila 170 °C, nato je naraščala za 5 °C/min do temperature 300 °C, pri tej temperaturi se je analiza nadaljevala še 15 minut. Celotna analiza je trajala 41 minut. Nosilni plin je bil helij, vzorec pa so injicirali po »split« načinu (9,9:1). Ionizacijo so izvedli z EI načinom (-70 eV), vzorec fragmentacije so primerjali s komercialno knjižnico spojin (NIST14/Wiley11) in interno knjižnico laboratorija. Kvantifikacijo *p*-kumarne kisline in smolnih kislin so izvedli s pomočjo derivatiziranega internega standarda heptadekanojske kisline (C17:0), lignane pa so kvantificirali s pomočjo derivatiziranega betulinola.

### **3.4. Meritve antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo ABTS**

Priprave na preizkuse antioksidativne aktivnosti smo začeli s preverjanjem topnosti terpentina in frakcij kolofonije v metanolu. V nadaljevanju smo iskali tisto koncentracijo frakcije v vzorcu, pri kateri je po reakciji z radikalom vrednost izmerjene absorbance prišla v splošno veljavno območje linearnosti med 0,1 in 1 (Beer-Lambertov zakon). Terpentin in frakcije smo popolnoma raztopili v metanolu pri koncentraciji 100 mg/mL. Na osnovi preliminarnih meritev absorbance smo se odločili za delo s koncentracijami in redčitvami, kot so prikazane v preglednici X v poglavju 4.4. Izvedbo testov ABTS in DPPH smo priredili po: Jurkaš, 2017 [15].

Pripravili smo osnovne raztopine vzorcev. Na analizni tehtnici smo natehtali predvideno maso vzorca in jo raztopili v 1 mL metanola. Natančne koncentracije so navedene med rezultati. Osnovne raztopine terpentinov smo po raztapljanju centrifugirali 10 minut pri 6000 rpm, da so sedimentirali netopni artefakti. Frakcij nismo centrifugirali, ker so bile predhodno prečiščene. Eterična olja smo analizirali nerazredčena; volumen koncentriranega eteričnega olja smo odmerili z mikropipeto, mu dodali raztopino radikala in izmerili absorbanco.

Raztopino ABTS<sup>•+</sup> smo pripravili z raztapljanjem praškov ABTS in amonijevega persulfata v metanolu. V primeru, ko smo raztopino pripravili s prečiščeno vodo, je nastala emulzija, kakor hitro smo jo združili z raztopino analiziranega vzorca v metanolu, meritev absorbance motne emulzijske raztopine pa ne bi bila verodostojna.

ABTS smo predhodno aktivirali z amonijevim persulfatom. V 50 mL bučko smo natehtali 0,13084 grama ABTS in 0,02995 grama amonijevega persulfata. Bučko smo napolnili z metanolom do oznake, ovili v aluminijasto folijo in pustili čez noč na sobni temperaturi, da so se praški raztopili in da je potekla reakcija. Raztopino ABTS<sup>•+</sup> smo pred izvedbo meritev dodatno redčili z metanolom, da smo dosegli absorbanco tako pripravljene raztopine približno 0,7. Meritve smo izvedli pri valovni dolžini 734 nm s spektrofotometrom Nanocolor UV/VIS NUV0753, (Macherey-Nagel, Nemčija). Za odštevanje ozadja smo uporabili metanol.

V prvem poskusu smo odpipetirali 24 µL osnovne raztopine posameznega vzorca oziroma eteričnega olja in mu dodali 935 µL raztopine ABTS<sup>•+</sup>. Za vzorce, katerih vrednost absorbance je bila med 0,1 in 1, smo to vrednost obdržali, druge vzorce smo redčili, dokler vrednost absorbance ni bila med 0,1 in 1. Poleg terpentina in frakcij smo za primerjavo antioksidativne aktivnosti analizirali tudi snovi, ki veljajo za učinkovite antioksidante. Te so: sintezni tokoferol, BHT in rožmarinov ekstrakt (Flavoksan 14), kot antioksidativni pripravki rastlinskega izvora.

Rezultate izračunov antioksidativne aktivnosti (AA) smo podali relativno, glede na galno kislino, ki je močan antioksidant – njena AA za namen naših izračunov je 100 %. Za izračune AA eteričnih olj smo upoštevali gostoto terpeninovega olja 0,865 g/mL.

Antioksidativno aktivnost smo izračunali po formuli:

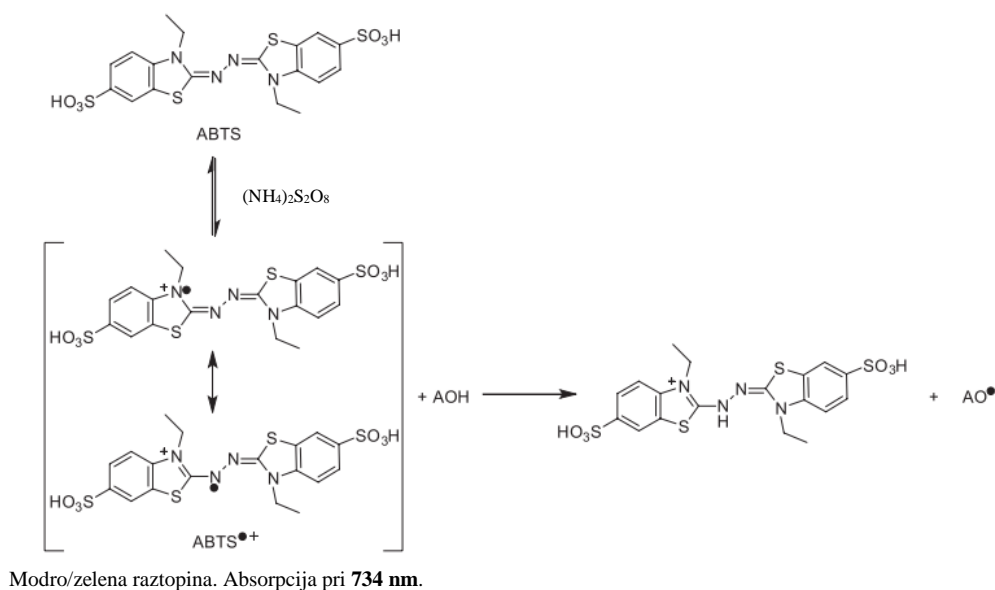
$$AA = (A_{\text{slepa}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{slepa}} - A_{\text{kontrola}}) \times 100,$$

pri čemer je AA antioksidativna aktivnost, slepi vzorec je topilo (metanol) z dodatkom reagenta ( $A_{\text{slepa}}$ ), kontrola pa je galna kislina z dodatkom reagenta ( $A_{\text{kontrola}}$ ).  $A_{\text{vzorec}}$  je vrednost absorbance posameznega vzorca.

Za tem smo upoštevali redčitev in koncentracijo osnovne raztopine (*faktor za preračun na gram snovi*). Končni rezultat je AA vzorca, pomnožena z *relativnim faktorjem glede na galno kislino*, ki upošteva koncentracije in redčitve, ter referira vrednost relativno, na galno

kislino – AA\*relF(galna) [%]. Ta vrednost predstavlja AA, kot odstotek AA galne kisline. Rezultati in izračuni so prikazani v preglednici X v poglavju 4.4.

Pripravo reagenta z oksidacijo ABTS do  $ABTS^{\bullet+}$  prikazuje slika 1. V nadaljevanju je prikazana reakcija radikala  $ABTS^{\bullet+}$  z antioksidantom (AOH). Antioksidant reducira  $ABTS^{\bullet+}$  do stabilne molekule, ob tem pa se zmanjšata koncentracija  $ABTS^{\bullet+}$  in njena absorbanca v raztopini. Absorbanco  $ABTS^{\bullet+}$  izmerimo v območju bližnje infrardeče svetlobe pri 734 nm.



Slika 1: Aktivacija molekule ABTS in reakcija  $ABTS^{\bullet+}$  z antioksidantom. Prirejeno po de Oliveira idr., 2014 [16].

### 3.5. Meritve antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo DPPH

Priprava osnovnih raztopin vzorcev za analizo je opisana v prejšnjem poglavju, koncentracije pa so navedene v poglavju 4.5. Oba preizkusa antioksidativne aktivnosti smo izvedli z istimi raztopinami vzorcev.

Raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo v 50-mL bučko natehtali 0,00283 g DPPH v prahu in bučko dopolnili do oznake z metanolom. Raztopina je občutljiva na svetlobo in nestabilna, zato smo bučko ovili z aluminijasto folijo.

Odpipetirali smo 36  $\mu$ L osnovne raztopine vzorca oziroma eteričnega olja in mu dodali 900  $\mu$ L raztopine DPPH. Vzorce, katerih vrednost ni padla v splošno veljavno območje

linearnosti med 0,1 in 1, smo naprej redčili ali koncentrirali, kot je prikazano v preglednici XI v poglavju 4.5, dokler vrednost ni padla v želeno območje. Analizirali smo tudi antioksidativno aktivnost sinteznega tokoferola, BHT in rožmarinovega ekstrakta (Flavoksan 14), ki veljajo za učinkovite antioksidante. Po dodatku raztopine DPPH vzorcem smo počakali 30 minut, potem smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm, s spektrofotometrom Nanocolor UV/VIS NUV0753, (Macherey-Nagel, Nemčija).

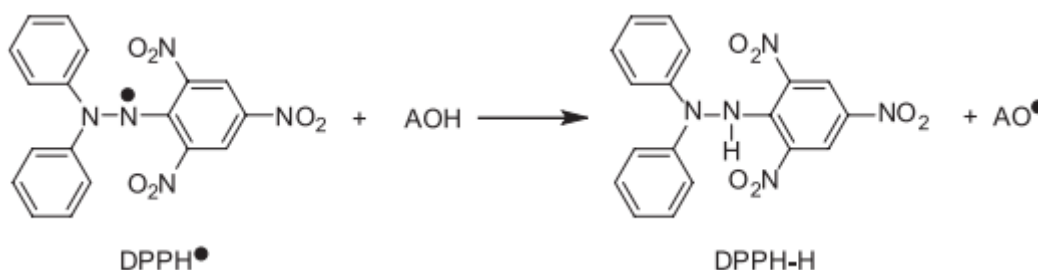
Antioksidativno aktivnost (AA) smo izračunali na enak način kot pri metodi ABTS. Rezultate AA smo podali relativno, glede na galno kislino. Za izračune AA eteričnih olj smo upoštevali gostoto terpentinovnega olja 0,865 g/mL.

Antioksidativno aktivnost smo izračunali po formuli:

$$AA = (A_{\text{slapa}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{slapa}} - A_{\text{kontrola}}) \times 100.$$

Slepi vzorec je topilo (metanol) z dodatkom reagenta ( $A_{\text{slapa}}$ ), kontrola pa je galna kislina z dodatkom reagenta ( $A_{\text{kontrola}}$ ).  $A_{\text{vzorec}}$  je vrednost absorbanco posameznega vzorca. Končni rezultat je AA vzorca, pomnožena z *relativnim faktorjem glede na galno kislino*, ki upošteva koncentracije in redčitve, ter referira vrednost relativno, na galno kislino –  $AA \cdot \text{relF}(\text{galna})$  [%]. Ta vrednost predstavlja AA, kot odstotek AA galne kisline. Rezultati in izračuni so prikazani v preglednici XI v poglavju 4.5.

Slika 2 prikazuje reakcijo  $\text{DPPH}^\bullet$  z antioksidantom (AOH). Antioksidant reducira  $\text{DPPH}^\bullet$  do stabilne molekule, ob tem pa se zmanjšata koncentracija  $\text{DPPH}^\bullet$  in njena absorbanca v raztopini. Absorbanco  $\text{DPPH}^\bullet$  izmerimo pri valovni dolžini 517 nm.



