

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

Број:	07.02.2024
Опш:	
05 851	

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број : IV-03-967/34 од 15.12.2023. године именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Сњежане Мирковић** под називом:

Одабране врсте рода *Pinus sp.*: истраживање хемијског профила, биолошких активности и потенцијала за примену на кожи

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је Комисија у следећем саставу:

- **др Марина Томовић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник;
- **др Ивана Нешић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармацеутска технологија и биотехнологија, члан;
- **др Марина Миленковић**, редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија са имунологијом и имунохемијом, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи Извештај:

2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат, Сњежана Мирковић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Rod Pinus L. (борови) припада породици *Pinaceae* и обухвата око 225 врста, што га чини најбројнијим родом међу голосеменицама. Различити делови *Pinus* врста имају етнотерапијску примену у третману кожних проблема (екцеми, акне, алопеција, псоријаза, гљивична обољења) и лечењу рана. Етарска уља борова се интензивно користе у фармацеутској, козметичкој и парфимеријској индустрији.

Резистенција бактерија на антибиотике и недостатак нових антибиотика на тржишту лекова подстакли су испитивања антибактеријског деловања алтернативних

антимикробних агенаса, као што су етарска уља и биљни екстракти. Поред мноштва фитонутријената, биљке садрже и полифенолна једињења, главне носиоце антиоксидативног деловања, који играју значајну улогу у превенцији и третману различитих обољења. Антиоксиданси у препаратима за примену на кожи имају заштитну улогу од штетног UV зрачења (фотостарења и фотокарциногенезе коже) и штетног деловања оксидативног стреса. Широко коришћени синтетски антиинфламаторни агенси често имају бројне нежељене ефекте, па традиционални лекови и лековите биљке представљају значајан извор нових антиинфламаторних супстанци.

Разноликост хемијског састава и традиционална употреба биљака *Pinus* врста популаризују студије које за предмет истраживања имају антимикробни, антиоксидативни и антиинфламаторни потенцијал ових врста.

2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Ова студија ће се, у првој фази, бавити испитивањем хемијског састава, антимикробне и антиоксидативне активности метанолних екстраката и етарских уља иглица и зелених шишарица *Pinus* врста које расту на подручју Босне и Херцеговине, а то су: *Pinus heldreichii* Christ. (муника, субендемит Балканског полуострва, реликтна врста), *Pinus mugo* Turra. (планински бор), *Pinus nigra* J.F.(црни бор) *Pinus sylvestris* L. (бели бор) и *Pinus pinaster* Aiton (приморски бор). На основу резултата прве фазе, у другој фази истраживања биће припремљени изолати (етанолни екстракт и етарско уље) одабране врсте рода *Pinus*, као и одговарајућег дела биљке (иглице или шишарице). Како би се проценио потенцијал ових изолата за примену на кожи, спровешће се испитивања њихове антимикробне активности против *Cutibacterium acnes* (*in vitro*), као и антиинфламаторна активност *in vivo*. Паралелно, испитаће се и наведене активности дисперзија липосома у које је инкапсулирано одабрано етарско уље, као и липосома са инкапсулираним етарским уљем уз додатак одабраног екстракта у спољашњој фази липосомске дисперзије. Предмет дисертације биће и истраживања физичко-хемијских особина (стабилности) липосомских дисперзија, као и евалуација безбедности примене наведених изолата *per se* или након инкорпорирања у липосоме на кожи хуманих добровољаца. Наведена истраживања на дефинисаним *Pinus* врстама нису до сада спровођена.

