

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marina I. Jovanović

**ANTIMIKROBNI I CITOTOKSIČNI POTENCIJAL ETANOLNIH
EKSTRAKATA ODABRANIH PREDSTAVNIKA PODFAMILIJE
POLYGONOIDEAE I NJIHOV EFEKAT U KOMBINACIJI SA
STREPTOMICINOM I DOKSORUBICINOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marina I. Jovanović

**EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC
POTENTIAL OF ETHANOL EXTRACTS ISOLATED FROM
SELECTED PLANTS OF POLYGONOIDEAE SUBFAMILY
AND THEIR EFFECT IN COMBINATION WITH
STREPTOMYCIN AND DOXORUBICIN**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

MENTOR:

dr Dragana Mitić Čulafić
viši naučni saradnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Biljana Nikolić
vanredni profesor, Biološki fakultet Univerzitet u Beogradu
dr Tatjana Srđić Rajić
naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije
dr Nebojša Jasnić
vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
dr Emilija Svirčev
docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: _____ 2020. godine

Istraživanje za ovu doktorsku disertaciju rađeno je na Katedri za mikrobiologiju, Katedri za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Departmanu za fiziologiju životinja, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Takođe, deo istraživanja je sproveden u eksperimentalnoj laboratoriji Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” i Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Koristim ovu priliku da se zahvalim svima onima koji su dali doprinos izradi ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mojoj mentorki dr Dragani Mitić Čulafić na usmerenju prilikom odabira teme, posvećenom vremenu prilikom realizacije ovog rada, svim razgovorima i na svemu što sam od nje naučila.

prof. dr Biljani Nikolić hvala na ispravkama teksta kojim je doprinela uobličavanju ove doktorske disertacije i publikacija koje su proistekle iz ovog istraživanja, kao i savetima vezanim za naučni rad.

Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Knežević Vukčević, prof. dr Branki Vuković Gačić i prof. dr Slaviši Stanković čijim su zalaganjem mikrobiološka i genotoksikološka laboratorija adekvatno opremljene, a time i omogućen kvalitetan rad u ispitivanju bioloških efekata kako na ćelijskim linijama, tako i na bakterijskim kulturama.

Dr Tatjani Srđić Rajić i dr Nebojši Jasniću najiskrenije hvala na ukazanoj pomoći u eksperimentalnom delu i savetima u kom smeru treba da ide ovo doktorsko istraživanje.

Dr Emiliji Svirčev se zahvaljujem na obezbeđenom polaznom materijalu, uzorcima biljnih ekstrakata kao i sugestijama iz oblasti fitohemije i prijateljskom stavu.

Dr Ivani Morić, dr Aleksandru Paviću i dr Tatjani Stević hvala na ukazanoj pomoći u eksperimentalnom radu, svim sugestijama i saradnji.

Hvala ti Dina Tenji na svim stručnim savetima i predivnoj saradnji. Doći ću ja po još.

Svim mikrosima hvala; Bojani Vasilijević i dr Stoimiru Kolareviću, dragim kolegama i vrsnim stručnjacima, hvala na divnoj saradnji i izuzetnoj pomoći u svim fazama moga rada na fakultetu. Hvala Stefani Cvetković, Stefani Đukanović, dr Jovani Kostić-Vuković, dr Karolini Sunjog, dr Tamari Janakijev, dr Olji Stanojević, dr Ivici Dimkiću, dr Ivanu Nikoliću, Jeleni Đorđević, Jovani Jovanović Marić, Aleksandri Jelušić, Tamari Pavlović i Nini Tomić na prijateljskom stavu i ukazanoj pomoći tokom rada na katedri.

Aleksandri Belovanović, Mariji Biorac i Dejani Bokun hvala na pomoći u eksperimentalnom radu.

Veliko hvala kolegama sa Instituta za opštu i fizičku hemiju na motivaciji, savetima i podršci tokom pisanja ove teze. Najlepše hvala dr Stanislavi Gorjanović, dr Sanji Ostojić, dr Snežani Zlatanović, dr Mariji Petrović i dr Stevanu Blagojeviću.

Na velikoj životnoj podršci tokom pisanja teze i bavljenja naukom hvala Nini Tomić, Nataši Orozović, Vladimiru Koraću i svim članovima porodica Rajić i Jovanović.

Neizmerno ti hvala na svemu Nemanja Jovanović, ovaj doktorat je posvećen tebi.

Izvod

Antimikrobni i citotoksični potencijal etanolnih ekstrakata odabranih predstavnika podfamilije Polygonoideae i njihov efekat u kombinaciji sa streptomycinom i doksorubicinom

Za ispitivanje antimikrobnog i citotoksičnog efekta odabrano je 8 biljaka podfamilije Polygonoideae od kojih je napravljeno 12 etanolnih ekstrakata, od herbi (h) i rizoma (r): *Polygonum aviculare* (POAh, POAr), *Polygonum maritimum* (POMh), *Persicaria amphibia* (PEAh), *Persicaria maculosa* (PEMh), *Persicaria lapathifolia* (PELh, PELr), *Persicaria hydropiper* (PEHh, PEHr), *Bistorta officinalis* (BIOh, BIOR) i *Fagopyrum esculentum* (FAEh). Svi testirani ekstrakti ispoljavaju umerenu antifungalnu aktivnost, a POAh, POMh, PEAh, POAr, PEHr i BIOR dovode do obezbojavanja konidija. Antibakterijski efekat je testiran prema većem broju G⁺ i G⁻ bakterija pri čemu je BIOR pokazao najpotentnije antimikrobno dejstvo. BIOR i PEMh pokazuju značajan antibiofilm i antiquorum sensing efekat prema medicinski važnom patogenu *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i to preko modulacije aktivnosti LasR receptora. Ovi ekstrakti i njihovi aktivni konstituenti, hinska i hlorigenska kiselina, katehin i kvercetin-3-O-glukozid, inhibiraju sintezu violaceina kod *Chromobacterium violaceum*. U kombinaciji sa streptomycinom BIOR ostvaruje različite tipove interakcija: antagonistički, indiferentni, aditivni i sinergistički. Prilikom testiranja citotoksičnosti odabranih ekstrakata i doksorubicina (D) uočen je sinergizam između *P. aviculare* i D na ćelijama hepatocelularnog adenokarcinoma (HepG2) i plućnog adenokarcinoma (A549). Takođe, sinergizam između *P. amphibia* i D je detektovan na A549 ćelijama. Sinergistički efekat se ostvaruje preko sledećih procesa: uvođenje ćelija u apoptozu, zaustavljanje ćelijskog ciklusa, modelovanje aktivnosti antioksidativnih enzima i Keap1-Nrf2 signalnog puta. Na normalnim ćelijama fibroblasta pluća (MRC-5) *P. aviculare* i D, *P. amphibia* i D kao i *P. maculosa* i D ostvaruju antagonizam. Odsustvo toksičnosti PEMh i BIOR u nižim dozama, potvrđeno je *in vivo* testom na modelu *Danio rerio*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija, Genotoksikologija

Ključne reči: Polygonoideae, antimikrobni efekat, antibiofilm efekat, quorum sensing, *Danio rerio*, doksorubicin, apoptoza, zaustavljanje ćelijskog ciklusa, antioksidativni enzimi, Keap1-Nrf2 signalni put

Abstract

Evaluation of antimicrobial and cytotoxic potential of ethanol extracts isolated from selected plants of Polygonoideae subfamily and their effect in combination with streptomycin and doxorubicin

In order to test the chemotherapeutic and antimicrobial potential, 8 plants of the subfamily Polygonoideae were selected and 12 ethanol extracts were made. Herb (h) and rhizome (r) extracts were obtained from: *Polygonum aviculare* (POAh, POAr), *Polygonum maritimum* (POMh), *Persicaria amphibia* (PEAh), *Persicaria maculosa* (PEMh), *Persicaria lapathifolia* (PELh, PELr), *Persicaria hydropiper* (PEHh, PEHr), *Bistorta officinalis* (BIOh, BIOR) and *Fagopyrum esculentum* (FAEh). All tested extracts moderately inhibited the growth of selected fungi. POAh, POMh, PEAh, POAr, PEHr and BIOR leads to discoloration of conidia. Antibacterial activity on different Gram positive and Gram negative strains has been evaluated. BIOR showed the most potent antibacterial activity. Also, BIOR and PEMh exhibited significant antibiofilm and quorum sensing effects against medically important pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, through the modulation of LasR receptor activity. Both extracts as well as their active constituents, chicnic acid, chlorogenic acid, catechin and quercetin-3-*O*-glucoside, inhibited violacein synthesis in *Chromobacterium violaceum*. The BIOR engaged in various interactions with streptomycin: synergic, additive, indifferent and antagonistic. Cytotoxicity testing of selected extracts and doxorubicin (D) revealed a synergistic relationship between *P. aviculare* and D, in hepatocellular adenocarcinoma (HepG2) and pulmonary adenocarcinoma cells (A549). Also, synergism between *P. amphibia* and D, was detected on A549 cells. The observed synergisms could be linked to the interference with apoptosis, cell cycle, antioxidant enzymes expression and Keap1-Nrf2 pathway. On normal lung fibroblast cells (MRC-5) *P. aviculare* and D, *P. amphibia* and D as well as *P. maculosa* and D exerts an antagonistic effect. *In vivo* assay on the *Danio rerio* model shows no signs of toxicity at lower tested concentrations for PEMh and BIOR.

Research field: Biology

Specific research field: Microbiology, Genotoxicology

Key words: Polygonoideae, antimicrobial effect, antibiofilm effect, quorum sensing, *Danio rerio*, doxorubicin, apoptosis, cell cycle arrest, antioxidative enzymes, Keap1-Nrf2 signaling pathway

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu:

3-okso-C12-HSL-N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton

7-AAD - aminoaktinomicin D

AHL - N-acil-L-homoserin lakton

ARE - antioksidativni responsivni elementi

ATCC kolekcije - eng. American Type Culture Collection

Bcl 2 eng. B-cell leukemia/lymphoma 2

BIK- biofilm inhibitorna koncentracija

BIOh - ekstrakt herbe *Bistorta officinalis*

BIOr - ekstrakt rizoma *Bistorta officinalis*

BSA - eng. bovine serum albumin

BTB - eng. Bric a Brac; domen Keap1 proteina

C4-HSL - N-butiril-L-homoserin lakton

CAD - eng. caspase-activated DNase

CDK - ciklin zavisna kinaza

Ct - eng. the cycle threshold

D - doksorubicin

DGR - eng. double-glycine repeat - dupli-glicinski ponovci

DHN - dihidroksinaftalen

DMSO - dimetil sulfoksid

D_{PEAD} - Pojedinačno primenjen doksorubicin u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa ekstraktom herbe *P. amphibia*, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija

D_{PEMD} - Pojedinačno primenjen doksorubicin u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa ekstraktom herbe *P. maculosa*, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija

D_{POAD} - Pojedinačno primenjen doksorubicin u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa ekstraktom herbe *P. aviculare*, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija

D_{POMD} - Pojedinačno primenjen doksorubicin u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa ekstraktom herbe *P. maritimum*, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija

EC₅₀ - doza koja izaziva malformacije kod 50% embriona

ECACC kolekcije - eng. The European Collection of Authenticated Cell Cultures

ECL - eng. enhanced chemiluminescence

EC-SOD - ekstracelularna superoksid dismutaza

EPS - ekstracelularne polimerne supstance

FAEh - ekstrakt herbe *Fagopyrum esculentum*

FICI- indeks frakcione inhibitorne koncentracije

GK - galna kiselina

HHQ - 2-heptil-4-hinolon

HK - hlorogenska kiselina

HLL - N-heksanoil-L-homoserin lakton

HO-1 - hem oksigenaza

K-3-O-Glk - kvercetin-3-O-glukozid

Ka - katehin

KAT - katalaza

Keap1 - eng. Kelch-like ECH associated protein 1

KK – eng. quinic acid - hinska kiselina

LC₅₀ - letalna doza koja izaziva 50% smrtnosti embriona

Maf - eng. musculo aponeurotic fibrosarcoma
MBK - minimalna baktericidna koncentracija
MIK - minimalna inhibitorna koncentracija
MvfR - eng. multiple virulence factor regulator; sin. PqsR
Nrf2 - eng. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PEAD - Kombinovani tretman herbe *P. amphibia* i doksorubicina
PEAh - ekstrakt herbe *Persicaria amphibia*
PEAh_{PEAD} - Pojedinačno primenjen ekstrakt herbe *P. amphibia* u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa doksorubicinom, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija
PEHh - ekstrakt herbe *Persicaria hydropiper*
PEHr - ekstrakt rizoma *Persicaria hydropiper*
PELh - ekstrakt herbe *Persicaria laphatifolia*
PELr - ekstrakt rizoma *Persicaria laphatifolia*
PEMD - Kombinovani tretman herbe *P. maculosa* i doksorubicina
PEMh - ekstrakt herbe *Persicaria maculosa*
PEMh_{PEMD} - Pojedinačno primenjen ekstrakt herbe *P. maculosa* u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa doksorubicinom, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija
PI - propidijum jodid
POAD - Kombinovani tretman herbe *P. aviculare* i doksorubicina
POAh - ekstrakt herbe *Polygonum aviculare*
POAh_{POAD} – Pojedinačno primenjen ekstrakt herbe *P. aviculare* u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa doksorubicinom, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija
POAr - ekstrakt rizoma *Polygonum aviculare*
POMD - Kombinovani tretman herbe *P. maritimum* i doksorubicina
POMh - ekstrakt herbe *Polygonum maritimum*
POMh_{POMD} - Pojedinačno primenjen ekstrakt herbe *P. maritimum* u koncentraciji koja je korišćena i u kotretmanu sa doksorubicinom, pri čemu je navedenim kotretmanom postignuto 50% preživljavanja ćelija
PQS - eng. Pseudomonas Quinolone Signal
PVDF - polivinildifluoridna membrana
QQ – quorum quenching
QS - quorum sensing
ROS - eng. reactive oxygen species - reaktivne kiseonične vrste
RU – rutin, kvercetin-3-*O*-rutinozid
SDS PAGE - natrijumdodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza
SOD - superoksid dismutaza
SOD1 - Cu/Zn-SOD
SOD2 - Mn-SOD
spf - sati posle fertilizacije
Str - streptomycin
SZO - Svetska Zdravstvena Organizacija

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Upotreba biljaka i njihovih derivata.....	1
1.2. Podfamilija Polygonoideae.....	2
1.3. Primena odabranih vrsta iz podfamilije Polygonoideae.....	5
1.4. Hemijski sastav odabranih predstavnika podfamilije Polygonoideae.....	9
1.5. Oportunistički patogeni i kontaminanti hrane.....	10
1.6. Pigmenti kao faktori patogenosti.....	12
1.7. Biofilm.....	12
1.7.1. Definicija i svojstva biofilma.....	12
1.7.2. Formiranje biofilma.....	13
1.7.3. Degradacija biofilma.....	13
1.7.4. Komunikacija bakterija u biofilmu (QS signalizacija).....	14
1.8. Antimikrobni agensi biljnog porekla.....	17
1.9. Antikancerski agensi prirodnog porekla i principi njihovog delovanja.....	17
1.10. Doksorubicin.....	18
1.11. Apoptoza.....	19
1.12. Ćelijski ciklus.....	19
1.13. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita.....	20
1.14. Regulacija antioksidativne zaštite Keap1-Nrf2 signalnim putem.....	21
1.15. Bezbednost primene biljnih ekstrakta.....	24
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	26
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1. Materijal.....	27
3.1.1. Biljni ekstrakti.....	27
3.1.2. Mikroorganizmi.....	27
3.1.3. Ćelijske kulture.....	28
3.1.4. Podloge i rastvori za rad sa mikroorganizmima.....	29
3.1.5. Podloge i reagensi za gajenje humanih ćelija.....	30
3.1.6. Odabrani citostatik korišćen u tretmanima humanih ćelija.....	31

3.1.7.	Odabrani antibiotik korišćen u tretmanima mikroorganizama	31
3.1.8.	Prajmeri za qRT-PCR	31
3.1.9.	Antitela upotrebljivana u imunoblotu	32
3.2.	Metode.....	32
3.2.1.	Priprema mikromiceta.....	32
3.2.2.	Procena inhibicije rasta mikromiceta.....	32
3.2.3.	Praćenje morfoloških promena spora gljiva konfokalnom mikroskopijom.....	33
3.2.4.	Priprema prekonoćnih bakterijskih kultura.....	33
3.2.5.	Mikrodilucioni testovi.....	33
3.2.5.1.	Priprema bakterija za mikrodilucione testove.....	34
3.2.5.2.	Određivanja minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije.....	34
3.2.5.3.	Evaluacija uticaja ekstrakta i Str u kombinaciji metodom šahovske table (eng. checkerboard assay)	34
3.2.6.	Procena uticaja ekstrakta na formiranje biofilma	35
3.2.7.	Procena uticaja ekstrakata na već formirani biofilm.....	35
3.2.8.	QS testovi.....	36
3.2.8.1.	Test produkcije violaceina <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026.....	36
3.2.8.2.	Test produkcije piocijanina.....	36
3.2.8.3.	Test pokretljivosti <i>P. aeruginosa</i> PAO1	36
3.2.8.4.	Test interferencije ekstrakata sa QS signalnim putevima	36
3.2.9.	Priprema kulture humanih ćelija	37
3.2.10.	Pasažiranje kulture humanih ćelija	37
3.2.11.	Procena broja vijabilnih ćelija.....	37
3.2.12.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti <i>in vitro</i>	37
3.2.13.	Utvrđivanje tipa interakcije test supstanci u kombinaciji na odabranim ćelijskim linijama	38
3.2.14.	Protočna citometrija	38
3.2.14.1.	Priprema ćelija za ispitivanje tipa ćelijske smrti i analize ćelijskog ciklusa	38
3.2.14.2.	Određivanje tipa ćelijske smrti	38
3.2.14.3.	Ispitivanje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.....	39
3.2.15.	Ispitivanje uticaja i mehanizma delovanja testiranih ekstrakata na produkciju antioksidativnih enzima u humanim ćelijama <i>in vitro</i>	39
3.2.15.1.	Priprema ćelijskih lizata.....	39

3.2.15.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Loriju (eng. Lowry).....	39
3.2.15.3. Ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima imunoblot tehnikom	40
3.2.16. Ispitivanje regulacije genske ekspresije qRT-PCR metodom.....	41
3.2.17. Procena toksičnosti ekstrakata na embrionalnom modelu zebrica (<i>Danio rerio</i>).....	41
3.2.17.1. Uslovi uzgoja <i>Danio rerio</i>	41
3.2.17.2. Evaluacija toksičnosti	42
3.2.18. Statistička analiza.....	43
4. REZULTATI	44
4.1. Antimikrobni efekti odabranih ekstrakata.....	44
4.1.1. Antifungalni efekti odabranih ekstrakata.....	44
4.1.1.1. Procena inhibicije rasta mikromiceta nakon tretmana odabranim ekstraktima	44
4.1.1.2. Praćenje morfoloških promena spora gljiva konfokalnom mikroskopijom.....	45
4.1.2. Antibakterijski efekti odabranih biljnih ekstrakata	45
4.1.2.1. Određivanje minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije odabranih ekstrakata mikrodilucionim esejima.....	45
4.1.2.2. Kombinovani efekat BIOR ekstrakta i komercijalnog antibiotika Str	48
4.1.2.3. Antibiofilm i antivirulentna aktivnost biljnih ekstrakata	49
4.1.2.3.1. Produkcija violaceina <i>C. violaceum</i> CV026 nakon tretmana sa odabranim ekstraktima	50
4.1.2.3.2. Efekat ekstrakta PEMh, BIOR na formiranje biofilma sojeva <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 i <i>P. aeruginosa</i> PAO1	50
4.1.2.3.3. Efekat ekstrakta BIOR na redukciju broja bakterija u preformiranoj biofilm zajednici sojeva <i>S. aureus</i> ATCC 25923 i <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	51
4.1.2.3.4. Efekat PEMh i BIOR ekstrakta na produkciju piocijanina <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	52
4.1.2.3.5. Efekat ekstrakta PEMh i BIOR na pokretljivost <i>P. aeruginosa</i> PAO1	53
4.1.2.3.6. Uticaj PEMh i BIOR ekstrakata na QS međubakterijsku komunikaciju.....	53
4.1.2.3.7. Produkcija violaceina <i>C. violaceum</i> CV026 nakon tretmana sa dominantnim konstituentima ekstrakata.....	54
4.1.2.3.8. Efekat dominantnih konstituenata ekstrakta na formiranje biofilma soja <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	54
4.1.2.3.9. Uticaj dominantnih konstituenata ekstrakata na QS međubakterijsku komunikaciju..	55
4.2. Efekt POAh, POMh, PEAh i PEMh ekstrakata i njihova interakcija sa D na humanim ćelijama različitih karcinoma u <i>in vitro</i> uslovima.....	56
4.2.1. Citotoksična aktivnost biljnih ekstrakata pojedinačno i u kombinaciji sa D <i>in vitro</i>	56
4.2.2. Analize uticaja POAh, POMh, PEAh i PEMh ekstrakata protočnom citometrijom.....	64

4.2.2.1. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane ispitivanim ekstraktima na ćelijskim linijama različitih humanih karcinoma.....	64
4.2.2.1.1. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane ispitivanim ekstraktima na HepG2 ćelijskoj liniji	64
4.2.2.1.2. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane ispitivanim ekstraktima na A549 ćelijskoj liniji	67
4.2.2.1.3. Analiza tipa ćelijske smrti na MRC-5 ćelijskoj liniji	69
4.2.2.2. Uticaj biljnih ekstrakata na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.....	71
4.2.2.2.1. Uticaj POAh, POMh, PEAh i PEMh ekstrakata i D na ćelijski ciklus HepG2 ćelija	71
4.2.2.2.2. Uticaj POAh, PEAh i PEMh ekstrakata i D na ćelijski ciklus A549 ćelija.....	74
4.2.2.2.3. Uticaj POAh, PEAh i PEMh ekstrakata i D na ćelijski ciklus MRC-5 ćelija	76
4.2.3. Uticaj biljnih ekstrakata na aktivnost enzima antioksidativne zaštite.....	78
4.2.4. Uticaj biljnih ekstrakata na regulaciju ekspresije Nrf2 i Keap1 gena.....	81
4.2.5. Procena toksičnosti ekstrakta na embrionalnom modelu zebrića (<i>Danio rerio</i>).....	83
5. DISKUSIJA	85
5.1. Antimikrobni efekti	85
5.2. Citotoksičnost odabranih ekstrakata.....	92
5.3. Bezbednost primene ekstrakata	96
5.4. Dalje perspektive istraživanja odabranih predstavnika podfamilije Polygonoideae baziranim na predstavljenim rezultatima disertacije.....	96
6. ZAKLJUČCI.....	98
7. LITERATURA	100
8. PRILOG	115
8.1. PRILOG 1. Podaci o biljnom materijalu, ekstrakciji i hemijskoj karakterizaciji ekstrakata .	115
8.2. PRILOG 2. Podaci antibiofilm i antivirulentnog efekta.....	119
8.3. PRILOG 3. Podaci praćenja nivoa antioksidativnih enzima i mehanizma genske regulacije	121

1. UVOD

1.1. Upotreba biljaka i njihovih derivata

Pronalaženje, poznavanje i primena lekova oblikovala je značajan deo istorije čovečanstva, pri čemu su biljke kao lekovite sirovine dugo vremena predstavljale nezamenljive i gotovo jedine dostupne medikamente. Osim toga, biološki posmatrano upotreba biljaka sa ulogom lečenja nije karakteristična samo za ljudsku vrstu nego se uočava i kod životinja poput *Pan troglodytes schweinfurthii* (vrsti šimpanza), koja koristi lišće *Aspilia rudis* u lečenju stomaćnih bakterijskih infekcija (Agosta, 1997). Takođe, tradicionalni pristup primene biljaka od medicinskog značaja nije vezana samo za daleku prošlost već je i danas veoma zastupljen. Svetska Zdravstvena Organizacija (SZO) ističe da biljke kao primarni tretman u lečenju koristi 80% celokupnog stanovništva. U azijskim zemljama, Ajurveda, tradicionalna kineska medicina, Unani i Kampo i dalje imaju dominantan uticaj u zdravstvenoj nezi (Ghosh i sar., 2010).¹ Alternativna medicina Afrike i Latinske Amerike, kao i narodna medicina Evrope takođe predstavljaju prvobitni pristup lečenja različitih oboljenja (Lewis i Elvin-Lewis, 2003; Shikov i sar., 2014). Takođe, i u Balkanskim zemljama korišćenje lekovitog bilja kao terapijskog i profilaktičkog sredstva ima neprekidanu tradiciju od davnina do danas (Tucakov, 2014).