Vijoličasta raztopina. Absorpcija pri 517 nm.

Slika 2: Reakcija molekule  $\text{DPPH}^\bullet$  z antioksidantom. Prirjeno po de Oliveira idr., 2014 [16].

### **3.6. Preverjanje protibakterijske učinkovitosti terpentina**

Za izvedbo testiranja protibakterijske učinkovitosti terpentina smo se dogovarjali z dvema izvajalcema. Prvotno smo načrtovali poskus, pri katerem bi ugotovili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) in minimalno baktericidno koncentracijo (MBC) terpentina. Ta podatek bi bil v pomoč pri formuliranju zdravilnega pripravka s terpentinom za zdravljenje ran, saj bi imeli orientacijsko vrednost, kakšna mora biti najnižja koncentracija terpentina v pripravku, da je tak pripravek sposoben preprečiti okužbo rane oziroma uničiti patogene mikroorganizme okužene rane. Po dogovarjanju s prvim izvajalcem smo ugotovili, da bo izvedba takšnega testa prevelik zalogaj, zato smo v nadaljevanju test poenostavili. Zamislili smo si disk difuzijski test v agarju. Na diske bi nanесли različne volumne terpentina raztopljenega v absolutnem etanolu in počakali, da etanol izhlapi. Na diskah bi tako ostale različne mase terpentina. Diske bi pripravili v aseptičnih razmerah. Izvajalec bi agarne plošče inokuliral s sevi bakterij, ki najpogosteje okužijo rane in nanje postavil diske z različnimi masami terpentina. Merili bi cono inhibicije. S tem sicer ne bi dobili podatkov o koncentraciji, vendar bi nam tak eksperiment dal okvirne podatke o moči baktericidnega delovanja. Žal se nam z izvajalci, ki imajo ustrezne laboratorije za delo s patogenimi mikroorganizmi, ni uspelo dogovoriti, da bi v doglednem času izpeljali predlagane eksperimente, zato smo se odločili za pregled literarnih podatkov v zvezi s protibakterijsko učinkovitostjo terpentina.

V uvodnem delu naloge smo navedli, kateri patogeni najpogosteje okužijo rane. Gre za vrste *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* in *Streptococcus pyogenes*. Pri pregledu literature smo se osredotočili na iskanje podatkov o učinkovitosti terpentina proti tem vrstam patogenov.

### **3.7. Ugotavljanje vpliva terpentina na rast keratinocitov in fibroblastov v celičnih kulturah *in vitro***

Pred izvedbo poskusov na celicah smo preverili topnost terpentina v mediju za gojenje celic. Pripravili smo osnovno raztopino terpentina s koncentracijo 10 mg/mL v različnih topilih: metanolu, dimetilsulfoksidu (DMSO), brezvodnem etanolu in 70-odstotnem etanolu. Osnovne raztopine smo redčili z medijem brez dodatka seruma in z medijem z dodatkom seruma (10 %), v razmerju 1:1, 1:8 ali 1:9.

Tako pripravljene vzorce, pri katerih se smola ni oborila in niso bili motni, smo centrifugirali 5 minut pri 15.000 rpm in preverjali nastanek usedline. Rezultati so prikazani v poglavju 4.7, med Rezultati in razpravo. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo eksperiment s celicami izvedli z raztapljanjem terpentina v absolutnem etanolu. V zasnovi poskusa na celicah smo predvideli tudi preverjanje vpliva etanola na rast celic.

Delo s celicami je potekalo v aseptičnih razmerah, v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF-komora). Raztopino terpentina s koncentracijo 10 mg/mL smo pripravili z raztapljanjem svežega slovenskega terpentina (SLO SV) v absolutnem etanolu. Raztopino smo centrifugirali 10 min pri 6000 rpm, da so na dnu ostali netopni artefakti. Raztopino smo potem sterilizirali v aseptičnih razmerah z mikrofiltracijo in pripravili redčitve z medijem za nanos k celicam. Z mikrofiltracijo smo sterilizirali tudi absolutni etanol in pripravili redčitve. Celice smo odmrznili in jih resuspendirali v mediju brez seruma; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Prešteli smo jih s pomočjo 0,4-odstotne raztopine metilenskega modrila v Neubauerjevi komori. Njihovo koncentracijo v suspenziji smo uravnali na  $6,25 \times 10^4$ /mL z DMEM. V vdolbine mikrotitrne plošče z ravnim dnom smo jih raztočili po spodaj prikazanih shemah (preglednici I in II), v volumnu po 80  $\mu$ L. Vse štiri plošče, dve s keratinociti in dve s fibroblasti, v DMEM brez seruma smo inkubirali v inkubatorju preko noči pri 37 °C, da so se celice pritrdile na rastno površino. Naslednji dan smo v vdolbine dodali fetalni goveji serum (FBS) po shemi skupaj s pripravljenimi vzorci. Pripravili smo vzorčne raztopine in jih dodali v vdolbine, v volumnu po 20  $\mu$ L, do skupnega volumna 100  $\mu$ L na vdolbino. Dve plošči, po eno vsake vrste, smo inkubirali 48 ur, drugi dve pa 72 ur, vse pri temperaturi 37 °C.

Po 48 urah inkubacije smo ploščama dodali barvilo CCK-8, inkubirali 4 ure pri 37 °C in izmerili absorbanco pri  $\lambda=450$  nm. Po 72 urah inkubacije pa smo ploščama dodali barvilo MTS-promega, inkubirali 4 ure pri 37 °C in izmerili absorbanco pri  $\lambda=490$  nm. Meritve absorbance smo izvedli s čitalcem mikrotitrskih plošč (Synergy H4 Hybrid Reader SN252102, BioTek, ZDA).

*Preglednica I: Načrt nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo za testiranje vpliva terpentina na rast keratinocitov.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	Kneg.	Kneg.	Kneg.	Kpoz.	Kpoz.	Kpoz.	K+or	K+or	K+or	K+or2x	DPBS
C	DPBS	K+or2x	K+or2x	K+or5x	K+or5x	K+or5x	K+or10x	K+or10x	K+or10x	K+or20x	K+or20x	DPBS
D	DPBS	K+or20x	K+or40x	K+or40x	K+or40x	K+Vor	K+Vor	K+Vor	K+Vor2x	K+Vor2x	K+Vor2x	DPBS
E	DPBS	K+Vor5x	K+Vor5x	K+Vor5x	K+Vor10x	K+Vor10x	K+Vor10x	K+Vor20x	K+Vor20x	K+Vor20x	K+Vor40x	DPBS
F	DPBS	K+Vor40x	K+Vor40x	M+or	M+or	M+or	M+or2x	M+or2x	M+or2x	M+or5x	M+or5x	DPBS
G	DPBS	M+or5x	M+or10x	M+or10x	M+or10x	M+or20x	M+or20x	M+or20x	M+or40x	M+or40x	M+or40x	DPBS
H	DPBS	M	M	M	M	M	M	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS

Pomen oznak:

**DPBS** – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, brez  $Ca^{++}$  in  $Mg^{++}$

**M** – DMEM z 10% FBS

**K** – človeška keratinocitna linija NCTC 2544

**F** – človeški dermalni fibroblasti (primarne celice)

**Kneg. in Fneg.:** keratinociti ali fibroblasti (po 5.000 na vdolbino) v DMEM brez FBS

**Kpoz. in Fpoz.:** keratinociti ali fibroblasti (po 5.000 na vdolbino) v DMEM z 10 % FBS

**or:** osnovna raztopina terpentina (10 mg/mL absolutnega etanola)

**or (2x, 5x, 10x, 20x, 40x):** redčitve osnovne raztopine z M (DMEM z 10% FBS)

**Vor:** vehikel osnovne raztopine terpentina (absolutni etanol)

**Vor (2x, 5x, 10x, 20x, 40x):** redčitve vehikla osnovne raztopine (absolutnega etanola)

*Preglednica II: Načrt nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo za testiranje vpliva terpentina na rast fibroblastov.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	Fneg.	Fneg.	Fneg.	Fpoz.	Fpoz.	Fpoz.	F+or	F+or	F+or	F+or2x	DPBS
C	DPBS	F+or2x	F+or2x	F+or5x	F+or5x	F+or5x	F+or10x	F+or10x	F+or10x	F+or20x	F+or20x	DPBS
D	DPBS	F+or20x	F+or40x	F+or40x	F+or40x	F+Vor	F+Vor	F+Vor	F+Vor2x	F+Vor2x	F+Vor2x	DPBS
E	DPBS	F+Vor5x	F+Vor5x	F+Vor5x	F+Vor10x	F+Vor10x	F+Vor10x	F+Vor20x	F+Vor20x	F+Vor20x	F+Vor40x	DPBS
F	DPBS	F+Vor40x	F+Vor40x	M+or	M+or	M+or	M+or2x	M+or2x	M+or2x	M+or5x	M+or5x	DPBS
G	DPBS	M+or5x	M+or10x	M+or10x	M+or10x	M+or20x	M+or20x	M+or20x	M+or40x	M+or40x	M+or40x	DPBS
H	DPBS	M	M	M	M	M	M	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS

V nadaljevanju je načrt priprave raztopin ter preračun mas in volumnov v vdolbinah mikrotitrne plošče:

**M1: 50% FBS v DMEM:** 7,5 mL FBS + 7,5 mL DMEM → za redčenje osnovne raztopine smrekove smole in za dodatek po 20 µL k **Kpoz. in Fpoz.**

**or:** 10 mg terpentina/mL absolutnega etanola → v 20 µL je 200 µg

**or2x:** 1 mL or + 1mL M1 → 5 mg/mL; v 20 µL je 100 µg

**or5x:** 1 ml or2x + 1,5 mL M1 → 2 mg/mL; v 20 µL je 40 µg

**or10x:** 1 ml or5x + 1 mL M1 → 1mg/mL; v 20 µL je 20 µg

**or20x:** 1 ml or10x + 1mL M1 → 0,5 mg/mL; v 20 µL je 10 µg

**or40x:** 1 ml or20x + 1mL M1 → 0,25 mg/mL; v 20 µL je 5 µg

**Vor:** absolutni etanol (2 mL) → 20 µL EtOH/100 µL (20 %)

**Vor2x:** 1 mL Vor + 1mL M1 → 1mL EtOH v 2mL (0,5 mL EtOH/mL) → 20 µL → 10 µL EtOH/100 µL (10%)

**Vor5x:** 1 mL Vor2x + 1,5 mL M1 → 0,5 mL EtOH v 2,5 mL (0,2 mL EtOH/mL) → 20 µL → 4 µL EtOH/100 µL (4 %)

**Vor10x:** 1 ml Vor5x + 1 mL M1 → 0,2 mL EtOH v 2 mL (0,1 mL EtOH/mL) → 20 µL → 2 µL EtOH/100 µL (2%)

**Vor20x:** 1 ml Vor10x + 1mL M1 → 0,1 mL EtOH v 2 mL (0,05 mL EtOH/mL) → 20 µL → 1 µL EtOH/100 µL (1 %)

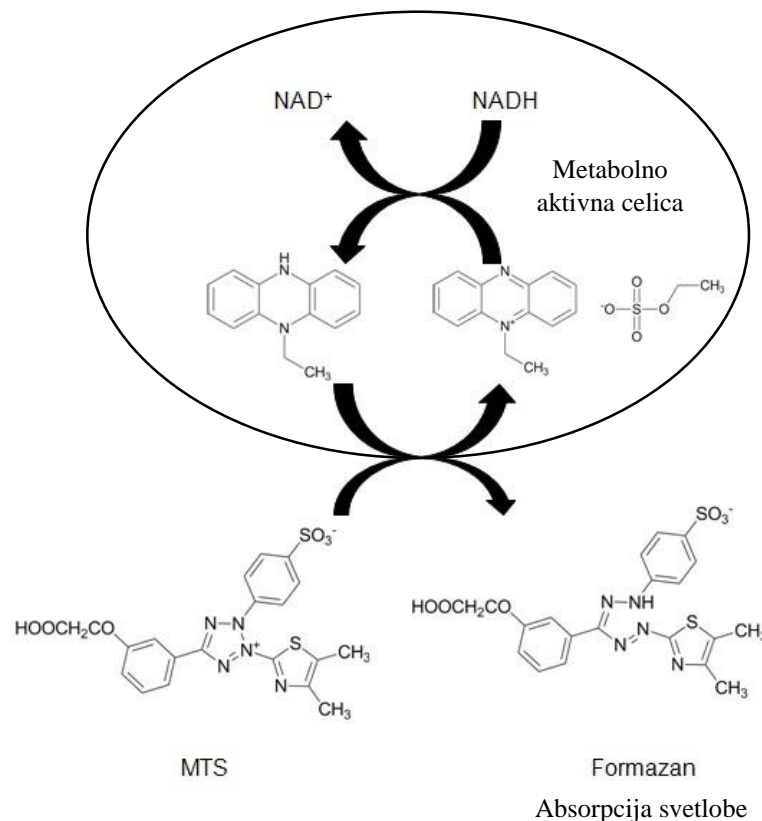
**Vor40x:** 1 ml Vor20x + 1mL M1 → 0,05 mL EtOH v 2 mL (0,025 mL EtOH/mL) → 20 µL → 0,5 µL EtOH/100 µL (0,5 %)



