

Antimikotična aktivnost esencijalnih ulja matičnjaka, manuke i vratića na uzročnike otomikoza

Antifungal activity of essential oils of lemon balm, manuka and tansy to the causative agents of otomycosis

Dorđe Jovanović¹, Vera Jovanović¹, Sanja Mitrović^{1,2}

¹ Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

² Mentor: Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: doriangrey92@gmail.com

Sažetak

Uvod: Otomikoze su površne gljivične infekcije kože spoljašnjeg ušnog kanala. Jedan od terapijskih pristupa koji postaje aktuelan u lečenju otomikoza je primena esencijalnih ulja za koja je pokazano da imaju različita biološka svojstva, među kojima je i antimikrobni efekat.

Cilj: Cilj istraživanja je ispitivanje antimikotičnog dejstva esencijalnih ulja matičnjaka (*Melissa officinalis*), manuke (*Leptospermum scoparium*) i vratića (*Tanacetum vulgare*) na uzročnike otomikoza.

Materijal i metode: Ispitivana je osetljivost 20 sojeva *Candida* spp. i *Aspergillus* spp., izabranih metodom slučajnog izbora, izolovanih iz briseva spoljašnjeg ušnog kanala bolesnika sa znacima i simptomima otitis externe. Antigljivična aktivnost esencijalnih ulja matičnjaka, manuke i vratića ispitivana je mikrodilucionom metodom, određivanjem vrednosti minimalnih inhibitorskih (MIC) i minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC).

Rezultati: Vrednosti MIC matičnjaka kretale su se u rasponu od 0,39 do 50 µL/mL, manuke od 0,39 do 50 µL/mL i vratića od 1,56 do 50 µL/mL. Minimalne fungicidne koncentracije su bile 2-4 puta veće od vrednosti MIC, izuzev u slučaju jednog soja *Aspergillus niger* koji je bio tolerantan na esencijalno ulje matičnjaka.

Zaključak: Ispitivanjem aktivnosti esencijalnih ulja matičnjaka, manuke i vratića na sojeve *Candida* spp. i *Aspergillus* spp. mikrodilucionom metodom pokazano je da navedena esencijalna ulja imaju antimikotični efekat.

Ključne reči: esencijalno ulje, *Melissa officinalis*, *Leptospermum scoparium*, *Tanacetum vulgare*, antimikotična aktivnost

Uvod

Otomikoze su površne gljivične infekcije kože spoljašnjeg ušnog kanala. Retko dovode do komplikacija, kada dolazi do perforacije bubne opne sa zahvatanjem srednjeg uva (1). Karakteristični simptomi su nelagodnost u uvu (koja može da varira od pruritusa do ozbiljnih bolova koji se pogoršavaju pri žvakanju) i otoreja (2). Zapaljenje

Abstract

Introduction: Otomycosis is a superficial fungal infection of the external ear canal. One of the therapeutic approaches that became topical in treatment of otomycosis is the application of essential oils, which is shown to have different biological properties, including the antimicrobial effect.

Aim: The objective of the research is to examine antimycotic effects of essential oils of lemon balm (*Melissa officinalis*), manuka (*Leptospermum scoparium*) and tansy (*Tanacetum vulgare*) on the causative agents of otomycosis.

Materials and Methods: In this study, we investigated the sensitivity of 20 randomly selected strains of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. isolated from swabs taken from the external ear canal of patients with signs and symptoms of otitis externa. Antifungal activity of essential oils of lemon balm, manuka and tansy was tested by using the microdilution method by determining the value of the Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum fungicidal concentration (MFC).

Results: MIC values of lemon balm were in the range of 0.39-50 µl/ml, manuka of 0.39-50 µL/mL and tansy of 1.56-50 µL/mL. The MFC values were 2-4 times higher than the MIC values, except in the case of a strain of *Aspergillus niger*, which was tolerant of the lemon balm essential oil.

Conclusion: The investigation has shown that essential oil activities of lemon balm, manuka and tansy to the strains of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. using the microdilution method, have antifungal effect.

Key words: essential oil, *Melissa officinalis*, *Leptospermum scoparium*, *Tanacetum vulgare*, antifungal activity

može da uzrokuje oticanje spoljašnjeg ušnog kanala, što dovodi do parcijalnog gubitka sluha i tinitusa. Otomikoze predstavljaju globalni problem, s tim što vlažno, toplo i prašnjavo okruženje doprinosi da otomikoze preovladavaju u tropskim i suptropskim predelima (3). Prevalencija korelira sa klimatskim uslovima i kreće se u opsegu 5-25% ukupnog broja bolesnika sa znacima i simptomima otitis externe (4). Najčešći izazivači otomikoza su gljive

iz roda *Aspergillus* i *Candida* su. U retkim slučajevima je utvrđeno da su izazivači bolesti *Penicillium* spp, *Mucor* spp. i *Rhizopus* spp. (5).