Iako etnofarmakološka upotreba biljaka često može poslužiti kao osnova odabira biljnih vrsta za dalja *in vitro* i *in vivo* biološka ispitivanja (Lewis i Elvin-Lewis, 2003), dobijanju finalnog leka biljnog porekla i njegovoj primeni u zvaničnoj medicini prethodi dug vremenski period testiranja efikasnosti i toksičnosti standardnim testovima kojima se testiraju i konvencionalni lekovi. Razliku u kriterijumima upotrebe biljnih lekova tradicionalne i moderne medicine najbolje ilustruje primena „Stivensovog leka” čija je dostupnost u savremenoj evropskoj farmaciji omogućena posle detaljne hemijske i biološke karakterizacije komponenata leka (različitih *Pelagrum* vrsta) i dugogodišnjih kliničkih studija dr Šeheja (eng. dr Schehaye, Ženevski Univerzitet, Švajcarska). Pre navedenog, predlog Čarlsa Henri Stivenisa o upotrebi tradicionalnog leka južno afričkog plemena Zulu protiv tuberkuloze u oficijelnoj medicini rezultirao je rigoroznim neodobravanjem (Bladt i Wagner, 2007).

Pored upotrebe biljnih droga u sirovom obliku, u medicinske svrhe, takođe se koriste njihove pojedinačne aktivne komponente. Prema podacima SZO, na tržištu farmaceutskih medikamenata oko 25% od ukupnog prometa ostvaruju lekovi koji potiču od biljaka, odnosno 121 izolovane aktivne komponente. Kao primer navedenog ističe se upotreba komercijalnih citostatika vinblastina i vinkristina prvi put izolovanih iz *Catharanthus roseus*, endemične madagaskarske biljke (Yuan i sar., 2016; Leonti i sar., 2017). Nadalje, značajan broj sintetskih lekova osmišljen je po modelu opisanih aktivnih komponenti biljnog porekla. Jedan od najistaknutijih primera navedenog je otkriće aspirina, *O*-acetilsalicilne kiseline, dobijene po uzoru na salicin iz *Salix albe* i aktivnih biljnih komponenti na bazi salicilne kiseline (Agosta, 1997).

Istraživanja agensa prirodnog porekla sa ciljem pronalaska novih i još efikasnijih medikamenata predstavlja i dalje prisutan trend svetske naučne javnosti. Navedeno je naročito opravdano pojavom umanjenog terapijskog efekta konvencionalnih lekova pri dužoj upotrebi, kao i oslabljenom efikasnošću komercijalnih antibiotika i hemioterapeutika koja je izazvana rastućom rezistencijom patogenih bakterija i ćelija kancera (Rai i Kon, 2013; Huang i sar., 2014; Pavić i sar., 2019). Nadalje, smatra se da prirodne agense poput biljnih ekstrakata, odlikuje veća selektivnost prilikom delovanja. Tokom tretmana onkoloških oboljenja, potrebno je narušiti funkcionalnost malignih ćelija bez remećenja funkcionalnosti okolnih zdravih ćelija, dok lečenje infekcija lekom dobre selektivnosti rezultira u očuvanju mikrobioma, čime se pospešuje odbrambeni potencijal samog organizma. Jedan od pristupa

¹ Ajurveda, Unani i Kampo predstavljaju narodnu Indijsku, Islamsku i Japansku medicinu, respektivno.

pospešivanja delovanja komercijalnih lekova je korišćenjem prirodnih agensa kao adjuvanasa u kombinovanoj terapiji.

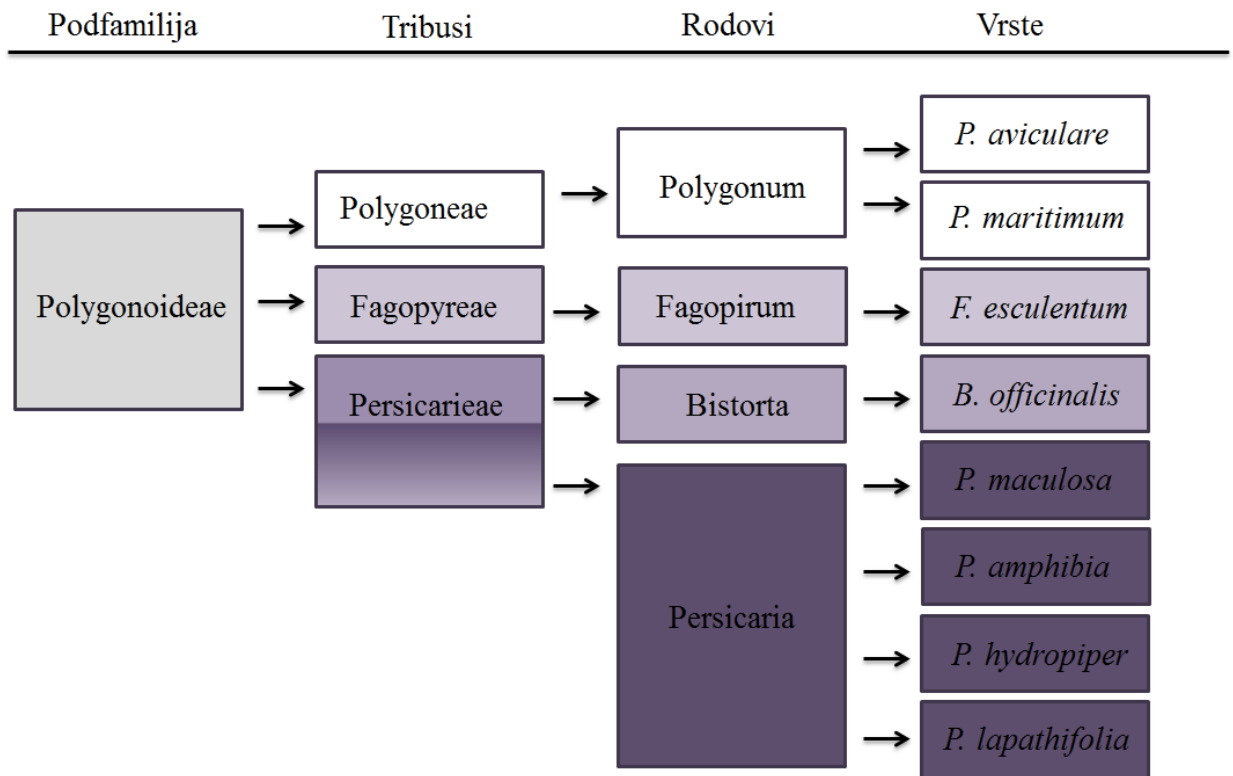
Pored nespornog značaja za farmaceutsku industriju, biljni proizvodi, usled antimikrobnog dejstva, nalaze primenu i u poljoprivrednim delatnostima. Usled podložnosti biljaka gljivičnim infekcijama, u poljoprivredi raste potreba za pronalaženjem prirodnih agenasa, umesto sintetičkih, što je u skladu sa aspektima danas popularne ekološke proizvodnje i zaštite životne sredine (Badillo i sar., 2008). Takođe, ističe se i upotreba lekovitih biljaka u prehrambenoj industriji u proizvodnji funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava ispoljava i određene benefitne efekte na ljudsko zdravlje kroz prevenciju nastanka oboljenja.

Biljno carstvo je izuzetno bogatog diverziteta, po brojnosti i vrstama, pri čemu je prema bioaktivnostima okarakterisan veoma mali procenat biljaka (Yuan i sar., 2016). Kako je i u Srbiji flora veoma raznovrsna, a narodna medicina naše zemlje zasnovana na upotrebi oko 700 biljnih vrsta, od čega je 420 zvanično registrovano kao lekovite biljke, ispitivanje biološke aktivnosti do sada neispitanih biljnih vrsta sa naših područja je od izuzetnog naučnog i praktičnog značaja (Jarić i sar., 2018).

1.2. Podfamilija Polygonoideae

Podfamilija Polygonoideae zajedno sa Eriogonoideae i Symmerioideae se nalazi u okviru familije Polygonaceae. Kako je sama familija Polygonaceae izuzetno raznolika, obuhvata oko 1200 eurivalentnih vrsta klasifikovanih u oko 50 rodova, veoma često se u literaturi ističe problem precizne taksonomske klasifikacije. Rodovi podfamilije Polygonoideae: *Polygonum*, *Fagopyrum*, *Bistorta* i *Persicaria* su dominantni prema brojnosti vrsta i rasprostranjenju u florama mnogih zemalja, a naročino na severnoj hemisferi (Sanchez i sar., 2011; Burke i Sanchez, 2011; Galasso i sar., 2009). Na **Slici 1.** predstavljena je klasifikacija sledećih odabranih vrsta podfamilije Polygonoideae: *Polygonum aviculare*, *Polygonum maritimum*, *Persicaria amphibia* (sin. *Polygonum amphibium*), *Persicaria maculosa* (sin. *Polygonum persicaria*), *Persicaria lapathifolia* (sin. *Polygonum lapathifolium*), *Persicaria hydropiper* (sin. *Polygonum hydropiper*), *Bistorta officinalis* (sin. *Polygonum bistorta*) i *Fagopyrum esculentum* (sin. *Polygonum fagopyrum*). Klasifikacija je preuzeta iz studija Galasso i sar. (2009) i De Craene i sar. (2004). Značajne zajedničke botaničke karakteristike selektovanih vrsta podfamilije Polygonoideae ukazuju na prisustvo ohree² i vrstu ploda orašice. Odabrani predstavnici su zeljaste jednogodišnje ili višegodišnje biljke (**Slika 2**).

² Ohrea predstavlja modifikovane lisne zalistke (sin. stipule). Izgleda kao prozirni omotač u podnožju lista koji je cevasto postavljen oko stabljike (Cartron i sar., 2008).



Slika 1. Klasifikacija odabranih vrsta podfamilije Polygonoideae preuzeta iz studije Galasso i sar. (2009). Usled odsustva podataka o *P. maritimum* u studiji Galasso i sar. (2009) za ovu vrstu predstavljena je klasifikacija predložena od strane De Craene i sar. (2004).



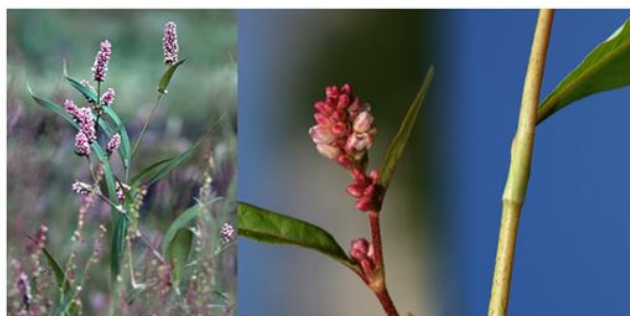
Polygonum aviculare L. 1753



Polygonum maritimum L. 1753



Persicaria amphibia (L.) Delarbre 1800



Persicaria maculosa S. F. Gray 1822



Persicaria hydropiper (L.) Delarbre 1800



Persicaria lapathifolia (L.) Delarbre 1800



Bistorta officinalis Delarbre 1800



Fagopyrum esculentum Moench 1794

Slika 2. Odabrane vrste podfamilije Polygonoideae.

1.3. Primena odabranih vrsta iz podfamilije Polygonoideae

Biljke iz podfamilije Polygonoideae upotrebljavaju se u ishrani ljudi i životinja, pri čemu mnoge od njih ostvaruju blagotvorne efekte na zdravlje korisnika (Nkuété i sar., 2015). U kulinarstvu pronalaze primenu kao začini i salate. Nadalje, nadzemni delovi biljaka mogu se kuvati, pri čemu predstavljaju sastojke za predjela, gulaše i čorbe, a mogu se i prerađivati do brašna od kojeg se priprema slano i slatko pecivo. Pojedine su medonosne biljke. Ove biljke se primenjuju za dobijanje različitih napitaka poput: čaja, bezalkoholnih pića i piva. Usled lekovitih svojstava koriste se kao funkcionalna hrana i narodni lekovi. Zbog velike geografske rasprostranjenosti u tradicionalnim medicinama Azije, Evrope i Amerike veoma često su u upotrebi vrste poput *P. aviculare*, *P. hydropiper* i *B. officinalis* (Lajter i sar., 2013). Za biljke sa terapijskim značajem je često karakteristična upotreba u formi biljnih mešavina ili sirovih ekstrakata, koji se mogu dobiti od nadzemnih delova biljaka kao i od korena i rizoma. Kako danas više ne postoji limitirana razmena informacija između različitih kontinenata, u veoma različitim kulturama često su zabeležene slične namene, koje uključuju kulinarsku i etnofarmakološku upotrebu, jedne biljne vrste (**Tabela 1-3**).

Tabela 1. Primena odabranih predstavnika Polygonoideae u tradicionalnoj medicini

Biljna vrsta	Primena u tradicionalnoj medicini	Literatura
<i>P. aviculare</i>	U tretmanima maligniteta, bolesti limfnog sistema, dizenterije, infekcija urinarnog trakta, bubrežnih poremećaja; kao antiinflamatorni agens i diuretik	Ballabh i sar., 2008; Nikolaeva i sar., 2009; Shikov i sar., 2014; Ravipati i sar., 2013
<i>P. maritimum</i>	Za tretiranje opekotina i otoka	Salhi i sar., 2019
<i>F. esculentum</i>	Kao antihemoragični i hipotenzivni lek; vaskuloprotektor, za previjanje rana, detoksikaciju; u lečenju hemoragične retinopenije, anemije, dijabetesa, peridontitisa, konstipacije, gastrointestinalnih poremećaja	Quettier-Deleu i sar., 2000; Al-Snafi, 2017; Aung i sar., 2016
<i>B. officinalis</i>	U svojstvu astringenta; prilikom inflamacije mukoznih membrana, dizenterije, dijareje, krvarenja kod ekstenzivnih menstruacija; intestinalnih poremećaja	Voronkova i Vysochina, 2014; Demiray i sar., 2009; Lajter i sar., 2013
<i>P. maculosa</i>	Kao astringent; prilikom lečenja rana i fungalnih infekcija	Ghosh i sar., 2010; Derita i Zacchino, 2011
<i>P. amphibia</i>	Kao astringent; u lečenju stomaknih tegoba, dijareje, prehlade, blistera i hemoroida, dijabetesa, fraktura kostiju, nazalnih polipa i kancera	Lewis i Elvin-Lewis, 2003; Özbay i Alim, 2009; Bolotova, 2015
<i>P. hydropiper</i>	Kao kontraceptivno sredstvo, hemostatik, analgetik; protiv glavobolje, upale zuba, ulceralnog gastritisa, dizenterije, gubitka apetita, dismenoreje. U lečenju maligniteta	Lajter i sar., 2013; Hashim i sar., 2012; Shikov i sar., 2014; Duraipandiyani i sar., 2010

UVOD

P. lapathifolia Kao antiseptik i astringent; za lečenje stomačnih tegoba, groznica, opekotina, gljivičnih infekcija; za čišćenje krvi

Latifa i sar., 2013;
Kubínová i sar., 2014

Tabela 2. Primena odabranih predstavnika Polygonoideae u kulinarstvu

Biljna vrsta	Primene u kulinarstvu	Literatura
<i>P. aviculare</i>	U Koreji kao salata, u Vijetnamu kao začin, u Australiji cvetovi ove biljke omogućavaju dobijanje meda	Chon i sar., 2008; Costea i Tardif, 2005; Sakurai i sar., 2004
<i>P. maritimum</i>	nije pronađena	
<i>F. esculentum</i>	Za dobijanje meda i brašna. Služi kao zaslađivač ukusa i za pripremu peciva	Al-Snafi, 2017
<i>B. officinalis</i>	Rizom se koristi kao začin za gulaše i čorbe, brašno od rizoma se upotrebljava za pravljenje peciva. Tradicionalna upotreba zabeležena je kako u zemljama Azije tako i Evrope	Demiray i sar., 2009; Guarrera i sar., 2016
<i>P. maculosa</i>	U pripremi tradicionalnog italijanskog jela „Pistic”	Paoletti i sar., 1995
<i>P. amphibia</i>	U proizvodnji bezalkoholnog pića; lišće se dodaje prilikom pravljenja supe	Özbay i Alim, 2009; Özen, 2010
<i>P. hydropiper</i>	Sastojak Malajanskog tradicionalnog jela „Laksa”; kao začin biberastog ukusa u Kini i Evropi; kao tradicionalno povrće za pravljenje sušija „sashimi”u Japanu; dodatak prilikom kiseljenja krastavaca	Hashim i sar., 2012; Huq i sar., 2014;
<i>P. lapathifolia</i>	Kao povrće ili salata u Indiji	Latifa i sar., 2013

Tabela 3. Preostale primene odabranih predstavnika Polygonoideae

Biljna vrsta	Ostale primene	Literatura
<i>P. aviculare</i>	Veterinarski lek, protiv dijareje pasa i mačaka u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD); dodatak stočnoj hrani; bojenje tekstila	Costea i Tardif, 2005; Lucchetti i sar., 2019
<i>P. maritimum</i>	Potencijalna primena u kozmetičkoj industriji	Rodrigues i sar., 2019
<i>F. esculentum</i>	Potencijalna primena kao preparat protiv bora u kozmetičkoj industriji	Rodrigues i sar., 2019
<i>B. officinalis</i>	Potencijalna primena kao preparat protiv bora u kozmetičkoj industriji	Rodrigues i sar., 2019
<i>P. maculosa</i>	Insekticid	Ghosh i sar., 2010
<i>P. amphibia</i>	Kao izvor žute boje u Škotskoj; za čišćenje kože	Özbay i Alim, 2009; Nkuété i sar., 2015
<i>P. hydropiper</i>	Koristi se za ribarenje u Nepal - za usporavanje lokomotornih funkcija plena	Kulakkattolickal, 1989
<i>P. lapathifolia</i>	Za kupanje i pranje veša	Latifa i sar., 2013

1.4. Hemijski sastav odabranih predstavnika podfamilije Polygonoideae

U literaturi postoji obilje informacija o hemijskom sastavu odabranih biljnih ekstrakata podfamilije Polygonoideae (Intisar i sar., 2013; Prota i sar., 2014; Kubínová i sar., 2014; Voronkova i Vysochina, 2014; Arora i sar., 2018; Rodrigues i sar., 2019). Glavna grupa sekundarnih metabolita koje sintetiziraju ove biljke su polifenoli. Upravo su različiti flavonoidi i fenolne kiseline u velikoj mjeri zaslužni za ispoljavanje raznoraznih bioloških efekata poput: antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, modulacije „quorum sensing“ signalizacije, hemioterapijskog potencijala, regulacije ćelijskog ciklusa i tipa ćelijske smrti (Leonarduzzi i sar., 2010; Özçelik i sar., 2011; El-Haci i sar., 2013; Aleksić i sar., 2018). U Prilogu 1. (**Tabela 21 i 22**) prikazan je hemijski sastav odabranih ekstrakata korišćenih u ovom doktorskom istraživanju, pri čemu su detaljna hemijska karakterizacija i poređenje dobijenog fitohemijskog profila ekstrakata sa podacima iz dostupne literature podrobno predstavljene u doktorskoj disertaciji dr Emilije Svirčev (2014).

1.5. Opurtunistički patogeni i kontaminenti hrane

Značajan deo „raznolikosti života u svim svojim manifestacijama”, odnosno biodiverziteta čine mikroorganizmi. Opšte je poznato da je veliki broj mikroorganizama u stalnom direktnom ili indirektnom kontaktu sa ljudima. Štaviše, u ljudskom organizmu je deset puta veća zastupljenost mikroorganizama nego humanih ćelija (Zarco i sar., 2012). Dugogodišnja biohemijska i molekularna izučavanja mikroorganizama omogućila su njihovu kontrolisanu primenu u najrazličitijim ljudskim delatnostima (Balázs, 2014). Međutim, gubitak mogućnosti kontrole rasta mikroorganizama rezultira veoma štetnim posledicama. Neselektivna upotreba antibiotika u humanoj i veterinarskoj kliničkoj praksi uslovlila je pojavu multirezistentnih bakterijskih sojeva. Infekcije izazvane patogenima koji su rezistentni na antibiotike kao i njihovo širenje predstavljaju globalni problem današnjice (Satish i sar., 2009; Özçelik i sar., 2011; Rai i Kon, 2013). Najčešći patogeni bolničkih okruženja su: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus* spp. (Freitas i sar., 2019). Takođe, jedan od najzastupljenijih patogena poreklom iz hrane životinjskog porekla je *Listeria monocytogenes* (Vasiljević i sar., 2019).

Prema savremenoj klasifikaciji bakterija³ gore navedeni patogeni su raspoređeni u okviru kola Proteobacteria i Firmicutes (domen Bacteria). U kolu Proteobacteria, klasi Gammaproteobacteria, redu Enterobacteriales, familiji Enterobacteriaceae, svrstane su brojne Gram negativne bakterije uključujući i bakterije roda *Escherichia*, *Shigella* i *Salmonella*. Usled čestog horizontalnog transfera gena kao genetski veoma srodne vrste ističu se *E. coli*, *S. flexner* i vrste roda *Salmonella*. Za razliku od *E. coli*, vrste roda *Shigella* i *Salmonella* su skoro uvek patogene (Madigan et al., 2015).

E. coli je Gram negativna bakterija koja može proizvoditi šigela toksin (AB5 familija toksina). Na osnovu antigena O (lipopolisaharidni antigen), K (kapsularni antigen) i H (flagelarni antigen) moguće je razlikovati serotipove (Joensen i sar., 2015). Infekcija ovom bakterijom dovodi do pojave hemoragičnog kolitisa i hemolitičko-uremijskog sindroma (Hughes i sar., 2006; Nallapareddy i sar., 2006).

Shigella flexneri je Gram negativna, fakultativno anaerobna bakterija, uzročnik šigeloza i dijareje (Jennison i Verma, 2004).

Vrste roda *Salmonella* predstavljaju Gram negativne, pokretne, štapićaste bakterije koje odlikuje mogućnost korišćenja citrata kao izvora ugljenika i lizina kao izvora azota. Sposobne su da proizvode vodonik sulfid. Izazivaju akutni gastritis, enterokolitis i fatalnu tifoidnu groznicu (Dekker i sar., 2015).

Nadalje, u okviru klase Gammaproteobacteria, reda Pseudomonadales, familije Pseudomonadaceae, roda *Pseudomonas* nalazi se vrsta *P. aeruginosa* (Madigan et al., 2015). *P. aeruginosa*, opurtunistički patogen, je Gram negativna, aerobna, pokretna i štapićasta bakterija. Njena patogenost je vezana za produkciju egzotoksina A, egzoenzima S, hemolizina: fosforilaza C i ramnolipida, kao i proteaza: Las B elastaza, Las A elastaza i alkalne fosfataze i piocijanina. Pored piocijanina, ova bakterija sintetiše i pioverdin i piomelanin (Alzahrani i Alqahtani, 2016). *P. aeruginosa* izaziva širok spektar plućnih bolesti uključujući i cističnu fibrozu (Van Delden i Iglewski, 1998).

Dalje, kolo Firmicutes, klasa Bacilli, red Bacillales uključuje familije Listeriaceae i Staphylococcaceae, u kojima se nalaze rodovi *Listeria* i *Staphylococcus*, respektivno (Madigan et al., 2015).

L. monocytogenes je Gram pozitivna, katalaza pozitivna, oksidaza negativna, asporogena, aerobna i fakultativno anaerobna, štapićasta bakterija sa zaobljenim krajevima. Optimalni uslovi za njen

³ Savremena klasifikacija bakterija se zasniva na operativnom modelu (eng. operational-based model), višefaznom pristupu, koji se sastoji od fenotipskih, hemotaksonomskih i genotipskih podataka, kao i filogenetskih informacija (Schleifer, 2009).

rast obuhvataju temperaturni opseg od 30°C do 37°C (Sneath i sar., 1986). Odlikuje je produkcija β hemolizina i listeriozina O. Ova bakterija je uzročnik listerioza. U slučaju sistemskih infekcija može dovesti do meningitisa, encefalitisa i septikemije (Farber i Peterkin, 1991; Churchill i sar., 2006).