**Kneg. in Fneg.:** k 80  $\mu\text{L}$  suspenzije celic v DMEM dodamo 20  $\mu\text{L}$  DMEM brez FBS

**Kpoz. in Fpoz.:** k 80  $\mu\text{L}$  suspenzije celic v DMEM dodamo 20  $\mu\text{L}$  50% FBS v DMEM  $\rightarrow$  v 20  $\mu\text{L}$  je 10  $\mu\text{L}$  FBS

Slika 3 prikazuje reakcijo metabolitov aktivnih celic; reduciranih kofaktorjev (NADH), z barvili (MTS in WST-8). MTS in WST-8, ki jo vsebuje CCK-8, sta analoga in sodita v skupino tetrazolijevih spojin z negativnim nabojem. Težko prehajata v evkariontske celice, zato se v gojišče aplicirata skupaj z vmesnim akceptorjem elektronov (fenazinijev etilsulfat). Ta prenese elektrone iz citoplazme in pospeši redukcijo tetrazolijeve spojine v obarvan formazanov produkt. Občutljivost CCK-8 je večja od občutljivosti drugih tetrazolijevih spojin [17]. Celično aktivnost spremljamo preko meritve absorbance formazana. Več kot je metabolno aktivnih celic, več NADH nastane, večja je absorbanca.



Slika 3: Na primeru MTS prikazan način delovanja uporabljenih barvil za spremljanje metabolne aktivnosti celic. Prirejeno po Riss idr., 2016 [17].

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Pregled pripravljenih vzorcev

Terpentine in vzorce smo označili na sledeči način. Terpentini slovenskih smrek imajo oznako SLO, sveži terpentini slovenskih smrek, pridobljeni spomladi 2018, pa oznako SLO SV. Terpentini bosanskih smrek imajo oznako BIH, terpentini finskih smrek pa oznako FIN. Frakcije nekaterih vzorcev smo pripravljali večkrat, zato imajo številke. Eterično olje je označeno z oznako EO, nevtralna frakcija z oznako NF in kislina frakcija z oznako KF. Slovenski terpenin iz leta 2017 je bil skladiščen v dveh škatlah; Sc. 1 in Sc. 2. V spodnji preglednici je pregled vseh pripravljenih nevtralnih in kislinskih frakcij ter njihove mase.

*Preglednica III: Pregled pripravljenih nevtralnih in kislinskih frakcij kolofonije.*

Opis vzorca	Oznaka	Masa vzorca [g]
<del>Slo 0 Ph. Jug.</del>	<del>Slo 0</del>	0,00
Slo 1 Ph. Jug. nevtralna frakcija	Slo 1 NF	4,36
Slo 1 Ph. Jug. kislina frakcija	Slo 1 KF	27,03
Slo 2 Ph. Eur. nevtralna frakcija	Slo 2 NF	5,82
Slo 2 Ph. Eur. kislina frakcija	Slo 2 KF	33,37
Slo 3 Ph. Jug. Sc. 1 nevtralna frakcija	Slo 3 NF	4,97
Slo 3 Ph. Jug. Sc. 1 kislina frakcija	Slo 3 KF	33,33
<b>SLO 4 Ph. Eur. Sc. 2 nevtralna frakcija</b>	<b>SLO 4 NF</b>	<b>6,09</b>
<b>SLO 4 Ph. Eur. Sc. 2 kislina frakcija</b>	<b>SLO 4 KF</b>	<b>32,89</b>
<b>BIH 1 Ph. Eur. nevtralna frakcija</b>	<b>BIH 1 NF</b>	<b>2,44</b>
<b>BIH 1 Ph. Eur. kislina frakcija</b>	<b>BIH 1 KF</b>	<b>27,99</b>
<del>BIH 2 Ph. Eur.</del>	<del>BIH 2</del>	0,00
BIH Ph. Jug. nevtralna frakcija	BIH 3 NF	2,28
BIH Ph. Jug. kislina frakcija	BIH 3 KF	28,66
<b>SLO sveža smola Ph. Eur. nevtralna frakcija</b>	<b>SLO SV NF</b>	<b>4,62</b>
<b>SLO sveža smola Ph. Eur. kislina frakcija</b>	<b>SLO SV KF</b>	<b>37,55</b>
<b>FIN Ph. Eur. nevtralna frakcija</b>	<b>FIN NF</b>	<b>1,97</b>
<b>FIN Ph. Eur. kislina frakcija</b>	<b>FIN KF</b>	<b>21,12</b>

*Ph. Eur* in *Ph. Jug* označujeta, kateri destilacijski nastavek smo uporabili pri destilaciji terpentina. S krepkim tiskom so označene tiste frakcije, ki smo jih vključili v nadaljnje raziskave. Prečrtane pa so tiste frakcije, ki smo jih med postopkom priprave zavrgli.

SLO 0 smolo smo poskušali raztopiti tako, da smo v bučko nalili 200 mL dietiletra. Zaradi prisotne vode, ki je predhodno nismo odlili, je nastala emulzija. V liju ločniku so bile vidne tri faze; vodna, etrna in faza emulzije. Lij ločnik smo pustili stati dva dni, vendar ni prišlo do ločitve faz. Vzorec smo zavrgli in prilagodili nadaljnji postopek raztapljanja smole v etru tako, da smo vodo po destilaciji odlili in nato dolili dietileter v bučko. Bučko smo stresali, dokler se smola ni raztopila. Raztapljanje je trajalo 15 do 20 minut. Vzorec BIH 2 smo po destilaciji zavrgli, ker nismo potrebovali dodatne mase frakcij za nadaljnjo analizo.

Preglednica IV prikazuje pripravljena eterična olja, njihov izplen, uporabljen destilacijski nastavek in čas destilacije. S krepkim tiskom so označena tista EO, ki smo jih vključili v nadaljnje raziskave. Prečrtana pa so tista EO, katerih kolofonijo smo zavrgli.

*Preglednica IV: Pregled pripravljenih eteričnih olj.*

Vzorec	Količina [mL]	Clevenger	Čas destilacije
<del>Slo 0</del>	4,7	Ph. Jug	3 h
Slo 1	4,7	Ph. Jug	2 h
Slo 2	3,5 + 0,3	Ph. Eur	2 h + 3 h 20 min
Slo 3	4,3	Ph. Jug	2 h 30min
<b>SLO 4</b>	<b>4,1</b>	<b>Ph. Eur</b>	<b>2 h 30min</b>
<b>BIH 1</b>	<b>2,1</b>	<b>Ph. Eur</b>	<b>2 h</b>
<del>BIH 2</del>	2,1	Ph. Eur	2 h
BIH 3	2,1	Ph. Jug	4 h
<b>SLO SV</b>	<b>5,0</b>	<b>Ph. Eur</b>	<b>2 h</b>
<b>FIN</b>	<b>1,6</b>	<b>Ph. Eur</b>	<b>2 h</b>

Za destilacijo terpentina smo uporabili clevenger, kot ga opisuje Evropska farmakopeja in clevenger, kot ga opisuje Jugoslovanska farmakopeja. Jugoslovanski clevenger ima večji pretok, kar pa ne vpliva na izplen EO bosanskega terpentina, BIH 1, BIH 2 in BIH 3. Izplen je enak, kljub različnim časom destilacije in različnima clevengerjema.

Tudi pri SLO 3 in SLO 4 so po enakem času destilacije z različnima clevengerjema, razlike v izplenu eteričnega olja minimalne. Odločili smo se, da nadaljujemo destilacije z uporabo clevengerja po Evropski farmakopeji. Preverili smo tudi vpliv časa na izplen eteričnega olja. Vzorec SLO 2 smo destilirali najprej dve uri, naslednji dan pa še enkrat tri ure in dvajset minut. Količina dodatno pridobljenega olja je bila minimalna. Iz tega smo zaključili, da zadoščata dve uri destilacije.

Bosanski in finski terpentin nista bila sveža. Večji del eteričnega olja je izhlapel že preden smo dobili izhodni material, kar je razlog majhnemu izplenu eteričnega olja v primerjavi s svežim slovenskim terpentinom.

V nadaljevanju smo ocenili delež izgub pri pripravi vzorcev. Rezultate prikazuje naslednja preglednica. S krepkim tiskom so označeni vzorci, ki smo jih vključili v nadaljnje raziskave.

*Preglednica V: Ocena deleža izgub pri pripravi vzorcev.*

Vzorec	m (kolofonija)	~ m (EO)	m (kolofonija + EO + lubje)	m (izgube)	% izgub
Slo 1	31,4	4,7	41,1	8,9	17,8
Slo 3	38,3	4,3	47,8	2,2	4,5
<b>SLO 4</b>	<b>39,0</b>	<b>4,1</b>	<b>48,5</b>	<b>1,5</b>	<b>3,1</b>
<b>BIH 1</b>	<b>30,4</b>	<b>2,1</b>	<b>43,7</b>	<b>6,3</b>	<b>12,7</b>
BIH 3	30,9	2,1	42,3	7,7	15,5
<b>SLO SV</b>	<b>42,2</b>	<b>5,0</b>	<b>48,3</b>	<b>1,7</b>	<b>3,5</b>
<b>FIN</b>	<b>23,1</b>	<b>1,6</b>	<b>35,5</b>	<b>14,5</b>	<b>29,0</b>

Mase so podane v gramih. Pri masi kolofonije smo sešteli maso kisle in maso nevtralne frakcije. Za maso eteričnega olja smo vzeli volumen izplena in predpostavili gostoto 1 g/mL. Obema masama smo prišteli maso lubja in artefaktov, ki smo jo dobili tako, da smo po raztapljanju kolofonije v dietiletru raztopino filtrirali pri znižanem tlaku. Lubje, ki je ostalo na filter papirju smo posušili na zraku in stehali. Maso izgube smo izračunali na način, da smo masi, s katero smo začeli destilacijo (50 g), odšteli skupno maso iz prejšnjega stolpca. Rezultat izračunov je delež izgub, izražen v odstotkih, v zadnjem stolpcu preglednice V.

Pri BIH 1 in FIN so velike izgube posledica odstranjevanja fermentacijskih produktov iz dietiletrne faze, med postopkom ekstrakcije. SLO 1 in BIH 3 sta vzorca kolofonije, ki smo ju kot prva ločili na frakcije. Večje izgube so verjetno posledica eksperimentalnih napak pri začetnem preizkušanju postopka frakcioniranja kolofonije. Določene izgube so nastale tudi pri raztapljanju kolofonije. Pri nekaterih vzorcih so bili skupki artefaktov relativno veliki, med temi skupki pa je verjetno ostalo tudi nekaj neraztopljene kolofonije.

