

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ**

ИЗБОРНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Оцена научне заснованости теме докторске дисертације

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-8423/3-3 од 2.12.2009. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата мр пх. ЗОРИЦЕ ПОТПАРЕ, под називом:

" Испитивање биолошке активности препарата пелоида са локалитета улцињске обале Јадранског мора "

На основу одлуке Изборног већа, предложена трочлана комисија у саставу:

1. проф. др Слободан Јанковић, председник, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу за уже научне области фармакологија са токсикологијом и клиничка фармација
2. проф. др Драган Миловановић, члан, ванредни професор Медицинског факултета у Крагујевцу за ужу научну област фармакологија и токсикологија
3. доц. др Милица Нинковић, члан, доцент Војномедицинске академије у Београду за ужу научну област клиничка физиологија

подноси Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

I. Биографски подаци

Кандидат мр пх. Зорица Потпара, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Медицинског факултета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

Лични подаци

Зорица Потпара је рођена 8.1.1963. год. у Никшићу, Црна Гора. Основну школу завршила је у Никшићу, као добитник дипломе „Луча“. Гимназију, смјер биохемија и молекуларна биологија завршила је у Београду 1981.године, као добитник дипломе „ Вук С. Караџић“. Фармацеутски факултет уписала је 1981.год. а завршила 1985 .године у Београду. Специјализацију из фармацеутске технологије на Фармацеутском факултету у Београду уписала је 1988.год. а завршила 1991.год. Докторске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу уписала је 2007.године, област Молекулска медицина, смер Експериментална и клиничка фармакологија.

Приправнички стаж обавила је у апотекарској установи у Београду. Током 1987.године по завршетку приправничког стажа прелази у Подгорицу где ради у апотеци „Подгорица“ у оквиру Апотекарске Установе Црна Гора, а посебно у галенској лабораторији. По завршетку специјализације годину дана је провела у Енглеској, где је учила енглески језик на Loughborough колеџу. Током 1997. године прелази у ИЦН Црна Гора на место руководиоца погона за израду Флонивина БС. Новостворени погон је био урађен по стандардима Добре произвођачке праксе, што се односило на све сегменте производње као и на дистрибуцију готовог производа. Осим организовања производње, радила је на припреми протокола производних серија и на припреми за сертификат Добре роизвођачке праксе.

Током 2001.године добија место директора производње чврстих облика у фабрици лијекова „Хабитфарм“ у Подгорици. Током 2003. године прелази на место руководиоца производње у фирми „Фонтис“ ДОО, која у свом саставу има веледрогерију, козметички салон и производњу дермокозметичких препарата за негу здраве и проблематичне коже. Активно учествује у припреми елабората за отварање Самосталног студијског програма фармације у Подгорици, који је и отворен 2007.год. Девог септембра 2009.год. положила је усмени докторски испит из Молекулске медицине са оценом 9 (девет). Сада ради и као сарадник на предмету фармацеутска технологија на Самосталном студијском програму фармације у Подгорици. Удата је и мајка троје деце. Користи се енглеским и руским језиком.

Научно-истраживачки рад и списак објављених радова

Радови публиковани у целини у домаћем научном часопису са рецензијом

1. **Зорица Р.Потпара**, Снежана М.Цупара, Нада Ђ. Марстијеповић, ДрагицаР. Бојовић. Медицински пелоид, Рационална терапија, 2009, Vol.I, No 2, стр.25-30/УДК 615.838.7. **М53 - 1 бод**

Радови публиковани у сажетку, са конгреса

1. **З. Потпара**, С.Вучуровић, И.Арсид, В.Тадић. Фитокосметика и балнеологија - могућност развоја нових производа за његу и заштиту коже . IX Дани лековитог биља, 2008, Космај. Зборник радова, **М64 – домаћи конгрес - 0.2 бода**
2. Н.Марстијеповић, Д.Ковачевић, **З.Потпара**. Comparison granulometric analysis sample illite-kaolinite clays on the microstructure of sintered product. XIV International Clay Conference – Italy 2009. Book of abstract, Vol. II **М34 - инострани конгрес - 0.5**
УКУПНО БОДОВА: 1.7

II Подаци о предложеној теми

Предложена тема је из области фармацеутске технологије и фармакологије, и третира актуелну, изузетно значајну проблематику у вези са проценом састава и биолошке активности препарата добијених од пелоида са улцињске обале Јадранског мора.

