



StES 2020
STUDENTS ENCOUNTERING SCIENCE

ZBORNIK RADOVA
Prirodne nauke

ISSN 2637-1987 (Print)
ISSN 2637-1928 (Online)

13. Naučno-stručni skup
Studenti u susret nauci – StES 2020

ZBORNIK RADOVA

Prirodne nauke

13th scientific conference
Students encountering science – StES 2020

PROCEEDINGS

Natural Sciences

Banja Luka
2020.

Izdavači:
Univerzitet u Banjoj Luci
Studentski parlament Univerziteta u Banjoj Luci

Za izdavača:
prof. dr Goran Latinović
Angelina Dulić

Urednik:
Bojan Garić

Lektor za srpski jezik:
Aleksandra Savić

Lektor za engleski jezik:
Milica Guzijan

Štampa:
Mikro print s.p. Banja Luka

Tiraž:
35

Naučni odbor:
Prof. dr Goran Latinović, prof. dr Zoran Vujković,
prof. dr Igor Milinković, prof. dr Vladimir Risojević,
prof. dr Duško Jojić, prof. dr Željko Vaško
doc. dr Siniša Lakić

Recenzenti:
Prof. dr Bijana Kukavica
Prof. dr Vera Nikolić
Prof. dr Dragojla Golub
Prof. dr Svjetlana Lolić
Prof. dr Tanja Maksimović
Prof. dr Dragan Matić
Prof. dr Milica Balaban
Prof. dr Saša Zeljković
Prof. dr Biljana Davidović Plavšić
Prof. dr Dijana Jelić
Doc. dr Snježana Dupljanin
Doc. dr Dragana Malivuk Gak
Doc. dr Maja Manojlović
Doc. dr Milana Grbić
Mr Marko Ivanišević
Ma Dragica Delić
Ma Rajko Roljić
Ma Bijana Radusin Sopić

SADRŽAJ:

ANA MILENKOVIĆ, MIKROBIOLOŠKO ISPITIVANJE ČISTOĆE UPOTREBLJENIH UZORAKA KOZMETIČKIH PROIZVODA	5
DEJAN PUHALO, MOGUĆNOSTI TURISTIČKE VALORIZACIJE GEOPOTENCIJALA PODRUČJA ZUBAČKA UBLA – GRAD TREBINJE (PRISTUP PROSTORNO-FUNKCIONALNOJ ORGANIZACIJI)	23
OGNJAN MILETIĆ, Jovana Paspalj, Radoslav Dekić, EFEKTI KONZUMACIJE RAZLIČITIH PIĆA NA ERITROCITNU LOZU WISTAR PACOVA	37
NEVENA KUKAVICA, UPOREDNA ANALIZA METODA TRAPEZA I PRAVOUGAONIKA ZA ODREĐIVANJE POVRŠINE ISPOD KRIVE (AUC) U FARMAKOKINETIČKIM MODELIMA	45
LEJLA UŠANOVIĆ, Lejla Lasić, Jasna Hanjalić, Belma Kalamujić Stroil, SPECIES COMPOSITION OF TICKS REMOVED FROM DOGS IN THE MUNICIPALITY OF VITEZ (BOSNIA AND HERZEGOVINA)	59
NINA BABIĆ, Dragana Gajić, FITOSINTEZA I MIKROBIOLOŠKA ANALIZA NANOČESTICA ZnO	65

MIKROBIOLOŠKO ISPITIVANJE ČISTOĆE UPOTREBLJENIH UZORAKA KOZMETIČKIH PROIZVODA

Autor: ANA MILENKOVIĆ

e-mail: ana.milenkovic1@pmf.edu.rs

Mentor: Asis. Nikola Stanković

Departman za biologiju i ekologiju

Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu

Uvod: Dekorativna kozmetika igra važnu ulogu u ljudskim životima. Upotreba kozmetičkih proizvoda poslednjih godina beleži visoki porast ne samo u populaciji žena, već i muškaraca i dece. Danas se u svim drogerijama i parfimerijama mogu videti police bogato opremljene test-uzorcima u različitim bojama i nijansama dostupnim svim potrošačima. Isprobavanje uzoraka nečistim rukama dovodi do kontaminacije izloženih proizvoda. Mikroorganizmi koji se tu mogu naći izazivaju kvarenje kozmetičkih proizvoda, a pored toga, mogu neželjeno uticati na zdravlje korisnika, počev od crvenila i svraba do teških infekcija na koži.

Cilj rada: Ispitati izložene uzorke kozmetičkih proizvoda za lice i oči u drogerijama; izolovati i determinisati bakterije i gljive; analizirati prisustvo i brojnost patogena u uzorcima; prikazati najznačajnije patogene vrste i ukazati na njihovu potencijalnu opasnost po zdravlje korisnika.

Materijal i metode: Materijal je sakupljen iz 5 nasumično izabranih drogerija i parfimerija na teritoriji grada Niša, u toku avgusta 2020. godine. Ukupno 25 uzoraka šminke je analizirano u sterilnim laboratorijskim uslovima, kako bi se ispitalo prisustvo mikroorganizama. Za determinaciju prisutnih mikroorganizama ispitane su mikromorfološke odlike ćelija, makromorfološke odlike kolonija, kao i biohemijske i fiziološke osobine na specijalnim podlogama.

Rezultati: Aerobnom kultivacijom, od ukupno 25 istraženih uzoraka upotrebljenih kozmetičkih proizvoda, mikroorganizmi su izolovani u 9, što kazuje da je 36% ispitanih uzoraka bilo kontaminirano mikroorganizmima. Procenat kontaminacije bakterijama iznosi 28%, dok procenat kontaminacije gljivicama iznosi 12% od ukupno testiranih uzoraka. Prisustvo oportunističkih Gram-pozitivnih bakterija i gljivica predstavlja potencijalni rizik za zdravlje imunokompromitovanih korisnika.

Zaključak: Dobijeni nivo kontaminacije test-uzoraka ukazuje na to da mikroorganizmi mogu „sami“ dospeti iz vazduha, zbog svog širokog rasprostranjenja i otpornosti na sredinske uslove. Dobijeni rezultati predstavljaju značajan doprinos za podizanje svesti o eventualnim zdravstvenim problemima koji se mogu manifestovati na koži upotrebom neadekvatno izloženih uzoraka.

Ključne reči: Kozmetički uzorci; mikrobna kontaminacija; bakterije; gljive.

UVOD

Definicija kozmetike i kratka istorija

Kozmetika se odnosi na sredstva koja su prirodnog ili industrijski sintetisanog porekla specijalno namenjena za upotrebu na koži i sluzokoži. Kozmetički proizvod je definisan kao bilo koja supstanca ili preparat koji služi za utrljavanje, polivanje, raspršivanje ili bilo koji drugi način primene na delovima tela, u cilju čišćenja, zaštite i očuvanja, ulepšavanja, menjanja fizičkog izgleda (1). U kozmetiku spadaju kreme za zaštitu kože, losioni, parfemi, lakovi za nokte, šminka (ruževi za usne, dekorativna kozmetika za oči i lice: puderi, korektori, rumenila, bronzeri), farbe za kosu, sprejevi i gelovi za kosu, dezodoransi, kupke i šamponi itd.

Dekorativna kozmetika je uvek igrala važnu ulogu u ljudskim životima. Prvi nalazi o ulepšavanju datiraju iz srednjeg kamenog doba (pre oko 100 000 godina). Tadašnji *body art* smatra se jednim od prvih rituala u ljudskoj kulturi (2). Među kulturama gde se kozmetika široko koristila bili su stari Egipat, antička Grčka, Rimsko carstvo, Indija i Persija. Dokumentovano je da su ondašnje Rimljanke koristile kohl za iscrtavanje linije očiju, a upotreba ovog antimonovog sulfida zabeležena je i u kulturi starog Egipta. Koristili su ga, naime, i muškarci i žene kao tuš za oči, što je bila svojevrsna verzija maskare, ali i za potamnjivanje i iscrtavanje obrva (3). Na Dalekom istoku, u Japanu, gejša su za bojenje usana i očnih kapaka koristile ruževe od mlevenih latica šafranike (*Carthamus sp.*).

U Evropi je korišćenje dekorativne kozmetike bilo ograničeno. Koristile su je samo žene visokih društvenih klasa. Zatim se vrlo brzo raširila upotreba i među drugim, nižim klasama društva, koje su time pokušavale da dostignu nivo aristokrata (3).

Početkom 20. veka, kozmetička industrija doživljava procvat i kozmetika postaje ponovo popularna zahvaljujući medijskoj pažnji i kozmetičarima, poput Maksa Faktora i Eugena Šulera. Za vreme Prvog i Drugog svetskog rata, kozmetika je pala u drugi plan, ali već 60-ih godina ona doživljava uspon. Brzi razvoj filmske industrije i mega popularnost glumaca, a naročito glumica, koje su imale neverovatan uticaj sa filmskog platna na široke populacije, doprineo je neverovatnom povećanju potražnje za najrazličitijim kozmetičkim proizvodima, kako tada tako i danas.

Tehnološki napredak i stalne inovacije glavna su obeležja moderne kozmetičke industrije. Neprekidne inovacije, redizajn proizvoda i poboljšanja postojećih postali su nužni za opstanak na globalnom tržištu (5).

Mikrobiološka kontaminacija kozmetičkih proizvoda

Mikrobiološka kontaminacija odnosi se na nenamerno ili slučajno unošenje mikroba kao što su bakterije, kvasci, plesni, virusi, prioni i protozoe. Prisustvo mikroorganizama može izazvati kvarenje kozmetičkih proizvoda (promena strukture, pH vrednosti, boje, mirisa proizvoda i sl.), a pored toga, mogu neželjeno uticati na zdravlje onog ko taj proizvod koristi, počev od alergijskih reakcija, crvenila i svraba do teških infekcija na koži.

Mikrobiološka kontaminacija kozmetičkih proizvoda može se odvijati u dve faze: tokom njene proizvodnje, pakovanja i distribucije, i prilikom otvaranja i upotrebe proizvoda od strane proizvođača. U prvom slučaju, odgovornost proizvođača je da obezbedi pravilno mikrobno očuvanje kozmetike (6). Progresivni razvoj kozmetičke industrije stvorio je potrebu za sprovođenjem mikrobiološke analize sirovina koje se koriste u proizvodnji kozmetičkih proizvoda, kao i finalnih proizvoda, a u cilju dobijanja kvalitetnog i bezbednog proizvoda za korisnika. Važeći evropski regulatorni okvir u oblasti kozmetičkih proizvoda zahteva od proizvođača da obezbede procenu mikrobiološkog kvaliteta (eng. *microbial limits test*) i ispitivanje efikasnosti konzervansa (eng. *challenge test*), kao i da se podaci o mikrobiološkoj stabilnosti dokumentuju u izveštaju o bezbednosti. Tokom razvoja kozmetičkog proizvoda, potrebno je razmotriti rizik od mikrobiološke kontaminacije pri izboru sirovina i pakovanja, proizvodnog postupka, kao i uslova korišćenja i čuvanja (7).

Drugi slučaj obuhvata kontaminaciju proizvoda nakon otvaranja. Od trenutka otvaranja, kozmetički proizvod je podložan stalnoj i promenljivoj mikrobiološkoj kontaminaciji iz okruženja. Čistoća nakon otvaranja zavisi od konzervansa proizvoda, prikladnosti ambalaže, skladištenja i primene, ali veliki uticaj imaju korisnici. Danas se u svim drogerijama i parfimerijama mogu videti police bogato opremljene test-uzorcima u različitim bojama i nijansama dostupnim svim potrošačima. Isprobavanje uzoraka nečistim rukama dovodi do kontaminacije izloženih proizvoda i do potencijalne opasnosti po zdravlje za narednog korisnika.

Mikrobiološka bezbednost upotrebe kozmetičkih proizvoda

Upotreba kozmetičkih proizvoda poslednjih godina beleži visoki porast ne samo u populaciji žena, već i muškaraca i dece. Industrija kozmetike se fokusira na nove molekularne i biološke strategije, sve s ciljem unapređenja efikasnosti proizvoda.

Brojnim istraživanjima utvrđeno je da su kozmetički proizvodi, zbog svog hemijskog sastava koji obuhvata polisaharide, proteine, lipide, alkohole i vitamine, pogodni medijumi za rast i razvoj mnogobrojnih vrsta bakterija i gljiva. Takođe, sredinski uslovi kojima su izloženi proizvodi (temperatura od 20 do 30 °C, neutralna pH vrednost i optimalna vlažnost vazduha) im omogućavaju uspešan opstanak i razmnožavanje na podlogama (8). Prema zakonu koji je doneo Evropski parlament (9), kozmetičkim proizvodima i sastojcima, osim aditiva u boji, nije potrebno odobrenje FDA pre nego što izađu na tržište. Međutim, ne smeju biti „falsifikovani“ ili „pogrešno označeni“. To znači da moraju biti pravilno označeni i moraju biti sigurni za potrošače kada se koriste u skladu sa uputstvima na etiketi. To takođe znači da se ne smeju pripremati, pakovati ili skladištiti na način da su kontaminirani ili štetni po zdravlje. Kompanije i pojedinci koji proizvode ili distribuiraju kozmetiku zakonski su odgovorni za sigurnost svojih proizvoda. To uključuje osiguranje da kozmetika ne sadrži štetne mikroorganizme (1).

Iako trenutno u svetu ne postoje jasne, zakonski obavezujuće granične vrednosti za sadržaj mikroba u kozmetici, prema preporuci Naučnog komiteta za bezbednost potrošača (SCCS), kozmetika ne bi trebalo da sadrži više od 100 tj. 1000 cfu/g (eng. *colony-forming units per gram*), u zavisnosti od vrste proizvoda (10).

CILJ ISTRAŽIVANJA

Ključan aspekt bezbednosti kozmetičkih proizvoda je da njihov mikrobiološki kvalitet i stabilnost moraju biti takvi da ne predstavljaju mogući rizik po zdravlje korisnika tokom celokupnog upotrebog perioda proizvoda. Iako se za kozmetičke proizvode ne očekuje da budu potpuno aseptični, proliferacija mikroorganizama, kao i

nastajanje njihovih metaboličkih procesa i endotoksina, predstavlja potencijalnu opasnost, posebno za decu, starije i imunokompromitovane osobe.

Ciljevi ovog istraživanja su sledeći:

1. Ispitati izložene uzorke kozmetičkih proizvoda za lice i oči u drogerijama;
2. izolovati i determinisati bakterije i gljive iz uzoraka;
3. analizirati prisustvo i brojnost potencijalnih patogena u uzorcima;
4. prikazati najznačajnije patogene vrste i ukazati na njihovu potencijalnu opasnost po zdravlje korisnika.

MATERIJAL I METODE

Materijal za ovo istraživanje sakupljen je iz 5 nasumično izabranih drogerija i parfimerija na teritoriji grada Niša, u toku avgusta 2020. godine.

Kozmetički proizvodi

Ukupno 25 uzoraka šminke, sa odgovarajućim datumom proizvodnje i isteka, prikupljeno je za istraživanje. Od dostupnih proizvoda, metodom slučajnog izbora, uzeti su uzorci 7 tečnih pudera, 3 tečna korektora, 3 praškasta proizvoda za konturisanje lica, 2 tečna rumenila, 2 senke za oči, 2 maskare i 6 kremastih ruževa za usne. Uzorci su u najkraćem roku ispitivani i analizirani u sterilnim laboratorijskim uslovima, kako bi se ispitalo prisustvo mikroorganizama. Tabela 1. sadrži detaljni prikaz sastava izabranih uzoraka:

Tabela 1

R. br. uzorka	Tip proizvoda	Sastav
1	Tečni puder	Aqua, Cyclopentasiloxane, PEG-10 Dimethicone, Cetearyl Ethylhexanoate, Ethylhexyl Palmitate, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Glycerin, Sodium Chloride, Distearidimonium Hectorite, Methicone, Phenoxyethanol , Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone, Polymethylsilsesquioxane, Ethylhexylglycerin , Potassium Sorbate , Sodium Benzoate , Butyl Methoxydibenzoylmethane, Talc, Parfum, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Iron Oxide (CI 77492), Diiron Trioxide (CI 77491), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
2	Tečno rumenilo	Aqua, Isohexadecane, Hydrogenated Farnesene, Dimethicone, Glycerin, Hydrogenated Polyisobutene, Tribehnenin, Polyglyceryl-3 Polyricinoleate, Sorbitan Isostearate, Prunus Armeniaca Kernel Oil, Sorbitan Sesquiolate, Mica, Phenoxyethanol , Glyceryl Oleate, Magnesium Sulfate, Tocopheryl Acetate, Parfum, Aluminium Hydroxide, Ethylhexylglycerin , Triethoxycaprylsilane, Disodium EDTA, PEG-8, Tocopherol, Ascorbyl Palmitate, Ascorbic Acid, Citric Acid, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), CI 15850, Diiron Trioxide (CI 77491), Carmine (CI 75470)]
3	Proizvod za konturisanje	Talc, Mica, Magnesium Stearate, Dimethicone, Isopropyl Isostearate, Pentaerythrityl Tetraistearate, Petrolatum, Phenoxyethanol , Ethylhexylglycerin , Ethylhexyl Palmitate, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Silica Dimethyl Silylate, Polyisobutene, Synthetic Wax, Paraffinum Liquidum, BHT, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Tin Oxide, Diethylhexyl Synglyidenemalonate, Caprylic/Capric Triglyceride, Linalool, Limonene, Parfum, [+/- Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Titanium Dioxide (CI 77891), Triiron Tetraoxide (CI 77499), CI 15850, Tartrazine (CI 19140)]
4	Tečni korektor	Sastav ovog proizvoda nije naznačen na pakovanju, niti ga je moguće pronaći.
5	Ruž za usne	Isododecane, Dimethicone, Diisostearyl Malate, Polybutene, Distearidimonium Hectorite, Silica Dimethyl Silylate, Glyceryl Behenate, Hydrogenated Polycyclopentadiene, Trimethylsiloxysilicate, Beeswax, Propylene Carbonate, Mica, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Ethylhexyl Salicylate, PEG-8, Tocopherol, Ascorbyl Palmitate, Ascorbic Acid, Citric Acid, Argania Spinosa Kernel Oil, Aroma, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499), Tartrazine (CI 19140), Brilliant Blue (CI 42090), CI 15850, CI 45410]

6	Ruž za usne	Dimethicone, Trimethylsiloxysilicate, Isododecane, Nylon-611, Dimethicone Crosspolymer, C30-45 Alkyldimethylsilyl Polypropylsilsesquioxane, Lauroyl Lysine, Alumina, Silica Silylate, Disodium Stearoyl Glutamate, Phenoxyethanol , Caprylyl Glycol , Limonene, Aluminum Hydroxide, Paraffin, Benzyl Benzoate, Benzyl Alcohol , Citronellol, Parfum, [+/- Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Titanium Dioxide (CI 77891), Triiron Tetraoxide (CI 77499), CI 15850, Carmine (CI 75470)]
7	Proizvod za konturisanje	Talc, Perlite, Triisostearin, Phenyl Trimethicone, Magnesium Stearate, Caprylyl Glycol, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
8	Ruž za usne	Isododecane, Dimethicone, Diisostearyl Malate, Polybutene, Distearidimonium Hectorite, Silica Dimethyl Silylate, Glyceryl Behenate, Hydrogenated Polycyclopentadiene, Trimethylsiloxysilicate, Beeswax, Propylene Carbonate, Mica, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Ethylhexyl Salicylate, PEG-8, Tocopherol, Ascorbyl Palmitate, Ascorbic Acid, Citric Acid, Argania Spinosa Kernel Oil, Aroma, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), CI 15850, Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499), Tartrazine (CI 19140), Brilliant Blue (CI 42090), CI 45410]
9	Tečno rumenilo	Aqua, Isohexadecane, Hydrogenated Farnesene, Dimethicone, Glycerin, Hydrogenated Polyisobutene, Tribehenin, Polyglyceryl-3 Polyricinoleate, Sorbitan Isostearate, Raspberry Seed Oil, Sorbitan Sesquioleate, Mica, Phenoxyethanol , Glyceryl Oleate, Magnesium Sulfate, Tocopheryl Acetate, Parfum, Aluminium Hydroxide, Ethylhexylglycerin , Triethoxycaprylylsilane, Disodium EDTA, PEG-8, Tocopherol, Alpha-isomethylionone, Ascorbyl Palmitate, Ascorbic Acid, Citric Acid, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Carmine (CI 75470), CI 15850]
10	Tečni puder	Aqua, Helianthus Annuus Hybrid Oil, Polyglyceryl-3 Polyricinoleate, Carthamus Tinctorius Seed Oil, Ethyl-Alcohol, Glyceryl Oleate, Glycerin, Mica, Tricaprylin, Parfum, Hydrogenated Castor Oil, Silica, Prunus Armeniaca Fruit Extract, Bambusa Arundinacea Leaf Extract, Magnesium Sulfate, Xanthan Gum, Lecithin, Xylitylglucoside, Anhydroxylitol, Xylitol, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil, Ascorbyl Palmitate, Limonene, Linalool, Citric Acid, Citronellol, Geraniol, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
11	Tečni puder	Aqua, Cyclopentasiloxane, Talc, Propylene Glycol, Dimethicone, Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid, Aluminum Starch Octenylsuccinate, Sodium Chloride, PEG/PPG-18/18 Dimethicone, PVP, Methicone, Benzyl Alcohol , Phenoxyethanol , Sodium Hydroxide, Ethylene/Methacrylate Copolymer, Synthetic Beeswax, Trihydroxystearin, Silica, Sodium Benzoate, Synthetic Wax, Polyglyceryl-4 Isostearate, Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone, Hexyl Laurate, Isopropyl Titanium Triisostearate, Ethylene Brassylate, Polyethylene, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
12	Senka za oči	Calcium Aluminum Borosilicate, Talc, Phenyl Trimethicone, Mica, Dimethicone, Synthetic Fluorophlogopite, Magnesium Stearate, Phenoxyethanol , Ethylhexylglycerin , Diisostearyl Malate, Methyl Methacrylate Crosspolymer, Ethylhexyl Methoxycinnamate, BHT, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Diethylhexyl Syngylidenemalonate, Caprylic/ Capric Triglyceride, Tin Oxide, Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Triiron Tetraoxide (CI 77499), Iron Oxide (CI 77492), Brilliant Blue (CI 42090)
13	Ruž za usne	Sastav ovog proizvoda nije naznačen na pakovanju, niti ga je moguće pronaći.
14	Senka za oči	Mica, Talc, Synthetic Fluorophlogopite, Dimethicone, Magnesium Stearate, Pentaerythrityl Tetraoisostearate, Isopropyl Isostearate, Polyisobutene, Synthetic Wax, Phenoxyethanol , Ethylhexylglycerin , Paraffinum Liquidum, Ethylhexyl Stearate, Diisostearyl Malate, Tin Oxide, Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Triiron Tetraoxide (CI 77499), Iron Oxide (CI 77492)
15	Ruž za usne	Sastav ovog proizvoda nije naznačen na pakovanju, niti ga je moguće pronaći.

16	Ruž za usne	Isododecane, Dimethicone, Diisostearyl Malate, Polybutene, Disteardimonium Hectorite, Silica Dimethyl Silylate, Glyceryl Behenate, Hydrogenated Polycyclopentadiene, Trimethylsiloxysilicate, Beeswax, Propylene Carbonate, Mica, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Butyl Methoxydibenzoylmethane, Ethylhexyl Salicylate, PEG-8, Tocopherol, Ascorbyl Palmitate, Ascorbic Acid, Citric Acid, Argania Spinosa Kernel Oil, Aroma, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499), Tartrazine (CI 19140), Brilliant Blue (CI 42090), CI 15850, CI 45410]
17	Proizvod za konturisanje	Talc, Coco-Caprylate, Dimethicone, Diethylhexyl Carbonate, Polyethylene, Beeswax, Polyamide-5, Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer, Pentaerythrityl Adipate, Helianthus Annuus Seed Oil, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Triethoxycaprylsilane, Alumina, Tocopherol, Chamomilla Recutita Flower Extract, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
18	Maskara	Aqua, Paraffin, Synthetic Beeswax, Steareth-20, Carnauba Wax, Steareth-2, Glyceryl Behenate, Cetyl Alcohol, Tocopheryl Acetate, Tocopherol, Jojoba Esters, Methylpropanediol, Hydroxyethylcellulose, Caprylyl Glycol, Dimethicone, Polyurethane-14, Amp-Acrylates Copolymer, Aminomethyl Propanediol, Aminomethyl Propanol, Isopropyl Acetate, BHT, Phenoxyethanol , Potassium Sorbate , Triiron Tetraoxide (CI 77499)
19	Tečni puder	Aqua, Cyclopentasiloxane, Glycerin, Talc, Dimethicone Crosspolymer, Diethylhexyl Carbonate, Sodium Chloride, Niacinamide, Acetyl Glucosamine, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Tocopheryl Acetate, Panthenol, Palmitoyl Pentapeptide-4, BHT, Allantoin, Camellia Sinensis Leaf Extract, PEG/PPG-18/18 Dimethicone, Dimethicone, Cyclohexasiloxane, Methicone, Aluminum Hydroxide, PEG-10 Dimethicone Crosspolymer, Cyclotetrasiloxane, Disodium EDTA, PEG-100 Stearate, Caramel, Benzyl Alcohol , Methylparaben , Propylparaben , Ethylparaben , Parfum, Linalool, Hexyl Cinnamal, Citronellol, Limonene, Benzyl Salicylate, Butylphenyl Methylpropional, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), CI 77489, Diiron Trioxide (CI 77491), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
20	Tečni puder	Aqua, Cyclopentasiloxane, Talc, Pentylene Glycol , Ethylhexyl Methoxycinnamate, Glycerin, Dimethicone, Cetyl Dimethicone, Polyglyceryl-4 Isostearate, Nylon-12, Disteardimonium Hectorite, Sodium Chloride, Cera Microcrystallina, Hydrogen Dimethicone, Silica, Tocopheryl Acetate, Xanthan Gum, Parfum, Aluminum Hydroxide, Disodium EDTA, Triethoxycaprylsilane, Helianthus Annuus Seed Oil, Rosmarinus Officinalis Leaf Extract, Sodium Hyaluronate, [+ / - Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
21	Tečni korektor	Aqua, Cyclopentasiloxane, Talc, Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone, Propylene Glycol, Acrylates/Dimethicone Copolymer, Benzyl Alcohol (konzervans), Sodium Chloride, Hydrogen Dimethicone, Magnesium Sulfate, Sodium Dehydroacetate (konzervans), Aluminum Hydroxide, Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer, Disteardimonium Hectorite, Dehydroacetic Acid , Potassium Sorbate , Tetrasodium EDTA, BHT, Propylene Carbonate, [+/-: Titanium Dioxide (CI 77891), Iron Oxide (CI 77492), Diiron Trioxide (CI 77491), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]
22	Tečni puder	Cyclopentasiloxane, Dimethicone, Talc, Dimethicone Crosspolymer, Phenyl Trimethicone, Silica, Cyclohexasiloxane, Tribehenin, C30-45 Alkyl Methicone, C30-45 Olefin, Methicone, Paraffinum Liquidum, Triethoxycaprylsilane, Phenoxyethanol , Methylparaben , Ethylparaben , Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)
23	Tečni puder	Cyclopentasiloxane, Dimethicone, Talc, Dimethicone Crosspolymer, Phenyl Trimethicone, Silica, Cyclohexasiloxane, Tribehenin, C30-45 Alkyl Methicone, C30-45 Olefin, Methicone, Paraffinum Liquidum, Triethoxycaprylsilane, Phenoxyethanol , Methylparaben , Ethylparaben , Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)

24	Maskara	Aqua, Beeswax, Ammonium Acrylates Copolymer, Propylene Glycol, Eicosene Copolymer, Carnauba Wax, Cetyl Alcohol, Polysorbate 20, Ethylene/Acrylic Acid Copolymer, Potassium Cetyl Phosphate, Hydrogenated Palm Glycerides, Styrene/Acrylates Copolymer, Stearic Acid , Phenoxyethanol , Disodium Deceth-6 Sulfosuccinate, Panthenol, Aminomethyl Propanediol, Hectorite, Laureth-30, C11-15 Pareth-40, C11-15 Pareth-7, Hydroxyethylcellulose, Tocopheryl Acetate, Argania Spinosa Kernel Oil, Disodium EDTA, Sodium Dehydroacetate , Caprylyl Glycol, Sodium Laureth-12 Sulfate, Hydrolyzed Collagen, Silica, Pantolactone, Hydrolyzed Keratin, Sodium Sulfate, Potassium Sorbate , Sodium Benzoate , [+/- Mica, Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499), Ferric Ferrocyanide (CI 77510), Carmine (CI 75470), Chromium Hydroxide Green (CI 77289), Chromium Oxide Greens (CI 77288), Ultramarines (CI 77007)]
25	Tečni korektor	Aqua, Cyclopentasiloxane, Propylene Glycol, PEG-10 Dimethicone, Dimethicone, Distearidimonium Hectorite, Triethoxycaprylylsilane, Polymethyl Methacrylate, Dimethicone Crosspolymer, Trimethylsiloxysilicate, Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer, Sodium Chloride, Dimethiconol, Talc, Ethylene/Methacrylate Copolymer, Phenoxyethanol , Isopropyl Titanium Triisostearate, Ethylhexylglycerin , BHT, [+/- Titanium Dioxide (CI 77891), Diiron Trioxide (CI 77491), Iron Oxide (CI 77492), Triiron Tetraoxide (CI 77499)]

Uzimanje uzoraka

Sledeći materijal korišćen je za prikupljanje uzoraka:

- 1) 25 jednokratnih kompleta za bris2) 0,9% rastvor natrijum-hlorida
- 3) Sterilna igla 0.9 x 40
- 4) Sterilni graduisani špric 5 ml
- 5) Marker za obeležavanje uzoraka

U mikrobiološkoj laboratoriji Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu pripremljeni su kompleti briseva za uzimanje uzoraka. U svakoj epruveti stavljeno je po 3 ml 0,9% rastvora natrijum-hlorida. Metodom slučajnog izbora, u svakoj od 5 drogerija i parfimerija, uzet je bris sa 5 dostupnih proizvoda štapićem iz kompleta. Ubrzo posle toga, uzorci su doneseni u laboratoriju na analizu, kako bi se proverio stepen moguće kontaminacije.

Priprema hranljivih podloga

Za ovo istraživanje korišćene su sledeće podloge:

- 1) Hranljivi agar
- 2) Sabouraud dekstrozni agar
- 3) Chapmanova podloga (Manitol slani agar)
- 4) Krvni agar
- 5) UTI agar

- 1) Hranljivi agar je podloga namenjena za kultivisanje velikog broja mikroorganizama.

Postupak pripreme: Na tehničkoj vagi odmereno je 16,5 g praha, odmereni prah je dodat u 400 ml destilovane vode, a zatim je sadržaj ostavljen da odstoji. Nakon 15 minuta, podloga je pažljivo zagrejana do ključanja kako bi se sadržaj potpuno rastvorio, a onda je prebačena u autoklav na sterilizaciju, 15 minuta na 121°C.

2) Sabouraud dekstrozni agar namenjen je za izolovanje i kultivaciju gljiva. Postupak pripreme: Na tehničkoj vagi odmereno je 16,25 g praha, odmereni prah je dodat u 250 ml destilovane vode, a zatim je sadržaj ostavljen da odstoji. Nakon 15 minuta, podloga je pažljivo zagrejana do ključanja kako bi se sadržaj potpuno rastvorio, a onda je prebačena u autoklav na sterilizaciju, 15 minuta na 121°C.

3) Chapmanova podloga (Manitol slani agar) je selektivna podloga za izolaciju stafilocoka i diferencijaciju na osnovu njihove sposobnosti da fermentuju manitol. Rast većine pratećih mikroorganizama je inhibiran zbog visoke koncentracije natrijum-hlorida u podlozi.

Postupak pripreme: Na tehničkoj vagi odmereno je 5,55 g praha, odmereni prah je dodat u 50 ml destilovane vode, a zatim je sadržaj ostavljen da odstoji. Nakon 15 minuta, podloga je pažljivo zagrejana do ključanja kako bi se sadržaj potpuno rastvorio, a onda je prebačena u autoklav na sterilizaciju, 15 minuta na 121°C.

4) Krvni agar je hranljiva podloga za izolovanje i kultivaciju velikog broja mikroorganizama, ali i za ispitivanje njihovih hemolitičkih osobina.

Postupak pripreme: Na tehničkoj vagi odmereno je 2,15 g praha, odmereni prah je dodat u 50 ml destilovane vode, a zatim je sadržaj ostavljen da odstoji. Nakon 15 minuta, podloga je pažljivo zagrejana do ključanja kako bi se sadržaj potpuno rastvorio, a onda je prebačena u autoklav na sterilizaciju, 15 minuta na 121°C. Zatim je sterilnoj podlozi, ohlađenoj na 50°C, dodato pod aseptičnim uslovima 5–7% sterilne defibrinisane krvi.

5) UTI agar je hromogeni medijum za pretpostavljenu identifikaciju i diferencijaciju svih glavnih mikroorganizama koji uzrokuju infekcije urinarnog trakta (UTI). Agar sadrži dva specifična hromogena supstrata koja reaguju sa enzimima koje proizvode *Enterococcus spp.* i *Escherichia coli*. Pored toga, sadrži fenilalanin i triptofan, koji pružaju indikaciju aktivnosti triptofana deaminaze, što ukazuje na prisustvo *Proteus spp.*, *Morganella spp.* i *Providencia spp.* (11).

Postupak pripreme: Na tehničkoj vagi odmereno je 2,815 g praha, odmereni prah je dodat u 50 ml destilovane vode, a zatim je sadržaj ostavljen da odstoji. Nakon 15 minuta, podloga je pažljivo zagrejana do ključanja kako bi se sadržaj potpuno rastvorio, a onda je prebačena u autoklav na sterilizaciju, 15 minuta na 121°C.

Razlivanje hranljivih podloga

Nakon hlađenja na 50°C, pripremljene podloge su, uz otvoren plamenik, sterilno razlivene u Petri ploče Ø90 tako da debljina podloge bude 10 mm. Nakon razlivanja, podloge su obeležene, okrenute poklopcem nadole i ostavljene na tamno mesto do zasejavanja.

Zasejavanje i inkubiranje zasejanih kultura

Za kultivaciju i praćenje razvoja mikroorganizama korišćeni su hranljivi agar (rast i razvoj bakterija) i Sabouraud dekstrozni agar (rast i razvoj gljiva).

Korišćena metoda aerobnog zasejavanja u ovom istraživanju je zasejavanje potezom (eng. *streak plate*). Pre zasejavanja, sadržaj svake od epruveta je vorteksovan kako bi se ćelije mikroorganizama u njoj ravnomerno rasporedile. Zatim je štapićem iz kompleta, uz otvoreni plamenik, sadržaj razmazan finim pokretima u gornjem delu ploče cik-cak potezom.

Posle izvršenog zasejavanja, hranljive podloge stavljene su u termostat sa obezbeđenom optimalnom temperaturom za razvoj mikroorganizama. Označene Petri ploče postavljene su u obrnute položaje kako bi se sprečilo da kapljice vode, nastale kondenzacijom vodene pare, padaju sa poklopca na podlogu, razlivaju se i ometaju razvoj kulture. Hranljive podloge gde se očekivao rast bakterija inkubirane su 24h na temperaturi od 37°C, dok su podloge za razvoj kvasaca i plesni (Sabouraud dekstrozni agar) inkubirane 3–5 dana na istoj temperaturi.

Mikrobiološka analiza

Poslednji korak većine mikrobioloških analiza sastoji se u identifikaciji mikroorganizama dobijenih iz kolonija koje su porasle na podlogama na kojima su zasejani uzorci.

Identifikaciji se pristupa tek pošto je na hranljivoj podlozi izolovana čista kultura. Postoje dva pristupa u identifikaciji bakterija i gljiva: jedan se oslanja na genotipske, a drugi na fenotipske karakteristike. Prilikom izučavanja nekog mikroorganizma, neophodno je pratiti niz osobina na osnovu kojih se, uz pomoć priručnika ili identifikacionog ključa, vrši identifikacija (12).

Nakon inkubacije, na pojedinim Petri pločama razvile su se kulture bakterija i gljiva. Za njihovu determinaciju do roda ispitane su mikromorfološke odlike ćelija (izgled, veličina, sporulacija i bojenje po Gramu), makromorfološke odlike kolonija (oblik, izdignutost, ivice, pigmentisanost), kao i biohemijske i fiziološke osobine na specijalnim podlogama. Za proučavanje mikromorfoloških karakteristika mikroorganizama izrađeni su mikroskopski preparati. Preparati su fiksirani metodom fizičke fiksacije (fiksacija toplotom), a sledećim postupkom: na sterilno predmetno staklo napravljen je razmaz ispitivanog materijala, a zatim je nekoliko puta provučen kroz plamen kako bi se ćelije zalepile za predmetno staklo. Kako su mikroorganizmi uglavnom poluprozračni i nebojeni, ali i zbog veoma malih ćelija, teže se uočavaju pomoću svetlosnog mikroskopa.

Zbog toga su izrađeni preparati obojeni metodom sukcesivnog bojenja, bojenja po Gramu. Diferencijalno bojenje po Gramu predstavlja jednu od najčešćih metoda složenog bojenja koje se mnogo upotrebljava u bakteriologiji. Bakterije se identifikuju na osnovu građe ćelijskog zida na Gram-pozitivne (+), Gram-negativne (-) i Gram-varijabilne (+-). U metodi bojenja po Gramu koriste se 4 hemijska reagensa. Primarna boja kojom se prelivaju preparati je kristal violet (eng. *crystal violet*). Drugi reagens koji se primenjuje je razblaženi rastvor joda i kalijum-jodida, tzv. Lugolov rastvor (eng. *Lugol's iodine*), čija je uloga da učvrsti vezu između prethodno dodate boje i supstrata. Sukcesivnim delovanjem trećeg reagensa, 96% etil-alkohola, dolazi do obezbojavanja ćelija koje ne vezuju primarnu boju. Ćelije koje vezuju kristal violet, i posle ispiranja etanolom, ostaće obojene ljubičasto. To će biti Gram-pozitivne bakterijske ćelije. Kao četvrti reagens i sekundarna boja preparat se prelijeva safraninom (eng. *safranin*). U slučaju obezbojavanja ćelija u

prethodnom koraku, one će ovog puta poprimiti crvenu boju, a takve ćelije nazivaju se Gram-negativnim. Gram-pozitivne ćelije u svom ćelijskom zidu imaju peptidoglukane koje etanol ne rastvara, tako da one i nakon postupka obezbojavanja ostaju obojene ljubičasto. Gram-negativne bakterije u svom ćelijskom zidu imaju sloj lipopolisaharida za koji se vezuje kristal violet, ali se nakon tretiranja etil-alkoholom lipopolisaharidni sloj rastvara, a samim tim se ispira primarna boja, a ćelije se obezbojavaju. U poslednjem koraku, delovanjem safranina, ćelije poprimaju crvenu boju (12). Postupak bojenja: Prethodno obeleženi i fiksirani preparati preliveni su kristal violetom, a zatim ostavljeni da odstoje 2–3 minuta. Višak boje je odstranjen uz pomoć filter papira, a potom je dodat Lugolov rastvor da deluje 1–2 minuta. Nakon toga, preparati su isprani 96% etanolom sve do trenutka obezbojavanja predmetnica. Zatim su isprani vodom kako bi se zaustavila reakcija obezbojavanja. U poslednjem koraku, preparati su preliveni safraninom koji je delovao 30 sekundi. Na kraju je boja isprana vodom, a posle sušenja, preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom, pomoću imerzionog objektiva.