S. aureus je Gram pozitivna, oksidaza negativna, nepokretna, asporogena, fakultativno anaerobna, ubikvitarna bakterija koja izaziva mnogovrsne humane infekcije. Raste u temperaturnom opsegu od 15-45°C. Odlikuje je produkcija različitih enterotoksina poput toksični šok sindrom toksina 1 i citotoksina, u koje spadaju hemolizini: α , β , γ i δ (Sneath i sar., 1986; Dinges i sar., 2000).

Takođe, u okviru kola Firmicutes, klase Bacilli, nalazi se red Lactobacillales u koji je uvršćena familija Enterococcaceae, rod *Enterococcus*, vrsta *Enterococcus faecalis* (Madigan et al., 2015).

Enterococcus faecalis je Gram pozitivna, nepokretna bakterija, tolerantna na različite stresne uslove. Raste na temperaturi od 10°C do 40°C. Preživljava tridesetominutno zagrevanja na 60°C (Sneath i sar., 1986). Odlikuje je vanćelijska produkcija superoksida i produkcija litičkih enzima gelatinaze i hijaluronidaze, kao i toksina citolizina. Jedna je od najčešćih uzročnika bolničkih bakteremija. Može izazvati oralne infekcije, infekcije urinarnog trakta, endokardijuma, abdomena i zapaljenje rana (Kayaoglu i Ørstavik, 2004; Nallapareddy i sar., 2006).

Patogenost kao životna strategija je prepoznata i kod gljiva. Inhalacija spora *Aspergillus fumigatus* može dovesti do aspergiloza, bolesti pri kojoj dolazi do destrukcije plućnog tkiva (Tekaiia i Latgé, 2005; Al Yousef, 2013). Oportunističke infekcije uzrokovane sporama gljive *Fusarium* predstavljaju fuzarioze. Spore *Alternaria* mogu izazvati alergije i posledično dovesti do nastanka astme umerenog tipa, pneumotitisa ili polenske groznice. Gljivičnim infekcijama naročito su podložni pacijenti sa hematološkim malignitetima, usled njihove imunokompromitovanosti (Tekaiia i Latgé, 2005). Dalje, navedene gljive, pored različitih oboljenja, indirektno mogu izazvati intoksikacije (mikotoksikoze) usled produkovanja širokog spektra mikotoksina (Zabka i sar., 2011). Ističe se da se metabolizam mikotoksina oslanja na indukciju oksidativnog stresa (Omar, 2013). Mikotoksini se prema hemijskoj strukturi dele na: aflatoksine, ohratoksine, fumonozine, trihotecene i zearaleone. Produkcija aflatoksina i ohratoksina odlika je pojedinih vrsta rodova *Aspergillus*, pri čemu je sinteza ohratoksina uočena i kod nekih vrsta roda *Penicillium*. Vrste roda *Fusarium* karakteriše produkcija trihotecena, zearaleona i fumonozina (Sweeney i Dobson, 1998). Mikotoksini mogu delovati nefrotoksično, hepatotoksično, teratogeno, mutageno i kancerogeno (Omar, 2013). Prisustvo mikotoksina kao i samih gljivičnih kontaminacija lekovitih i jestivih biljaka predstavlja poseban izazov u distribuciji fitopreparata i prehrambenoj industriji. Fitopatogenim mikromicetama pripadaju i rodovi: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* i *Fusarium* (Egbuta i sar., 2017).

1.6. Pigmenti kao faktori patogenosti

Važan parametar u kliničkoj mikrobiologiji predstavlja varijetet boja koje u mnogome olakšavaju identifikaciju infektivnih bakterija i gljiva. Kao što je već istaknuto, produkcija pigmenta piocijanina je odlika *P. aeruginosa*. Kako nijedna druga Gram negativa, nefermentativna bakterija ne produkuje piocijanin ova odlika se koristi u medicinskoj dijagnostici. U mnogim slučajevima uspešnost patogeneze vezuje se za produkciju pigmenta koje karakterišu proinflamatorne i citotoksične sposobnosti kao i mogućnost remećenja imunog odgovora domaćina (Liu i Nizet, 2009). Prema vrsti produkovanog pigmenta neretko su davani nazivi mikroorganizmima (Liu i Nizet, 2009). Primer navedenog je *Chromobacterium violaceum*, saprofitna bakterija, koja produkuje ljubičasto plavi pigment violacein (Yeo i Tham, 2012).

Dalje, melanin je naročito bitan pigment prisutan u brojnim organizmima, između ostalog i u gljivama vrsta roda *Aspergillus*. Kao i mnogi pigmenti melanin pruža zaštitu od reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species, ROS), a samim tim prilikom infekcije štiti mikromicete od imunskog odgovora domaćina koji se sprovodi posredstvom fagocitoze pri kojoj nastaju velike količine hidroksiradikala ($\cdot\text{OH}$) i superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Takođe, kod vrsta roda *Aspergillus* produkcija konidijalnog zelenog-plavog pigmenta regulisana je dihidroksinaftalen (DHN)-melanin signalnim putem. Promene na morfološkom nivou poput gubitka pigmenta i promene boje konidija, predstavljaju fiziološki odgovor na stresne uslove. Nastanak albino fenotipa povezan je sa disfunkcionalnošću gena *alb1* (Youngchim i sar., 2004; Tekaiia i Latgé, 2005; Losada, 2009). Takođe, vrste roda *Aspergillus* produkuju širok opseg sekundarnih metabolita, u koje spada i melanin, koji uslovljavaju i reflektuju pravilnosti njihovog rasta i morfogeneze (Losada, 2009).

1.7. Biofilm

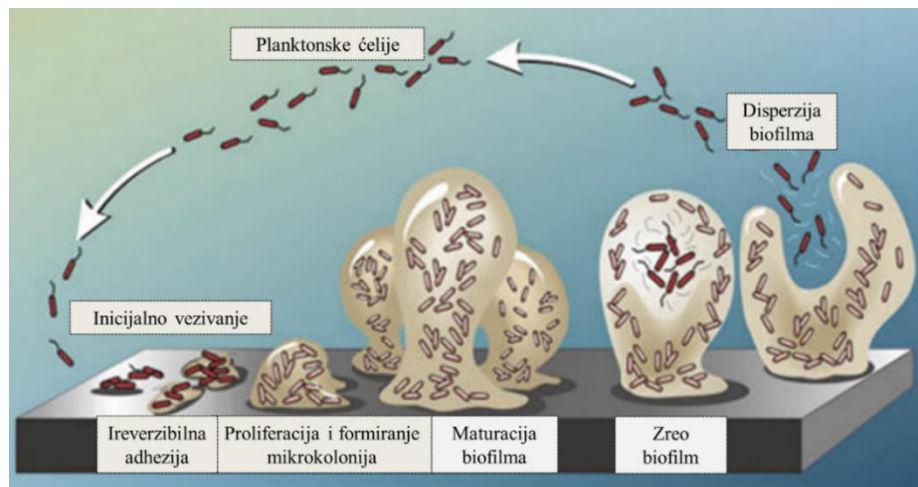
1.7.1. Definicija i svojstva biofilma

Biofilm je favorizovana životna strategija mnogih mikroorganizama. Biofilm predstavlja strukturnu zajednicu mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za supstrat i koji su uronjeni u matriks ekstracelularnih polimernih supstanci (EPS) koje sami produkuju, a koji pokazuju različite karakteristike rasta i ekspresije gena u odnosu na planktonske organizme (Dubois-Brissonnet i sar., 2016). Kod bakterija koje stvaraju biofilm strukture uočavamo kompetivne prednosti u pogledu: preživljavanja varijabilnih uslova spoljašnje sredine, dostupnosti nutrienata i smanjene osetljivosti na delovanje različitih antimikrobnih agenasa. Povećana antimikrobna otpornost u biofilmu može biti stečena ili svojstvena (sin. intrinzična). Stečena antimikrobna rezistencija je omogućena transferom ekstrahromozomalnog materijala između bakterija unutar biofilma, dok je intrinzična antimikrobna rezistencija uslovljena osobenim karakteristikama formacije biofilma. Kao primer intrinzične antimikrobne otpornosti u literaturi se najčešće ističe funkcija EPS matriksa u svojstvu fizičke barijere koja otežava transport antimikrobnih agenasa do mesta delovanja, smanjenjem brzine prodora agenasa do ćelija (Donlan, 2001).

Mesta formiranja bakterijskih biofilмова su veoma raznolika, od zemljišnih i vodenih staništa, do živih tkiva poput srčanih zalistaka, pluća pacijenata sa cističnom fibrozom i srednjeg uha bolesnika sa perzistentnom *otitis mediom* (Donlan, 2001). Biofilmovi se takođe mogu javiti na zubnim površinama kao i na ranama (Højby i sar., 2010). Nadalje, bakterije mogu formirati biofilmove na opremi za obradu i pakovanje hrane. Pojavljivanje biofilмова u medicinskim institucijama i u prehrambenim industrijama opravdava česta istraživanja usmerena ka kontroli i sprečavanju njihovog formiranja (Peeters i sar., 2008; Sandasi i sar., 2011).

1.7.2. Formiranje biofilma

Formiranje biofilma započinje sa reverzibilnim vezivanjem planktonskih mikroorganizama za čvrstu površinu (**Slika 3**). Nakon ovoga sledi ireverzibilno vezivanje za odgovarajuću površinu i formiranje mikrokolonija. Oko mikrokolonija formira se polimerni matriks izgrađen od vanćelijskih supstanci. Zreo biofilm koji predstavlja sledeću fazu u procesu formiranja javlja se u obliku struktura nalik pečurkama i tornjevima. U ovom stadijumu javljaju se vodeni kanali koji omogućavaju dotok kiseonika i nutrijenata centralnim ćelijama zrelog biofilma. Vodeni kanali su neophodni za pravilno funkcionisanje biofilm zajednice usled toga što je stratifikacija koncentracije kiseonika, metaboličke aktivnosti, sinteze proteina i ćelijskog rasta veoma izražena. Centralne slojeve biofilma odlikuju anaerobni uslovi, izostajanje bakterijskog rasta kao i niska metabolička aktivnost (Donlan, 2001, Høiby i sar., 2010; Taraszkiwicz i sar., 2012).



Slika 3. Proces formiranja biofilma (preuzeto iz Karaguler i sar, 2017).

1.7.3. Degradacija biofilma

Degradacija biofilma odvija se na sledeće načine: uklanjanjem formiranog biofilma mehaničkim putem, razgradnjom posredovanom enzimima ili interferiranjem sa „quorum sensing” (QS) signalnim putevima. Migracija ćelija sa zrelog biofilma, u formi oslobođenih planktonskih ćelija, je regularna pojava u ciklusu formiranja i širenja bakterijskih biofilm infekcija. Pokretljivost bakterija je naročito bitna u ovom koraku. Kod *P. aeruginosa* trzajuće kretanje (eng. swarming motility) pored disperzije omogućava i realizaciju prvog koraka u formiranju biofilma - invaziju i adheziju na različitim površinama. Trzajuće kretanje se definiše kao forma pokreta nastalih usled aktivnosti flagela (Chu i sar., 2013).

1.7.4. Komunikacija bakterija u biofilmu (QS signalizacija)

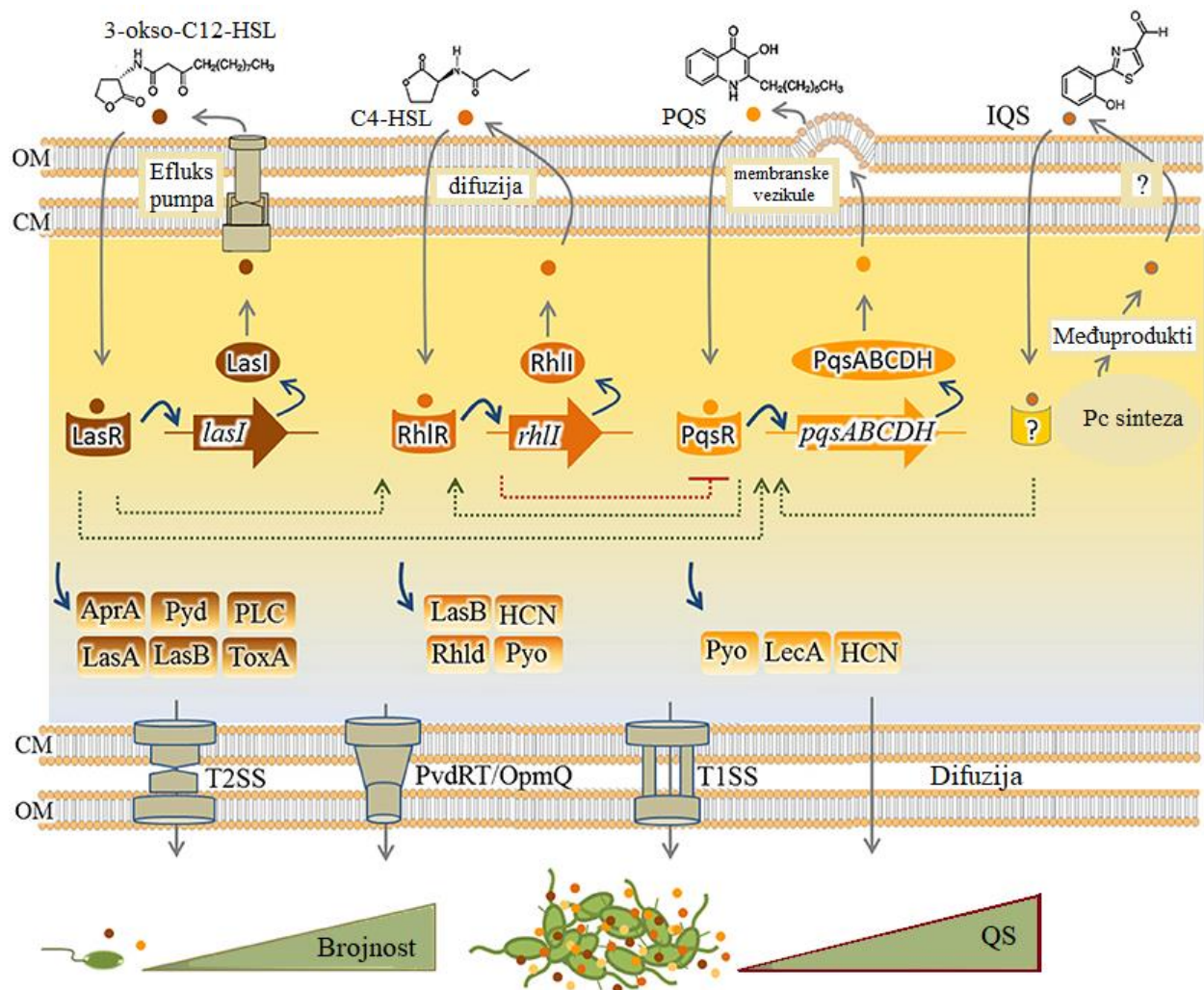
Kao što je već pomenuto, formiranje, sazrevanje i disperzija biofilma regulisana je međubakterijskom komunikacijom, odnosno QS signalizacijom (Vasavi i sar., 2017). Takođe, bioluminiscencija, trzajuće kretanje, produkcija pigmenata, kao i procesi uključeni u interakciji patogena sa domaćinom su pod kontrolom QS sistema (Chu i sar., 2013). Bakterijska komunikacija se zasniva na sintezi i odgovoru na sintetisane signalne molekule, takozvane autoinducere. Bakterije proizvode i detektuju QS molekule nakon dostizanja kritične brojnosti na ograničenom prostoru (Dong i Zhang, 2005). QS molekuli Gram pozitivnih bakterija su mali peptidi, dok su QS molekuli Gram negativnih bakterija N-acil-L-homoserin laktone (AHL).

Kod *P. aeruginosa* PAO1 QS se zasniva na četiri različita sistema međubakterijske komunikacije: Las, Rhl, Pqs i IQS. Navedeni sistemi su povezani kroz hijerarhijsku kaskadu događaja koji kontrolišu faktore virulencije i druge fiziološke procese (Aleksić i sar., 2018). Las i Rhl sistemi sadrže autoinducerske sintetaze (LasI i RhlI), DNK vezujuće transkripcione aktivatore/receptorne proteine (LasR i RhlR) i gene koji su odgovorni za sintezu QS proteina (**Slika 4**). U citoplazmi *P. aeruginosa* poseduje autoinducerske sintetaze LuxI tipa i receptore LuxR tipa. LuxIR tip QS signalizacije omogućava ekstracelularno i intracelularno nagomilavanje autoinducera (Venturi, 2006).

AHL autoinduceri prolaze kroz ćelijsku membranu slobodnim difundovanjem, radom efluks pumpi ili pomoću membranskih vezikula. Način prolaska kroz ćelijsku membranu je uslovljen dužinom acil lanca (Pearson i sar., 1999). Nakon dostizanja kritične brojnosti autoinduceri se vezuju za receptorne proteine koji su smešteni u citoplazmi bakterijske ćelije. Formirani kompleks receptora i autoinducera se vezuje za regulatorne elemente ciljnih gena i vrši transkripcionu aktivaciju. Pojednostavljeno posmatrano, QS receptori su ujedno i AHL-zavisni transkripcioni faktori. Autoinduceri su neophodni za transkripcionu aktivaciju i dimerizaciju receptora LasR, dok RhlR ne zahteva prisustvo autoinducera za dimerizaciju (Schuster i Greenberg, 2006). Dalje, sintetaza LasI proizvode N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin laktone (3-okso-C12-HSL) koji se nakon dostizanja kritične brojnosti vezuje za LasR receptorni protein. RhlI omogućava sintezu N-butil-L-homoserin laktone (C4-HSL) koji se nakon dostizanja kritične brojnosti vezuju za RhlR. Aktivirani LasR i RhlR vrše ulogu transkripcionih faktora i regulišu aktivaciju specifičnih gena za sopstvenu biosintezu i sintezu LasB elastaze, LasA proteaza, pioverdina, fosfolipaze C, egzotoksina A, hidrogen cijanida, ramnolipida i piocijanina (McKnight i sar., 2000; Annapoorani i sar., 2012; Welsh i sar., 2015; Moradali i sar., 2017).

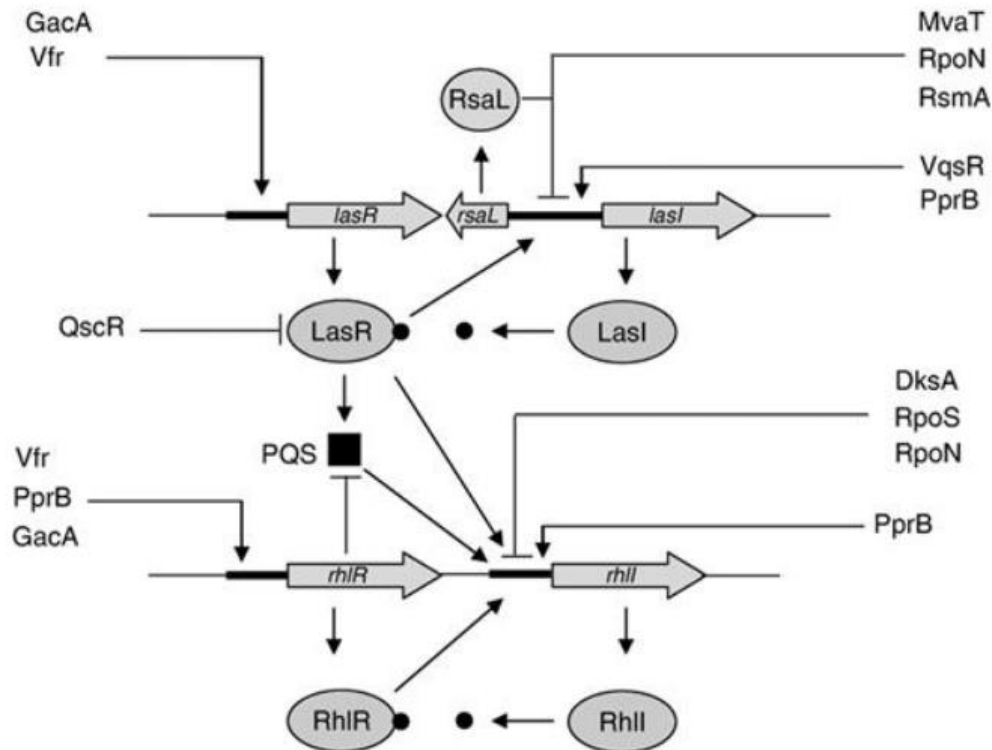
Sinteza piocijanina, lektina A, hidrogen cijanida i ramnolipida regulisana je i Pqs sistemom, posredstvom autoinducera 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolona (PQS) (eng. Pseudomonas Quinolone Signal) (Welsh i sar., 2015; Wilder i sar. 2011). Autoinducer PQS nastaje hidroksilacijom 2-heptil-4-hinolona (HHQ) koju katalizuje PqH, NADH-zavisna flavin monooksigenaza, dok je za nastanak HHQ zaslužna aktivnost enzima PqsA–D. Autoinduceri PQS i HHQ se vezuju za PqsR receptor (eng. multiple virulence factor regulator; sin. MvfR). PqsR receptor sa autoinducerima deluje kao transkripcioni faktor i vezuje se za ciljne gene. Na ovaj način PQS i HHQ utiču na sopstvenu biosintezu i različite faktore virulencije (Wagner i sar., 2016; Schütz i Empting (2018).

Nadalje, u radu Cornelis (2019) osporeno je da su produkti gena *ambABCDE* odgovorni za sintezu IQS signalnog molekula (2- (2- hidroksifenil)- tiazol- 4- karbaldehid) i da je IQS sistem Las- nezavisni način produkcije piocijanina. Literaturni podaci o IQS sistemu su veoma oskudni.



Slika 4. Las, Rhl, Pqs i IQS QS sistemi kod *P. aeruginosa* PAO1. AprA, alkalna proteaza; Pyd, pioverdin; PLC, fosfolipaza C; Tox, toksin A; LasA, LasA proteaza; LasB, LasB elastasa; HCN, hidrogen cianid; Pyo, piocijanin; Rhld, ramnolipidi; Lec A, lektin A; Pc sinteza, sinteza piocelina (eng. pyochelin); CM, citoplazmatična membrana; OM, spoljašnja membrana. T1SS/T2SS, tip 1 i 2 sekrecioni sistemi; PvdRT-Opm, PvdRT-OpmQ efluks pumpa. Kružići predstavljaju autoinducere. Isprekidana linija sa strelicom predstavlja pozitivnu regulaciju; isprekidana linija sa vertikalnom crtom na kraju predstavlja negativnu regulaciju (Moradali i sar., 2017).

Dodatno kod *P. aeruginosa* nivo AHL QS je regulisan od strane različitih globalnih regulatornih faktora poput: cAMP receptor regulatornog proteina Vfr, stacionarno faznog sigma faktora RpoS, alternativnog sigma faktora RpoN, dva LuxR homologna proteina (QscR i VqsR), posttranskripcionih regulatora RsmA i DksA, transkripcionih regulatornih proteina RsaL i MvaT, regulatornog proteina PprB i dvokomponentnog regulatornog sistema GacA-GacS (**Slika 5**) (Venturi, 2006) .



Slika 5. Regulacija Las i Rhl QS sistema *P. aeruginosa* (Venturi, 2006).

Opšte posmatrano, postoje tri načina preko kojih je moguće ometati QS signalizaciju:

- 1) blokiranjem sinteze autoinducera, delovanjem na LasI, RhlI ili PqsABCD i PqsH,
- 2) degradacijom autoinducera posredstvom enzima i uklanjanjem autoinducera posredstvom antitela
- 3) ometanjem receptora, delovanjem na LasR, RhlR i MvfR/PqsR (Wagner i sar., 2016; Rémy i sar., 2018).

U literaturi, ometanje QS signalizacije je označeno kao *quorum quenching* (QQ) (Rémy i sar., 2018; Krzyżek 2019). Kako QS i QQ predstavljaju dva antipodna procesa popularno se nazivaju i kao „jin i jang međubakterijske komunikacije”. Agensi koji ometaju QS nazvani su QS inhibitori. Među QS inhibitorima nalaze se različiti polifenoli biljnog porekla, enzimi, peptidi, antitela, kao i antibiotik azitromicin (Rémy i sar., 2018).