2.3 Наслов, циљ(еви) и хипотеза(е) докторске дисертације

Наслов: Одабране врсте рода *Pinus sp.*: истраживање хемијског профила, биолошких активности и потенцијала за примену на кожи

Циљеви:

Циљ овог истраживања је:

Фаза 1

1. Припрема метанолних екстраката иглица и зелених шишарица испитиваних биљних врста *Pinus sp.*
2. Хемијска карактеризиција екстраката иглица и зелених шишарица врста *Pinus sp.* која обухвата одређивање укупних фенола, флавоноида и танина, те одређивање садржаја фенолних једињења.
3. Екстракција етарских уља из иглица и зелених шишарица испитиваних врста *Pinus sp.*
4. Одређивање квантитативног приноса и хемијског састава етарских уља иглица и зелених шишарица врста *Pinus sp.*
5. Испитивање *in vitro* антиоксидативне активности екстраката.
6. Испитивање антимикуробног деловања етарских уља и екстраката.
7. Испитивање антимикуробне активности комбинације етарских уља и антибиотика.

Фаза 2

8. Припрема изолата (етанолни екстракт и етарско уље) од биљних сировина врсте рода *Pinus*, која је одабрана на основу прве фазе истраживања.
9. Формулација и физичко-хемијска карактеризација липосомских дисперзија без активних једињења, дисперзија са инкапсулираним етарским уљем, те дисперзија са инкапсулираним етарским уљем уз додатак екстракта у спољашњој фази, због ипитивања потенцијалног синергизма.
10. Процена потенцијала етарских уља, екстракта и наведених липосома за примену на кожи, испитивањем: антимикуробне активност против *Cutibacterium acnes (in vitro)* и антиинфламаторне активности (*in vivo*).
11. Испитивање физичко-хемијских особина (стабилности) липосома (pH вредност, електрична проводљивост, величина честица, зета потенцијал).
12. *In vivo* процена иритационог потенцијала (аспект безбедности) наведених изолата *per se* или липосомских дисперзија на кожи хуманих добровољаца, мерењем биофизичких параметара (електрична капацитативност, трансепидермални губитак влаге, еритема индекс, pH) коже пре и након наношења узорака, под 24-часовном оклузијом.-

Хипотезе:

Фаза 1

1. У етарским уљима доминирају терпени, док су у екстрактима главни конституенси феноли, флавоноиди и танини.

2. Метанолни екстракти иглица и шишарица врста *Pinus sp.* имају различит садржај фенола, флавоноида и танина.
3. Постоји разлика у квалитативном и квантитативном саставу етарских уља различитих *Pinus* врста.
4. Екстракти биљних врста *Pinus sp.* испољавају антиоксидативну активност *in vitro*.
5. Етарска уља биљних врста *Pinus sp.* испољавају антимикуробно деловање.
6. Испитивана етарска уља показују адитиван/синергистички ефекат са антибиотиком.
7. Постоји разлика у биолошкој активности етарских уља и/или екстраката различитих *Pinus* врста.

Фаза 2

8. Припремљени изолати (етанолни екстракт и етарско уље) од биљних сировина врсте рода *Pinus* показују одређене биолошке активности, које су у вези са потенцијалном применом на кожи: антимикуробну активност против *Cutibacterium acnes (in vitro)* и антиинфламаторну активност (*in vivo*).
9. Инкапсулација етарског уља у липосоме доводи до побољшаних биолошких активности: антимикуробне активности против *Cutibacterium acnes (in vitro)* и антиинфламаторне активности (*in vivo*).
10. Липосомске дисперзије са инкапсулираним етарским уљем, и екстрактом у спољашој фази, због синергизма испољавају боље биолошке активности које су у вези са потенцијалном применом на кожи.
11. Развијене липосомске дисперзије показују задовољавајуће физичко-хемијске особине и стабилност.
12. Формулација липосома са етарским уљем и/или екстрактом као активном супстанцом или сами изолати показују задовољавајућу безбедност за топикалну примену.

2.4. Методе истраживања

2.4.1. Врста студије

Испитивање антимикуробне активности представља експерименталну студију на стандардним сојевима микроорганизама у *in vitro* условима, док је одређивање антиоксидативне активности експериментална студија аналитичке природе. У циљу одређивања антиинфламаторног потенцијала биће извршена студија на животињама *in vivo*. Процена безбедности формулација липосома са етарским уљем и/или екстрактом као активном супстанцом или самих изолати након примене на кожи, вршиће се у *in vivo* неинвазивној студији на здравим добровољцима, мерењем биофизичких параметара коже.