Esencijalna ulja su isparljiva, prirodna, kompleksna organska jedinjenja koja karakteriše snažan miris i predstavljaju sekundarne metabolite aromatičnog bilja. Ove veoma složene smeše sadrže 20-60 komponenti u različitim koncentracijama koje određuju njihova biološka svojstva. Najzastupljeniji sastojci esencijalnih ulja su terpeni, seskviterpeni, terpenoidi, aromatična i alifatična jedinjenja, koje karakteriše niska molekularna masa (6). Hemijski sastav esencijalnih ulja može da varira u zavisnosti od geografskog porekla i perioda berbe biljaka. Citotoksični efekat esencijalnih ulja zasnovan je na prooksidativnoj aktivnosti njihovih komponenti i čini ih odličnim antiseptičkim i antimikrobnim agensima. Individualne komponente esencijalnih ulja pokazuju različit stepen antimikrobne aktivnosti, zbog čega varijacije u sastavu esencijalnih ulja biljaka sa različitih lokacija mogu da budu uzrok promenljivog antimikrobnog dejstva (7).

Za ispitivanje antimikotičnog dejstva na uzročnike otomikoza odabrana su esencijalna ulja matičnjaka (*Melissa officinalis*), manuke (*Leptospermum scoparium*) i vratića (*Tanacetum vulgare*).

Matičnjak pripada familiji Lamiaceae i široko je rasprostranjen u Centralnoj i Južnoj Evropi i Maloj Aziji. Glavni sastojci esencijalnog ulja matičnjaka su citrali (geranial + neral), citronelal, limonen, geraniol, β -kariofilen, β -kariofilen-oksidi i germakren D, sa sezonskim i individualnim varijacijama koncentracija i proporcija ovih komponenti (8). Dosadašnja istraživanja esencijalnog ulja matičnjaka pokazuju da ono ima značajnu antimikrobnu, antiinflamatornu, antioksidativnu, antiholinestraznu, proapoptoznu i antitumorsku aktivnost (8-13).

Manuka je cvetna biljka iz familije Myrtaceae, poreklom sa Novog Zelanda i jugoistoka Australije. Aktivne komponente esencijalnog ulja manuke obuhvataju monoterpeni, seskviterpeni, leptospermon, metilcinamat, kariofilen, linalol i selenin, pri čemu njihova koncentracija u ulju zavisi od hemotipa biljke (14). Dosadašnja istraživanja esencijalnog ulja manuke pokazuju da ono ima značajnu antimikrobnu, antiinflamatornu, antivirusnu i miorelaksantnu aktivnost (15-17).

Vratić je višegodišnja zeljasta biljka iz familije Asteraceae, poreklom iz Evroazije. Rasprostranjena je širom evropskog kontinenta, osim nekih mediteranskih ostrva. Esencijalno ulje vratića predstavlja smešu α -tujona, β -tujona, 1,8 cineola, kamfora, mirtenola, davanona i hrizantenona, sa preovladavanjem određenih komponenti u zavisnosti od hemotipa biljke (18). Dosadašnja istraživanja esencijalnog ulja vratića pokazuju njegovu značajnu antiinflamatornu, antihelmintsku, antivirusnu, antimikrobnu i antiulceroznu aktivnost (7, 19-22).

Cilj našeg istraživanja je ispitivanje antimikotičnog dejstva esencijalnih ulja matičnjaka, manuke i vratića na uzročnike otomikoza.

Materijal i metode

Istraživanje je sprovedeno na kliničkim izolatima gljivica, uzročnika otomikoza, iz kolekcije Laboratorije za mikologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ispitivana je osetljivost 20 sojeva *Candida* spp. i *Aspergillus* spp., izabranih metodom slučajnog izbora, izolovanih iz briseva spoljašnjeg ušnog kanala bolesnika sa znacima i simptomima otitis externe. Kulture gljivica su čuvane na Saburovom dekstroznom agaru (*Sabouraud dextrose agar*, SDA) na 4°C. Sojevi su osveženi presejavanjem na SDA, 24 h pre pravljenja inokuluma, i kultivisanjem na 37°C. Identifikacija do nivoa vrste u okviru rodova *Candida* i *Aspergillus* vršena je na osnovu mikroskopskih i kulturalnih karakteristika, a za *Candida* spp. i korišćenjem diferencijalne hromogene hranljive podloge CHROMagar (*HiMedia, India*).

U daljem radu su korišćene 24-časovne kulture sojeva, a inokulum je pripreman u destilovanoj vodi denzitometrijskom metodom (*Dinko Instrument Colorimetar, Barcelona*), pri čemu je broj mikroorganizama standardizovan na 0,5 *McFarland* i podešavan na finalnu koncentraciju inokuluma od 103 do 104 CFU/mL.

Antifungalna aktivnost esencijalnih ulja matičnjaka, manuke i vratića, dobijenih ljubaznošću doc. dr Ane Džamić sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, ispitivana je modifikovanom mikrodilucionim metodom (15, 23). U tu svrhu su napravljene serije dvostrukih razblaženja za svako od esencijalnih ulja u rastvaraču, tj. smeši etanol-voda (70% etanol), koje su se kretale u rasponu od 50 do 0,09 μ L/mL.