1.8. Antimikrobni agensi biljnog porekla

Biljni ekstrakti predstavljaju kompleksne mešavine mnogovrsnih konstituenata, usled čega različitim mehanizmima ispoljavaju antimikrobne efekte. Pored direktnog ubijanja bakterija, atenuacija virulencije remećenjem QS signalnih puteva, QS inhibitorima, predstavlja još jedan pokušaj kontrole patogena. Podrobnije, destrukcija ćelijskog zida, modifikacija aktivnih mesta receptora - povećanje afiniteta prema antibioticima, remećenje efluks pumpi, povećanje permeabilnosti ćelijske membrane, sprečavanje biosinteze specifičnih ćelijskih konstituenata, inhibicija sinteze specifičnih enzima, atenuacija virulencije, uključujući i sprečavanje produkcije toksina, neki su od mehanizama kojim biljni ekstrakti onemogućavaju infektivnost patogenih bakterija i omogućavaju njihovo suzbijanje (González-Lamothe i sar., 2009; Rai i Kon, 2013). Dalje, antifungalni efekti ekstrakata najčešće uključuju sledeće mehanizme: zaustavljanje ćelijske deobe, inhibiciju vijabilnosti spora, remećenje ćelijskog disanja, disrupciju ćelijske membrane i dezintegraciju ćelijskog zida (inhibicijom sinteze 1,3 β -glukana i hitina). Ekstrakti ili njihovi konstituenti koji pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost u netoksičnim dozama u početnim skrining testovima su poznati pod nazivom „hit” (Cos i sar., 2006; Rai i Kon, 2013). Smatra se da ekstrakte odlikuje antimikrobna aktivnost ako ispoljavaju bakteriostatski efekat pri koncentracijama ispod 1 mg/mL (Rai i Kon, 2013).

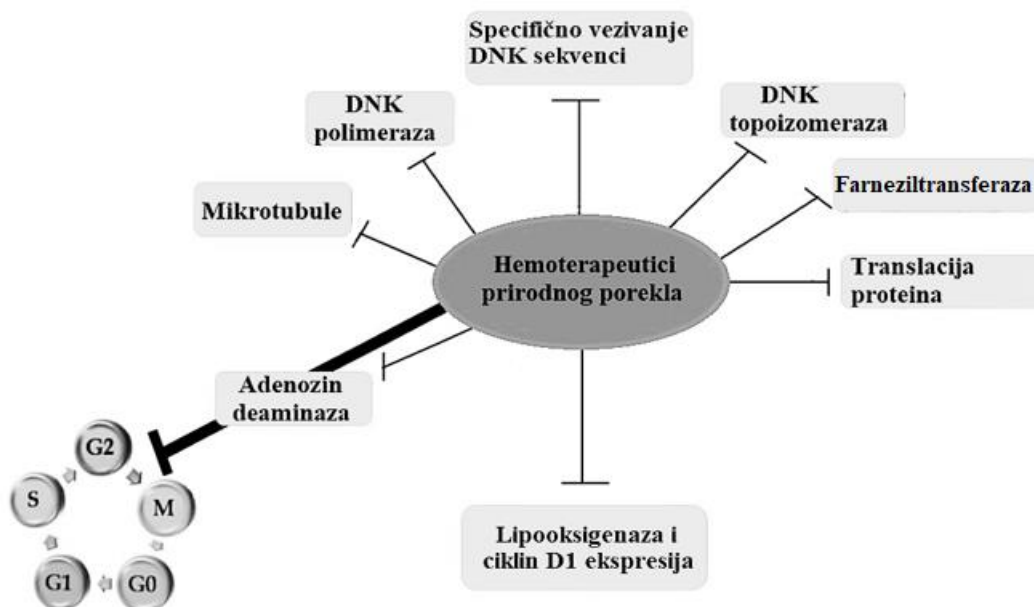
Dalje, pojedine studije pokazuju da biljni ekstrakti mogu poboljšati aktivnost antibiotika, poput streptomcina (Str) (Palaksha i sar., 2010). Decenijama korišćen antibiotik Str je aminoglikozid i najčešće inhibira sintezu proteina vezivanjem za 30S subjedinicu ribozoma (Morić i sar., 2010; Rai i Kon, 2013).

Biljni ekstrakti, pored uloge u suzbijanju infekcija, mogu se koristiti i za sprečavanje rasta mikroorganizama u različitim namirnicama, čime se čuvaju organoleptičke karakteristike hrane (Chitarrini i sar., 2014).

1.9. Antikancerski agensi prirodnog porekla i principi njihovog delovanja

Prvi koncept hemioprevencije pojavljuje se 1951. godine nakon što je ustanovljeno smanjenje stope karcinoma kod glodara kojima su simultano davani antikarcinogeni i karcinogeni ksenobiotici (Zhang, 2006). Najčešće korišćeni citostatici izvorno biljnog porekla su paklitaksel poreklom iz *Taxus brevifolia*, kamptotecin izolovan iz *Camptotheca acuminata*, kao i vinblastin i vinkristin (vinka alkaloidi) koji su po prvi put detektovani u *Catharanthus roseus* (Weaver, 2014; Tewar i sar., 2019). Tradicionalna upotreba *C. acuminata* i vrste roda *Taxus* u lečenju karcinoma zabeležena je u Kini, odnosno u centralnom delu Himalaja. Međutim, otkriće antikancerskog potencijala vinblastina i vinkristina iz *C. roseus* nije zasnovano na etnofarmakološkoj upotrebi. Kao rezultat bioloških testova sprovedenih radi ispitivanja hipoglikemijskog efekta, u cilju validacije navedene upotrebe *C. roseus* u tradicionalnoj medicini, neočekivano je dokazan veoma izražen citotoksični efekat koji je usmerio dalja istraživanja ka ispitivanju antikancerskog potencijala (Leonti i sar., 2017). Kao što se može videti iz navedenog, narodna medicina raspolaže značajnom količinom podataka koji mogu poslužiti kod odabira polaznog materijala sa svrhom ispitivanja hemioterapeutske sposobnosti potencijala, ali takođe treba obratiti pažnju na različite fitofarmakološke karakteristike biljaka koje mogu poslužiti kao pokazatelji moguće antikancerske aktivnosti. Uzevši u obzir ideju funkcionalne veze između kancera i oksidativnog stresa, koja se naročito ističe u današnje vreme, sposobnost modelovanja ćelijskog odgovora na oksidativni stres može sugerisati na hemioterapeutske sposobnosti same biljke ili biljnih konstituenata. Biljni polifenolni konstituenti, usled njihove kompleksne hemijske strukture, mogu remetiti procese maligne transformacije pomoću nekoliko različitih mehanizama: modifikacijom redoks statusa ćelije, modelovanjem bazalnih ćelijskih funkcija i onkogenih signalnih puteva (Dai i Mumper, 2010; Tewar i sar, 2019). Detaljnije posmatrano, usled povećanog nivoa endogenog oksidativnog stresa redoks status malignih ćelija je izmenjen u odnosu na normale ćelije. U živoj ćeliji Fe^{3+} i Cu^{2+} su joni metala koji učestvuju u najviše redoks reakcija. Jedan od puteva modifikacije redoks statusa ćelije polifenolima

uključuje mobilizaciju endogenog Cu^{2+} iz hromatina posredstvom metal helirajućih agenasa, pri čemu se u ovom procesu stvaraju ROS koji dovode do remećenja strukture i fragmentacije DNK molekula (Hadi i sar., 2007). Kako je nivo Cu^{2+} znatno veći u malignim u odnosu na normalne ćelije, navedeni proces ukazuje na mogućnost selektivnosti biljnih antikancerskih agenasa. Dalje, većina antikancerskih agenasa koja izaziva oksidativni stres, a time i posledično degradaciju DNK, uvodi ćelije uglavnom u kasnu apoptozu. Apoptoza koja je indukovana antikancerskim agensima naziva se još i farmakološka smrt, radi distinkcije od fiziološki indukovane apoptoze (Ullah i sar., 2011). U mehanizme modelovanja bazalnih ćelijskih funkcija se ubrajaju: inhibicija aktivnosti enzima koji ispoljavaju aktivnost na DNK molekulu, poput DNK topoizomeraza I i II, remećenje umnožavanja DNK molekula, zaustavljanje ćelijskog ciklusa, modulacija nivoa polimerizacije mikrotubula, inhibicija aktivnosti enzima koji učestvuju u posttranslacionoj modifikaciji proteina, poput farneziltransferaza⁴, inhibicija lipooksigenaza i adenzin deaminaza, kao i izazivanje promena u regulaciji signalnih puteva koji kontrolišu angiogenezu, invaziju i metastazu malignih ćelija (**Slika 6**) (Tewar i sar., 2019).



Slika 6. Neki od mehanizama delovanja različitih hemoterapeutika prirodnog porekla (prilagođeno prema Tewar i sar., 2019).

1.10. Doksorubicin

Doksorubicin (D) (drugačije nazvan adriamicin) je antraciklinski antibiotik značajne antineoplastične efikasnosti, koji je izvorno dobijen iz mutiranog soja *Streptomyces peucetius* (Choi i sar., 2007; Rai i sar., 2016; Tewar i sar., 2019). D ispoljava različite mehanizme delovanja: uzrokuje stvaranje dvolančanih prekida na molekulu DNK, remeti aktivnost DNK topoizomeraze II i doprinosi stvaranju slobodnih radikala u ćeliji (Ichihara i sar., 2007; Tong i sar., 2012; Lee i sar., 2015). U hemioterapiji ovaj citostatik predstavlja lek izbora u lečenju mnogih maligniteta, uključujući i hepatocelularni karcinom (Zhu, 2006). Međutim, primena D za sobom povlači različite kontraindikacije

⁴ Inhibicijom farneziltransferaza se sprečava izoprenilacija Ras proteina (Lebowitz i Prendergast, 1998).

poput kardiomiopatije, hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti (Xin i sar., 2011; Eid i sar., 2012; Srdić Rajić i sar., 2016; Raghunath i sar., 2018; Pavić i sar., 2019). Štaviše, uspešnost delovanja D ograničena je i sve češćom pojavom rezistencije kod kancerskih ćelija. Sa svrhom smanjenja toksičnosti citostatika, tokom lečenja maligniteta primenjuje se simultana upotreba hemioterapeutika i adjuvantnih agenasa koje odlikuju proapoptotska i prooksidativna svojstva prema kancerskim ćelijama. Prilikom ispitivanja adjuvantnih sredstava posebna pažnja se usmerava na biljne ekstrakte i njihove produkte. Kao primer navedenog ističe se mogućnost senzitivizacije kancerskih ćelija na D rezveratrolom, supstancom izolovanom iz *Polygonum cuspidatum* (Hashemzaei i sar., 2016; Rai i sar., 2016).

1.11. Apoptoza

Programirana ćelijska smrt, apoptoza, je nenadmašno bitan homeostatski mehanizam. Prisutna je u normalnim fiziološkim i patološkim stanjima. Termin apoptoza je prvi put upotrebljen 1972. godine kako bi se precizno opisao određeni morfološki tip ćelijske smrti. Karakteristike apoptotičnih ćelija uključuju: smanjenje ćelijske zapremine, kondenzaciju hromatina, cepanje jedarne DNK, formiranje velikih citoplazmatskih vezikula, takozvanih apoptotskih tela, izostanak inflamacije i zadržavanje intaktnosti ćelijske membrane, pri čemu dolazi do premeštanja fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane (Elmore, 2007). Apoptoza je energetski zahtevan proces. Glavni apoptotski signalni putevi su intrinzični/unutrašnji (mitohondrijalni put) i ekstrinzični/spoljašnji (kaskada receptora smrti) (Dong i sar., 2018). Oba kaskadna puta, unutrašnji i spoljašnji, uključuju aktivnost određenih proteolitičkih enzima, kaspaza, pri čemu i u jednom i u drugom putu kaspaza 3 ima ulogu egzekutorne kaspaze (dovodi do razgradnje velikog broja ćelijskih proteina i posledično do fragmentacije DNK). Kaspaza 3 aktivira endonukleazu CAD (eng. caspase-activated DNase) koja zajedno sa endonukleazom G vrši fragmentaciju DNK molekula. Aktivacija mitohondrijalnog puta zavisi od aktivnosti proapoptotskih i antiapoptotskih gena Bcl-2 familije. Kao anti-apoptotski geni ističu se: *Bcl-2*, *Bcl-x*, *Bcl-XL*, *Bcl-XS*, *Bcl-w* i *BAG*, dok su u proapoptotske gene svrstani: *Bcl-10*, *Bax*, *Bak*, *Bid*, *Bad*, *Bim*, *Bik*, i *Blk*. Prvootkriveni član familije Bcl-2 je protein Bcl-2 (eng. B-cell leukemia/lymphoma 2) čija je uloga onemogućavanje izlazaka citohroma c iz mitohondrija. Citohrom C je ključni aktivator izvršne faze procesa apoptoze koji posledično aktivira kaspazu 3. Aktivnost *Bcl-2* familije gena regulisana je u velikoj meri tumor supresornim genom *p53* (Elmore, 2007). Usled DNK oštećenja *p53* gen pokreće kaskadu događaja koja dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, prilikom čega ili dolazi do reparacije DNK ili, ako se oštećenja ne mogu popraviti, do pokretanja apoptoze (Stark i Taylor, 2004). Jedan od načina pokretanja apoptoze regulisan signalnim putevima koji su pod kontrolom *p53* gena uključuje nagomilavanje slobodno radikalskih vrsta koje su, kao što je već istaknuto, izrazito potentni aktivatori apoptoze (Tsang i sar., 2003; Dong i sar., 2018). Pored ROS širok spektar stimulansa može podstaći ulazak ćelija u apoptozu. Međutim, drugačija jačina istog stimulansa može uzrokovati različiti tip ćelijske smrti, dakle ne mora nužno izazvati apoptozu. Tako na primer, hemioterapeutici u nižim koncentracijama mogu dovesti do farmakološke apoptoze, dok u većim koncentracijama uvode ćelije u nekrozu. Nekroza, za razliku od apoptoze, je energetski pasivan proces izazvan spoljašnjim faktorima koji obuhvata veći broj ćelija. Nekrotične ćelije odlikuje bubrenje, disruptivnost ćelijske membrane, curenje citoplazme van ćelije i prisutnost inflamacije. Proces apoptoze završava se fagocitiranjem apoptotskih telašca, fragmentisanih kasno apoptotičnih ćelija koje obavijaju membrane. Fagocitozu vrše makrofagi i druge ćelije parenhima ili okolne ćelije (Elmore, 2007).

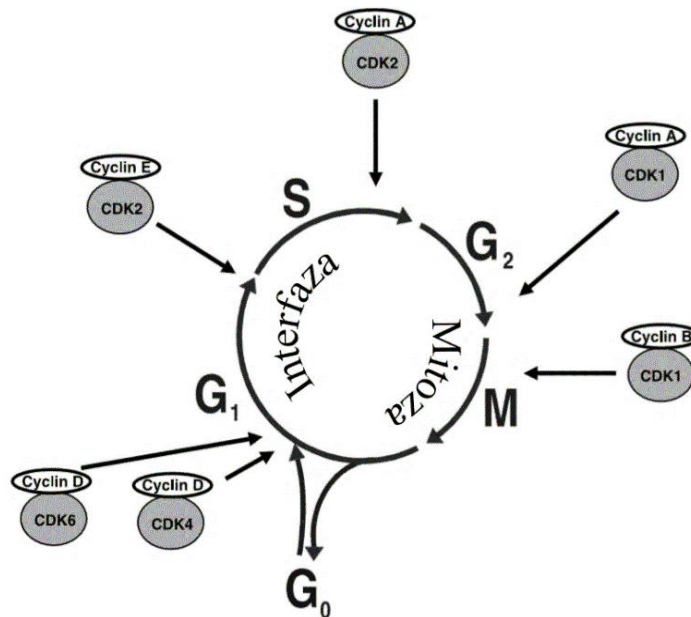
1.12. Ćelijski ciklus

Ćelijski ciklus je podeljen u pet poznatih faza: G1, S, G2, M i G0. G1 faza (eng. G označava gap-raskorak, međuprostor) je period pripreme ćelija za replikaciju DNK molekula i uključuje povećanje ćelijske mase (**Slika 7**). Sinteza DNK se odvija u S fazi ćelijskog ciklusa (S označava sintezu). Nakon S faze sledi G2 faza u kojoj se ćelije pripremaju za ulazak u mitozu (M označava mitozu). U toku M faze

odvija se kariokineza, podela jedarnog materijala i citokineza, podela citoplazme. Nakon deobe, novonastale ćelije ne moraju odmah krenuti pripremu za sintezu DNK molekula, nego mogu preći u G0 fazu. Kada su u G0 fazi, ćelije su u stanju mirovanja (eng. resting state), bez rasta i proliferacije (Vermeulen i sar., 2003; Barnum i O'Connell, 2014; Alimbetov i sar., 2018).

Između navedenih faza nalaze se kontrolne tačke u kojim se revidira ćelijska deoba, odnosno u kojim se proverava integritet ćelijskih komponenti i verodostojnost DNK sinteze. Kao što je već istaknuto, zastoj ćelija u određenom segmentu ćelijskog ciklusa dešava se kako bi se omogućila reparacija oštećene DNK ili, ako reparacija nije moguća, da se onemogući dalja progresija ćelijskog ciklusa, pri čemu se pokreću mehanizmi programirane ćelijske smrti (Stark i Taylor, 2004). Kontrolne tačke provere oštećenja DNK su pozicionirane pre ulaska ćelija u S fazu, zatim nakon DNK replikacije, a takođe su prisutne kontrolne tačke provere DNK oštećenja tokom S i M faze (Vermeulen i sar., 2003).

Nesmetano odvijanje ćelijskog ciklusa uključuje prisustvo ciklin zavisnih kinaza (CDK) čiju aktivnost regulišu CDK inhibitori i vezivanje ciklina (Vermeulen i sar., 2003; Alimbetov i sar., 2018). Glavna uloga CDK, nakon formiranja kompleksa sa ciklinima, je fosforilacija proteina, poput proteina retinoblastoma (pRb) koji uslovljava transkripciju gena neophodnih za pravilno odvijanje ćelijskog ciklusa. Do sada je okarakterisano devet CDK (CDK1-CDK9) koje imaju bitnu ulogu kako u ćelijskom ciklusu tako i u apoptozi. Poremećaj aktivnosti CDK detektovan je u mnogim tipovima malignih ćelija, uključujući i ćelije plućnog i hepatocelularnog karcinoma (Alimbetov i sar., 2018).



Slika 7. Faze ćelijskog ciklusa (preuzeto iz Vermeulen i sar., 2003). Mesta delovanja CDK su kontrolne tačke ćelijskog ciklusa.

1.13. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita

Oksidativni stres, narušena ravnoteža između stvaranja reaktivnih molekularnih vrsta i njihovog neutralisanja, je uzročnik mnogih biohemijskih promena koje mogu rezultirati ozbiljnim poremećajima organskih sistema, uključujući i nastanak kancera (Mimica-Dukić i sar., 2010; Badhani i sar., 2015; Mitić-Ćulafić i sar., 2016). Smatra se da je ćelija u stanju oksidativnog stresa onda kada koncentracija reaktivnih molekularnih vrsta nadmašuje normalan fiziološki nivo. Normalan ćelijski metabolizam predstavlja značajan izvor reaktivnih molekularnih vrsta (Birben i sar., 2012). Neki od procesa u kojima se akumuliraju ROS su: mitohondrijalni put apoptoze, oksidativni mehanizam unutarćelijskog

uništavanja mikroorganizama posredovan fagocitozom, metabolizam ksenobiotika i ćelijsko disanje (Matés i sar., 1999; Hamanaka i Chandel, 2010). Među najpotentnijim ROS molekulima koji nastaju u navedenim procesima izdvajaju se: superoksid anjon ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikal ($\cdot OH$) i vodonik peroksid (H_2O_2). Neutralizacija ROS sprovodi se zahvaljujući aktivnosti antioksidativnih enzima i antioksidanata (Birben i sar., 2012). Veoma bitni enzimi antioksidativne zaštite su superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (KAT). SOD katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala do vodonik peroksida i kiseonika, a nastali vodonik peroksid se dalje razlaže do vode i kiseonika uz pomoć KAT. Kod ljudi postoje tri SOD izoforme: citosolna (Cu/Zn-SOD, poznata i pod nazivom SOD1), mitohondrijalna (Mn-SOD, SOD2) i ekstracelularna (EC-SOD), koje se, kao što se prema priloženom vidi, razlikuju prema lokalizaciji u ćeliji. Detaljnije posmatrano, kofaktori kod SOD1 i EC-SOD su cink i bakar, dok SOD2 sadrži mangan. Cu/Zn-SOD se sastoji od 2 identične subjedinice (32 kDa) koje u aktivnom centru sadrže atome Zn i Cu koji su spojeni histidinskim ostacima. Mn-SOD je homotetramer (96 kDa) čija subjedinica sadrži Mn, atom koji menja valencu od (II) do (III) i obrnuto tokom dvostepene dismutacije superoksid anjona (Matés i sar., 1999). Kako antioksidativni enzimi igraju bitnu ulogu u održavanju ćelijske homeostaze, postojali su mnogobrojni pokušaji upotrebe SOD kao medikamenta, ali su oni rezultirali neuspehom. Enzimi, generalno posmatrano, su loši kandidati za potencijalne lekove usled: visoke cene dobijanja, problema asociranih sa stabilnošću i prečišćavanjem, onemogućene oralne aplikacije i slabih farmakokinetičkih sposobnosti (Hybertson i sar., 2011). Međutim, kako biljne droge i biološki aktivne komponente biljka mogu aktivirati enzimske antioksidativne sisteme čoveka, prisutan je trend ispitivanja antioksidativnog efekta biljnih ekstrakata. Takođe, treba istaći da pored mogućnosti indukcije enzima antioksidativne zaštite, biljke predstavljaju značajan izvor antioksidanata. Izrazito bitna grupa antioksidanata su polifenolna jedinjenja u koje se ubrajaju: flavonoidi, terpenoidi (monoterpeni, seskviterpeni i diterpeni), fenolne kiseline, ligandi, stilbeni i tanini. Benefitni efekat flavonoida na ljudsko zdravlje ističu mnoge studije. Veza između povećanog unosa flavonoida putem hrane i smanjenog rizika pojavljivanja hroničnih bolesti i kancera je istaknuta u mnogobrojnim naučnim studijama (Le Marchand, 2002; Romagnolo i Selmin, 2012; Zhu, 2016;).

1.14. Regulacija antioksidativne zaštite Keap1-Nrf2 signalnim putem

Održavanje ćelijske redoks homeostaze i prevencija bolesti koje se mogu razviti usled delovanja oksidativnog stresa omogućene su pravilnim funkcionisanjem komponenata Keap1-Nrf2 signalnog puta. Navedeni signalni put se zasniva na tri glavne komponente: elementima antioksidativnog odgovora (eng. antioxidative response element, ARE) - kratkim DNK sekvencama u promotornom regionu onih gena čija će se transkripcija aktivirati, *Nrf2* (eng. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) i *Keap1* genskim produktima (eng. Kelch-like ECH associated protein 1).

Nrf2 je 1994. godine identifikovan kao transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju beta-globulinskih gena (Hybertson i sar., 2011). Dosadašnja saznanja ukazuju da Nrf2 reguliše ekspresiju velikog broja gena, u čije produkte se ubrajaju: NAD(P)H hinon-oksido-reduktaza 1 (NQO1), glutation S-transferaza (GST), γ -glutamilcistein sintetaza (GCS), UDP-glukuronoziltransferaza (UGT), epoksid hidrolaza, SOD1, SOD2 i KAT (Thimmulappa i sar., 2002). Nrf2 pripada familiji regulatornih proteina (eng. Cap 'n' Collar, CNC) i za njega je karakterističan motiv leucinskog „rajfešlusa” (leucine-zipper). Ova familija uključuje još i Nrf1 (eng. nuclear factor-erythroid derived 2-related factor 1) NF-E2 (eng. nuclear factor-erythroid derived 2), Nrf3, kao i Bach1 i Bach2 proteine (Zhang, 2006, Zhu, 2016). Nrf2 je protein u čiji sastav ulazi 605 amino kiselina i sastoji se od 7 domena (Neh1-7) (**Tabela 4; Slika 8A**) (Raghunath i sar., 2018).