2.4.2. Популација која се истражује

Први део истраживања односи се на испитивање антиинфламаторне активности и обухватиће 80 здравих пацова *Wistar albino* соја, старости 8 недеља, телесне тежине 200-250 грама. Све животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, циклус светло:тама 12:12 сати), вода и храна ће бити доступни у довољној количини да би их животиње конзумирале према потреби (*ad libitum*). Експерименти ће се спровести у Лабораторији за кардиоваскуларна истраживања, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. При експерименталном раду биће поштоване одредбе прописаних акта (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципи етичности. Студија је одобрена од стране надлежних етичких институција факултета и Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде (одлука бр. 01-9011/3 од 14.09.2023.).

У зависности од третмана, експерименталне животиње ће бити подељене у групе на следећи начин:

1. Негативна контрола- нетретирани пацови (n=8)
2. Позитивна контрола-животињама примењена 1% хидрокортизон маст (n=8)
3. Животињама примењено етарско уље растворено у води, уз додатак Полисорбата 20 (n=8)
4. Животињама примењена вода уз додатак Полисорбата 20 (n=8)
5. Животињама примењен етанолни екстракт растворен у води (n=8)
6. Животињама примењен етанолни екстракт растворен у води уз додатак Полисорбата 20 (n=8)
7. Животињама примењена липосомска дисперзија без активних једињења (n=8)
8. Животињама примењена липосомска дисперзија са инкапсулираним етарским уљем (n=8)
9. Животињама примењена липосомска дисперзија са инкапсулираним етарским уљем и екстрактом у спољашњој фази (n=8)
10. Животињама примењена липосомска дисперзија са екстрактом у спољашњој фази (n=8).

Део истраживања који се односи на *in vivo* испитивање безбедности примене припремљених липосомских формулација или самих изолата на кожи здравих добровољаца, спровешће се као отворена студија, у складу са Хелсиншком декларацијом уз придржавање протокола одобреног од стране Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Нишу (одлука бр. 12-269112-2 од 09.3.2023.). Пре почетка студије, добровољци ће потписати информисани пристанак.

2.4.3. Узорковање

Припрема етарског уља и екстракта испитиваних биљних врста

Етарска уља испитиваних врста биће изолована из уситњеног биљног материјала дестилацијом помоћу водене паре у апаратури по *Clevenger*-у током 2 часа, методом прописаном у Ph. Jug. IV. Садржај етарског уља се изражава процентуално, у односу на суву масу биљног материјала. Етарска уља биће чувана на температури +4°C до извођења анализа.

Метанолни екстракти за прву фазу истраживања и етанолни екстракт за другу фазу истраживања ће се добити *Soxhlet* екстракцијом уситњених иглица и шишарица одговарајућим растварачима. Сви израђени екстракти биће упарени под сниженим притиском до сува, након чега ће се одредити принос екстракције, у процентима у односу на суву масу. Суви екстракти ће се до анализе чувати на температури +4°C.

Хемијска карактеризација испитиваних узорака

Садржај етарског уља се одређује према пропису Ph. Jug. IV.

Квантитативна анализа етарског уља ће се радити на GC са FID детектором (Flame Ionization Detector). Анализа етарског уља гасном хроматографијом ће се радити на HP-5890, серија II GC апарат (Hewlett Packard, Waldbronn, Немачка). Површински проценти добијени у опсегу као резултат стандардног обрађивања хроматограма, ће се користити као основа за квантитативну анализу.

GC-MS анализа ће се радити на аналитичком систему који повезује гасни хроматограф са спектрометром маса. Приликом анализе долази до раздвајања супстанци из смеше у гасном хроматографу и детекције у спектрометру маса као изузетно осетљивом и селективном детектору. Приликом квалитативне анализе вршиће се поређење ретенционих времена и масених спектра компоненти са референтним супстанцама из расположиве базе података. Биће извршено поређење експериментално добијених вредности *Kovats index* (Ковачеви индекси-К.И.) са литературним вредностима.