Biohemijske i fiziološke odlike bakterija praćene su na specijalnim selektivnim podlogama. Selektivne podloge su ove koje stimulišu rast jedne vrste ili grupe bakterija, a inhibiraju rast ostalih. Selektivnost se postiže dodavanjem raznih supstanci ili antibiotika. U ovom istraživanju, za proučavanje biohemijskih i fizioloških osobina bakterija, korišćene su Chapmanova podloga (za izolaciju stafilokoka i diferencijaciju na osnovu njihove sposobnosti da fermentuju manitol), krvni agar (za kultivaciju izbirljivih mikroorganizama i ispitivanje njihovih hemolitičkih osobina) i UTI agar (za diferencijaciju enteričkih bakterija na osnovu njihove sposobnosti da sintetišu enzim triptofan deaminazu).

REZULTATI I DISKUSIJA

Aerobnom kultivacijom, od ukupno 25 istraženih uzoraka upotrebljenih kozmetičkih proizvoda, mikroorganizmi su izolovani u 9, što kazuje da je 36% ispitanih uzoraka bilo kontaminirano mikroorganizmima. Od tog broja, 7 uzoraka bilo je kontaminirano bakterijama, a 3 uzorka gljivicama, što znači da procenat kontaminacije bakterijama iznosi 28%, dok procenat kontaminacije gljivicama iznosi 12% od ukupno testiranih uzoraka. U Tabeli 2. su prikazani rezultati koji pokazuju redni broj uzoraka sa podacima o prisustvu i identifikaciji mikroorganizama izolovanih iz ispitanih uzoraka. Bakterijska kontaminacija pronađena je u 2 tečna pudera (od ukupno 7 testiranih), 2 proizvoda za konturisanje (od ukupno 3 testirana), 1 tečno rumenilo (od ukupno 2 testirana), 1 tečni korektor (od 3 ukupno testirana) i 2 ruža za usne (od 6 ukupno testirana). Od 7 testiranih tečnih pudera, 1 je bio kontaminiran plesnima, od 2 tečna rumenila 1, a od 6 ruževa za usne, kontaminacija je pronađena u 1 uzorku. Jedno tečno rumenilo (Uzorak br. 9) bilo je kontaminirano i bakterijama i gljivicama. Ni u jednoj maskari i senkama za oči nije detektovana mikrobiološka kontaminacija.

Tabela 2.

R.br. uzorka	Tip proizvoda	Prisustvo MO	Izolovani MO
1	Tečni puder	Da	<i>Staphylococcus sp.</i>
2	Tečno rumenilo	Ne	/
3	Proizvod za konturisanje	Ne	/
4	Tečni korektor	Da	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	Ruž za usne	Ne	/
6	Ruž za usne	Ne	/
7	Proizvod za konturisanje	Da	<i>Bacillus cereus</i>
8	Ruž za usne	Ne	/
9	Tečno rumenilo	Da	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Aspergillus sp.</i>
10	Tečni puder	Da	<i>Penicillium notatum</i> , <i>Saccharomyces sp.</i>
11	Tečni puder	Ne	/
12	Senka za oči	Ne	/
13	Ruž za usne	Da	<i>Penicillium notatum</i>
14	Senka za oči	Ne	/
15	Ruž za usne	Da	<i>Bacillus sp.</i>
16	Ruž za usne	Ne	/
17	Proizvod za konturisanje	Da	<i>Micrococcus luteus</i>
18	Maskara	Ne	/
19	Tečni puder	Ne	/

20	Tečni puder	Da	<i>Bacillus subtilis</i>
21	Tečni korektor	Ne	/
22	Tečni puder	Ne	/
23	Tečni puder	Ne	/
24	Maskara	Ne	/
25	Tečni korektor	Ne	/

U ovom istraživanju identifikacija je rađena na osnovu fenotipskih odlika mikroorganizama. Klasična fenotipska identifikacija zasniva se na uočljivim fizičkim ili metaboličkim karakteristikama nakon inkubacije kolonije koja je prethodno gajena na pločama za kulturu u prisustvu odabranih supstrata najmanje 1 dan. Dakle, fenotipska identifikacija zavisi od karakteristika kao što su potreba za rastom određenih hranljivih sastojaka, sposobnost mikroorganizma da proizvede jedan ili više specifičnih bioproizvoda, proizvodnja specifičnih enzima, fermentacija jednog ili više specifičnih šećera ili osetljivost ili otpornost na jedan ili više specifičnih antibakterijskih sredstava agensi (13). U svetu postoje komercijalizovani brzi testovi za postizanje fenotipske identifikacije. Međutim, kako su ovi testovi dostupni samo specijalizovanim laboratorijama, nije bilo mogućnosti za njihovu nabavku.

Iz uzorka br. 1 i br. 4 izolovane su bakterije iz roda *Staphylococcus* (*Staphylococcus* sp. i *Staphylococcus epidermidis*). (Slike 1, 2, 3 i 4.)

Stafilokoke su Gram-pozitivne bakterije loptastog oblika, najčešće raspoređene u vidu grozdastih formacija. Nemaju flagele, asporogene su i svrstavaju se među fakultativno anaerobne bakterije. Rod *Staphylococcus* obuhvata 32 vrste, a najznačajniji izazivači oboljenja kod ljudi su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus saprophyticus* (14). Zahvaljujući svojoj otpornosti na faktore sredine, stafilokoke mogu relativno dugo ostati izvan tela domaćina i zbog te osobine su često prisutne u različitim uzorcima kao kontaminanti, a između ostalog i kao sastavni deo mikroflore kože. *Staphylococcus epidermidis* je tipičan predstavnik oportunističkih bakterija. Lako kolonizuje sve dostupne regije čovekovog organizma ulazeći u sastav fiziološke mikroflore (14). Na hranljivom agaru formirale su se beličaste loptaste kolonije, a na Chapmanovoj podlozi crveno pigmentisane kolonije i nije bilo promene boje okolne podloge. (Slika 5.)

Zbog svoje česte prisutnosti, identifikovan je u mnogim istraživanjima koja su se bavila mikrobiološkom kontaminacijom, ali zbog svoje izuzetno male virulencije, ne izaziva zabrinutost kod istraživača.

Preventivne mere koje se najvećim delom odnose na suzbijanje stafilokoka jesu striktna primena mera lične higijene i higijene prostora (14).

Iz uzorka br. 7, br. 15 i uzorka br. 20 izolovane su vrste iz roda *Bacillus* i to *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp. i *Bacillus subtilis*. Ovaj rod broji oko 20 vrsta od kojih je, za čoveka, patogena *Bacillus anthracis*, dok su vrste *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis* uslovno patogene. Ostale vrste ovog roda nisu patogene za čoveka.

Rod *Bacillus* čine Gram-pozitivni bacili koji u nepovoljnim uslovima sporulišu (stvaraju endospore) (14). *Bacillus cereus* je pokretan fakultativno anaerobni bacil koji ne stvara kapsulu. Formira centralno postavljene endospore koje se mogu slobodno naći u prirodi i zbog toga je često prisutan kao kontaminant u uzorcima.

Na krvnom agaru ova bakterija je izazivala β hemolizu. *Bacillus subtilis* je bakterija koja formira endosporu u centru ćelije i ne deformiše oblik tela. Spore su ubikvitarne i nalaze se slobodno u prirodi, a često je ova vrsta izolovana i na površinama raznih predmeta. *Bacillus subtilis* je deo normalne mikroflore čoveka, ali u retkim slučajevima može izazvati infekcije, pre svega iritaciju sluzokože vežnjače, a onda i konjuktivitis kod imunokompromitovanih osoba (15). Ova bakterija je na krvnom agaru izazivala β hemolizu. (Slike 6, 7, 12, 13, 16, 17 i 8.)

Iz uzorka br. 9 i uzora br. 17 izolovana je bakterija *Micrococcus luteus*. Ova vrsta formira Gram-pozitivne, a vrlo često i Gram-varijabilne, nepokretne, u tetradu složene, loptaste ćelije vidljive pod imerzionim objektivom. Na hranljivom agaru formira bleđožute loptaste kolonije. Obavezni je aerob, široko rasprostranjen u prirodi, a samim tim je i često izolovan sa uzoraka kože. Kolonizuje sluzokožu usne i nosne šupljine, a često i gornje respiratorne organe. Za identifikaciju je korišćen krvni agar na kome je pokazan koagulaza-negativan rezultat. (Slike 10, 11, 14, 15 i 8.) Iako veliki broj naučnika ovu vrstu smatra apatogenom, kod imunokompromitovanih osoba ona ponekad može izazvati infekcije (15).

Uzorci br. 9, br. 10 i br. 13 bili su kontaminirani gljivicama i to vrstom iz roda *Aspergillus* sp. (uzorak br. 9), roda *Penicillium* – *Penicillium notatum* (uzorci br. 10 i br. 13) i vrstom iz roda *Saccharomyces* sp. (uzorak br. 10). (Slika 18. Slika 19. Slika 20. Slika 21. Slika 22. Slika 23.)

Na Sabouraud dekstroznom agaru pojavile su se beličasto-žute kolonije koje su na naličju bile svetlonarandžaste. Uporednim posmatranjem morfoloških odlika kolonije, u uzorku br. 9 potvrđeno je prisustvo vrste iz roda *Aspergillus*. Na Sabouraud dekstroznom agaru, gde su zasejani mikroorganizmi iz uzoraka br. 10 i br. 13, u početku su formirane bele kolonije, a zatim su one postale zelenkasto-plavo pigmentisane, na osnovu čega se moglo pretpostaviti da je reč o vrsti *Penicillium notatum*.

Uporednim posmatranjem morfoloških odlika kolonije potvrđeno je prisustvo vrste *Penicillium notatum*.

Mnogobrojne vrste ovih rodova rasprostranjene su svuda u okruženju, a zbog svoje česte prisutnosti, identifikovane su u mnogim istraživanjima koja su se bavila mikrobiološkom kontaminacijom. Micete gljivica iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* često se mogu naći na koži, paranazalnim sinusima, nosnim šupljinama, ušnom kanalu i patološki izmenjenim noktima zbog čega se, između ostalog, lako prenose na uzorke kozmetike. Gljivične infekcije kože izazvane plesnima su vrlo retke, spore ovih plesni mogu izazvati alergijsku reakciju, a uglavnom se dešavaju kod osoba sa slabim imunitetom (15).

Iz uzorka br. 10 izdvojena je još jedna gljiva, kvasnica iz roda *Saccharomyces*. Na hranljivoj podlozi formirane su loptaste beličaste kolonije, a mikroskopiranjem je utvrđeno da se radi o vrsti iz roda *Saccharomyces*. Kvasci su jednoćelijski, eukariotski organizmi koji imaju sposobnost da razvijaju višećelijske karakteristike formirajući nizove povezanih pupajućih ćelija poznatih kao pseudohife ili lažne hife (12). Vrste ovog roda su široko rasprostranjene u svetu, izuzetno su prisutne u okruženju i nemaju patogene svojstva, te ne predstavljaju opasnost po čoveka. Ako se obrati pažnja na sastav proizvoda gde je došlo do kontaminacije gljivicama, primetiće se da uzorci br. 9 i br. 10 u svom sadržaju imaju supstance koje mogu uticati na formiranje akni (eng. *support fungal acne*), a to su gliceril-oleat, askorbil-palmitat i tribehenin (eng. *Glycerol Oleate, Ascorbyl Palmitate, Tribehinin*) (16).

Uzimajući u obzir prethodna istraživanja o mikrobiološkoj kontaminaciji kozmetičkih uzoraka (17) (18) (19) (20), gde su kao najfrekventniji patogeni identifikovani *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter sp.* i *Candida albicans*, dobijeni rezultati u ovom istraživanju pokazuju da u uzetim uzorcima nisu bile prisutne ove bakterije i gljivice. Na Chapmanovoj podlozi nije dokazano prisustvo koagulaza pozitivnog *Staphylococcus aureus*-a i podloga nije promenila boju. Zasejavanjem na UTI agaru ispitano je prisustvo Gram-negativnih bakterija, a dobijeni rezultati su pokazali da se one nisu našle u uzorcima. Posledica proliferacije mikroorganizama u kozmetičkim proizvodima je i degradacija sastojaka i narušavanje organoleptičkih karakteristika proizvoda koje se manifestuje kao vidljivo prisustvo mikroorganizama i/ili pojava neprijatnog mirisa, promena pH vrednosti, teksture, viskoziteta i boje itd (19). Da bi se minimizirala mikrobiološka kontaminacija, neophodna je upotreba hemijske zaštite, a to se u najvećem broju slučajeva postiže konzervansima. Konzervansi su supstance koje se dodaju u kozmetičke preparate da bi u određenom vremenu sprečile rast mikroorganizama i neželjene hemijske reakcije koje bi mogle da unište sam proizvod. To su antimikrobni sastojci koji sprečavaju razvoj bakterija i plesni u proizvodu i produžavaju mu rok trajanja. Nalaze se u svim proizvodima koji u svojim formulacijama sadrže vodu, jer je voda pogodna sredina za stvaranje mikroba. Samo je nekoliko kozmetičkih proizvoda stabilno bez dodavanja konzervansa. Tu spadaju proizvodi sa visokim nivoom alkohola, kao i proizvodi koji sadrže veoma malo ili nimalo vode. Pored toga, postoji i par prirodnih materijala koji sadrže supstance za koje se kaže da imaju antimikrobni efekat. Tu spadaju na primer propolis, kora cimeta, ulje karanfilića itd., ali ove supstance nisu adekvatno istražene za upotrebu kao konzervansi u kozmetičkoj industriji (21).

U Tabeli 1. boldovani su konzervansi (22) korišćeni u proizvodnji uzorkovanih kozmetičkih proizvoda.

U Tabeli 3, radi bolje preglednosti, izdvojeni su konzervansi upotrebljeni u kontaminiranim proizvodima:

Tabela 3.

R. br. uzorka	Tip proizvoda	Konzervansi
1.	Tečni puder	Fenoksietanol i etilheksiglicerol u kombinaciji (eng. <i>Phenoxyethanol i Ethylhexylglycerin</i>), kalijum-sorbat (eng. <i>Potassium Sorbate</i>) i natrijum-benzoat (eng. <i>Sodium Benzoate</i>)
4.	Tečni korektor	Sastav ovog proizvoda nije naznačen na pakovanju, niti ga je moguće pronaći.
7.	Proizvod za konturisanje	Proizvod ne sadrži nijedan konzervans.
9.	Tečno rumenilo	Fenoksietanol i etilheksiglicerol u kombinaciji (eng. <i>Phenoxyethanol i Ethylhexylglycerin</i>)
10.	Tečni puder	Proizvod ne sadrži nijedan konzervans.
13.	Ruž za usne	Sastav ovog proizvoda nije naznačen na pakovanju, niti ga je moguće pronaći.
15.	Ruž za usne	Sastav ovog proizvoda nije naznačen na pakovanju, niti ga je moguće pronaći.
17.	Proizvod za konturisanje	Proizvod ne sadrži nijedan konzervans.
20.	Tečni puder	Pentilen-glikol (eng. <i>Pentylene Glycol</i>)

Tri proizvoda (proizvodi za konturisanje i jedan tečni puder) u svom sastavu nisu sadržali konzervanse. Značajan rizik za sigurnost potrošača jesu proizvodi bez adekvatne mikrobiološke zaštite. Naime, proizvodi bez konzervansa će brže razviti mikroorganizme, a njihov razvoj će dovesti do vidljivih promena u izgledu proizvoda. Jedan proizvod (tečni puder) sadrži pentilen-glikol (eng. *Pentylene Glycol*). Pentilen-glikol je hemijski proizvedeni

emulgator. Ima antimikrobno svojstvo, jer kao dihidrični alkohol sprečava u određenoj koncentraciji umnožavanje neželjenih mikroorganizama. Međutim, ovakav konzervans ne štiti kožu nakon nanošenja proizvoda. Naprotiv, u mnogim slučajevima može čak i da nanese štetu i izazove alergijsku reakciju. Iako ova supstanca nije klasifikovana kao opasna i toksična, a senzibilizacija kože praktično eliminisana zbog drugih supstanci u proizvodima, pentilen-glikol nije naveden kao klasični konzervans (22). To znači da su proizvodi označeni kao „bez konzervansa“. Čak tri proizvoda (dva ruža za usne i tečni korektor), od ukupno 9 kontaminiranih, nije imalo naznačene podatke o svom sastavu, što otvara mogućnost da proizvod nema konzervanse. Nedovoljna informisanost o proizvodu, njegovoj upotrebi i držanju direktno može uticati na brži razvoj mikroorganizama, što potencijalno opasno može uticati na zdravlje korisnika.

Dva tečna proizvoda (puder i rumenilo) u svom sastavu sadrže fenoksietanol i etilheksilglicerin u kombinaciji (eng. *Phenoxyethanol* i *Ethylhexylglycerin*). Fenoksietanol i etilheksilglicerin su podjednako efikasni protiv bakterija i gljiva. To je tipično biostatski proizvod sa biocidnim svojstvima neophodnim za praktičnu upotrebu. U kombinaciji čine konzervans širokog spektra delovanja. Međutim, da bi fenoksietanol i etilheksilglicerin efikasno delovali u uništavanju organizama u već kontaminiranim proizvodima, potrebno je minimalno vreme kontakta od 48 sati. Budući da se efekat fenoksietanola i etilheksilglicerina odvija hemijskim reakcijama sa mikroorganizmima kada se koristi u jako kontaminiranim proizvodima, to znači da se efikasnost ovog konzervansa gubi, pa se mikroorganizmi mogu uspešno razvijati na uzorku. Jedan tečni puder sadržao je natrijum-benzoat (eng. *Sodium Benzoate*) i kalijum-sorbat (eng. *Potassium Sorbate*) koji deluju kao baktericidi i fungicidi, te se zbog toga upotrebljavaju kao konzervansi u kozmetičkim proizvodima. Natrijum-benzoat se često kombinuje sa kalijum-sorbatom u proizvodima sa niskim Ph, kako bi se obezbedio sinergijski efekat konzervansa protiv kvasca i plesni (23). Međutim, kako je za ovo istraživanje korišćen otvoreni test-uzorak, treba uzeti u obzir da je pH vrednost promenjena usled dugog stajanja na otvorenom, te da je vremenom aktivnost ovih supstanci oslabljena, što je prouzrokovalo proliferaciju bakterija.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog, kao i prethodnih istraživanja, pokazali su da su kozmetički proizvodi pogodan medijum za razvoj mikroorganizama. Dobijeni nivo kontaminacije test-uzoraka ukazuje na to da korisnici u radnjama upotrebljavaju izložene proizvode, ali i da mikroorganizmi mogu „sami“ dospeti iz vazduha zbog svog širokog rasprostranjenja i otpornosti na sredinske uslove. Iz celokupnog istraživanja se može zaključiti da je mikrobiološka kontaminacija jedan od najkritičnijih parametara za kvalitet kozmetike i bezbednost korisnika. Rizik za kontaminaciju kozmetičkih proizvoda mora se razmotriti u svim aspektima „životnog veka“ kozmetičkih proizvoda (počev od izbora sastojaka, konzervansa, uslova proizvodnje, karakteristika pakovanja i mogućih preporuka/uputstava za upotrebu kozmetičkih proizvoda) (7). Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je širok spektar konzervansa razvijen za borbu protiv kontaminacije usled ponovljene upotrebe od strane potrošača, jer je 64% proizvoda bilo u potpunosti bez kontaminacije, a kontaminirani deo uzoraka nije sadržao patogene mikroorganizme koji bi nepoželjno uticali na zdravlje potrošača. Iako pojedini konzervansi mogu izazvati slabije alergijske reakcije kod imunokompromitovanih osoba, u današnje vreme održavanje ravnoteže između zaštite od mikrobiološke kontaminacije i ograničavanja zdravstvenih rizika konzervansa predstavlja umetnost očuvanja. Trenutni trendovi na terenu uključuju istraživanje novih molekula s biocidnom snagom i dobrom toksikološkom kompatibilnošću, analizu sinergizama i antagonizama mešavina konzervansa i potragu za brzim, pouzdanim metodama za otkrivanje mikrobiološke kontaminacije i ispitivanje efikasnosti konzervansa u svakoj formulaciji.

Dobijeni rezultati, takođe, ukazuju i na nedostatak informisanosti i predstavljaju značajan doprinos za podizanje svesti o eventualnim zdravstvenim problemima koji se mogu manifestovati na koži upotrebom neadekvatno izloženih uzoraka. Neophodno je promovisati pojačanje higijenskih uslova u prodavnicama gde su izloženi test-uzorci, nadgledati ponašanje potrošača i onemogućiti aplikaciju uzoraka na delovima lica i tela. Štaviše, poželjno bi bilo sprovesti i edukacije o higijeni i pravilnoj upotrebi kozmetičkih proizvoda.

LITERATURA

- (1) Unknown. U.S. Food and Drug Administration. [Online].; 2010 [cited 2020 09 24. Available from: <https://www.fda.gov/>.
- (2) Power C. Women in Prehistoric Rock Art. *New Perspectives on Prehistoric Art*. 2004; 75140.
- (3) Britannica E. *Encyclopædia Britannica*. 15th ed. London: Encyclopædia Britannica; 2010.
- (4) Angeloglou M. *History of Make-up* Worthing: Littlehampton Book Services Ltd.; 1970.
- (5) Marina M. Menadžment kozmetičkih proizvoda i njihova kastimizacija na globalnom tržištu. Niš: University of Niš, Inženjerski menadžment; 2016.
- (6) I.M. Michalek SMJFLCdS. Microbiological contamination of cosmetic products –observations from Europe, 2005–2018. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2019.
- (7) Danina Krajišnik LD. Mikrobiološka bezbednost kozmetičkih proizvoda i potencijalni rizici za potrošače. In ; 2018; Beograd. p. 949–970.
- (8) Biopharm. <https://food.r-biopharm.com/>. [Online].; 2015 [cited 2020 09 30. Available from: <https://food.r-biopharm.com/news/microorganisms-cosmetics-can-your-makeup-make-you-ill>.
- (9) 27/13 SIEu. <http://eurlex.europa.eu>. [Online].; 2009 [cited 2020 09 30. Available from: <http://eurlex.europa.eu/oj/direct-access.html?locale=hr>.
- (10) Safety SCoC. <https://ec.europa.eu/>. [Online]. [cited 2020 09 30. Available from: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety_en.
- (11) Unknown. <http://www.oxoid.com/>. [Online]. [cited 2020 10 01. Available from: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0949.
- (12) Mihajlov-Krstev T. *Praktikum iz mikrobiologije*. 1st ed. Niš: Prirodno-matematički fakultet.
- (13) Bou G,FOA,GC,SNJA,VS. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2011; 29(601).
- (14) Vlahović MŠ. *Medicinska bakteriologija* Beograd: Savremena administracija; 2008.
- (15) Karakašević B. *Mikrobiologija i parazitologija*. V ed. Beograd: Medicinska knjiga; 1987.
- (16) <https://folliculitisscout.com/>. [Online]. [cited 2020 10 05. Available from: <https://folliculitisscout.com/>.
- (17) Fatma Kaynak Onurdağ SÖDA. Microbiological Investigation of Used Cosmetic Samples. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2010 January 2010; Volume 30.
- (18) Leila Dadashi RD. Investigating incidence of bacterial and fungal contamination in shared cosmetic kits available in the women beauty salons. *Health Promot Perspect*. 2016 Jun; 3.
- (19) Krzysztof Skowron AJABAKKGe. Microbiological purity assessment of cosmetics used by one and several persons and cosmetics after their expiry date. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2017 Feb; 68.
- (20) Edlira Neza MC. Microbiological Analysis of Cosmetics. *Cosmetics*. 2016.
- (21) Karin K. *Farmaceutska tehnologija I*.
- (22) Gazzete FL. Buzer.de. [Online].; 2014 [cited 2020 10 05. Available from: <http://www.buzer.de/gesetz/487/a6088.htm>.
- (23) lotioncrafter.com/. [Online]. [cited 2020 10 05. Available from: <https://lotioncrafter.com/products/sodium-benzoate>.
- (24) Olson K. Cosmetics in Roman Antiquity: Substance, Remedy, Poison. *Cosmetics in Roman Antiquity*. 2009 Mar; p. 291-310.
- (25) Milan Savić SV. *Suve podloge* Beograd: Torlak – Institut za virusologiju, vakcine i serume ; 2010.

MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF USED COSMETIC SAMPLES

Author: ANA MILENKOVIĆ

e-mail: ana.milenkovic1@pmf.edu.rs

Mentor: TA Nikola Stanković

Department of Biology and Ecology

Faculty of Sciences and Mathematics, University of Nis

Introduction: Decorative cosmetics play an important role in human lives. The use of cosmetic products in recent years has seen a big increase not only in the population of women, but also men and children. Today shelves in all the drugstores and perfumeries are well stocked with test samples in various colors and shades, and available to all consumers. Using the samples with unclean hands leads to contamination of the products. Microorganisms that can be found there cause spoilage of the cosmetic products, and in addition, they can have adverse effects on the health of the customer, ranging from redness and itching to severe skin infections.

Aim: Examine the purity of samples of face and eye cosmetics displayed in drugstores; isolate and identify bacteria and fungi; analyze the presence and quantity of pathogens in samples; present the most important pathogenic species and indicate their potential health hazard to users.

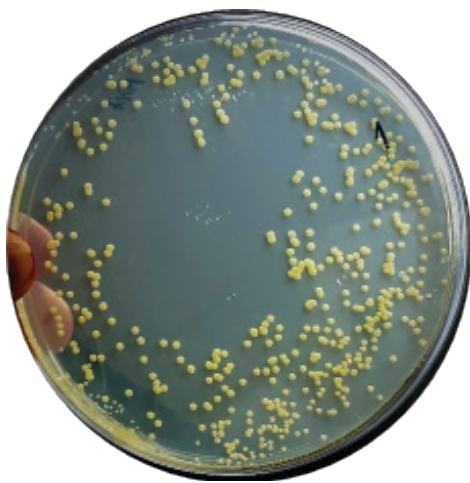
Material and Methods: The material was collected from 5 randomly selected drugstores and perfumeries on the territory of the city of Nis during August 2020. A total of 25 make-up samples were analyzed under sterile laboratory conditions to examine the presence of microorganisms. For the determination of the present microorganisms, micromorphological characteristics of cells, macromorphological characteristics of colonies, as well as biochemical and physiological properties on special substrates were examined.

Results: By aerobic cultivation, out of a total of 25 examined samples of the cosmetic products used, microorganisms were isolated in 9, which shows that 36% of the tested samples were contaminated with microorganisms. The percentage of bacterial contamination is 28%, while the percentage of fungal contamination is 12% of all the samples tested. The presence of opportunistic Gram-positive bacteria and fungi poses a potential health risk to immunocompromised users.

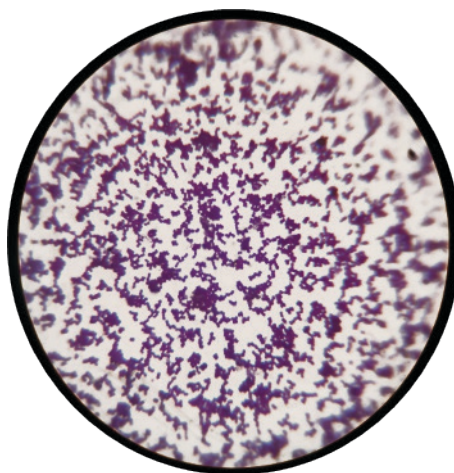
Conclusion: The obtained level of contamination of the test samples indicates that microorganisms can get into the samples from the air due to their wide distribution and resistance to environmental conditions. The obtained results are a significant contribution to raising awareness of possible health problems that may be manifested on the skin when using inadequately exhibited samples.

Keywords: cosmetic samples; microbial contamination; bacteria; fungi

PRILOG



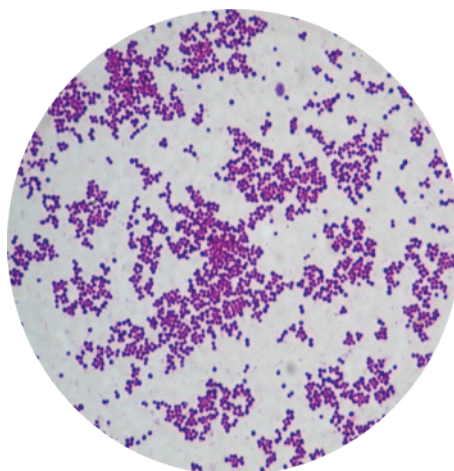
Slika 1.



Slika 2.



Slika 3.



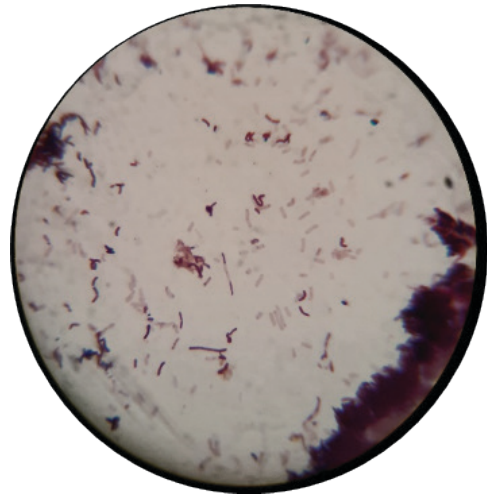
Slika 4.



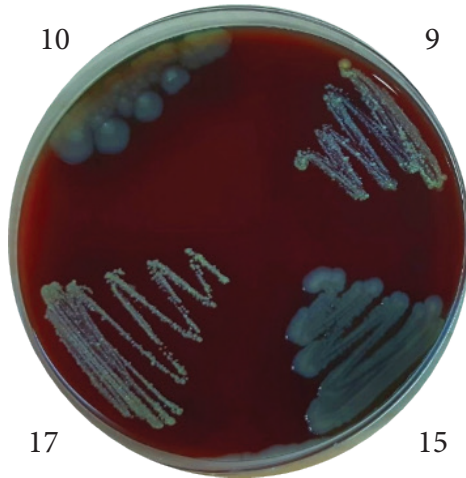
Slika 5.



Slika 6.



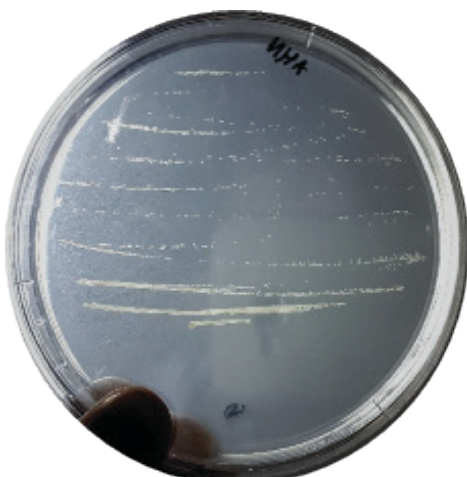
Slika 7.



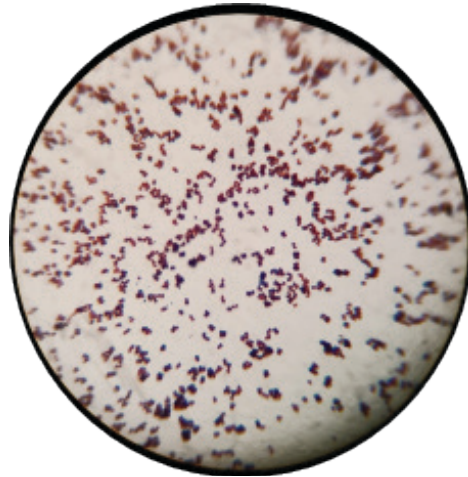
Slika 8.



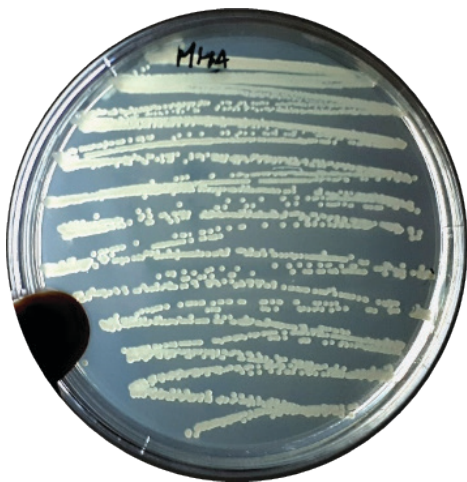
Slika 9.



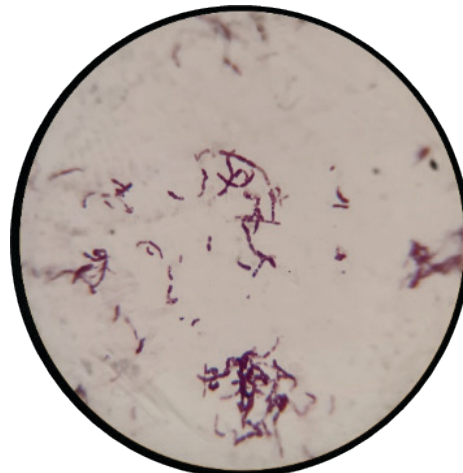
Slika 10.



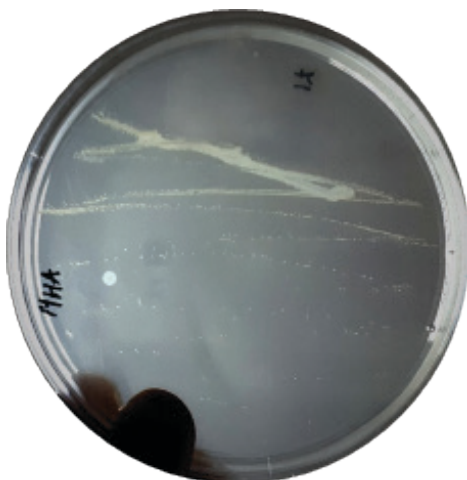
Slika 11.



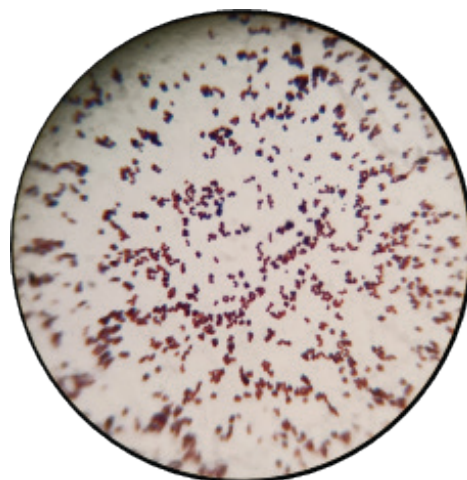
Slika 12.



Slika 13.



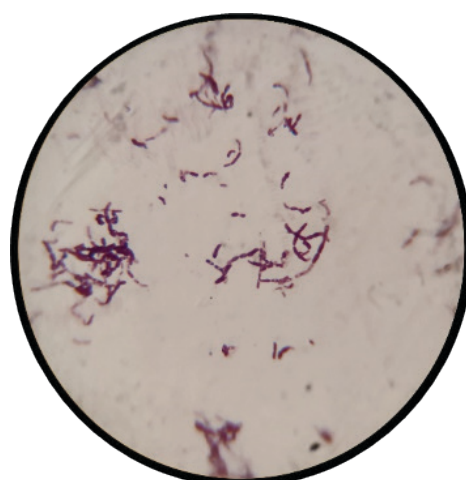
Slika 14.



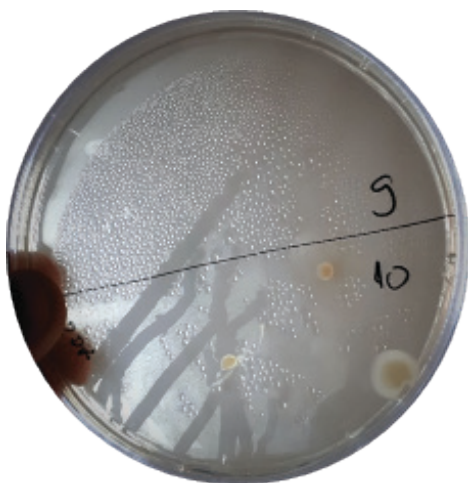
Slika 15.



Slika 16.



Slika 17.



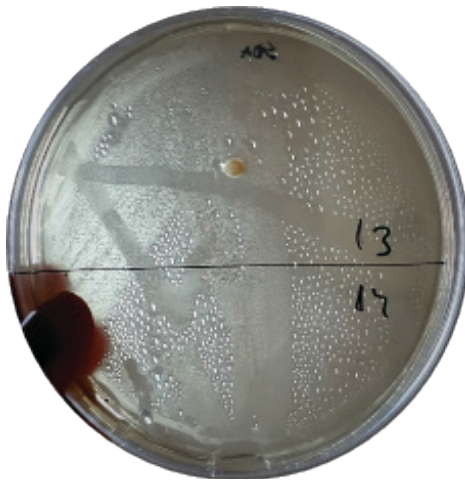
Slika 18.



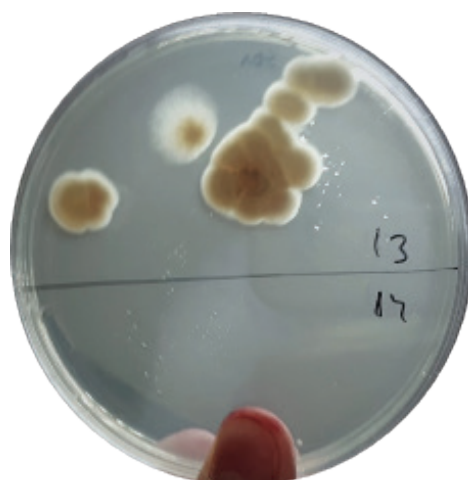
Slika 19.



Slika 20.



Slika 21.



Slika 22.



Slika 23.