V naslednji preglednici so zbrani vzorci, ki smo jih vključili v raziskave. Zraven je navedena masa oziroma volumen pri eteričnih oljih ter oznaka vzorca. Te oznake uporabljamo skozi celotno raziskavo. Izbrane vzorce smo pripravili s clevengerjem po Evropski farmakopeji.

*Preglednica VI: Vzorci vključeni v nadaljnje raziskave.*

<b>Opis vzorca</b>	<b>Oznaka vzorca</b>	<b>Masa [g]</b>
Slovenska smola, sveža, nabrana leta 2018	SLO SV	-
Nevtralna frakcija sveže slovenske smole	SLO SV NF	4,62
Kisla frakcija sveže slovenske smole	SLO SV KF	37,55
Eterično olje sveže slovenske smole	SLO SV EO	5 mL
Slovenska smola, nabrana leta 2017	SLO 4	-
Nevtralna frakcija slovenske smole iz 2017	SLO 4 NF	6,09
Kisla frakcija slovenske smole iz 2017	SLO 4 KF	32,89
Eterično olje slovenske smole iz 2017	SLO 4 EO	4,1 mL
Bosanska smola	BIH	-
Nevtralna frakcija bosanske smole	BIH 1 NF	2,44
Kisla frakcija bosanske smole	BIH 1 KF	27,99
Eterično olje bosanske smole	BIH 1 EO	2,1 mL
Finska smola	FIN	-
Nevtralna frakcija finske smole	FIN NF	1,97
Kisla frakcija finske smole	FIN KF	21,12
Eterično olje finske smole	FIN EO	1,6 mL

## 4.2. Rezultati analize kemijske sestave terpentinovnega eteričnega olja s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo

Preglednica VII prikazuje seznam vseh spojin, ki smo jih identificirali z GC-MS analizo, in njihove deleže. S krepkim tiskom so označene spojine, katerih delež v eteričnem olju presega 1 % celotne vsebnosti. Vrednosti so podane na tri veljavna mesta.

*Preglednica VII: Rezultati GC-MS analize eteričnih olj; sestava in vsebnost posameznih spojin. RI – Kovatsov retencijski indeks.*

Spojina	RI	Vsebnost [% celotne vsebnosti]			
		SLO SV	SLO 4	FIN	BIH 1
triciklen	919	0,13	0,17	0,22	0,14
$\alpha$ -tujen	923	0,18	-	-	-
<b><math>\alpha</math>-pinen</b>	<b>930</b>	<b>39,0</b>	<b>38,2</b>	<b>42,3</b>	<b>69,5</b>
$\alpha$ -fenhen	944	-	0,08	0,13	-
<b>kamfen</b>	<b>946</b>	0,44	0,74	<b>1,24</b>	<b>2,80</b>
tuja-2,4(10)-dien	950	-	-	0,47	0,51
<i>m</i> -cimen	967	-	-	0,23	-
sabinen	969	0,42	0,09	-	-
<b><math>\beta</math>-pinen</b>	<b>974</b>	<b>43,0</b>	<b>34,6</b>	<b>12,5</b>	<b>4,73</b>
<b>mircen</b>	<b>987</b>	<b>1,64</b>	0,89	0,66	0,36
?	1002	-	-	0,09	-
$\alpha$ -felandren	1004	-	-	0,15	-
<b><math>\delta</math>-3-karen</b>	<b>1006</b>	0,89	<b>3,22</b>	<b>2,62</b>	<b>1,12</b>
$\alpha$ -terpinen	1014	0,14	-	0,23	-
<i>p</i> -cimen	1022	0,27	0,32	0,76	0,29
<b>limonen</b>	<b>1027</b>	<b>2,20</b>	<b>2,29</b>	<b>13,9</b>	<b>3,62</b>
<b><math>\beta</math>-felandren</b>	<b>1028</b>	<b>4,31</b>	<b>2,85</b>	<b>1,56</b>	0,71
evkaliptol	1029	0,13	-	0,20	-
$\gamma$ -terpinen	1056	0,22	0,09	0,16	-
?	1069	-	-	0,10	-
terpinolen	1083	0,46	0,64	0,38	0,43
fenhon	1085	-	0,16	-	0,26
<i>p</i> -cimen	1087	-	-	0,16	0,13
2,4-dimetilanisol	1110	-	-	0,10	-
endo-fenhol	1116	-	-	0,44	0,27
$\alpha$ -kamfolenal	1123	-	-	0,22	0,15
( <i>E</i> )-pinokarveol	1138	-	0,20	0,96	0,47
kafra	1143	-	0,32	0,30	0,38
?	1148	-	-	0,17	0,13

kamfenhidrat	1152	-	-	-	0,13
( <i>E</i> )-pinokamfon	1157	-	-	0,12	0,12
pinokarvon	1159	-	-	0,09	-
4-etilfenol	1164	-	-	0,39	-
<b>izoborneol</b>	<b>1169</b>	<b>0,27</b>	<b>0,54</b>	<b>1,61</b>	<b>1,24</b>
<b>terpinen-4-ol</b>	<b>1178</b>	<b>0,67</b>	<b>1,92</b>	<b>0,93</b>	<b>1,02</b>
<i>p</i> -cimen-8-ol	1184	-	-	0,19	0,11
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	<b>1192</b>	<b>1,61</b>	<b>4,37</b>	<b>7,85</b>	<b>8,37</b>
estragol	1195	0,14	0,13	-	-
?	1200	-	-	-	0,10
verbenon	1204	-	-	0,42	0,43
( <i>E</i> )-karveol	1216	-	-	0,19	-
4-etilgvajakol	1270	-	-	0,18	0,15
bornilacetat	1281	0,24	0,60	0,58	-
$\alpha$ -kubeben	1345	0,17	0,14	-	-
$\alpha$ -longipinen	1348	-	0,25	0,79	-
$\alpha$ -ilangen	1367	-	0,20	0,16	0,09
longiciklen	1372	-	-	0,12	-
$\alpha$ -kopaen	1373	-	0,09	-	0,19
$\beta$ -burbonen	1381	0,30	-	0,32	0,25
$\alpha$ -gurjunen	1400	0,20	0,66	0,20	-
<b>longifolen</b>	<b>1406</b>	<b>0,11</b>	<b>1,09</b>	<b>1,48</b>	-
( <i>E</i> )-kariofilen	1416	0,52	-	-	-
<b>(<i>Z</i>)-kariofilen</b>	<b>1417</b>	-	<b>1,50</b>	-	-
$\beta$ -kopaen	1427	-	-	-	0,08
( <i>Z</i> )- $\alpha$ -bergamoten	1431	-	0,19	-	-
$\alpha$ -humulen	1453	-	0,18	-	-
$\gamma$ -murolen	1472	0,27	0,28	0,34	0,65
<b>germakren D</b>	<b>1478</b>	<b>1,38</b>	0,26	-	-
valencen	1493	-	0,13	-	0,09
$\alpha$ -murolen	1496	-	0,25	-	0,11
$\gamma$ -kadinen	1510	0,16	0,86	0,12	0,24
<b><math>\delta</math>-kadinen</b>	<b>1516</b>	<b>0,56</b>	<b>1,54</b>	0,32	0,26
?	1919	-	-	<b>3,08</b>	-
cembren	1934	-	-	0,35	-
?	2156	-	-	-	0,10
Vsota:		100,0	100,0	100,1	99,7
Število spojin:		29	36	48	37
Delež neidentificiranih spojin (%):		0,0	0,0	3,44	0,33
Število neidentificiranih spojin:		0	0	4	3

Vsoto deležev smo izračunali za kontrolo ali so bile identificirane vse spojine, ki so prisotne v eteričnem olju (EO). Spojine pri katerih je namesto imena oznaka ?, so neidentificirane spojine, ki niso zajete v podatkovni knjižnici. Te se pojavljajo pri finskem in bosanskem EO. Njihov delež v finskem EO je večji kot delež v bosanskem EO. Primerjava EO SLO SV in SLO 4 terpentina pokaže, da se deleži posameznih spojin precej razlikujejo. EO SLO 4 vsebuje tudi več spojin – nekatere so verjetno produkti oksidacije terpentina. Tudi EO FIN in BIH 1 vsebujeta več spojin kot SLO SV. Eden od razlogov je verjetno dejstvo, da sta obe EO iz staranega terpentina, drugi pa je prisotnost dodatnih, neidentificiranih spojin. Drugi možni razlogi za razlike v kvalitativni in kvantitativni sestavi EO so različna geografska področja in s tem povezane razmere rasti, starost dreves in čas nabiranja smole.

V naslednji preglednici so zbrane glavne spojine terpentinovih eteričnih olj – vključene so tiste spojine iz zgornje preglednice, katerih delež je presegal 1 % celotne vsebnosti. S krepkim tiskom so označene spojine, katerih delež v posameznem EO je največji. Spodaj je izračunan delež spojin, ki niso vključene v to preglednico, za prikaz, kolikšen delež od celotne vsebnosti predstavljajo glavne spojine. Vrednosti so podane na tri veljavna mesta.

*Preglednica VIII: Pregled glavnih spojin eteričnih olj; sestava in vsebnost posameznih spojin. RI – Kovatsov retencijski indeks.*

<b>Spojina</b>	<b>RI</b>	<b>SLO SV</b>	<b>SLO 4</b>	<b>FIN</b>	<b>BIH 1</b>
$\alpha$ -pinen	930	<b>39,0</b>	<b>38,2</b>	<b>42,3</b>	<b>69,5</b>
kamfen	946	0,44	0,74	1,24	<b>2,80</b>
$\beta$ -pinen	974	<b>43,0</b>	<b>34,6</b>	<b>12,5</b>	<b>4,73</b>
mircen	987	1,64	0,89	0,66	0,36
$\delta$ -3-karen	1006	0,89	<b>3,22</b>	<b>2,62</b>	1,12
limonen	1027	<b>2,20</b>	<b>2,29</b>	<b>13,9</b>	<b>3,62</b>
$\beta$ -felandren	1028	<b>4,31</b>	<b>2,85</b>	1,56	0,71
izoborneol	1169	0,27	0,54	1,61	1,24
terpinen-4-ol	1178	0,67	1,92	0,93	1,02
$\alpha$ -terpineol	1192	1,61	<b>4,37</b>	<b>7,85</b>	<b>8,37</b>
longifolen	1406	0,11	1,09	1,48	-
(Z)-kariofilen	1417	-	1,50	-	-
germakren D	1478	1,38	0,26	-	-
$\delta$ -kadinen	1516	0,56	1,54	0,32	0,26
?	1919	-	-	<b>3,08</b>	-
Delež drugih spojin:		4,0	6,0	9,9	6,3



Delež  $\alpha$ -pinena v bosanskem in finskem EO je večji kot v slovenskem, medtem ko je delež  $\beta$ -pinena precej manjši. Finsko eterično olje vsebuje precej limonena.  $\alpha$ -Terpineol je morda oksidacijski produkt. V EO svežega slovenskega terpentina ga je namreč relativno malo v primerjavi z drugimi EO, ki so iz starejših terpeninov. V finskem EO je tudi največji delež drugih spojin. Tudi sicer, če pogledamo prejšnjo preglednico, ima finsko eterično olje najbolj pestro sestavo.

Literatura navaja sledeče glavne sestavine terpeninovega EO:  $\alpha$ - in  $\beta$ -pinen, kamfen,  $\beta$ -felandren,  $\delta$ -karen, limonen, mircen, bornilacetat,  $\delta$ -kadinen,  $\alpha$ -murolen [3, 4]. V naših vzorcih smo našli vse navedene spojine, so pa pri nas prevladujoče tudi nekatere druge spojine. Razlikujejo se razmerja spojin med posameznimi EO.