За одређивње садржаја активних једињења у екстрактима користиће се официналне фармакопејске методе (према Европској фармакопији, Ph Eur 11.00 и југословенској фармакопеји Ph. Jug. IV), Folin-Ciocalteu метода и HPLC метода.

Одређивање укупних флавоноида, фенола и танина

Садржај укупних флавоноида одредиће се спектрофотометријском методом описаном у Европској фармакопеји 11.0. Одређивање укупних фенола ће се вршити Folin-Ciocalteu методом (9), док ће се проценат садржаја укупних танина одредити методом описаном у Европској фармакопеји 11.0.

Одређивање садржаја фенола HPLC-UV анализом

Квалитативна и квантитативна анализу метанолних/етанолних екстраката, вршиће се на HPLC System 1200 Agilent Technologies са бинарном пумпом, PDA детектором и аутосамплером. Идентификација једињења се врши на основу карактеристичног UV спектра и ретенционог времена идентификованих једињења, а затим се врши поређење са одговарајућим подацима за стандардна једињења.

In vitro испитивање антиоксидативне активности

DPPH тест за одређивање антиоксидативног дејства

DPPH (α, α -Difenil- β -pikrilhidrazil) тест ће се спроводи у складу са процедуром коју је предложио Blois, у којој се DPPH радикал у реакцији са дономом протона редукује и доводи до промене боје из љубичасте у жуту. Интензитет промене боје ће се одредити спектрофотометријски (10). Способност неутрализације DPPH радикала изражава се процентом инхибиције.

FRAP-тест за одређивање антиоксидативног дејства

За одређивање антиоксидативне активности испитиваних узорака, користиће се и FRAP-тест по методи Benzie-а и Strain-а, која се заснива на редуцији Fe^{3+} -трипиридил-триазин комплекса (Fe^{3+} -TPTZ) до Fe^{2+} -трипиридил-триазин комплекса. Редуковани Fe^{2+} -трипиридил-триазин комплекс поседује интензивно плаву боју, која се одређује спектрофотометријски на 593 nm (11).

In vitro испитивање антимикробне активности

Вредности минималне инхибиторне концентрације (енгл. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) етарских уља и екстраката, за тестиране микроорганизме одређиваће се бујон-микродилуционом методом, према смерницама Института за клиничке и лабораторијске стандарде (енгл. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) (12). Испитивања ће се вршити у *Mueller Hinton* бујону (МНВ) за тестиране сојеве бактерија и у *Sabouraud* декстрозном бујону за *C. albicans*.

У микротитрациону плочу са 96 места ће се додати по 100 μ L радних концентрација етарских уља/екстраката и по 100 μ L бактеријске суспензије. Као индикатор раста бактерија користиће се трифенил-тетразолијум хлорид ТТС, (Sigma-Aldrich, SAD). Раст микроорганизма процениће се на основу појаве замућења течног медијума. MIC је најнижа концентрација испитиваног узорка у присуству које нема видљивог раста тестираног микроорганизма. Сва одређивања извешће су у дупликату уз укључене две позитивне контроле раста. Ампицилин, амикацин и меропенем ће бити примењени као контролни антибиотици, док ће се као контролни антимикотик користити амфотерицин. Сваки експеримент ће бити поновљен три пута.

Испитивање ефекта комбиноване примене етарског уља и антибиотика (гентамицина)

Ефекат комбинације етарских уља са антибиотцима на раст клинички најзначајнијих стандардних сојева бактерија (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) биће испитан помоћу тзв. “*checkerboard*” методе (13). Испитивање ће бити извршено у микротитрационим плочама са 96 места са двоструким, серијским разблажењима антибиотика нижим од забележених МИС вредности. Интеракција између антибиотика и етарског уља биће процењена након израчунавања фракционе инхибиторне концентрације (енгл. *fractional inhibitory concentration*, FIC) и индекса фракционе инхибиторне концентрације (енгл. *fractional inhibitory concentration indices*, FICI).

