

**ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

1. Одлука Наставно – научног већа Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 24.09.2014. године, одлуком 01-9299/3-24 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називо „ **Антимикробно дејство етарских уља неких врста фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae* на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду** “ кандидата Данијеле Пецарски, у следећем саставу:

- 1. проф. др Зорица Кнежевић Југовић**, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Биохемиско инжењерство и технологије, председник;
- 2. проф. др Сузана Димитријевић**, ванредни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Биохемиско инжењерство и технологије, члан;
- 3. проф. др Мирјана Варјачић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Данијеле Пецарски и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата Данијеле Пецарски под називом „**Антимикробно дејство етарских уља неких врста фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae* на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду**“, урађена под менторством проф. др Слободана Јанковића, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармација, представља оригиналну студију код нас која се бави испитивањем хемијског састава и антимикробног дејства етарских уља фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae* и прву студију код

нас која се бави формулисањем и испитивањем хитозанских честица са инкапсулираним етарским уљем тиммијана.

Ова студија представља оригинално истраживање из области фитохемије, битехнологије и фитофармакологије базирано на веома значајној и интересантној проблематици везаној за примену етарских уља самостално или инкапсулираних у хитозанске честице у савременој антимикубној терапији гениталних инфекција, која су до сада била коришћена углавном у традиционалној медицини за третирање бактеријских и гљивичних инфекција.

Појава резистентности микроорганизама на постојеће антибиотике повећава потребу за проналаском нових терапевтских агенаса са антимикубним деловањем у гинекологији. Последњих година у свету се запажа пораст присуства бактеријских вагиноза као и све чешће присуство резистенције микроорганизама на примену вагиналета које у свом саству садрже метронидазол и клиндамицин (свтски протоколи у третману бактеријских вагиноза.) Ипак резултати лечења пацијената са овом хроничном инфекцијом вагине нису увек успешни, стога се последњих година прибегава и примена етарских уља која су показала снажно антибактеријско дејство.

Посебно место имају етарска уља ароматичних биљака, где спадају биљке фамилије *Ariaceae* (ким, коријандер, морач) и фамилије *Lamiaceae* (жалфија, оригано и тиммијан). Употреба етарских уља у антимикубној терапији је нарочито инетерсантна јер не постоји доказана резистенција микроорганизама на етарска уља управо због великог броја различитих једињења у њиховом саставу која и појединачно испољавају снажно антимикубно деловање, али је изразита специфичност њихових синергистичких ефеката који у ствари и спречавају настанак отпорности. За разлику од конвенционалних антимикубних лекова који имају бројне механизма антимикубног дејства, етарска уља због свога липофилног карактера делују углавном на нивоу ћелијске мембране бактеријске ћелије. Доказано је антиоксидантно и антибактеријско дејство које има око 100 испарљивих састојака етарских уља фамилије *Lamiaceae*. Наведена дејства су веома важна за регулисање оксидо-редукционог потенцијала и нормалне бактеријске флоре, који су главни предуслов за постизање нормалне вагиналне флоре жене у било којој доби живота. Међутим, биоактивне компоненте етарских уља су нестабилна и лако исприва једињења, која под утицајем спољних фактора лако могу да промене хемијску структуру, а тиме и фармаколошко дејство, па се велика пажња усмерава развоју инкапсулационих техника које омогућавају задржавање биолошке активности датог етарског уља, као и његово контролисано ослобађање при достизању циљног ткива.

Специфичност и значај ове докторске дисертације се огледа у укупном сагледавању хемијског састава и утврђивању антибактеријског дејства етарских уља кима, коријандера, морача, жалфије, тиммијана, оригана и еукалиптуса на стандардизованим културама бактерија: Грам-позитивне: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 29212, Грам-негативне: *E. coli* ATCC 25922, ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, Гљивицама: *Candida albicans* ATCC 10231, најчешћим узрочницима вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду. Обзиром да се ради о терапији вагиналних инфекција неопходно је било одредити и антимикубну активност испитаних етарских уља на *lactobacillus* врсте, нормлно присутних и неопходних за одржавање нормалне вагиналне микрофлоре.

Област од посебног истраживачког интереса у овој студији је формулисање и испитивање хитозанских честица са инкапсулираним етарским уљем тиммијана (које је

у претходном истраживању показало најјаче антимикубно дејство), као и утицај варијабилна (концентрација етарског уља, концентрација умреживача глутаралдехида) на облик и величину честица које ће бити од пресудног значаја за избор фармацеутског облика као носача за ове честице. Посебно је интересантно да у досадашним истраживањима не постоје резултати испитивања инкапсулације етарских уља у хитозанске честице. Инкапсулација супстанци у хитозанске честице је углавном примењивана за хидросолубилне супстанце какви су ензими, биљни екстракти и разне врсте хидросолубилних лекова. Међутим, због своје изразите мукоадхезивности, биоразградивости, нетоксичности и антимикубног дејства, овај природни полимер представља идеалан носач за етарска уља и њихову примену у антимикубној терапији . Доказана је и значајна антимикубна активност хитозанских честица са етарским уљем што потврђује нашу претпоставку да би овакав препарат био идеалан у профилактичке сврхе у терапији вагиналних инфекција.