Tokom normalnih fizioloških uslova Keap1 funkcioniše kao negativni regulator Nrf2 transkripcionog faktora, odnosno kao njegov proteinski inhibitor⁵. Keap1 je protein bogat cisteinskim ostacima, pri čemu C151, C273 i C288 imaju presudnu ulogu u promeni konformacije Keap1 proteina (Kansanen i sar., 2013). Poznato je da cistein usled prisustva tiolne (sulfhidridne grupe) odlikuje značajna reaktivnost i da različiti biološki procesi zahtevaju njegovo prisustvo. Keap1 ima 3 domena, svaki domen sadrži cisteinske ostatke, kod ljudi se nalazi ukupno 27 cisteinskih ostataka u okviru navedenog proteina (**Tabela 5, Slika 8B**). IVR domen sadrži cisteinske ostatke koji predstavljaju redoks senzore. U citoplazmi Keap1 održava nizak nivo Nrf2 preko ubikvitin-proteozomalnog degradacionog sistema (Raghunath i sar., 2018). Podrobnije posmatrano, veza Keap1 i Cul3-Rbx1-E3 ligaznog kompleksa vodi ka vezivanju ubikvitina i lizinskih ostataka Neh2 domena Nrf2 proteina, što rezultira ubikvitinacijom i proteozomalnom degradacijom Nrf2 proteina (Zhu, 2016).

Sa druge strane, aktivacija Nrf2 je omogućena nakon kovalentne modifikacije cisteina Keap1 proteina, pri čemu se Nrf2 oslobađa od Keap1 regulatornog kompleksa. Fosforilisan Nrf2 se premešta iz citoplazme u jedro gde zajedno sa Maf (eng. musculo aponeurotic fibrosarcoma) proteinima formira heterodimerni kompleks koji se vezuje za ARE (Zhu, 2016; Raghunath i sar., 2018).

Postoje različite diskusije preciznog mehanizma kojim Keap1 reguliše aktivnost Nrf2. Najzastupljenija su dva modela: „šarka i reza” i Cul3-Keap1 disocijacija. U oba modela stabilizacija i akumulacija Nrf2, praćena njegovom translokacijom u jedro, je omogućena sprečavanjem ubikvitinacije. U modelu „šarka i reza” Nrf2 i Keap1 stupaju najpre u otvorenu, a nakon toga i u zatvorenu konformaciju. U otvorenoj konformaciji, Nrf2 se preko ETGE motiva Neh2 domena vezuje za jedan kraj dimera Keap1. U ovom stadijumu Nrf2 nije podvrgnut ubikvitinaciji. Nakon toga, DLG motiv Neh2 domena Nrf2 transkripcionog faktora se vezuje za drugi kraj dimera Keap1 pri čemu se formira zatvorena konformacija. Kao posledica toga dolazi do ubikvitinacije Nrf2 preko Cul3-Rbx1-E3 ligaznog kompleksa, što je okidač za njegovu degradaciju. Ciklus vezivanja i degradacije Nrf2 se ponavlja. Kada je ćelija izložena oksidativnom stresu, ROS dovodi do oksidacije Keap1 cisteinskih ostataka što rezultira konformacionim promenama Keap1 proteina. Keap1 je i dalje vezan za DLG motiv, međutim veza između ETGE motiva Nrf2 proteina i Kelch domena Keap1 proteina se gubi. Interakcija sa ubikvitin konjugativnim enzimima je onemogućena usled čega izostaje ubikvitinacija Nrf2, što vodi ka zaustavljanju ciklusa degradacije i akumuliranju Nrf2.

U Cul3-Keap1 modelu disociranja, u uslovima oksidativnog stresa interakcija između Keap1 i Cul3 je onemogućena inducerima poput tert-butilhidrokinona (tBHQ) ili eikosapentenoičnom kiselinom (EPA), što takođe rezultira izostankom ubikvitinacije Nrf2. Veoma bitnu ulogu u ovom modelu igra cistein 151 u BTB domenu Keap1 proteina (Kansanen i sar., 2013; Zhu i sar., 2016).

Konstitutivna ekspresija *Nrf2* gena praćena inaktivacijom Keap1 represora detektovana je kod različitih tipova malignih ćelija, uključujući i hepatocelularne i ćelije plućnog adenokarcinoma (Gao i sar., 2013; Raghunath i sar., 2018). Konstitutivnu ekspresiju *Nrf2* gena uzrokuju sledeći procesi: somatske mutacije *Keap1* ili *Nrf2* gena koje dovode do poremećaja interakcije između njihovih proteinskih produkata, epigenetske modifikacije *Keap1* gena, poput hipermetilacije, akumulacija disruptornih proteina poput p62 i p21, posttranslaciona modifikacija cisteinskih ostataka Keap1 proteina sukcinilacijom, indukcija transkripcije *Nrf2* gena izazvana onkogenima, poput Kras^{G12D} (Kansanen i sar., 2013). Kako je za neke biljne derivate pronađeno da pokazuju potencijal senzitivizacije hemiorezistentnih ćelija pomoću supresije *Nrf2* gena (Raghunath i sar., 2018) u modernim istraživanjima prisutan je trend potrage za *Nrf2* inhibitorima među prirodnim agensima.

⁵ U literaturi Keap1 je često definisan kao protein represor, pri čemu je bitno zapaziti da se represija odvija na nivou sintetisanog Nrf2 proteina, a ne na nivou transkripcije njihovih gena.

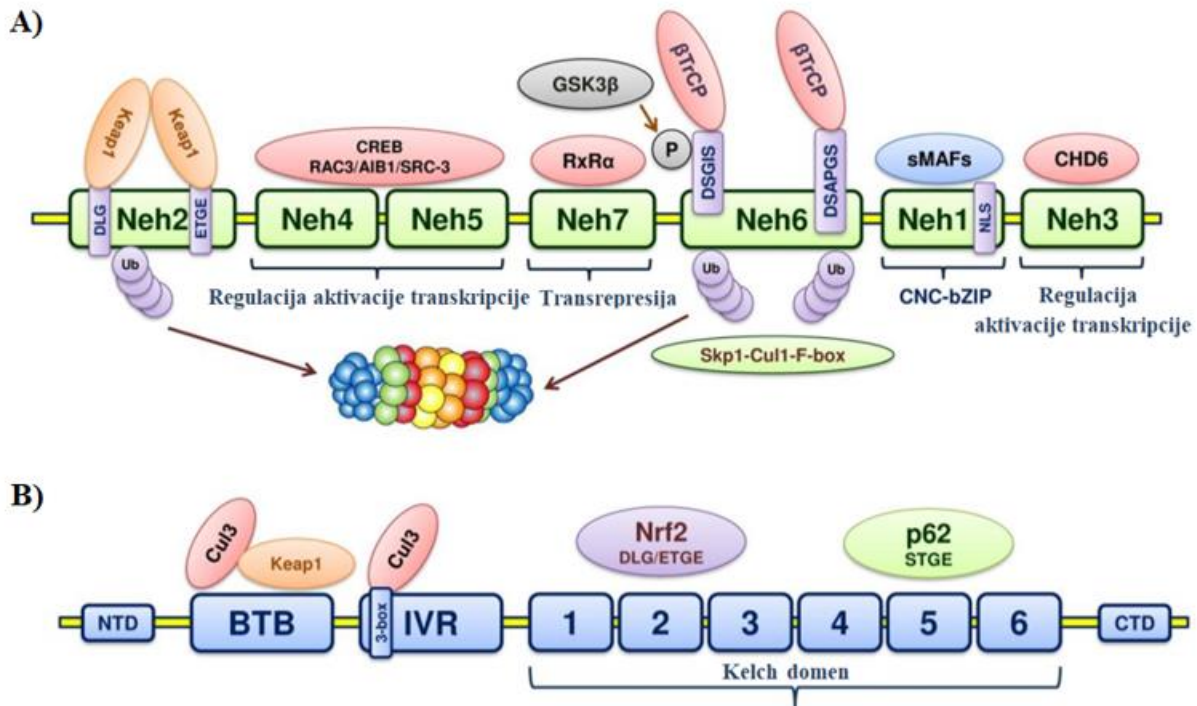
Tabela 4. Nrf2 domeni

Domen	Uloga
Neh1	dimerizacija sa drugim transkripcionim faktorima; preko DNK vezujućeg CNC-bZIP regiona intereaguje sa ZIP domenom malih Maf proteina i vezuje se za DNK
Neh2	preko motiva ETGE i DLG intereaguje sa Kelch domenom Keap1 gena; proteozomalna degradacija Nrf2- negativna regulacija
Neh3	regulatori aktivacije transkripcije sa koaktivatorima;
Neh4	regulatori aktivacije transkripcije sa koaktivatorima;
Neh5	regulatori aktivacije transkripcije sa koaktivatorima; regulacija ćelijske lokalizacije Nrf2
Neh6	redoks-insenzitivni domen, proteozomalna degradacija Nrf2 nezavisna od Keap1
Neh7	Inhibitor transkripcije Nrf2; transrepresija

Tabela 5. Keap1 domeni

Domen	Uloga
BTB (eng. Bric a Brac; sin. aka POZ)	posreduje u Keap1-Keap1 homodimerizaciji i asociranju sa Cul3
IVR	posreduje u asociranju Cul3; predstavlja redoks senzor usled prisustva cisteinskih ostataka; povezuje BTB i Kelch domen
Kelch (aka DGR ili DC)*	omogućava vezivanje za aktinski skelet; vezuje se za ETGE i DLG motive Neh2 domena;

* Amino - kiselinski ostaci u Kelch domenu su tirozin (β C), triptofan (β D) i dupli-glicinski ponovci (eng. double-glycine repeat, DGR)



Slika 8. Strukturni domeni Nrf2 (A) i Keap1 (B) proteina (preuzeto iz Raghunath i sar., 2018).

1.15. Bezbednost primene biljnih ekstrakta

Povezanost zdravlja i hrane sigurno nije novijeg datuma. Zapravo, shvatanje hrane kao leka poznato je još od Hipokrata, dok sam pojam funkcionalne hrane nastaje tek 1984. godine u Japanu, a koncept „nutritivnih lekova” (eng. nutraceutical) se pojavljuje 1989. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (Andlauer i Fürst, 2002; Arai i sar., 2001).

Nutritivni lekovi se definišu kao bilo koje supstance koje se mogu smatrati hranom, a koje ostvaruju benefita svojstva na zdravlje korisnika, kroz prevenciju i tretman bolesti. U modernom vremenu, naročito se ističe veza između industrijski neobrađene hrane, antioksidativnih svojstava i smanjene stope nastanka karcinoma (Dai i Mumper, 2010). Iako industrijski neobrađena hrana, popularno prozvana i hrana *prirodnog* porekla, ima značajnu ulogu u prevenciji različitih bolesti, ne treba zaboraviti da ih ona neretko može i izazivati.

Štaviše, SZO ističe da ne treba pretpostavljati da atribut *prirodno* automatski označava sigurno za upotrebu. Biljke uobičajeno sintetišu širok spektar sekundarnih metabolita kao adaptivni odgovor na stresne uslove, što uključuje i zaštitu od herbivora (Manning, 2017). Na veliki broj toksičnih supstanci biljnog porekla, u koje se ubrajaju i sekundarni metaboliti biljaka, kod sisara kao imunološki odgovor mogu nastati alergijske reakcije. Biljke u svojstvu hrane pored alergijskih, imunološki posredovanih reakcija, mogu izazvati i netolerancije na funkcionalnu hranu usled poremećaja u funkcionisanju enzimskih sistema kod sisara. Trovanje biljkama prisutno je od kad i njihova upotreba i ono je bilo toliko često da su nastale i poznate parole koje opisuju vidljive simptome humanih intoksikacija, poput: „Bled kao krpa i lud kao da je jeo bunike”⁶. Navedene fraze odnose se pre svega na trovanje atropinom, alkaloidom biljnog porekla (Bhatia i sar., 2014). Poput atropina, koji se koristi kao medikament u periarestnim aritmijama (Vincent, 1997; Pantelić i sar., 2014), mnoge supstance biljnog porekla u jednim

⁶ Fraze na engleskom koje opisuju trovanje atropinom: „Blind as a bat, red as a beet, dry as a bone and mad as a hatter” (Bhatia i sar., 2014).

koncentracijama i načinima primene ostvaruju lekovita, a u drugim toksična svojstva. Takođe, varijabilne metaboličke obrade različitih živih bića mogu usloviti ispoljavanje lekovitih ili toksičnih svojstava određenih supstanci uključujući i onih prirodnog porekla (Watkins i Klaassen, 1986).

Tvrđnja da „zelena medicina” nije toliko bezbedna bez obzira na ustaljena mišljenja (Tewari i sar., 2019) i postulat da „doza čini otrov” impliciraju pitanje bezbednosti primene biljaka podfamilije Polygonoideae u humanoj i animalnoj ishrani i medicini. Kao poseban problem ističe se akcidentalna ishrana otrovnim biljkama kod preživara, koja često dovodi do disfunkcija bubrega i jetre, a neretko rezultira i smrtnim ishodom, što povlači velike ekonomske gubitke (Bhatia i sar., 2014). U literaturi pronalazimo da oksalacetat koji se akumulira u biljkama, između ostalog i u pojedinim vrstama familije Polygonaceae, izaziva bubrežne disfunkcije kao i promene u centralnom nervnom sistemu (Burrows i Tyrl, 1989). Diskutovano je da ingestija *P. aviculare* kod konja dovodi do letalnog trovanja nitritima. Nadalje, *P. maculosa* je navedena na listi otrovnih biljaka za preživare Udampur okruga Indije (Bhatia i sar., 2014). U Taragandi (Australija) 2009. godine sa različitih rančeva prijavljena je visoka stopa uginuća krava. Nakon detaljnih ispitivanja ovih slučajeva, koja su uključila i analizu ishrane, iznet je zaključak da je *P. lapathifolia* izazvala fotosenzitivnost (toksičnost na koži) i fatalnu akutnu nekrozu jetre kod krava (Lugton i Woolacott, 2014). Nadalje, ekstrakt lišća *P. hydropiper* pokazuje toksično dejstvo na ribe (Kulakkattoickal, 1989). Sa druge strane, u Indijskoj tradicionalnoj medicini *P. amphibia* se koristila kao protivotrov od trovanja opijumom (Bolotova, 2015). Takođe, prema *in vivo* istraživanjima na miševima, *B. officinalis* se pokazala kao bezbedna za korišćenje (Ali i sar., 2015).

Iako je evaluacija toksičnosti izazov kliničke medicine, uzevši u obzir sve navedeno, a i usled problema popularizacije i pogrešne interpretacije rezultata *in vitro* istraživanja koja su dovela do idealizacije biljnih droga, ispitivanja toksičnosti potencijalnih biljnih medikamenata su prioritarna. Od testova koji su ekonomični, a uključuju mogućnost ekstrapolacije rezultata na sisarske modele i procenu rizika u određenom stepenu, ističe se embrionalni test toksičnosti na zebricama, *Danio rerio*. Njihov genom odlikuje 70% homologije sa humanim genomom. U sistemu testiranja toksičnosti agenasa poput potencijalnih hemioterapeutika, ovaj model omogućava prelazak od *in vitro* testova ka kliničkim studijama (Barros i sar., 2008; Falcão i sar., 2018). Štaviše, zebriice mogu poslužiti kao alat za izučavanje efikasnosti hemioterapeutika na malignim ćelijama izolovanim iz zasebnih pacijenata i introdukovanih u embrion zebriice, što omogućava razvijanje personalizovane hemioterapije (Van der Ent i sar., 2015).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Dosadašnja biološka ispitivanja i etnofarmakološka saznanja sugerišu da ekstrakte biljaka iz podfamilije Poligonoideae odlikuju antimikrobna i hemioterapeutska svojstva. Međutim, literaturni podaci o antimikrobnim, citotoksičnim i antioksidativnim svojstvima Poligonoideae biljaka su nepotpuna. Većina istraživanja se odnosi na ispitivanja bioloških efekata biljnih ekstrakata bez njihovog kombinovanja sa komercijalnim antibioticima i citostaticima. Nadalje, ispitivanja antioksidativnih efekata ovih biljaka se pre svega zasnivaju na hemijskim testovima uklanjanja slobodnih radikala, kao i na proceni potencijala vezivanja metalnih jona. Podaci o mehanizmima delovanja ekstrakata na genskom i ćelijskom nivou su takođe oskudni.

Shodno prethodno navedenom, osnovni ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:

- 1) analiza antimikrobnog efekta izabranih ekstrakata podfamilije Poligonoideae prema odabranim gljivama i bakterijama, izazivačima infekcija,
- 2) analiza citotoksične aktivnosti odabranih ekstrakata pojedinačno i u kombinaciji sa konvencionalnim citostatikom D,
- 3) ispitivanje uloge odabranih biljnih ekstrakata u odgovoru ćelije na oksidativni stres,
- 4) procena bezbednosti upotrebe selektovanih biljnih ekstrakata.

Da bi se realizovali glavni ciljevi, definisani su i brojni konkretni podciljevi, koji uključuju ispitivanja:

- antifungalnog efekta ekstrakata na gljive, biljne i humane patogene,
- antibakterijskog efekta ekstrakata na odabrane sojeve bakterija izazivača bolesti kod ljudi,
- efekta ekstrakata na formiranje biofilma, kao i na već formirani biofilm,
- efekta ekstrakata na međućelijsku komunikaciju (QS) u biofilmu, praćenjem efekata ekstrakata na transkripcione regulatore QS,
- kombinovanog efekta biljnih ekstrakata i antibiotika Str na izabranim bakterijskim sojevima,
- metaboličke aktivnosti tretiranih ćelija MTT testom,
- tipa interakcija biljnih ekstrakata i citostatika D u kombinaciji, koje se karakterišu matematičkom procenom indeksa interakcije kombinovanog efekta,
- efekta ekstrakata i citostatika D, pojedinačno i u kombinaciji, na apoptozu i zaustavljanje ćelijskog ciklusa,
- uticaja ekstrakata na ekspresiju enzima antioksidativne zaštite, superoksid dismutaze 1 i 2 i katalaze,
- regulacije ekspresije *Keap1* i *Nrf2* gena,
- toksičnosti biljnih ekstrakata na modelu *Danio rerio*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Biljni ekstrakti

Priprema biljnih ekstrakata je vršena na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu pod neposrednim rukovodstvom dr Emilije Svirčev. Potreban biljni materijal korišćen za pripremu ekstrakata su sačinjavali nadzemni delovi biljaka (herbe) i rizomi od odabranih biljnih vrsta koje su pripadale sledećim rodovima: *Polygonum*, *Persicaria*, *Bistorta* i *Fagopyrum*. Ukupno je napravljeno 12 biljnih ekstrakata. Ekstrakti herbi, čija je oznaka obeležena u zagradama, dobijeni su od sledećih biljnih vrsta: *Polygonum aviculare* (POAh), *Polygonum maritimum* (POMh), *Persicaria amphibia* (PEAh), *Persicaria maculosa* (PEMh), *Persicaria lapathifolia* (PELh), *Persicaria hydropiper* (PEHh), *Bistorta officinalis* (BIOh) i *Fagopyrum esculentum* (FAEh). Ekstrakti rizoma dobijeni su od: *Polygonum aviculare* (POAr), *Persicaria lapathifolia* (PELr), *Persicaria hydropiper* (PEHr) i *Bistorta officinalis* (BIOr). Lokaliteti prikupljanja biljnog materijala, brojevi vaučera determinisanog biljnog materijala kao i detaljan način ekstrakcije dat je u **PRILOG 1 (Slika 41; Tabela 20)**.

3.1.2. Mikroorganizmi

Mikroorganizmi korišćeni u ovom radu su prikazani u **Tabeli 6**.

Tabela 6. Sojevi mikroorganizama

Bakterijski sojevi	Izvor
Gram pozitivni sojevi	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923),	ATCC kolekcija
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19111),	ATCC kolekcija
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	ATCC kolekcija
Gram negativni sojevi	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739),	ATCC kolekcija
<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 9199),	ATCC kolekcija
<i>Salmonella enteritidis</i> var. Enteritidis (ATCC 13076)	ATCC kolekcija
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442),	ATCC kolekcija
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (DSMZ 22644)	DSMZ kolekcija
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Laboratorijska kolekcija Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu
<i>P. aeruginosa</i> PAOJP2 (pKD-rhlA)	Laboratorijska kolekcija Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu

MATERIJAL I METODE

<i>P. aeruginosa</i> PA14-R3 (Δ lasI Prsal:: <i>lux</i>)	Laboratorijska kolekcija Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Δ pqsA (CTX <i>lux</i> :: <i>pqsA</i>)	Laboratorijska kolekcija Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Laboratorijska kolekcija Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Mikromicete	Izvor
<i>Alternaria alternata</i>	Laboratorijska kolekcija Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” (Prirodni izolati sa cvetova <i>Calendula officinalis</i>)
<i>Aspergillus</i> sp.	Laboratorijska kolekcija Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” (Prirodni izolati sa cvetova <i>C. officinalis</i>)
<i>Penicillium</i> sp.	Laboratorijska kolekcija Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” (Prirodni izolati sa cvetova <i>C. officinalis</i>)
<i>Fusarium semitectum</i>	Laboratorijska kolekcija Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” (Prirodni izolati sa cvetova <i>C. officinalis</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Laboratorijska kolekcija Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” (Prirodni izolati sa cvetova <i>C. officinalis</i>)

3.1.3. Čelijske kulture

Čelijske kulture korišćene u ovom radu su prikazane u **Tabeli 7**. Čelijske linije ATCC kolekcije (eng. American Type Culture Collection; Manasas, VA, SAD) i ECACC kolekcije (eng. The European Collection of Authenticated Cell Cultures; Solsberi, Engleska) su dobijene od Dr Bojane Žegure sa Nacionalnog Instituta Biologije (Slovenia) i Dr Dragane Četojević-Simin sa Onkološkog Instituta Vojvodine (Sremska Kamenica, Srbija).

Tabela 7. Kulture humanih čelijskih linija

Oznaka čelijske linije	Izvor	Naziv
HepG2 (ATCC HB 8065)	Laboratorijska kolekcija Nacionalnog Instituta Biologije, Slovenija	Humani hepatocelularni karcinom

A549 (ATCC CCL-185)	Laboratorijska kolekcija Onkološkog Instituta Vojvodine, Sremska Kamenica, Srbija	Humani epitelijalni plućni adenokarcinom
MRC-5 (ECACC 84101801)	Laboratorijska kolekcija, Onkološkog Instituta Vojvodine, Sremska Kamenica, Srbija	Fetalni fibroblasti pluća

3.1.4. Podloge i rastvori za rad sa mikroorganizmima

Podloge i rastvori korišćeni prilikom rada sa mikroorganizmima su pravljani prema priloženim protokolima (**Tabela 8**). Sterilizacija podloga je vršena autoklaviranjem 15 min na 121°C. Sterilizacija rastvora je vršena filtriranjem.

Tabela 8. Protokoli za pripremanje podloga i reagenasa korišćenih u eksperimentalnom radu sa mikroorganizmima

Mikrobiološke podloge	Sastav	Količina (g)*
Luria-Bertani bujon (LB)	NaCl	5
	Bakto tripton	10
	Ekstrakt kvasca	5
Luria-Bertani agar (LA)	NaCl	5
	Bakto tripton	10
	Ekstrakt kvasca	5
	Agar	15
Miler-Hinton bujon (MHB)	MHB prah	21
Miler-Hinton agar (MHA)	MHB prah	21
	Agar	15
eng. Brain- Heart Infusion bujon (BHI)	BHI prah	37
eng. Brain- Heart Infusion agar (BHA)	BHI prah	37
	Agar	15
Krompirov dekstrozni agar (eng. potato dextrose agar, PDA)	PDA prah	39
M8 medijum	Na ₂ HPO ₄	5
	KH ₂ PO ₄	3
	NaCl	0,5
	Agar	5

	Sastav	Količina
Fiziološki rastvor	NaCl	9 g
Brom-timol plavo	BTP	50 µL
	NaOH	8 µL
	H ₂ O	100 µL

*Predstavljena količina je rastvarana u 1L dH₂O, osim ako nije drugačije naznačeno u tabeli

3.1.5. Podloge i reagensi za gajenje humanih ćelija

Za gajenje humanih ćelija upotrebljavane su gotove podloge i puferi, nabavljeni od Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemačka). Za gajenje HepG2 ćelija je korišćen Williams-ov medijum sa D-glukozom finalne koncentracije 4,5% i L-glutaminom finalne koncentracije 2 mM i dodatkom fetalnog goveđeg seruma (FBS) finalne koncentracije 15%, rastvora antibiotika penicilina (100 IU/mL) i Str (100 µg/mL). Za gajenje A549 i MRC-5 ćelija je korišćen DMEM medijum (eng. Dulbecco's modified eagle medium) sa D-glukozom finalne koncentracije 4,5% i L-glutaminom finalne koncentracije 2 mM. Medijum je suplementiran sa FBS finalne koncentracije 10% i rastvorom antibiotika penicilina (100 IU/mL) i Str (100 µg/mL). Za ispiranje ćelija korišćen je fosfatni pufer (eng. Dulbecco's buffer saline, PBS). Za tripsinizaciju ćelija je korišćen 0,1% rastvor tripsina (Gibco Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD) (**Tabela 9**).