Za izvođenje mikrodilucione metode korišćene su ploče za mikrotitraciju i Miler-Hinton (*Müller-Hinton*) bujon sa 2% glukozom. Svaki bunarčić ploče u koji je davano po 90 μ L podloge i 10 μ L odgovarajućeg razblaženja esencijalnog ulja zasejavan je sa 10 μ L podešenog inokuluma ispitivanog soja gljiva. U ispitivanje svakog soja bile su uključene pozitivna (bez dodatog esencijalnog ulja, tzv. kontrola rasta) i negativna kontrola (bez dodatih esencijalnih ulja i gljiva).

Zasejane ploče su inkubirane 48 h na 37°C, nakon čega je određivana minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), definisana kao najniža koncentracija ispitivanog esencijalnog ulja koja sprečava vidljiv rast mikroorganizma (odsustvo zrnastog ili homogenog taloga na dnu bunarčića).

Minimalna fungicidna koncentracija (MFC) određivana je presejavanjem po 10 μ L sadržaja iz bunarčića bez porasta na SDA i 24-časovnom inkubacijom na 37°C, kao najmanja koncentracija esencijalnog ulja koja je sprečavala porast nakon presejavanja.

Rezultati

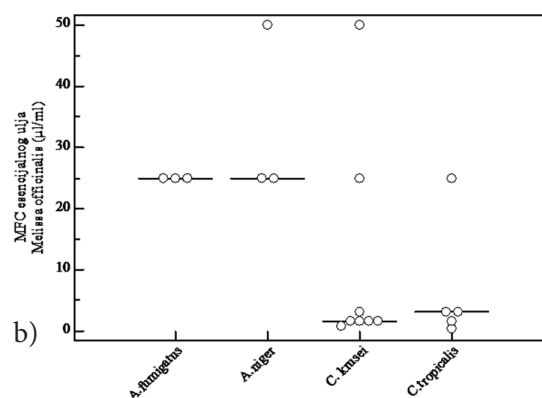
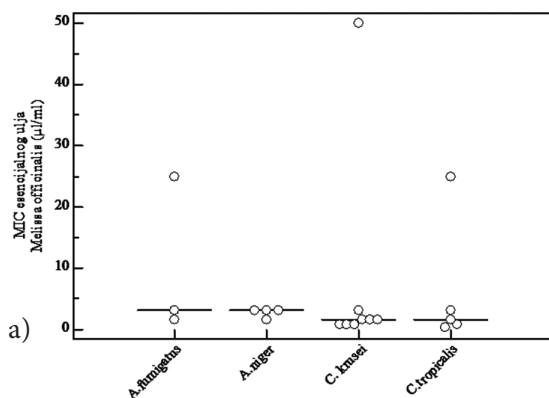
Ispitivani izolati uzročnika otomikoza identifikovani su do nivoa vrste na osnovu kulturalnih i mikroskopskih karakteristika. Od 20 ispitivanih uzoraka, 13 (65%) je identifikovano kao *Candida* spp., dok je 7 (35%) identifikovano kao *Aspergillus* spp. Identifikovane vrste u okviru roda *Candida* su *Candida krusei* (5; 25%) i *Candida tropicalis* (8; 40%), dok su u okviru roda *Aspergillus* pripadale vrstama *Aspergillus niger* (4; 20%) i *Aspergillus fumigatus* (3; 15%).

Ulja biljnih vrsta *Melissa officinalis*, *Leptospermum scoparium* i *Tanacetum vulgare* su pokazala antigljivičnu aktivnost prema testiranim sojevima *Candida* spp. i *Aspergillus* spp. u okviru ispitivanih koncentracija od 0,09 do 50 $\mu\text{L/mL}$. Minimalna fungicidna koncentracija esencijalnog ulja manuke bila je veća od 50 $\mu\text{L/mL}$ kod četiri ispitivana izolata, dok je MFC ulja matičnjaka bila veća od 50 $\mu\text{L/mL}$ u slučaju jednog izolata. Rezultati antigljivične aktivnosti su prikazani pojedinačno za svaki od ispitivanih sojeva u **tabeli 1**.

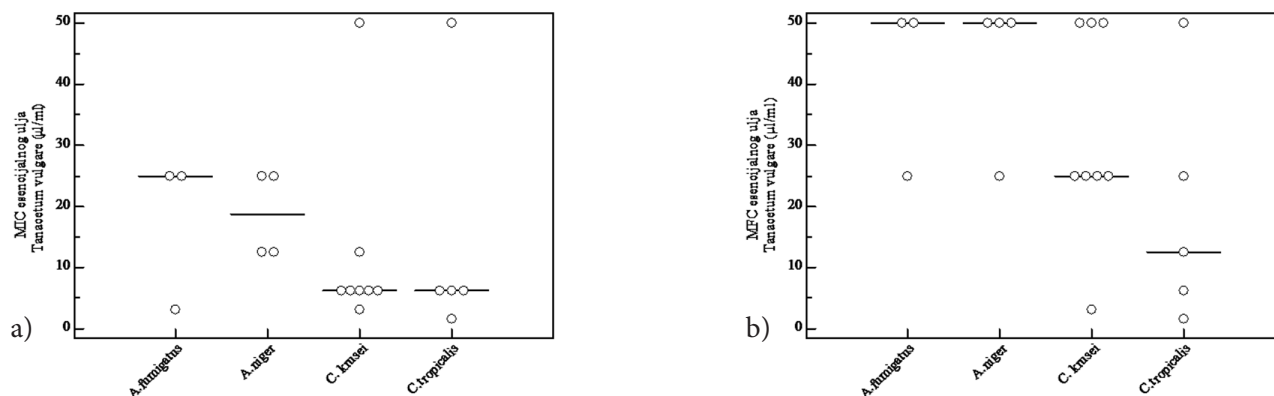
Tabela 1. Rezultati antifungalne aktivnosti ispitivanih esencijalnih ulja na uzročnike otomikoza