### 4.3. Rezultati analize kemijske sestave terpentina s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo

Preglednica IX prikazuje sestavo slovenskega, bosanskega in finskega terpentina. Vzorci so bili derivatizirani in analizirani z GC-MS. Vsak terpenin je bil analiziran dvakrat.

*Preglednica IX: Rezultati GC-MS analize derivatiziranih spojin terpeninov; sestava in vsebnost posameznih spojin.*

Spojina	Vsebnost mg/g						
	SLO 4 (1)	SLO 4 (2)	BIH 1 (1)	BIH 1 (2)	FIN (1)	FIN (2)	
<i>p</i> -kumarna kislina	0,8	1,5	11,2	4,6	123,3	182,6	
ferulna kislina	0,1	0,1	9,0	5,7	6,0	6,5	
2,4-dihidroksicimetna kislina	5,3	4,9	18,1	11,4	19,4	18,9	
neoabienol	11,0	11,1	6,0	9,1	5,2	3,4	
pimaral	5,9	6,3	6,7	7,5	3,3	3,0	
pimarol	0,9	1,3	5,1	6,1	1,3	1,3	
sekohidroabietinska kislina	1,4	1,6	2,3	1,9	0,3	1,0	
smolne kisline	pimarna kislina	11,2	9,2	24,7	28,4	2,3	3,8
	sandrakopimarna kislina	33,0	28,8	21,1	17,9	4,8	8,3
	izopimarna kislina	75,8	70,2	45,6	53,6	11,3	7,4
	palustrinska kislina	76,1	102,6	75,4	56,3	30,7	30,5
	levopimarna kislina	38,2	208,4	134,9	27,8	39,9	11,6
	dehidroabietinska kislina	206,5	140,8	92,0	148,7	82,5	8,3
	abietinska kislina	45,4	70,8	63,2	45,8	88,8	116,6
	neoabietinska kislina	37,2	73,4	78,3	27,3	31,1	16,7
oksidirane smolne kisline	<i>x</i> -hidroksiabietinska kislina	85,6	22,8	13,9	46,4	29,1	19,4
	<i>x</i> -hidroksiabietinska kislina	6,5	5,9	6,1	5,5	5,0	4,7
	<i>x</i> -hidroksiabietinska kislina	30,3	33,0	29,9	39,4	3,0	2,2
	7-oksodehidroabietinska kislina	11,4	9,3	11,4	11,6	24,6	34,5
	hidroksi-smolna kislina	23,1	13,8	11,9	17,1	10,9	18,8
	dihidroksi-dehidroabietinska kislina	6,6	3,1	6,6	4,9	2,4	2,1
	<i>x</i> -hidroksi-7-oksodehidroabietinska kislina	4,8	3,6	4,5	6,4	5,4	8,3
lignani	sekoizolaricirezinol	0,4	0,5	1,9	1,3	10,3	13,8
	matairezol	0,1	0,1	8,2	4,7	0,5	1,3
	laricirezinol	0,7	1,1	8,5	2,0	24,8	40,4
	pinorezinol	0,7	1,3	33,0	24,5	115,4	253,1
Vsota:	718,8	825,5	729,6	615,8	681,3	818,5	

Iz vsote mas spojin na gram vzorca je razvidno, da se je z derivatizacijo izgubil precejšen delež spojin. Tudi ponovljivost pri nekaterih spojinah je relativno slaba.

Literatura navaja, da je nehlapna frakcija, kolofonija, zmes diterpenskih smolnih kislin (abietinska, neoabietinska, dehidroabietinska, dihidroabietinska, pimarna, izopimarna, levopimarna, sandrakopimarna in palustrinska kislina) in lignanov (pinorezinol, laricirezinol, izolaricirezinol, sekoizolaricirezinol, matairezinol in *p*-hidroksicimetne kisline) ([1], [4]). Z analizo smo v vzorcih določili vse spojine, ki jih navaja literatura, razen izolaricirezinola in *p*-hidroksicimetne kisline, poleg tega pa tudi nekatere dodatne spojine.

Smo mnenja, da analiza z GC-MS s predhodno derivatizacijo vzorcev ni primerna metoda za kvalitativno in kvantitativno analizo kolofonije. Kvalitativno izgubljammo spojine, kar je razvidno iz vsote mas, kvantitativno pa so rezultati slabo ponovljivi. Menimo, da bi bila za ugotavljanje sestave terpentina bolj primerna analiza z LC-MS.

Z analizo LC-MS bi lahko preverili kvalitativno in kvantitativno sestavo in ugotavljali morebitne spremembe med procesom priprave. Ugotavljali bi lahko tudi vpliv rastišča na sestavo terpentina. Analizo smo načrtovali in vzorce tudi že poslali v analizo, vendar rezultati niso prispeli pravočasno, da bi jih lahko vključili v to nalogo.

#### 4.4. Rezultati meritev antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo ABTS

Rezultati meritev antioksidativne aktivnosti z metodo ABTS so zbrani v preglednici X.

*Preglednica X: Relativna antioksidativna aktivnost terpentinov in frakcij glede na galno kislino, v odstotkih, izmerjena z metodo ABTS.*

Razmerje OR:raztopina ABTS=24:935 - v preglednici so vpisana le odstopanja in redčitve; OR - osnovna raztopina; A - absorbanca; AA - antioksidativna aktivnost v %; relF - relativni faktor glede na galno kislino.

Vzorec	Koncentracija osnovne raztopine (g/mL)	Razmerje OR:ABTS	A1	Razmerje OR:ABTS	A2	Razmerje OR:ABTS	A3	Izbrana A	AA	Faktor za preračun na gram snovi	Relativni faktor glede na galno kislino	AA*relF (galna) [%]
SLO SV	0,111		0,006	1/10	0,531			0,531	116,0	3763	0,0010	0,11
SLO SV NF	0,011		0,347					0,347	311,7	3774	0,0010	0,30
SLO SV KF	0,011		0,096	1/10	0,514			0,514	134,0	37269	0,0095	1,27
SLO SV EO	0,865	24 $\mu$ L	0,003	1 $\mu$ L	0,143	0,5 $\mu$ L	0,401	0,401	254,3	2312	0,0006	0,15
SLO 4	0,116		0,001	1/10	0,443			0,443	209,6	3594	0,0009	0,19
SLO 4 NF	0,011		0,349					0,349	309,6	3938	0,0010	0,31
SLO 4 KF	0,011		0,201					0,201	467,0	3761	0,0010	0,45
SLO 4 EO	0,865	24 $\mu$ L	0,004	1 $\mu$ L	0,402			0,402	253,2	1156	0,0003	0,07
BIH	0,110		0,002	1/10	0,255			0,255	409,6	3797	0,0010	0,39
BIH 1 NF	0,010		0,450					0,450	202,1	4026	0,0010	0,21
BIH 1 KF	0,011		0,001	1/10	0,276			0,276	387,2	39494	0,0100	3,88
BIH 1 EO	0,865	24 $\mu$ L	0,004	1 $\mu$ L	0,097	0,5 $\mu$ L	0,172	0,172	497,9	2312	0,0006	0,29
FIN	0,109		0,003	1/10	0,389			0,389	267,0	3809	0,0010	0,26
FIN NF	0,011		0,273					0,273	390,4	3771	0,0010	0,37
FIN KF	0,011		0,002	1/10	0,219			0,219	447,9	36906	0,0094	4,20
FIN EO	0,865	24 $\mu$ L	0,008	1 $\mu$ L	0,098	0,5 $\mu$ L	0,152	0,152	519,1	2312	0,0006	0,30
Sintezni tokoferol	0,011		0,001	1/10	0,001	1/100	0,504	0,504	144,7	371361	0,0943	13,64
Flavoksan 14	0,010		0,001	1/10	0,485			0,485	164,9	41173	0,0105	1,72
BHT	0,011		0,006	1/10	0,120	1/100	0,613	0,613	28,7	379824	0,0964	2,77
Kontrola (galna ksl.)	0,001		0,001	1/10	0,002	1/100	0,546	0,546	100,0	3938248	1,0000	100,00
Slepi vzorec (MeOH)	1,000		0,640		0,644		0,640	0,640	0,0	42	0,0000	0,00

V poglavju Materiali in metode smo omenili, da je končni rezultat meritev in izračunov vrednost v zadnjem stolpcu preglednice  $AA*relF(galna)[\%]$  in predstavlja odstotek antioksidativne aktivnosti galne kisline. Vrednosti so preračunane na enoto mase snovi. Največjo antioksidativno aktivnost imajo kisle frakcije kolofonije. Ta je pri FIN KF in BIH 1 KF celo večja kot pri Flavoksanu 14 (ekstrakt rožmarina, pridobljen z ekstrakcijo s superkričnim  $CO_2$ ) in BHT, ki je široko uporabljan sintezni antioksidant. Kljub temu so vrednosti nižje kot pri tokoferolu. Antioksidativna aktivnost drugih frakcij in celotnih terpeninov je šibka.

## 4.5. Rezultati meritev antioksidativne aktivnosti terpentina in frakcij z metodo DPPH

Rezultati meritev antioksidativne aktivnosti z metodo DPPH so zbrani v preglednici XI.

*Preglednica XI: Relativna antioksidativna aktivnost terpentinov in frakcij glede na galno kislino, v odstotkih, izmerjena z metodo DPPH.*

OR - osnovna raztopina; A - absorbanca; AA - antioksidativna aktivnost v %; relF - relativni faktor glede na galno kislino.

Vzorec	Koncentracija osnovne raztopine (g/mL)	Razmerje OR:DPPH	A1	Razmerje OR:DPPH	A2	Razmerje OR:DPPH	A3	Izbrana A	AA	Faktor za preračun na gram snovi	Relativni faktor glede na galno kislino	AA*relF (galna) [%]
SLO SV	0,111	36:900	0,513					0,513	68,9	251	0,0010	0,07
SLO SV NF	0,011	36:900	1,003	72:900	0,827	144:900	0,630	0,827	34,6	1258	0,0048	0,17
SLO SV KF	0,011	36:900	0,427					0,427	78,3	2485	0,0095	0,74
SLO SV EO	0,865	36:900	0,083	9:900	0,303			0,303	91,8	128	0,0005	0,04
SLO 4	0,116	36:900	0,144					0,144	109,2	240	0,0009	0,10
SLO 4 NF	0,011	36:900	1,053	72:900	0,988	144:900	0,821	0,988	17,0	1313	0,0050	0,09
SLO 4 KF	0,011	36:900	0,632					0,632	55,9	2507	0,0095	0,53
SLO 4 EO	0,865	36:900	0,516					0,516	68,6	32	0,0001	0,01
BIH	0,110	36:900	0,044	1/10 36:900	0,661			0,661	52,7	2531	0,0096	0,51
BIH 1 NF	0,010	36:900	1,011	72:900	0,906	144:900	0,710	0,906	26,0	1342	0,0051	0,13
BIH 1 KF	0,011	36:900	0,050	1/10 36:900	0,665			0,665	52,3	26330	0,1003	5,24
BIH 1 EO	0,865	36:900	0,042	9:900	0,188			0,188	104,4	128	0,0005	0,05
FIN	0,109	36:900	0,114					0,114	112,4	254	0,0010	0,11
FIN NF	0,011	36:900	0,839					0,839	33,3	2514	0,0096	0,32
FIN KF	0,011	36:900	0,048	1/10 36:900	0,541			0,541	65,8	24604	0,0937	6,17
FIN EO	0,865	36:900	0,052	9:900	0,140			0,140	109,6	128	0,0005	0,05
Sintezni tokoferol	0,011	36:900	0,038	1/10 36:900	0,046	1/100 36:900	1,005	1,005	15,2	247574	0,9430	14,31
Flavoksan 14	0,010	36:900	0,040	1/10 36:900	0,947			0,947	21,5	27448	0,1045	2,25
BHT	0,011	36:900	0,040	1/10 36:900	0,329	1/100 36:900	0,974	0,329	89,0	25322	0,0964	8,58
Kontrola (galna ksl.)	0,001	36:900	0,046	1/10 36:900	0,228	1/100 36:900	1,026	0,228	100,0	262550	1,0000	100,00
Slepi vzorec (MeOH)	1,000	36:900	1,143	36:900	1,144			1,144	0,0	28	0,0001	0,00

Tudi v tej preglednici so vrednosti preračunane na enoto mase snovi in je končni rezultat meritev in izračunov prikazan v zadnjem stolpcu; AA\*relF(galna)[%], ter predstavlja odstotek antioksidativne aktivnosti galne kisline. Test z metodo DPPH je pokazal, da imajo največjo antioksidativno aktivnost kisle frakcije kolofonije. Tukaj je vrednost FIN KF in BIH 1 KF višja kot pri Flavoksanu 14 (ekstrakt rožmarina, pridobljen z ekstrakcijo s superkritičnim CO<sub>2</sub>), je pa nižja kot pri BHT in tokoferolu. Antioksidativna aktivnost drugih frakcij in celotnih terpeninov je šibka.