Tabela 9. Protokoli za pripremanje medijuma i reagenasa korišćenih u eksperimentalnom radu sa ćelijskim kulturama

Medijumi za gajenje ćelija	Sastav	Količina (mL)
DMEM medijum sa dodatkom D-glukoze finalne koncentracije 4,5% i L-glutamina finalne koncentracije 2 mM	DMEM	44,5
	FBS	5
	rastvor antibiotika streptomycin/penicilin	0,5
Wilijamsov medijum sa dodatkom D-glukoze finalne koncentracije 4,5% i L-glutamina finalne koncentracije 2 mM	Wilijamsov medijum	42
	FBS	7,5
	rastvor antibiotika streptomycin/penicilin	0,5
Rastvori i reagensi	Sastav	Količina
1xPBS	10xPBS	45 mL

	dH ₂ O	5 mL
Pufer za liziranje	50 mM Tris pH 7,5	0,06057 g
	150 mM NaCl	0,08766 g
Rastvor 1	1% PBS	10 mL
	20 mg K-Na tartarata	20 mg
	CuSO ₄	2 mL
Rastvor 2	Na ₂ CO ₃	10 g
	NaOH	2 g
	H ₂ O	500 mL
Radni reagens	Rastvor 1	1 mL
	Rastvor 2	49 mL

3.1.6. Odabrani citostatik korišćen u tretmanima humanih ćelija

Korišćeni citostatik D je predstavljao ostatak rastvora davanog pacijentima sa malignitetima i dobijen je sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu. Primarni stok dobijenog citostatika iznosio je 5 mg/mL.

3.1.7. Odabrani antibiotik korišćen u tretmanima mikroorganizama

Str je pribavljen od firme Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Primarni stok antibiotika pravljen je u koncentraciji 20 mg/mL u destilovanoj vodi.

3.1.8. Prajmeri za qRT-PCR

Prajmeri korišćeni u kvantitavnoj RT-PCR analizi predstavljeni su u **Tabeli 10**. Prajmeri su pribavljeni od Invitrogen Life TechnologiesTM (Carlsbad, KA, SAD).

Tabela 10. Prajmeri korišćeni u kvantitativnoj qRT-PCR analizi

Naziv gena	Simbol za gen	Sekvenca prajmera (5'-3')	Ćelijska linija
eng. Kelch-like ECH-associated protein 1	<i>Keap1</i>	Forward: GACAGCCTCTGACAACACAAC Reverse: GAAATCAAAGAACCTGTGGC	HepG2; A549
eng. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	<i>Nrf2</i>	Forward: CCTCAACTATAGCGATGCTGAATCT Reverse: AGGAGTTGGGCATGAGTGAGTAG	HepG2; A549

eng. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	<i>Nrf2</i>	Forward: TCCGGGTGTGTTTGTTCCAA	
		Reverse: CGCCCGCGAGATAAAGAGTT	MRC-5
Beta aktin	β -aktin	Forward: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	
		Reverse: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	HepG2; A549; MRC-5

3.1.9. Antitela upotrebljivana u imunoblotu

U imunoblotu su korišćena sledeća antitela:

- Zečje poliklonsko antitetlo za identifikaciju ćelija koje ekspimiraju SOD1, SOD2 i KAT
- Mišje monoklonsko antitelo za identifikaciju ćelija koje ekspimiraju β -aktin
- Kozje anti-zečje poliklonalno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena za detekciju SOD1, SOD2 i KAT
- Zečje antimišje poliklonalno antitelo za detekciju β -aktina

3.2. Metode

3.2.1. Priprema mikromiceta

Mikromicete su gajane na PDA podlozi, u periodu 10 do 21 dana, u zavisnosti od vrste gljive.

3.2.2. Procena inhibicije rasta mikromiceta

In vitro ispitivanje antifungalnog efekta odabranih biljnih ekstrakata je vršeno procenom zona inhibicija rasta mikromiceta na PDA podlogama. Po 100 μ L odabrane koncentracije ekstrakata (**Tabela 11**) je utrljavano staklenim štapićem na PDA podloge, tako da se test supstanca homogeno rasporedi. Potom je sprovedena inokulacija gljiva. Izrasli micelijumi sledećih gljiva: *A. alternata*, *F. semitectum* i *F. oxysporum* su isecani u vidu diska prečnika do 10 mm i prenošeni na centralni deo PDA podloge u koje je dodavan odgovarajući ekstrakt. Zbog rasejavanja spora, inokulacija *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. je vršena ezom, pri čemu je deo materijala sa izraslih kultura postavljan u centar PDA podloge sa dodatkom ekstrakta. Kulture su inkubirane na 25-28°C 7 dana. Nakon inkubacije meren je prečnik izraslih micelijuma. Rast netretiranih gljiva je predstavljao kontrolu. Delovanje ekstrakata je izraženo kroz jednačinu:

$$\%I = 100x(dkxdt)/dk$$

Pri čemu je I-inhibicija rasta micelija izražena u procentima; dk-rast micelija kontrole u mm; dt-rast micelija tretiranih ekstraktima u mm.

Tabela 11. Ispitivane koncentracije testiranih ekstrakata

Biljni ekstrakti	Finalne koncentracije ekstrakta po Petri šolji (mg/mL)	
	testirane prema <i>A. alternata</i> , <i>Penicillium sp.</i> i <i>F. oxysporum</i>	testirane prema <i>Aspergillus sp.</i> i <i>F. semitectum</i>
POAh	1,004	5,02
POAr	1,048	5,24
POMh	1,005	5,02
PEAh	1,007	5,03
PEMh	2,006	10,03
PELh	1,997	9,98
PELr	2,007	10,03
PEHh	2,001	10,05
PEHr	2,004	10,02
BIOh	2,001	10,05
BIOr	2,016	10,08
FAEh	1,978	9,89

3.2.3. Praćenje morfoloških promena spora gljiva konfokalnom mikroskopijom

U cilju praćenja morfoloških promena na sporama *Aspergillus sp.* odabran je najefikasniji ekstrakt i nakon tretmana je sprovedeno bojenje brom-timol plavim, a promene su praćene konfokalnom mikroskopijom. Na predmetnu pločicu je nanesa boja brom timol plavo, nakon čega je sterilnom ezom razmazan zahvaćeni deo kulture. Nakon pravljenja tankog sloja polaznog materijala prekrivenog bojom, vršena je inkubacija u trajanju od 3 minuta. Preparat je posmatran konfokalnim mikroskopom.

3.2.4. Priprema premonoćnih bakterijskih kultura

Sa odgovarajućih išaranih ploča sterilnom ezom je zahvaćena jedna bakterijska kolonija nakon čega je vršena inokulacija u 3 mL odgovarajućih tečnih podloga. Zasejane kulture i sam medijum (kontrola sterilnosti) su inkubirane u termostatu preko noći na 37°C.

3.2.5. Mikrodilucioni testovi

Od mikrodilucionih testova sa rezazurinom kao indikatorom ćelijskog rasta sprovedeni su MIK test, radi određivanja bakteriostatskih koncentracija biljnih ekstrakata i Str testiranih pojedinačno, kao i metoda šahovske table (eng. checkerboard assay) koja je sprovedena radi određivanja vrste interakcije odabranih koncentracija biljnih ekstrakata i Str u kombinaciji.

3.2.5.1. Priprema bakterija za mikrodilucione testove

Pripremljene prekonocne kulture su zasejavane u 30 mL odgovarajuće podloge i inkubirane na 37°C na 185 rpm do dostizanja odgovarajuće brojnosti koja je iznosila 10^8 bakterija/mL. Rast bakterija praćen je spektrofotometrijskim merenjem optičke gustine (OD_{600}) (UV-630 pc Double Beam Spectrophotometer, MRC) pri čemu su upoređivane dobijene vrednosti sa predhodno konstruisanim kalibracionim krivama rasta. BHI tečni medijum korišćen je tokom ispitivanja *L. monocytogenes*, dok je MHB bujon upotrebljavan prilikom testiranja ostalih bakterija. Nakon dostizanja odgovarajuće brojnosti, bakterijske kulture su centrifugirane 10 min na 4000 rpm (Medifuge, Nemačka), a potom je talog resuspendovan u istom volumenu u 0,01 M $MgSO_4$. Dobijena suspenzija je zatim razblažena do finalne koncentracije koja je iznosila 10^6 bakterija/mL.

3.2.5.2. Određivanje minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije

U mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića ravnog dna (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) pravljena je serija dvostrukih razblaženja test supstanci u odgovarajućem medijumu. Nakon pravljenja gradijenta razblaženja test supstanci (koncentracionog opsega od 0,625 do 5 mg/mL) u bunariće je dodavano 20 μ L bakterijske suspenzije (10^6 bakterija/mL) i medijum do dostizanja ukupne zapremine od 200 μ L po bunaru. Na kraju je u svaki bunar nanešeno 22 μ L resazurina, finalne koncentracije 0,675 mg/mL. Prva kolona bunarića u ploči predstavljala je kontrolu sterilnosti, druga negativnu kontrolu (kontrolu bakterijskog rasta), treća pozitivnu kontrolu, a četvrta kontrolu rastvarača. Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik Str. Kao rastvarač korišćen je dimetil sulfoksid (DMSO). Pripremljene mikrotitarske ploče su obavijane parafilmom i inkubirane na 37°C do promene boje indikatora, oko 24 h. Posle inkubacije procenjen je rast ćelija posmatranjem prisustva ili odsustva promene boje indikatora iz ljubičaste u rozu. Promena boje indikatora omogućena je delovanjem oksidoreduktaza iz živih ćelija. Resazurin, ljubičasta boja, usled dejstva navedenog enzima se redukuje do rezorufina ružičaste obojenosti. Upravo ta promena boje, koja se vizuelno detektuje, omogućava određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).

Radi potvrde bakteriostatske, MIK koncentracije, i radi određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBK), sterilnom ezom je zahvatan sadržaj iz bunarića u kojima je nakon inkubacije i dalje prisutna ljubičasta boje, odnosno u kojima je detektovano odsustvovao rasta bakterija. Potom je kratkim pokretima eze, crtana zmijica na odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Nakon inkubacije, 37°C 24 h, posmatran je izostanak ili prisustvo rasta na podlozi, i potvrđene su MIK i MBK koncentracije.

3.2.5.3. Evaluacija uticaja ekstrakta i Str u kombinaciji metodom šahovske table (eng. checkerboard assay)

Za procenu efekta kombinacije antimikrobnih agenasa protiv selektovanih patogenih mikroorganizama odabran je ekstrakt sa najefektivnijim antibakterijskim delovanjem i komercijalni antibiotik Str, pri čemu je korišćena dvodimenzionalna, dvo-agensna mikrodiluciona metoda (eng. two-agent broth microdilution checkerboard assay). Ukratko, serija razblaženja smeše dva agensa je kreirana u 96-bunarnoj mikrotitarskoj ploči pri čemu je u samoj ploči pravljen vertikalni gradijent koncentracije prve supstance, a naknadno su unesena odgovarajuća razblaženja druge supstance po horizontalnoj liniji ploče. Razblaženja prve supstance antibiotika, Str i druge supstance, odabranog biljnog ekstrakta, su pravljena u MHB medijumu u opsegu vrednosti od $1/32 \times \text{MIK}$ do $4 \times \text{MIK}$. Kao kontrola rasta korišćene su netretirane bakterije, a kao negativna kontrola bakterije tretirane sa DMSO. U bunariće je dodato po 20 μ L bakterijske suspenzije (osim u blank) tako da je broj bakterija iznosio 2×10^4 bakterija/bunaru. Ukupna zapremina po bunaru je iznosila 200 μ L. Na kraju je dodato 22 μ L resazurina. Inkubacija je

vršena na 37°C 24 h. Nakon inkubacije tražene su one kombinacije ekstrakta i antibiotika koje ne dovode do promene boje rezazurina (MIK) i računane su FICI vrednosti po sledećoj formuli:

$$\text{FICI} = (\text{MIKa1} / \text{MIKa2}) + (\text{MIKb1} / \text{MIKb2})$$

Pri čemu je FICI- indeks frakcione inhibitorne koncentracije za dva testirana agensa. MIKa1- koncentracija prve supstance u kombinaciji kojom je dostignuta MIK vrednost; MIKa2- minimalna inhibitorna koncentracija prve supstance primenjene individualno; MIKb1- koncentracija druge supstance u kombinaciji kojom je dostignuta MIK vrednost; MIKb2- minimalna inhibitorna koncentracija druge supstance primenjene individualno.

Dobijene vrednosti ukazale su na sledeće vrste interakcija: sinergizam ($\text{FICI} < 0,5$), aditivnost ($0,5 < \text{FICI} \leq 1$), indiferentnost ($1 < \text{FICI} \leq 4$) i antagonizam ($\text{FICI} > 4$) (Karlowsky i sar., 2006). Prema Odds (2003) FICI vrednosti se mogu interpretirati i na sledeći način: sinergizam ($\text{FICI} \leq 0,5$), antagonizam ($\text{FICI} > 4,0$) i bez interakcije ($0,5 < \text{FICI} \leq 4,0$). Radi što preciznijeg opisa vrste interakcije, u našem istraživanju rezultati su okarakterisani prema Karlowsky i sar. (2006).

3.2.6. Procena uticaja ekstrakta na formiranje biofilma

Kvantifikacija bakterija koje formiraju biofilm, prethodno tretirane ekstraktima, je vršena primenom kristal violet testa (CV test). Po 100 μL pripremljene bakterijske suspenzije (1×10^6 CFU/mL za *S. aureus*, *S. Enteritidis* i 5×10^7 CFU/mL za *P. aeruginosa* PAO1) je sipano u bunariće mikrotitarske ploče sa ravnim dnom. U prvoj koloni 96-bunarne ploče nalazila se blank kontrola, a u drugoj kontrola rasta bakterija. Preostale kolone služile su za ispitivanje delovanja željenih koncentracija ekstrakta (10, 50 i 100 $\mu\text{g/mL}$) na odabrane bakterije koje formiraju biofilm. Biofilm je razvijan u prisustvu ekstrakta 16 h na 37°C. Nakon inkubacije medijum iz bunara je dekantovan, a formirani biofilmovi su isprani sa destilovanom vodom i bojeni sa 0,1% kristal-violetom (100 μL). Inkubacija sa bojom je vršena 15 min na sobnoj temperaturi. Radi uklanjanja viška boje biofilmovi su dodatno ispirani destilovanom vodom, a absorbovani kristal-violet od strane bakterija je rastvoren dodavanjem 100 μL apsolutnog etanola i dodatno inkubiran 10 min. Potom je merena optičke gustine OD₅₇₀ u čitaču mikrodilucionih ploča (Tecan Multiplate Reader, Švajcarska). Iznos rastvorene boje je direktno proporcionalan broju bakterija koje ulaze u sastav biofilma, tj. boji se sveukupna masa biofilma.

3.2.7. Procena uticaja ekstrakata na već formirani biofilm

Ispitivanje uticaja biljnih ekstrakata na već formirani biofilm je sprovedeno u *in vitro* uslovima upotrebom silikonskih diskova kao modela biomaterijala. Silikonski diskovi prečnika 1 cm su postavljani u 12-bunarne mikrotitarske ploče. Nakon prekonoćne UV sterilizacije u bunariće sa silikonskim diskovima je dodato po 1 mL bakterijske suspenzije (10^6 bakterija/mL) koja je prethodno pripremljena u MHB bujonu. Posle 24 h inkubacije diskovi su ispirani sa 1% PBS kako bi se uklonile neadherirane ćelije. Posle ispiranja diskovi su prebacivani u novu 12-bunarnu ploču, a adherirane ćelije su tretirane sa željenom koncentracijom ekstrakta (1/32MIK-2MIK). Nakon inkubacije (24 h, 37°C) medijum sa ekstraktima koji je sadržao neadherirane (odlepljene) ćelije poreklom iz biofilma je korišćen za procenu efekta ekstrakta na vijabilnost bakterija u suspenziji poreklom iz zrelog biofilma. Dalje su diskovi potapani u 3 mL 10 mM fosfatnog pufera u epruvetama za centrifugiranje, pri čemu je razdvajanje ćelijskog biofilma vršeno u ultrazvučnom kupatilu 10 minuta (60 Hzi 150 W). Broj adheriranih i neadheriranih (odlepljenih) bakterija je određen indirektnom metodom.

3.2.8. QS testovi

3.2.8.1. Test produkcije violaceina *Chromobacterium violaceum* CV026

Efekat biljnih ekstrakata i čistih konstituenata prisutnih u ekstraktima na međubakterijsku komunikaciju najpre je ispitivan disk difuzionom metodom na biotest soju *Chromobacterium violaceum* CV026 prema protokolu Borges i sar. (2014). Soj CV026 je konstruisan bez sposobnosti samostalne produkcije pigmenta violaceina, indukcijom mutacije u genu za sintezu autoinducerskih molekula. Sposobnost soja CV026 da sintetiše ljubičasti pigment violacein moguć je tek nakon egzogenog dodavanja autoinducerskih molekula (homoserin laktona) (McClellan, 1997). U skladu sa navedenim test inhibicije produkcije violaceina odvijao se na sledeći način: U 5 mL polučvrstog 0,3% LB medijuma inokulisano je 50 μ L bakterijske kulture *C. violaceum* CV026. Produkcija ljubičastog pigmenta violaceina je indukovana N-heksanoil-L-homoserin laktonom (HLL) koji je dodat (5 μ L iz stoka od 10 μ g/mL) simultano sa bakterijama u polučvrst medijum. Nakon mešanja smeša je homogeno razlivena na LA podlogu. Po stezanju polučvrstog agara, postavljani su celulozni diskovi od filter papira na koje su nanošeni izabrani ekstrakti (250 mg/mL), čisti konstituenti ekstrakta (100 μ g/disk) i DMSO (5 μ L). DMSO je korišćen kao kontrola rastvarača. Inhibicija sinteze violaceina detektovana je pojavom depigmentisane, opalescentne, zone oko diskova na tamnoj pozadini.

3.2.8.2. Test produkcije piocijanina

Produkcija piocijanina je praćena na biotest soju *P. aeruginosa* PA14 prema protokolu O'Loughlin i sar. (2013). *P. aeruginosa* PA14 je inokulisan u LB medijum sa dodatkom odabranog ekstrakta i 0,1% DMSO. Ovako pripremljena prekonocna kultura je centrifugirana 3000 rpm, 15 min. Odvojeni supernatant je propuštan kroz 0,22 μ m nitrocelulozne filtre (Millipore, Sigma-Aldrich, Nemačka), nakon čega je određivana optička gustina na UV-Vis spektrofotometru pri talasnoj dužini od 695 nm (Ultraspec 3300pro, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, SAD). Sva merenja su urađena u tri nezavisna eksperimenta, u triplikatu, a rezultat je izveden iz prosečne vrednosti izmerenih optičkih gustina.

3.2.8.3. Test pokretljivosti *P. aeruginosa* PAO1

Ispitivanje pokretljivosti preko procene veličine „rojenja” je izvršeno na M8 medijumu obogaćenim sa 0,2% glukozom, 0,5% kazamino kiselinom i 1 mM MgSO₄. M8 medijumu su dodavani odabrani ekstrakti (50 μ g/mL) i 0,1% DMSO. Bakterijska kultura *P. aeruginosa* PAO1 je inkubirana preko noći na 37°C/120 rpm, do gustine OD₆₀₀ = 0,4–0,6. Na pripremljene podloge, u centar petri šolje, je inokulisano 3 μ L prekonocne kulture, nakon čega je vršena inkubacija na 37°C 24 h. Testovi su urađeni u dva ponavljanja u triplikatu. Rezultati rasta su vizualno posmatrani nakon inkubacije i zabeleženi fotografisanjem.

3.2.8.4. Test interferencije ekstrakata sa QS signalnim putevima

Uticaj odabranih ekstrakata na različite signalne puteve QS komunikacije, je praćen posmatranjem aktivnosti tri transkripciona faktora (RhIR, LasR i PqsR) kod odabranih biosenzorskih sojeva: *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasI PrsA::lux) (Massai i sar., 2011), *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhlA (Δ rhlA PrhA::lux) (Duan i Surette, 2007) i *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX lux::pqsA) (Fletcher i sar., 2007). Navedeni sojevi predstavljaju mutante za proizvodnju odgovarajućih autoinducera koji uslovljavaju aktivnost DNK-vezujućih transkripcionih faktora RhIR, LasR i PqsR. Navedeni transkripcioni faktori se takođe nazivaju i R-proteinima pošto vezuju autoinducere. „R-proteini” u kompleksu sa egzogeno dodatim signalnim molekulima (3-okso-C12-HSL, C4-HSL i HHQ) se vezuju za odgovarajuće promotorne sekvence gena, pri čemu se pokreće kaskada događaja koji dovode do

bioluminiscencije, koja se detektuje ovim testom. Kako aktivnost kompleksa „R-proteina” i autoinducera uzrokuje pojavu bioluminiscencije, izmereni intenzitet bioluminiscencije jasno ukazuje na njihovu aktivnost.

Prekonočne kulture sojeva *P. aeruginosa* PA14-R3 ($\Delta lasI PrsA::lux$), PAOJP2/pKD-*rhIA* ($\Delta rhIA PrhIA::lux$) i PAO1 $\Delta pqsA$ (CTX *lux::pqsA*) su razblažene tako da se dostigne OD₆₀₀ = 0,045. Nakon podešavanja željene optičke gustine, bakterije su inkubirane u prisustvu ekstrakta/čistih supstanci i specifičnih autoinducera: 3-okso-C12-HSL, C4-HSL i HHQ. Čelijska gustina i bioluminiscencija su merene nakon 4 h na čitaču mikrotitarskih ploča (Tecan Infinite200 multiplate-reader, Tecan Group Ltd., Švajcarska). Bioluminiscencija je normalizovana prema čelijskoj gustini.

3.2.9. Priprema kulture humanih ćelija

Adherentne kulture humanih ćelija su zasejavane u odgovarajuće hranljive medijume u sterilnim flaskovima, zapremine od 50 do 250 mL. Ćelije su rasle do formiranja monosloja u inkubatoru na temperaturi 37°C, u atmosferi vazduha sa 5% CO₂, zasićenog vodenom parom (Binder, Holandija).

3.2.10. Pasažiranje kulture humanih ćelija

Nakon dostizanja određene brojnosti, odnosno nakon popunjavanja prostora flaska, ćelije su „pasažirane” tj. presejavane u novi medijum. Najpre je uklanjan potrošeni medijum, a monosloj ćelije ispiran sa 1% PBS. Odlepljivanje ćelija je omogućeno dodavanjem 0,1% rastvora tripsina koji je predhodno zagrejan (37°C). Vreme potrebno da tripsin deluje, odnosno da se ćelije odvoje od podloge je iznosilo 1 - 5 minuta pri temperatura od 37°C. Svetlosnim mikroskopom (Boeko, Nemačka) je proveravano odlepljivanje ćelija. Nakon dodavanja svežeg medijuma radi neutralisanja tripsina, čelijska suspenzija je centrifugirana na 800 rpm, 10 minuta. Čelijski talog je resuspendovan u 1 mL odgovarajućeg medijuma nakon čega su ćelije provlačene kroz iglu i špric, nakon čega je vršeno njihovo brojanje.