ПРЕДМЕТ РАДА

Последњих година велика пажња у медицини и фармацији посвећује се проучавању природних физичких и хемијских чинилаца спољне средине, односно

природних ресурса и њиховој примени у фармакотерапији. Захваљујући развоју савремених аналитичких метода могуће је утврдити квалитативни и квантитативни састав природних ресурса, као што су минерално блато – пелоид и лековито биље. Фармаколошким испитивањима утврђује се објективно терапијско дјеловање, а коришћењем нових техничко – технолошких поступака могу се формулисати савремени фармацеутски облици који примјењени као дермофармацеутски препарати испољавају веома повољно дејство на кожу.

Пелоиди су природни чиниоци који настају таложењем разграђених и распаднутих органских и неорганских материја под утицајем геохидролошких, биолошких, хемијских, климатских и других фактора. Назив пелоид потиче од грчке ријечи „пелос“, што значи муљ, блато. Минерално блато-пелоид користи се од давнина а његове лековите моћи и терапијске предности познате су хиљадама година уназад. Подаци о његовом коришћењу су пронађени на папирусима писаним пре 4000 година који показују да су Египћани користили пелоид код опекотина, гинеколошких болести, проблема са зглобовима.

Пелоидотерапија доказано даје повољне резултате у дегенеративним и инфламаторним реуматским обољењима, обољењима дигестивног тракта, а све је чешћа примена у дерматолошким обољењима и у козметици. Пелоиди дјелују термички, механички и према многим ауторима, хемијски.

Термички ефекат пелоида на организам огледа се у томе што доводи до локалне хиперемije ткива које је изложено топлотом пелоиду, убрзава циркулацију крви, појачава метаболичке процесе што доводи до смањења мишићних спазма и болова. При апликацији пелоида запажени су антимикробни, антивирусни, антинеопластични и антиинфламаторни ефекти. Аналгетски ефекат пелоида је последица деловања топлоте на нервне завршетке и одвођења медијатора бола – брадикинина при чему се смањује ткивна напетост.

Механички ефекат је нарочито изражен у пелоидним купкама и огледа се у дејству потиска који смањује тјелесну масу, тако да отпор пружа само пелоид и то у свим правцима подједнако. Механички притисак и потисак дјелују на дубоке крвне судове и лимфне судове, при чему доводе до промена у протоку крви и лимфе.

Хемијски ефекат пелоида још увијек није довољно испитан, али се сматра да он зависи од рН пелоида. Алкални пелоиди чине кожу пропустљивом за катјоне, а кисели за ањјоне. Из пелоидне суспензије кроз кожу продиру сумпор, сумпорводоник, нека једињења гвожђа, витамини Ц и Д. При додиру коже са пелоидом који садржи разне електролите, долази до промене електричног потенцијала коже и на томе се заснива апсорпциона моћ пелоида.

Детаљнија испитивања физичких својстава, хемијског састава и биолошког дјеловања пелоида почела су почетком прошлог века и трају до данашњих дана. Упоредна испитивања пелоида са локалитета улцињске обале вршена у Београду и Загребу осамдесетих година прошлог века, показала су да је пелоид изузетно доброг квалитета како по органолептичким својствима, тако и по повољном гранулометријском саставу и минеролошким карактеристикама. Без обзира на позитивне резултате пелоида и предлоге за интензивније коришћење у медицинске сврхе, до овог времена врло мало се урадило на реализацији тих идеја.

У литератури нема података о примени пелоида са улцињске обале ни у препарату за кожу ни о његовом дејству на одређене промене на кожи (као што су сува кожа, акнозна, наборана кожа). У том смислу ово истраживање ће донети нове научне информације и проширити наша сазнања о пелоидима.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Испитати минеролошки састав, физичко-хемијска својства, биолошка својства пелоида са улцињске обале Јадранског мора.

2. Формулисати препарат типа масти, урадити студију пре-после која би показала дејство препарата са пелоидом на различите стадијуме акнозне коже, при чему би користили валидну методу за градирање акни.
3. Формулисати препарат типа креме U/V, дефинисати фармацеутско-технолошки поступак израде, извршити процену подношљивости одабране формулације и њено фармаколошко дејство (антимикробно, епителизирајуће и регенеративно)

ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

1. Испитивање методама савременог биоинжењеринга коже (мерење рН површине коже, влажности, садржаја површинских липида, трансепидермалног губитка воде) креме са пелоидом, омогућава се карактеризација препарата за локалну примену са аспекта утицаја на наведене параметре коже.
2. Испитивани пелоид има повољан састав и садржај потенцијално леоковите супстанце.
3. Препарат који садржи пелоид показује антиинфламаторне, епителизирајуће и регенеративне ефекте.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

За потребе остваривања задатих циљева ове докторске дисертације, као природна сировина користиће се минерално блато-пелоид са локалитета обале Јадранског мора код Улциња. Сходно циљевима, истраживања у овом раду ће се изводити у следећим правцима:

1 - Испитивање пелоида

➤ Физичко-хемијска анализа : приликом испитивања садржаја макроелемената примениће се метода растварања микроталасном дигестијом која омогућава потпуно превођење свих макро и микроелемената у раствор који се одређује техником ICP-OES (оптичка емисиона спектрометрија са индуковано спрегнутом плазмом). Осим познавања садржаја неког елемента у пелоиду, важно је и познавање лакоприступачне фракције која се под одређеним условима може мобилисати и ступити у биогеохемијски циклус. Из тог разлога ће се радити секвенцијална анализа нативног узорка по модификованом поступку BCR за секвенцијалне екстракције. Ова екстракција се састоји из три фазе:

- А) 1. Фаза – екстрахује се јоноизмењивачка и карбонатна фракција
- Б) 2. Фаза - екстрахују се слабо хидратисани хидроксиди гвожђа и мангана и микроелементи сорбовани на њима
- В) 3. Фаза – екстрахује се органско сулфидна фракција

Одређивање свих елемената ће се радити на инструменту: iCAP 6500 Duo ICP, Thermo SCIENTIFIC, UK

- Рендгенска дифракциона анализа пелоида у циљу идентификације минерала и минеролошког састава, као и одређивање врсте кристалне решетке и величине кристала.
- Антимикробно дејство пелоида
- Анализа присуства алги у пелоиду и њихово дејство на кожу

2 – Формулација и испитивање првог препарата са пелоидом на акнозну кожу

➤ Формулација препарата

Формулисаће се и израдити препарат у облику масти типа суспензије, при чему се прашкасте супстанце разрибају са биљном тинктуром а затим суспендују у подлогу типа стеаринског крема, који припада групи хидрофилних кремава. Пелоид, обрађен посебном техником инкорпорираће се у подлогу .

-Порекло активног принципа :

Сирови пелоид је са подручја улцињске обале званог Језеро. Добија се тако што се са површине коже слој дебљине 30cm, који представља наслаге шкољки, а испод њега се узима блато. Сирови пелоид се обради са водом загревањем на температури од 75⁰С, а затим филтрира и охлади.

-Порекло помоћних сировина:

У састав препарата за акнозну кожу, осим пелоида као активне супстанце улазе прашкасте материје - цинк оксид, талк, сумпор (произвођача Cognis Laboratories, Немачка), тинктура органски гајеног биља у пропилен-гликолу (произвођач - BASF, Немачка) и подлога типа стеаринског крема. Биље које се користи за израду тинктуре је органски гајено произвођача „Ин спе“ из Бара, а тинктура се припрема по пропису Ph.Jug.IV од следећег биља: Agrimonia eupatoria-рањеник, Achillea millefolium-хајдучка трава, Plantago мајор-боквица, Matricaria chamomila-камилица, Satureja montana – вресак, Foenugraeci semen-грчко сјеме.

➤ Фармацеутско-технолошка испитивања масти типа суспензије:

Фармацеутско-технолошка испитивања препарата за третман акни у облику масти типа суспензије обухватају анализе :

а) *изглед препарата:* односно тактилне особине обухватају лакоћу апликације, размаз у танком слоју мора бити хомогеног изгледа без видљивих грудвица и зрнаца и одређује се органолептички

б) *величина честица* : не сме бити већа од 60µm

Осим ових испитивања које прописује Ph Jug.IV, могу се спровести испитивања која наводи Ph.Jug.V, а захтеви се односе на све полуврсте препарате за примену на кожи.

а) *одређивање рН вредности* врши се потенциометријски, директним мерењем у препарату.

б) *одређивање реолошких карактеристика* (привидни вискозитет, напон попуштања, одређивање минималног и максималног привидног вискозитета). Мерење реолошких карактеристика изводи се ротационим вискозиметром, а метода мерења се заснива на појави да тело које се урони у течност, приликом свог обртања , наилази на вискозни отпор.

в) *мерење конзистенције* по Ph.Jug.V, врши се пенетрометром , при чему се под одређеним и валидираним условима мјери пенетрација купе (дио пенетрометра) у препарат који се испитује када купа слободно пада са одређене висине.

➤ Студија пре-после за приказ дејства препарата са пелоидом на акнозну кожу

Одабрани дизајн студије „пре и после“ је најповољнији да прикажемо оно што нам је циљ у раду, а то је дејство препарата са пелоидом на акнозну кожу, односно санирање акни и ожиљака од акни. Документација испитаника коју посједује „Фонтис“ обухвата картон са описним стањем пацијената приликом почетка примјене као и приликом

редовних контрола до излечења, затим фотографије са приказом стања акни током периода примене препарата за акне.