Ispitivani sojevi gljiva	<i>Tanacetum vulgare</i>		<i>Leptospermum scoparium</i>		<i>Melissa officinalis</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>A.fumigatus</i>	3,13	50	1,56	6,25	25	25
<i>A.fumigatus</i>	25	25	12,5	>50*	1,56	25
<i>A.fumigatus</i>	25	50	25	>50*	3,13	25
<i>A.niger</i>	25	50	12,5	12,5	3,13	25
<i>A.niger</i>	25	25	25	25	3,13	>50*
<i>A.niger</i>	12,5	50	25	50	1,56	25
<i>A.niger</i>	12,5	50	50	>50*	3,13	50
<i>C.krusei</i>	6,25	50	6,25	50	0,78	3,13
<i>C.krusei</i>	6,25	25	6,25	6,25	1,56	1,56
<i>C.krusei</i>	6,25	25	6,25	12,5	1,56	1,56
<i>C.krusei</i>	12,5	50	50	>50*	3,13	25
<i>C.krusei</i>	6,25	25	6,25	6,25	50	50
<i>C.krusei</i>	3,13	3,13	0,39	1,56	0,78	1,56
<i>C.krusei</i>	6,25	25	0,39	0,39	0,78	0,78
<i>C.krusei</i>	50	50	0,78	25	1,56	1,56
<i>C.tropicalis</i>	6,25	12,5	3,13	12,5	0,78	1,56
<i>C.tropicalis</i>	6,25	6,25	1,56	1,56	25	25
<i>C.tropicalis</i>	50	50	25	25	3,13	3,13
<i>C.tropicalis</i>	1,56	1,56	1,56	1,56	0,39	0,39
<i>C.tropicalis</i>	6,25	25	1,56	50	1,56	3,13

* > od najveće testirane koncentracije



Grafikon 1. Opseg variranja minimalnih inhibitornih (a) i minimalnih fungicidnih (b) koncentracija esencijalnog ulja matičnjaka na uzročnike otomikoza



Grafikon 2. Opseg variranja minimalnih inhibitornih (a) i minimalnih fungicidnih (b) koncentracija esencijalnog ulja vratića na uzročnike otomikoza

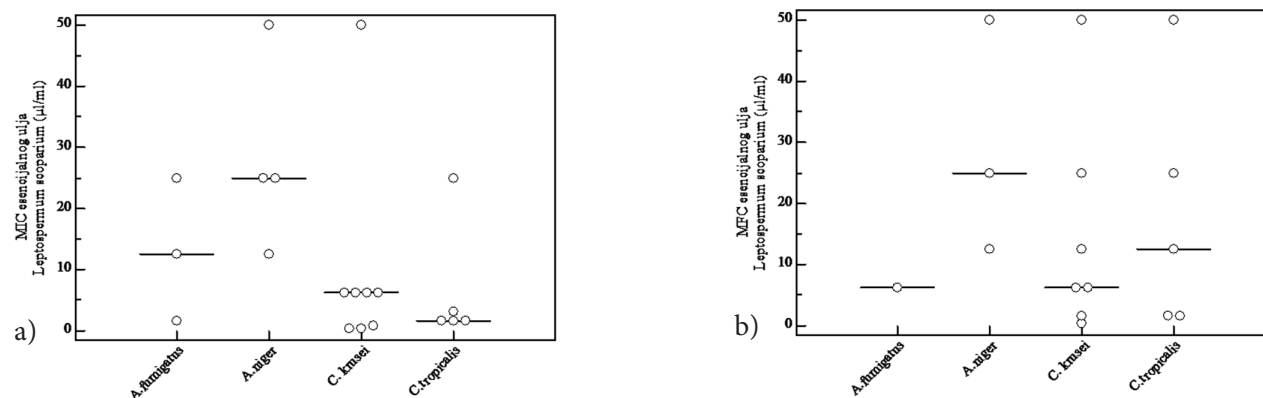
Minimalne inhibitorne koncentracije esencijalnog ulja matičnjaka za ispitivane sojeve nalaze se u opsegu od 0,39 do 50 $\mu\text{L/mL}$, dok se minimalne fungicidne koncentracije nalaze u opsegu 0,78-50 $\mu\text{L/mL}$. U odnosu na vrstu gljivica, esencijalno ulje matičnjaka je najveću aktivnost pokazalo u odnosu na izolate *C. krusei*. Opseg variranja vrednosti MIC i MFC ispitivanih sojeva prikazan je na **grafikonu 1**.