MOGUĆNOSTI TURISTIČKE VALORIZACIJE GEOPOTENCIJALA PODRUČJA ZUBAČKA UBLA – GRAD TREBINJE (PRISTUP PROSTORNO-FUNKCIONALNOJ ORGANIZACIJI)

Autor: DEJAN PUHALO

e-mail: dejanpuhalo3@gmail.com

Mentor: Prof. dr Mira Mandić

Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Uvod: Predmet rada je geoprostorna cjelina Zubačka Ubla, koja teritorijalno pripada Gradu Trebinju. Raspolaze prirodnim i antropogenim vrijednostima, nedovoljno poznatim i nevalorizovanim, čije bi stavljanje u funkciju razvoja turizma doprinosilo turističkoj ponudi Grada Trebinja i ukupnom razvoju. Posmatrana geoprostorna cjelina ima povoljan geografski položaj i izuzetnu heterogenost u kojoj su identifikovani, analizirani i klasifikovani potencijalni turistički motivi, predloženi oblici turističke valorizacije izdvojenih geografskih potencijala i lokaliteta. Predloženom prostorno-funkcionalnom organizacijom analizirane cjeline teži se zadržati identitet mjesta i uspostaviti koncept održivog razvoja ruralnog turizma.

Cilj rada: Cilj rada je formulisanje razvojne strategije zasnovane na kompleksnoj i sistematičnoj analizi geopotencijala koja može predstavljati osnovu za donošenje utemeljenih odluka i idejnih rješenja lokalne zajednice pri valorizaciji i uređenju Zubačkih Ubala, „pasivne zone” u turističkoj regiji Trebinja.

Materijali i metode: Metodama analize, terenskog rada, opservacije, komparacije, sinteze i kartiranja utvrđeno je postojeće stanje prirodnih i antropogenih vrijednosti i izloženost rizicima. Definirano je idejno rješenje valorizacije i prostorno-funkcionalne organizacije proučavane prostorne cjeline.

Rezultati: Terenskim istraživanjem je utvrđeno: dostupnost lokaliteta, infrastrukturne potrebe, izgrađenost prostora, smještajni kapaciteti i ukupno stanje resursa. Identifikovani su razvojni problemi, ograničenja i potencijali.

Zaključak: Analizom posmatranog prostora zaključuje se da područje Zubačka Ubla raspolaze potencijalima za razvoj vikend, izletničkog, lovnog, kamp, sportsko-rekreativnog, seoskog i eko-turizma. Uspostavljanje navedenog prostora u atraktivni turistički lokalitet uslovljeno je stepenom očuvanosti ekosistema, adaptacijom i izgradnjom infrastrukture, racionalnom prostorno-funkcionalnom organizacijom i animiranjem lokalnog stanovništva.

Ključne riječi: Zubačka Ubla; valorizacija geopotencijala; turizam; prostorno-funkcionalna organizacija

UVOD

Geoprostorna cjelina Zubačka Ubla, smještena u južnom perifernom prostoru Grada Trebinja (MZ Zupci), predstavlja ruralni prostor izuzetnih fizičko-geografskih i ambijentalnih vrijednosti. Analizirana cjelina ima povoljan saobraćajno-geografski i ukupan geografski položaj, očuvanog geosistema, koji je pogodan za turističku valorizaciju. Navedeni lokalitet u turističkoj zoni Hercegovine nije uključen u aktivnu turističku ponudu Grada Trebinja i nije tretiran strateškim dokumentima koji se odnose na turizam. Ovim radom se teži prikazati ambijentalne vrijednosti (prirodne i antropogene) i definisati moguću turističku valorizaciju pojedinih geosistema. Na osnovu valorizacije geopotencijala, definisani su savremeni pravci razvoja koji podrazumijevaju zaštitu, unapređenje i prezentovanje prirodnih i antropogenih vrijednosti, izgradnju infrastrukture, planski pristup prostoru uz uvažavanje svih aspekata njegove održivosti. Vrednovanjem i aktiviranjem prostora, podizanjem stepena infrastrukturne uređenosti i efikasnijom prostorno-funkcionalnom organizacijom Zubačkih Ubala, čiji potencijali su nedovoljno valorizovani, dalo bi za rezultat visoko vrednovani turistički lokalitet. Vrednovani turistički lokalitet pozicioniran je u graničnom prostoru prirodno-geografskih turističkih cjelina i turističko-geografskih područja (planinskog i primorskog). Blizina visoko vrednovanog turističkog prekograničnog prostora Hrvatske i Crne Gore ima veliku ulogu u jačanju turističkog razvoja prostora Hercegovine, gdje se nalazi analizirana prostorna cjelina. Identifikacija turističkih potencijala, njihova zaštita, umrežavanje u sistem turističke ponude šireg prostora i konačno prezentovanje, u cilju su ukupne održivosti prostornog razvoja. Pored identifikacije mogućih potencijala, terenska istraživanja se baziraju na utvrđivanju prirodnih, infrastrukturnih i funkcionalnih ograničenja koja postoje na predmetnom području. Kroz rad se teži uspostaviti

optimalna prostorna ravnoteža između stepena iskorišćenosti, održivosti kulturnog identiteta, jačanja pojedinih geosistema, uključenosti socioekonomske održivosti lokalnog stanovništva i akcionih grupa. Sistematičnom analizom geopotencijala, mogućnosti i ograničenja prostora, na kojima se zasniva „vizija” budućeg razvoja, teži se formiranju održive turističke prostorno-funkcionalne cjeline. Kompleksna valorizacija i uključenost lokalnog stanovništva omogućava formiranje turistički atraktivnog lokaliteta hercegovačke turističke ponude, održivog unutar svojih granica i sa mogućim pozitivnim uticajem na aktiviranje okolnog turistički pasivnog prostora i ukupnu turističku pozicioniranost Grada Trebinja. U radu su obrazloženi potencijalni razvojni pravci koji objedinjuju razvojne ciljeve i mogućnosti postizanja veće aktivnosti stanovništva, socioekonomskog razvoja i bolje očuvanosti geosistema, što u konačnom može povoljno uticati na socioekonomski razvoj Grada Trebinja. Rad predstavlja potencijalni model formiranja novog turističkog sadržaja i formiranja kompleksne aktivne destinacije u turističkoj ponudi Grada Trebinja, čiji je cilj identifikacija i reanimacija ruralnih prostora, odnosno njihovo uključivanje u savremene društvene procese.

Predmet istraživanja je ruralni prostor Zubačka Ubla, dio teritorije Grada Trebinja, visokih ambijentalnih vrijednosti, koji prirodnom i antropogenom strukturom posjeduju velike mogućnosti razvoja ruralnog turizma. „Relf tvrdi da su fizički razmještaj, aktivnost i značenje tri osnovna elementa kojima se identifikuje mjesto“ [1, str. 12.]. Kompleksnom valorizacijom predmetnog područja, zaštitom geopotencijala i definisanjem potrebnih mjera i aktivnosti, pozitivno bi se uticalo na razvoj turizma. Radom se analiziraju prirodne i stvorene strukture predmetnog područja, njihova očuvanost i mogućnost valorizacije u kontekstu razvoja turizma.

Cilj rada je da se na osnovu kompleksne analize geopotencijala u cilju turističke valorizacije definišu mjere i aktivnosti očuvanja, valorizacije i pokretanja kompleksne cjelogodišnje aktivne turističke destinacije, prostorno-funkcionalno organizovane u duhu svih aspekata održivog razvoja. Predstavljanje prirodnih vrijednosti i mogućih oblika vrednovanja i aktivnosti stanovništva ima za cilj promociju turističkih potencijala i podsticanje socioekonomskog razvoja Grada Trebinja. Uočavanje ograničenja (pravnih, planskih, infrastrukturnih, organizacionih i dr.) u cilju je sistemskog pristupa planiranju prostora i razvoja, otklanjanja prepreka, unapređenja prostorno-funkcionalne organizacije i pozicioniranja u regionu. Ovim radom se teže akcentovati planska načela koja će uskladiti ekološke i socioekonomske aspekte razvoja, uskladiti fizičke strukture i prirodnu sredinu.

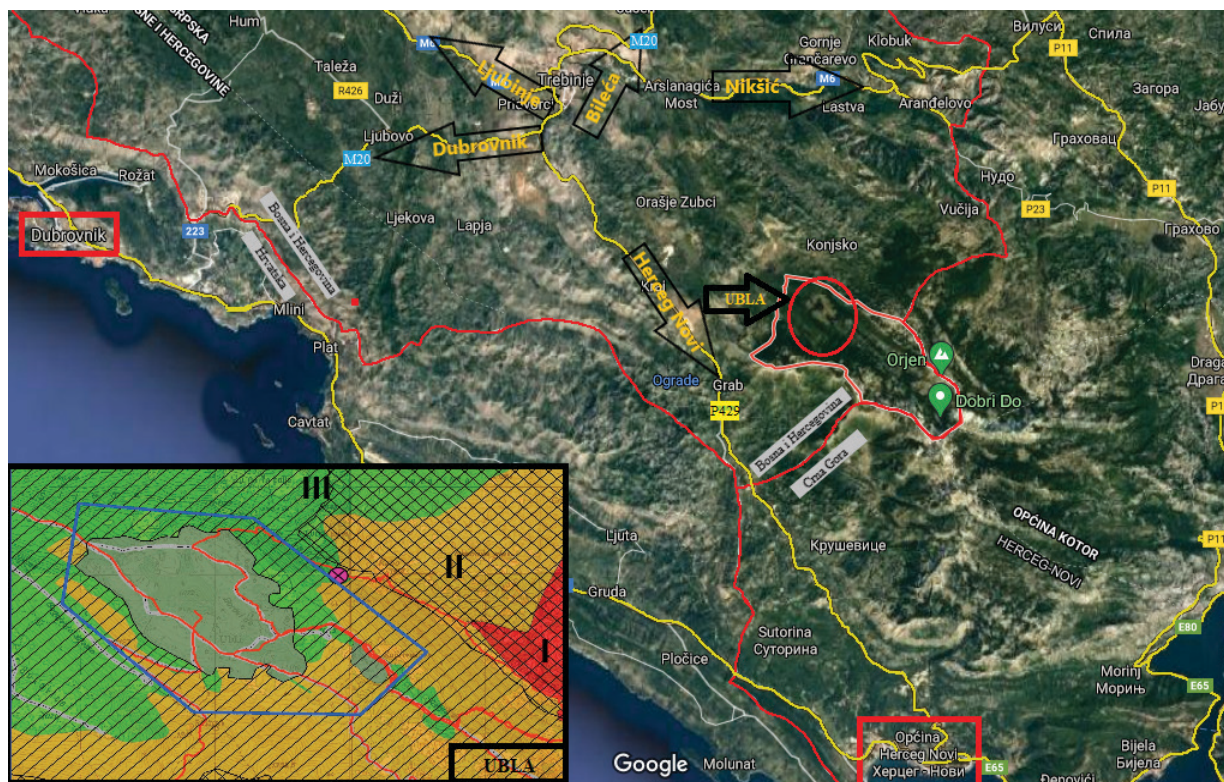
Zadaci istraživanja su identifikacija prostorne cjeline kao potencijalne turističke destinacije kroz kompleksnu geoprostornu analizu. Jedan od ključnih zadataka je uspostavljanje efikasne prostorno-funkcionalne organizacije posmatranog prostora kao aktivne turističke destinacije u duhu principa održivog razvoja. Zadaci koji se prožimaju kroz rad:

- analiza turističko-geografskog položaja predmetnog područja;
- izdvajanje i analiza prirodno-geografskih i antropogeografskih vrijednosti koje odlikuju predmetno područje i njihova turistička valorizacija;
- utvrđivanje mogućnosti prostorno-funkcionalne transformacije u cilju pokretanja turističkih aktivnosti;
- definisanje kompleksne turističke valorizacije i efikasnije prostorno-funkcionalne organizacije (potencijalni model organizacije prostora u funkciji turizma);
- procjena uticaja predloženog „modela“ razvoja predmetnog područja na održivost razvoja Zubačkih Ubala i razvoja turizma Grada Trebinje.

Opšte karakteristike turističkog položaja Trebinja i Zubačkih Ubala

Grad Trebinje ima povoljan geografski položaj na osnovu čijih se prednosti mogu definisati autentični razvojni pravci. Smješten u graničnom pojasu Dubrovnika (Republika Hrvatska) i Herceg Novog (Crna Gora), u turističkoj mediteranskoj zoni predisponira mogućnost većeg uključivanja u turističku ponudu i kretanja [Prilog 1]. Bliskost sa Mediteranom se naglašava u prirodno-geografskoj strukturi prostora i kulturnom nasljeđu, što utiče na specifičnosti i autentičnosti Grada Trebinja. Planinsko kontinentalno zaleđe očuvanog biodiverziteta nudi brojne mogućnosti za različite vidove turizma. Navedeni faktori pozitivno utiču na mogućnost definisanja održivog razvoja turizma i povećanje turističkog kretanja u regionu i šire [2, 3]. Značaj i uloga saobraćajne infrastrukture je ključna za dostupnost i umreženost potencijalnih turističkih lokaliteta i uspostavljanje održivog razvoja turizma [4]. Dakle, jačanju turističkog razvoja ide u prilog dobra povezanost južnog submediteranskog prostora Republike Srpske (Bosne i Hercegovine) sa središnjim planinsko-kotlinskim i sjevernim peripanonskim prostorom. Od vitalnog značaja za razvoj turizma jeste transgranična saradnja koja omogućava različite vidove infrastrukturnog povezivanja i umrežavanja turističkog lokaliteta i turističkih regija u prekograničnim oblastima RS/BiH sa Hrvatskom i Crnom Gorom, relativna blizina sa Srbijom (Tara, Zlatibor, Mokra gora), čime se uvećava heterogenost turističke ponude i brojnost turističke klijentele. Stoga je potrebno uticati na raznovrsnost turističkih sadržaja i destinacija Grada Trebinja. U dosadašnjoj praksi razvoja turizma, uglavnom je vrednovan urbani prostor Trebinja, te je nužno turistički vrednovati veliki i heterogen potencijal ruralnog prostora i aktivirati stanovništvo, čime bi se pozitivno uticalo na socioekonomski razvoj i održivost ruralnog prostora. Ruralni prostor teritorije Grada Trebinja čini oko 84% od ukupne teritorije (904 km²), što ide u prilog neophodnosti reanimacije i revitalizacije ruralnih prostora u cilju postizanja uravnoteženog prostornog razvoja [2]. Razvojem

ruralnog turizma u značajnoj mjeri može se uticati na integralni i održivi razvoj sela kroz stimulisanje razvoja poljoprivrede i raznih oblika turizma sa težištem na seoskom turizmu, zasnovanom na postojećem geopotencijalu, jačanju smjestajnih kapaciteta i infrastrukture. Ruralni turizam na području Grada Trebinja nije zaživio, nisu na adekvatan način prepoznate vrijednosti ruralnog prostora, prirodne i kulturne. Planskim definisanjem razvoja ruralnog turizma na teritoriji Grada Trebinja u značajnoj mjeri može se uticati na povećanje raznolikosti turističke ponude i jačanje privrede Grada [5, 6, 7, 8, 9].



Prilog 1. Položaj analizirane geoprostorne cjeline (Ubla) u odnosu na širi saobraćajno-geografski položaj

Dakle, analizom i klasifikacijom se teži diferencirati potencijalna lokacija Zubačka Ubla, smještena na brdsko-planinskoj zaravni, unutar granica MZ Zubci, čija ukupna površina iznosi oko 200 km² [10]. Sjeveroistočno od Zubaca prostire se Klobuk i Lastva, kao dvije manje naseljene geoprostorne cjeline, sa istočne strane graniči sa crnogorskim Ridinama (srednjovjekovna župa Dračevica, prostor oko današnjeg Herceg Novog) i sa zapadne strane graniči sa Petrovim poljem (Trebinje). Unutar teritorijalnog obuhvata Zubaca, nalazi se nekoliko sela, većih i manjih prostornih cjelina, naseljenih i nenaseljenih. Uslovno, mogu se diferencirati neke od naseobinskih cjelina: Tuli, Bravenik (Ilijine grede i Bogojevića selo), Konjsko (Radešići, Carevo Polje) [10]. Diferenciranošću Ubala na osnovu visokih i očuvanih ambijentalnih vrijednosti (prirodnih i antropogenih), navedeni prostor može se posmatrati kao potencijalni turistički lokalitet značajnog, do sada nevalorizovanog potencijala. Dobra saobraćajna povezanost Trebinje–Dubrovnik (Republika Hrvatska) odvija se magistralnim putem „M20”, što predstavlja dobru saobraćajnu sponu u dužini od oko 32 km. Saobraćajna povezanost Trebinje – Herceg Novi (Republika Crna Gora) odvija se regionalnim putem „R429”, sa udaljenošću oko 40 km [Prilog 1]. Iz navedenog se zaključuje čvrsta međusobna povezanost Grada Trebinja sa okruženjem, što utiče na definisanje razvojnih pravaca. Ukupnost njegovog geografskog položaja (fizičko-geografskog, saobraćajno-geografskog, društveno-geografskog) u prostoru turističkog transgraničnog regiona (Republika Srpska – Hrvatska – Crna Gora) i specifičnosti prirodno-geografskih karakteristika lokaliteta i okruženja, postojeća fizička infrastruktura i sociogeografske karakteristike opravdavaju ulaganja u turističku infrastrukturu i promociju Ubala kao novog turističkog lokaliteta na teritoriji Grada Trebinja [11, 12]. „Turizam je postao jedan od najvažnijih društvenih, gospodarskih, kulturnih, političkih i geografskih fenomena suvremenog razvoja svijeta čiji se utjecaj manifestira, isprepliće i konfrontira u geografskom prostoru, i to na svim razinama, od lokalne i regionalne preko nacionalne, sve do globalne.” [13, str. 1.] U odnosu na Hrvatsku i Crnu Goru, Trebinje u čijem teritorijalnom sastavu su i Ubla, pored lokalnih turističkih sadržaja, čini čvorište iz kojeg se mogu posjećivati brojni atraktivni lokaliteti njegovog okruženja, kao i potencijalni nedovoljno vrednovani lokaliteti u zaleđu. Ubla su pozicionirana na nadmorskoj visini od oko 1020 m u sjevernom dijelu planine Orjen (subadriatička planina dinarskog orogena) i jednim dijelom masiva Bijele Gore (1862m n/v). Tu se ističe Zubački kabo (1894m n/v) kao najviši vrh Orjena, što ga definiše kao najviši vrh primorskog pojasa Dinarskog gorja. Do analizirane geoprostorne cjeline se dolazi regionalnim putem „R429”

(Trebinje – Crna Gora) prema Herceg Novom te skretanje za selo Tuli u Konjsko, a iz pravca Konavla (Hrvatska) putem preko Graba (makadamski put, trenutno nije u funkciji). Ukupna udaljenost od Trebinja do analizirane cjeline je oko 25 km, a udaljenost od regionalnog puta „R429” je oko 8 km (asfaltiranim putem). Fizičko-geografska i prirodno-geografska struktura pružaju mogućnost unutrašnjeg zoniranja terena za potrebe uspostavljanja novih fizičkih struktura potrebnih za smještaj turista (objekti, kamp, prostor za rekreaciju) i očuvanog prirodnog ambijenta sa biovegetacijskim sistemima, što pruža mogućnost turističke aktivnosti i formiranja cjelogodišnje atraktivne aktivne destinacije, kako na lokalnom tako i regionalnom nivou. Analizirana geoprосторna cjelina se nalazi na tromeđi Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Hrvatske, što ide u prilog povezivanju turističkih lokaliteta različitih fizičko-geografskih i kulturno-istorijskih vrijednosti i jačanju ukupnog turističkog potencijala, čiji bi razvoj doprinio pozicioniranju transgraničnog turističkog regiona, čija je turistička funkcija značajna u definisanju ključnih razvojnih politika navedenih država. Zbog karakterističnog reljefa, prostor raspolaže sa nizom geomorfoloških oblika, uglavnom jama i pećina koje su nedovoljno istražene [14, 4, 11]. Terenskom analizom, uz članove lovačkog udruženja „Leotar“, analizirana je „Bukova pećina“. Lokacija ove pećine je Bijela gora (1862 m n/v) ispod vrha „Gubar“ (1679 m n/v). Pećina se nalazi na nadmorskoj visini od oko 1500 m. Terenskom analizom se zaključuje da pećina ne spada u razgranate pećine, nema bočne veze, odnosno pećinski sistem, a dužina kanala iznosi oko 78 m. U pećini ne postoji pećinski nakit (stalagmiti, stalaktiti, itd.), postojeći nakit koji je ranije bio prisutan degradiran je antropogenim djelovanjem. Pećinu je potrebno zaštititi, odnosno njen ulaz zatvoriti i uključiti je u sistem valorizacije jer ima određenih vrijednosti (prirodni fenomen). Predmetno područje graniči sa planinskim masivima koji raspolažu sa brojnim endemskim vrstama [15]. Blizina masiva Bijele gore i Orjena ovaj prostor čini atraktivnijim, zbog prisustva brojnih endemskih taksonomskih kategorija [15], čije prisustvo ograničava antropogena djelovanja. Na osnovu prirodnog bogatstva, prostor je proglašen Parkom prirode „Orjen“, što u značajnoj mjeri čini područje atraktivnijim. Takođe, odluka o proglašenju nalaže poštovanje načela planskog djelovanja u cilju očuvanosti postojećeg biodiverziteta i usmjeravanja turističkih aktivnosti [14].

METODE I MATERIJALI

Metodološki pristup – istraživanje je bazirano na standardnim naučnim metodama geografske nauke i prostornog planiranja koje se koriste u svrhu istraživanja, planiranja i uređenja geoprостora, s ciljem dobijanja što relevantnijih pokazatelja prostornog razvoja i definisanja adekvatne valorizacije, odnosno prostornog razvoja i uređenja. U radu su korištene metode terenskog rada, analize, komparacije, opservacije, sinteze i kartografski metod. *Metod terenskog rada* korišten u svrhu konkretnog upoznavanja sa prirodnim i stvorenim strukturama unutar predmetnog područja, utvrđivanja stepena očuvanosti i odstupanja od stanja definisanog prostorno-plan-skim dokumentima. Tokom terenskog rada, značajan je metod posmatranja (uočavanje, kartiranje, mjerenje, brojanje, fotografisanje ...), a unutar pomenutog metoda, sistematična analiza, izdvajanje i obrada prikupljenih empirijskih podataka. *Metod komparacije* je omogućio da se u radu dođe do relevantnih zaključaka o stepenu i karakteru nastalih promjena koje ukazuju na određene geografske pojave i procese unutar predmetnog područja, što u procesu planiranja može predstavljati problem ili prednost u definisanju razvojnih pravaca. Komparativnom analizom prostorno-funkcionalnog razvoja analizirane cjeline rezultati su dobijeni iz planskih dokumenata (Prostorni plan Grada Trebinja iz 1981. godine i Zoning plan Ubla iz 1980. godine, te terenske analize). Na osnovu razvojnih pravaca, može se zaključiti u nekim dijelovima čak izostanak implementacije planske osnove, koja za rezultat ima degradaciju prostora. Statističkom analizom demografskih pokazatelja utvrđena je depopulacija. Po popisu stanovništva iz 1990. godine, u naselju Zubačka Ubla nema registrovanih stanovnika, dok prema popisu iz 2013. godine ima 8 registrovanih stanovnika [16, 17], što je posljedica migracija na relaciji selo–grad u procesu industrijalizacije. Proces depopulacije seoskih naselja intenziviran je u periodu građanskog rata. Vrednovanje ruralnog prostora i definisanje turističkih destinacija u ruralnom prostoru uz uključivanje lokalnog stanovništva jedna je od mogućih mjera revitalizacije prostora. *Metod analize, izdvajanja, komparacije i sinteze* odlikuje izradu cijelog rada, korišćenih u ocjeni prikupljenih podataka o stanju geopotencijala. Ilustrativni metod je korišten za prikazivanje prostornih odnosa i geoprосторnih fakata (fotografija, karta).

Priložene karte su izrađene na osnovu zvaničnog dokumenta [14], koristeći originalne karte iz dokumenta kao podlogu autorskih priloženih karata (Karta 1, karta zoniranja i karta 2, korišćenje zemljišta). Takođe, u radu je korišten satelitski snimak sa *Google maps* [Prilog 1]. Rad se sastoji iz više cjelina koje su objedinjene teorijskim i istraživačkim dijelom, te definisanjem i predstavljanjem idejnog rješenja za analiziranu geoprосторnu cjelinu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja dobijeni su na osnovu geografske literature, komparativne analize prostorno-planske dokumentacije i terenskog rada etapno sprovedenog od 2018. godine, na osnovu koga je prikupljena baza relevantnih pokazatelja prostornog razvoja posmatranog područja. Sistematičnim pristupom geoprосторna cjelina je identifikovana, analizirana, klasifikovana na osnovu elemenata koji je čine atraktivnom i na osnovu prethodno

navedenog, definisan je budući razvoj. Istraživanjem predmetnog područja analizirani su prirodno-geografski potencijali i ograničenja, antropogeografske karakteristike i postojeća fizička infrastruktura i utvrđene mogućnosti i ograničenja njihovog integrisanja u funkciji turističke valorizacije prostora. Terenskim radom je izvršena detaljnija analiza očuvanosti prostornih vrijednosti i stvorene fizičke strukture (objekata, boniteta, stanje infrastrukture, postojećih oblika devastiranja prostora, itd.). Na osnovu postojećeg razmještaja objekata, bazirano je buduće zoniranje prostora sa strogim granicama korištenja i u duhu principa prostornog planiranja i efikasnije prostorno-funkcionalne organizacije. Utvrđene činjenice ukazuju na visok stepen očuvanosti i vrijednosti prirodno-geografskih struktura i mogućnost definisanja razvojnih pravaca predmetnog područja, razvojem različitih oblika ruralnog turizma. Tokom istraživanja, urađeno je skiciranje prostora, izdvajanje potencijalnih lokacija za određene oblike turističkog vrednovanja, izgradnju vidikovaca, lovačke kuće, multifunkcionalnog istraživačkog centra, smještajnih kapaciteta i prateće infrastrukture. Potencijalni model turističke valorizacije i prostorno-funkcionalne organizacije potencira zaštitu ambijentalnih vrijednosti, uključenost lokalnih akcionih grupa i jačanje socioekonomskog razvoja, sve u cilju definisanja potencijalnog idejnog rješenja. Težište je stavljeno na turističku valorizaciju Zubačkih Ubala kao prostorne cjeline sa visokim ambijentalnim vrijednostima, vodeći računa o komponentama prirodno-geografskih i antropogeografskih vrijednosti s ciljem njihovog očuvanja.

Prirodno-geografska osnova turističke valorizacije

Prirodno-geografske karakteristike predstavljaju okosnicu u definisanju prostorno-planskih razvojnih faktora. Istraživanjem se teži uspostaviti harmonija između prirodne osnove i planiranih intervencija koje ne bi narušile ambijentalne vrijednosti analizirane cjeline [13]. Kroz analizu dostupnih materijala, zaključuje se da planski pristup nije bio adekvatan prema prirodnoj osnovi, te se ovim radom teži valorizaciji marginizovanih segmenata i pozitivnoj interakciji prirodne osnove i novoplaniranog idejnog rješenja.

Geološke karakteristike imaju različite pravce djelovanja u planiranju prostora, naročito prilikom izgradnje objekata koji su uslovljeni stabilnošću terena. Područje Trebinja (unutar čijih granica je analizirana cjelina), građeno je od čvrsto vezanih-okamenjenih stijena, slabo vezanih i nevezanih sedimenata, na osnovu čega se može zaključiti da je nosivost terena povoljna za planiranje nove infrastrukture. Tako povoljni geološki uslovi pružaju mogućnost pravilnog planskog situacionog razmještaja objekata. Analizirana geoprostorna cjelina se nalazi na podlozi od kredinih krečnjaka i flišnih pojaseva. Analizom geološke karte [18], zaključuje se da je predmetno područje izgrađeno od oko 90% krečnjaka gornje krede (mezozojske starosti). Pored toga, u manjoj mjeri zastupljeni su dolomiti krede s laporovitim i glinovitim primjesama [18]. Analizirani prostor graniči sa specifičnim razvijenim podzemnim karsnim reljefom, čiju osnovu je moguće valorizovati. Najvećim dijelom su to jame i pećine, uglavnom manjih dimenzija. Identifikovan broj pećina u Parku prirode „Orjen” (unutar čijih granica se nalazi analizirana geoprostorna cjelina) je 13 sa prosječnom dužinom kanala od 50 m [14]. Dinamičnost reljefa se izražava kroz nagib i ekspozicije terena čija osnova u velikoj mjeri utiče na planska rješenja. Vidljivi su tragovi djelovanja lednika čijim radom su se formirala polja (Ubla, Konjsko, Grab polje), a ovako specifična morfofizionomija nalaže mogućnosti planskog djelovanja [10]. Terenskom analizom nisu identifikovane jame i pećine u okviru predmetnog područja.

Klima predstavlja značajan faktor koji utiče na dužinu turističke sezone, odnosno mogućnosti valorizacije turističke destinacije. Efekti globalnih klimatskih promjena reflektuju se na prirodnu sredinu, time i na socio-ekonomski razvoj i ljudsko društvo [19]. Potrebno je definisati aktivnosti unutar analizirane cjeline koje bi odgovarale klimatskim uslovima koji su karakteristični na prostoru predmetnog područja. Blizina planinskih masiva koji graniče sa analiziranom geoprostornom cjelinom utiču na klimu unutar njenih granica. Orjen predstavlja svojevrsan fenomen, bezvoda zbog geološke građe terena, iako godišnje prima u prosjeku oko 4762 mm padavina. Širok dijapazon nadmorskih visina uslovlje su različite klimatske specifičnosti. Na najnižoj tački, srednja januarska temperatura iznosi 3.7 °C, a srednja julska temperatura 22.1 °C. Na najvišoj nadmorskoj visini (Zubački kabo), najhladniji mjesec je februar sa srednjom temperaturom -5.3, dok je najtopliji mjesec jul, čija srednja temperatura iznosi 11.6 °C [19, 14]. Analizom klimatskih faktora mogu se zaključiti povoljne predispozicije za definisanje cjelogodišnjeg turizma [20]. Snježni pokrivač unutar analizirane cjeline se zadržava godišnje oko 40-ak dana, što zavisi od debljine sloja snježnog pokrivača. Snježni pokrivač se znatno duže zadržava na sjeverozapadnom dijelu predmetnog područja, na šta utiče zaklonjenost planinskim grebenovima. Prosječna visina snježnog pokrivača tokom godine iznosi oko 70 cm, snježni pokrivač je kvalitetan (suh i prašnjav) što ide u prilog definisanju zimskih turističkih sadržaja unutar obuhvata. Dakle, unutar analiziranog obuhvata potrebno je definisati turističke aktivnosti koje će odgovarati klimatskim uslovima u određenom periodu, takvim pristupom definisanja turističkog sadržaja postiže se cjelogodišnji turizam. Tokom zimskog perioda, područje raspolaže površinama sa povoljnim nagibom za aktivnosti na snježnom pokrivaču (skijanje, klizanje, organizovane zimske šetnje, poligon za ski-lift sa različitim sadržajima, itd.). Zbog zimskih klimatskih uslova, radijus kretanja potencijalnih turista je znatno manji u odnosu na ljeto. Zato je potrebno uspostaviti zanatske radionice autohtonih proizvoda (pletenje, vezenje, tkanje, itd.), čijim radom se predstavlja identitet hercegovačkog područja. Potrebno je uspostaviti diferenciran sadržaj u odnosu na klimatske uslove (planinarenje, izviđačke akcije, biciklizam, branje

plodova i bilja, edukacije, radionice, itd.). Zaključuje se da Zubačka Ubla kao cjelina sa svojom okolinom imaju povoljan klimatski potencijal, što omogućava formiranje cjelogodišnje aktivne turističke destinacije.

Po šumsko-privrednoj podjeli prostora [7], diferencirana i u radu analizirana prostorna cjelina Ubla se nalazi u Privrednoj jedinici „Štirovnik – Bijela gora“, čijim šumskim zemljištem upravlja Javno preduzeće „Šume Republike Srpske“. Posmatrano područje većim dijelom čine visoke šume crnog bora i manjim dijelom kulture (zasada) crnog. Na samom ulazu u Ubla iz pravca Bogojević sela se nalaze izdaničke šume hrasta medunca i cera sa crnim jasenom. Sječe u odjelu oko Ubala (državna šuma) nisu rađene poslednjih 30-ak godina, prisutna je sječa samo na privatnim parcelama [7]. Osnovni cilj je sistematična analiza šuma sa stepenom njihove zaštite, potrebno je planski i vremenski urediti šume, takođe definisati propisanu tehniku načina korištenja u sistemu turističke valorizacije. Na osnovu analize, teži se očuvanju šumskog pokrivača i njegovom usmjeravanju na turističko-rekreativnu funkciju šuma, koja bi upotpunjavala turističku ponudu. Šume unutar predmetnog područja imaju povoljan prostorni razmještaj i estetsku vrijednost u smislu vizuelnog doživljaja, što bi u značajnoj mjeri uticalo na unapređenje sadržaja unutar turističke destinacije. Pažnja je usmjerena na analizu šumskog odjela i odsjeka, te definisanju turističko-rekreativnih funkcija šuma [21]. U kompleksnom sistemu turističke valorizacije, šume se mogu koristiti u pokretanju lovnog i izletničkog turizma, definisanje terena za „Paintball“ i definisanje „Adrenalinskog parka“, te ostalih sportsko-rekreativnih sadržaja. Turistička valorizacija šumskog ekosistema podrazumijeva prvenstveno njegovu očuvanost s mogućim strateškim pristupom upravljanja, uz poštovanje načela zaštitne zone u kojoj se nalazi.

Analiza fizičke strukture

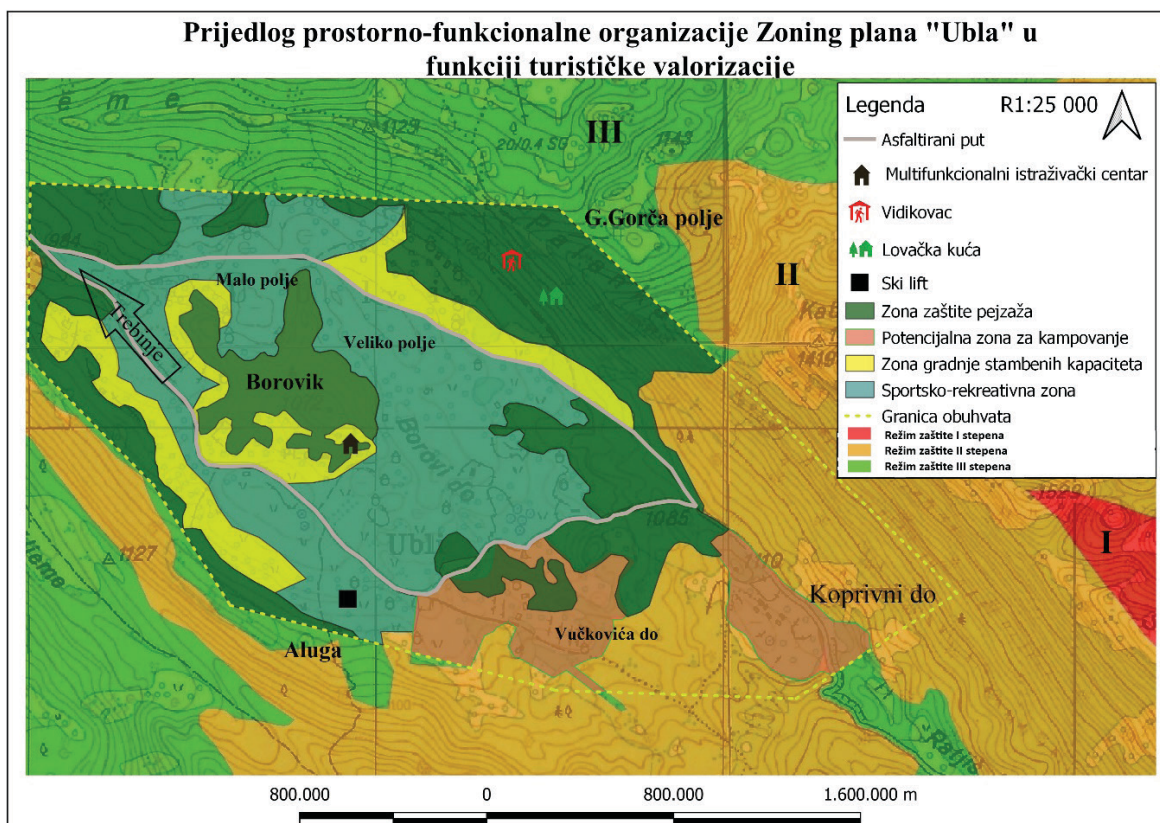
Terenskim radom su identifikovane i analizirane ljudskim radom stvorene fizičke strukture unutar analizirane geoprostorne cjeline, koje mogu pozitivno uticati na turističku valorizaciju i ukupnu transformaciju prostora Ubla. Značajan faktor valorizacije prostora je saobraćajna infrastruktura. Prva terenska istraživanja (2018. godine) su zabilježila da se saobraćaj odvija nekategorisanim makadamskim putem, oštećenim djelovanjem erozije. Posljednjim terenskim radom (septembar 2020. godine) zabilježeno je asfaltiranje puta (nedovoljan broj proširenja) u pojasu analizirane geoprostorne cjeline. Može se uočiti slaba saobraćajna opterećenost, zbog nedostatka valorizacije prostora i privrednih aktivnosti. Na osnovu sprovedenih terenskih analiza izgrađenosti sredine objektima, može se uočiti dominantnost vikend-kuća. Diferencirana prostorna cjelina raspolaže sa oko 90 izgrađenih objekata u funkciji stanovanja. Većina postojećih objekata je građeno u funkciji i stilu vikend-objekata, novije gradnje. Uočljiva je arhitektonska neusaglašenost sa ambijentalnom cjelinom. U spratnosti objekata zastupljene su različite forme: prizemlje, prizemlje + sprat, prizemlje + potkrovlje. Na osnovu terenskih istraživanja i subjektivnom procjenom fizičkog stanja, objekti se nalaze u kategoriji dobrog fizičkog boniteta. Zabilježeni su u manjoj mjeri objekti lošeg boniteta (starije gradnje). Objekti bi trebali da odišu arhitektonskom ujednačenošću, sa izraženim elementima planinske arhitekture, što ne potvrđuje postojeće stanje. Prepreku efikasnijoj prostornoj organizaciji može predstavljati neracionalno korišćenje zemljišta, zbog nedostatka planskog definisanja namjene zemljišta, iako ovaj ambijent zahtijeva poseban planski pristup upravljanja prostorom. Centralni dio predmetnog područja čini značajan sakralni objekat duhovne kulture crkva Sv. despota Stefana, čija je gradnja počela 2000. godine (crkveno zvono postavljeno 2003. godine). Ispred crkve se nalazi spomenik vojvodi Luki Vukaloviću. U blizini crkve, djelimično je uređen izletnički prostor, koji je potrebno upotpuniti novim sadržajima. Na sjevernoj strani predmetnog područja u podnožju „Gornje Gorča Polje“ je objekat simboličnog gabarita – kuća „ptičara“, koja se koristi u svrhu istraživanja. Ratni i poslijeratni period ostavio je velike posljedice po stanovništvo i fizičku strukturu. Devastirani Planinarski dom na Ublima nakon 25 godina je obnovljen i u vlasništvu Planinarskog društva „Vučiji zub“. U ratu devastirani ski-lift u dužini od oko 350 m graniči sa šumskim pojasom „Aluga“ sagrađen osamdesetih godina prošlog vijeka i sa još uvijek vidljivom postojećom konstrukcijom [Karta 2].