V naslednji preglednici so zbrani rezultati obeh metod ugotavljanja antioksidativne aktivnosti za primerjavo.

*Preglednica XII: Primerjava vrednosti relativne antioksidativne aktivnosti terpeninov in frakcij glede na galno kislino, v odstotkih, izračunanih po dveh metodah za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti.*

Vzorec	ABTS	DPPH
	AA*relF(galna) [%]	AA*relF(galna) [%]
SLO SV	0,11	0,07
SLO SV NF	0,30	0,17
SLO SV KF	1,27	0,74
SLO SV EO	0,15	0,04
SLO 4	0,19	0,10
SLO 4 NF	0,31	0,09
SLO 4 KF	0,45	0,53
SLO 4 EO	0,07	0,01
BIH	0,39	0,51
BIH 1 NF	0,21	0,13
BIH 1 KF	3,88	5,24
BIH 1 EO	0,29	0,05
FIN	0,26	0,11
FIN NF	0,37	0,32
FIN KF	4,20	6,17
FIN EO	0,30	0,05
Sintezni tokoferol	13,64	14,31
Flavoksan 14	1,72	2,25
BHT	2,77	8,58
Kontrola (galna ksl.)	100,00	100,00
Slepi vzorec (MeOH)	0,00	0,00

Obe metodi sta pokazali šibko antioksidativno aktivnost terpentina in frakcij. Zanimivo je, da pri vzorcih ni bistvenih razlik v vrednostih med metodama, z izjemo BHT, pri katerem se vrednost precej razlikuje in vpliva tudi na interpretacijo. Iz rezultatov lahko sklepamo, da največji delež antioksidativne aktivnosti terpentina pripada kisli frakciji, najmanj pa prispeva eterično olje.

Šibka antioksidativna aktivnost terpentina niti ni presenetljiva. V uvodu smo omenili pomembno vlogo kisikovih reaktivnih zvrsti v procesu celjenja rane, kot obveščevalnih molekul in pomembnih agensov, s katerimi imunske celice uničujejo patogene mikroorganizme. Poseganje v ta proces z močnimi antioksidanti bi lahko imelo neželene posledice. Terpentin pa je očitno snov, ki ima sposobnost odstraniti neželen presežek radikalov, ne ovira pa fizioloških mehanizmov, pri katerih so radikali nujni.

## **4.6. Protibakterijska učinkovitost terpentina**

Jokinen in Sipponen sta izvedla mikrobiološke raziskave za ugotavljanje protimikrobnega učinka terpentina. Problem izvedbe teh poskusov je netopnost smole v vodnem mediju, posledica so lahko lažno negativni rezultati. Zaradi tega sta uporabila različne metode.

Test difuzije v agar sta izvedla tako, da sta v agar naredila vdolbine premera 8 mm in jih napolnila z 10-odstotnim mazilom iz terpentina. Za kontrolo sta vdolbine napolnila s sterilno fiziološko raztopino. Plošče sta inkubirala pri 35 °C za 18 ur, preden sta izmerila cono inhibicije. Uporabila sta Mueller-Hintonov agar [1].

Dilucijski test v agarju sta izvedla zaradi ugotavljanja minimalne inhibitorne koncentracije. Uporabila sta Mueller-Hintonov agar in mu dodala Tween 80, da je bila njegova koncentracija 1 % (m/V). V agar sta dodala uprašen terpentin tako, da so bile končne koncentracije 1 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 % in 0,2 % (m/V) v mediju. Bakterijsko rast na gojišču sta ugotavljala po 16 do 20 urah inkubacije pri 35 °C. Plošče, na katerih ni bilo opaziti bakterij, sta inkubirala še 5 dni [1].

Za poskuse v tekočem mediju sta uporabila gojišče FAB (*fastidious anaerobe broth*, Lab M Ltd., Bury, United Kingdom). Poskuse sta izvedla na dva načina. Prvi način. Testne bakterije sta inokulirala v 1 mL FAB gojišča z ali brez kaplje (0,05 mL) terpentina. Razrast bakterij sta opazovala preko motnosti gojišča in jo opisala kot motnost odsotna, blaga,



srednja ali močna. Drugi način. Sloj terpentina sta nanese po dnu petrijevke in čez prelila 12 mL FAB medija. Medij sta inkubirala od 15 min do 72 ur, da se je v njem raztopila različna količina smrekove smole. Takšne medije, z različnimi koncentracijami terpentina, sta uporabila kot gojišče za različne bakterije. Po inkubaciji s terpeninom je bil medij bolj kisel (pH 6,5) kot pred inkubacijo (pH 7,6). Po inokulaciji z bakterijami sta gojišče inkubirala pri 35 °C, 72 ur [1].

Na koncu sta izvedla protimikrobni preizkus po Evropski farmakopeji. Test je sestavljen iz standardnih mikroorganizmov, s katerimi testiramo protimikrobni učinek snovi. Ti organizmi so: po Gramu pozitivne bakterije, *Staphylococcus aureus* in *MRSA*, po Gramu negativne bakterije, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* in kvasovka *Candida albicans*. Če snov ne izkazuje protimikrobnega delovanja, bodo mikroorganizmi po stiku z medijem ostali viabilni in možna bo ponovna kultivacija. Vzorce za testiranje sta pripravila tako, da sta prečiščen terpenin zmešala z inertnim mazilom. Končna koncentracija terpentina v mazilih je bila 0,5 %, 2 % ali 10 %. Gostota inokulacije je bila v območju od  $10^4$  do  $10^6$  CFU/mL (*colony-forming units*) oz. CFU/g. Poskus rekultivacije bakterij sta izvedla po 1 uri, 48 urah, 7, 14 ali 28 dneh. Protimikrobni učinek sta ocenila kot zmanjšanje števila CFU, kot funkcijo časa. Snov je znatno protimikrobno učinkovita, če se število CFU pri rekultivaciji zmanjša za vsaj  $10^2$  v 48 urah in vsaj za  $10^3$  v 7 dneh. Inokuliran medij sta inkubirala pri sobni temperaturi. Vzorce za rekultivacijo pa sta jemala po zgoraj navedenih časih.

S preizkusom po Evropski farmakopeji sta dokazala protimikrobno učinkovitost proti vsem šestim testiranim mikroorganizmom. Z drugimi preizkusi sta dokazala protimikrobno učinkovitost proti po Gramu pozitivnim bakterijam: *Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, po Gramu negativni bakteriji *Proteus vulgaris* in dermatofitnim glivam *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis* in *Epidermophyton floccosum* [1]. Za terpenin so dokazane tudi naslednje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC): 0,2 % (m/V) proti bakterijam iz rodu *Streptococcus*, 0,4 % (m/V) proti bakterijam iz rodu *Staphylococcus* in 0,4 do 0,6 % (m/V) proti bakterijam iz rodu *Enterococcus*. Za po Gramu negativne bakterije in bakterijo *Proteus vulgaris* je MIC preko 1 % (m/V) [2].

Za bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* ter kvasovko *Candida albicans* nista dokazala protimikrobne učinkovitosti s prvimi tremi preizkusi, sta pa dokazala učinkovitost po štirih dneh stika z 10-odstotnim mazilom iz terpentina v preizkusu po Evropski farmakopeji ([2], [18]).

Terpentin ima protimikrobno delovanje proti širokemu spektru mikroorganizmov. Učinkuje proti po Gramu pozitivnim (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*) in po Gramu negativnim bakterijam (*E. coli*, *P. aeruginosa*), kvasovkam, kot je *C. albicans*, in dermatofitnim glivam. Mazilo mora vsebovati vsaj 10 % terpentina, da ima protimikrobni učinek ([1], [2], [18]).

S tem so dokazali protimikrobno delovanje terpentina proti vsem, uvidoma omenjenim, glavnim povzročiteljem okužb ran. Na podlagi teh podatkov zaključujemo, da ima terpentin sposobnost preprečiti okužbo rane in uničiti patogene mikroorganizme na inficiranih ranah.

#### 4.7. Vpliv terpentina na rast keratinocitov in fibroblastov v celičnih kulturah *in vitro*

Omenili smo že, da smo pred izvedbo poskusov na celicah izvedli teste, s katerimi smo ugotavljali mešanje terpentina, raztopljenega v različnih topilih, z medijem. Na ta način smo racionalizirali porabo materiala za teste na celicah. Natehtali smo 10 mg terpentina in ga raztopili v navedenih topilih. Raztopino terpentina v DMSO smo še dodatno razredčili z DMSO v razmerju 1:10, da je bila končna koncentracija 1 mg/mL. Po mešanju z medijem smo preverjali motnost raztopine in nastanek oborine. Rezultati so zbrani v preglednici XIII.

*Preglednica XIII: Rezultati preizkusa mešanja terpentina, raztopljenega v različnih topilih, z medijem za gojenje celic, z dodatkom in brez dodatka seruma;*

BS – medij brez seruma; SS – medij z dodatkom seruma

(Primer: 1:9 BS – zmešali smo: 1 del raztopine terpentina in 9 delov medija brez seruma – nastala je oborina).

10 mg/mL v metanolu		10 mg/mL v DMSO		1 mg/mL v DMSO	
1:1 BS	1:1 SS	1:1 BS	1:1 SS	1:1 BS	1:1 SS
oborina	oborina	oborina	oborina	manj bistro	bistro
1:9 BS	1:9 SS	1:9 BS	1:9 SS		
oborina	motno	motno	manj motno		

Benjamin Justin: Analiza sestave smrekove smole, ugotavljanje njenih antioksidativnih in protibakterijskih lastnosti ter njenega delovanja na fibroblaste in keratinocite in vitro

10 mg/mL v brezvodnem etanolu		10 mg/mL v 70-odstotnem etanolu			
1:1 BS	1:1 SS	1:1 BS	1:1 SS	1:8 BS	1:8 SS
manj bistro	bistro	motno	motno	motno	manj motno
1:9 BS	1:9 SS	1:9 BS	1:9 SS		
manj bistro	bistro	manj bistro	bistro		

Najbolj obetavni so bili videti vzorci, pripravljene z brezvodnim etanolom. Za dodaten preizkus smo vse bistre ali pa rahlo motne vzorce centrifugirali 5 min pri 15.000 rpm (preglednica XIV).

*Preglednica XIV: Prisotnost usedline po centrifugiranju obetavnih vzorcev;*

BS – medij brez seruma; SS – medij z dodatkom seruma.