Esencijalno ulje biljke *Tanacetum vulgare* je pokazalo varijaciju MIC vrednosti u intervalima 1,56-50 $\mu\text{L/mL}$, kao i varijacije MFC u istom opsegu. U odnosu na vrstu gljivica, esencijalno ulje matičnjaka je najveću aktivnost

pokazalo u odnosu na izolate *C. tropicalis*. Vrednosti MIC i MFC za ispitivane sojeve prikazane su na **grafikonu 2**.

Minimalne inhibitorne koncentracije vrednosti esencijalnog ulja manuke kretale su se u rasponu od 0,39 do 50 $\mu\text{L/mL}$, kao i vrednosti MFC. Najveću aktivnost ovo ulje je pokazalo prema izolatima *C. krusei*. Vrednosti MIC i MFC ispitivanih sojeva prikazane su na **grafikonu 3**.

Na osnovu konstruisanih kriva kumulativne osetljivosti određivane su vrednosti MIC_{50} , MIC_{90} , MFC_{50} i MFC_{90} ispitivanih esencijalnih ulja na uzročnike otomikoza, što je prikazano u **tabeli 2**.



Grafikon 3. Opseg variranja minimalnih inhibitornih (a) i minimalnih fungicidnih (b) koncentracija esencijalnog ulja manuke na uzročnike otomikoza

Tabela 2. Vrednosti MIC_{50} , MIC_{90} , MFC_{50} i MFC_{90} ispitivanih esencijalnih ulja na uzročnike otomikoza

Esencijalna ulja	Izolati gljivica	MIC_{90}	MFC_{50}	MFC_{90}
<i>Melissa officinalis</i>	<i>Candida</i> spp.	50 $\mu\text{L/mL}$	1,56 $\mu\text{L/mL}$	50 $\mu\text{L/mL}$
	<i>Aspergillus</i> spp.	25 $\mu\text{L/mL}$	25 $\mu\text{L/mL}$	50 $\mu\text{L/mL}$
<i>Tanacetum vulgare</i>	<i>Candida</i> spp.	50 $\mu\text{L/mL}$	25 $\mu\text{L/mL}$	50 $\mu\text{L/mL}$
	<i>Aspergillus</i> spp.	25 $\mu\text{L/mL}$	50 $\mu\text{L/mL}$	50 $\mu\text{L/mL}$
<i>Leptospermum scoparium</i>	<i>Candida</i> spp.	50 $\mu\text{L/mL}$	12,5 $\mu\text{L/mL}$	50 $\mu\text{L/mL}$
	<i>Aspergillus</i> spp.	50 $\mu\text{L/mL}$	12,5 $\mu\text{L/mL}$	50 $\mu\text{L/mL}$

Određivanjem odnosa MFC/MIC ispitivanih esencijalnih ulja utvrđeno je da među ispitivanim izolatima uzročnika otomikoza nisu nađeni tolerantni sojevi na esencijalna ulja vratića i manuke (MFC/MIC = 2-4). Tolerantni sojevi se karakterišu smanjenom osetljivošću na antimikotike, pri čemu je vrednost odnosa MFC/MIC > 16. Samo jedan soj *A. niger* je pokazao toleranciju na esencijalno ulje matičnjaka, pri čemu je vrednost MFC/MIC ovog izolata bila veća od 16. Ostali izolati nisu pokazali toleranciju na ovo ulje jer je MFC/MIC iznosila 2-4.

Diskusija

Mnoge lekovite biljke se već vekovima koriste u tradicionalnoj medicini u lečenju i prevenciji mnogih bolesti. Danas postoji opravdano povećano interesovanje za ispitivanje aktivnosti mnogih biljnih ekstrakata i esencijalnih ulja zbog toksičnih efekata mnogih lekova, rezistencije mikroorganizama, ali i ekonomskih razloga (6). Budući da naši prostori poseduju izuzetno bogatu floru, trebalo bi razmotriti mogućnost intenzivne proizvodnje esencijalnih ulja i njihove veće primene u lečenju različitih infekcija.

Matičnjak je biljka široko rasprostranjena u centralnoj i južnoj Evropi. U Srbiji raste sporadično, ali se gaji kao lekovita sirovina za farmaceutsku industriju. Brojna farmakološka ispitivanja esencijalnog ulja matičnjaka ukazuju na širok spektar dejstva. Esencijalno ulje matičnjaka ispoljava antifungalnu aktivnost u odnosu na brojne patogene: *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp., *Microsporum* spp. (8, 23). Matičnjak poseduje izraziti antioksidativni efekat koji se pripisuje fenolnim komponentama (10). Dokazana je izražena antiholinesterazna aktivnost ovog ulja, što može da koristi u potencijalnom lečenju Alchajmerove bolesti (11). Pokazana je i antitumorska aktivnost na linije humanih malignih ćelija, pri čemu izostaje citotoksični efekat na kontrolnu grupu normalnih ćelijskih kultura (13).