Unutar analizirane geoprostorne cjeline identifikovana su tri centra okupljanja i još nekoliko potencijalnih. Izletnički prostor u centru predmetnog područja je djelimično uređen. Pored definisanog izletničkog prostora, postoji nekoliko livada koje su u ljetnom i zimskom periodu pogodne za sportsko-rekreativna dešavanja. Novoadaptirani planinski dom predstavlja ugostiteljski i smještajni objekat. Sportsko-rekreativne površine koristi mlada populacija. Kod ostalih centara okupljanja (crkva Sv. despota Stefana i drugi), definisani su različiti korisnici sa različitim starosnom strukturom. Skala koncentracije okupljanja se u značajnoj mjeri modifikuje u zavisnosti od godišnjih doba. Prethodno navedeno se konstatuje terenskim radom i analizom, kao i na osnovu kartografskih priloga [Karta 2].

Idejno rješenje – prijedlog uređenja analizirane geoprostorne cjeline

Prethodno diferencirane i analizirane opisane karakteristike prirodne i unutar nje fizičke strukture navedene geoprostorne cjeline iniciraju mogućnost strateško-planskog pristupa sa mogućnostima valorizacije. Može se zaključiti da analizirana geoprostorna cjelina raspolaže sa određenim razvojnim potencijalima koje je potrebno uključiti u sistem valorizacije. Budućim planskim koracima potrebno je definisati razvojne pravce, kako bi se

uspostavila održiva prostorno-funkcionalna cjelina, ambijentalno i funkcionalno uklopljena sa širom okolinom. Diferencirana geoprostorna cjelina pripada zaštićenom području Park prirode „Orjen“, što predstavlja jedan od potencijalnih razvojnih mogućnosti u planiranju. Međutim, analizirana cjelina pripada III stepenu zaštite, što unaprijed nalaže načela planskog djelovanja korišćenja, uređenja i unapređenja zaštićenog prirodnog dobra [14]. Ukupna površina III stepena zaštite iznosi 9. 111,25 ha (54% od ukupne površine), graniči sa režimom zaštite II stepena čija površina iznosi 7. 349,00 ha (44% od ukupne površine) i režim zaštite I stepena površina iznosi 255,58 ha (2% od ukupne površine). Prethodno navedene zone imaju definisan način antropogenog djelovanja koji odgovara stepenu zaštite koji ih tretira [14]. Unutar analiziranog predmetnog obuhvata, vidno je neplan-sko djelovanje, što za rezultat ima degradaciju prirodne osnove i narušavanje ambijentalne cjeline. Neplanska izgradnja vikendica je uzrokovala prenamjenu šumskog i poljoprivrednog zemljišta u građevinsko, a promjene su konstantovane terenskim radom. Neplansko antropogeno djelovanje na područje može imati više negativ-nih direktnih i indirektnih posljedica, neki od njih su: degradacija prirodne osnove, urušavanje ambijentalnih vrijednosti, nekontrolisano zagađenje staništa (voda, vazduh, zemljište) itd., time i smanjene mogućnosti turi-stičke valorizacije [8, 13]. Definisanim idejnim rješenjem teži se ka unutrašnjem zoniranju prostora sa jasno naglašenim granicama koje ne bi narušavale izvornost prirodne osnove, te bi se postiglo racionalno korišćenje prostora i ambijentalno uklapanje. Prije izgradnje fizičkih struktura, potrebno je riješiti imovinsko-pravne odnose, izgradnju objekata vršiti na osnovu prostorno-planske dokumentacije i utvrđenog planskog strateškog pristupa, uz očuvanost pejzažnih vrijednosti. Unutar III zone, u čijim granicama se nalazi analizirana cjelina, moguće su intervencije koje bi ograničeno tretirale prirodne i stvorene vrijednosti u skladu održivog razvoja. Prostorno-planske intervencije su usklađene sa stepenom zaštite analizirane cjeline. Pod intervencijom se podra-zumijeva valorizacija postojeće fizičke strukture, definisanje dodatnih normativa za građenje objekata, uređenje i održavanje kulturno-istorijskog nasljeđa, infrastrukturna opremljenost, itd. Idejnim rješenjem se teži definisanju potencijalne unutrašnje zone analizirane cjeline, čime se formulišu i izdvajaju prostorno-funkcionalna obilježja, odnosno namjena zemljišta (*zona gradnje stambenih kapaciteta, sportsko-rekreativna zona, zona zaštite pejzaža, potencijalna zona za kampovanje, te prijedlog potencijalnih lokacija za izgradnju vidikovca, multifunkcionalnog istraživačkog centra i lovačke kuće*). Lokacije utvrđene i markirane terenskim radom i na taj način definisane zone predstavljene su na Karti 1. Planskim pristupom u izgradnji prostora utvrđuje se: građevinsko, poljoprivredno i šumsko zemljište, te infrastrukturni sistemi [22].



Karta 1. Prijedlog prostorno-funkcionalne organizacije Zoning plana „Ubla” u funkciji turističke valorizacije

Zona gradnje – potencijalne lokacije za izgradnju objekata potrebno je planirati na kontaktu sa šumskim pojasom, konfiguracija terena je povoljna za takav vid distribucije objekata. Pravilnim situacionim razmještajem objekata postižu se elementi prostorne „humanosti“, koja za rezultat ima adekvatno vrednovanje prostora. Planiranu zonu gradnje prilagoditi urbanističko-tehničkim uslovima, čime se opravdavaju planske aktivnosti usmjerene u postizanju arhitektonsko-ambijentalne usaglašenosti. Prilikom planiranja situacionog razmještaja unutar zone, potrebno je težiti rješenju koje obezbjeđuje pravilnu parcelaciju, vodeći računa o formiranju parcela u smislu rješavanja imovinsko-pravnih odnosa. Neophodno je buduće planske korake definisati tako da se uklope parcele sa postojećim, na šta utiču vlasničke granice, konfiguracija terena i opšti tehnički normativi. Građevinske parcele je potrebno definisati tako da odišu komforom i arhitektonsko-ambijentalnom uklopljenošću, što utiče na usaglašenost sa prostornim i funkcionalno-tehničkim uslovima. Kako bi se uspostavila pravilna prostorna iskorišćenost, potrebno je odrediti tačan broj objekata koji bi se mogli graditi unutar analizirane geoprostorne cjeline. Iz prethodno urađenih analiza, vidna je visoka ambijentalna vrijednost koja zahtijeva tačno definisanje gabarita potencijalnih objekata, njihovu spratnost, funkciju, arhitektonsko uklapanje i prostornu distribuciju. Zbog ambijentalnog uklapanja, gradnju pratećih sadržaja planirati da se grade u sklopu objekta (suteran ili nisko prizemlje). Potrebno je potencijalne sabirne saobraćajnice planirati sa sekundarnom mrežom puteva, čime bi se zadovoljavale potencijalne potrebe planirane i analizirane cjeline. Planski pristupiti definisanju parking površina, čiji bi kapaciteti zadovoljavali potrebe planirane fizičke strukture [22]. Poželjno bi bilo planirati jedan centralni parking, čime bi se rasteretili parking prostori unutar distributivnog razmještaja objekata. Potencijalne površine za zonu gradnje analizirane geoprostorne cjeline su: granični prostor sa šumskim pojasom „Aluga“, „Borovik“, jedan dio u blizini „Velikog polja“ i „Malog polja“, te površina na ulazu u obuhvat. Određene mikrocjeline je potrebno estetski oblikovati, vodeći se načelima ambijentalnosti.

Sportsko-rekreativna zona – teži se uspostaviti dovoljan broj površina za sportsko-rekreativna dešavanja u sklopu analizirane cjeline. Idejnim rješenjem diferencirane su potencijalne sportsko-rekreativne zone čija konfiguracija i kapaciteti omogućavaju takav vid iskorištavanja sa stepenom ekološke održivosti. Potencijalne površine potrebno je ostaviti u prirodnom izdanju sa minimalnim estetskim korekcijama, koje ne podrazumijevaju asfaltiranje, već samo uklapanje u izgrađenu ambijentalnu strukturu. Centralni dio analizirane cjeline raspolaže sa djelimično uređenim izletničkim prostorom, te je potrebno nadograditi ga potrebnom infrastrukturom i zabraniti gradnju u centralnom dijelu obuhvata.

Zona zaštite pejzaža – terenskim radom su identifikovane potencijalne zone zaštite koje je, na osnovu prirodnih karakteristika, potrebno zaštititi od gradnje i njihovog narušavanja. Mogu se iskoristiti za sportsko-rekreativna dešavanja uz minimalne arhitektonske intervencije. Intervencije je potrebno usaglasiti sa ambijentalnim vrijednostima i ekosistemom koji nalaže planska načela djelovanja. Karakteristični lokaliteti koje je potrebno zaštititi su: „Malo polje“, „Veliko polje“, „Borovik“, šumski pojas „Aluga“. Prethodno navedeno se može uključiti u valorizaciju i privesti namjeni koja ne bi narušavala njihovu prirodnu fizionomiju (sportsko-rekreativne površine), ali sa strogom zaštitom od gradnje i asfaltiranja.

Potencijalna zona za kampovanje – kako bi se uspostavila kompletna valorizacija prostora koja se uklapa u stepen zaštite Parka prirode „Orjen“, može se diferencirati potencijalno mjesto za kampovanje. Interesi potencijalnih turista će biti različiti, tako je potrebno turističku ponudu upotpuniti različitim sadržajem. Potencijalna lokacija za kampovanje je „Koprivni do“ i „Vučkovića do“ koji se nalaze unutar analizirane cjeline. Ove lokacije ujedno predstavljaju tampon-zonu između završetka III stepena zaštite (u radu tretirane) i II zone zaštite Parka prirode „Orjen“, gdje su antropogena djelovanja dodatno ograničena kako se ne bi narušio ekosistem. Unutar potencijalne zone za kampovanje, postoje površine čija konfiguracija omogućava takvo djelovanje uz pridržavanje načela koja nalaže zaštićena zona III i II stepena.

Prijedlog potencijalnih lokacija – terenskim radom identifikovane su potencijalne lokacije za izgradnju vidikovca, multifunkcionalnog istraživačkog centra i lovačke kuće. Lokacija za izgradnju vidikovca se nalazi u podnožju „Gornje Gorča polje“ koja se na osnovu svoje konfiguracije i dostupnosti može definisati tako da zadovoljava minimalne urbanističko-tehničke uslove za gradnju. Lokacija identifikovana za izgradnju vidikovca pruža panoramski pogled na analiziranu cjelinu i okolne planinske masive sa kojima graniči. U neposrednoj blizini prethodno navedene lokacije postoji jedna pogodna lokacija za izgradnju lovačke kuće. Radom i učešćem lovaca bi se upotpunila turistička ponuda i to bi dodatno uticalo na atraktivnost same turističke destinacije. Saobraćaj do potencijalnih lokacija se odvija šumskim putem koji treba rekonstruisati i modernizovati. Zbog ambijentalnih vrijednosti, prvenstveno biodiverziteta, potrebno je uključiti mišljenje nauke o zaštiti prostora. Identifikacija lokacije za izgradnju multifunkcionalnog istraživačkog centra ima za cilj promovisanje biodiverziteta i endemičnih vrsta, kao i drugih prirodnih vrijednosti kao specifičan oblik visitor centra čiji bi rad upotpunio turističku ponudu. Prethodno navedene i analizirane zone su prikazane na Karti 1. Navedene činjenice iniciraju mogućnost formiranja eko-etno sela, čije bi prostorno-funkcionalno uklapanje u prirodni ambijent imalo za rezultat formiranje atraktivne autentične turističke destinacije. Poželjno je planirati široki spektar aktivnosti uz aktivno učešće stanovništva što bi dovelo do održivog razvoja ruralnog turizma. U predstavljenoj swot analizi sažeti su važniji pokazatelji posmatranog prostora: prednosti (snage) predmetnog područja Ubla, antropogenim djelovanjem potrebno je neutralisati ili umanjiti slabosti, razvojne mogućnosti je potrebno iskoristiti u punom kapacitetu (održivi razvoj), a prijetnje je potrebno minimizirati pri implementaciji. Dakle, na osnovu priložene analize se mogu izvesti zaključci s ciljem detaljnijeg upoznavanja sa predmetnim područjem.

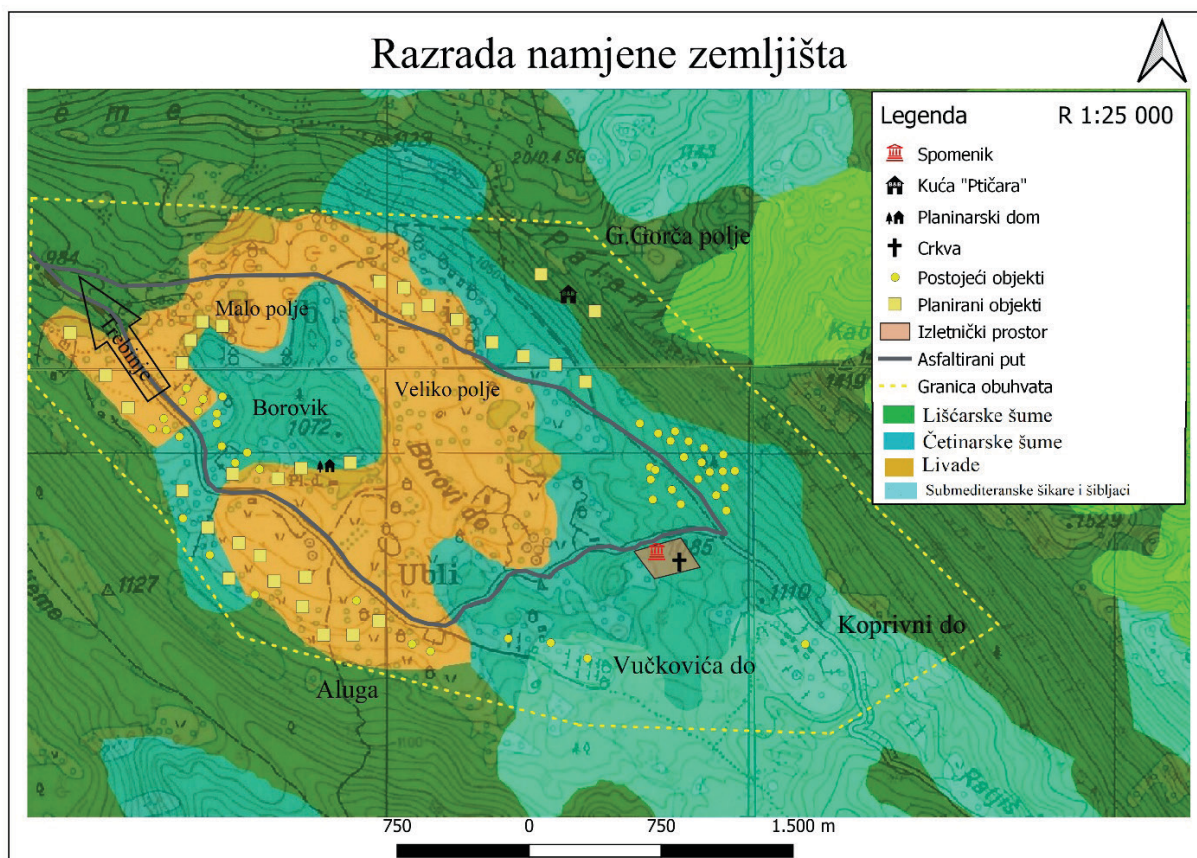
SNAGE	SLABOSTI
Prostor visokih ambijentalnih vrijednosti i očuvanog biodiverziteta Povoljan turističko-geografski položaj Blizina više atraktivnih prirodno-geografskih objekata i endemskih taksona Znatan potencijal za diverzifikaciju privrede ruralnog područja (poljoprivreda, turizam) Područje kontaktnih fizičko-geografskih karakteristika Neposredna blizina više atraktivnih turističkih lokaliteta (Dubrovnik, Herceg Novi, Mostar, Radimlja, Tjentište, Višegrad, itd.) Komparativne prednosti u proizvodnji (vino, tradicionalni proizvodi, ljekovito i aromatično bilje, med, itd.) Zadovoljavajuća saobraćajna povezanost Postojeća fizička struktura i mogućnost uključenosti u turističku valorizaciju Kvalifikovano stanovništvo okruženja i različite organizacije građana kao podrška razvoju turizma	Nizak stepen turističke valorizacije Nepovoljna starosna struktura lokalnog stanovništva Slaba turistička promocija ruralnog prostora Nedostatak koordinacije između različitih aktera u razvoju turizma Neadekvatna turistička infrastruktura Neusklađenost u korištenju ruralnih resursa Nedovoljna istraženost razvojnih potencijala Ekološka neosviještenost Nedovoljna razvijenost infrastrukture (vodosnabdijevanje, kanalizacioni sistemi, upravljanje otpadom) Nedovoljno poznavanje i korištenje marketinškog modela u svrhu promocije razvoja turizma Nedovoljno prepoznavanje ruralnog potencijala od strane lokalne samouprave Sporost u donošenju i provođenju pravnih, prostorno-planskih i drugih dokumenata i strategija razvoja Nedostatak finansijskih sredstava
MOGUĆNOSTI	PRIJETNJE
Prostor atraktivan za formiranje aktivne turističke destinacije (promjene u navikama i vrijednostima turista koji traže autentičnost) Poboljšavanje javne turističke infrastrukture, stimulisanje mladih za razvoj malih mjesta Kontrolisano upravljanje prirodnim i kulturnim resursima Očuvanje prirodne i kulturne baštine, umrežavanje lokaliteta u pravcu poboljšavanja turističke ponude Grada Trebinja Promocija prirodnih i kulturnih potencijala u svrhu razvoja turizma Unapređenje marketinga i prezentacija autentične kompleksne turističke destinacije Razvoj gastronomskih i smještajnih usluga, rekreativnih aktivnosti, naučnih istraživanja, kao i drugih društvenih aktivnosti Povezivanje zainteresovanih stejkholdera (lokalna uprava, naučne i privredne institucije, nevladine organizacije, udruženja građana), s ciljem stvaranja boljih uslova socioekonomskog razvoja Pokretanje starih hercegovačkih zanata Iniciranje modela domaćinstva poljoprivrednik-ugostitelj Jačanje demografske i socioekonomske održivosti Formiranje održive prostorno-funkcionalne cjeline i turističke destinacije Pozitivni uticaji na predmetno područje, potencijalnih saobraćajnih projekata (Jadransko-jonski autoput, pruga Nikšić–Čapljina, autoput Beograd–Sarajevo, aerodrom Mionići ...)	Degradacija prirodne osnove negativnim antropogenim uticajem Loša implementacija i provođenje pravnih i planskih propisa Društveno-ekonomska kriza Slaba koordinacija između različitih institucija i organizacija u oblasti turizma Neplansko djelovanje i privatizacija

ZAKLJUČAK

Na osnovu urađenih analiza, može se zaključiti da geoprостorna cjelina Ubla raspolaže potencijalima na osnovu čije perzistentnosti je moguće definisati turistički razvojni pravac. Definisanjem Ubala kao potencijalne turističke destinacije, kompleksnom valorizacijom potencijala lokaliteta (geomorfološki, biogeografski, pejzažni, kulturno-istorijski, etnološki i drugi), koji omogućavaju razvoj različitih oblika turizma (vikend-turizam, izletnički, planinarenje, lovni, eko, etno i drugi), čime se upotpunjuje turistička ponuda Grada Trebinja u cilju integralnog sagledavanja ponude zasnovane na prirodno-geografskim i kulturno-istorijskim specifičnostima. Formiranjem nove atraktivne cjelogodišnje turističke destinacije, ostvaruju se pozitivni razvojni efekti turizma na lokalnom i regionalnom nivou. Poboljšava se kvalitet turističke ponude za potrebe lokalnog stanovništva i turista šireg regiona u cilju razvoja turizma i turističkog pozicioniranja. Saobraćajno-geografski položaj omogućuje posredničku ulogu u kretanju turista s mogućnostima preusmjeravanja i dužeg zadržavanja ukoliko su turistički lokaliteti povezani u osmišljenu turističku ponudu (proizvod). Dakle, predstavljanjem rezultata istraživanja može se zaključiti da Ubla predstavlja potencijalni faktor održivog ruralnog turizma jer on omogućava uključivanje lokalnog stanovništva. Planskim pristupom usmjeravanju ruralnog razvoja se može podstaći očuvanje lokalnog identiteta, stabilniji lokalni socioekonomski razvoj, aktivno učešće stanovništva, zaštita i prezentovanje autohtonih vrijednosti. Globalno posmatrano, ruralni turizam u svijetu bilježi sve veći rast i atraktivnost, što ide u prilog definisanju razvojnih pravaca posmatrane i analizirane cjeline [23]. Razvojem nove turističke ponude, podstiče se razvoj drugih sektora privrede: poljoprivrede, ugostiteljstva, saobraćaja, što u konačnom može uticati na jačanje privrednog razvoja Grada Trebinja i njegovog turističkog pozicioniranja. Unutrašnjim zoniranjem prostora, pravilnim mjerama i planskim rješenjima povećava se iskorišćenost prostora i dobija kompleksna prostorno-funkcionalna cjelina. Pravilnim planskim pristupom implementaciji idejnog rješenja, zasnovanog na definisanom stepenu zaštite i namjene prostora, formirala bi se planski uređena i funkcionalno organizovana prostorna cjelina kompleksne turističke ponude. Potrebno je djelovati određenim razvojnim mjerama koje bi uticale na valorizaciju ruralnog prostora uz njihovo uklapanje u savremene razvojne tokove, čime bi turistička valorizacija u značajnoj mjeri doprinijela razvoju ruralnog prostora i Grada Trebinja. U radu analizirana geoprостorna cjelina nema veliki prostorni obuhvat ni funkcionalni kapacitet, ali može vršiti funkcionalni pritisak na „pasivne” granične geoprостorne cjeline i pružiti mogućnosti njihove turističke valorizacije. Racionalnim pristupom planiranju turistički održive i funkcionalne turističke lokacije pozitivni efekti osjetili bi se i u geoprостornim cjelinama najbližim predmetnom području (Tuli, Konjsko, Bogojevića selo, itd.) [10]. Geoprостorne cjeline koje graniče sa predmetnim područjem raspolažu brojnim potencijalima (prirodnim i antropogenim), što utiče na njihovu atraktivnost i uključenost u sistem valorizacije, čijim djelovanjem se postiže stvaranje više funkcionalnih areala unutar prostora MZ Zubci. Turizam predstavlja značajan razvojni faktor koji utiče na podizanje i transformaciju svijesti stanovništva, način djelovanja i prostora u pravcu unapređenja infrastrukture, pokretanja aktivnosti očuvanja prirodnih i kulturnih resursa i drugih aktivnosti sa pozitivnim ekonomskim efektima. Uspostavljanje funkcionalne prostorne cjeline koja bi angažovala lokalno stanovništvo i akcione grupe (lovačko društvo, turistička organizacija, kulturno-umjetnička društva, planinarsko društvo, udruženja za zaštitu prirode, itd.) oko zajedničkog cilja turističke cjelogodišnje destinacije, značajno bi uticalo na socioekonomsku održivost stanovništva predmetnog područja. Razvojne mogućnosti ruralnog prostora Grada Trebinja su mnogo veće od dostignutog stepena razvoja i integracije.

Prostorno planske intervencije i arhitektonska ambijentalna (morfofizionomska) usklađenost „turističkog proizvoda” temelji se na postojećim prirodno-geografskim i antropogeografskim strukturama. Osnovno definisanje ciljeva razvoja u radu posmatranog područja je postizanje prostorno-održivog razvoja ruralnog turizma i njegova integrisanost u savremene razvojne tokove, čime bi se aktivirali uočeni i analizirani potencijali. Prethodne analize i definisano idejno rješenje predstavljaju autentičnu cjelogodišnju turističku destinaciju koja unutar svojih granica pruža i obezbjeđuje turističku atraktivnost i aktivnosti različitog karaktera (vikend-odmor, planinarenje, biciklizam, istraživanje, sport i rekreacija, sakupljanje plodova i bilja, lov, foto safari, itd.) [24]. Definisanje idejnog rješenja je kompleksno zbog preplitanja više funkcija unutar granica analizirane cjeline, pri čemu se vodilo računa o multidisciplinarnom pristupu i zaštiti prirodnog naslijeđa i maksimalnoj očuvanosti autentičnosti prirodne sredine. U postupku implementacije potrebno je odrediti prioritete i definisati jasne strateške korake kako se ne bi narušile postojeće vrijednosti prostora. Etapno uključivanje prostora u turističku ponudu omogućilo bi i priliv sredstava za nova ulaganja doprinoseći njenoj ekonomskoj samoodrživosti. Predloženo rješenje u skladu je sa stepenom zaštite posmatranog prostora i postojećom prostorno-planskom dokumentacijom.

U prvoj fazi potrebno je definisati aktivnu saradnju između zainteresovanih vlasnika vikendica, turističke organizacije i lokalne samouprave Grada Trebinja. Utvrditi tačan broj zainteresovanih aktera, koji bi svoje vikendice uključili u sistem turističke ponude, na obostranu korist. Utvrđeni broj objekata prilagoditi potrebama potencijalnih turista, utvrditi saradnju sa preduzećem „Komunalno a.d.” Trebinje, čije bi zaduženje bilo čišćenje terena (sakupljanje, odvoz i deponovanje smeća). Planom predvidjeti optimalan i isplativ način upravljanja čvrstim otpadom, sve u cilju uspostavljanja ekološki održivog prostora. Takođe, potrebno je planski pristupiti



Karta 2. Komparativni prikaz postojećeg i planiranog stanja

upotpunjavanju turističke infrastrukture i definisanju prostora za druženje i sportsko-rekreativna dešavanja. Postojeće markirane staze za planinarenje se mogu modifikovati u zavisnosti od zainteresovanih interesnih grupa. Stanovništvo je potrebno edukovati o načinu predstavljanja „proizvoda“ potencijalnim turistima, čime se dodatno utiče na kvalitet ponude i profesionalnost usluge [25]. Pored vlasnika vikendica, potrebno je uključiti širok spektar zainteresovanih akcionih grupa, a to su Lovačko udruženje „Leotar“, planinari „Vučiji zub“, izviđači, sportisti, itd. U sistem valorizacije uključiti stanovništvo, čime se u velikoj mjeri utiče na održivi razvoj i postižu povoljniji socioekonomski uslovi za razvoj ruralnog prostora. Prezentovanje tradicionalnih rukotvorina, običaji, tradicionalna gastronomija i ostalo utiču na autentičnost i atraktivnost potencijalne turističke destinacije. Uspostaviti pravilan marketing plan gdje bi se akcenatovale atraktivnosti analizirane cjeline, samim tim uticalo bi se na povećanje broja zainteresovanih posjetilaca. Tako definisanim strateškim pristupom planiranju postižu se minimalni uslovi za početak turističkog razvoja unutar granica analizirane cjeline.

U drugoj fazi, sredstva prikupljena iz prve faze djelovanja ulagati u drugu fazu koja bi težila upotpunjavanju turističke ponude. Izvršiti pravilnu parcelaciju (riješeni imovinsko- pravni odnosi) koja bi omogućila maksimalno smanjenje negativnih uticaja na ekosistem, a samim tim i na biodiverzitet. Fizičku strukturu upotpuniti novom, različitih funkcija, čijim bi se djelovanjem uticalo na turističku prepoznatljivost i pozicioniranje. Proširiti smještajne kapacitete, objekte novogradnje usaglasiti arhitektonskom ujednačenošću i usklađenošću sa prostorom visokih ambijentalnih vrijednosti u kojem se nalazi. Novoizgrađene objekte je potrebno graditi po određenim tehničkim standardima u kojima bi bilo definisano otklanjanje arhitektonskih barijera. Objekte prilagoditi širokom socijalnom spektru korisničkih grupa. Na osnovu analiza, zaključeno je da noseći kapacitet prostora može da zadovolji lociranje do 85 novih objekata. Planski definisati staze za šetnju i biciklističke staze (markirati ih) i prilagoditi različitim korisnicima. Izvršiti rekonstrukciju ski-lifta, čijim radom bi se uspostavila još jedna turistička atrakcija. Planom rekonstrukcije ski-lifta potrebno je zadovoljiti minimalne uslove za uređenje skijališta, kao tehničku cjelinu koja treba da sadrži sve potrebne elemente. Zbog geografskog položaja i ukupnih prirodnih i antropogeografskih karakteristika, poželjno je planiranje multifunkcionalnog istraživačkog centra. Mogao bi imati funkciju centra za edukaciju mladih, doprinositi razvoju nauke, promociji zdravog načina života, očuvanja kulture i tradicije sa radionicama za turiste što bi dodatno uticalo na turističku prepoznatljivost i razvoj lokalne samouprave.

Treća faza, nakon uređenja fizičkih struktura (smještajni kapaciteti, infrastruktura, itd.) analizirane cjeline i postignutim prostorno-funkcionalnim razvojem, održivim unutar svojih granica, potrebno je djelovanje turističke funkcije planskim aktivnostima usmjeravati na granične geoprostorne cjeline koje raspolažu prirodnim i kulturnim resursima pogodnim za turističku valorizaciju [26]. Uključivanjem više turistički atraktivnih sadržaja,

boljom povezanosti interesnih grupa, koordinacijom i promocijom različite turističke ponude, uz uključenost poljoprivrednih domaćinstava u smještaj i ishranu turista, postiže se socioekonomska, a time i demografska održivost prostora koji se nalazi u turističkoj regiji koja je trenutno pasivni problemski prostor. Tokom planiranja, potrebno je voditi računa o zaštiti vrijednosti područja, kako se ne bi stvarali negativni „pritisci“, koji mogu predstavljati faktor ugrožavanja.

LITERATURA

- [1.] Vujošević, M. (2011) Planiranje održivog razvoja – novije zapadno iskustvo u planskoj evaluaciji, metodama i tehnikama. U N. Kurtović-Folić (Ur.), Tematski zbornik radova Unapređenje strategije obnove i korišćenja javnih prostora (str. 3–30). Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Fakultet tehničkih nauka.
- [2] Vukojević D, Popović S. Turistička vrijednost ruralnog prostora Trebinja. Herald, 2014, 18, 167–177. doi:10.7251/HER1814169V.
- [3] Zekanović, I. (2020): Spoljašnji faktor geopolitičkog položaja Republike Srpske. Geografsko društvo Republike Srpske, Banja Luka.
- [4] Vujović S, Spajić J, Vučković J. *Značaj saobraćajne infrastrukture za razvoj turizma*. Centar za strateška istraživanja nacionalne bezbjednosti. Beograd, 2011, (str: 135–148).
- [5] Mandić, M. (2019): *Geografski aspekti ruralnog razvoja*. Geografsko društvo Republike Srpske, Banja Luka.
- [6] Spasić, N. (Ur.) (1997). Korišćenje resursa, održivi razvoj i uređenje prostora. Institut za arhitekturu i urbanizam Srbije (IAUS).
- [7] Javno preduzeće „Šume Republike Srpske“ PJ Trebinje. Šumski odjeli i odsjeci – dokumentacija.
- [8] Ministarstvo spoljne trgovine i ekonomskih odnosa Bosne i Hercegovine. (2018): *Strateški plan ruralnog razvoja Bosne i Hercegovine (2018-2021) Okvirni dokument*. Autor: Sarajevo.
- [9] Grgurić O. *Funkcionalno-morfološka struktura suburbanog prostora*. Sociologija sela. 1984, 22, 23–34. UDK: 316.334.5.
- [10] Ratković, A. (2008): *Zubci arheološka nalazišta*. Zavod za zaštitu kulturno-istorijskog i prirodnog nasljeđa Republike Srpske, Banja Luka.
- [11] Grad Trebinje. (2017): *Strategija razvoja grada Trebinja 2018-2027*. Autor: Trebinje.
- [12] Krajnović A, Čičin-Šain D, Predovan M. *Strateško upravljanje razvojem ruralnog turizma – problemi i smjernice*. Oeconomica Jadertina, 2011, 1 (1), 30–45. UDK: 338.2:338.484:631(497.5).
- [13] Vojnović, N. (2017): Prirodna osnova i turizam. Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Zagreb.
- [14] Studija zaštite (2020). Park prirode “Orjen” Republički zavod za zaštitu kulturno-istorijskog i prirodnog nasljeđa Republike Srpske, Banja Luka.
- [15] Lubarda, B. (2019): *Balkanski endemi u flori Bosne i Hercegovine*. Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet, Banja Luka.
- [16] Republički zavod za statistiku SRBiH. (1991). Popis stanovništva, domaćinstava, stanova i poljoprivrednih gazdinstava 1991., Prvi rezultati za stanovništvo, domaćinstva, stanove i poljoprivredna gazdinstva po opštinama i naseljenim mjestima. Statistički bilten 220. Sarajevo: Autor.
- [17] Republički zavod za statistiku Republike Srpske. (2017). Popis stanovništva, domaćinstava i stanova u Republici Srpskoj 2013. godine, Rezultati popisa – gradovi, opštine, naseljena mjesta. Banja Luka: Autor
- [18] Natević Lj, Petrović V. (1967): Osnovna geološka karta list Trebinje 1:100000. Savezni geološki zavod Beograd
- [19] Grdić Šverko Z, Krstinić-Nižić M, Mumalo M. *Povezanost klimatskih promjena i turizma: multikriterijska analiza ocjenjivanja mjera prilagodbe*. ,2017, UDK 338.48:551.583.
- [20] Popov T, Gnjata S, Trbić G. Ekstremni temperaturni i padavinski mjeseci u Istočnoj Hercegovini. Herald, 2019, 23, 73–94. doi:10.7251/HER1923073P.
- [21] Krpina V, Španjol Ž, Jazbec A. Uloga šuma i šumarstva u turizmu i zaštita na području Zadarske županije. Zagreb, 2014, UDK 630*907 + 971 (001).
- [22] Zakon o uređenju prostora i građenju („Službeni glasnik Republike Srpske”, br. 40/2013 i 2/2015 – odluka US, 106/2015 i 3/2016 – ispr., 104/2018 – odluka US i 84/2019), <http://www.vladars.net/sr-SP-Cyrl/Vlada/Ministarstva/mgr/PAO/Documents/Zakon%20o%20uredjenju%20prostora.pdf>.

- [23] Maksin M, Pucar M, Milijić S, Korać M. (2011): Održivi razvoj turizma u Evropskoj uniji i Srbiji. Institut za arhitekturu i urbanizam Srbije (IAUS), Beograd.
- [24] Lovačko udruženje "Leotar" – dokumentacija.
- [25] Kušen E, Katica D, Kušen-Tomljanović N. (2018) Turistička educiranost lokalnoga stanovništva u turističkoj destinaciji. U D. Smolčić Jurdana & I. Milohnić (Ur.), Zbornik radova 4. međunarodnog kongresa o ruralnom turizmu (str. 119-132.). Supetar: Sveučilište u Rijeci, Fakultet za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu, Hrvatska udruga za turizam i ruralni razvoj „Klub članova selo”.
- [26] Živković M. Nodalno-funkcionalna determinacija i organizacija funkcionalnog područja Gradiške. Herald, 2010, 13, 110-121. doi:10.7251/HER0913117Z.

POSSIBILITIES OF TOURIST VALORIZATION OF GEOPOTENTIAL OF ZUBAČKA UBLA AREA – CITY OF TREBINJE (ACCESS TO SPATIAL-FUNCTIONAL ORGANIZATION)

Author: DEJAN PUHALO

e-mail: dejanpuhalo3@gmail.com

Mentor: Full Prof. Mira Mandić

Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka

Introduction: The subject of this paper is the spatial unit Zubačka Ubla, which territorially belongs to the City of Trebinje. It has natural and anthropogenic values, insufficiently known and unvalued, whose putting into the function of tourism development would contribute to the tourist offer of the City of Trebinje and overall development. The observed geospatial unit has a favorable geographical position and exceptional heterogeneity in which potential tourist motives and the proposed forms of tourist valorization of the selected geographical potentials and localities are identified, analyzed and classified. The proposed spatial-functional organization of the analyzed unit seeks to preserve the identity of the place and establish the concept of sustainable development of rural tourism.

Aim: The aim of this paper is to formulate a development strategy based on a complex and systematic analysis of geopotential which can be the basis for making informed decisions and conceptual solutions by the local community in the valorization and organization of Zubačka Ubla "passive zone" in the tourist region of Trebinje.

Material and Methods: Methods of analysis, field work, observation, comparison, synthesis and mapping were used to determine the existing state of natural and anthropogenic values and risk exposure. The conceptual solution of valorization and spatial-functional organization of the studied spatial unit is defined.

Results: The field research determined: the availability of sites, infrastructural needs, space construction, accommodation capacities and the total state of resources. Development problems, constraints and potentials have been identified.

Conclusion: The analysis of the observed area concludes that the area of Zubačka Ubla has the potential for the development of weekend, excursion, hunting, camping, sport and recreational, and rural tourism as well as ecotourism. The establishment of the mentioned space in an attractive tourist locality is conditioned by the degree of preservation of the ecosystem, adaptation and construction of infrastructure, rationality of the spatial-functional organization and animation of the local population.

Keywords: Zubačka Ubla; valorization of geopotential; tourism; spatial-functional organization

EFEKTI KONZUMACIJE RAZLIČITIH PIĆA NA ERITROCITNU LOZU WISTAR PACOVA

Autori: OGNJAN MILETIĆ, Jovana Paspalj, Radoslav Dekić

e-mail: ognjanbl@gmail.com

Mentor: Vanr. prof. Radoslav Dekić

Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Uvod: Današnji izrazito brz način života je doveo do toga da sve više ljudi pribjegava upotrebi različitih napitaka koji im omogućavaju produktivniji i efikasniji rad. Ispitivanje statusa hematoloških parametara predstavlja pouzdan indikator fiziološkog stanja organizma u takvim stanjima.

Cilj rada: Cilj ovog istraživanja je praćenje efekata konzumacije alkohola i energetskega pića pojedinačno, kao i njihove kombinacije (koktela), na parametre eritrocitne loze Wistar pacova.