Испитивање антимикробне активности одабраних изолата врста рода *Pinus* и липосомских дисперзија против *Cutibacterium acnes*

У испитивањима ће бити коришћен стандардни сој *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (KWIK-STIK™, Microbiologics Inc., SAD). Антибактеријски ефекат испитиваних етарских уља, екстракта и липосомских дисперзија биће тестиран агар-дифузионом методом (енгл. *agar well diffusion assay*) према препорукама CLSI (2017) (14).

Ванкомицин (Sigma; St Louis, MO, USA) растворен у дестилованој води ће бити коришћен као контролни стандардни антибиотик. Сваки експеримент ће бити поновљен три пута и биће презентоване средње вредности зона инхибиције.

Испитивање антиинфламаторног ефекта одабраних изолата врста рода *Pinus* и липосомских дисперзија *in vivo*

Испитивани биљни изолати (екстракт и етарско уље) и липосоми ће се утрљавати на шапу пацова сат времена пре изазивања инфламације карагенином. 1% хидрокортизон маст представља референтну супстанцу која смањује едем на шапици пацова. Негативну контролу представљају нетретирани пацови. Раствор карагенина у физиолошком раствору (0,5% у запремини од 0,1 mL) ће се апликовати субплантарно један сат након дермалне примене испитиваних изолата или липосома или хидрокортизона. Дебљина ткива леве шапице сваког пацова ће се мерити у следећим тренуцима: непосредно пре изазивања инфламације и 1, 2, 3, 4 часа након инфламације уз помоћ дигиталног калипера. Процент инхибиције едема шапице рачуна се према формули:

$$\% \text{ инхибиције} = 100 \times [1 - (Y_t / Y_c)]$$

Где је Y_t = просечно повећање дебљине шапе у третираној групи пацова између два тренутка мерења, а Y_c = просечно повећање дебљине шапе у нетретираној групи пацова између два тренутка мерења (15). Након спроведеног експеримента, животиње ће се анестезирати и жртвовати цервикалном дислокацијом у циљу изоловања шапице за

неопходне биохемијске анализе. У хомогенизованом ткиву шапе пацова ће се спектрофотометријски одређивати прооксидативни маркер, индекс липидне пероксидације, мерен као тиобарбитурна киселина (TBARS) као и активност ензима антиоксидативног система заштите: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), концентрација редукованог глутатиона (GSH).

Протокол за израду липосома

Липосомске дисперзије ће бити припремљене уз помоћ комерцијално доступног ексципијенса Phosal 40 IP (Липоид, Немачка), који представља глобуларни систем за инкапсулацију "уради сам" (енгл. *Do-it-Yourself Globular Encapsulation System*), спремног за растварање етарског уља. Плацебо узорци липосомске дисперзије биће припремљени са Phosal 40 IP и пречишћеном водом. Код узорака са инкапсулираним етарским уљем и екстрактом, као и код липосомске дисперзије без етарског уља са екстрактом, екстракт ће бити додат у спољашњу фазу након мешања Phosal 40 IP и воде. Након одмеравања састојака, фазе ће бити мешане коришћењем ротор-статор хомогенизатора. Да би се добила коначна дисперзија, припремљена груба емулзија ће бити пропуштена кроз одговарајући уређај који ће омогућити добијање липосома жељене величине (16).

Физичко-хемијска карактеризација липосома

Одређивање средњег пречника, дистрибуције величине липосома и индекса полидисперзности методом динамичког расипања светлости

За анализу величине капи биће примењена *batch-mode* метода динамичког расипање светлости (енгл. *dynamic light scattering*, DLS) према оперативној процедури NCL-PCC-1 (17) коришћењем уређаја Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Велика Британија). Испитивани узорци липосома ће непосредно пре мерења бити разблажени и пренети у полистиренску кивету за једнократну употребу. Мерење ће бити спроведено на температури од 25°C, применом He-Ne ласера (таласна дужина светлости: 633 nm), уз детекцију расуте светлости под углом од 90°. За анализу података биће коришћен софтвер Malvern Dispersion Technology Software – DTS (Nano), верзија 5.00.