Формулацијом хитозанских честица и испитивањем кинетике отпуштања етарског уља тимијана из ових честица у прописаној концентрацији (MIC) у одређеном временском периоду, створени су услови за примену оваквих препарата како у превентивне сврхе за одржавање нормалне микрофлоре жене у репродуктивном периоду, тако и за третирање бактеријских вагиноза као допунска терапија.

Истраживање је засновано на савременим научним сазнањима и најактуелнијим трендовима у биотехнологији и фитофармакологији, методолошки је добро постављено и адекватно спроведено, а проистекли резултати ће свакако омогућити рационалну и оправдану примену како испитаних етарских уља , тако и дизајнираног *Drug Delivery System-a* са етарским уљем тимијана у савременој фармакотерапији, пре свега у профилакси али и у терапији вагиналних инфекција .

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „PubMed“, „Medline“, „KoBSON“, „SCIndeks“ помоћу кључних речи „thyme essential oil“, „sage essential oil“, „oregano essential oil“, „coriander essential oil“, „fennel essential oil“, „caraway essential oil“, „eucalyptus essential oil“ „antimicrobial activity“, „bacterial vaginosis“, „drug delivery system“ „chitosan“ „encapsulation“ , не наилази се на студије сличног дизајна и методолошког приступа. Код нас не постоје публиковане студије које су испитивале антимикубно дејство наведених етарских уља фамилија *Apiaceae* и *Lamiaceae* и инкапсулацију етарског уља тимијана у хитозанске честице.

На основу тога Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Данијеле Пецарски, под називом „**Антимикубно дејство етарских уља неких врста фамилија *Apiaceae* и *Lamiaceae* на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду**“ представља резултат оригиналног научног рада на пољу испитивања хемијског састава и антимикубног дејства етарских уља кима, коријандера, морача, жалфије, оригана , тимијана и еукалиптуса, као и формулисања хитозанских честица са инкапсулираним етарским уљем које је у току испитивања показало најјачи антимикубни ефекат (тимијан).

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Пецарски Данијела, рођена је 1973. год. у Чачку. Завршила је Фармацеутски факултет у Београду, и специјализирала фармацеутску технологију, са темеом „Формулисање и испитивање гела за очи са декспантенолом“, на ВМА у Београду. Написала је више научних радова (приложени су неки од њих).

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Научни радови објављени у целини у часописима :

1. **Pecarski D**, Knežević Jugović Z, Dimitrijević Branković S, Mihajilovski K, Janković S. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan microparticles with thyme essential oil. *Hemijaska industrija*. 2014, 48-48. On Line-First. M-23
2. **Pecarski Danijela**, Zorica Knežević Jugović, Suzana Dimitrijević Branković, Katarina Mihajilovski, Slobodan Janković. Comparative analysis of chemical composition and antimicrobial activities of some of Lamiaceae family species and eucalyptus (*Eucalyptus globules M*). *Acta Periodica Technologica* .2014; vol 45: *In press* . M-51
3. **Pecarski D**, Bogavac M, Karaman M, Božin B, Jugović Z. Chemical structure and antibacterial activity of the essential oil type *Carum carvi L*. *Bulgarian Journal of Ecological Science, Ecology and future*. 2011; 10(1-2): 39-46. Часопис међународног карактера, без посебне категорије.

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду остали су у највећој мери идентични. Примењена методологија истраживања идентична је са одобреном.

Докторска дисертација спец. фарм. Данијеле Пецарски „**Антимикробно дејство етарских уља неких врста фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae* на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду**“ садржи следећа поглавља: Увод, Циљ рада, Хипотеза, Општи део, Материјали, Методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Рад садржи 26 табеларних приказа и 50 слика, а у поглављу Литература адекватно је цитирано 449 референци из савремене домаће и светске литературе.

У уводном делу и теоретском разматрању, кандидат је позивајући се на валидне литературне податке јасно и прецизно изложио актуелне проблеме везане за појаву резистенције на конвенционалну антибиотску терапију вагиналних инфекција, као и значајна научна сазнања и резултате примене преапарата на бази *Drug Delivery Systema* са аспекта вагиналне примене лека. У студији је теоријски објашњен механизам антимикробног деловања конвенционалних антибиотика и етарских уља који се користе у лечењу вагиналних инфекција, али и механизми резистенције истих. Приказане су фармаколошке особине и хемијска карактеризација етарских уља

фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae*, њихова употреба у народној традиционалној медицини, као и бројне студије које су доказале фармаколошка својства, пре свега антибактериско дејство, ових етарских уља. Поред тога приказана је и примена *Drug Delivery Systema* у савременој фармакотерапији са аспекта вагиналних препарата, као и употреба система испоруке лека на бази микро / нано хитозанских честица као ефикасног носача за разне биолошки активне супстанце .