3.2.11. Procena broja vijabilnih ćelija

Broj vijabilnih ćelija u kulturi je procenjen direktnim brojanjem na hemocitometru, nakon bojenja tripan plavim (eng. trypan-blue metodom). 10 µL čelijske suspenzije je pomešano sa 20 µL 0,4% vodenog rastvora tripan plave boje i sipano je na hemocitometar. Ćelije su posmatrane pod mikroskopom i brojane pomoću hemocitometra u 4 vidna polja, nakon čega je preračunat broj živih, neobojenih ćelija prema formuli:

$$\frac{\text{broj neobojenih ćelija raspoređenih u 16 vidna polja}}{r \times V}$$

$$r \times V$$

odnosno

$$\frac{\text{broj neobojenih ćelija prebrojanih u 4 vidna polja} \times 4}{3 \times 10^{-4}}$$

$$3 \times 10^{-4}$$

pri čemu je u formuli 4 - broj potreban da bi se procenio broj ćelija u 16 vidnih polja; 3 - vrednost razblaženja (r); 10⁻⁴ predstavlja ukupnu zapreminu 16 vidnih polja (0.1 mm³=10⁻⁴ cm³; V). Kako je 1 cm² jednak 1 mL na ovaj način postavljena formula omogućava preračunavanje broja ćelija/mL.

3.2.12. Ispitivanje citotoksične aktivnosti *in vitro*

Citotoksična aktivnost biljnih ekstrakata pojedinačno i u kombinaciji sa citostatikom ispitana je primenom MTT testa. MTT test je zasnovan na metaboličkoj sposobnosti ćelija da konvertuju tetrazolijumovu so (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid (MTT), čiji je rastvor žute boje, u kristale formazana, koji imaju intenzivnu ljubičastu obojenost.

Mogućnost redukovanja MTT-a imaju samo metabolički aktivne ćelije, kod koji je prisutna aktivnost enzima sukcinat dehidrogenaze. Kolorimetrijsko očitavanje inteziteta ljubičaste boje, dobijene nakon rastvaranja kristala formazana, na 570 nm, služi za kvantifikaciju ćelijskog rasta. Način na koji je sproveden ovaj test je sledeći: 2×10^4 ćelija/bunaru je zasejano u 96 bunarne ploče i inkubirano 24 h na 37°C, u prisustvu 5% CO₂. Ćelije su nakon adherencije tretirane serijama dvostepenih razblaženja u koncentracionom opsegu od 0,125-4 mg/mL ekstrakta i 0,712-22,8 µg/mL D, pojedinačno i u mešavini. Nakon 24 h inkubacije medijum je uklanjan i dodavan je MTT rastvor (finalne koncentracije 0,5 mg/mL) i dodatnih 3 h je vršena doinkubacija. Na kraju inkubacije medijum je uklanjan i dodavan je DMSO. Optička gustina je merena na 570 nm, pomoću mikrolejt čitača (Multiskan FC, Thermo Scientific, Shingai, Kina). Tri nezavisna eksperimenata su primenjena i spoljašnji bunari su isključeni.

3.2.13. Utvrđivanje tipa interakcije test supstanci u kombinaciji na odabranim ćelijskim linijama

Da bi odredili vrstu interakcije između ekstrakta i D u smeši procenjivan je kombinovani indeks (CI). Vrednosti kombinovanog indeksa opisuju uzajamno delovanje agenasa ukazujući na jednu od sledećih vrsta interakcija: sinergizam (CI<1), aditivnost (CI=1) i antagonizam (CI>1) (Vasilijević i sar., 2018). CI je izračunat prema dobijenim IC₂₅ i IC₅₀ vrednostima koje su procenjene na osnovu očitavanja MTT testa. U svrhu procene CI korišćena je sledeća formula:

$$CI = C_1/C_{X1} + C_2/C_{X2}$$

gde je C₁-inhibitorna koncentracija prve testirane supstance u smeši pri kojoj je ostvareno 50% preživljavanja; C_{X1}- inhibitorna koncentracija prve supstance testirane pojedinačno pri kojoj je ostvareno 50% preživljavanja; C₂- inhibitorna koncentracija druge testirane supstance u smeši pri kojoj je ostvareno 50% preživljavanja; C_{X2}- inhibitorna koncentracija druge supstance testirane pojedinačno pri kojoj je ostvareno 50% preživljavanja.

3.2.14. Protočna citometrija

Metodama protočne citometrije vršeno je ispitivanje tipa ćelijske smrti i distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. U ovu svrhu upotrebljivan je FACS Kalibur protočni citometar (Calibur Becton Dickinson, Heidelberg, Nemačka) koji razvrstava ćelije prema ekscitiranom fluorescentnom signalu i specijalizovan kompjuterski softver (eng. cell quest computer software), u skladu sa preporukama proizvođača.

3.2.14.1. Priprema ćelija za ispitivanje tipa ćelijske smrti i analize ćelijskog ciklusa

U ploče sa 6 bunara zasejavano je 1×10^6 HepG2, A549 i MRC-5 ćelija. Nakon 24 h ćelije su tretirane odgovarajućim koncentracijama biljnih ekstrakata i D, u kombinaciji i pojedinačno. Pored navedenog tretmana, dva bunara sa ćelijskim monoslojem su odvojena kao kontrola rasta ćelija. Nakon 24 h inkubacije (48 h od zasejavanja) na 37°C i 5% CO₂, medijum je odlivan, ćelije su ispirane sa 1% PBS i tripsinizovane. Ćelije su resuspendovane u 1 mL 1% PBS i dalje korištene za određivanje tipa ćelijske smrti i analzu ćelijskog ciklusa.

3.2.14.2. Određivanje tipa ćelijske smrti

Procenat apoptotičnih i nekrotičnih ćelija je određivan korišćenjem Annexin V-FITC kita za detekciju apoptoze i aminoaktinomycin D boje (7-AAD) prema protokolu predloženom od Srdić-Rajić i sar. (2016). Princip testa je zasnovan na raspoređivanju ćelija po veličini i fluorescenciji, pri čemu je fluorescentni signal posledica vezivanja boja za različite ćelijske komponente. U ranoj apoptozi aneksin V koji nosi boju FITC se vezuje za fosfatidilserin grupe izvrnute na spoljašnjoj strani ćelijske membrane. U kasnoj apoptozi/nekrozi 7-AAD prolazi kroz oštećenu ćelijsku membranu i interkalira se u DNK

molekul. Sumirano, ovim testom se razlikuju vijabilne ćelije (FITC⁻/7AAD⁻), ćelije u ranoj apoptozi (FITC⁺/7AAD⁻), ćelije u kasnoj apoptozi/nekrozi (FITC⁺/7AAD⁺) i ćelijski debri. Ćelijski debri predstavljaju DNK fragmenti razorenih ćelija koji su obojeni sa 7AAD, ali su ovi fragmenti odvojeni od kasno apoptotičnih/nekrotičnih ćelija usled drugačije veličine obojenih fragmenata, pri čemu ćelijski debri odlikuju veoma kratki fragmenti. Sam protokol ispitivanja tipa ćelijske smrti nakon pripreme suspenzije tretiranih ćelija je uključivao prebacivanje 100 µL ćelijeke suspenzije u BD Falcon™ polipropilenske epruvete (BD BIOSCIENCES, Belgija) i dodavanje 1 mL 1% PBS. Nadalje, ovako pripremljene ćelije su centrifugirane 10 min na 1800 rpm, i resuspendovane u 100 µL pufera za vezivanje sa dodatkom 5 µL aneksin V-FITC i 5 µL 7-AAD boje. Ćelije su blago vorteksovane i inkubirane 15 min na 25°C u mraku. Potom je dodavano 400 µL pufera za vezivanje u svaku epruvetu, nakon čega je analiziranje vršeno na protočnom citometru.

3.2.14.3. Ispitivanje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Kvantitativno merenje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je sprovedeno prema protokolu predloženom od Srđić-Rajić i sar. (2016), analizom DNK sadržaja fiksiranih HepG2, A549 i MRC-5 ćelija, nakon bojenja propidijum jodidom (PI). Nakon centrifugiranja ćelijske suspenzije, fiksiranje ćelija je vršeno 70% ledeno hladnim etanolom, nakon čega su ćelije držane na -20°C u trajanju od 30 min. Hlađenjem ćelija omogućava se difundovanje boje u ćeliju. Potom su ćelije dva puta isprane 1% PBS i dodata je RNazaA (finalne koncentracije 200 µg/mL) i PI (finalne koncentracije 50 µg/mL) i inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Ovako obojene ćelije podvrgnute su protočnoj citometrijskoj analizi.

3.2.15. Ispitivanje uticaja i mehanizma delovanja testiranih ekstrakata na produkciju antioksidativnih enzima u humanim ćelijama *in vitro*

3.2.15.1. Priprema ćelijskih lizata

Izolovanje proteina iz ćelija vršeno je njihovim liziranjem u prisustvu odgovarajućeg pufera za liziranje. U 12 bunarnoj ploči je zasejavano 6×10^5 ćelija/bunaru. Nakon 24 h ćelije su tretirane ekstraktima i D, pojedinačno i u kombinaciji (IC₂₅). Posle 24 h tretmana ćelije su tripsinizovane, centrifugirane (1600 rpm) i ispirane sa ledeno hladnim 1% PBS-om. Nakon toga su ćelije opet centrifugirane (6300 rpm) pri temperaturi od 4°C, nakon čega je dodat pufer za liziranje kojem su neposredno pre korišćenja dodati inhibitori proteaza i 1% triton. Vršena je 30 minutna inkubacija na ledu. Nakon ovoga usledilo je još jedno centrifugiranje na 6300 rpm. Dobijeni supernatant je prebacivan u sterilne vajičice i čuvan na -70°C do daljeg rada.

3.2.15.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Loriju (eng. Lowry)

Koncentracija proteina u supernatantu je određivana spektrofotometrijskom metodom po Loriju (Lowry i sar., 1951). Ova metoda je zasnovana na merenju apsorbance (750 nm) dva obojena kompleksa, biuretskog i redukovano kompleksa fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina formiraju Folin-Chicalteau-ov reagens, koji je u oksidovanom stanju žute boje, a redukcijom pomoću aminokiselina tirozina, triptofana i cisteina menja boju u plavo. Intenzitet boje je proporcionalan broju peptidnih veza i koncentraciji redukujućih grupa. Sama metoda je rađena po sledećem protokolu; uzorci su razblaženi u miliQ H₂O u odnosu 1:10. U ependorfice je sipano po 100 µL odgovarajućeg razblaženja uzorka i 100 µL 2% natrijumdodecilsulfata (eng. sodium dodecyl sulfate, SDS). Nakon dodavanja po 3 mL radnog reagensa vršena je inkubacija 10 min. Potom je dodavano po 100 µL Folin-Chicalteau reagensa i sprovedena je inkubacija 20 min u mraku. Koncentracija proteina određivana je merenjem apsorbance uzoraka na 750 nm i tačaka standardne krive korišćenjem parametara

linearne regresije. Standardna kriva konstruisana je na osnovu očitanih vrednosti serije razblaženja BSA standarda (eng. bovine serum albumin) u rasponu od 2,5 do 200 μg .

3.2.15.3. Ispitivanje aktivnosti antioksidativnih enzima imunoblot tehnikom

Za utvrđivanje relativne količine antioksidativnih proteina u humanim ćelijama tretiranih ekstraktima i D, pojedinačno i u kombinaciji korišćena je imunoblot metoda. Nakon određivanja ukupne koncentracije proteina iz ćelijskih lizata, prema najnižoj dobijenoj koncentraciji ujednačena je vrednost ukupnih proteina u svim uzorcima. Koncentracija uzoraka po bunaru je iznosila 20 μg za ispitivanje SOD1 i SOD2, odnosno 50 μg za ispitivanje KAT. Pre nanošenja uzoraka na gel, vršena je denaturacija proteina. Uzorci su zagrevani na 100°C i dodavan je 2- β -merkaptoetanol. Svrha navedenog tioalkohola je redukcija disulfidnih veza između subjedinica proteina. Nakon denaturacije proteina uzorci su nalivani u bunariće gela i razdvajanje proteina po veličini je vršeno pomoću SDS poliakrilamid gel elektroforeze (SDS PAGE). Razdvajanje proteina kroz 12% SDS poliakrilamidni gel je omogućeno korišćenjem elektroforetskog pufera i delovanjem spoljašnjeg električnog polja jačine 100-200 V. Puffer za SDS PAGE kao denaturišuće sredstvo sadrži anjonski deterdžent SDS. Negativno naelektrisani SDS se obmotava oko okosnice polipeptidnog lanca, pri čemu dolazi do njihovog međusobnog odbijanja, a samim tim i do razdvajanja lanaca proteina. Svi polipeptidi stiču elektronegativni naboj koji potiče od SDS (Moore, 2009). Vreme trajanja elektroforeze je iznosilo oko 90 minuta. Migracija polipeptida vršena je kroz sistem gradijentnog gela koji se sastoji od gela za koncentrovanje (pH 6,8) i gela za razdvajanje (pH 8,8) (Mahmood i Yang, 2012). Oba gela su sadržala u različitim koncentracijama, bisakrilamid, SDS, katalizatore (APS, TEMED) i H₂O. Pored uzoraka, pre pokretanja vertikalne elektroforeze (MiniPROTEAN 3) u zaseban bunarić je dodavan i marker širokog opsega molekulske težine, koji omogućava identifikaciju veličine ciljanog proteina. Nakon razdvajanja proteina na gelu, vršen je mokri transfer proteina sa gela na 0,45 mm polivinildifluoridnu membranu (PVDF). U ovu svrhu korišćen je puffer niske jonske jačine sa niskom električnom strujom - elektroforezom. Najpre je gel prekrivan membranom i nameštan u takozvani sendvič između elektroda pločastog oblika. Transfer je rađen preko noći, u trajanju od 16 h, pri jačini električnog polja od 20 mA po gelu. Transfer proteina sa gela na membranu vršen je radi lakše manipulacije membranom i preciznije detekcije većeg broja ciljnih proteina, pri čemu su proteini koji se nalaze adsorbovani na membrani mnogo dostupniji za reakciju sa antitelima (imunodetekciju) od proteina koji se nalaze u gelu. Provera efikasnosti transfera vršena je bojenjem proteina na membrani sa Ponceau S (Pierce MemCode™). Ispiranje membrane radi uklanjanja višaka imunohemijskih reagenasa vršeno je sa pufferom koji sadrži TBS (eng. tris buffered saline) i deterdžent, Tween 20 (TBST puffer). U cilju onemogućavanja nespecifičnog vezivanja antitela za površinu membrane primenjeno je blokiranje membrane. Kako membranu odlikuje veoma visok afinitet za vezivanje proteina, a antitela su proteinske prirode, postoji mogućnost njihovog vezivanja i za ona mesta na membrani koja ne sadrže proteine od interesa. Da bi se izbegli lažno pozitivni rezultati prilikom detekcije proteina od interesa neophodno je blokirati sva nespecifična mesta na membrani, upotrebom proteina koji će se vezati za membranu, a neće intereagovati sa primarnim i sekundarnim antitelom. Za blokiranje membrane korišćeno je 5% nemasno mleko u prahu, rastvoreno u TBST pufferu. Blokiranje membrane je vršeno 1,5 h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja membrane dodavana su odgovarajuća monoklonska i poliklonska antitela radi imunodetekcije željenih proteina. Kao primarna antitela korišćena su anti-SOD1 (Abcam, ab16831), anti-SOD2 (Abcam, ab13533) i anti-KAT (Abcam, ab16371) zečja poliklonska antitela. Anti- β aktin mišje monoklonsko antitelo je korišćeno za kontrolu nalivanja uzoraka (ab8224 Abcam, Cambridge, UK). Primarna antitela i anti- β aktin mišje monoklonsko antitelo su razblažena u TBST pufferu (1:2000; 1:1000). Kao sekundarna antitela korišćena su kozje anti-zečje poliklonsko antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (za SOD1, SOD2 i CAT, razblaženo u odnosu 1:5000, Abcam, ab6721) i magareće antimišje poliklonalno antitelo (za β -aktin, razblaženo u

odnosu 1:5000, SantaCruz, sc-2094). Vreme inkubacije primarnog antitela sa membranom je iznosilo 1,5 h, dok je vreme inkubacije sa sekundarnim antitelom iznosilo 1 h. Vizuelizacija signala izvršena je hemiluminiscentnom detekcijom pomoću ECL kita (ECLplus, Amersham, Bucks, UK). Membrana je prelivana ECL reagensom (eng. enhanced chemiluminescence) koji sadrži istu zapreminu rastvora luminola i *p*-kumarične kiseline rastvorenih u puferu (Tris-HCl, pH 8,5). Nakon dodavanja reagensa, reaktivne trake su detektovane emitovanjem signala sa membrane u komori za detekciju (ChemiDoc-It2 detection system; UVP, Jena, Nemačka). Ukratko, signal je dobijen jer je sekundarno antitelo vezano za peroksidazu rena (eng. horse radish peroxidase, HRP), a ona katalizuje oksidaciju luminola, pri čemu u prisustvu vodonik peroksida nastaje intermedijarno jedinjenje 3-aminofalat, koje se nalazi u ekscitovanom stanju, i pri prelasku u niže energetske stanje emituje fotone svetlosti (luminiscencija), koje potom CCD kamera detektuje. Dobijene imunoreaktivne trake analizirane su u programu Image J (version 1.32).

3.2.16. Ispitivanje regulacije genske ekspresije qRT-PCR metodom

Kvantitativna analiza qRT-PCR je sprovedena kako bi se pratila ekspresija *Nrf2* i *Keap1* gena. Metoda je primenjena prema protokolu Kaisarević i sar, (2015) sa malim modifikacijama. Čelije su zasejavane u ploče sa 12 bunara (10^6 ćelija/bunaru) i inkubirane 24 h. Potom su ćelije podvrgnute 24 h tretmanu ekstraktima i D, pojedinačno i u kombinaciji (IC₂₅). Pravljenje ćelijskog lizata radi izolovanja ukupne RNK uključivalo je fenolsku ekstrakciju sa trizolom. Čelije su inkubirane sa trizol reagensom, 10 min na sobnoj temperaturi. Potom su nastavkom prebačene iz bunarića u vajičice i čuvane zamrznute na -70°C do daljeg rada. Nakon odleđivanja dodavano je 100 µl hloroforma. Smeša je vorteksovana, inkubirana 3 min na sobnoj temperaturi, centrifugirana 15 min na 6000 rpm (4°C) i sačuvana je gornja faza u kojoj se nalazi RNK. Kako bi se istaložila RNK dodavan je izopropanol. Čelijski talog, nakon centrifugiranja 6000 rpm 4°C 10 min, je ispran 75% etanolom. Nakon ponovnog centrifugiranja 3000 rpm ćelijski talog je sušen na sobnoj temperatura 5-10 min i rastvoren u vodi. Kvantifikovanje i ispitivanje čistoće izolovane RNK je omogućeno pomoću BioSpec-nano (Schimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Čistoća izolovane RNK određivana je spektrofotometrijskim merenjem apsorbanci na talasnim dužinama od 260/280 nm i 260/230 nm. Vrednosti apsorbanci kretale su se u opsegu od 1,8 do 2,1 što je ukazivalo na pogodne karakteristike RNK za dalju analizu ekspimiranja gena. Prevođenje RNK u cDNK (2 µg) je rađeno korišćenjem cDNK reverznog transkripcionog kita. Reverzna transkripcija je sprovedena dodavanjem reakcione smeše u Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), pri sledećim uslovima: 10 min na 25°C, 120 min na 37°C i 5 min na 85°C. Ciljni transkripti, *Keap1* i *Nrf2*, su detektovani praćenjem PCR reakcija na Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Nemačka), pri čemu je fluorescenca praćena u realnom vremenu. PCR smeša je sadržala: cDNK (15 ng), specifične prajmere (500 nM) (**Tabela 10**) i master miks (Power SYBR Green PCR Master Mix). Finalna zapremina reakcione smeše je iznosila 12,5 µL. Uslovi termalnih ciklusa PCR reakcije su uključivali standardne korake: 2 min na 50°C, 10 min na 95°C, 40 ciklusa 15 s na 95°C i 1 min na 60°C. Dobijeni rezultati su normalizovani u odnosu na β -aktin (eng. house keeping gen). Nivo relativne ekspresije gena je preračunat na osnovu gornjeg praga ciklusa (eng. the cycle threshold, Ct) prema načinu koji su izložili Voelker i sar. (2007).

3.2.17. Procena toksičnosti ekstrakata na embrionalnom modelu zebrica (*Danio rerio*)

3.2.17.1. Uslovi uzgoja *Danio rerio*

Divlji soj zebrice (*Danio rerio*) je dobijen od dr Ane Cvejić (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK). Embrioni divljeg tipa zebrica su gajeni do adultnog stadijuma u akvarijumima pri temperaturi vode 28°C i kontrolisanim fotoperiodom koji se sastojao od 14 h svetlosti i 10 h tame. Snabdevenost kiseonikom omogućena je upotrebom vazdušnih pumpi. Ribe su hranjene kombinacijom:

svežih račića (*Artemia salina*), dva puta dnevno, i sušenom hranom, jedanput dnevno (TetraMin™ flakes, Tetra Melle, Nemačka).

3.2.17.2. Evaluacija toksičnosti

Evaluacija toksičnosti odabranih ekstrakata i njihovih čistih konstituenata je sprovedena na embrionalnom modelu *Danio rerio*. Eksperimenti su izvedeni prema protokolu predloženom od strane Pavić i sar. (2017) koji je u skladu sa standardnom OECD metodom (2013) sa minornim modifikacijama. Nakon izleganja, embrioni su premeštani iz akvarijuma u 24 bunarne ploče. U svaki bunar koji je sadržao 1 mL pripremljenog rastvora slane vode (0,2 g/L of Instant Ocean® Salt u destilovanoj vodi) je postavljeno po 10 embriona. Ovako pripremljene ploče su inkubirane na 28°C. Kako bi ispitali letalni efekat, kardiotoksičnost i uticaj ekstrakta na razviće zebrića, embrioni su po dostizanju 6 spf (sati posle fertilizacije) tretirani odabranom koncentracijom ekstrakta (odabrane koncentracije od 50 µg/mL do 250 µg/mL) i čistim supstancama (odabrane koncentracije od 10 µg/mL do 50 µg/mL). Kao negativna kontrola korišćen je rastvor slane vode. Eksperiment je ponovljen 3 puta i svaka koncentracija testirana je na 30 embriona. Nakon 24, 48, 72, 96 i 120 sati posle fertilizacije (spf) praćeno je da li je došlo do pojave morfoloških promena predstavljenim u **Tabeli 12.** pomoću invertovanog mikroskopa (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan). Mrtvi emrioni su prebrojavani i uklanjani na svakih 24 h. Na 120 spf embrionima je proverena brzina otkucaja srca, nakon čega je vršeno anesteziiranje sa 0,1% rastvorom trikaina. Embrioni su fotografisani i umrtvljeni zamrzavanjem na -20°C ≥ 24 h. Vrednosti LC₅₀ (letalna doza koja izaziva 50% smrtnosti embriona) i EC₅₀ (doza koja izaziva malformacije kod 50% embriona) su determinisane upotrebom ToxRatPro softvera (ToxRat Solution GmbH, Alsdorf, Nemačka).

Tabela 12. Letalni i teratogeni efekti koji su praćeni u naznačenim vremenskim intervalima tokom 120 spf nakon tretmana *Danio rerio* odabranim ekstraktima i čistim supstancama

Kategorija	Krajnja tačka u razviću	Vreme izlaganja (spf)				
		24	48	72	96	120
Letalni efekat	Koagulacija jajeta (embriona) ^a	●				
	Odsustvo odvajanja repa	●				
	Odsustvo formiranja somita	●				
	Odsustvo kontrakcija srca	●				
Teratogeni efekat	Malformacija glave		●	●	●	●
	Malformacija očiju ^b		●	●	●	●
	Malformacija vilice		●	●	●	●
	Malformacija sakula/otolita ^c		●	●	●	●
	Malformacija notohorde		●	●	●	●
	Malformacija repa ^d		●	●	●	●
	Skolioza		●	●	●	●
	Edem žumancetne kese		●	●	●	●
	Deformacija žumancetne kese		●	●	●	●
	Promena u veličini/dužini tela ^e			●	●	●
	Izleganje				●	●
Kardiotoksičnost	Edem perikardijalne duplje		●	●	●	●
	Morfologija srca				●	●
	Promena frekvence rada srca					●
	(otkucaj/min)					●

^aNijedna struktura organa nije prepoznata; zastoj u razvoju embriona (organogenezi).

^b Abnormalnost oblika i veličine oka.