Одређивање површинског наелектрисања капи

Зета потенцијал, као индикатор површинског наелектрисања, биће одређен применом уређаја ZetasizerNano ZS90 (Malvern Instruments Ltd), одређивањем електрофоретске покретљивости капљица у електричном пољу. Узорци, разблажени непосредно пре мерења, биће пренети у савијену мерну ћелију са две електроде.

Ефикасност инкапсулације етарског уља (%EE)

0,1ml липосома биће помешано са истом количином раствора протамина (10 mg/ml) и вортексовано 60 секунди. Након тога ће смеши бити додато 3 ml физиолошког раствора и добијена мешавина ће бити центрифугирана на 3 000 rpm, 30 мин. Етарско уље из супернатанта (неинкапсулирано) биће екстраховано органским растварачем који ће затим бити отпарен, а остатак растворен у органском растварачу и као такав анализиран GC/MS и GC/FID техником (у њему ће бити одређиван садржај активних једињења који представљају количину ових компонената која није

инкапсулирана у липосоме). Истом техником биће одређен садржај истих једињења у коришћеном етарском уљу. Садржај инкапсулираног етарског уља биће израчунат из разлике количине ових компонената присутних у етарском уљу и количине која није инкапсулирана (односно која је одређена у супернатанту након центрифугирања) (16).

Мерење рН вредности и електричне проводљивости

Мерења рН вредности и електричне проводљивости биће извршена након израде липосома на уређајима: рН-meter HI 9321 (Hanna instruments, SAD) и кондуктометар CDM 230 (Radiometer, Данска).

Прелиминарна физичко-хемијска стабилност липосома

У циљу провере физичко-хемијске стабилности припремљених узорача липосома, мерења рН вредности и електричне проводљивости, величине честица и зета потенцијала поново ће бити поновљена након 1 и 3 месеца.

Методe за *in vivo* карактеризацију изолата *per se* или инкорпорираних у липосоме - биофизичке методе

Евалуација прелиминарног безбедоносног профила (иритационог потенцијала) израђених липосомских дисперзија или изолата вршиће се у 24-часовној студији под оклузијом на нормалној кожи (18). У *in vivo* карактеризацији биће коришћене неинвазивне технике мерења биофизичких параметара коже хуманих добровољаца и то: еритема индекса (енгл. *erythema index*, EI), трансепидермалног губитка воде (енгл. *transepidermal water loss*, TEWL), меланин индекса (енгл. *melanin index* MI), електричне капацитивности (енгл. *electrical capacitance*, EC), као мере хидратације *stratum corneum*-а и рН коже.

Одрђивање EI вршиће се сондом Mexameter® MX18, којом ће се такође вршити процена садржаја меланина у кожи (MI). Процена хидратације коже вршиће се мерењем EC коже уређајем Corneometer® CM 825, који је осетљив на релативну диелектричну константу воде. Промена у тоталној капацитивности коже се изражава арбитрарним јединицама. TEWL представља технику за процену баријерне функције коже, мерењем количине воде, која пролази кроз *stratum corneum* и напушта кожу као водена пара. TEWL ће се мерити сондом Tewameter® TM 300, чиме се обезбеђује информација о ефектима које топикално примењени производи имају на епидермалну баријеру. Испитивања утицаја препарата на рН коже је електрохемијска метода која не испољава нежељена дејства на кожу. Мерење Skin рН-meter PH 905 сондом омогућава брзо и ефикасно мерење рН коже. Све наведене сонде су део апарата Multi Probe Adapter System MPA® 9, произвођача Courage+Khazaka electronic GmbH, Немачка.

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

Варијабле које се могу пратити су: узорак (етарска уља, екстракти, липосоми) и исход-ефекат (праћење ефеката кроз дефинисана *in vitro* и *in vivo* испитивања).