У другом поглављу докторске дисертације, јасно су изложени циљеви истраживања и конкретни задаци : да се испита антимикубно деловање етарских уља кима, коријандера, морача, жалфије, оригана, тимијана и еукалиптуса на културе индикаторских патогених сојева микроорганизама најчешћих узрочника урогениталних инфекција; да се утврди минимална инхибиторна (MIC) и минимална бактерицидна концентрација (MBC) етарских уља *in vitro*; да се испита *in vitro* бактерицидно и фунгицидно деловање етарских уља у односу на конвенционалне антибиотике и антимикуботике који се користе у лечењу бактеријских и гљивичних инфекција спољних гениталија жене; да се формулише мукоадхезивни *Drug Delivery System* (хитозанске честице са етарским уљем тимијана) који ће контролисаним отпуштањем етарског уља из раствора за испирање вагиналне слузнице обезбедити антимикубно и антифунгицидно деловање у предвиђеном периоду.

Постављене су следеће хипотезе истраживања: етарска уља кима, коријандера, морача, жалфије, оригана, тимијана и еукалиптуса инхибирају раст испитаних бактерија и гљивица изазивача вулво-вагиналних инфекција; MIC и MBC испитиваних етарских уља су упоредиви са MIC и MBC комерцијалних антибиотика; мукоадхезивни *Drug Delivery System* -хитозанске честице са етарским уљем тимијана, ће отпустити етарско уље тимијана у предвиђеном периоду, и овако формулисан раствор за испирање вагиналне слузнице ће обезбедити антимикубно и антифунгицидно деловање.

Материјал и методологија подударни су са наведеним у пријави докторске дисертације и презентовани су на одговарајући начин. За потребе ове докторске дисертације коришћена су комерцијална етарска уља произвођача *Sanoflore* , Француска и *La Florina*, Немачка. За испитивање *in vitro* антимикубне активности етарских уља, коришћене су каталожке културе индикаторских патогених сојева микроорганизама (ATCC - American Type Culture Collection) које се најчешће користе за испитивање ефикасности антимикубних супстанци, а потенцијални су колонизатори урогениталног тракта: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Esherichia coli* ATCC 25922; *Candida albicans* ATCC 24433; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Из групе бактерија млечне киселине, одабрани су сојеви врста које могу насељавати урогенитални тракт, па је са тог аспекта, утицај испитиваних етарских уља на ове бактерије био од интереса за даљи рад: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* LGG, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*.

У овом раду све методе можемо поделити на: Хемијска анализа етарских уља; Микробиолошка испитивања етарских уља и хитозанских честица; Методе израде хитозанских честица са етарским уљем тимијана.

Детаљно је презентована метода одређивања хемијског састава етарских уља - Гасна хроматографија са масеном спектрометријом (GC-MS). Идентификација компоненти базирана је на израчунатим ретенционим индексима (RI) и масеним спектрима упоређиваним са стандардним супстанцама и/или са NIS/NBS Wiley библиотеком масених спектра, као и са литературним подацима или са подацима слободне базе података (<http://www.flavornet.org/iowtv.pherobase.com>).

Микробиолошка испитивања се заснивају на одређивању антимикробне активности појединачних етарских уља, *in vitro*, како би се извршила селекција најпогоднијег етарског уља које ће бити инкапсулирано у хитозанске честице. Из тог разлога, ова испитивања су подељена у две групе. Прву групу су чинила испитивања антимикробног дејства наведених врста етарских уља, стандардним микробиолошким методама – методом дифузије на агарној подлози и бујон дилуционом методом одређивања минималне инхибиторне концентрације (МИС). Друга група испитивања је базирана на одређивању антимикробне активности селекционисаног етарског уља након инкапсулације у хитозанске честице, која има за циљ заштиту испарљивог и фотосензитивног етарског уља и продужење његовог дејства у условима контролисаног отпуштања. *In vitro* антимикробна дејства етарских уља, су квалитативно и квантитативно испитана одређивањем ширине зоне инхибиције, као и одређивањем МИС вредности за свако уље. Узевши у обзир чињеницу да формулишемо вагиналне препарате за третирање бактеријских вагиноза, испитали смо и потенцијално синергистичко дејство етарских уља и сублеталне дозе млечне киселине. Резултати су изражени ширином зона инхибиције. Наредна фаза утврђивања антимикробне активности је обухватала одређивање МИС и МВС вредности етарских уља еукалптуса, жалфије, оригана и тимијана на одабране бактерије и праћење кинетике антимикробног дејства ових уља у току 24 часа, које може бити веома корисно за одређивање фармакокинетике оваквих препарата у неким наредним истраживањима.