Vratić je rasprostranjen širom evropskog kontinenta, pa i u Srbiji. Dosadašnja istraživanja esencijalnog ulja vratića ukazuju na njegov širok spektar dejstva. U narodnoj srpskoj medicini vratić se koristi kao antihelmintik. Ovo dejstvo je dokazano i ispitivanjem in vitro citotoksičnog efekta esencijalnog ulja na vrstu *Schistosoma mansoni* (20). Pored širokog antimikrobnog dejstva na vrste *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* i *Trichophyton mentagrophytes* (7, 24), utvrđena su i antivirusna svojstva ovog ulja prema tipu 1 Herpes simplex virusa (HSV-1) (21). Neophodna su dodatna ispitivanja stepena resorpcije esencijalnog ulja vratića preko kože i sluzokože, kao i mogućnost terapijske primene, s obzirom na to da je prilikom ispitivanja citotoksičnog efekta na maligne

ćelije ovo ulje pokazalo izraženo citotoksično dejstvo u kontrolnoj grupi normalnih ćelija (25).

Manuka je endemska biljka, poreklom sa Novog Zelanda i jugoistoka Australije. Dosadašnja farmakološka ispitivanja esencijalnog ulja manuke ukazuju na širok spektar dejstva. Dokazani su njegovi antimikrobni i antivirusni efekti na širok spektar patogena: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Malassezia furfur*, *Trichophyton* spp., HSV-1 i HSV-2 (15, 16). Pored toga, odlikuje se izuzetnim antiinflamatornim svojstvima (15), kao i značajnim miorelaksantnim efektom (17). Esencijalno ulje manuke ima široku primenu na Novom Zelandu, u obliku komercijalnih Manex preparata (26).

Gljivična oboljenja predstavljaju veliki problem današnjice zbog sve većeg broja imunokompromitovanih bolesnika sa sistemskim mikoza. Značajan problem predstavljaju i površne mikoze, poput otomikoza koje mogu da dovedu do komplikacija, od kojih je najčešća otitis media.

Derivati azola predstavljaju značajnu grupu antigljivičnih lekova u lečenju otomikoza. Potencijalni neželjeni efekti ove grupe lekova i povećanje broja rezistentnih sojeva uzročnika otomikoza opravdano su povećali interes za ispitivanje antimikotične aktivnosti mnogih biljnih ekstrakata i esencijalnih ulja. Kombinacije esencijalnih ulja i antimikrobnih lekova imaju svoje prednosti: sinergistički ili aditivni efekat i smanjenje toksičnosti i neželjenih reakcija (27).

Rezultati identifikacije uzročnika otomikoza u radu su pokazali da je *Candida* spp. izolovana u 65% slučajeva, dok je *Aspergillus* spp. izolovan u 35 % slučajeva. Ovakav rezultat je donekle očekivan s obzirom na to da su *Aspergillus* spp. i *Candida* spp. najčešći izazivači otomikoza, tj. da se *Candida* spp. najčešće izoluje u okviru umerene klime, dok *Aspergillus* spp. preovladava u toplim klimatskim uslovima (28).

U ovoj studiji je ispitivan relativno mali broj sojeva gljiva, posebno pojedinih vrsta. Rezultati su, međutim, pokazali in vitro osetljivost ispitivanih sojeva na esencijalna ulja ispitivanih biljaka.

Esencijalno ulje biljke matičnjaka pokazalo je značajniju antigljivičnu aktivnost u odnosu na ostala ispitivana ulja kao efikasnije na izolate roda *Candida*, pri čemu je MIC najvećeg broja izolata 0,78 µL/mL i MFC 1,56 µL/mL. Ove vrednosti su znatno niže od vrednosti koje su u svojoj studiji pokazali Mimica-Dukić i saradnici (8). Vrednosti MIC ovog ulja za gljive roda *Aspergillus* su bile nešto više i za najveći broj izolata iznose 3,13 µL/mL, dok vrednosti MFC iznose 25 µL/mL. Ovi rezultati su u korelaciji sa rezultatima pokazanim u sličnim radovima (29, 30). Upoređivanje dobijenih rezultata sa rezultatima iz literature je otežano s obzirom na to da je u većini dru-

gih radova korišćen disk-difuzioni metod koji je manje precizan i ne daje vrednosti MIC i MFC.

Esencijalno ulje vratića se pokazalo efikasnijim prema gljivama iz roda *Candida*, pri čemu je MIC najvećeg broja izolata 6,25 $\mu\text{L/mL}$ i MFC 25 $\mu\text{L/mL}$. Mikulašová (*Mikulášová*) i saradnici su takođe pokazali umerenu antifungalnu aktivnost ovog esencijalnog ulja na gljive iz roda *Candida* (7). Vrednosti MIC ovog ulja za gljive iz roda *Aspergillus* su bile nešto više i za najveći broj izolata iznose 25 $\mu\text{L/mL}$, dok vrednosti MFC iznose 50 $\mu\text{L/mL}$. Naši rezultati su u suprotnosti sa rezultatima studije Džonsa (*Jones*) i saradnika, koji su negirali antifungalnu aktivnost ovog ulja (31).