2.4.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка потребна за процену безбедности израчуната је на основу података о трансдермалном губитку воде (биофизички параметар коже) на нетретираној кожи (контрола) и кожи третираној формулацијом са активном супстанцом, у студији сличног дизајна (19). Студијски узорак је израчунат узимајући алфа (α) од 0.05 и снагу студије од 0.8, за Студентов *t*-тест (два независна узорка), упоређујући две групе података (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између испитиване формулације и контроле, утврђен је број добровољаца и износи 13.

Прорачун укупног узорка животиња је заснован на претходно публикованом истраживању (15). За прорачун је коришћен *t*-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма. Узимајући у обзир резултате наведене студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 70. Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупни студијски узорак је утврђен на 80 експерименталних животиња (по 8 у свакој групи).

2.4.6. Статистичка анализа

За статистичку обраду података користиће се SPSS софтвер верзија 20.0, а ниво статистичке значајности ће бити постављен на $p \leq 0,05$.

Студентовим *t*-тестом и једнофакторском анализом варијансе (ANOVA) ће се утврдити постојање статистичке значајности средњих вредности, а накнадним Post Hoc Tukey тестом ће се утврдити између којих конкретно група постоји статистички значајна разлика. У случају да резултати не покажу нормалну дистрибуцију, спровешће се непараметарски тестови Kruskal-Wallis-ов и Mann-Whitney-ев тест. Кофициент корелације ће се одредити из регресионе или кореалационе анализе.

Резултати ће се приказати табеларно, графички и дијаграмом 3D *pie*.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Очекивани резултати, који су у складу са задатим циљевима:

- Показаће да у етарским уљима доминирају терпени, док су у екстрактима главни конституенси феноли и флавоноиди, те да постоји разлика у квалитативном и квантитативном саставу етарских уља и екстраката различитих *Pinus* врста.

- Показаће да су испитиване врсте потентни антиоксидативни агенси.
- Студија ће указати на значајну *in vitro* антимикуробну активност испитиваних етарских уља, те синергистички антимикуробни ефекат са гентамицом.
- Изолати биљних сировина врсте рода *Pinus*, које испоље најбољу биолошку активност, показаће значајне активности, антимикуробну активност против *Cutibacterium acnes (in vitro)* и антиинфламаторну активност (*in vivo*).
- Етарско уље инкапсулирано у липосоме показаће повећану ефикасност у биолошким активностима. Липосомске дисперзије, код којих је инкапсулирано етарско уље, а у спољашњој фази је екстракт, због синергизма испољаваће бољу биолошку активност.
- Липосомска дисперзија формулисана са биљним изолатима биће стабилна и безбедна за дермалну примену.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

У доступној литератури не постоје студије које на овај начин евалуирају антимикуробну и антиинфламаторну активност предложених врста у новим фармацеутским носачима попут липосома. Значај испитивања огледа се и у новим сазнањима о хемијском саставу, антиоксидативним, антимикуробним ефектима биљних изолата врста *Pinus sp.* са територије Босне и Херцеговине, са посебним акцентом на недовољно истражене зелене шишарице, чиме ће се употпунити сазнање о недовољно истраженим природним ресурсима овог подручја. Утврдиће се да ли биљни изолати *per se* или инкорпорирани у липосоме имају потенцијал за примену на кожи.

На основу резултата биолошке активности и безбедности примене, утврдиће се да ли етарска уља и екстракти ових биљних врста, као и липосомске дисперзије, имају биопотенцијал за примену у фармацеутској и козметичкој индустрији.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Фармацеутски факултет Универзитета у Београду уписала 2002. године, на одсеку дипломирани фармацеут-медицински биохемичар, а исти завршила 2009. године са просечном оценом 9,06. Школске 2008/2009 године уписала други смер-дипломирани фармацеут, на Фармацеутском факултету у Београду, на коме је дипломирала 2012. године са просечном оценом 8,77.

У периоду од 2009-2017. године радила на Фармацеутском факултету „Универзитета Бијељина“ у Бијељини, као асистент на предмету Фармакогнозија. Од 2017. године запослена у ЈЗУ Болници „Свети Врачеви“ у Бијељини, у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику. Почетком фебруара 2023. године завршила специјализацију из медицинске биохемије на Медицинском факултету у Фочи, Универзитет у Источном Сарајеву.