Хитозанске микрочестице са инкапсулираним етарским уљем тимијана добијене су емулгационим поступком уз додаток умреживача глутаралдехида (у количини од 2 % у односу на укупну запремину уљане и водене фазе). Рађене су две серије честица: у првој серији варирана је концентрација етарског уља тимијана (3 μ l/ml, 6 μ l/ml, 12 μ l/ml, 15 μ l/ml), у другој серији варирана је концентрација умреживача глутаралдехида (2%, 3%, 5%, 8%). У свакој серији честица прављено је по четири врсте честица, свака са различитом концентрацијом вариране супстанце, *cross-linking* методом, у циљу испитивања утицаја концентрације етарског уља и количине умреживача на степен инкапсулације тимијана у хитозанске честице, као и на величину хитозанских честица. Након центрифугирања емулзије која у себи садржи водену фазу (са хитозаном и емулгатором) и уљану фазу (са етарским уљем тимијана), у коју је додат умреживач (глутаралдехид), одвојен је супернатант, из кога се даље одређује количина тимијана која се није уградила у микрочестице. Запремина супернатанта се измери, и касније се ова вредност користити у прорачуну. У талогу након центрифугирања се налазе честице, које се даље испирају, према детаљно описаном поступку испирања.

Израђене хитозанске честице се из кивета центрифуге, пресипају након одвајања супернатанта, а затим се врши њихово испирање на вакуум пумпи. Запремина издвојеног испирка се измери, а затим се измери маса овако испраних честица на аналитичкој ваги. Део честица се користи за микроскопско мерење и сликање, а део за проучавање кинетике отпуштања биоактивне супстанце, етарског уља тимијана. Микрочестице за сликање се чувају у ацетатном пуферу рН 4,6 у нормалном суду.

Кинетика отпуштања полифенола из микрочестица у околни медијум је праћена преко промене концентрације укупних полифенола, у току времена - *Folin-Ciocalteu* (FC) методом која је најпоузданија метода за одређивање укупних полифенола и мерењем апсорбанци различито обојених комплекса за израду баждарене криве. Баждарна крива је нацртана на основу измерених средњих вредности апсорбанци и одговарајућих концентрација тимијана.

Ефикасност инкапсулације тимијана ($EE\%$) се рачуна као количина тимијана (полифенола) инкапсулираног у микрочестице (m_B), подељено са количином укупног тимијана (укупних полифенола) потрошених за припрему микрочестица (m), као што је приказано у једначини :

$$EE\% = \frac{m_e}{m}$$

На основу добијених резултата апсорбанце супернатанта и на основу једначине баждарне криве, прерачунава се концентрација отпуштеног тимијана у супернатанту (у $\mu\text{l/ml}$) на следећи начин:

$$C_s \text{ (отпуштеног тимијана у супернатанту)} = A/0,7866$$

Овако добијене концентрације тимијана у супернатанту (C_s , $\mu\text{L/ml}$) треба помножити са запремином супернатанта, да би се добила запремина отпуштеног тимијана пре испирања микрочестица:

$$Q_s = C_s * V_s$$

Q_s - количина отпуштеног тимијана у супернатанту; C_s -концентрација отпуштеног тимијана у супернатанту; V_s –запремина супернатанта

Затим се израчунава степен инкапсулације тимијана ($EE\%$) у хитозанским микрочестицама. Од почетне концентрације тимијана одузима се количина отпуштеног тимијана (количина у супернатанту), и дели са почетном концентрацијом тимијана:

$$EE\% = [Q_i - Q_s / Q_i] * 100$$

Q_i -иницијална количина етарског уља тимијана; Q_s – количина отпуштеног тимијана у супернатанту .

Степен инкапсулације у процентима EE (%) добијамо када ову вредност помножимо са 100.

Концентрацију тимијана у испирку (C_{ro}), добијамо на основу средње вредности апсорбанце испирка (A_{av}) и нагиба стандардне праве.

$$C_{ro} \text{ (отпуштеног тимијана током испирања)} = A_{av} / N_{agib}$$

Количина отпуштеног тимијана приликом испирања честица се израчунава као производ отпуштеног тимијана у току испирања и запремине испирка:

$$Q_{ro} = C_{ro} * V_{ro}$$

Q_{ro} - количина отпуштеног тимијана приликом испирања честица; C_{ro} -концентрација отпуштеног тимијана приликом испирања честица ; V_{ro} –запремина испирка

Количина преосталог тимијана у честицама (инкапсулираног тимијана) се израчунава:

$$Q_e = Q_i - [Q_s + Q_{ro}]$$

Q_e -количина инкапсулираног уља тимијана ; Q_i - почетна количина тимијана ; Q_s -количина исцурелог тимијана у супернатанту; Q_{ro} – количина исцурелог тимијана приликом испирања честица

Поступак прорачуна степена инкапсулације за честице код којих је варирана количина глутаралдехида [2%, 3%, 5%, 8%] се прорачунава као и у претходном случају.