Број испитаника потребан за студију (уз снагу студије од 80% и вероватноћу грешке првог реда од 0.05) је 44, а урадиће се проспективно/ретросективно на основу резултата добијених користећи скалу за општу процену стања акни, на основу неке друге валидне методе као што је бројање лезија које потичу од акни или на основу глобалне скале од 5 категорија, која представља најновији предлог FDA.

➤ **Статистичка обрада података**

Сви подаци добијени из картона евиденције испитаника биће приказани и анализирани адекватним статистичким методама користећи софтверски пакет СПСС. За приказивање података користеће се Студентов Т тест за упоређивање континуалних обележја, а Ни квадрат тест за упоређивање категоријских обележја посматраних феномена.

3- Формулација и испитивање другог препарата са пелоидом на здраву кожу

Формулисаће се и израдити препарат за спољашњу примену при чему ће се пелоид обрађен посебном техником инкорпорирати у одговарајућу подлогу уз додатак тинктура одабраног органски гајеног биља. Настали крем има водену фазу као континуирану фазу и припада групи хидрофилних, односно кремова уље у води.

Порекло активног принципа

Активни принцип је минерално блато – пелоид, са локалитета улцињске обале, добијен са дубине око 30 cm испод површине и обрађен посебном техником са водом загревањем на 75°C, затим филтриран и охлађен.

Порекло помоћних сировина

За израду крема типа у/в са пелоидом као подлога се користи амбифилна подлога која представља мешовити тип емулзија и има уравнотежене хидрофилно-липофилне особине. У овакав тип подлоге могу се инкорпорирати одређене количине хидрофилне и липофилне супстанце без промене стабилности, а за израду овог препарата коришћена магистрално израђена амбифилна подлога у лабораторији Фонтиса.

Уљану фазу чини уље Јојобе (произвођач BASF, Њемачка) а водену фазу тинктура биља урађена по пропису Фармакопеје која садржи органски гајено биље произвођача „Ин спе“, Бар и то следећих врста: *Matricaria chamomila*-камилица, *Sambucus Nigra* – зова, *Artemisia vulgaris* – пелин, *Arctium Lappa*- чичак, *Salvia Officinalis* – жалфија и *Geranium macrorrhizum* - здравац

➤ **Фармацеутско-технолошка испитивања крема :**

Крем са пелоидом као активном супстанцом има водену фазу као континуирану фазу и припада групи хидрофилних, односно у/в кремова, а фармацеутско-технолошка испитивања ће обухватити:

а) *Изглед препарата* – испитује се органолептички (визуелним посматрањем, наношењем и размазивањем на стакленој плочи процениће се боја, мирис, сјај, конзистенција и хомогеност)

б) *Сензорне особине препарата*, тј. размазивост, моћ упијања, субјективни осјећај влажења и оклузије коже, лепљивост, клизавост и апсорптивност процењују се након наношења на кожу.

в) *одређивање рН вредности* врши се потенциометријски, директним мерењем у препарату.

г) одређивање реолошких карактеристика (привидни вискозитет, напон попуштања, одређивање минималног и максималног привидног вискозитета).

➤ ***In vivo* испитивања дјеловања крема са пелоидом на здраву хуману кожу**

Методe савременог биоинжењеринга коже (мерење рН површине коже, влажности, садржаја површинских липида, трансепидермалног губитка воде) омогућавају карактеризацију препарата за локалну примену са аспекта његовог дејства на наведене параметре коже. *In vivo* тестови на здравој кожи омогућавају проучавање деловања препарата.

- Испитивање утицаја креме на рН коже . С обзиром да је површина коже прекривена невидљивим хидрофилно - липофилним омотачем (хидросолубилне супстанце у рожнатом слоју, зној, себум, излучена угљена киселина) и релативно високом садржајем влаге, могуће је на кожи вршити директно мерење рН вредности. Испитивање утицаја креме на рН коже је електрохемијска метода која не испољава нежељена дејства на кожу. Мјерење Skin-pH-metrom PH 900 (произвођач Courage+Khazaka, Нјемачка), омогућава брзо и ефикасно мерење рН коже .