Esencijalno ulje manuke se, kao i prethodna ulja, pokazalo efikasnijim prema gljivama iz roda *Candida*, pri čemu je MIC najvećeg broja izolata 6,25 $\mu\text{L/mL}$. Vrednosti MFC ovog esencijalnog ulja su izrazito varijabilne i kreću se u opsegu od 0,39 do 50 $\mu\text{L/mL}$. Vrednosti MIC ovog ulja za gljive iz roda *Aspergillus* bile su nešto više i za najveći broj izolata iznose 25 $\mu\text{L/mL}$. Vrednosti MFC za *Aspergillus* u većini slučajeva nije bilo moguće odrediti jer su prevazilazile najveću ispitivanu koncentraciju (>50 $\mu\text{L/mL}$). Slične rezultate su pokazali Čen (*Chen*) i saradnici, kao i Liz-Balkin (*Lis-Balchin*) i saradnici (15, 32).

Značajni su i podaci koji se odnose na tolerantne sojeve gljiva, s obzirom na to da tolerancija mikroorganizama na antimikrobna sredstva predstavlja početni korak ka rezistenciji. U slučaju jednog izolata *A. niger* pokazano je da je MIC esencijalnog ulja matičnjaka 3,13 $\mu\text{L/mL}$, a MFC je bila veća od maksimalne ispitivane koncentracije ovog ulja (> 50 $\mu\text{L/mL}$). Za razliku od ostalih izolata kod kojih odnos MFC/MIC nije bio veći od 2-4, kod pomenutog izolata je odnos MFC/MIC veći od 16, što je kriterijum za procenu tolerancije na antimikrobno sredstvo. Ovakav nalaz ukazuje na postojanje tolerancije ovog soja prema esencijalnom ulju matičnjaka.

Vrednosti MIC ispitivanih esencijalnih ulja koja su delovala inhibitorno na 50%, odnosno 90% ispitivanih sojeva (MIC_{50} i MIC_{90}) za ova dva roda gljiva značajno se razlikuju (**tabela 2**). Razlike u vrednostima MIC_{50} i MIC_{90} za *Candida* spp., u zavisnosti od esencijalnog ulja, razlikuju se za 8-32 puta veću koncentraciju. Iste vrednosti za *Aspergillus* spp. variraju za dvostruku ili četverostruku koncentraciju u zavisnosti od esencijalnog ulja. Ovakav nalaz ukazuje na veliku razliku u osetljivosti pojedinih sojeva gljiva, što bi trebalo da, ukoliko se dokaže odsustvo citotoksičnog efekta esencijalnog ulja na ćelije domaćina, utiče na korišćenje visokih koncentracija ulja u eventualnim preparatima za lečenje otomikoza.

Zapaža se da se vrednosti MFC koncentracija ispitivanih esencijalnih ulja koja su delovala fungicidno na 50%, odnosno 90% ispitivanih sojeva (MFC_{50} i MFC_{90}) ne razlikuju značajno, tj. razlikuju se najviše za dvostruko razblaženje esencijalnih ulja.

Značaj rezultata ovog rada je u karakteristikama korišćenih sojeva gljiva, s obzirom na to da se radi o humanim izolatima, izazivačima infekcije uha, koji su rezistentniji u odnosu na sojeve izolovane iz spoljašnje sredine. Dobijeni rezultati, nažalost, nisu potpuno uporedivi sa rezultatima iz literature, s obzirom na to da se radi o različitim vrstama u okviru roda *Candida*, kao i o relativno malom broju ispitanih sojeva.

Iako se u statističkim razmatranjima određivanje kumulativnih vrednosti MIC_{50} i MIC_{90} , kao i MFC_{50} i MFC_{90} uglavnom smatra reprezentativnim samo ukoliko je ispitivanjem obuhvaćen veliki broj sojeva mikroorganizama ($N > 100$), prikaz rezultata i u ovakvim istraživanjima, gde je obuhvaćen relativno mali broj izolata ($N = 20$), može da bude koristan i ilustrativan.

Zaključak

Ispitivanjem aktivnosti esencijalnih ulja matičnjaka, manuke i vratića na sojeve *Candida* spp. i *Aspergillus* spp., izazivača otomikoza, bujon mikrodilucionom metodom, pokazano je da navedena esencijalna ulja imaju antitigljiivični efekat. Ovakav in vitro rezultat ukazuje na potencijalnu primenu esencijalnih ulja navedenih biljaka u lečenju otomikoza. Sistemska primena ovih supstanci zahteva dodatna ispitivanja, pre svega citotoksičnog efekta.