Након прописане израде, и одређивања степена инкапсулације тимијана, микрочестице се сликају и мери се њихова величина. За сликање је коришћен електронски микроскоп (Carl Zeiss GmbH Modcenterstraße 16 A-1034 Wien PF 14). Суспензија микрочестица се пажљиво ставља на сахатно стакло, а затим под објектив увеличања 200 пута, да би се усликао испитивани узорак. За сликање смо користили програм Axi Vision 4.6.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани са 17 табела и 37 слика. У поглављу Дискусија детаљно су објашњени резултати истраживања и упоређени са литературним подацима других аутора из ове области. Дата су и могућа објашњења добијених резултата у светлу познатих чињеница које се односе на испитивану проблематику. Коментари резултата су језгровити, а начин приказивања чини их прегледним и разумљивим.

Хемијском анализом испитаних етарских уља установљено је да она преваходно садрже терпене, међу којима убедљиво доминирају монотерпенска једињења у односу на сесквитерпене. На основу наших резултата, може се закључити да се код већине проучених етарских уља рода *Lamiaceae* као доминантне компоненте јављају: карвакрол, тимол, р-цимен, γ -terpinene, линалол, α -pinene, еукалиптол, камфор. Према многим литературним подацима, компоненте етарских уља које углавном доприносе њиховом антимикуробном ефекту су тимол и карвакрол. Најбољу антибактеријску активност су показала етарска уља биљних врста са највећим садржајем тимола и карвакрола: *тимијан* (36,12% -тимол и 2,34%- карвакрол) и *оригано* (5,69%- тимолол и 59,63% -карвакрол). Уље прве врсте је деловало нешто боље у односу на другу, што је у складу са подацима о већој активности тимола у односу на карвакрол . Иако су у уљима жалфије и еукалиптуса заступљене обе компоненте (тимол и карвакрол), оно делује слабије од уља поменутих врста, што наводи на закључак да на антимикуробну активност утиче и количина одређене компоненте присутне у уљу, али и њихово синергистичко деловање.

Применом диск дифузионе методе, сва испитана етарска уља, осим морача, су показала антимикуробну активност против тестираних микроорганизама, чија се јачина огледа у ширини зоне инхибиције. Међу Грам-позитивним бактеријама, већу осетљивост је показала *S. aureus* (0,1-12mm) у односу на *E. faecalis* (2-8 mm), који је неосетљив на деловање етарских уља кима, коријандера и морача. Нешто слабију осетљивост је показала Грам-негативна бактерија *E. coli* ATCC 25922 (1-8 mm) која је такође неосетљива на дејство коријандера и морача. Ниска осетљивост грам-негативних бактерија на етарска уља може бити последица грађе њиховог ћелијског зида који поседује додатну спољашњу мембрану око пептидогликанског слоја, што смањује дифузију хидрофобних компоненти кроз њихов липополисахаридни омотач. Поред тога, вршено је и испитивање комбинације етарских уља и млечне киселине, која и сама има антимикуробно дејство, а због своје рН вредности била би погодна да синергистички делују антибактеријски на испитиване бактерије. На основу резултата мерења зона инхибиције, види се повећана антимикуробна активност етарског уља, у првом реду тимијана , у комбинацији са млечном киселином, и то посебно када је у питању антимикуотичко деловање на *C.albicans* , што би могло бити тема неких будућих формулација и испитивања. Сва тестирана етарска уља, осим етарских уља коријандера и морача, показују антимикуотичку активност према *C.albicans*.

Испитана етарска уља су показала различите јачине антибактеријског деловања, а опадајући редослед је следећи: тимијан > оригано > жалфија > еукалиптус > ким > коријандер > морач. На основу ових вредности смо се определили да за даљу анализу, одређивање МИС вредности, изаберемо прва четири етарска уља која имају најјаче антибактеријско дејство.

Одређивањем величина зона инхибиције стандардних антибиотика, уочено је знатно јаче антимицотичко дејство нистатина (30µl/ml) у односу на испитивана етарска уља (20µl/ml). Међутим, етарска уља фамилије *Lamiaceae* (оригано, тимијан, жалфија), су показала знатно јаче антимицробно дејство од стандардних дискова клиндамицина (30µl/ml).

Испитивањем осетљивости лактобацила на тестирана етарска уља, посебно оригана и тимијана показало се да су зоне инхибиције за оригано и тимијан шире у односу на патогене сојеве *S. aureus* и *E. coli*. Међутим, *Lactobacillus acidophilus*, за разлику од осталих *Lactobacillus* врста, показује слабију осетљивост на етарска уља оригана и тимијана, јер су уочене зоне дифузне, што значи да бактерија расте у мањем броју. Могло би се рећи да етарска уља оригана и тимијана делују бактериостатски (смањују раст), а не бактерицидно (не дозвољавају раст) соја *Lactobacillus acidophilus*. Ово је веома значајно са аспекта израде вагиналних препарата на бази ових етарских уља, јер на тај начин употреба оваквих препарата неће реметити нормалну вагиналну флору.