Materijal i metode: Parametri eritrocitne loze koji su određeni su: broj eritrocita, koncentracija hemoglobina (Hb), hematokrit (Hct), srednja vrijednost zapremine eritrocita (MCV), srednja vrijednost količine hemoglobina u eritrocitu (MCH) i srednja vrijednost hemoglobina u litri eritrocita (MCHC). Istraživanje je sprovedeno na ukupno 20 jedinki, koje su bile podijeljene u 4 grupe – 1 kontrolna i 3 eksperimentalne grupe. Pored parametara eritrocitne loze, u radu su praćene i vrijednosti mase jedinki Wistar pacova tokom eksperimenta. Parametri eritrocitne loze su određeni pomoću hematološkog brojača, dok je masa jedinki određena pomoću tehničke vage.

Rezultati: Najniža vrijednost prirasta mase zabilježena je u kontrolnoj grupi, dok je najviša vrijednost prirasta mase zabilježena u eksperimentalnoj grupi jedinki koje su tretirane energetskega pićem. Najveća odstupanja ispitivanih parametara od referentnih vrijednosti pokazana su u eksperimentalnoj grupi jedinki koje su tretirane energetskega pićem.

Zaključak: Naše istraživanje je pokazalo da ovakva pića mogu negativno uticati na eritrocitnu lozu Wistar pacova, a samim tim i na cijeli organizam. Naročit problem predstavlja kombinovano uzimanje ove dvije komponente, jer miješanjem stimulansa (energetskih pića) sa depresivima (alkoholom) se šalje mješovita poruka nervnom sistemu, zbog čega su moguće promjene u ponašanju i donošenju odluka. Zbog svih navedenih razloga, unos ovakvih pića u organizam bi trebalo da bude ograničen ili potpuno izbjegnuto.

Ključne riječi: Energetska pića; alkohol; koktel; eritrocitna loza; masa jedinki.

UVOD

Stres je faktor koji bitno utiče na kvalitet života svakog pojedinca, zbog čega postoji konstantna potreba organizma da se prilagođava novim uslovima. Zbog današnjeg izrazito brzog načina života i psihičke napetosti, sve više ljudi pribjegava upotrebi različitih napitaka koji im omogućavaju produktivniji i efikasniji rad. Kada su u pitanju energetska pića, čini se kako su zdravstvene opasnosti uveliko i ozbiljno nadmašile bilo kakve prednosti. Osim toga, problem današnjice nije samo nekontrolisano i prekomjerno konzumiranje energetskih pića, već i najnoviji trend kombinovanja energetskih i alkoholnih pića. Upravo takva kombinacija, u kojoj su zastupljeni i alkohol i energetskega piće, naziva se koktel. Iako postoje dokazani pozitivni efekti konzumacije energetskih pića, kao što su poboljšana koncentracija i brzina reagovanja, stimulisan metabolizam, poboljšana mentalna i kognitivna funkcija i mnogi drugi (1), danas se sve više naglasak stavlja na negativne efekte konzumacije tih pića. Zdravstveni problemi povezani sa energetskega napicima odnose se na pretjerani unos kofeina, posebno kod osoba koje konzumiraju više od 200 mg kofeina dnevno. Neki od dokazanih negativnih efekata konzumacije energetskih pića su poremećaj srčanog ritma (2), zatim povišen krvni pritisak, povišen nivo glukoze u krvi, porast nivoa nelagodnosti kod zdravih mladih ljudi itd. (3). Veliki problem kod uzimanja kombinacije energetskog pića i alkohola (koktela) je taj što energetska pića mogu maskirati osjećaj alkoholne opijenosti. Ovakva kombinacija može imati fatalne posljedice, koje se ogledaju u smanjenoj pospanosti, ali i produženju sedativnog efekta alkohola, koje mogu dovesti do smanjenja sposobnosti rasuđivanja i otežanog neurokognitivnog funkcionisanja. Kombinacija alkohola i pojedinih sastojaka iz energetskih pića, kao što su kofein i taurin veoma često vode agresivnom ponašanju. Podaci iz studija koje su rađene na životinjama su pokazali da taurin može maskirati efekte alkohola i eventualno podstaći veću konzumaciju. Kombinovanje alkohola sa energetskega pićima dovodi do većeg unosa alkohola, što može dovesti do veće opijenosti, pa čak i trovanja alkoholom. Pored toga, veći nivoi opijenosti sa povećanim osjećajem budnosti mogu stvoriti lažnu percepciju stvarnog pogoršanja stanja.

Još jedna zabrinjavajuća činjenica je da alkohol i energetska pića predstavljaju diuretike i samim tim dehidracija organizma je vjerovatnija (4). Do danas je urađen jako veliki broj eksperimenata u kojima su ispitani efekti koji nastaju kao posljedica konzumiranja alkoholnih i energetskih pića, pojedinačno ili u kombinaciji. U okviru ovog istraživanja, ispitani su efekti konzumacije različitih pića na eritrocitnu lozu i masu Wistar pacova.

MATERIJAL I METODE

Ovo istraživanje je sprovedeno u prostorijama Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Tretman laboratorijskih pacova je trajao ukupno 21 dan.

Opšti uslovi eksperimenta. Istraživanje je sprovedeno na ukupno 20 jedinki, koje su smještene u prozirne, plastične kaveze sa metalnim poklopcem na vrhu. Jedinke su podijeljene u ukupno četiri grupe sa po pet jedinki u svakoj. Prva grupa je predstavljala kontrolnu grupu (K) i te jedinke su tretirane vodom. Druga ispitivana grupa je predstavljala prvu eksperimentalnu grupu (E1), koja je tretirana alkoholom. Kao alkoholna komponenta korišteno je alkoholno piće *Canadian Special Old*[®] (40%). Treća grupa jedinki (E2) je tretirana energetskim pićem *Monster*[®] (*Coca-Cola HBC Hrvatska d. o. o.*), dok je četvrta grupa jedinki (E3) tretirana kombinacijom alkoholnog i energetskog pića (koktel). Na osnovu podataka o uticaju alkoholnih i energetskih pića na hematološke parametre, odlučeno je da će životinje biti tretirane istom dozom pića po gramu mase pacova. Ta doza je za energetsko piće iznosila 2 ml/100 g, a za vodu i alkohol 1 ml/100 g. Eksperimentalna grupa koja je tretirana alkoholom i energetskim napitkom u kombinaciji, tretirana je u odnosu 1 : 2. Voda, alkohol, energetsko piće i koktel su aplikovani oralnom intubacijom pipetom zapremine 5 ml. Postupak aplikacije je ponavljan svakodnevno u približno isto vrijeme. U toku trajanja eksperimenta, u laboratoriji su održavani uslovi kontrolisanog osvjjetljenja (12 h svjetlost – 12 h mrak) i temperature od 24°C. Životinje su hranjene standardizovanom peletiranom hranom, a vodu su konzumirali *ad libitum*. Dan nakon posljednje aplikacije izvršeno je uzimanje uzoraka krvi, na osnovu kojih su određene vrijednosti hematoloških parametara.

Određivanje mase jedinki. Masa jedinki je parametar koji je praćen tokom cijelog eksperimenta. Za određivanje mase je korištena tehnička vaga, sa tačnošću na dvije decimale. Prije početka istraživanja, svim jedinkama je određena masa, kako bi se raspoređivanje u kaveze vršilo po principu približne mase. Na svakih sedam dana, jedinkama je praćena promjena mase i na osnovu tih podataka je ponovo vršeno računanje adekvatne doze pića kojom je tretirana svaka jedinka u eksperimentu (po g mase jedinke). U radu su prikazane početne i završne vrijednosti. Pored tih vrijednosti, navedene su i vrijednosti prosječnog prirasta mase za svaku grupu, koje su dobijene na osnovu prosječnog prirasta mase svake pojedinačne jedinke u grupi. Relativni prirast mase (*Percentage of body weight gain – BWG*) predstavlja odnos tjelesne mase nakon praćenog vremena u odnosu na masu zabilježenu na početku eksperimenta (8).

Anesteziranje životinja, uzimanje uzoraka krvi i određivanje hematoloških parametara. Dan nakon posljednje aplikacije izvršeno je uzimanje uzoraka krvi, na osnovu kojih su određene vrijednosti hematoloških parametara. Anesteziranje pacova je izvršeno intramuskularnom administracijom ketamina, koncentracije 50 mg/kg, koji je razblažen fiziološkim rastvorom u omjeru 1 : 10. Korišteni ketamin je proizveden pod nazivom Ketaminol 10 (Intervet, 100 ml/mg). Anestetik je ubrizgavan intramuskularno, u zapremini određenoj prema masi svake jedinke. Uzorci krvi su uzeti punkcijom srčanog mišića oštrom i sterilnom iglom. Uzorci krvi su sakupljeni u standardizovane epruvete sa antikoagulansom (K₃EDTA), da bi se vršile dalje analize.

Određivanje parametara eritrocitne loze. U sakupljenim uzorcima krvi su pomoću hematološkog brojača (*Nihon Kohden*) određeni sljedeći hematološki parametri: broj eritrocita (RBC), koncentracija hemoglobina (Hb), hematokrit (Hct) i hematološki indeksi (MCV – srednja vrijednost zapremine eritrocita, MCH – srednja vrijednost količine hemoglobina u eritrocitu i MCHC – srednja vrijednost hemoglobina u litri eritrocita).

Statistička obrada podataka. Svi dobijeni rezultati u istraživanju su statistički obrađeni pomoću programskog paketa *Microsoft Office Excel 2010*. Statistička obrada podataka se zasnivala na određivanju srednje vrijednosti, standardne devijacije, minimalne i maksimalne vrijednosti i koeficijenta varijacije.

REZULTATI

PARAMETRI ERITROCITNE LOZE

Kao što je već napomenuto, u dobijenim uzorcima krvi su pomoću hematološkog brojača određeni sljedeći parametri eritrocitne loze: broj eritrocita u krvi (RBC), koncentracija hemoglobina (Hb), hematokrit (Hct), srednja vrijednost zapremine eritrocita (MCV), srednja vrijednost količine hemoglobina u eritrocitu (MCH) i srednja vrijednost količine hemoglobina u litri eritrocita (MCHC). U tabelama 1, 2, 3, i 4. su prikazane vrijednosti praćenih hematoloških parametara za sve grupe.

Tabela 1. Parametri eritrocitne loze kontrolne grupe

	Broj eritrocita ($10^{12}/l$)	Hb (g/l)	Hct (l/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/l)
Srednja vrijednost	9.22	166.20	0.48	51.70	18.10	349.40
Standardna devijacija	0.54	8.52	0.02	1.91	0.81	5.31
Minimum	8.73	155.00	0.45	49.10	17.10	345.00
Maksimum	10.10	177.00	0.51	54.10	19.00	358.00
Koef. varijacije	5.87	5.13	4.17	3.69	4.48	1.52

Srednja vrijednost broja eritrocita jedinki kontrolne grupe se nalazi u okviru referentnih vrijednosti i ne pokazuje značajnija odstupanja. Koncentracija hemoglobina kod jedinki iz kontrolne grupe odgovara referentnim vrijednostima. Vrijednost hematokrita u ovoj grupi je nešto iznad referentne vrijednosti. Srednje vrijednosti MCV (51,70 fl), MCH (18,10 pg) i MCHC (349,40 g/l) ne pokazuju značajnija odstupanja od referentnih vrijednosti.

Tabela 2. Parametri eritrocitne loze eksperimentalne grupe E1 (alkohol)

	Broj eritrocita ($10^{12}/l$)	Hb (g/l)	Hct (l/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/l)
Srednja vrijednost	7.71	131.60	0.38	49.72	17.08	343.60
Standardna devijacija	0.93	14.76	0.04	1.07	0.36	6,84
Minimum	6.51	114.00	0.34	49.00	16.70	337.00
Maksimum	8.94	149.00	0.44	51.60	17.50	351.00
Koef. varijacije	12.06	11.22	10.53	2.15	2.12	1.99

Srednja vrijednost broja eritrocita u eksperimentalnoj grupi koja je tretirana alkoholom iznosila je 7,71 x $10^{12}/l$. Ova vrijednost ne pokazuje odstupanje u odnosu na referentnu vrijednost. Srednja vrijednost koncentracije hemoglobina u E1 grupi ne odstupa od normalnih vrijednosti, dok srednja vrijednost hematokrita (0,38 l/l) pokazuje nešto nižu vrijednost u odnosu na referentnu vrijednost. Srednja vrijednost za parametre MCV i MCHC se nalazi u opsegu referentnih, dok vrijednost parametra MCH pokazuje nešto nižu vrijednost u odnosu na referentnu vrijednost.

Tabela 3. Parametri eritrocitne loze eksperimentalne grupe E2 (energetsko piće)

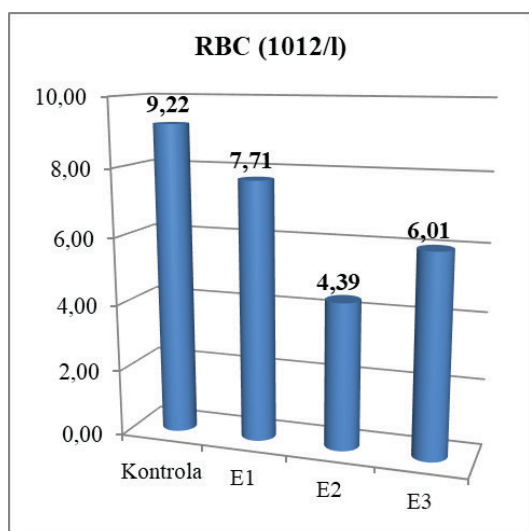
	Broj eritrocita ($10^{12}/l$)	Hb (g/l)	Hct (l/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/l)
Srednja vrijednost	4.39	78.00	0.23	52.96	17.90	338.40
Standardna devijacija	0.76	11.14	0.04	3.37	0.90	17.11
Minimum	3.14	61.00	0.18	52.40	17.00	309.00
Maksimum	5.15	92.00	0.27	56.10	19.40	347.00
Koef. varijacije	17.31	14.28	17.39	6.36	5.03	5.06

Srednja vrijednost broja eritrocita u E2 grupi je niža u odnosu na referentnu vrijednost. Osim toga, rezultati našeg istraživanja pokazali su da je srednja vrijednost koncentracije hemoglobina u E2 grupi značajno niža u odnosu na referentne vrijednosti i na vrijednosti dobijene u ostalim grupama. Srednja vrijednost hematokrita je takođe niža u odnosu na referentnu vrijednost. Srednje vrijednosti parametara MCV i MCHC su u okviru referentnih vrijednosti, dok je srednja vrijednost parametra MCH nešto niža od referentne vrijednosti.

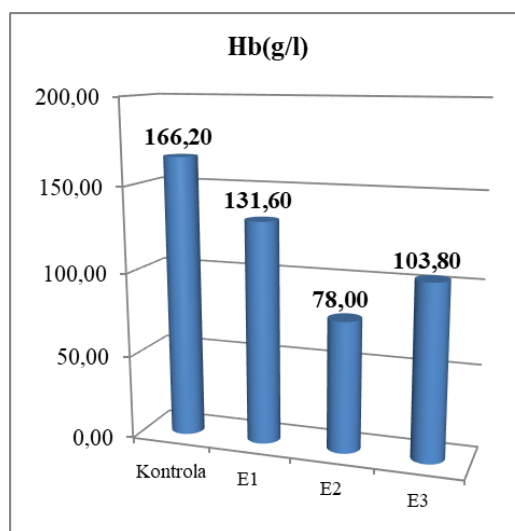
Tabela 4. Parametri eritrocitne loze eksperimentalne grupe E3 (koktel)

	Broj eritrocita ($10^{12}/l$)	Hb (g/l)	Hct (l/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/l)
Srednja vrijednost	6.01	103.80	0.30	50.14	17.22	343.80
Standardna devijacija	1.13	21.57	0.06	1.71	0.65	8.11
Minimum	4.36	76.00	0.23	48.70	16.30	335.00
Maksimum	7.19	130.00	0.38	52.20	18.10	354.00
Koef. varijacije	18.80	20.78	20.00	3.41	3.77	2.36

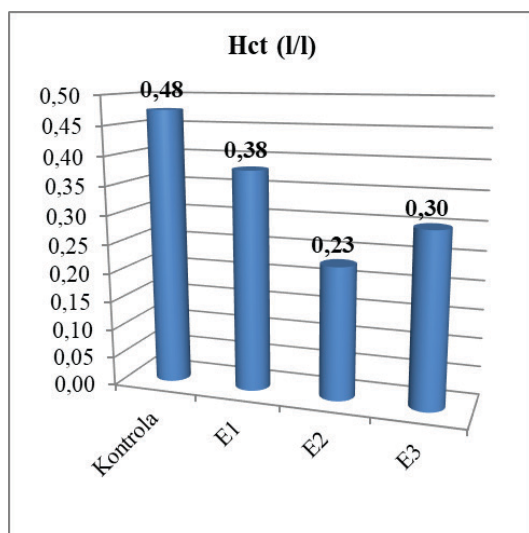
Broj eritrocita u eksperimentalnoj grupi koja je tretirana koktelom (E3) se nalazi u opsegu referentne vrijednosti prema Sharp i Vilano (5). Vrijednost koncentracije hemoglobina je iznosila 103,80 g/l. Srednja vrijednost hematokrita je nešto niža u odnosu na referentne vrijednosti. Srednje vrijednosti MCV i MCHC su u opsegu referentnih vrijednosti prema gore pomenutim autorima, dok je srednja vrijednost MCH nešto niža. Na grafikonima 1, 2, 3, 4, 5 i 6. su grafički predstavljeni svi dobijeni rezultati za parametre eritrocitne loze.



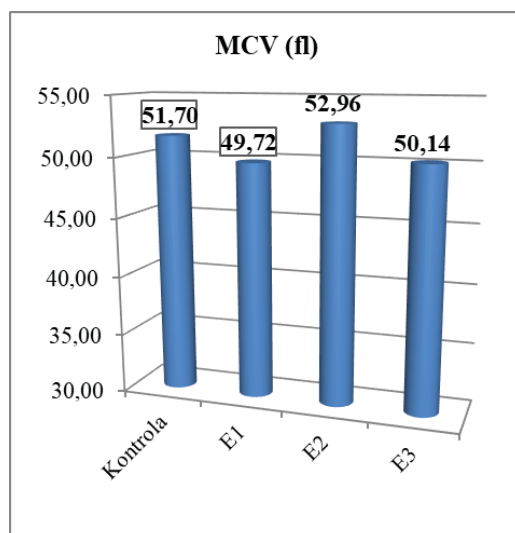
Grafikon 1. Broj eritrocita x $10^{12}/l$



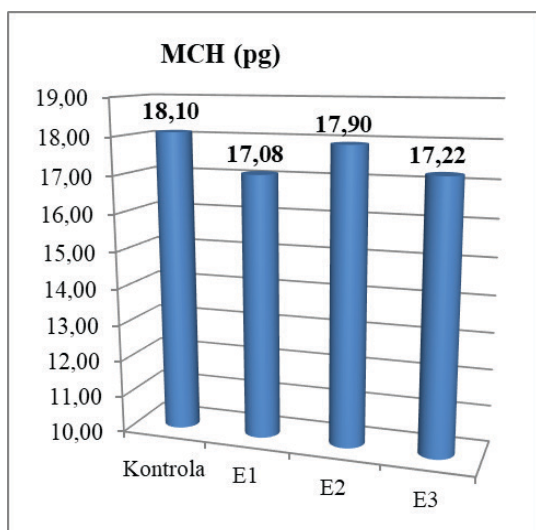
Grafikon 2. Koncentracija hemoglobina (g/l)



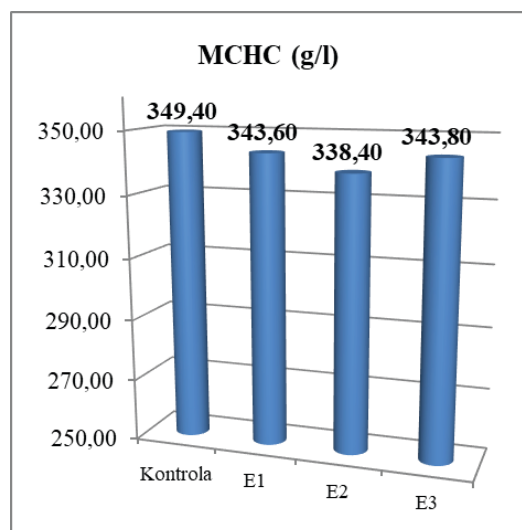
Grafikon 3. Hematokrit (l/l)



Grafikon 4. MCV (fl)



Grafikon 5. MCH (pg)



Grafikon 6. MCHC (g/l)

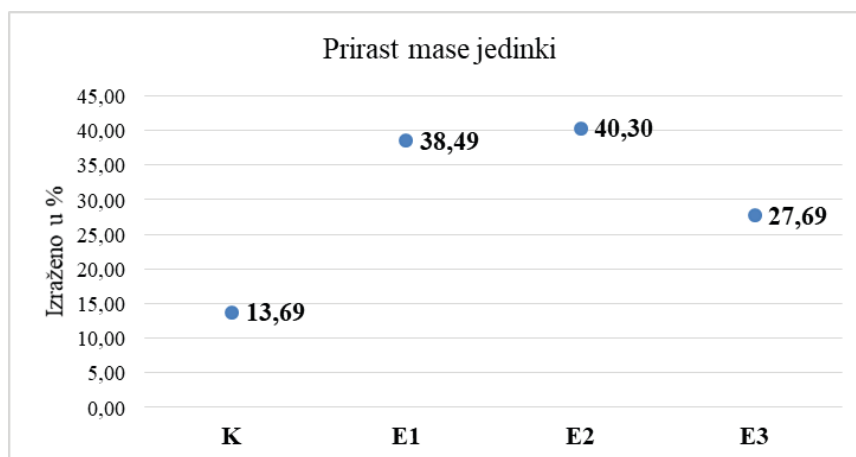
MASA I PRIRAST MASE U EKSPERIMENTU

Masa je parametar koji je praćen tokom cijelog eksperimenta. U Tabeli 5. su navedene vrijednosti prosječnog prirasta mase za svaku grupu jedinki, koje su dobijene na osnovu prosječnog prirasta mase svake pojedinačne jedinke. Skraćenice u Tabeli 5. su sljedeće: PM – početna masa; KM – konačna masa.

Tabela 5. Prosječan prirast mase svih grupa u eksperimentu

Oznaka	K – Kontrola		E1 – alkohol		E2 – energetska piće		E3 – koktel	
Srednja vrijednost	PM (g)	KM (g)	PM (g)	KM (g)	PM (g)	KM (g)	PM (g)	KM (g)
	99.10	108.33	68.50	92.60	71.21	100.01	102.74	125.16
Prosječan prirast mase	13.69%		38.49%		40.30%		27.69%	

Na osnovu vrijednosti prosječnog prirasta mase svake pojedinačne jedinke, dobijene su vrijednosti za prosječan prirast mase svake grupe. Najniža vrijednost prirasta mase zabilježena je u kontrolnoj grupi jedinki, dok je najviša vrijednost prirasta mase očekivano zabilježena u eksperimentalnoj grupi jedinki koje su tretirane energetska pićem (E2). Rezultati ovog eksperimenta pokazali su da je došlo do značajnog povećanja tjelesne mase kod jedinki tretiranih energetska pićem u poređenju sa kontrolnom grupom. U preostale dvije eksperimentalne grupe (E1 i E3), prirast mase je bio nešto niži u odnosu na vrijednost prirasta mase u E2 grupi. Stoga bi se iz eksperimenta moglo zaključiti da produženo konzumiranje energetskih pića značajno utiče na povećanje tjelesne mase tretiranih životinja energetska napicima. Na Grafikonu 7. su grafički prikazane vrijednosti za prosječan prirast mase svih grupa u istraživanju.



Grafikon 7. Grafički prikaz prirasta mase svih grupa u istraživanju

DISKUSIJA

Na osnovu dobijenih rezultata u našem istraživanju, uočeno je da je najniži broj eritrocita zabilježen u eksperimentalnoj grupi jedinki koje su tretirane energetske pićem. Osim toga, značajno niži broj eritrocita je zabilježen i u ostalim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu grupu. Smatra se da prisustvo visoke koncentracije ugljenih hidrata u sastavu energetskih pića može rezultovati višim osmotskim pritiskom, koji može dovesti do sniženog broja eritrocita (6). Sa druge strane, gubitak eritrocita može biti uzrokovan poremećajima u hematopoezi, destrukcijom eritrocita i/ili smanjenom brzinom njihove sinteze. Destrukcija eritrocita reflektuje neuspjeh hepatocelularne funkcije, koji bi mogao biti uzrokovan konzumacijom kofeinskog energetskog napitka (7–8). Kada je u pitanju koncentracija hemoglobina i vrijednost hematokrita, u našem istraživanju su zabilježene značajno više vrijednosti u kontrolnoj grupi u odnosu na sve eksperimentalne grupe. Rezultatima sličnih studija (8), u kojoj su pacovi soja *Wistar* tretirani energetskim pićima različitih proizvođača, pokazani su značajni uticaji na hematopoetski sistem. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju smanjenje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina, vrijednosti hematokrita, broja trombocita i neutrofila kod pacova tretiranih *Red Bull* energetskim pićem, što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja. Whitehead i sar. (9) su proučavali uticaj konzumacije alkohola na koncentraciju hemoglobina i broj eritrocita kod ispitanika muškog pola. Njihovi rezultati su pokazali da konzumacija alkohola dovodi do smanjenja broja eritrocita, ali do povećanja MCV parametra. Rezultati našeg istraživanja za parametre MCV, MCH i MCHC nisu pokazivali značajne razlike u poređenju kontrolne i eksperimentalnih grupa jedinki. Rezultati dobijeni u istraživanju Bassey i sar. (10) pokazali su da je došlo do promjene u broju eritrocita i u vrijednostima koncentracije hemoglobina kod pacova pojenih koktelom u odnosu na kontrolnu grupu. Smatra se da niska koncentracija hemoglobina može nastati i kao rezultat dehidracije uzrokovane kofeinom (4). Zabrinjavajuće podatke o negativnom uticaju energetskih pića je objavila Američka uprava za bezbjednost hrane 2012. godine u jednom od izvještaja. Ovi podaci pokazuju da konzumiranje *Red Bulla* može izazvati preko dvadeset različitih nuspojava, od kojih su najčešće nepravilan rad srca, povišen krvni pritisak, srčani zastoj, zatajenje bubrega i mnogi drugi (11). Osim toga, ova uprava je povezala i energetske piće *Monster* sa pet smrtnih slučajeva, zbog činjenice da se u sastavu ovog energetskog pića nalazi visoka koncentracija šećera, kao i dvostruke dnevne doze riboflavina, niacina, vitamina B6, ali i vitamina B12. Pored hematoloških parametara, u istraživanju je praćena i promjena u masi jedinki. Najniža vrijednost prirasta mase zabilježena je u kontrolnoj grupi jedinki, dok je najviša vrijednost prirasta mase očekivano zabilježena u eksperimentalnoj grupi jedinki koje su tretirane energetskim pićem (E2). Uzimajući u obzir da se u sastavu energetskih pića nalazi visoka koncentracija šećera, ali i mnogih drugih aktivnih supstanci, sasvim je očekivano da tokom dugotrajne upotrebe ovih negaziranih pića dolazi do porasta u masi. Dobijeni rezultat takođe može biti posljedica efekta neispavanosti uzrokovanim kofeinom koji se nalazi u energetskim pićima (10). Osim toga, značajno povećanje tjelesne mase može biti posljedica izmijenjene stope metabolizma, koja uzrokuje povećanje brzine skladištenja lipida u masnom tkivu (12). Prisustvo visokih količina šećera u sastavu energetskih pića može biti povezano sa povećanim rizikom od debljanja (13), zbog smanjene sitosti i unošenja tzv. praznih kalorija (14–15). Ugwuja (16) je u svom eksperimentu (2013) utvrdio da je veći prirast mase zabilježen kod pacova koji su tretirani pojedinačno energetskim pićem, nego kombinacijom energetskog pića i alkohola. Slični rezultati dobijeni su i u ovom istraživanju.

ZAKLJUČCI

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da alkohol i energetska pića (pojedinačno ili u kombinaciji) mogu negativno uticati na eritrocitnu lozu *Wistar* pacova, a samim tim i na cijeli organizam.

- Najniža vrijednost prirasta mase zabilježena je u kontrolnoj grupi (13.69%), dok je najviša vrijednost prirasta mase zabilježena u eksperimentalnoj grupi jedinki koje su tretirane energetskim pićem (E2) (40.30%).
- Srednja vrijednost broja eritrocita u kontrolnoj grupi je iznosila $9.22 \times 10^{12}/l$, a u svim eksperimentalnim grupama srednja vrijednost broja eritrocita je bila značajno niža. Najniža srednja vrijednost broja eritrocita utvrđena je u eksperimentalnoj grupi jedinki koje su tretirane energetskim pićem (52% niža u odnosu na kontrolnu grupu).
- Koncentracija hemoglobina pokazuje značajna odstupanja u eksperimentalnoj grupi koja je tretirana koktelom (E3) i u grupi jedinki koje su tretirane energetskim pićem (E2). Srednje vrijednosti koncentracije hemoglobina u ove dvije grupe su niže u odnosu na referentnu vrijednost.
- Srednja vrijednost hematokrita pokazuje značajno nižu vrijednost u eksperimentalnim grupama jedinki u odnosu na kontrolnu grupu jedinki. Date vrijednosti se nalaze van referentnih vrijednosti.
- Za parametre MCV, MCH i MCHC nisu uočene značajne razlike u poređenju kontrolne i eksperimentalnih grupa jedinki.

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da energetska pića i alkohol mogu predstavljati potencijalan problem ukoliko se konzumiraju često i u prekomjernim dozama. Naročit problem predstavlja kombinovano uzimanje ove dvije komponente, jer energetska pića maskiraju osjećaj alkoholne opijenosti. Miješanjem stimulansa (energetskih pića) sa depresivima (alkoholom) se šalje mješovita poruka nervnom sistemu, zbog čega su moguće promjene u ponašanju i donošenju odluka. Zbog svih navedenih razloga, unos ovakvih pića u organizam bi trebalo da bude ograničen ili potpuno izbjegnuto.

LITERATURA

- (1) Van Den Eynde F., Van Baelen P.C., Portzky M., Audenaert K. The effects of energy drinks on cognitive performance, *Tijdschrift voor psychiatrie*. 50 (5): 273–81, 2008. PMID: 18470842.
- (2) Hajsadeghi S., Mohammadpour F., Manteghi M.J., Kordshakeri K., Tokazebani M., Rahmani E., Hassan-zadeh M. Effects of energy drinks on blood pressure, heart rate, and electrocardiographic parameters: An experimental study on healthy young adults. Department of Cardiology, Rasoul-e-Akram Hospital, Medical Student Research Committee (MSRC), Internal Medicine, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, 2016. DOI: 10.5152/akd.2015.5930.
- (3) Nowak D., Goslinski M., Nowatkowska K. The Effect of Acute Consumption of Energy Drinks on Blood Pressure, Heart Rate and Blood Glucose in the Group of Young Adults. Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 2018. DOI: 10.3390/ijerph15030544.
- (4) Pennay A., Lubman D., Miller P. Combining energy drinks and alcohol - A recipe for trouble? *Australian Family Physician* Vol. 40, No. 3, March 2011. PMID: 21597509.
- (5) Sharp, P. and Villano, J. *The Laboratory Rat*, Second Edition. CRC Press, New York, 2013.
- (6) Marczinski C.A., Fillmore M.T., Bardgett M.E., Howard M.A. Effects of energy drinks mixed with alcohol on behavioral control: Risks for college students consuming trendy cocktails. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 1282-1292, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01464.x>.
- (7) Akande I. S. and Banjoko O. A. Assessment of Biochemical Effect of “Power Horse” Energy Drink on Hepatic, Renal and Histological Functions in Sprague Dawley Rats. *Annual Review & Research in Biology*. 1(3): 45-56, 2011. ID: 203815671.
- (8) Khayyat I.L., Essawy E.A., Al Rawy M.M., Sorour J.M. Comparative study on the effect of energy drinks on haematopoietic system in Wistar albino rats, *J. Environ. Biol.* 5, 883-91, 2014. PMID: 25204063.
- (9) Whitehead TP, Robinson D, Allaway SL, Hale AC. The effects of cigarette smoking and alcohol consumption on blood hemoglobin, erythrocytes and leukocytes: a dose related study on male subjects. *Clinical and laboratory hematology*, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.1995.tb01221.x>.
- (10) Bassey N.O., Ukpanukpong R.U., Essien N.M., Abu C.I., Enyivi P.B., Ekam V. S. Effect of acetaminophen and caffeinated energy drink on the body weight and haematological indices of albino Wistar rats during sub-chronic alcohol consumption. Department of Biochemistry, University of Calabar, Calabar, Nigeria, 2017. ISSN: 2277-2103.
- (11) Food and Drug Administration (FDA): <https://www.fda.gov/>. 2012.
- (12) Vasanti S.M., Matthias B.S, Frank, B.H. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review 1,2,3, *Am J Clin Nutr* 84 (2):274-88, 2006. doi: 10.1093/ajcn/84.1.274.
- (13) Malik V.S., Popkin B.M., Bray G.A., Despres J.P., Willett W.C, Hu F.B. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care*, 33 (11):2477-83, 2010. doi: 10.2337/dc10-1079.
- (14) Anton S.D., Martin C.K, Han H., Coulon S., Cefalu W.T., Geiselman P. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55 (1):37-43, 2010. doi: 10.1016/j.appet.2010.03.009.
- (15) Bray G.A. How bad is fructose? *Am J Clin Nutr*, 86 (4):895-6, 2007. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.4.895>.
- (16) Ugwuja E. Biochemical effects of energy drinks alone or in combination with alcohol in normal albino rats. Department of Chemical Pathology, Faculty of Clinical Medicine, Ebonyi State University, 2013. doi: 10.5681/apb.2014.011.

EFFECTS OF CONSUMPTION OF DIFFERENT BEVERAGES ON RED BLOOD CELL PARAMETERS OF *WISTAR* RATS

Authors: OGNJAN MILETIĆ, Jovana Paspalj, Radoslav Dekić

e-mail: ognjanbl@gmail.com

Mentor: Assoc. Prof. Radoslav Dekić

Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka

Introduction: Due to today's extremely fast lifestyle, more people resort to the use of various beverages that allow them to work more productively and efficiently. Examination of the status of hematological parameters is a reliable indicator of the physiological state of an organism in such conditions.

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of alcohol and energy drink consumption separately, as well as their combinations (cocktails), on the red blood cell parameters of Wistar rats.

Material and Methods: The following red blood cell parameters were measured: red blood cell count, hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). The research was conducted on 20 Wistar rats, which were allocated into four groups – 1 control group and 3 experimental groups. Besides the red blood cell parameters, the growth of Wistar rats during the experiment was also monitored. The parameters of the red blood cells were measured using a Nihon Kohden hematological analyzer, while the body mass was determined using a technical scale.

Results: The lowest value of weight gain was recorded in the control group, while the highest value of weight gain was recorded in the experimental group treated with an energy drink. The largest deviations from the reference values are shown in the experimental group treated with an energy drink.

Conclusion: Our research has shown that such drinks can negatively affect the erythrocytes of Wistar rats, and also the whole organism. A special problem is the combined intake of these two components, because mixing stimulants (energy drinks) and depressants (alcohol) sends a mixed message to the nervous system, which is why changes in behavior and decision-making are possible. For all these reasons, the intake of such drinks should be limited or completely avoided.

Keywords: energy drink; alcohol; cocktail; red blood cell parameters; body mass

UPOREDNA ANALIZA METODA TRAPEZA I PRAVOUGAONIKA ZA ODREĐIVANJE POVRŠINE ISPOD KRIVE (AUC) U FARMAKOKINETIČKIM MODELIMA

Autor: NEVENA KUKAVICA

e-mail: kukavica.nevena4@gmail.com

Mentori: Doc. dr Dragana Ranković, asis. Marija Minić

Katedra za fiziku i matematiku

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Uvod: Ovaj rad se bavi različitim načinima izračunavanja površine ispod krive (PIK) i površine ispod krive prvog statističkog momenta (PIKM-a), koji se vrlo često računaju tokom sprovođenja farmakokinetičke analize lekova ili metabolita. Kod prostorne farmakokinetičke analize, nakon što se izvrši fitovanje krive, može se izračunati stvarna vrednost PIK-a, međutim, kod neprostorne analize to nije slučaj.

Cilj rada: Metoda trapeza najčešće je korišćena za aproksimaciju PIK-a u neprostornoj analizi, ali je kroz ovaj rad razmotrena mogućnost primene metode pravougaonika.

Materijal i metode: Proučene su tri metode pravougaonika, gde su za visinu uzete vrednosti koncentracija na početku, sredini i kraju intervala. Bez obzira na metodu koja se primeni, dolazi do pravljenja greške prilikom određivanja aproksimativne vrednosti PIK-a. Zato je kroz primere, koji predstavljaju simulaciju primene lekova i koji se međusobno razlikuju u načinu primene leka i modelu koji lek prati, razmotreno primenom koje metode aproksimacije PIK-a dolazi do najmanje greške.

Rezultati: Primenom metode pravougaonika sa visinom na sredini intervala javlja se najmanja greška, dok vrednosti aproksimacija PIK-a dobijene metodom trapeza ne pokazuju značajno veću grešku. Metode pravougaonika, kada se visina uzima na početku i na kraju intervala, ne daju zadovoljavajuće rezultate. Kod ispitivanja vrednosti aproksimacija PIKM-a, došlo se do istovetnih zaključaka, kao u slučaju aproksimiranja PIK-a.

Zaključak: Bez obzira na to da li je lek primenjen ekstravaskularno ili intravenski, i da li je pratio jednodimenzionalni ili dvodimenzionalni model, metode izbora su iste. Može se pretpostaviti da bi se primenom metode izbora u realnim primerima farmakokinetičke analize lekova takođe pravila najmanja greška u aproksimaciji PIK-a i PIKM-a. Ali je pretpostavka da bi greške bile proporcionalne i bez razlike u značaju u odnosu na vrednosti grešaka koje su se javile u opisanim primerima u samom radu.

Ključne reči: PIK; PIKM; metoda trapeza; metoda pravougaonika; farmakokinetička analiza

UVOD

Merenje koncentracije leka ili metabolita, najčešće u plazmi, ima veoma važnu ulogu u farmakokinetičkim ispitivanjima. Praćenje trenda po kom se menja koncentracija u plazmi najlakše je pratiti korišćenjem grafika [1]. Površina ispod krive (*area under curve* – AUC, PIK) parametar je koji se često izračunava iz grafika i predstavlja integral koncentracije leka u funkciji vremena $C = f(t)$ od nule do beskonačnosti. Značaj površine ispod krive (PIK) jeste u tome što predstavlja meru količine leka u sistemske cirkulaciji, odnosno količinu resorbovanog leka, otuda ovaj parametar predstavlja stepen resorpcije leka. Pored toga, PIKM je površina ispod krive prvog statističkog momenta definisana kao površina ispod krive $C \cdot t = f(t)$ od nule do beskonačnosti dobijene iz proizvoda vremena i koncentracije leka u funkciji vremena. Značaj ova dva parametra jeste i u određivanju srednjeg vremena zadržavanja (SVZ). SVZ je parametar koji označava prosečno vreme koje molekuli leka provedu u organizmu, tj. određenom kinetičkom prostoru i zavisi od mesta i brzine ulaska leka i izlaska leka najčešće iz plazme, a izračunava se iz odnosa PIK-a i PIKM-a [1].