- Испитивање ефекта влажења коже . Влажност коже је један од најважнијих параметара за карактеризацију стања stratum corneum. Како вода испарава са површине коже – зависно од атмосферске влаге и температуре – кожа може бити сува, крхка, љуспаста, а могу се јавити и фисуре. Испитивање ефекта влажења коже вршиће се на апарату Corneometer CM 825 (произвођач Courage+Khazaka, Немачка) који мери капацитет коже и осетљив је на релативну диелектричну константу мереног материјала. Принцип мерења влажности коже апаратом Corneometer CM 825 заснива се на одређивању капацитативности кондензатора при контакту са површином коже. Обзиром да је диелектрична константа воде много већа од диелектричне константе кератина и епидермалних липида, сматра се да диелектричне особине stratum corneum у великој мјери зависе од садржаја влаге у њему. *In vivo* испитивања могу се спроводити након једнократне примене креме и тада се процењују његови краткотрајни ефекти влажења коже, у току неколико сати од примене препарата, или у току више дана или недеља, када се процењују дуготрајни ефекти влажења коже.

- Испитивање утицаја креме на садржај површинских липида коже. Кожа је прекривена танким слојем липида који су пореклом из себума, секрета себацеалних жлијезда. Липиди себума састоје се из сквалена, воскова и естара холестерола и триглицерида и често се зову површински липиди коже. У нормалним условима себум је присутан у емулгованој форми са водом или знојем , чинећи хидролипидни филм. За мерење садржаја површинских липида постоји више техника, а најчешће се мерење врши на апарату Sebumeter SM 810, Courage +Khazaka GmbH electronic, Немачка, који је у основи фотометар а базира се на мерењу повећане транспарентности пластичног филма који је обложен липидима, након њихове апсорпције са површине коже. Мерење се врши након једнократне апликације препарата и у периоду до 8 сати након примене.

- Испитивање трансепидермалног губитка влаге (TEWL) служи за процену баријерних својстава коже и степена њеног оштећења, односно ефеката препарата који су намењени обнављању кожне баријере. Уређај за мерење је Tewameter TM 210 (произвођач Courage+Khazaka, Немачка). Под равнотежним условима, површина хумане коже окружена је граничним слојем водене паре, унутар кога постоји унутрашње-спољни градијент. Овај градијент паре у корелацији је са градијентом воде унутар stratum corneum , што је у ствари функција квалитета кожне баријере.

Садржај влаге у кожи након примене препарата је значајан параметар за дерматолошке препарате, с обзиром да је утврђено да садржај влаге у stratum corneum утиче на баријерну функцију коже, пенетрацију активних супстанци и механичке особине коже. Препарати за локалну примену различитих карактеристика утичу на пуферски капацитет коже, њену рН вредност и осетљивост, што је веома значајно код коже код које је услед постојања одређеног степена оштећења ослабљена баријерна функција и повећан трансепидермални губитак воде.

ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ СТУДИЈЕ

Будући да се ради о природном ресурсу, чија су дејства позната од давнина и примењивана у различите терапијске сврхе, резултати овог истраживања ће допринети бољем сагледавању карактеристика и дејства минералног блата-пелоида са аспекта примене на кожу, било да се ради о санирању одређених промена као што су акне, ожиљци од акни, или побољшања општег стања коже.

Примена дермофармацеутских и дермокозметичких препарата поред терапијских има многе позитивне ефекте на структуру и функцију коже, а могу бити узроковани директном интеракцијом са епидермисом или су резултат утицаја на физиолошко стање коже.

ЗНАЧАЈ ИСТРАЖИВАЊА

Резултати физичко-хемијских испитивања минералног блата-пелоида, као и резултати фармаколошког дејства препарата са пелоидом биће основа за процену оправданости примене пелоида у третману различитих дерматолошких стања. Тиме ће се створити услови за унапређење терапије акни и других поремећаја у дерматологији, и отворити нове могућности за производњу лековитих препарата на бази пелоида у Црној Гори и целом региону Балкана.

III Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, мр пх Зорица Потпара испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитује састав и биолошка активност препарата пелоида.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза мр пх Зорице Потпаре под менторством проф. др Слободана Јанковића бити од великог научног и практичног значаја за избор ефикасне, безбедне и економски оправдане терапије пелоидом у дерматологији.

4. Комисија са задовољством предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **мр пх Зорице Потпаре** под називом **"Испитивање биолошке активности препарата пелоида са локалитета улцињске обале Јадранског мора"**, и одобри њену израду.

Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Слободана Јанковића, редовног професора Медицинског факултета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација.

Председник комисије

проф. др Слободан Јанковић, редовни професор Медицинског факултета у Крагујевцу за уже научне области фармакологија са токсикологијом и клиничка фармација

проф. др Драган Миловановић, члан, ванредни професор Медицинског факултета у Крагујевцу за ужу научну област фармакологија и токсикологија

доц. др Милица Нинковић, члан, доцент Војномедицинске академије у Београду за ужу научну област клиничка физиологија

У Крагујевцу, 14.12.2009.