Упоредивањем резултата испитивања антимицробног дејства хитозанских честица са различитим концентрацијама етарског уља, као и самог хитозана запажа се да је антимицробна активност хитозанских честица зависна од концентрације етарског уља тимијана у њима, иако се види да и сам хитозан има антимицробно дејство, о чему говоре и бројна истраживања.

Резултати испитивања степена инкапсулације етарског уља тимијана у односу на варијабиле (концентрација етарског уља тимијана и концентрација глутаралдехида) показују да се повећањем почетне концентрације тимијана повећава и степен инкапсулације биоактивне компоненте у хитозанске микрочестице, док концентрација глутаралдехида не утиче на степен инкапсулације.

На основу резултата мерења величине пречника појединачних честица у узорку електронским микроскопом можемо закључити да се пречници микрочестица, односно величина микрочестица повећава са повећањем концентрације тимијана, а смањује са повећањем концентрације глутералдехида.

Статистичка обрада података је радјена у Оригин 8.0, коришћена је One-way ANOVA, а за поређење средњих вредности Туркеу тест са нивоом значајности 0.01. ANOVA тестом утврђено је да нема значајне разлике у величини честица за GA 2% и 3% као ни у величини честица за GA 5% и 8%. Значајне разлике у величини честица (на нивоу 0.01) су за GA 2% у односу на 5% и 8%, односно у величини честица за GA 3% у односу на 5% и 8%.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата спец. фарм. Данијеле Пецарски под називом „Антимицробно дејство етарских уља неких врста фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae* на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у

репродуктивном периоду“, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Хемијском анализом етарских уља применом гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC-MS) установљено је да тестирана етарска уља превасходно садрже терпене, међу којима убедљиво доминирају монотерпенска једињења у односу на сесквитерпене. Доказано је пристство 107 различитих терпенских компонената: 17 монотерпенских угљоводоника, 5 ароматичних монотерпена, 41 оксидовани монотерпен, 2 фенилпропаноида, 3 сесквитерпенска угљоводоника, 12 моноцикличних сесквитерпена, 2 бициклична и 1 трициклични сесквитерпен.

2. Састав етарских уља се значајно квалитативно и квантитативно разликује што се објашњава чињеницом да је у оквиру тезе анализирано 7 различитих етарских уља, која припадају различитим фамилијама. Међутим, појединачне компоненте се значајно истичу у оквиру сваке врсте етарског уља па тако можемо закључити које су компоненте карактеристичне за одређену врсту.

- За етарско уље еукалиптуса може се уочити доминација компонената као што су оксидовани монотерпен еукалиптол (20,66%), угљоводонични монотерпени лимонен (30,96%) и α -*pinen* (12,21%) и ароматични монотерпен, *p-cimen*(22,25%).
- У етарском уљу кима доминирају монотерпени (94,08%), и то најдоминантнији су ароматични монотерпен *p-cimen* (25,60%), затим угљоводонични монотерпени α -*pinen* (13,25%), лимонен (29,85%) и угљоводонични монотерпен еукалиптол (16,98 %).
- У етарском уљу коријандера доминирају монотерпени, и то ароматични монотерпени *p-cimen* (23,12%), оксидовани монотерпени еукалиптол (19,64%) и монотерпенски угљоводоници лимонен (31,10%) и α -*pinen* (11,96%).
- У етарском уљу морача доминира, ароматични монотерпен, фенилпропанског типа, транс-анетол (63,16%), и заузима више од половине уља. Остале доминантне компоненте су оксидовани монотерпен естрагол (6,43%) и монотерпенски угљоводоници *L-fenchon* (15,53%), лимонене (4,69%) и α -*pinen* (4,33%). Сесквитерпена има готово у траговима.
- У етарском уљу оригана више од половине укупног уља чини доминантно једињење- оксидовани монотерпен карвакрол (59,03%); знатно мање тимол (5,69%), а затим монотерпенски угљоводоници *p-cimen*(5,02%) и γ -*terpinen* (4,64 %).
- У етарском уља жалфије доминира оксидовани монотерпен α - *tujon* (29.9%), затим камфор (15.47) и β -*tujon* (13.68%), карвакрол (3.32), затим монотерпенски угљоводоници камфен (3.04%) и α -*pinen* (2.63%) ,а значајан је и садржај сесквитерпенског угљоводоника 1- α -борнил ацетата (2.23%).
- У етарском уљу тимијана више од половине укупног уља чини 6 доминантних једињења, где доминира оксидовани монотерпен тимол (36,12%), а затим

монотерпенски угљоводоник *p-cimen* (21,15%). Остале доминантне компоненте овог етарских уља су *γ-terpinen* (6.98%), линалол (5,90%), карвакрол (4,54 %) и еукалиптол (4,74%).