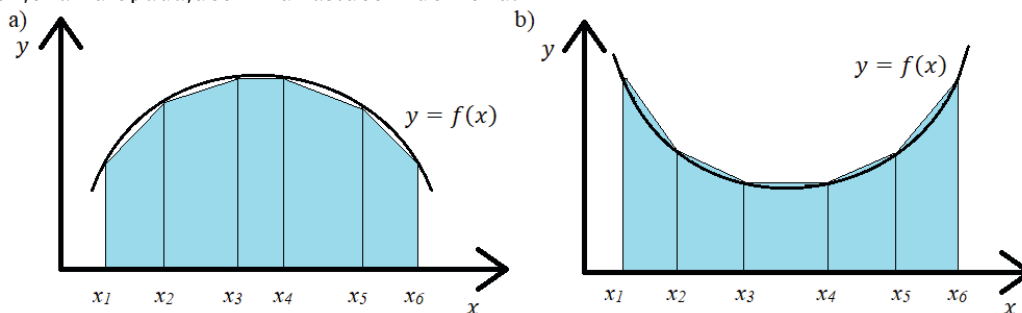
Osnovni tip ispitivanja koji se koristi u farmakokinetici je model zavisna (prostorna) analiza, koja kvantitativno definiše procese kroz koje lek prolazi u organizmu. Matematički model dobijen prostornom analizom može biti previše komplikovan, pa prostorna analiza nije uvek optimalan izbor farmakokinetičke analize za upotrebu u kliničkoj praksi. Model nezavisna (neprostorna) analiza nametnula se kao pristup koji znatno više odgovara kliničkoj praksi i često je sastavni deo sprovođenja racionalne farmakoterapije iz nekoliko razloga [2]. Pre svega, organizam je celina sastavljena iz višemilionskih prostora i nije opravdano deliti ga na ograničen broj prostora. Dodatni razlog za čestu primenu neprostorne analize jeste nedovoljan broj bioloških uzoraka i/ili neadekvatan broj uzoraka u okviru određenih farmakokinetičkih procesa [1]. U samoj neprostornoj analizi podataka, ne vrši se fitovanje podataka i ne formira se model na osnovu kog bi se računali potrebni parametri. Iz tog razloga, nije moguće tačno izračunati PIK, već se površina procenjuje, najčešće metodom trapeza [2]. Kako se vrši aproksimacija tokom izračunavanja vrednosti PIK-a, dolazi do pravljenja određene

greške, zbog koje je prognostička moć neprostorne analize manja u odnosu na prostornu analizu i ne može na adekvatan način da kvantifikuje nelinearnosti u farmakokinetičkim procesima [1]. Međutim, neprostorna analiza podataka se sprovodi jednostavnije i brže u odnosu na prostornu analizu i pored toga omogućava izračunavanje primarnih farmakokinetičkih parametara, iako je bazirana na manjem broju pretpostavki [1].

Iako se PIK najčešće procenjuje metodom trapeza, postoje i druge metode, kao što je metod pravougaonika. U okviru metode pravougaonika razlikuju se tri vrste, u zavisnosti od toga koja vrednost se uzima za visinu pravougaonika: koncentracije na početku, sredini ili kraju svakog intervala.

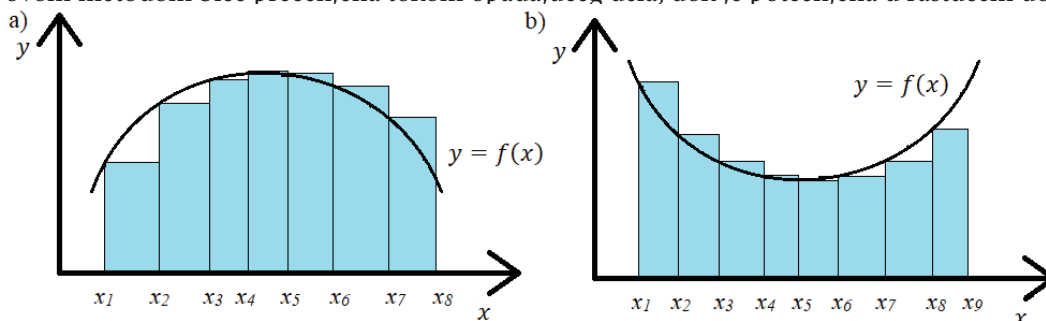
U ovom radu biće upoređena metoda trapeza sa metodom pravougaonika (sve tri vrste) pri aproksimaciji PIK-a. Cilj rada jeste da se proceni greška tokom primene navedenih metoda u različitim slučajevima primene leka (ekstravaskularne i intravenske) i izvede zaključak koji je metod najpogodniji za primenu pri aproksimaciji PIK-a i PIKM-a na različitim primerima.

Potrebno je naglasiti da je greška, koja se javlja prilikom aproksimacije, posledica toga što je u nekim delovima funkcije vrednost PIK-a precenjena, dok je u nekim potcenjena, u zavisnosti od njenog oblika i metode koja se primenjuje. U slučaju aproksimacije metodom trapeza, ukoliko je funkcija konkavnog oblika, aproksimacija koja se izračunava biće potcenjena u odnosu na stvarnu, dok je u slučaju konveksnog oblika funkcije precenjena i u opadajućem i u rastućem domenu.



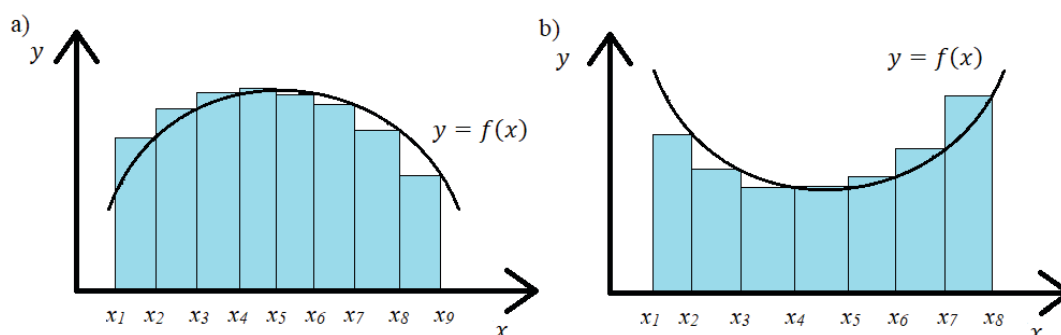
Slika 1. Aproksimacija PIK-a metodom trapeza u slučaju: a) konkavne i b) konveksne funkcije

U slučaju primene metode pravougaonika sa visinom na početku intervala kod funkcije, koja je konkavna, tokom domena u kome je funkcija rastuća vrednost površine biće potcenjena, dok će, u domenu u kome je funkcija opadajuća, vrednost biti precenjena. Ukoliko je funkcija konveksna, vrednost aproksimacije PIK-a dobijena ovom metodom biće precenjena tokom opadajućeg dela, dok je potcenjena u rastućem domenu.



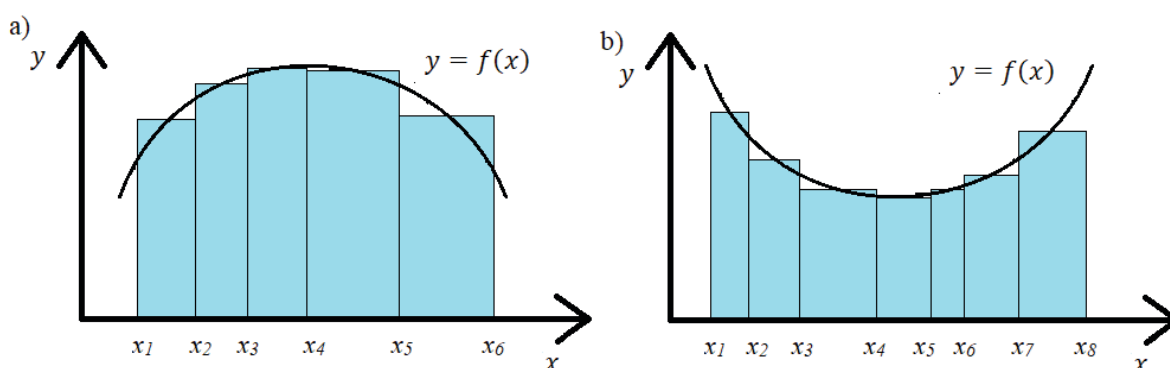
Slika 2. Aproksimacija PIK-a metodom pravougaonika sa visinom na početku intervala u slučaju: a) konkavne i b) konveksne funkcije

Primenom metode pravougaonika u kojoj je za visinu uzeta vrednost na kraju intervala, u slučaju konkavne funkcije, vrednost tokom rastućeg domena funkcije je precenjena, a tokom opadajućeg je potcenjena. Primenom ove metode na konveksnu funkciju, tokom opadajućeg domena vrednost će biti potcenjena, a tokom rastućeg domena vrednost je precenjena.



Slika 3. Aproximacija PIK-a metodom pravougaonika sa visinom na kraju intervala u slučaju: a) konkavne i b) konveksne funkcije

Metodom pravougaonika sa visinom na sredini intervala vrednost aproksimacije PIK-a će se takođe razlikovati u odnosu na stvarnu vrednost, međutim, površina pravougaonika u pojedinim intervalima biće veća, a u pojedinim manja od stvarne vrednosti PIK-a između granica intervala.



Slika 4. Aproximacija PIK-a metodom pravougaonika sa visinom na sredini intervala u slučaju: a) konkavne i b) konveksne funkcije [3]

MATERIJAL I METODE

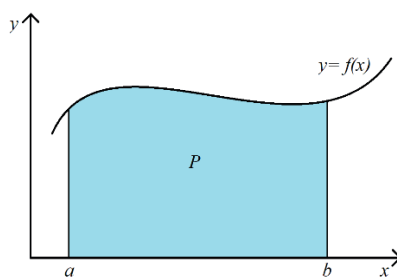
Potrebno je izračunati PIK koncentracije leka u funkciji vremena od nule do beskonačnosti posle intravenske i ekstravaskularne primene leka $PIK_{i.v.}^{0 \rightarrow \infty}$ i $PIK_{e.v.}^{0 \rightarrow \infty}$; kao i površinu ispod prvog statističkog momenta, odnosno površinu ispod krive proizvoda koncentracije i vremena u funkciji vremena od nule do beskonačnosti $PIKM^{0 \rightarrow \infty}$ [2]. Za rešavanje ovog problema, potrebno je uvesti sledeće definicije.

Definicije matematičkih pojmova koje slede, a koje su kasnije primenjene na primerima u nastavku rada, preuzete su iz [3].

Određeni integral

Def. Neka je interval $[a, b]$ podeljen na n intervala $[x_0, x_1], [x_1, x_2], \dots, [x_{n-1}, x_n]$ tačkama (P) $a = x_0, x_1, \dots, x_n = b$, $x_0 < x_1 < \dots < x_n$ i neka su (T) $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_n$ proizvoljne tačke koji pripadaju tim intervalima $\xi_1 \in [x_0, x_1], \xi_2 \in [x_1, x_2], \dots, \xi_n \in [x_{n-1}, x_n]$. Neka je d_k dužina intervala $[x_{k-1}, x_k]$, $k = 1, 2, \dots, n$ i neka je $d = \max(d_1, d_2, \dots, d_n)$. Pretpostavimo da je funkcija f ograničena na $[a, b]$. Ako za svaku podelu (P) i svaki izbor tačaka (T) postoji ista konačna granična vrednost $I = \lim_{d \rightarrow 0} \sum_{k=1}^n f(\xi_k)(x_k - x_{k-1})$ kažemo da je funkcija $f(x)$ integrabilna na $[a, b]$. Granična vrednost I naziva se određeni integral funkcije f na $[a, b]$ i označava se $I = \int_a^b f(x) dx$.

Def. Neka je f pozitivna neprekidna funkcija na $[a, b]$. Tada površinu P ograničenu krivom $y = f(x)$ i pravama $x = a$ i $x = b$ i x -osom definišemo sa $P = \int_a^b f(x) dx$.



Slika 5. Određeni integral funkcije $f(x)$ na $[a, b]$

Stav:

- i. Ako je funkcija f neprekidna na $[a, b]$, onda je integrabilna na $[a, b]$.
- ii. Ako je funkcija f integrabilna na $[a, b]$, onda je ograničena na $[a, b]$.
- iii. Ako je funkcija f ograničena sa konačnim brojem prekida na $[a, b]$, onda je integrabilna na $[a, b]$.
- iv. Ako je funkcija f ograničena i monotona na $[a, b]$, onda je integrabilna na $[a, b]$.

Njutn–Lajbnicov stav predstavlja osnovni stav u diferencijalnom računu koji povezuje određeni sa neodređenim integralom, $\int f(x)dx = F(x) + C$.

Stav (Njutn–Lajbnic): Neka je F diferencijabilna na (a, b) i neka je $F'(x) = f(x)$ i neka je f integrabilna na $[a, b]$. Tada je $\int_a^b f(x)dx = F(b) - F(a)$.

Stav (osobine):

- i. $a \leq c \leq b \Rightarrow \int_a^b f(x)dx = \int_a^c f(x)dx + \int_c^b f(x)dx$.
- ii. $\int_a^b cf(x)dx = c \int_a^b f(x)dx$, $c = \text{const}$.
- iii. $\int_a^b (f(x) + g(x))dx = \int_a^b f(x)dx + \int_a^b g(x)dx$.

Nesvojstveni integral

Def. Neka je f integrabilna funkcija na svakom konačnom intervalu $[a, b]$. Tada je po definiciji:

$$\begin{aligned} \int_a^{+\infty} f(x)dx &= \lim_{b \rightarrow +\infty} \int_a^b f(x)dx, \\ \int_{-\infty}^b f(x)dx &= \lim_{a \rightarrow -\infty} \int_a^b f(x)dx, \\ \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)dx &= \int_{-\infty}^c f(x)dx + \int_c^{+\infty} f(x)dx = \lim_{a \rightarrow -\infty} \int_a^c f(x)dx + \lim_{b \rightarrow +\infty} \int_c^b f(x)dx, \\ &\quad -\infty < c < +\infty. \end{aligned}$$

Def. Neka funkcija f nije ograničena u okolini tačke b i neka je integrabilna na svakom intervalu $[a, b - \varepsilon]$, $\varepsilon > 0$. Tada je po definiciji:

$$\int_a^b f(x)dx = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0+} \int_a^{b-\varepsilon} f(x)dx.$$

Analogno, ako funkcija f nije ograničena u okolini tačke a i ako je integrabilna na svakom intervalu $[a + \varepsilon, b]$, $\varepsilon > 0$, tada je po definiciji:

$$\int_a^b f(x)dx = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0+} \int_{a+\varepsilon}^b f(x)dx.$$

Integrali uvedeni prethodnom definicijom nazivaju se nesvojstveni integrali. Oni su konvergentni ako postoje granične vrednosti koje ih definišu, a ako to nije slučaj, oni su divergentni.

Približno izračunavanje integrala

Metod pravougaonika

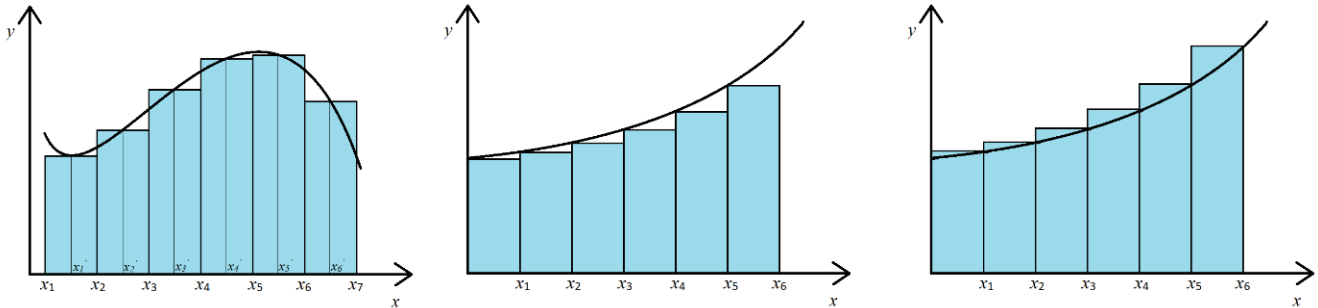
Posmatramo određeni integral $\int_a^b f(x)dx$. Podelimo interval $[a, b]$ na n jednakih intervala, tačkama $a = x_0, x_1, \dots, x_n = b$, $a = x_0 < x_1 < \dots < x_n = b$. Dužine intervala su jednake $\frac{b-a}{n}$. Integral se može približno izračunati kao zbir površina pravougaonika čije su osnovice $[x_{k-1}, x_k]$, a visine su vrednosti funkcije u sredinama tih intervala:

$$\int_a^b f(x) dx \approx \frac{b-a}{n} \left(f\left(\frac{x_0+x_1}{2}\right) + f\left(\frac{x_1+x_2}{2}\right) + \dots + f\left(\frac{x_{n-1}+x_n}{2}\right) \right)$$

Ako za visine pravougaonika uzmemo početne ili krajnje tačke intervala, imamo sledeće dve formule:

$$\int_a^b f(x) dx \approx \frac{b-a}{n} (f(x_0) + f(x_1) + \dots + f(x_{n-1}))$$

$$\int_a^b f(x) dx \approx \frac{b-a}{n} (f(x_1) + f(x_2) + \dots + f(x_n))$$



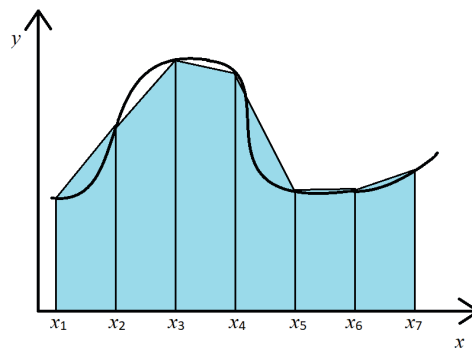
Slika 6. Grafički prikaz metode pravougaonika sa visinama na sredini, početku i kraju intervala za $n=6$

Metod trapeza

Integral se može približno izračunati kao zbir površina trapeza čije su paralelne stranice $f(x_{k-1})$ i $f(x_k)$, $k = 1, 2, 3, \dots, n$, a visine su dužine intervala $[x_{k-1}, x_k]$, odnosno $\frac{b-a}{n}$:

$$\int_a^b f(x) dx \approx \frac{b-a}{n} \left(\frac{f(x_0)+f(x_1)}{2} + \frac{f(x_1)+f(x_2)}{2} + \dots + \frac{f(x_{n-1})+f(x_n)}{2} \right) =$$

$$= \frac{b-a}{n} \left(\frac{f(x_0)+f(x_n)}{2} + f(x_1) + f(x_2) + \dots + f(x_{n-1}) \right)$$



Slika 7. Grafički prikaz metode trapeza

Primena metode trapeza za aproksimaciju PIK-a

Površina ispod krive koncentracije leka u funkciji vremena od nule do beskonačnosti posle intravenske primene leka kod jednodimenzionalnog i dvodimenzionalnog modela je:

$$PIK_{iv.}^{0 \rightarrow \infty} = \int_0^{+\infty} C_0 e^{-\beta t} dt = PIK^{0 \rightarrow t_x} + PIK^{t_x \rightarrow \infty} = \int_0^{t_x} C_0 e^{-\beta t} dt + \int_{t_x}^{+\infty} C_0 e^{-\beta t} dt,$$

gde C_0 predstavlja koncentraciju u trenutku $t = 0$, β je konstanta brzine eliminacije leka, a t_x vreme poslednje izmerene koncentracije [1].

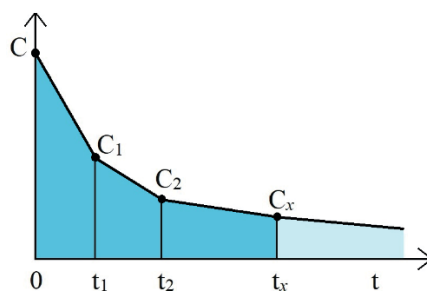
Integral $\int_0^{t_x} C_0 e^{-\beta t} dt$ se može proceniti nekom od metoda aproksimacije integrala, a

$$\int_{t_x}^{+\infty} C_0 e^{-\beta t} dt = \lim_{b \rightarrow +\infty} \frac{C_0}{-\beta} e^{-\beta t} \Big|_{t_x}^b = \frac{C_0}{-\beta} (0 - e^{-t_x \beta}) = \frac{C_0 e^{-\beta t_x}}{\beta} = \frac{C_x}{\beta}, \text{ gde je } C_x \text{ koncentracija u trenutku } t_x [1].$$

Odatle, u slučaju da se za aproksimaciju koristi metoda trapeza, važi sledeća formula:

$$PIK_{iv.}^{0 \rightarrow \infty} = \sum_{n=0}^{x-1} \frac{C_n + C_{n+1}}{2} \cdot (t_{n+1} - t_n) + \frac{C_x}{\beta},$$

gde su C_n, C_{n+1} vrednosti koncentracija izmerenih u odgovarajućim trenucima t_{n+1}, t_n [1].



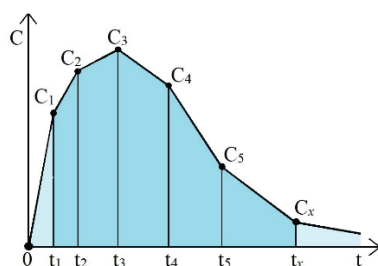
Slika 8. Grafički prikaz metode trapeza kod intravenske primene

Kod ekstravaskularne primene leka, PIK koncentracije leka u funkciji vremena od nule do beskonačnosti je:

$$PIK_{e.v.}^{0 \rightarrow \infty} = PIK^{0 \rightarrow t_1} + PIK^{t_1 \rightarrow t_x} + PIK^{t_x \rightarrow \infty}.$$

S obzirom na oblik funkcije koncentracije leka, vrednost početnog intervala se izračunava kao površina trougla, $PIK^{0 \rightarrow t_1} = \frac{C_1 \cdot t_1}{2}$. Odatle, u slučaju da se za aproksimaciju koristi metoda trapeza, važi sledeća formula:

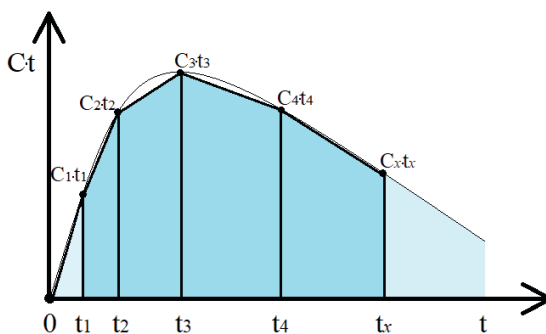
$$PIK_{e.v.}^{0 \rightarrow \infty} = \frac{C_1 \cdot t_1}{2} + \sum_{n=0}^{x-1} \frac{C_n + C_{n+1}}{2} \cdot (t_{n+1} - t_n) + \frac{C_x}{\beta} [1].$$



Slika 9. Grafički prikaz metode trapeza kod ekstravaskularne primene

Analogno izračunavanju PIK-a, izračunava se PIKM u neprostornoj analizi. PIKM predstavlja površinu ispod prvog statističkog momenta, odnosno površinu ispod krive proizvoda koncentracije i vremena u funkciji vremena. Obrazac za izračunavanje PIKM-a metodom trapeza je:

$$PIKM^{0 \rightarrow \infty} = PIK^{0 \rightarrow t_1} + PIK^{t_1 \rightarrow t_x} + PIKM^{t_x \rightarrow \infty} = \frac{C_1 t_1^2}{2} + \sum_{n=0}^{x-1} \frac{C_n t_n + C_{n+1} t_{n+1}}{2} \cdot (t_{n+1} - t_n) + \frac{C_x t_x}{\beta} + \frac{C_x}{\beta^2} [1].$$



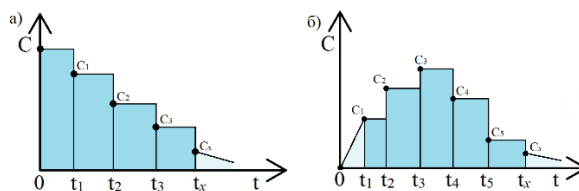
Slika 10. Grafički prikaz metode trapeza za aproksimaciju PIKM-a

S obzirom na to da u realnim primenama funkcija ispod koje se površina traži nije poznata, već se ocenjuje, pri računanju izloženosti organizma leku nakon t_x takođe se pravi određena greška. Međutim, način računanja nakon t_x ne razlikuje se bez obzira na metodu koja se koristi za izračunavanje PIK-a, zato će predmet istraživanja biti interval u kojem se može minimizirati greška primenom odgovarajuće metode: od 0 do t_x u slučaju intravenske primene, i od t_1 do t_x u slučaju ekstravaskularne primene.

Primena metode pravougaonika za aproksimaciju PIK-a

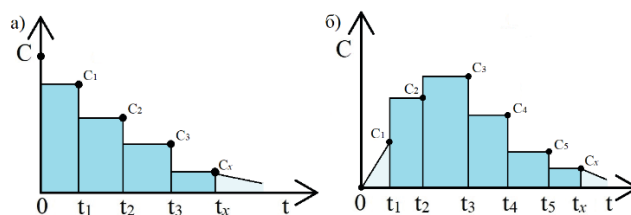
Iako je metoda trapeza najrasprostranjenija, za aproksimaciju se mogu koristiti i druge metode. Po istom principu metode trapeza, površina izračunata metodom pravougaonika na intervalu $[t_{n-1}, t_n]$ je:

- i. $PIK^{t_{n-1} \rightarrow t_n} = C_{n-1} \cdot (t_n - t_{n-1})$, ukoliko se za visinu pravougaonika uzima vrednost koncentracije na početku intervala,



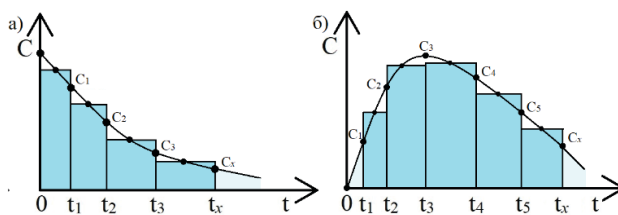
Slika 11. Grafički prikaz metode pravougaonika sa visinom na početku intervala kod
a) intravenske i b) ekstravaskularne primene

- ii. $PIK^{t_{n-1} \rightarrow t_n} = C_n \cdot (t_n - t_{n-1})$, ukoliko se za visinu pravougaonika uzima vrednost koncentracije na kraju intervala



Slika 12. Grafički prikaz metode pravougaonika sa visinom na kraju intervala kod
a) intravenske i b) ekstravaskularne primene

- iii. $PIK^{t_{n-1} \rightarrow t_n} = C_{SR} \cdot (t_n - t_{n-1})$, ukoliko se za visinu pravougaonika uzima vrednost koncentracije na sredini intervala, gde je C_{SR} vrednost koncentracije u sredini intervala.



Slika 13. Grafički prikaz metode pravougaonika sa visinom na sredini intervala kod
a) intravenske i b) ekstravaskularne primene

REZULTATI

Ostatak rada posvećen je primeni opisanih metoda u određivanju vrednosti PIK-a i oceni greške koja se pravi. U primerima na osnovu modela biće izračunata vrednost PIK-a primenom određenog integrala koja predstavlja stvarnu vrednost, a zatim će se primenom metode trapeza i metoda pravougaonika odrediti koja je vrednost najpribližnija njoj.

Primer 1.

Pretpostavimo da je lek A primenjen intravenskim putem u dozi od $D=500\text{mg}$, da je vrednost V_d jednaka 10L , konstanta poluvremena eliminacije β iznosi $0,2\text{h}^{-1}$ i da lek prati jednodostorni model. Iz datih podataka može se odrediti vrednost $C_0 = D/V_d = 50\text{ mg/L}$ i formira se model $C_t = 50 \cdot e^{-0,2t}$. Dobijeni model služi za određivanje PIK-a primenom određenog integrala i upoređivanje dobijene vrednosti sa vrednostima PIK-a koje će biti izračunate metodom trapeza i pravougaonika.

Kako je funkcija neprekidna i integrabilna izračunavanjem određenog integrala na intervalu od 0 h do 10 h , dobija se sledeća vrednost:

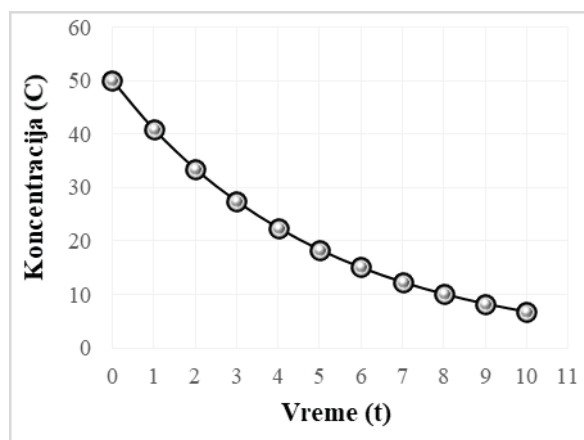
$$PIK = \int_0^{10} 50 \cdot e^{-0,2t} dt = 216,17 \text{ mg}\cdot\text{h/L}.$$

Dalje se na osnovu modela odrede koncentracije leka u izabranim vremenskim trenucima i koncentracije u sredini svakog intervala.

t	t _{SR}	C	C _{SR}
0	0,5	50	45,242
1	1,5	40,937	37,041
2	2,5	33,516	30,327
3	3,5	27,441	24,829
4	4,5	22,466	20,328
5	5,5	18,394	16,644
6	6,5	15,06	13,627
7	7,5	12,33	11,157
8	8,5	10,095	9,1342
9	9,5	8,2649	7,4784
10		6,7668	

t – vreme
t_{SR} – sredina vremenskog intervala
C – koncentracija
C_{SR} – koncentracija na sredini intervala

Tabela I. Vrednosti koncentracija u odgovarajućim vremenskim intervalima leka A



Slika 14. Grafički prikaz koncentracija u funkciji vremena leka A

Dobijene vrednosti na primeru ovog leka primenom metode trapeza i metoda pravougaonika prikazane su u Tabeli I.

i	PIK T	PIK P	PIK K	PIK S
1	45,468	50	40,937	45,242
2	37,226	40,937	33,516	37,041
3	30,478	33,516	27,441	30,327
4	24,954	27,441	22,466	24,829
5	20,43	22,466	18,394	20,328
6	16,727	18,394	15,06	16,644
7	13,695	15,06	12,33	13,627
8	11,212	12,33	10,095	11,157
9	9,1799	10,095	8,2649	9,1342
10	7,5159	8,2649	6,7668	7,4784
Σ	216,89	238,5	195,27	215,81

PIK T – PIK izračunat metodom trapeza
PIK P – PIK izračunat metodom pravougaonika sa visinom na početku intervala
PIK K – PIK izračunat metodom pravougaonika sa visinom na kraju intervala
PIK S – PIK izračunat metodom pravougaonika sa visinom na sredini intervala

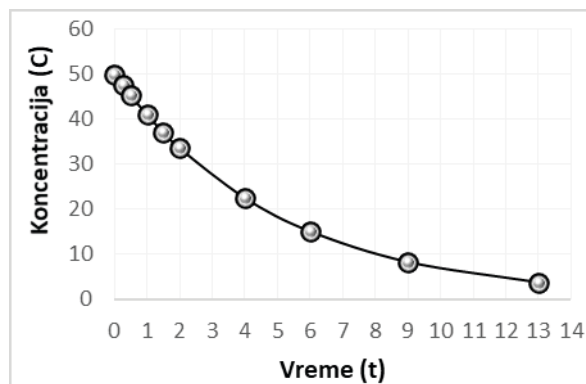
Tabela II. Vrednosti PIK-a leka A dobijene metodom trapeza i metodama pravougaonika

Na osnovu dobijenih vrednosti, može se zaključiti da se za izračunavanje PIK-a u ovom primeru za lek koji je primenjen intravenski i prati jednodimenzionalni model najmanja greška pravi primenom metode pravougaonika u kojoj je za visinu uzeta vrednost koncentracije na sredini intervala. Od preostalih vrednosti, malu razliku između stvarne vrednosti PIK-a ima vrednost dobijena metodom trapeza, dok se ostale dve vrednosti dobijene metodom pravougaonika u kojima su za vrednosti visine pravougaonika uzete vrednosti koncentracije na početku i kraju intervala značajno razlikuju.

Primer 2.

U ovom primeru razmatraće se primena gore opisanih metoda na isti lek A, sa razlikom da se dužine intervala razlikuju, odnosno nisu međusobno jednaki. Razlog za ovakav pristup analizi jeste da se u praksi uzorci gotovo nikad ne uzimaju u jednakim vremenskim intervalima, pa se na ovaj način simulira vrednost koncentracija dobijenih merenjem iz plazme ispitanika. Vrednost izračunata primenom određenog integrala iznosi: $PIK = \int_0^{13} 50 \cdot e^{-0,2t} dt = 231,43 \text{ mg} \cdot \text{h/L}$.

t	t _{SR}	C	C _{SR}
0	0,125	50	48,765
0,25	0,375	47,561	46,387
0,5	0,75	45,242	43,035
1	1,25	40,937	38,94
1,5	1,75	37,041	35,234
2	3	33,516	27,441
4	5	22,466	18,394
6	7,5	15,06	11,157
9	11	8,2649	5,5402
13		3,7137	



Slika 15. Grafički prikaz koncentracija u funkciji vremena leka A

Tabela III. Vrednosti koncentracija u odgovarajućim vremenskim intervalima leka A

PIK T	PIK P	PIK K	PIK S
234,93	276,2	193,65	229,69

Tabela IV. Vrednosti PIK-a leka A dobijene metodom trapeza i metodama pravougaonika

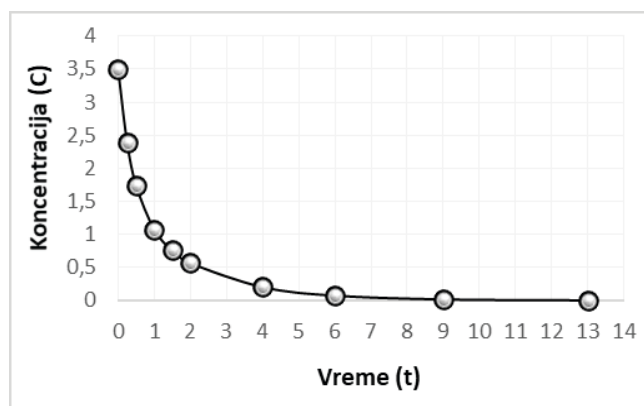
I pored promene u dužinama intervala, greške do kojih dolazi primenom različitih metoda slične su onima do kojih dolazi u slučaju gde su intervali bili jednaki. Time je pokazano da promena u dužinama intervala nije uticala na grešku koja se pravi primenom različitih metoda.

Primer 3.

Pretpostavimo da je lek B primenjen intravenski i da prati dvoprostorni model koji glasi $C_t = 2 \cdot e^{-2,5t} + 1,5 \cdot e^{-0,5t}$. Na osnovu modela primenom određenog integrala na intervalu od 0 h do 13 h izračunava se PIK, shodno tome da je funkcija neprekidna i samim tim integrabilna: $PIK = \int_0^{13} (2 \cdot e^{-2,5t} + 1,5 \cdot e^{-0,5t}) dt = 3,8 \text{ mg} \cdot \text{h/L}$. Aproksimacija PIK-a računa se po istom principu kao i u prethodnom primeru u izabranim intervalima koji su međusobno nejednaki i navedene su u Tabeli VI.

t	t _{SR}	C	C _{SR}
0	0,125	3,5	2,8724
0,25	0,375	2,3943	2,0268
0,5	0,75	1,7412	1,3376
1	1,25	1,074	0,8908
1,5	1,75	0,7556	0,6505
2	3	0,5653	0,3358
4	5	0,2031	0,1231
6	7,5	0,0747	0,0353
9	11	0,0167	0,0061
13	13	0,0023	0,0023

Tabela V. Vrednosti koncentracija u odgovarajućim vremenskim intervalima leka B



Slika 16. Grafički prikaz koncentracija u funkciji vremena leka B

PIK T	PIK P	PIK K	PIK S
3,9661	5,0864	2,8459	3,7124

Tabela VI. Vrednosti PIK-a leka B dobijene metodom trapeza i metodama pravougaonika

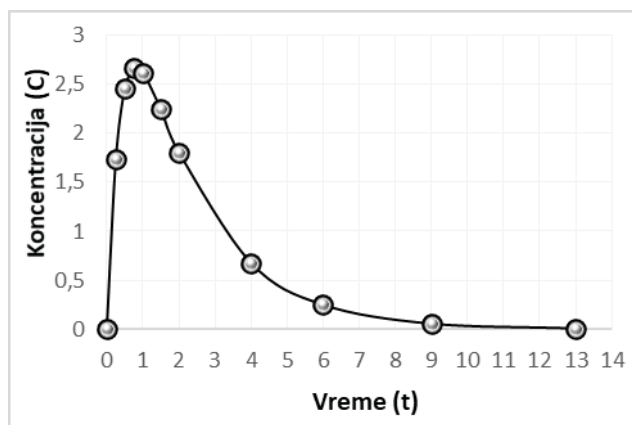
Najpribližnija vrednost PIK-a jeste dobijena metodom pravougaonika u kojoj je za visinu pravougaonika uzeta vrednost koncentracije na sredini intervala. Pored ove, sledeća vrednost PIK-a koja se najmanje razlikuje od stvarne vrednosti jeste ona koja je dobijena metodom trapeza. Dok je vrednost PIK-a dobijena metodom pravougaonika, gde je za visinu uzeta vrednost koncentracije na početku intervala značajno veća, a vrednost PIK-a dobijena metodom pravougaonika, gde je za visinu uzeta vrednost koncentracije na kraju intervala značajno manja u odnosu na stvarnu vrednost.

Primer 4.