Студент је треће године докторских студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Као први аутор, др Сњежана Мирковић је објавила два рада у целини у часопису категорије M22 и M23, и три рада у којима је један од аутора категорије M21 и M23 који се публикују на једном од водећих страних језика, чиме је испунила услов за пријаву теме докторске дисертације:

1. S. Mirković, S. Janković, J. Džudović, V. Gužvić. Development and Validation of the Questionnaire for the Evaluation of Knowledge about Herbal Preparations (QEK-HP). *Acta facultatis medicae Naissensis* 2017, 34(2):107-118.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже др Ана Жугић, виши научни сарадник Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“.

Др Ана Жугић испуњава све услове за ментора докторске дисертације у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским студијама.

Др Ана Жугић поседује стручне и научне квалификације у складу са предметом истраживања и планираним методолошким приступом.

За коментора се предлаже др Вања Тадић, научни саветник. Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“.

Др Вања Тадић испуњава све услове за ментора докторске дисертације у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским студијама.

Др Вања Тадић поседује стручне и научне квалификације у складу са предметом истраживања и планираним методолошким приступом.

3.1. Компетентност ментора

Tadić V, Nešić I, Martinović M, Roj E, Brašanac-Vukanović S, Masimović S, Žugić A. Old plant, new possibilities: wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) in topical skin preparation. *Antioxidants* 2021;10(3):465.

Martinović, M., Krgović, N., Nešić, I., Žugić, A., Tadić, M.V. Conventional vs. Green Extraction Using Natural Deep Eutectic Solvents—Differences in the Composition of Soluble Unbound Phenolic Compounds and Antioxidant Activity. *Antioxidants* 2022, 11, 2295.

Stolić-Jovanović A., Martinović M., Žugić A., Nešić I., Tosti T., Blagojević S., Tadić M.V. Derivatives of L-ascorbic acid in emulgel: development and comprehensive evaluation of the topical delivery system. *Pharmaceutics* 2023, 15, 813.

Tadić V, Žugić A, Martinović M, Stanković M, Maksimović S, Frank A, Nešić I. Enhanced skin performance of emulgel vs. cream as systems for topical delivery of herbal actives

(immortelle extract and hemp oil), *Pharmaceutics* 2021;13(11):1919.

Stojiljković D, Nešić I, Tadić V, Najman S, Stojanović S. Standardized wild apple fruit extract as a bioactive agent in dermocosmetic products for efficacy skin hydration—In vitro and in vivo evaluation, *J Cosmet Dermatol* 2022; 00:1-8.

Vanja Tadić, Ana Žugić, Sofija Đorđević, Irena Žižović, Irena Homšek, Dušan Mišić, Ivana Nešić. The RP-HPLC method for analysis of usnic acid as potential marker of herbal drugs-based formulations containing *Usnea barbata*, *J. Serb. Chem. Soc.* 2022; 87: (0) 1–11.

4. Научна област дисертације

Фармација, Медицина

4.1. Научна област чланова Комисије

- **др Марина Томовић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник;
- **др Ивана Нешић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармацеутска технологија и биотехнологија, члан;
- **др Марина Миленковић**, редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија са имунологијом и имунохемијом, члан.

Сви предложени чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Сњежане Мирковић имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

Закључак и предлог Комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно истраживачког рада кандидата, Сњежане Мирковић, Комисија закључује да кандидат испуњава услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Сњежане Мирковић под називом: „ Одабране врсте рода *Pinus sp.*: истраживање хемијског профила, биолошких активности и потенцијала за примену на кожи“ и одобри њену израду.

Чланови комисије:

1. др **Марина Томовић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник;



2. др **Ивана Нешић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Фармацеутска технологија и биотехнологија, члан.



3. др **Марина Миленковић**, редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија са имунологијом и имунохемијом, члан;