3. Сва испитивана етарска уља, осим етарског уља морача, су показала антибактеријску активност у агар диск дифузионом тесту против тестираних микроорганизама. Пет од седам тестирани етарских уља, осим уља коријандера и морача, показују антимикотичку активност према *C.albicans*. Индикаторски сојеви су такође показали осетљивост на антимикробне агенсе, клиндамицин и нистатин, али знатно мању од осетљивости на етарска уља тимијана, жалфије и оригана.

Испитана етарска уља су показала различите јачине антибактеријског деловања, а опадајући редослед је следећи: *тимијан* > *оригано* > *жалфија* > *еукалиптус* > *ким* > *коријандер* > *морач*.

4. Уочено је синергистичко дејство етарских уља и млечне киселине, одређивањем антимикробне активности комбинације етарских уља и млечне киселине. Мерењем и упоређивањем зона инхибиције, види се повећана антимикробна активност етарског уља, у првом реду тимијана, у комбинацији са млечном киселином, и то посебно када је у питању антимикотичко деловање на *C.albicans*, што би могло бити тема неких будућих формулација и испитивања. Ово је веома значајно ако узмемо у обзир чињеницу да млечна киселина може послужити као алтернативно средство у регулисању киселе рН вредности вагине, као и да се препарати са млечном киселином препоручују како за лечење, тако и за профилаксу бактеријске вагинозе.

5. Сва испитана етарска уља, осим тимијана, имају бакетриостатско дејство према тестираним патогеним микроорганизмима. Етарско уље тимијана има бактерицидно дејство према референтном соју *S.aureus* који је коришћен у раду. Од Грам-позитивних бактерија, већу осетљивост је показала *S. aureus* (0,1-12mm) у односу на *E. faecalis* (2-8 mm), који је неосетљив на деловање етарских уља кима, коријандера и коморача. Нешто слабију осетљивост је показала Грам-негативна бактерија *E. coli* (1-8 mm) која је такође неосетљива на дејство коријандера и морача. Сва тестираа етарска уља, осим етарских уља коријандера и морача, показују антимикотичку активност према *C.albicans*.

6. *Lactobacillus* врсте показују значајну осетљивост према антимикробном дејству испитаних етарских уља, посебно уља тимијана и оригана. Међутим, *Lactobacillus acidophilus*, за разлику од осталих *Lactobacillus* врста, показује слабију осетљивост на ова етарска уља, јер су уочене зоне дифузне, што значи да бактерија расте у мањем броју. На основу овога могло би се закључити да етарска уља оригана и тимијана делују бакетриостатски (смањују раст), а не бактерицидно (не дозвољавају раст) на *Lactobacillus acidophilus* који је доминантан у нормалној вагиналној флори, што нам даје позитиван став за употребу ових етарских уља као антибактеријских агенаса за вагиналну примену.

7. Хитозанске честице са инкапсулираним етарским уљем тимијана, као и сам хитозан, показују значајну антимикробну активност на све испитане сојеве микроорганизама. Антимикробна активност хитозанских честица сразмерна је концентрацији етарског уља тимијана у њима.

8. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (МИС) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *E.coli* утврђено је:

MIC вредност за етарска уља жалфије и еукалиптуса је 100 $\mu\text{l/ml}$ (показују антимикробну активност при концентрацијама већим од 50 $\mu\text{l/ml}$, али потпуну инхибицију раста при концентрацији од 100 $\mu\text{l/ml}$). Примећује се већа антимикробна активност жалфије у односу на еукалиптус.

MIC вредност за етарска уља оригана и тимијана је 5 $\mu\text{l/ml}$. Нема значајније међусобне разлике у антимикробном деловању ова два уља на *E. coli*.

9. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *S.aureus* утврђено је:

MIC вредности етарских уља жалфије и еукалиптуса износе 50 $\mu\text{l/ml}$ за етарско уље жалфије и 100 $\mu\text{l/ml}$ за етарско уље еукалиптуса, при чему се може уочити знатна инхибиција раста *S. aureus* овим етарским уљима у концентрацијама већим од 30 $\mu\text{l/ml}$.

MIC вредности за тимијан и оригано износе 3 $\mu\text{l/ml}$.

10. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *E.faecalis* утврђено је:

Смањење броја ћелија *E. faecalis* се уочава тек при концентрацијама етарских уља жалфије и еукалиптуса од 50 $\mu\text{l/ml}$, а концентрација од 100 $\mu\text{l/ml}$ није довољна за потпуну инхибицију раста ове бактерије.

MIC вредности за тимијан и оригано износе 1 $\mu\text{l/ml}$.

11. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *C.albicans* утврђено је:

MIC вредност етарског уља жалфије за *C.albicans* је нешто виша од 100 $\mu\text{l/ml}$. *C.albicans* показује мању осетљивост на деловање етарског уља еукалиптуса које при коришћеним концентрацијама не доводи до потпуне инхибиције раста ове патогене гљивице.

Етарско уље тимијана и оригана показују слабије антимикробно дејство према патогеној гљивици *C.albicans* у примењеним концентрацијама. Нешто бољи ефекат показује уље тимијана које смањује раст ћелија *C.albicans* за 50% у концентрацији од 10 $\mu\text{l/ml}$ (MIC₅₀ вредност).

12. Израчунавањем степена инкапсулације етарског уља тимијана, варирањем концентрације етарског уља тимијана, као и концентрације глутаралдехида, као умреживача непоходног за стварање честица, закључујемо:

- повећањем почетне концентрације тимијана повећава се и степен инкапсулације биоактивне компоненте у хитозанске микрочестице
- концентрација глутаралдехида не утиче на степен инкапсулације

13. Праћењем кинетике отпуштања полифенола из микрочестица у околни медијум преко промене концентрације укупних полифенола у току времена (ФС методом), и прерачунавањем параметара, установљено је да концентрација глутаралдехида не утиче на проценат отпуштања тимијана.

14. Одређивањем величине хитозанских микрочестица помоћу електронског микроскопа утврђено је да је средња вредност величине честица зависна од почетне

концентрације инкорпорираног етарског уља тимијана То значи да је величина хитозанских честица са етарским уљем тимијана директно пропорционална концентрацији уља тимијана, односно да се пречници микрочестица повећавају са повећањем концентрације тимијана.

15. Варирањем концентracије GA -глутаралдехида (2%, 3%, 5%, 8%) и одређивањем величине честица електронским микроскопом утврђено је да нема статистички значајне разлике у величини честица за GA 2% и 3 % као ни у величини честица за GA 5% и 8%. На основу овога можемо закључити да се величина хитозанских честица смањује са повећањем концентрације глутералдехида.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Резултати испитивања ове докторске дисертације јасно указују на значајну антимикуробну активност етарског уља тимијана и његове инкпсулације у најсавременије фармацеутске облике, тзв *Drug Delivery Systeme* који би контролисаним отпуштањем активне супстанце омогућили стално присуство антимикуробног агенса у току антимикуробне терапије. Активност хитозанских честица у киселој средини, широк антибактеријски спектар тимијана, као и бактериостатско дејство истог на лактобациле, указују на могућност израде и употребе вагиналних антимикуробних фитопрепарата у терапијске и профилактичке сврхе . Ови биолошки активни природни производи би били идеална замена за конвенционалне препарате, посебно ако узмемо у обзир све чешћу појаву резистенције на примењене антибиотике која постаје глобалан проблем. Модификације у структури самог хитозана, увођењем тиолних група како би се повећала мукоадхезивност самих честица, би могли бити предмет будућих истраживања у формулисању идеалног вагиналног антибактеријског фитопрепарата.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати испитивања етарских уља кима, коријандера, морача, жалфије, оригана, тимијана и еукалиптуса, као и формулисање и испитивање хитозанских честица са етарским уљем тимијана су публиковани у 3 часописа од међународног значаја, као и презентовани на једном међународном скупу, а планирано је да остали резултати овог истраживања буду публиковани као оригинално истраживање у часопису од међународног значаја, односно презентовани на научним и стручним скуповима у форми усмене или постер презентације.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену завршене докторске дисертације кандидата спец. фарм. Данијеле Пецарски под називом „**Антимикробно дејство етарских уља неких врста фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae* на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду.**“, оцењује да је истраживање у оквиру тезе утемељено на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација спец. фарм. Данијеле Пецарски, урађена под менторством проф. др Слободана Јанковића, представља оригинални научни допринос у потпунијем сагледавању антибактеријског дејства етарских уља фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae*, у првом реду етарског уља тимијана и могућности његове инкапсулације у најсавременије фармацеутске облике како би допринели успешној и рационалној фармакотерапији вагиналних инфекција.

Комисија са задовољством **предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Антимикробно дејство етарских уља неких врста фамилија *Ariaceae* и *Lamiaceae* на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду.“ кандидата спец. фарм. Данијеле Пецарски буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.**

У Крагујевцу, 10.10.2014. године

КОМИСИЈА:

.....
проф. др Зорица Кнежевић Југовић
редовни професор Технолошко-металуршког факултета
Универзитета у Београду, за ужу научну област
Биохемиско инжењерство и технологије

.....
проф. др Сузана Димитријевић Бранковић
ванредни професор Технолошко-металуршког факултета
Универзитета у Београду, за ужу научну област
Биохемиско инжењерство и технологије

.....
проф. др Мирјана Варјачић
редовни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област
Гинекологија