U ovom primeru pretpostavka je da je lek C primenjen ekstravaskularno i da prati jednodimenzionalni model koji glasi $C_t = 5 \cdot e^{-0,5t} - 5 \cdot e^{-2,5t}$. Kako je funkcija neprekidna i integrabilna, vrednost PIK-a koja je izračunata primenom određenog integrala u intervalu od 0,25 h do 13 h iznosi $PIK = \int_{0,25}^{13} (5 \cdot e^{-0,5t} - 5 \cdot e^{-2,5t}) dt = 7,74$ mg·h/L, dok su preostale izračunate vrednosti prikazane tabelarno.

t	t _{SR}	C	C _{SR}
0	0,125	0	1,03899
0,25	0,375	1,73618	2,18712
0,5	0,625	2,46148	2,61002
0,75	0,875	2,66967	2,66726
1	1,25	2,62223	2,45662
1,5	1,75	2,24424	2,02137
2	3	1,80571	1,11289
4	5	0,67645	0,41041
6	7,5	0,24893	0,11759
9	11	0,05554	0,02043
13		0,00752	

Tabela VII. Vrednosti koncentracija u odgovarajućim vremenskim intervalima leka C



Slika 17. Grafički prikaz koncentracija u funkciji vremena leka C

PIK T	PIK P	PIK K	PIK S
8,04708	10,0834	6,01079	7,58618

Tabela VIII. Vrednosti PIK-a leka C dobijene metodom trapeza i metodama pravougaonika

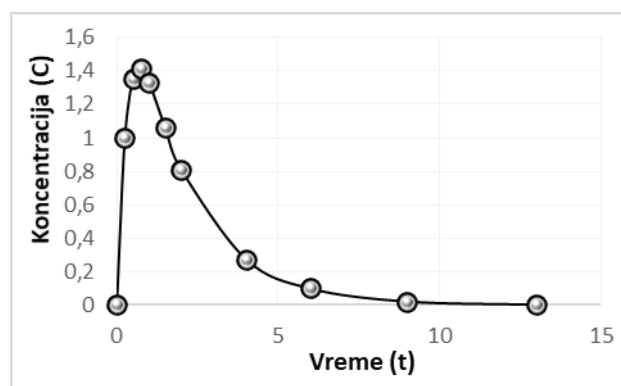
Kao i u prethodnim primerima, najpribližnija realnoj vrednosti PIK-a jeste ona dobijena metodom pravougaonika sa izabranom visinom na sredini intervala, a zatim je sledeća vrednost koja pokazuje najmanju grešku prilikom računanja ona dobijena metodom trapeza. U preostale dve vrednosti, greška koja se javlja je značajnija u pogledu da je jedna vrednost značajno veća, dok je druga značajno manja u odnosu na stvarnu vrednost PIK-a.

Primer 5.

Neka je lek D primenjen ekstravaskularnim putem primene prateći sledeći model: $C_t = 2 \cdot e^{-0,5t} + 2 \cdot e^{-1,5t} - 4 \cdot e^{-2,5t}$, koji predstavlja neprekidnu i integrabilnu funkciju. Vrednost integrala u intervalu od 0,25 h do 13 h iznosi $PIK = \int_{0,25}^{13} (2 \cdot e^{-0,5t} + 2 \cdot e^{-1,5t} - 4 \cdot e^{-2,5t}) dt = 3,58 \text{ mg} \cdot \text{h/L}$, dok su preostale vrednosti dobijene ostalim opisanim metodama navedene u Tabeli X.

t	t _{SR}	C	C _{SR}
0	0,125	0	0,6104
0,25	0,375	0,9985	1,2312
0,5	0,625	1,3563	1,408
0,75	0,875	1,4105	1,3808
1	1,25	1,331	1,2015
1,5	1,75	1,0615	0,9283
2	3	0,8084	0,4663
4	5	0,2754	0,1653
6	7,5	0,0998	0,0471
9	11	0,0222	0,0082
13		0,003	

Tabela IX. Vrednosti koncentracija u odgovarajućim vremenskim intervalima leka D



Slika 18. Grafički prikaz koncentracija u funkciji vremena leka D

PIK T	PIK P	PIK K	PIK S
3,7411	4,6935	2,7886	3,5068

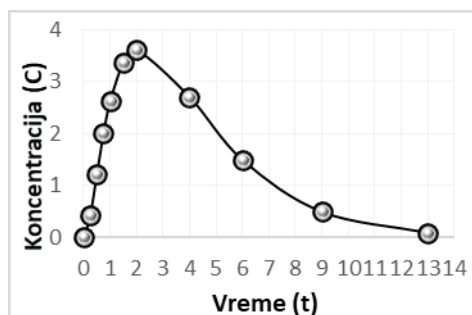
Tabela X. Vrednosti PIK-a leka D dobijene metodom trapeza i metodama pravougaonika

Metoda kojom se izračunava najpribližnija vrednost jeste dobijena metodom pravougaonika sa visinom na sredini svakog intervala, a zatim sledeća najpribližnija vrednost dobijena je metodom trapeza. Preostale dve vrednosti dobijene metodom pravougaonika sa visinom na početku ili na kraju intervala značajno su manje ili veće, pa se može pretpostaviti da je greška značajna njihovom primenom.

Primer 6.

U predstojećem primeru, razmatraće se primena opisanih metoda na računanje vrednosti površina ispod krive prvog statističkog momenta, odnosno PIKM-a. Razmatraće se vrednosti za lek C, koje su navedene u primeru 4. Kako PIKM predstavlja površinu ispod krive $C \cdot t = f(t)$, potrebno je pomnožiti svaku koncentraciju sa odgovarajućim vremenom. Stvarna vrednost PIKM-a izračunata je kao određeni integral funkcije, koja je neprekidna i integrabilna, glasi $f(t) = t \cdot (5 \cdot e^{-0,5t} - 5 \cdot e^{-2,5t})$ u intervalu od 0,25 h do 13 h i ta vrednost iznosi $\text{PIKM} = \int_{0,25}^{13} t \cdot (5 \cdot e^{-0,5t} - 5 \cdot e^{-2,5t}) dt = 18,93 \text{ mg} \cdot \text{h}^2/\text{L}$. Zatim su određene vrednosti proizvoda C-t na sredini svakog intervala i po istom principu kao u prethodnim primerima primenjene su metoda trapeza i metode pravougaonika. Sve vrednosti prikazane su u Tabeli XII.

t	t _{SR}	C	C _{SR}	C·t	C _{SR} ·t _{SR}
0	0,125	0	1,039	0	0,1299
0,25	0,375	1,7362	2,1871	0,434	0,8202
0,5	0,625	2,4615	2,61	1,2307	1,6313
0,75	0,875	2,6697	2,6673	2,0023	2,3339
1	1,25	2,6222	2,4566	2,6222	3,0708
1,5	1,75	2,2442	2,0214	3,3664	3,5374
2	3	1,8057	1,1129	3,6114	3,3387
4	5	0,6764	0,4104	2,7058	2,052
6	7,5	0,2489	0,1176	1,4936	0,8819
9	11	0,0555	0,0204	0,4999	0,2248
13		0,0075		0,0977	



Slika 19. Grafički prikaz proizvoda koncentracija i vremena u funkciji vremena leka C

Tabela XI. Vrednosti koncentracija u odgovarajućim vremenskim intervalima leka C

PIK T	PIK P	PIK K	PIK S
19,134	23,026	15,242	18,827

Tabela XII. Vrednosti PIKM-a leka C dobijene metodom trapeza i metodama pravougaonika

Kao i prilikom aproksimacije PIK-a, i vrednosti aproksimacija PIKM-a navode na iste zaključke. Odnosno, metoda izbora bila bi metoda pravougaonika sa koncentracijama na sredinama intervala, dok je metodom trapeza takođe izračunata vrednost bliska stvarnoj.

Kako je oblik krive prvog statističkog momenta isti bez obzira na način primene i modela koji lek prati, metode su ispitane na samo jednom primeru.

DISKUSIJA

U samom radu prikazana je simulacija ponašanja lekova ukoliko bi se primenili različitim putevima primene i ukoliko bismo pratili jednodimenzionalni, odnosno dvodimenzionalni farmakokinetički model. U odnosu na stvarnu vrednost PIK-a izračunate određenim integralom upoređene su vrednosti dobijene metodom trapeza i metodom pravougaonika. Za svaki opisan primer određena je metoda čijom primenom se pravi najmanja greška u izračunavanju PIK-a, pa se može pretpostaviti da bi se primenom izabrane metode najmanja greška pravila i u realnim primerima farmakokinetičke analize. Razlika koja bi se pojavila u vrednosti greške mogla bi se smatrati posledicom učestalosti uzorkovanja biološkog materijala, preciznošću metode kojom se određuje koncentracija leka ili metabolita u uzorku, pravilan način uzorkovanja, odabir metode uzorkovanja itd. Pretpostavka je da bi greške bile proporcionalne i bez razlike u značaju u odnosu na vrednosti grešaka koje su se javile u opisanim primerima u samom radu.

Kako se za izračunavanje PIKM-a koristi kriva koja je istog oblika bez obzira na način primene leka i modela koji lek prati, samo jedan primer je razmatran za primenu metoda trapeza i metoda pravougaonika u ove svrhe.

U svim primerima aproksimacije PIK-a i PIKM-a izračunate metodom pravougaonika sa visinom na

početku intervala su preценjene, dok su metodom pravougaonika sa visinom na kraju intervala potценjene. Iz ovog razloga, pomenute dve metode nisu odgovarajuće za aproksimaciju ovih funkcija. Primenom metode trapeza u svim primerima aproksimacije PIK-a i PIKM-a su preценjene, međutim, razlika u odnosu na stvarne vrednosti nije značajna. Razlog za ovakve rezultate jeste što su ispitivane funkcije konveksne i monotono opadajuće na celom domenu u slučaju intravenske primene ili tokom većine svog domena u slučaju ekstravaskularne primene.

Kao najpogodnija metoda za aproksimaciju PIK-a i PIKM-a pokazala se metoda pravougaonika sa visinom na sredini intervala. Rezultat koji se dobija svakako je najpribližniji stvarnoj vrednosti, zbog čega bi primena ove metode značajno poboljšala preciznost prilikom aproksimiranja PIK-a i PIKM-a. Međutim, u praktičnom smislu, može se javiti problem iz razloga što se vremenski trenuci razlikuju od onih u kojima se mere koncentracije.

ZAKLJUČAK

Generalno, način izbora izračunavanja PIK-a i PIKM-a u farmakokinetici jeste primena metoda trapeza. U radu je pokazano da pored metode trapeza postoji mogućnost korišćenja metode pravougaonika na izračunavanje PIK-a i PIKM-a.

Na primerima lekova primenjenih ekstravaskularno ili intravenski, a koji su pratili jednodimenzionalni ili dvodimenzionalni model, uočena je najmanja greška primenom metode pravougaonika u kojoj je za visinu uzeta vrednost koncentracije na sredini intervala. Ovakav pristup daje manju grešku u odnosu na široko rasprostranjenu metodu trapeza. Prednost je bolji rezultat, uz isti broj uzoraka potrebnih za izračunavanje, a mana je što istraživač mora unapred da odredi da će koristiti tu metodu, jer su potrebne vrednosti koncentracije u drugim vremenskim trenucima. Ali važno je naglasiti da se i u metodi trapeza ne pravi mnogo veća greška tokom aproksimacije PIK-a, što opravdava njenu dosadašnju široku primenu u nedimenzionalnoj farmakokinetičkoj analizi.

Kao i kod PIK-a, za izračunavanje aproksimacije PIKM-a takođe bi metoda izbora bila metoda pravougaonika sa koncentracijama na sredinama intervala kao visinom pravougaonika.

Metoda pravougaonika, za razliku od gorepomenutih, u kojoj je za visinu odabrana vrednost koncentracije na kraju intervala, ni u jednom primeru se nije pokazala odgovarajućom. Odnosno, pri svakoj aproksimaciji PIK-a ili PIKM-a vrednost je bila značajno manja u odnosu na stvarnu, stoga se može pretpostaviti da bi njena primena u farmakokinetičkoj analizi lekova dovela do značajne greške. Isti zaključak se može izvesti za metodu pravougaonika čiju visinu predstavljaju koncentracije na početku intervala, sa razlikom da su aproksimacije PIK-a ili PIKM-a bile u svakom primeru veće od stvarnih vrednosti.

LITERATURA

- [1] Pokrajac M, Miljković B, Vučićević K. (2019): Farmakokinetika, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet. Beograd.
- [2] Đorđević-Catić, A. (2014). *Farmakokinetička ispitivanja takrolimusa kod pacijenata sa presađenim bubregom* (Doctoral dissertation, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet).
- [3] Kečkić J, Nikčević S. (2005): Matematika – jednogodišnji kurs za studente biologije, poljoprivrede, farmacije, fizičke hemije, hemije, šumarstva. Naša knjiga. Beograd.
- [4] Ranković D, Milenković D. (2017): MATEMATIKA Zbirka zadataka za Farmaceutski fakultet. Beograd.
- [5] Purves, R. D. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC), *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 1992, 20(3), 211-226.
- [6] Yeh, K. C., & Kwan, K. C. A comparison of numerical integrating algorithms by trapezoidal, Lagrange, and spline approximation, *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 1978, 6(1), 79-98.
- [7] Yeh, K. C., & Small, R. D. Pharmacokinetic evaluation of stable piecewise cubic polynomials as numerical integration functions, *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, 1989, 17(6), 721-740.

COMPARATIVE ANALYSIS OF TRAPEZOIDAL AND RECTANGULAR METHODS FOR DETERMINATION OF AREA UNDER THE CURVE (AUC) IN PHARMACOKINETIC MODELS

Authors: OGNJAN MILETIĆ, Jovana Paspalj, Radoslav Dekić

Author: NEVENA KUKAVICA

e-mail: kukavica.nevena4@gmail.com

Mentors: Assist. Prof. Dragana Ranković, TA Marija Minić

Department of Physics and Mathematics Faculty of Pharmacy, University of Belgrad

Introduction: Due to today's extremely fast lifestyle, more people resort to the use of various beverages that allIntroduction: This paper deals with various methods of calculation of the area under the curve (AUC) and the area under the moment curve (AUMC), which are very often calculated during the pharmacokinetics analysis of drugs and metabolites. In compartmental pharmacokinetic analysis, the real value AUC can be calculated after the curve is fitted, but in noncompartmental analysis that is not the case.

Aim: The trapezoidal method is the most commonly used in noncompartmental analysis, but in this paper the application of the rectangle method is considered.

Material and Methods: Three rectangle methods were studied where values at the beginning, middle and end of the interval were taken for the height of the rectangle. Regardless of the method used, an error is made in determining the approximate value of the AUC. Therefore, through examples which represent the simulation of drug administration and which differ from each other in the method of drug application and the model that accompanies the drug, the method of approximation of AUC with which the smallest error is made was considered.

Results: The smallest error occurs by applying the rectangle method with the height in the middle of the interval, while the values of AUC approximations obtained by the trapezoidal method do not show a significantly larger error. The rectangle methods when the height is taken at the beginning and at the end of the interval do not give satisfactory results. When examining the values of AUCM approximations, the same conclusions were reached as in the case of AUC approximations.

Conclusion: Regardless of whether the drug was administered extravascularly or intravenously, or whether it followed a one-space or two-space model, the methods of choice are the same. It can be assumed that applying the method of choice in real examples of pharmacokinetic drug analysis would also lead to the smallest error in the approximation of AUC and AUCM. But the assumption is that the errors would be proportional and without any difference in significance in relation to the values of the errors that occurred in the examples described in this paper.

Keywords: AUC; AUCM; trapezoidal method; rectangle method; pharmacokinetics analysis

SPECIES COMPOSITION OF TICKS REMOVED FROM DOGS IN THE MUNICIPALITY OF VITEZ (BOSNIA AND HERZEGOVINA)

Authors: LEJLA UŠANOVIĆ, Lejla Lasić, Jasna Hanjalić, Belma Kalamujić Stroil

e-mail: usanovic.lejla@gmail.com

Laboratory for Molecular Genetics of Natural Resources

University of Sarajevo – Institute for Genetic Engineering and Biotechnology

Introduction: Ticks are vectors of various pathogens, and when parasitizing on hosts, animals and humans, they also pose a risk to their health. Today it is of great importance to know which species live in a particular area in order to be able to prevent and control the development of diseases caused by various pathogens in animals and humans. In Bosnia and Herzegovina tick research has been conducted, but sporadically and non-continuously.

Aim: Due to the importance of vector pathogens and their impact on human and animal health, this study was conducted in order to establish which species of ticks removed from dogs are present in the municipality of Vitez, for which no data have been available so far.

Material and Methods: The ticks were removed from the dogs at a veterinary station during a routine examination, and then morphologically determined. For samples for which a species could not be assigned based on morphology, the molecular genetic determination was performed by targeting the ITS region.

Results: Of all the ticks collected, 40 samples were morphologically determined, and two samples were subjected to the molecular genetic analysis. Three species were determined, namely *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Rhipicephalus sanguineus*.

Conclusion: The species recorded in the municipality of Vitez represent a contribution to the knowledge of tick species in the territory of Bosnia and Herzegovina. The importance of continuous monitoring of the qualitative status of ticks is reflected in the knowledge of possible pathogens that affect human and animal health.

Keywords: *Ixodes ricinus*; *Dermacentor reticulatus*; *Rhipicephalus sanguineus*; dogs, molecular detection; ITS; Bosnia and Herzegovina

INTRODUCTION

Ticks are very important vectors for different pathogens. There are four tick species reported to infest dogs and cats in Europe. These species are *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) and *Dermacentor reticulatus*. Based on the previous research, it is known which tick species are the vectors of certain pathogens. Therefore, *I. ricinus* is associated with *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* s.l., *D. reticulatus* is an important vector of *Babesia canis*, and *Rh. sanguineus* s.l. is a vector of a range of pathogens including but not limited to *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Babesia*, *Hepatozoon* and *Ehrlichia* spp [1-3].

Knowledge of species profiles is very important for effective control and prevention of tick-borne diseases. In Bosnia and Herzegovina (B&H), monitoring of ticks has not been conducted continuously. One broad range study on ticks was conducted in B&H sixteen years ago, in which ticks were collected from dogs, sheep, cows, goats, rodents, humans and plants. Of a total number of 4,967 ticks collected from dogs, 4,397 were determined as *I. ricinus* as the most prevalent species, followed by *Rh. sanguineus* (221), *Hyalomma marginatum marginatum* (123), *D. marginatus marginatus* (102), *Rh. bursa* (76), *Haemaphysalis punctata* (21), *D. reticulatus* (18) and *I. hexagonus* (9) [4]. *I. ricinus* was found in all the 26 screened localities, while other species were found in certain regions of B&H. *D. m. marginatus* was found in northern and central B&H. *R. bursa* was observed in northern Bosnia and western Herzegovina. An important result of this study was the first finding of *Hy. m. marginatum* in cattle, sheep, goats and dogs in this country, more precisely in central and eastern Bosnia. Furthermore, *Rh. sanguineus* was observed in eastern Bosnia and eastern Herzegovina, *H. punctata* was present in western and eastern Herzegovina, and *D. reticulatus* was found in eastern Herzegovina and western Bosnia. Tick species with the lowest prevalence, *I. hexagonus*, was observed only in western Bosnia [4]. Unfortunately, the continuity of tick research covering the entire territory of Bosnia and Herzegovina has not been maintained, only sporadic surveys have been conducted. One such study was done in the city of Tuzla, where ticks were collected from dogs and determined as *I. ricinus* and *D. reticulatus* [5]. In the Sarajevo Canton ticks collected from humans were all determined as *I. ricinus* [6].

To maintain the continuity of tick research in B&H due to the importance of vector-borne pathogens and their impact on human and animal health, this study aimed to screen tick species removed from dogs in the municipality of Vitez, B&H.

MATERIAL AND METHODS

Tick samples were collected from dogs in one veterinary clinic in the municipality of Vitez in May and June 2019. Ticks were removed by veterinarians during routine visits and preserved in 96% ethanol. The samples were washed in distilled water and stored individually at -20°C until the morphological identification and determination of engorgement level [7].

Ticks that could not be unambiguously assigned to any species based on the morphological criteria were individually genetically analyzed by targeting the internal transcribed spacer (*ITS*) region. DNA extraction was performed using commercially available EXTRACT ME DNA Tissue kit (Blirt, Poland) and verified by the horizontal 1.5% gel-electrophoresis with visualization using Midori Green (Nippon Genetics, Europe GmbH).

The distinction between *Ixodes* and *D. reticulatus* was done by the Polymerase chain reaction (PCR) using primer pair *dITS29* and *rITS800* [8]. The expected PCR amplicons were 778bp for *Ixodes* and 1045bp for *D. reticulatus*. Additionally, we performed amplification using primer pair *dITS678* and *rITS814* to confirm the species *Ixodes ricinus* [9]. The expected PCR amplicon was 137 bp for *I. ricinus*. All amplicons were inspected on horizontal 2% gel-electrophoresis stained with Midori green (Nippon Genetics, Europe GmbH). A 50 bp ladder (BioLabs, New England) was run in parallel with the samples.

RESULTS

Forty-two tick samples were removed from dogs during routine examinations in one veterinary clinic in the municipality of Vitez from May to June 2019. Forty collected tick samples were successfully morphologically determined. However, for two tick samples it was necessary to confirm the assigned species by performing molecular genetic analysis because the individuals were damaged.

In our sample we determined three tick species: *I. ricinus* (50%), *D. reticulatus* (47.6%) and *Rh. sanguineus* (2.4%). Two tick samples, which were molecularly analyzed, were confirmed as *I. ricinus* (Figure 1).

Of all the ticks collected, 57.1% were females and 42.9 % were males. We detected four cases of copulation, i.e. males were still attached to females after the removal (Figure 2).

According to the degree of engorgement, ticks were classified as partially engorged (2), semi-engorged (5) and fully engorged (35).

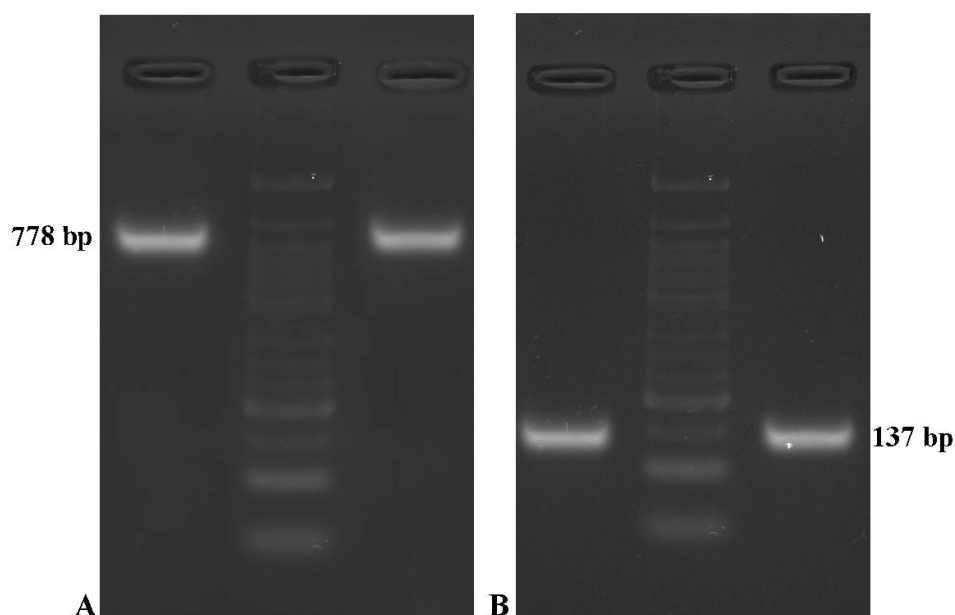


Figure 1. PCR amplicons visualized by 1.5% horizontal gel-electrophoresis: (A) Detection of 778 bp for both samples assigned to genus *Ixodes*; (B) Detection of 137 bp for both samples assigned to *I. ricinus*. (A, B) a 50 bp DNA ladder (BioLabs, New England)



Figure 2. Ticks collected in copulation (the larger tick is female and the smaller tick is male)

DISCUSSION

As in the case of many other resources, the research on ticks in B&H has not been systematic and continuous. The only broad range study that was conducted by Omeragić et al. [4] 16 years ago did not include the whole territory, but only the territory of the Federation of Bosnia and Herzegovina (FB&H). To our knowledge, the present study represents the first tick screening in the municipality of Vitez. Morphological identification based on the tick key [7] was successful for all intact individuals from the sample. However, two ticks were missing mouthparts, which made morphological identification difficult. Therefore, the PCR technique had to be utilized for species discrimination.

Based on the morphological and genetic identification, *I. ricinus*, *D. reticulatus* and *Rh. sanguineus* were identified in the collected sample.

Numerous environmental factors affect the composition of ticks in a particular area. Vegetation is a great modifier of the local weather or the microclimatic conditions, the one that ticks must adapt to for development and survival [10].

The municipality of Vitez is located in the central B&H. It is situated in the central part of the valley of the river Lašva, which stretches from the southeastern slopes of the mountain Vlašić to Busovača. This valley was formed at 390-480 meters above sea level (m.a.s.l.). The climate is distinctly continental. This detected composition of ticks in the municipality of Vitez is expected for several reasons. First, the altitude of the municipality of Vitez is in the range (below 500 m.a.s.l.) for which Omeragić et al. in 2010 reported all the determined species, including these three we found [4]. Also, there is quantitative evidence to suggest that *D. reticulatus* prefers areas near watercourses and water bodies. Open arable land with a high level of groundwater in the lowlands or on the hills meets its requirements. However, it is most often absent in the mountains, except in the case of suitable climatic conditions [11]. *Rh. sanguineus* ticks develop well at different temperatures and humidities, travelling around with the dog, its primary vertebrate host, and being a good example of the vector of multiple pathogens affecting companion animals, livestock, and humans [12].

For a complete insight into the composition of ticks in Bosnia and Herzegovina, comparisons can be made either: (1) over a long period of time at the same location, (2) over different geographic regions at the same time; or (3) over different altitudes at the same location. However, each of these options has limitations. For example, studying real-time climate change requires long-term studies [13].

Knowledge of the tick species distribution is important for monitoring vector-borne diseases. The results of our study led us to determine these three species in the Municipality of Vitez, the species which can inform us about possible pathogens and vector-borne diseases that we can expect in this area.

Until now, it is known that *I. ricinus*, as the most widespread tick species in Europe [14], is associated with *B. burgdorferi* s.l. complex, *B. miyamotoi*, *A. phagocytophilum*, *B. microti*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, and Tick-borne encephalitis virus (TBEV) [14].

D. reticulatus is a vector of pathogens causing animal health problems by transmitting the most important pathogen *B. canis*. Also, *D. reticulatus* adults bite humans and can transmit several *Rickettsia* spp., Omsk hemorrhagic fever virus and TBEV [11].

Rh. sanguineus is mostly a parasite in dogs and occasionally colonizes human habitats. It is considered as a significant vector of *E. canis*, *Mycoplasma haemocanis*, *B. vogeli*, *He. canis*, transmitting them to carnivores and *R.*

conorii, the agent of the Mediterranean spotted fever, transmitting it to humans [12].

These assumptions obtained on the basis of the composition of ticks in the municipality of Vitez, provide insight into the occurrence of possible infections in humans and animals.

From a public and veterinary health perspective, city parks and peri-urban recreational areas are typical meeting places for humans (their pets) and ticks. Ticks in this respect serve as a bridge for pathogens, connecting reservoir hosts with humans. [14]

All of these findings, based on the evidence of the tick species in the area of the municipality of Vitez, are very important because of: (1) the contribution to the data on the state of dog parasite fauna in Bosnia and Herzegovina and (2) the first knowledge of possible pathogens present in this area, which can directly affect human and animal health.

Accordingly, the obtained results lead us to plan new research in two directions: (1) the tick screening in the whole territory of Bosnia and Herzegovina, and creating a large database of dog parasite fauna, and (2) the detection of pathogens in ticks removed from dogs.

CONCLUSION

The recorded species in the municipality of Vitez represent a contribution to the knowledge of tick species in the territory of B&H. The importance of continuous monitoring of the qualitative status of ticks is reflected in the knowledge of possible pathogens that affect human and animal health. Therefore, future research should go in the direction of tick screening and pathogen detection throughout Bosnia and Herzegovina.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was assisted by veterinarians Ivona Alilović and Tomica Alilović in collecting the samples. Sanja Ćakić, a graduate biologist, made a great contribution to the morphological identification of ticks. We would like to take this opportunity to thank all of them.

REFERENCES

- [1] Solano-Gallego L, Sainz Á, Roura X, Estrada-Peña A, Miró G. A review of canine babesiosis: the European perspective, *Parasites and Vectors*, 2016, 9, 336.
- [2] Heyman P, Cochez C, Hofhuis A, van der Giessen J, Sprong H, Porter SR, et al. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2010, 8, 33–50.
- [3] Stuenkel S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3, 31.
- [4] Omeragić J. Ixodid ticks in Bosnia and Herzegovina, *Experimental & Applied Acarology*, 2010, 53, 301-309, doi.org/10.1007/s10493-010-9402-8.
- [5] Krčmar S, Ferizbegović J, Lonić E, Kamberović J. Hard tick infestation of dogs in the Tuzla area (Bosnia and Herzegovina), *Veterinarski arhiv*, 2014, 84, 177- 182.
- [6] Lasić L, Ušanović L, Ćakić S, Hanjalić J, Kalamujić Stroil B. First molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from humans in the Sarajevo Canton (Bosnia and Herzegovina), *Systematic and Applied Acarology*, 2020, 25(1), 169-172, doi:10.11158/saa.25.1.13.
- [7] Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R. (2004): Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza. Zaragoza.
- [8] Liu, D. (2013): Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens: Ixodidae (Hard ticks). Taylor & Francis Group. New York.
- [9] Rumer L, Sheshukova O, Dautel H, Donoso Mantke O, Niedrig M. Differentiation of Medically Important Euro-Asian Tick Species *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by Polymerase Chain Reaction, *Vector-Borne & Zoonotic Disease*, 2011, 11, 899-905, doi.org/10.1089/vbz.2009.0191.
- [10] Estrada-Peña A, Ayllón N, de la Fuente J. Impact of Climate Trends on Tick-Borne Pathogen Transmission, *Frontiers in Physiology*, 2012, 3, doi.org/10.3389/fphys.2012.00064

- [11] Földvári G, Široký P, Szekeres S, Majoros G, Sprong H. *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise, *Parasites and Vectors*, 2016, 9:314, DOI 10.1186/s13071-016-1599-x.
- [12] Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control, *Veterinary Parasitology*, 2008, 15:152(3-4), 173-85, doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.030.
- [13] Gilbert L. Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases?, *Oecologia*, 2009, 162:1, 217-225. DOI 10.1007/s00442-009-1430-x
- [14] Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubálek Z, Földvári G, et al. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health, *Frontiers in Public Health*, 2014, 2, 251, doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251.

SASTAV VRSTA KRPELJA SKINUTIH SA PASA U OPĆINI VITEZ (BOSNA I HERCEGOVINA)

Autori: LEJLA UŠANOVIĆ, Lejla Lasić, Jasna Hanjalić, Belma Kalamujić Stroil

e-mail: usanovic.lejla@gmail.com

Mentor: -

Laboratorija za molekularnu genetiku prirodnih resursa

Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu

Uvod: Krpelji predstavljaju vektore različitih patogena, a parazitirajući na domaćinima, životinjama i ljudima, predstavljaju i rizik po njihovo zdravlje. Danas je od velikog značaja poznavati koje vrste obitavaju na određenom području, da bi se mogao prevenirati i kontrolisati razvoj oboljenja kod životinja i ljudi, uzrokovanih raznim patogenima. U Bosni i Hercegovini su rađena istraživanja na krpeljima, ali sporadično i nekontinuirano.

Cilj rada: Zbog važnosti vektorskih patogena i njihovog uticaja na ljudsko i životinjsko zdravlje, ova studija je sprovedena s ciljem da ustanovi koje vrste krpelja skinutih sa pasa su prisutne u općini Vitez, za koju do sada nije bilo podataka iz ove oblasti.

Materijal i metode: Krpelji su skinuti sa pasa u veterinarskoj stanici, pri rutinskom pregledu, a potom morfološki determinisani. Za uzorke za koje se nedvojbeno nije mogla dodijeliti vrsta na osnovu morofologije, urađena je molekularno-genetička determinacija ciljanjem ITS regiona.

Rezultati: Ukupno je morfološki determinisano 40 uzoraka, a dva uzorka su bila podvrgnuta molekularno-genetičkoj analizi. Determinisane su tri vrste, i to *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* i *Rhipicephalus sanguineus*.

Zaključak: Zabilježene vrste u Općini Vitez predstavljaju doprinos poznavanju vrsta krpelja na teritoriji Bosne i Hercegovine. Važnost kontinuiranog praćenja kvalitativnog statusa krpelja ogleda se u poznavanju mogućih patogena koji utječu na zdravlje ljudi i životinja.

Ključne riječi: *Ixodes ricinus*; *Dermacentor reticulatus*; *Rhipicephalus sanguineus*; psi, molekularna detekcija, ITS; Bosna i Hercegovina.

FITOSINTEZA I MIKROBIOLOŠKA ANALIZA NANOČESTICA ZnO

Autor: NINA BABIĆ, Dragana Gajić

E-mail: nina.babic@student.pmf.unibl.org

Mentor: Dr Dijana Jelić, vanredni profesor

Komentor: Dr Aleksandra Šmitran, vanredni profesor

Studijski program hemija, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Uvod: Zelena sinteza je jedna od najfascinantnijih metoda za sintezu metalnih nanočestica, ali i atraktivna alternativa fizičko-hemijskoj sintezi. Istraživanja su dokazala da osobine metalnih nanočestica jako zavise od eksperimentalnih uslova, tako da je izbor metoda sinteze usko povezan sa željenim svojstvima materijala. Svojstva nano cink-oksida (ZnO NPs) su takva da postoji veliki potencijal da on u primjeni u potpunosti zamijeni dosadašnji mikrokristalni ZnO.

Cilj rada: Predmet istraživanja predstavljenog rada je fitosinteza (ZnO NPs), kao i fizičko-hemijska karakterizacija dobijenog materijala, a sve u cilju ispitivanja fotokatalitičkog i antimikrobnog potencijala fitosintetisanih ZnO NPs.

Materijal i metode: Za sintezu ZnO korišten je cink (II) acetatihidrat i ekstrakt cvjetova biljke *Geranium robertianum* Linnaeus. Za karakterizaciju sintetisanog ZnO, korištene su sljedeće instrumentalne metode: UV-VIS i IR spektroskopija, te optički mikroskop, kojima je potvrđeno prisustvo ZnO NPs, koje su imale oblik nepravilnih sfera. Antimikrobna svojstva sintetisanih ZnO NPs ispitivana su difuzionom metodom antibiograma, na pet bakterijskih vrsta: Gram-pozitivnim *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) i Gram-negativnim *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*.

Rezultati: Rezultati su pokazali da ZnO NPs sintetisane zelenom hemijom u velikom procentu utiču na degradaciju metilen plave boje (MB) sa efikasnošću razgradnje čak od 96% i vremenom poluraspada od 28,76 min. Vrijeme poluraspada boje, kada se ne koriste ZnO NPs, daleko je veće i iznosi 198,04 min. Utvrđeno je da ZnO NPs pokazuje veliku antimikrobnu aktivnost prema *Acinetobacter baumannii* i *Staphylococcus aureus*.

Zaključak: Metoda zelene hemije, uz primjenu *Geranium robertianum* L., pokazala se uspješnom za sintezu ZnO. Sintetisane nanočestice su izvanredan katalizator u fotodegradaciji organskog polutanta (metilen plavo). Imaju veliku tendenciju ka zaustavljanju rasta bakterija. Kao takve, nanočestice ZnO bi trebalo da se upotrebljavaju kao dopuna dejstvu antibiotika u borbi protiv različitih vrsta infekcija.

Ključne reči: Cink-oksid; zelena hemija; fotokataliza; antimikrobna aktivnost.

UVOD

Jedna od veoma aktuelnih oblasti u naučnim sferama je nauka o materijalima, koja je u velikoj mjeri usmjerena prema istraživanju metalnih nanočestica i njihovih oksida i pronalaženju najbolje metode za njihovu sintezu, koja direktno utiče na osobine nanočestica i njihovu primjenu. Zelena sinteza, koja podrazumijeva korištenje bioloških uzoraka poput biljnih ekstrakata, ima prednosti u odnosu na fizičko-hemijske metode sinteze metalnih nanočestica zbog jednostavnosti, ekonomičnosti, upotrebe manjih količina hemikalija, a naročito zbog ekoloških aspekata. Posljednjih godina fitosinteza nanočestica je privukla značajnu pažnju zbog rastuće potrebe za razvijanjem čistih i netoksičnih hemikalija, ekološki prihvatljivih rastvarača i obnovljivih materijala [1]. Istraživanja su pokazala da su veličina, morfologija, stabilnost i fizičko-hemijska svojstva metalnih nanočestica pod jakim uticajem eksperimentalnih uslova koji igraju ključne uloge u kontroli fizičko-hemijskih, optičkih i elektronskih osobina nanomaterijala [2]. Cink-oksid, zahvaljujući svojim jedinstvenim fizičko-hemijskim osobinama, kao što je visoka hemijska stabilnost, visok koeficijent elektrohemijske sprege, širok raspon apsorpcije zračenja i visoka fotohemijska stabilnost, široko je korišten i multifunkcionalni materijal. Primjenjuje se u proizvodnji kozmetičkih i farmaceutskih krema sa antibakterijskim i zaštitnim djelovanjem od UV zračenja, kao dodatak hrani, u proizvodnji lijekova, boja za tekstil, gume, plastike, keramike itd. [3, 4]. Zbog svoje široke upotrebe i poboljšanih osobina kada se nalazi u nanodimenzijama, postoji veliki potencijal da u potpunosti zamijeni dosadašnju upotrebu mikrokristalnog ZnO. Pravilan izbor metode sinteze je jako važan i najviše utiče na konačna svojstva materijala [5]. Shodno tome, nanočestice ZnO sintetisane su metodom zelene hemije, upotrebom ekstrakta biljke *Geranium robertianum* L. Sintetisanim nanočesticama ispitivan je fotokatalitički i antimikrobni potencijal.

MATERIJAL I METODE

Fitosinteza nanočestica ZnO:

Napravljen je 0,01 M rastvor cink (II) acetat-dihidrata, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Sa 2 M NaOH napravljenom rastvoru podešena je pH vrijednost na 12. Osušeni cvjetovi biljke *Geranium robertianum* L. rastvarani su u metanolu da bi se dobila koncentracija 1 mg/mL. Pripremljeni rastvori su pomiješani i 2 h na sobnoj temperaturi miješani na magnetnoj mješalici, na 550 rpm. Nakon 2 h, rastvor je centrifugiran 5 min na 3000 rpm. Potom, gornji dio rastvora se dekantuje a talog se ispere dejonizovanom vodom i suši na 60°C 24 h [6]. Dobijeni bijeli prah predstavlja sintetisani ZnO.