10 mg/mL v metanolu	10 mg/mL v DMSO	1 mg/mL v DMSO	
1:1 SS		1:1 BS	1:1 SS
usedlina		manjša usedlina	ni usedline
	1:9 SS		
	usedlina		
<hr/>			
10 mg/mL v brezvodnem etanolu	10 mg/mL v 70-odstotnem etanolu		
1:1 SS			
manjša usedlina			
1:9 SS	1:9 SS		
manjša usedlina	usedlina		

Tudi ta poskus je potrdil brezvodni etanol kot najbolj obetavno topilo. Usedlina, ki se je pojavila v vzorcih, je bila poleg terpentina verjetno sestavljena tudi iz proteinov, ki so sedimentirali. Imeli smo pomisleke, da bo etanol negativno vplival na rast celic. Zato smo se odločili preveriti vpliv koncentracije etanola na rast celic. Poskus smo izvedli hkrati s poskusom vpliva terpentina na rast celic, kot kontrolni poskus. Etanol smo k celicam nanesli v šestih različnih koncentracijah. Serum (10 %) je bil prisoten v vseh vdolbinah, razen pri negativni kontroli.

Rezultati meritev absorbance za vsako ploščo posebej so v prilogah. Meritev absorbance za vsako koncentracijo smo izvedli v treh ponovitvah. Izračunali smo povprečje in standardni

odklon. V nekaterih vdolbinah so absorbance močno odstopale od drugih dveh vrednosti. Takšne podatke smo izločili. Kljub temu je pri nekaterih vrednostih standardni odklon precejšen. V preglednici XV smo zbrali povprečne vrednosti za vsako koncentracijo. Združeni so podatki poskusov na keratinocitih in na fibroblastih. Negativna in pozitivna kontrola, kot referenčni vrednosti, sta označeni sivo. Pri negativni kontroli so bile celice v mediju brez seruma, pri pozitivni kontroli pa v mediju z 10 % seruma.

*Preglednica XV: Povzetek rezultatov testiranja vpliva terpentina in vehikla na celice; primerjava povprečnih vrednosti absorbance;*

**K** – keratinociti; **F** – fibroblasti; **neg.** – negativna kontrola; **poz.** – pozitivna kontrola; **or** – osnovna raztopina; **or2x,5x...** – redčitev osnovne raztopine z medijem; **vor** – vehikel osnovne raztopine (brezvodni etanol); **vor2x,5x** – redčitve vehikla z medijem; **M+or** – medij s serumom + osnovna raztopina vzorca (za kontrolo).

	Keratinociti		Fibroblasti		
	Po 48 h	Po 72 h	Po 48 h	Po 72 h	
<b>Neg.</b>	0,59	0,66	0,61	0,62	
<b>Poz.</b>	0,34	2,12	2,08	3,28	
Osnovna raztopina - terpenin v absolutnem etanolu in redčitev	<b>K/F+or</b>	5,10	3,52	10,81	4,85
	<b>K/F+or2x</b>	2,87	7,72	3,31	2,41
	<b>K/F+or5x</b>	0,53	0,93	0,58	0,70
	<b>K/F+or10x</b>	0,37	0,45	0,35	0,43
	<b>K/F+or20x</b>	0,29	0,74	0,82	1,24
	<b>K/F+or40x</b>	0,31	0,56	1,26	2,14
Vehikel - absolutni etanol in redčitev	<b>K/F+vor</b>	0,10	-0,04	-0,03	0,00
	<b>K/F+vor2x</b>	0,23	0,13	0,27	0,27
	<b>K/F+vor5x</b>	0,41	1,10	1,85	2,67
	<b>K/F+vor10x</b>	0,27	0,26	0,56	0,70
	<b>K/F+vor20x</b>	0,29	0,38	1,06	1,32
	<b>K/F+vor40x</b>	0,66	2,01	1,98	3,09
Medij, osnovna raztopina in redčitev	<b>M+or</b>	51,63	19,67	34,30	46,18
	<b>M+or2x</b>	3,95	3,64	3,39	3,45
	<b>M+or5x</b>	0,48	0,75	0,44	0,97
	<b>M+or10x</b>	0,31	0,38	0,32	0,41
	<b>M+or20x</b>	0,25	0,24	0,24	0,24
	<b>M+or40x</b>	0,22	0,19	0,21	0,23

V poglavju 3.7, med Materiali in metodami, smo opisali mehanizem delovanja barvil za spremljanje metabolne aktivnosti celic. Barvilo (MTS ali WST-8) se reducira do ustreznega formazana, katerega absorbanco izmerimo pri določeni valovni dolžini. Elektrone prejme od celic zaradi metabolizma. V zadnjih 18 vdolbinah pa celic ni bilo (zadnjih šest vrstic v preglednici). Kljub temu smo izmerili visoke vrednosti absorbance, zlasti pri osnovni raztopini in dvakratni redčitvi. Razlog je najverjetneje antioksidativno delovanje terpentina. Antioksidativne molekule ali drugače povedano reducenti, so oddali elektrone barvilu. S tem so ga reducirali. Nastal je formazan in povišal vrednost absorbance, kljub odsotnosti celic. V podporo tej trditvi govorijo padajoče vrednosti absorbance, ko se zmanjšuje koncentracija terpentina v raztopini (glej zadnjih šest vrstic preglednice XIX).

Etanol inhibitorno vpliva na rast keratinocitov in fibroblastov. Vrednosti absorbance so pri vseh koncentracijah nižje kot pri pozitivni kontroli (glej K/F+vor in redčitve). Visoke vrednosti absorbance v vdolbinah s celicami in osnovno raztopino ter dvakratno redčitvijo (K/F+or, K/F+or2x) so verjetno posledica antioksidativnih lastnosti terpentina.

S tem poskusom nismo odkrili vpliva terpentina na rast keratinocitov in fibroblastov. Oviro nam je predstavljalo topilo, absolutni etanol, in pa interakcije terpentina z barvilom za merjenje metabolne aktivnosti celic.

Razmišljali smo, kako bi izpeljali poskus, pri katerem bi se izognili uporabi vehikla. Terpentin v mediju ni topen, organska topila pa bodo citotoksična za celice. Zato bi naredili sledeče. Terpentin bi raztopili v absolutnem etanolu. V vdolbine bi nanegli različne volumne raztopine. S tem bi na gojišče vnesli različne mase terpentina. Potem bi počakali, da etanol izhlapi. Tako bi bil v vdolbinah terpentin, brez topila. Celice bi gojili na terpentinu. V vdolbine bi nanegli celice v mediju in počakali, da se pritrdijo, dodali serum in izvedli poskus. Tako bi se izognili negativnemu vplivu vehikla na celice. Kljub temu pa bi ostal problem interakcije terpentina z barvilom. Iz tega zaključujemo, da metoda z meritvijo metabolne aktivnosti preko absorbance z uporabljenima barviloma ni primerna metoda za ugotavljanje vpliva terpentina na rast keratinocitov in fibroblastov.

## 5. SKLEP

Z metodama ABTS in DPPH za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti smo dokazali šibko antioksidativno delovanje smrekove smole. V zvezi s procesom celjenja rane je šibko antioksidativno delovanje smrekove smole smiselno.

Terpentin ima protimikrobno delovanje proti širokemu spektru mikroorganizmov. Mazilo mora vsebovati vsaj 10 % terpentina, da ima protimikrobni učinek.

S poizkusi na celicah smo potrdili negativen vpliv absolutnega etanola na rast keratinocitov in fibroblastov, ki smo ga uporabili kot topilo za raztapljanje smrekove smole v gojišču za celice.

Na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili v tej nalogi, lahko zaključimo, da je smrekova smola sposobna preprečiti okužbo, preprečiti poškodbe zaradi presežka radikalov in na ta način tudi blažiti vnetje. Nimamo pa podatkov o vplivu smrekove smole na delitev in rast keratinocitov in fibroblastov. Za takšne zaključke bi bile nujne raziskave, kako gojiti celice ob prisotnosti smrekove smole in kako potem izmeriti njen vpliv.

Klinične študije drugih raziskovalcev so prinesle tudi dokaze o učinkovitosti smrekove smole pri zdravljenju ran. Na podlagi navedenih dejstev zaključujemo, da smrekova smola ima potencial za zdravljenje ran. Menimo, da bi z njeno pomočjo lahko pomagali ljudem, ki trpijo za kroničnimi ranami, zato so nadaljnje raziskave zaželeno in smiselne.

## 6. LITERATURA

- [1] J. Jokinen J. in A. Sipponen, „Refined spruce resin to treat chronic wounds: rebirth of an old folkloristic therapy,“ *Advances in wound care, volume 5, number 5*, pp. 198-207, 2016.
- [2] A. Sipponen, *Coniferous resin salve, ancient and effective treatment for chronic wounds - laboratory and clinical studies*, Helsinki: Unigrafia, Helsinki, 2013.
- [3] J. Bruneton, *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal plants 2nd edition*, Paris: Lavoisier Publishing, 1999, pp. 579-584.
- [4] W. Blaschek, U. Hilgenfeldt, U. Holzgrabe, K. Mörike, J. Reichling, P. Ruth, W. Barthlott in H. D. Höltje, *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, Stuttgart: Springer-Verlag, 2018.
- [5] D. Petrovič in M. Zorc, *Histologija*, Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, 2012, pp. 17-22,69-76,115-118.
- [6] P. Beldon, „Basic science of wound healing,“ *Surgery 28:9*, pp. 409-412, 2010.
- [7] S. Enoch in D. J. Leaper, „Basic science of wound healing,“ *Surgery 26:2*, pp. 31-37, 2007.
- [8] R. M. Blumm, J. E. Hollander in A. J. Singer, *Skin and soft tissue injuries and infections; Chapter 2: The biology of wound healing*, ZDA: PMPH, 2010.
- [9] A. Young in C.-E. McNaught, „The physiology of wound healing,“ *Surgery 29:10*, pp. 475-479, 2011.
- [10] K. Gjodsbol, J. J. Christensen, T. Karlsmark, B. Jorgensen, B. M. Klein in K. A. Krogfelt, „Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study,“ *International Wound Journal, Vol. 3, No. 3*, pp. 225-231, 2006.
- [11] B. McGuinness, M. Asimus in T. Swanson, *Wound management for the advanced practitioner; Chapter 9: Infected wounds*, Melbourne: IP Communications, 2014, pp. 212-237.
- [12] A. Giacometti, O. Cirioni, A. M. Schimizzi, M. S. Del Prete, F. Barchiesi, M. M. D'errico, E. Petrelli in G. Scalise, „Epidemiology and microbiology of surgical wound infections,“ *Journal of clinical microbiology, Vol. 38, No. 2*, pp. 918-922, 2000.
- [13] D. André-Lévigne, A. Modarressi, M. S. Pepper in B. Pittet-Cuénod, „Reactive oxygen species and NOX enzymes are emerging as key players in cutaneous wound repair,“ *International Journal of Molecular Sciences 18,2149*, pp. 1-28, 2017.

Benjamin Justin: Analiza sestave smrekove smole, ugotavljanje njenih antioksidativnih in protibakterijskih lastnosti ter njenega delovanja na fibroblaste in keratinocite in vitro

- [14] B. Wiyono, S. Tachibana in D. Tinambunan, „Chemical compositions of pine resin, rosin and turpentine oil from west Java,“ *Journal of Forestry Research; Vol.3, No.1*, pp. 7-17, 2006.
- [15] V. Jurkaš, Ugotavljanje antioksidativne aktivnosti v različnih vrstah ajde (*Fagopyrum* sp.); Poglavji: 4.3.1. Metoda DPPH in 4.3.2. Metoda ABTS, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2017.
- [16] S. de Oliveira, G. A. de Souza, C. Rodrigues Eckert, T. Alves Silva, E. Silva Sobral, O. Aparecida Favero, J. Pena Ferreira, P. Romoff in W. Josef Baader, „Evaluation of antiradical assay used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts,“ *Quim. Nova Vol. 37, No. 3*, pp. 497-503, 2014.
- [17] T. Riss L., R. Moravec A., A. Niles L., S. Duellman, H. Benink A., T. Worzella J. in L. Minor, „Cell viability assays,“ *Assay guidance manual*, p. 31 str., 2016.
- [18] A. Sipponen in K. Laitinen, „Antimicrobial properties of natural coniferous rosin in the European Pharmacopoeia challenge test,“ *APMIS 119*, pp. 720-724, 2011.