Literatura

1. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection: Diagnosis and Management: Wiley; 2008.
2. Ho T, Vrabec JT, Yoo D, Coker NJ. Otomycosis: clinical features and treatment implications. Otolaryngology--Head and Neck Surgery. 2006;135:787-91.
3. Prasad SC, Kotigadde S, Shekhar M, Thada ND, Prabhu P et al. Primary Otomycosis in the Indian Subcontinent: Predisposing Factors, Microbiology, and Classification. International Journal of Microbiology. 2014;2014:1-9.
4. Jackman A, Ward R, April M, Bent J. Topical antibiotic induced otomycosis. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. 2005;69:857-60.
5. Kurnatowski P, Filipiak A. Otomycosis: prevalence, clinical symptoms, therapeutic procedure. Mycoses. 2001;44:472-9.
6. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 2008;46:446-75.
7. Mikulašová M, Vavřková Š. Antimicrobial effects of essential oils from *Tanacetum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L., growing in Slovakia. Nova Biotechnol. 2009;9:161-5.
8. Mimica-Dukić N, Bozin B, Soković M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52:2485-9.
9. Bounihi A, Hajjaj G, Alnamer R, Cherrah Y, Zellou A. In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of *Melissa* offi-

- cinalis L. Essential Oil. *Advances in pharmacological sciences*. 2013;2013:1-7.
10. Dastmalchi K, Damien Dorman HJ, Oinonen PP, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*. 2008;41:391-400.
 11. Chaaryana W, Okonogi S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19:836-9.
 12. Queiroz RM, Takiya CM, Guimaraes LP, Rocha Gda G, Alviano DS, Blank AF, et al. Apoptosis-inducing effects of *Melissa officinalis* L. essential oil in glioblastoma multiforme cells. *Cancer investigation*. 2014;32:226-35.
 13. de Sousa AC, Gattass CR, Alviano DS, Alviano CS, Blank AF, Alves PB. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004;56:677-81.
 14. Douglas MH, van Klink JW, Smallfield BM, Perry NB, Anderson RE, Johnstone P, et al. Essential oils from New Zealand manuka: triketone and other chemotypes of *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry*. 2004;65:1255-64.
 15. Chen CC, Yan SH, Yen MY, Wu PF, Liao WT, Huang TS, Wen ZH et al. Investigations of kanuka and manuka essential oils for in vitro treatment of disease and cellular inflammation caused by infectious microorganisms. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2016;49:104-111.
 16. Reichling J, Koch C, Stahl-Biskup E, Sojka C, Schnitzler P. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta medica*. 2005;71:1123-7.
 17. Lis-Balchin M, Hart SL. An Investigation of the Actions of the Essential oils of Manuka (*Leptospermum scoparium*) and Kanuka (*Kunzea ericoides*), Myrtaceae on Guinea-pig Smooth Muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998;50:809-11.
 18. Judzentiene A, Mockute D. The inflorescence and leaf essential oils of *Tanacetum vulgare* L. var. *vulgare* growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2005;33:487-98.
 19. Williams CA, Harborne JB, Geiger H, Hoult JRS. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*. 1999;51:417-23.
 20. Godinho LS, Aleixo de Carvalho LS, Barbosa de Castro CC, Dias MM, Pinto Pde F, Crotti AE, et al. Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:1-9.
 21. Onozato T, Nakamura CV, Cortez DAG, Filho BPD, Ueda-Nakamura T. *Tanacetum vulgare*: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide. *Phytotherapy Research*. 2009;23:791-6.
 22. Tournier H, Schinella G, De Balsa EM, Buschiazzi H, MaÑez S, De Buschiazzi PM. Effect of the Chloroform Extract of *Tanacetum vulgare* and one of its Active Principles, Parthenolide, on Experimental Gastric Ulcer in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1999;51:215-9.
 23. Abdellatif F, Boudjella H, Zitouni A, Hassani A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *EXCLI journal*. 2014;13:772-781.
 24. Inouye S, Uchida K, Abe S. Vapor activity of 72 essential oils against a Trichophyton mentagrophytes. *J Infect Chemother*. 2006;12:210-6.
 25. Rosselli S, Bruno M, Raimondo FM, Spadaro V, Varol M, Koparal AT, et al. Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *siculum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2012;17:8186-95.
 26. Porter NG, Wilkins AL. Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* and *Kunzea ericoides*. *Phytochemistry*. 1999;50:407-15.
 27. Ilic BS, Kocic BD, Ciric VM, Cvetkovic OG, Miladinovic DL. An in vitro synergistic interaction of combinations of *Thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with chloramphenicol. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:1-12.
 28. Lucente FE. Fungal infections of the external ear. *Otolaryngologic clinics of North America*. 1993;26:995-1006.
 29. Aničić N, Dimitrijević S, Ristić M, Petrović S, Petrović S. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Melissa officinalis* L. *Lamiaceae*, *Hem Ind*. 2005; 59: 243-7.
 30. Ertürk Ö. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*. 2006;61:275-8.
 31. Jones NP, Arnason JT, Abou-Zaid M, Akpagana K, Sanchez-Vindas P, Smith ML. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;73:191-8.
 32. Lis-Balchin M, Hart SL, Deans SG. Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka* and *Kunzea ericoides* or *Kanuka*), originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy research : PTR*. 2000;14:623-9.