Metode karakterizacije sintetisanih ZnO NP:

U radu je korišten UV-VIS spektrofotometar, *Parkin Elmer Lambda 25*. Analiziranje spektra elektromagnetskog zračenja provodi se spektrofotometrom koji mjeri apsorbanciju kao funkciju talasne dužine svjetlosti. Instrument stoga omogućava mjerenje intenziteta apsorbance ili transmitancije (izražene u %), te određivanje koncentracije jedinjenja u ispitivanim uzorcima pomoću Lambert-Berovog zakona [7]:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l \quad (1)$$

ϵ – molarna apsorptivnost, $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$;

c – koncentracija uzorka, mol dm^{-3} ;

l – dužina svjetlosnog puta, cm;

A – apsorbancija ($\log \frac{I_0}{I}$, gdje je I_0 – intenzitet upadnog zračenja, I – intenzitet propuštenog zračenja).

Za pripremu uzoraka za snimanje na UV-VIS spektrofotometru, odvagano je 10 mg sintetisanog ZnO i rastvoreno u 10 mL destilovane vode. ZnO je suspendovan u vodi uz pomoć ultrazvučnog kupatila 1 h. Nakon dispergovanja, rastvor je ostavljen da stoji 24 h, da bi sve teže čestice pale na dno kivete, a samo čestice koloidnih veličina su ostale dispergovane u vodi. Koloidni rastvor se prenese u kivetu i snima na UV-VIS spektrofotometru u opsegu od 200 do 700 nm.

Infracrveni (IR) spektar sintetisanog uzorka je dobijen korištenjem IR spektrofotometra *Bruker Tensor 27 IR*. Infracrvena spektroskopija instrumentalna je metoda za identifikaciju funkcionalnih grupa prisutnih u molekuli. IR spektar je snimak apsorbiranog svjetla kao funkcija talasne dužine. Apsorbovaće se samo svjetlo čija se frekvencija podudara s frekvencijom vibracija veze u molekuli, odnosno frekvencije radijacije i vibracije moraju biti iste da bi došlo do apsorpcije [7].

Za dobijanje uvida u morfologiju fitosintetisanih ZnO NPs, korišten je optički mikroskop, *Omax A35140U*. Optički mikroskop, koji se često naziva i „svjetlosni optički mikroskop”, vrsta je mikroskopa koji koristi vidljivu svjetlost i sistem sočiva za uvećanje slika malih uzoraka [8]. Uvećanje *Omax A35140U* je 2500 puta.

Ispitivanje fotokatalitičke aktivnosti ZnO NPs:

Fotokatalitička aktivnost ispitana je na degradaciji organske boje metilen plavo (MB) i degradaciji MB sa dodatkom sintetisanih nanočestica ZnO kao fotokatalizatora. Oba eksperimenta su sprovedena pod djelovanjem sunčeve svjetlosti. MB je kancerogena i toksična boja, mora se čuvati na tamnom i hladnom mjestu jer se razlaže na svjetlosti. Takođe je i štetan zagađivač, čak i pri niskim koncentracijama [9].

Za potrebe eksperimenta, bilo je neophodno odvagati 20 mg sintetisanog ZnO i dodati u 20 mL rastvora MB, koncentracije 10 mg/L. Pripremljeni rastvori su pomiješani i stavljani na magnetnu mješalicu, uz intenzitet miješanja 450 rpm, pri 25°C tokom 2h. Ovako pripremljen rastvor (ZnO + MB) iznijet je na sunčevu svjetlost i praćen je proces fotokatalize na osnovu promjene boje rastvora. Početna vrijednost jačine sunčeve svjetlosti je iznosila 4500 lux izmjerena luksmetrom. Uzorci su pipetirani na svakih 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min i 120 min. U datim vremenskim intervalima uzorci od 1 mL su pipetirani u ependorf kivete, centrifugirani 5 min na 9000 rpm i snimani na UV/VIS spektrofotmetru.

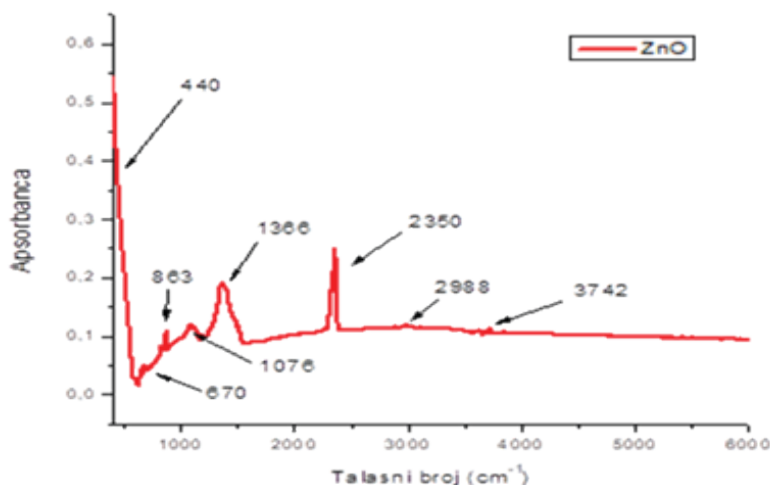
Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ZnO NPs:

Antimikrobna aktivnost nanočestica ZnO ispitana je difuzionom metodom antibiograma. Uzorak nanočestica rastvaran je postepeno u 99,5% alkoholu na ultrazvučnoj mješalici u toku jednog sata, gdje je konačna koncentracija rastvora iznosila 10 mg/mL. Antimikrobno testiranje je urađeno isti dan kada je pripremljen rastvor. Ispitivanje je sprovedeno na 5 bakterija: referentni sojevi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 8739, te klinički izolati *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA). Ispitivanje je vršeno na Miler-Hintonom agaru, u kojem su napravljene rupice prečnika 6 mm pomoću sterilnog borera. Podloga je zasijana sa sterilnim bрисom prethodno uronjenim u bakterijsku suspenziju 0,5 McFarlanda, koja je pripremljena u 0,9% NaCl. Nakon zasijavanja, u rupice je unijeto po 30 μ L nanočestica ZnO, te su inokulisane podloge ostavljene 1 h na sobnoj temperaturi, da bi nanočestice difundovale u podlogu. Nakon toga su ploče inkubirane tokom 24 h na 37°C. Prečnik zone inhibicije oko rupica je mjeren sutradan pomoću milimetarskog mjerača. Svaka bakterija je tretirana sa necentrifugiranim rastvorenim nanočesticama, te nakon centrifugiranja na 2500 rpm/5 min.

REZULTATI I DISKUSIJA

Karakterizacija sintetisanih nanočestica ZnO

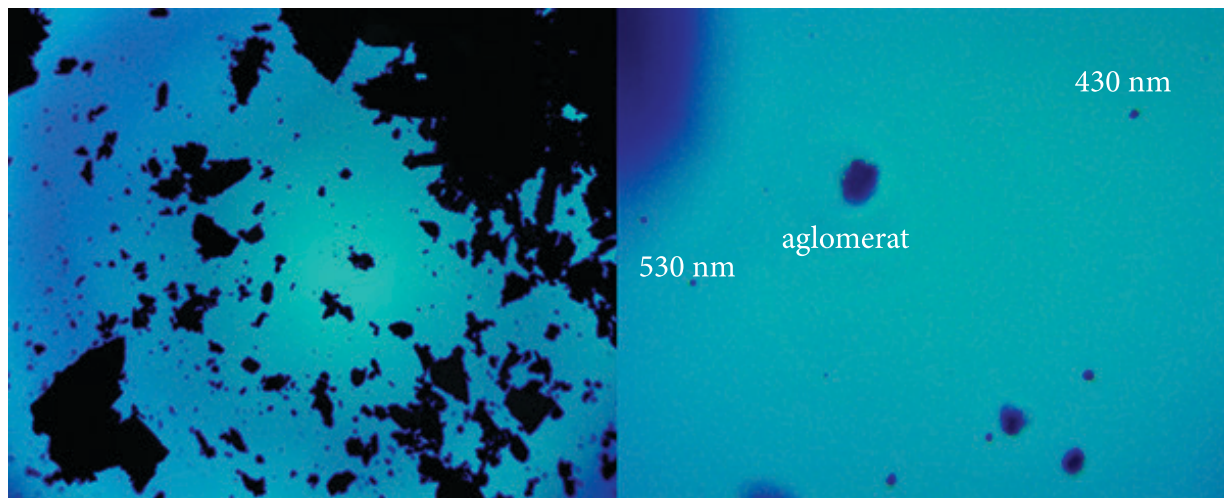
Fitosintetisane nanočestice ZnO podvrgnute su karakterizaciji na infracrvenom spektrofotometru i optičkom mikroskopu u cilju dobijanja saznanja o njihovoj strukturi i morfologiji. Infracrveni spektar ZnO NPs predstavljen je na Slici 1, a u Tabeli 1. date su karakteristične trake nađene u našem ZnO uzorku, u rasponu od 4000 do 400 cm^{-1} . Veći broj pikova snimljenog spektra ukazuje na prisutvo biomolekula u biljnom ekstraktu, koji djeluje kao redukujuće sredstvo pospješujući pretvaranje prekursora sinteze u ZnO. Pikovi 440 cm^{-1} i 670 cm^{-1} označavaju prisustvo metalnog oksida i istezanje veze u ZnO, a pik na 3742 cm^{-1} ukazuje na postojanje molekula vode, tačnije O-H grupe, i N-H rastezanje u aminima, što je i očekivano jer sintetisane nanočestice nisu podvrgavane kalcinaciji na visokim temperaturama. Senthilkumar i Sivakumar [10] su na sličan način izvršili karakterizaciju ZnO NPs dobijenih sa zelenim čajem (*Camellia sinensis*).



Slika 1. Infracrveni spektar ZnO NPs

Tabela 1. Funkcionalne grupe u IR spektru ZnO NPs	
Apsorpcionipik (cm^{-1})	Funkcionalna grupa
440	Zn-O-Zn
670	Zn-O, istezanje
863	C-H, metilgrupa
1076	C-O
1366	C-H, alkani
2350	C-O-C, istezanje
2988	-COOH (vodonikovaveza)
3742	H-O-H(O-H); N-H

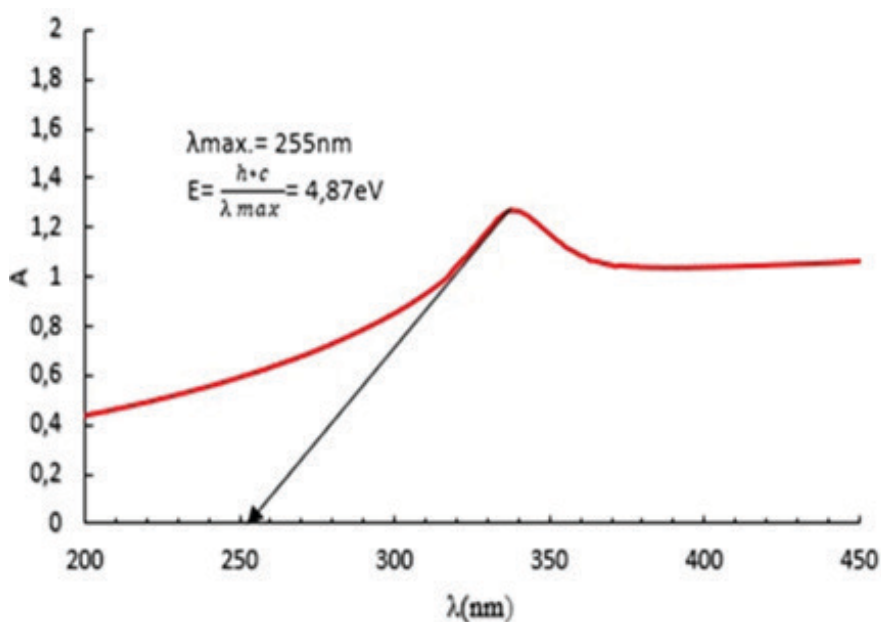
Da bismo dobili uvid u morfologiju i veličinu sintetisanih ZnO NPs, primijenili smo optički mikroskop. Optička mikroskopija je pokazala da su čestice sintetisanog ZnO nepravilnog sfernog oblika čije se dimenzije kreću od 430 nm do 530 nm (Slika 2, desno), kao i da je uočena pojava aglomeracije ZnO čestica i stvaranje klastera (Slika 2, lijevo), čime smo potvrdili sintezu nanočestica cink-oksida.



Slika 2. Snimci optičkog mikroskopa na ZnO NPs. Na slici lijevo (manja rezolucija) uočava se značajna aglomeracija, zbog izostanka procesa kalcinacije. Slika desno prikaz je nepravilnih sfernih nanočestica (veća rezolucija).

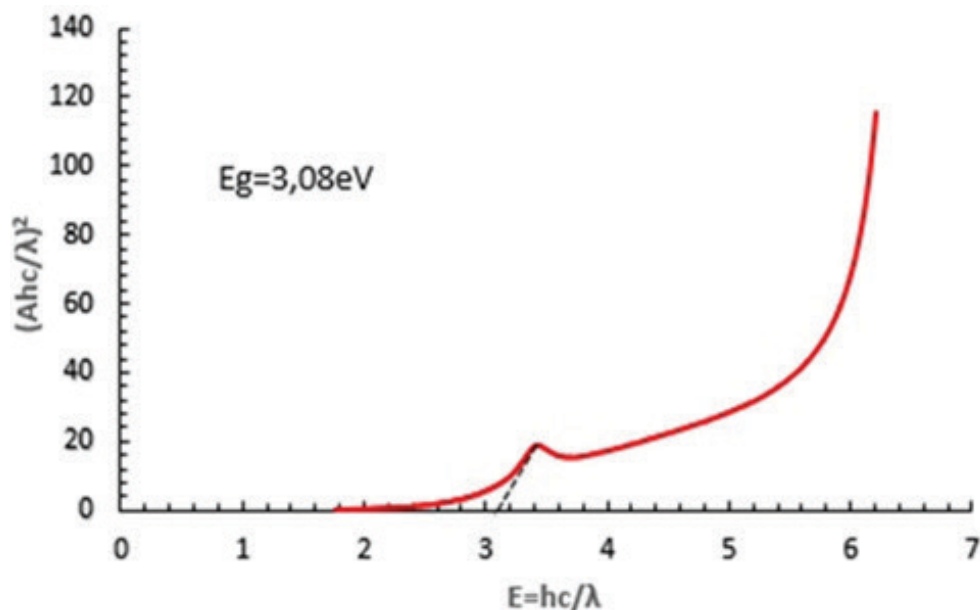
Fotokatalitička aktivnost

Veličina čestica je direktno povezana sa energetske procjepom. Što je energetski procjep veći, čestice su manje i obrnuto. Kod većih čestica, atomi i atomske orbitale se preklapaju, zbog toga se povećava broj molekulskih orbitala (vezivnih i antivezivnih), a energetski procjep između valentne i provodne trake će se smanjiti. Pomoću UV/VIS spektrofotometrije dobijen je spektar sintetisanih ZnO nanočestica (Slika 3). Iz dobijenog UV-VIS spektra smo očitali apsorpcijski maksimum (λ_{max}) i uz pomoć formule $E = \frac{h \times c}{\lambda_{max}}$ (eV) izračunali vrijednost apsorbovane energije poluprovodnika. Za ZnO NPs, ova vrijednost iznosi 4,87 eV sa maksimumom apsorpcije na 255 nm (Slika 3).



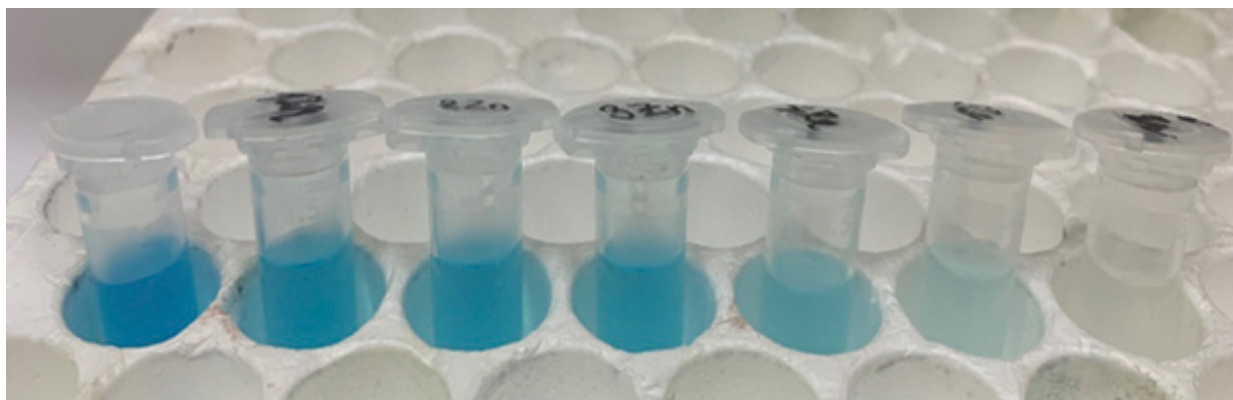
Slika 3. UV-VIS spektar ZnO NPs dispergovanih u vodi

Vrijednost energetskog procjepa poluprovodnika smo odredili grafičkim putem upotrebom Tauc plot funkcije ($(Ah\nu)^2 = f(h\nu)$) ekstrapolacijom po apscisi (x-osi), što pokazuje Slika 4. Vrijednost E_g iznosi 3,08 eV. Ova vrijednost je nešto niža od vrijednosti koja se sreće u literaturi i iznosi $\approx 3,37$ eV. Ovakav slučaj zabilježio je i u svom radu Jevapatarakul [11], gdje je vrijednost energetskog procjepa iznosila takođe $\approx 3,0$ eV.



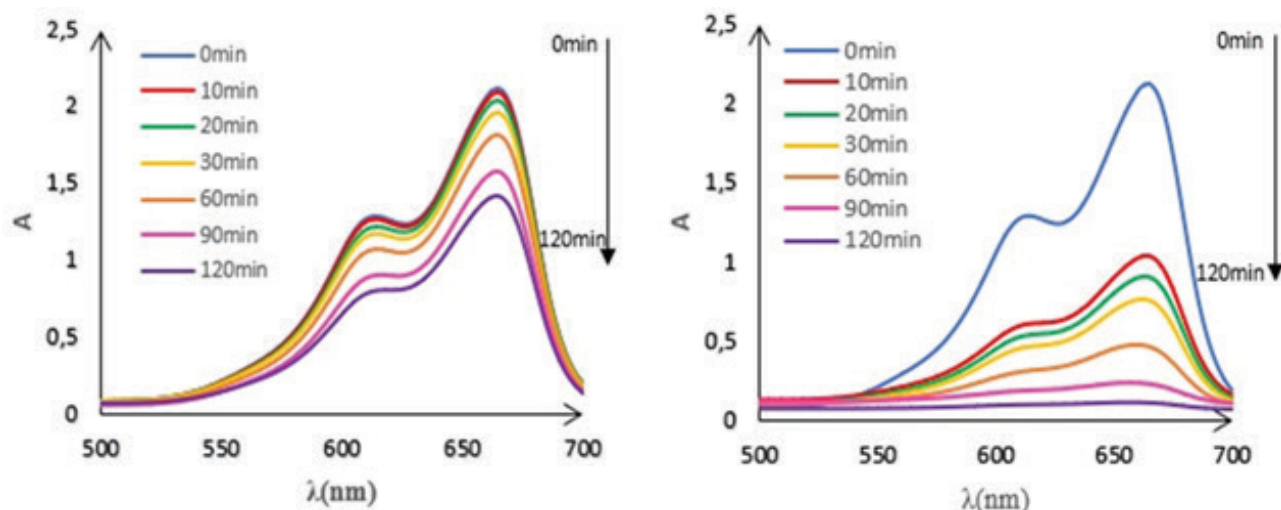
Slika 4. Tauc plot funkcija ZnO NPs

U narednom koraku izvršeno je ispitivanje fotokatalitičke aktivnosti sintetisanog ZnO NPs preko fotodegradacije metilen plavog. Ispitivana je fotodegradacija boje metilen plavo bez prisustva i uz prisustvo sintetisanog ZnO. Na ovaj način smo dobili uvid u fotokatalitičke sposobnosti ZnO NPs, odnosno, da li fitosintetisani ZnO doprinosi poboljšanoj fotodegradaciji boje metilen plavo. Na Slici 5. jasno se može vidjeti da je došlo do potpune fotodegradacije MB kada se kao katalizator koriste ZnO NPs. Prva ependorfica (sa lijeva) na Slici 5. predstavlja čisti MB na kojem se nije vršila fotokataliza sunčevim zračenjem. Dok druge ependorfice (ostalih 6) predstavljaju uzorke MB + ZnO nakon fotokatalize na sunčevom zračenju u toku 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min i 120 min. Nakon isteka 120 min, dobili smo potpuno prozirni rastvor MB + ZnO NPs, što ukazuje na potpunu fotodegradaciju MB uz pomoć fitosintetisnog ZnO.



Slika 5. Čisto MB (prva ependorfica sa lijeva) i MB + ZnO NPs (ostalih šest ependorfica) za različite vremenske intervale fotokatalize

Pored samog vizuelnog uočavanja rezultata fotokatalitičke aktivnosti, sakupljeni uzorci su se snimali na UV-VIS spektrofotometru, da bi se uporedila i izračunala tačna efikasnost fotokatalize.



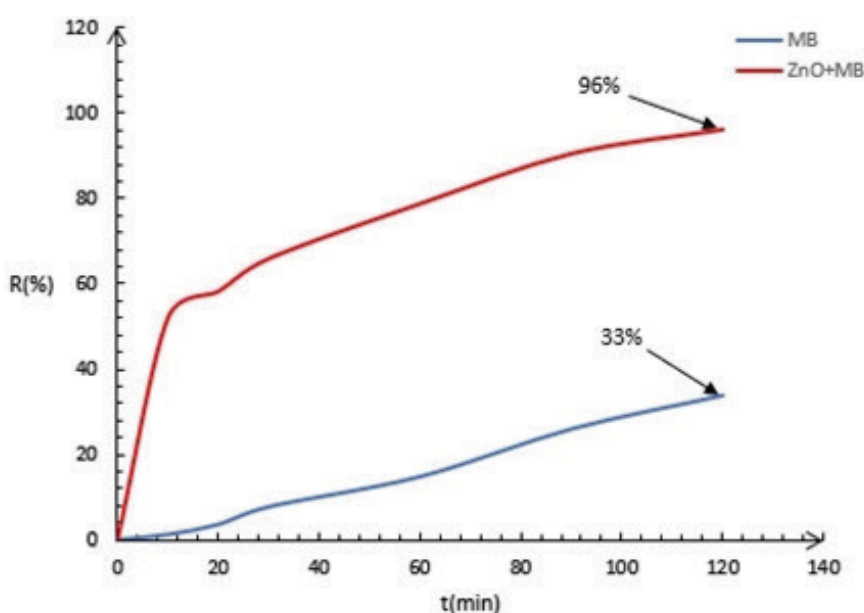
Slika 6. Apsorpcioni spektri MB (lijevo) i MB + ZnO NPs (desno) fotokatalitičke degradacije za različite vremenske intervale

Slika 6. predstavlja poređenje apsorpcionih spektara MB i MB + ZnO NPs fotokatalitičke degradacije u različitim vremenskim intervalima na 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min i 120 min za oba uzorka. Kod UV-VIS spektra koji pokazuje fotodegradaciju uzorka MB + ZnO NPs, uočava se drastično smanjenje maksimuma apsorpcije (crvena kriva) nakon prvih 10 min fotokatalize. Idući ka većim vremenskim intervalima, uočava se smanjivanje apsorpcionih maksimuma, gdje na 120 min gotovo da se maksimum ne može uočiti. Što je još jedan dokaz skoro pa potpune fotokatalitičke degradacije metilen plavo.

Da bi smo znali sa sigurnošću koliko se boje metilen plavo razgradilo upotrebom nanočestica ZnO, morali smo izračunati, tzv. efikasnost fotokatalize ($R_{\%}$), putem formule [12]:

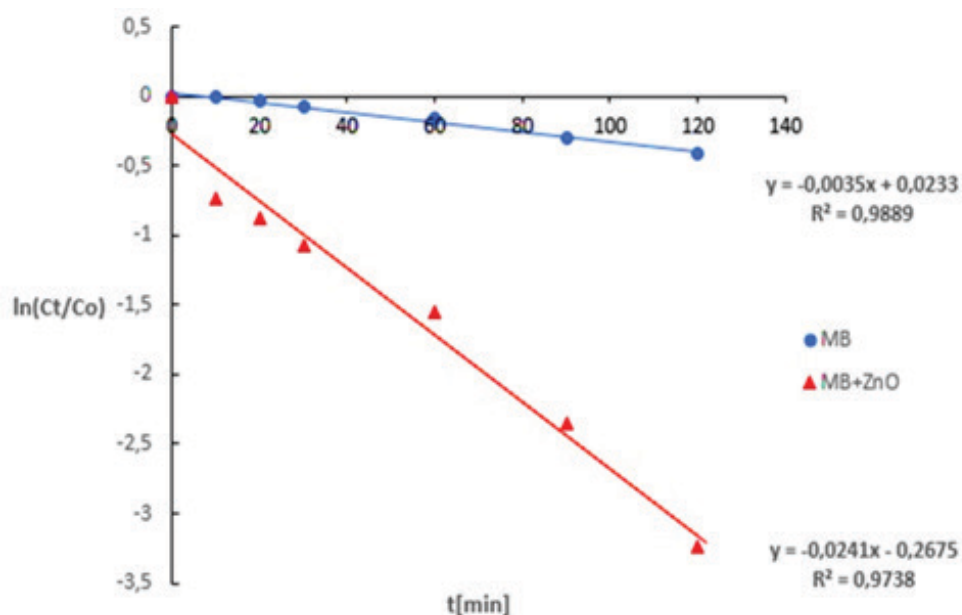
$$R(\%) = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \cdot 100 \quad (2)$$

Maksimum apsorpcije za metilen plavo je 664 nm, za različite vremenske intervale uzeta je apsorbanca sa 664 nm i, uz pomoć kalibracione krive MB i jednačine pravca, izračunali smo C_0 i C_t , a zatim i efikasnost fotokatalize.



Slika 7. Krivom $R(\%)=f(t)$ predstavljena je efikasnost fotokatalize za MB i MB + ZnO NPs

Na Slici 7. predstavljen je grafik $R(\%)=f(t)$ koji pokazuje efikasnost fotokatalize. Plava kriva predstavlja čisti uzorak MB, dok crvena kriva predstavlja uzorak metilen plavo sa nanočesticama ZnO podvrgnutim fotokatalizi sunčevom svjetlošću u vremenskim intervalima od 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min i 120 min. Uzorak čistog MB se fotokatalitički razgradio svega 33% nakon 120 min, dok uzorak MB sa nanočesticama ZnO (ZnO NPs + MB) je već nakon prvih 10 min se razgradio 52%. Nakon 120 min, efikasnost razgradnje boje metilen plavo iznosila je 96%. Zaključno, to nam govori da su nanočestice ZnO dobijene zelenom hemijom izvanredan katalizator u degradaciji organskog polutanta uz prisustvo sunčevog zračenja, tj. da su ZnO NPs izvrstan fotokatalizator.



Slika 8. Grafik linearne zavisnosti $\ln(Ct/Co)$ od t (min)

Slika 8. pokazuje grafik $\ln(Ct/Co)=f(t)$ gdje se vidi da nakon 120 min fotokatalize imamo veliki procenat razgradnje kod uzorka MB + ZnO NPs (crvena kriva) u poređenju sa čistim MB (plava kriva). Pomoću jednačina pravca sa grafikona $\ln(Ct/Co)=f(t)$ određena je konstanta brzine razgradnje boje MB i MB + ZnO NPs, kao i vrijeme polureakcije. Vrijeme polureakcije, $t_{1/2}$, je vrijeme za koje će se koncentracija ispitivanih uzoraka smanjiti na polovinu od početne vrijednosti [13]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3)$$

Rezultati koje smo dobili ispitivanjem kinetičkih parametara fotokatalize, tačnije konstanta brzine razgradnje uzoraka i vrijeme polureakcije prikazani su u Tabeli 2. Iz rezultata se može zaključiti da je konstanta brzine razgradnje i vrijeme poluraspada boje metilen plavo znatno veće u poređenju sa drugim uzorkom, do degradacije boje dolazi veoma polako u toku 198,04 min. U drugom slučaju, kada se boji metilen plavo dodaju nanočestice ZnO, dobija se drastično manje vrijeme poluraspada, koje iznosi 28,76 min, što znači da se metilen plavo jako brzo razgradi u odnosu na svoju početnu koncentraciju.

Tabela 2. Kinetički parametri fotokatalitičke degradacije MB		
Uzorak	$k(\text{min}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{min})$
Metilen plavo	0,0035	198,04
Metilen plavo + ZnO NPs	0,0241	28,76

Antimikrobna aktivnost nanočestica ZnO ispitana je difuzionom metodom antibiograma. Ispitivanje je sprovedeno na 5 bakterija: referentni sojevi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 8739, te klinički izolati *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA). Na Slici 9. prikazan je porast kolonija od pet različitih bakterija nakon tretmana sa necentrifugiranim ZnO NPs (lijevo slike) i nakon tretmana sa centrifugiranim ZnO NPs (desno slike), na kojima je antibakterijska aktivnost nanočestica ZnO ispitana mjerenjem zone inhibicije porasta bakterija.

Kod centrifugiranih bakterija, nije vidljivo bijelo obojenje od ZnO, jer su čestice ostale u sedimentu, što se može vidjeti na Slici 9. Najveća zona inhibicije uočena je kod kliničkog izolata *Acinetobacter baumannii* (Gram-negativna bakterija) nakon tretmana sa centrifugiranim ZnO NPs i iznosila je 15 mm (Slika 9. pod C). Pored ovog rezultata, značajna razlika u aktivnosti između centrifugiranih i necentrifugiranih ZnO NPs utvrđena je i prilikom testiranja kliničkog izolata MRSA, gdje su izmjerene zone inhibicije od 14 mm, odnosno 11 mm (Slika 9. pod E). Ostale vrijednosti zona inhibicije prikazane su u Tabeli 3.

Tabela 3. Rezultati zona inhibicije necentrifugiranih i centrifugiranih bakterijskih vrsta koje su ispitane (mm)		
Vrsta bakterije	Necentrifugirane ZnO NPs	Centrifugirane ZnO NPs
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11 mm	10 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	12 mm	10 mm
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10 mm	15 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 mm	11 mm
MRSA	11 mm	14 mm

ZAKLJUČAK

Metoda zelene hemije, uz primjenu *Geranium robertianum* L., pokazala se uspješnom za sintezu ZnO NPs. Metodama karakterizacije dokazano je da je sintetisan ZnO nanodimenzija. Ispitane su fotokatalitičke i antimikrobne sposobnosti dobijenog ZnO NPs. ZnO NPs je pokazao veliku fotokatalitičku aktivnost, sa efikasnošću razgradnje od 96%, kao i vremenom poluraspada od 28,76 min u odnosu na vrijeme poluraspada čiste metilen plave boje, koje iznosi 198,04 min. Antimikrobna aktivnost ZnO NPs je testirana na 5 različitih bakterija. Najveća aktivnost je uočena kod *Acinetobacter baumannii* i meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA). Naime, srazmjerno sa porastom površine nanočestica ZnO raste i broj, tj. koncentracija OH[•] radikala koji se oslobađaju sa te površine, a koji potom djeluju toksično na ispitivane bakterijske vrste [14]. ZnO NPs uspješno zaustavljaju rast bakterija, te bi se kao takve trebalo da dodatno unaprijede kao nadopuna dejstva antibiotika u borbi protiv različitih vrsta infekcija.

ZAHVALNOST

Autori zahvaljuju Ministarstvu za naučnotehnološki razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske za podršku ovom istraživanju, kroz projekat 19/6-020/961-74/18.



Slika 9. Porast bakterijskih kolonija nakon tretmana sa necentrifugiranim ZnO NPs (slike sa lijeve strane) i nakon tretmana sa centrifugiranim ZnO NPs (slike sa desne strane): A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; B) *Escherichia coli* ATCC 8739; C) *Acinetobacter baumannii*; D) *Pseudomonas aeruginosa*; E) MRSA

LITERATURA

- [1] Jasrotia, T., Chaudhary, S., Kaushik, A., Kumar, R., & Chaudhary, G. R. *Green chemistry-assisted synthesis of biocompatible Ag, Cu, and Fe₂O₃ nanoparticles*, Materials Today Chemistry, 2020, 15, 100214. doi:10.1016/j.mtchem.2019.100214.
- [2] Geethalakshmi R. and Sarada DVL, *Gold and silver nanoparticles from Trianthemadecandra: synthesis, characterization, and antimicrobial properties*, Int J Nanomedicine, 2012, 7, 5375–5384, doi: 10.2147/IJN.S36516.
- [3] Luković Golić T. D., *Solvothermalna analiza cink-oksida sa kontrolisanom veličinom čestica na nano i mikro skali*, 2013, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- [4] Janković, S., Milisavić, D., Okolić, T., & Jelić, D. *Preparation and characterization of ZnO nanoparticles by solvent free method*, Contemporary materials, 2018, IX-X, pp.48–52, doi:7251comeni1801048j.
- [5] Janković S., Milisavić D., Okolić T., & Jelić D. *Synthesis Of ZnO-Ag nanoparticles by sol-gel method*, Contemporary Materials, 2019, X–1, page 22 of 27, doi:10.7251/COMEN1901022J.
- [6] Babić N. , Žabić D., Jerlić Z., Četić S., Gajić D., & Jelić D. *Empowering students in science: Phytosynthesis, characterization and biomedical application of metallic (Ag, Si, Cu) and oxide (ZnO, TiO₂, CuO, Fe₂O₃) nanoparticles: microbiology, biokinetics and toxicology aspect*, Contemporary materials, (2020).
- [7] Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S (2001): *Introduction to Spectroscopy*, Third Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, Australia.
- [8] Di Gianfrancesco, A., *Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations*, Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants, 2017, 197–245. doi:10.1016/b978-0-08-100552-1.00008-7.
- [9] Babu, A. T., & Antony, R. *Green synthesis of silver doped nano metal oxides of zinc & copper for antibacterial properties, adsorption, catalytic hydrogenation & photodegradation of aromatics*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2019, 7(1), 102840. doi:10.1016/j.jece.2018.102840.
- [10] Senthilkumar S.R. and Sivakumar T. *Green tea (Camellia sinensis) mediated synthesis od zinc oxide(ZnO) nanoparticles and studies on their antimicrobial activities*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, ISSN- 0975-1491 Vol 6.
- [11] Jevapatarakul, D., T-Thienprasert, J., Payungporn, S., Chavalit, T., Khamwut, A., & T-Thienprasert, N. P. *Utilization of Cratoxylumformosum crude extract for synthesis of ZnO nanosheets: Characterization, biological activities and effects on gene expression of nonmelanoma skin cancer cell*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 130, 110552. doi:10.1016/j.biopha.2020.110552.
- [12] Phin, H.-Y., Ong, Y.-T., & Sin, J.-C. *Effect of carbon nanotubes loading on the photocatalytic activity of zinc oxide/carbon nanotubes photocatalyst synthesized via a modified sol-gel method*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2019, 103222. doi:10.1016/j.jece.2019.103222.
- [13] Cherrak R., Hadjel M., Benderdouche N., Adjdir, M., Mokhtar A., Khaldi K. et al. *Preparation of Nano-TiO₂/Diatomite Composites by Non-hydrolytic Sol–Gel Process and its Application in Photocatalytic Degradation of Crystal Violet*, Silicon volume 12, 2019, 927–935, doi:10.1007/s12633-019-00186-6.
- [14] Kadiyala, U., Turali-Emre, E. S., Bahng, J. H., Kotov, N. A., & VanEpps, J. S., *Unexpected insights into anti-bacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*, Nanoscale, 2018, 10(10), 4927–4939. doi:10.1039/c7nr08499d.

PHYTOSYNTHESIS AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF ZnO OXIDE NANOPARTICLES

Authors: NINA BABIĆ, Dragana Gajić

e-mail: nina.babic@student.pmf.unibl.org

Mentor: Assoc. Prof. Dijana Jelić

Co-mentor: Assoc. Prof. Aleksandra Šmitran

Chemistry Department, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka

Introduction: Green synthesis is one of the most fascinating methods of metal nanoparticle synthesis, as well as an attractive alternative to physico-chemical synthesis methods. Research has shown that metal nanoparticles are highly dependent on experimental conditions, so the choice of synthesis methods is closely related to the properties of the desired material. The properties of nano zinc oxides (ZnO NPs) are such that there is a great potential for its application to completely replace the previous microcrystalline ZnO.

Aim: The subject of the presented research is phytosynthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), including the physico-chemical characterization and evaluation of the photocatalytic and antimicrobial potential of phytosynthesized ZnO NPs.

Material and Methods: Zinc (II) acetate dihydrate and flower extract of *Geranium robertianum* Linnaeus were used for ZnO synthesis. Instrumental methods such as UV-VIS and IR spectroscopy and optical microscopy were used for the characterization of the synthesized ZnO NPs. Synthesis of irregular spherical particles was confirmed. Antibacterial properties of the synthesized ZnO NP were examined using the diffusion method of antibiogram on five bacterial types: gram positive *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and gram negative *Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*.

Results: The results showed that ZnO NPs synthesized by green chemistry affect the degradation of methylene blue color (MB) significantly, with an efficiency of degradation as much as 96% and half-life of 28,76 min. When ZnO NPs are not used, the half time of the degradation color is far longer and it lasts for 198,04 min. It has been established that ZnO NPs show high antimicrobial activity according to *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*.

Conclusion: The method of green chemistry with the application of *Geranium robertianum* L. is successful for the synthesis of ZnO nanoparticles. Synthesized nanoparticles are an excellent catalyst in the photodegradation of methylene blue. They have a high tendency to stop bacteria from growing. Therefore, ZnO NPs should be used as supplements to the effect of antibiotics in the fight against various infections.

Keywords: zinc oxide; green chemistry; photocatalysis; antimicrobial activity

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна и универзитетска библиотека
Републике Српске, Бања Лука

5(082)

НАУЧНО-стручни скуп Студенти у сусрет науци - StES (13 ; Бања
Лука ; 2020)

Prirodne nauke : zbornik radova / 13. Naučno-stručni skup
Studenti u susret nauci - StES 2020, Banja Luka 2020. = Natural
Sciences : proceedings / 13th scientific conference Students
encountering science - StES 2019 ; [urednik Bojan Garić]. - [Banja
Luka] : Univerzitet u Banjoj Luci : Studentski parlament Univerziteta u
Banjoj Luci, 2020 (Banja Luka : Mikro print). - 75 стр. : илустр. ; 30
cm. - (Prirodne nauke, ISSN 2637-1952, ISSN 2637-191X)

Тираж 35. - Библиографија уз сваки рад. - Abstracts.

ISBN 978-99976-49-08-9

COBISS.RS-ID 129991425