## PRILOGE

*Preglednica XVI: Vrednosti absorbance formazana (slika 3, str. 24) po 48 urni inkubaciji keratinocitov z vzorci terpentina in vehikla;*

**K** – keratinociti; **neg.** – negativna kontrola; **poz.** – pozitivna kontrola; **or** – osnovna raztopina; **or2x,5x...** – redčitev osnovne raztopine z medijem; **vor** – vehikel osnovne raztopine (brezvodni etanol); **vor2x,5x** – redčitve vehikla z medijem; **M+or** – medij s serumom + osnovna raztopina vzorca (za kontrolo); **x<sub>povpr</sub>** – povprečna vrednost; **st.dev** – standardni odklon.

	<b>K neg.</b>	<b>K poz.</b>	<b>K+or</b>	<b>K+or2x</b>	<b>K+or5x</b>	<b>K+or10x</b>	<b>K+or20x</b>	<b>K+or40x</b>
	0,975	0,266	5,23	2,169	0,51	0,325	0,327	0,414
	0,654	0,409	3,592	3,166	0,58	0,394	0,241	0,218
	0,132	- 0,394	6,477	3,284	0,493	0,404	0,307	0,294
<b>x<sub>povpr.</sub></b>	<b>0,587</b>	<b>0,338</b>	<b>5,100</b>	<b>2,873</b>	<b>0,528</b>	<b>0,374</b>	<b>0,292</b>	<b>0,309</b>
<b>st.dev</b>	0,43	0,10	1,45	0,61	0,05	0,04	0,05	0,10
			<b>K+vor</b>	<b>K+vor2x</b>	<b>K+vor5x</b>	<b>K+vor10x</b>	<b>K+vor20x</b>	<b>K+vor40x</b>
			0,129	0,228	0,826	0,226	0,286	0,97
			0,079	0,244	0,233	0,281	0,284	0,487
			0,092	0,225	0,166	0,297	0,3	0,508
<b>x<sub>povpr.</sub></b>			<b>0,100</b>	<b>0,232</b>	<b>0,408</b>	<b>0,268</b>	<b>0,290</b>	<b>0,655</b>
<b>st.dev</b>			0,03	0,01	0,36	0,04	0,01	0,27
			<b>M+or</b>	<b>M+or2x</b>	<b>M+or5x</b>	<b>M+or10x</b>	<b>M+or20x</b>	<b>M+or40x</b>
			- 44,807	3,906	0,518	0,341	0,221	0,246
			54,086	4,164	0,433	0,233	0,261	0,237
			49,172	3,766	0,492	0,358	0,257	0,186
<b>x<sub>povpr.</sub></b>			<b>51,629</b>	<b>3,945</b>	<b>0,481</b>	<b>0,311</b>	<b>0,246</b>	<b>0,223</b>
<b>st.dev</b>			3,47	0,20	0,04	0,07	0,02	0,03

*Preglednica XVII: Vrednosti absorbance formazana (slika 3, str. 24) po 72 urni inkubaciji keratinocitov z vzorci terpentina in vehikla;*

**K** – keratinociti; **neg.** – negativna kontrola; **poz.** – pozitivna kontrola; **or** – osnovna raztopina; **or2x,5x...** – redčitev osnovne raztopine z medijem; **vor** – vehikel osnovne raztopine (brezvodni etanol); **vor2x,5x** – redčitve vehikla z medijem; **M+or** – medij s serumom + osnovna raztopina vzorca (za kontrolo);  $\bar{x}_{povpr}$  – povprečna vrednost; **st.dev** – standardni odklon.

	<b>K neg.</b>	<b>K poz.</b>	<b>K+or</b>	<b>K+or2x</b>	<b>K+or5x</b>	<b>K+or10x</b>	<b>K+or20x</b>	<b>K+or40x</b>
	0,685	2,913	1,089	4,754	0,948	0,464	0,202	1,002
	0,735	1,986	6,527	10,174	0,932	0,488	0,669	0,457
	0,553	1,463	2,951	8,241	0,919	0,396	1,336	0,223
$\bar{x}_{povpr.}$	<b>0,658</b>	<b>2,121</b>	<b>3,522</b>	<b>7,723</b>	<b>0,933</b>	<b>0,449</b>	<b>0,736</b>	<b>0,561</b>
<b>st.dev</b>	0,09	0,73	2,76	2,75	0,01	0,05	0,57	0,40
			<b>K+vor</b>	<b>K+vor2x</b>	<b>K+vor5x</b>	<b>K+vor10x</b>	<b>K+vor20x</b>	<b>K+vor40x</b>
			-0,046	0,141	1,915	0,271	0,339	1,584
			-0,033	0,122	0,907	0,205	0,332	2,38
			-0,029	0,12	0,471	0,305	0,478	2,076
$\bar{x}_{povpr.}$			<b>-0,036</b>	<b>0,128</b>	<b>1,098</b>	<b>0,260</b>	<b>0,383</b>	<b>2,013</b>
<b>st.dev</b>			0,01	0,01	0,74	0,05	0,08	0,40
			<b>M+or</b>	<b>M+or2x</b>	<b>M+or5x</b>	<b>M+or10x</b>	<b>M+or20x</b>	<b>M+or40x</b>
			20,627	4,025	0,743	0,385	0,232	0,206
			25,157	3,684	0,772	0,392	0,247	0,196
			13,238	3,215	0,747	0,374	0,229	0,164
$\bar{x}_{povpr.}$			<b>19,674</b>	<b>3,641</b>	<b>0,754</b>	<b>0,384</b>	<b>0,236</b>	<b>0,189</b>
<b>st.dev</b>			6,02	0,41	0,02	0,01	0,01	0,02

*Preglednica XVIII: Vrednosti absorbance formazana (slika 3, str. 24) po 48 urni inkubaciji fibroblastov z vzorci terpentina in vehikla;*

**F** – fibroblasti; **neg.** – negativna kontrola; **poz.** – pozitivna kontrola; **or** – osnovna raztopina; **or2x,5x...** – redčitev osnovne raztopine z medijem; **vor** – vehikel osnovne raztopine (brezvodni etanol); **vor2x,5x** – redčitev vehikla z medijem; **M+or** – medij s serumom + osnovna raztopina vzorca (za kontrolo);  $\bar{x}_{povpr}$  – povprečna vrednost; **st.dev** – standardni odklon.

	<b>F neg.</b>	<b>F poz.</b>	<b>F+or</b>	<b>F+or2x</b>	<b>F+or5x</b>	<b>F+or10x</b>	<b>F+or20x</b>	<b>F+or40x</b>
	0,693	2,551	14,075	1,86	0,576	0,382	0,271	1,916
	0,682	2,141	12,501	4,754	0,618	0,321	0,893	1,245
	0,460	1,559	5,846	<del>634,8</del>	0,555	0,341	1,303	0,623
$\bar{x}_{povpr}$	<b>0,612</b>	<b>2,084</b>	<b>10,807</b>	<b>3,307</b>	<b>0,583</b>	<b>0,348</b>	<b>0,822</b>	<b>1,261</b>
<b>st.dev</b>	0,13	0,50	4,37	2,05	0,03	0,03	0,52	0,65
			<b>F+vor</b>	<b>F+vor2x</b>	<b>F+vor5x</b>	<b>F+vor10x</b>	<b>F+vor20x</b>	<b>F+vor40x</b>
			-0,018	0,214	2,485	0,768	0,489	2,444
			0,024	0,229	1,783	0,474	0,916	1,77
			-0,097	0,364	1,282	0,441	1,763	1,737
$\bar{x}_{povpr}$			<b>-0,030</b>	<b>0,269</b>	<b>1,850</b>	<b>0,561</b>	<b>1,056</b>	<b>1,984</b>
<b>st.dev</b>			0,06	0,08	0,60	0,18	0,65	0,40
			<b>M+or</b>	<b>M+or2x</b>	<b>M+or5x</b>	<b>M+or10x</b>	<b>M+or20x</b>	<b>M+or40x</b>
			34,688	2,927	0,434	0,288	0,220	0,208
			33,904	3,871	0,449	0,322	0,252	0,226
			<del>531,9</del>	3,363	0,429	0,364	0,243	0,192
$\bar{x}_{povpr}$			<b>34,296</b>	<b>3,387</b>	<b>0,437</b>	<b>0,325</b>	<b>0,238</b>	<b>0,209</b>
<b>st.dev</b>			0,55	0,47	0,01	0,04	0,02	0,02

*Preglednica XIX: Vrednosti absorbance formazana (slika 3, str. 24) po 72 urni inkubaciji fibroblastov z vzorci terpentina in vehikla;*

**F** – fibroblasti; **neg.** – negativna kontrola; **poz.** – pozitivna kontrola; **or** – osnovna raztopina; **or2x,5x...** – redčitev osnovne raztopine z medijem; **vor** – vehikel osnovne raztopine (brezvodni etanol); **vor2x,5x** – redčitve vehikla z medijem; **M+or** – medij s serumom + osnovna raztopina vzorca (za kontrolo);  $\bar{x}_{\text{povpr}}$  – povprečna vrednost; **st.dev** – standardni odklon.

	<b>F neg.</b>	<b>F poz.</b>	<b>F+or</b>	<b>F+2xor</b>	<b>F+5x0r</b>	<b>F+10xor</b>	<b>F+20xor</b>	<b>F+40xor</b>
	0,761	3,801	3,59	1,903	0,591	0,447	0,275	3,284
	0,605	3,301	4,995	2,493	0,724	0,43	0,837	2,482
	0,499	2,725	5,975	2,8	0,792	0,424	1,638	0,65
$\bar{x}_{\text{povpr.}}$	<b>0,622</b>	<b>3,276</b>	<b>4,853</b>	<b>2,411</b>	<b>0,702</b>	<b>0,434</b>	<b>1,238</b>	<b>2,139</b>
<b>st.dev</b>	0,13	0,54	1,20	0,47	0,10	0,01	0,57	1,35
			<b>F+vor</b>	<b>F+vor2x</b>	<b>F+vor5x</b>	<b>F+vor10x</b>	<b>F+vor20x</b>	<b>F+vor40x</b>
			-0,031	0,132	3,56	1,108	0,554	3,15
			0,001	0,25	2,777	0,486	1,021	3,157
			0,036	0,433	1,685	0,506	2,374	2,97
$\bar{x}_{\text{povpr.}}$			<b>0,002</b>	<b>0,272</b>	<b>2,674</b>	<b>0,700</b>	<b>1,316</b>	<b>3,092</b>
<b>st.dev</b>			0,03	0,15	0,94	0,35	0,95	0,11
			<b>M+or</b>	<b>M+or2x</b>	<b>M+or5x</b>	<b>M+or10x</b>	<b>M+or20x</b>	<b>M+or40x</b>
			21,209	2,948	0,722	0,424	0,201	0,254
			71,142	3,593	0,797	0,418	0,266	0,214
			- 640,84	3,805	1,38	0,393	0,248	0,212
$\bar{x}_{\text{povpr.}}$			<b>46,176</b>	<b>3,449</b>	<b>0,966</b>	<b>0,412</b>	<b>0,238</b>	<b>0,227</b>
<b>st.dev</b>			35,31	0,45	0,36	0,02	0,03	0,02