- ^c Prisutnost nijednog, jednog ili više od dva otolita u sakulusu. Redukcija ili uvećanje otolita i sakulusa.
- ^d Malformacije repa su beležene kada je rep savijen, uvrnut ili manji od repa kontrolnih embriona, odnosno kada je detektovana promena u obliku i položaju repa u odnosu na kontrolnu grupu.
- ^e Poremećaji rasta embriona su ustanovljeni poređenjem dužine tela sa kontrolnim embrionima vizualnom opservacijom upotrebom svetlosnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Japan).

3.2.18. Statistička analiza

Vrednosti dobijene sledećim testovima: testom produkcije piocijanina, testom interferencije ekstrakata sa QS signalnim putevima, testom procene uticaja ekstrakata na formiranje i preformirani biofilm, testom apoptoze i analize distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, imunoblotom i qRT-PCR su analizirane analizom varijanse, primenom testova statističke značajnosti (One-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test) upotrebom GraphPad Prism softvera. Nivo statističke značajnosti je definisan kao $p < 0,05$. Radi opisivanja farmakokinetičke interakcije između delovanja ekstrakta i D izračunavan je kombinovan indeks pri čemu su korišćene vrednosti iz MTT testa obrađene u Excel softveru.

4. REZULTATI

4.1. Antimikrobni efekti odabranih ekstrakata

U okviru ove doktorske disertacije ispitivan je antifungalni i antibakterijski efekat odabranih etanolnih (80% v/v) ekstrakata podfamilije Polygonoideae kroz seriju različitih testova. U početnim skrining testovima analizirano je 12 ekstrakata, a u zavisnosti od dobijenih rezultata birani su ekstrakti sa najefikasnijim delovanjem za dalja testiranja.

4.1.1. Antifungalni efekti odabranih ekstrakata

Testiranja antifungalnog potencijala 12 ekstrakata podfamilije Polygonoideae sprovedeno je na sledećim prirodnim izolatima mikromiceta: *A. alternata*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *F. semitectum* i *F. oxysporum*.

4.1.1.1. Procena inhibicije rasta mikromiceta nakon tretmana odabranim ekstraktima

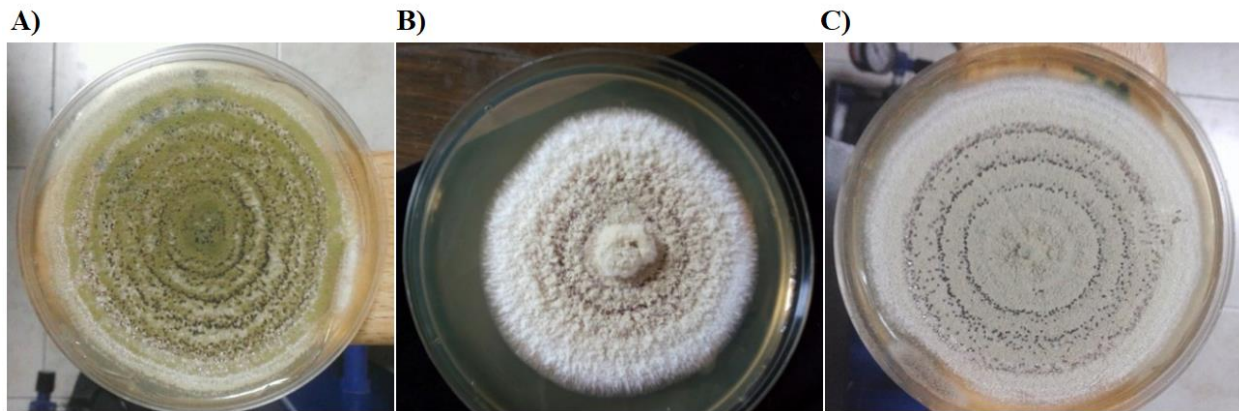
Dobijeni rezultati ukazuju da testirani biljni ekstrakti ispoljavaju antifungalnu aktivnost, pri čemu varira senzitivnost različitih vrsta analiziranih gljiva tj. ispitivani ekstrakti rizoma i herbi istih i različitih biljnih vrsta ispoljavaju selektivno delovanje na odabrane gljive (**Tabela 13**). Posmatrajući pojedinačno gljive, *A. alternata* se pokazala kao najsenzitivnija na dejstvo ekstrakata. Procenti inhibicije rasta *A. alternata* se nalaze u opsegu od 3,92- 34,76%, pri čemu je značajna inhibicija rasta ($\geq 32,49\%$) uočena nakon tretmana sledećim ekstraktima, poređanim u niz opadajuće aktivnosti: PEHr>POMh>PEMh>PEHh. Od 12 odabranih ekstrakata, BIOR (31,37%), PEHr (29,40%) i PEAh (28,23%) su se pokazali kao najefektivniji inhibitori rasta *Aspergillus* sp., dok BIOh nije ispoljio nikakav efekat. Nadalje, iako su svi ekstrakti ispoljili antifungalno svojstvo na rast *Penicillium* sp. (od 9,6-30,6%) izražen inhibitorni efekat je ostvaren ekstraktima u sledećem nizu POMh>BIOh>PEMh>PEHr sa 30,6>29,17>23,73>23,32%, respektivno. Najveći procenat inhibicije rasta gljive *F. semitectum* (20,24%) je zabeležen nakon delovanja POMh ekstrakta, dok POAr nije pokazao nikakav uticaj na rast micelija u testiranoj koncentraciji. Kao najrezistentnija gljiva na dejstvo ekstrakata je prepoznata *F. oxysporum*, prema kojoj je donekle značajan efekat inhibicije ostvario jedino PEMh ekstrakt (16,54%).

Tabela 13. Inhibicija rasta¹ odabranih mikromiceta nakon tretmana ekstraktima

Mikromicete	Inhibicija rasta [%]											
	POAh	POAr	POMh	PEAh	PEMh	PELh	PELr	PEHh	PEHr	BIOh	BIOr	FAEh
<i>A. alternata</i>	21,83	15,35	34,3	3,92	33,92	25,35	25,7	32,49	34,76	23,92	11,42	11,06
<i>Aspergillus</i> sp.	24,70	24,30	19,6	28,23	24,69	15,29	26,66	19,99	29,40	nd	31,37	11,76
<i>Penicillium</i> sp.	11,22	9,6	30,6	16,86	23,72	10,4	15,86	15,25	23,32	29,17	19,49	21,12
<i>F. semitectum</i>	3,79	nd*	20,24	6,74	7,17	2,95	6,32	13,07	10,96	2,25	16,45	15,18
<i>F. oxysporum</i>	3,67	1,83	nd	4,91	16,54	6,86	0,73	5,88	5,14	2,21	1,47	0,73

¹Inhibicija rasta je računata na osnovu odnosa prečnika izraslih micelija na PDA podlogama sa i bez ekstrakata; *nd-nije detektovano

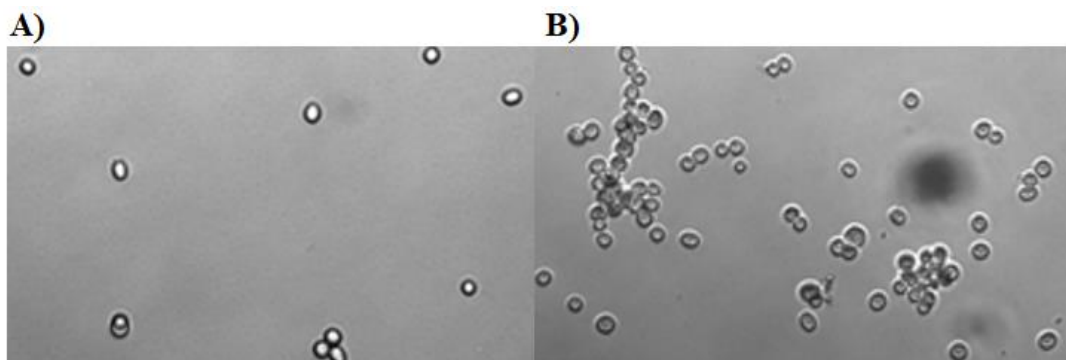
Nakon tretmana ekstraktima PEHr i BIOR primećena je promena morfologije micelija *Aspergillus* sp. koja je paraćena gubitkom konidijalnog pigmenta primarno zelene obojenosti (**Slika 9**). Takođe, ekstrakti POAh i POAr, POMh i PEAh utiču na promenu morfologije micelija i dovode do obezbojavanja konidija.



Slika 9. Promena fenotipskih karakteristika micelija *Aspergillus* sp. nakon tretmana odabranim ekstraktima A) netretirana kontrola B) tretman sa PEHr C) tretman sa BIOR.

4.1.1.2. Praćenje morfoloških promena spora gljiva konfokalnom mikroskopijom

Toksično delovanje biljnih ekstrakata na gljive može se detektovati preko gubitka konidijalnog pigmenta i promene morfologije spora. Pošto je uočen gubitak konidijalnog pigmenta u daljem radu je ispitan uticaj BIOR na fenotipske karakteristike spora *Aspergillus* sp. i ustanovljeno je da ekstrakt izaziva promene u pogledu morfologije i obojenosti. Spore kontrolnog uzorka su pojedinačne i prosvetljene u odnosu na spore tretirane sa BIOR, koje su neprozirne i uglavnom grupisane, što može biti posledica toksičnog delovanja ispitivanih supstanci (**Slika 10**).



Slika 10. Preparat spora *Aspergillus* sp. A) netretirana kontrola; B) tretman ekstraktom BIOR.

4.1.2. Antibakterijski efekti odabranih biljnih ekstrakata

U daljem radu ispitan je antibakterijski efekat odabranih ekstrakata. Radi detaljnijeg razumevanja prirode antimikrobnog potencijala selektovanih ekstrakata u pojedinim eksperimentima testirane su i čiste supstance koje se ističu po zastupljenosti u hemijskom sastavu odabranih ekstrakata.

4.1.2.1. Određivanje minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije odabranih ekstrakata mikrodilucionim esejima

U ovom radu, antibakterijska aktivnost 12 etanolnih ekstrakata biljaka podfamilije Polygonoideae je ispitana mikrodilucionom metodom na 7 bakterijskih sojeva. Najizraženiji antibakterijski efekat postignut je ekstraktom BIOR prema soju *S. aureus* ATCC 25923, pri čemu je MIK uočen na 0,156 mg/mL, a MBK na 0,312 mg/mL. Takođe, MIK i MBK vrednosti detektovane su nakon tretmana BIOR ekstraktom na *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *P. aeruginosa* ATCC 15442 pri koncentracijama od 2,5

REZULTATI

mg/mL i 5 mg/mL, respektivno. Nadalje, BIOh i POAr ekstrakti pokazali su bakteriostatsku aktivnost prema *S. aureus* ATCC 25923 na koncentraciji od 0,312 mg/mL, kao i baktericidni efekat na koncentraciji od 0,625 mg/mL. Prema bakteriji *S. aureus* ATCC 25923 antibakterijski efekat su takođe pokazali i ekstrakti PEAh i PEHh, međutim MIK vrednost je postignuta znatno višim koncentracijama (MIK-2,5 mg/mL i 5 mg/mL, respektivno). Ekstrakti PEMh i PELr su ispoljili antibakterijski potencijal prema najvećem broju testiranih sojeva uključujući: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 8739 i *P. aeruginosa* ATCC 15442. Takođe, PEMh ekstrakt je pokazao antibakterijski efekat na *S. Enteritidis* ATCC 13076, dok je PELr pokazao antibakterijsku aktivnost i prema *S. flexneri* ATCC 9199. Ipak, ovi ekstrakti su pokazali bakteriostatski efekat na koncentracijama od 5 mg/mL što ih po klasifikaciji aktivnosti ekstraktata svrstava u slabo aktivne. Slabo antibakterijsko dejstvo prema sojevima *E. coli* ATCC 8739 i *P. aeruginosa* ATCC 15442 uočeno je i kod PELh i FAEh ekstraktata (MIK-5 mg/mL). Takođe, FAEh ekstrakt je pokazao zanemarljivu antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* ATCC 25923, pri čemu je MIK zabeležen na koncentraciji od 2,5 mg/mL. Ekstrakti POAh, POMh i PEHr nisu pokazali antibakterijski efekat ni prema jednoj od 7 testiranih bakterija. MIK vrednost nije detektovana ni kod jednog ekstrakta ispitanog protiv bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *E. faecalis* ATCC 29212. Kao pozitivna kontrola korišćen je komercijalno proizvedeni antibiotik Str. Na svim bakterijskim kulturama je detektovano delovanje antibiotika, a MIK vrednosti su zabeležene u opsegu od 6,25 do 50 µg/mL u zavisnosti od osetljivosti sojeva. Rezultati mikrodilucionog testa za ispitane ekstrakte i antibiotik su prikazani u **Tabeli 14**.

REZULTATI

Tabela 14. Rezultati mikrodilucionog testa za odabrane ekstrakte biljaka podfamilije Polygonoideae

Bakterije	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442		<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739		<i>Salmonella enteritidis</i> var. Enteritidis ATCC 13076		<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199		
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	
POAr	0,312	0,625	nd*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PEAh	2,5	5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PEMh	5	>5	5	>5	5	>5	5	>5	nd	nd	nd
PELh	nd	nd	5	>5	5	>5	nd	nd	nd	nd	nd
PELr	5	>5	5	>5	5	>5	nd	nd	5	>5	>5
PEHh	5	>5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BIOh	0,312	0,625	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BIOr	0,156	0,312	2,5	5	nd	nd	2,5	5	nd	nd	nd
FAEh	2,5	5	5	>5	5	>5	nd	nd	nd	nd	nd
Antibiotik Str (µg/mL)	25	50	12,5	25	6,25	12,5	3,125	6,25	12,5	25	25

*Nd-nije detektovano

4.1.2.2. Kombinovani efekat BIOR ekstrakta i komercijalnog antibiotika Str

U cilju ispitivanja antibakterijskog delovanja ekstrakta u kombinaciji sa komercijalnim antibiotikom, izabran je ekstrakt sa najmanjom MIK vrednosti, BIOR i antibiotik Str. U ovom testu ispitivanje je sprovedeno na bakterijskim kulturama koje su pokazale najizraženiju osetljivost prilikom ispitivanja pojedinačnih supstanci, odnosno na sojevima: *S. aureus* i *S. Enteritidis*. Farmakokinetička interakcija dve supstance u kombinaciji određena je FICI indeksom kojim se opisuje: sinergistički ($FICI < 0,5$), aditivni ($0,5 < FICI \leq 1$), indiferentni ($1 < FICI \leq 4$) i antagonistički ($FICI > 4$) odnos. Sinergističkom interakcijom je omogućeno smanjenje koncentracije antibiotika prilikom kombinacije sa ekstraktom, pri zadržavanju značajnog antibakterijskog efekta koji je ekvivalentan individualnom antibiotskom tretmanu, ali za čije je ostvarivanje bila potrebna znatno veća doza antibiotika. Svrha navedenog je redukovanje kontraindikacija kao i pojave antibiotske rezistencije. Indiferentan efekat pokazuje da postoji odsustvo interakcije između testiranih agenasa, a aditivan da je efekat agenasa u kombinaciji jednak sumi efekata koje agensi ostvaruju pojedinačno. Antagonistički odnos ukazuje da je efekat ekstrakta ili antibiotika slabiji kada se primenjuju u kombinaciji, u odnosu na efekat koji ostvaruju pojedinačno (Bassolé i Juliani, 2012).

Na *S. aureus* ekstrakt BIOR i Str ispoljavaju indiferentni, aditivni i sinergistički efekat u zavisnosti od testirane doze (**Tabela 15**). Indiferentni i aditivni efekat su primećeni i prilikom kombinovanog tretmana različitim koncentracijama ekstrakta i antibiotika protiv *S. Enteritidis*. Takođe, pri koncentracijama od 0,078 mg/mL BIOR ekstrakta i 12,5 µg/mL Str zapažen je blagi antagonizam.

Tabela 15. Farmakokinetičke interakcije između BIOR ekstrakta i Str na bakterijskim sojevima *S. aureus* i *S. Enteritidis*

<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
BIOR (mg/mL)	Str (µg/mL)	FICI indeks	Efekat u interakciji
0,312	1,5625	2,06	Indiferentni
0,156	6,25	1,25	Indiferentni
0,078	6,25	0,75	Aditivni
0,039	6,25	0,5	Aditivni
0,0195	1,56	0,1875	Sinergistički
0,00975	1,56	0,125	Sinergistički

<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076			
BIOR (mg/mL)	Str (µg/mL)	FICI indeks	Efekat u interakciji
0,078	12,5	4,0312	Antagonistički/Indiferentni
1,25	6,25	2,2	Indiferentni
0,625	3,125	1,2	Indiferentni

REZULTATI

0,3125	3,125	1,1	Indiferentni
0,156	3,125	1,049	Aditivni/Indiferentni
0,078	3,125	1,02	Aditivni/Indiferentni

4.1.2.3. Antibiofilm i antivirulentna aktivnost biljnih ekstrakata

Prema ustanovljenom antibakterijskom potencijalu, koji je istaknut u rezultatima mikrodilucione metode, birani su ekstrakti koji su korišćeni u daljim analizama. Kriterijum za odabir je bio da ekstrakti ispoljavaju antibakterijski efekat prema više testiranih sojeva ili da su pokazali antibakterijski efekat na nižim MIK i MBK vrednostima u odnosu na ostale ekstrakte. Ipak, kako je prema rezultatima mikrodilucionog eseja ustanovljeno da odabrane ekstrakte pretežno ne odlikuje značajan antibakterijski efekat, odlučeno je da dalja istraživanja budu usmerena ka ispitivanju efekta ekstrakta na međubakterijsku komunikaciju. Remećenje međubakterijske komunikacije odlika je QS inhibitornih agenasa koji umesto ispoljavanja antibakterijskog efekta, tj. direktne eradikacije bakterija, omogućavaju suzbijanje njihove virulentnosti.

U cilju praćenja uticaja ekstrakta na aktivnosti koje su regulisane QS međubakterijskom komunikacijom sprovedeni su sledeći testovi:

- test inhibicije violaceina na biotest soju *C. violaceum* CV026,
- kristal violet test (CV test) za ispitivanje uticaja ekstrakta na formiranje biofilma sojeva *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *P. aeruginosa* PAO1,
- praćenje uticaja ekstrakata na ukupnu biomasu formiranih biofilмова *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 upotrebom silikonskih diskova,
- test inhibicije produkcije piocijanina na *P. aeruginosa* PA14,
- test inhibicije rojenja na *P. aeruginosa* PAO1,
- praćenje aktivnosti transkripcionih aktivatora na kojima se zasniva QS signalizacija kod *P. aeruginosa*, pri čemu su korišćeni biosenzorski sojevi: *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasI PrsA::lux), *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhlA (Δ rhlA PrhA::lux) i *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX lux::pqsA).

Sojevi *S. aureus* ATCC 25923 i *S. Enteritidis* ATCC 13076 su selektovani na osnovu rezultata mikrodilucionog testa.

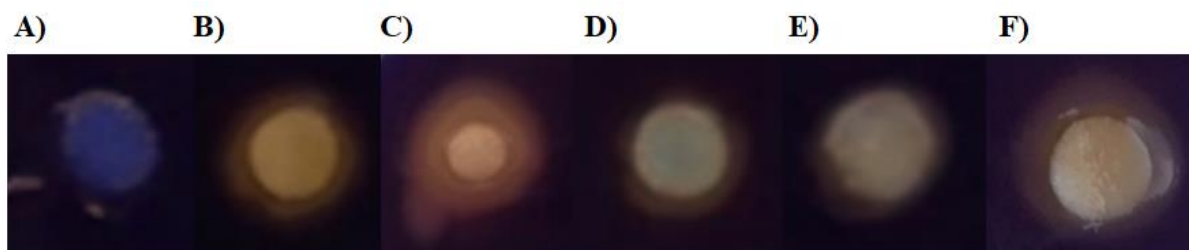
Sojevi *C. violaceum* CV026, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PA14, *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasI PrsA::lux), *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhlA (Δ rhlA PrhA::lux) i *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX lux::pqsA) se koriste kao modeli Gram negativnih bakterija za anti-QS istraživanja i zbog toga su odabrani za eksperimentalni rad.

Posmatrano prema ekstraktima, prema rezultatima mikrodilucionog testa i testa inhibicije produkcije violaceina odabrana su dva najefikasnija ekstrakta, PEMh i BIOR, koji su korišćeni u svim anti-QS testovima, sa izuzetkom testa ispitivanja uticaja ekstrakta na ukupnu biomasu formiranih biofilмова u kojem je korišćen jedino BIOR ekstrakt. BIOR ekstrakt je odabran usled izraženijeg antibiofilm efekta detektovanog CV testom.

4.1.2.3.1. Produkcija violaceina *C. violaceum* CV026 nakon tretmana sa odabranim ekstraktima

Prilikom traganja za agensima koji kontrolišu nastanak i širenje bakterijskih infekcija veoma često se sprovodi skrining test za detekciju QS inhibitora metodom inhibicije produkcije violaceina. Prema tome u daljem radu ispitivana je mogućnost inhibicije produkcije violaceina difuzionom metodom na biotest soju *C. violaceum* CV026 delovanjem sledećih ekstrakata: POAr, PEAh, PEMh, BIOh i BIOR. Produkcija violaceina kod bakterije *C. violaceum* je regulisana N-acil-L-homoserin laktonima (AHL). Soj *C. violaceum* CV026 ima mutaciju u genu za sintezu AHL usled čega se produkcija pigmenta violaceina odvija samo ako se AHL egzogeno doda, kao u ovom disk difuzionom testu. Kako su AHL signalni molekuli odgovorni za međubakterijsku komunikaciju kod Gram negativnih bakterija, praćenje produkcije sinteze violaceina jasan je pokazatelj interferiranja odabranih agenasa sa QS signalnim putevima.

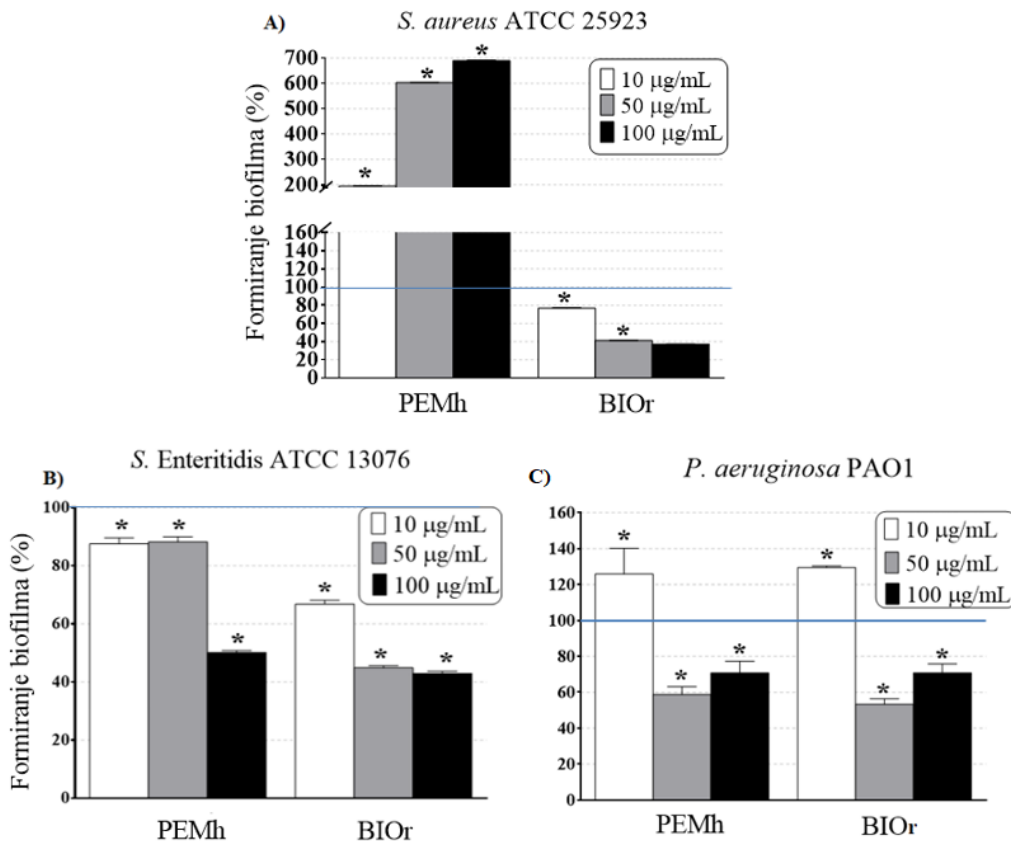
Prema depigmentisanim zonama oko diska filter papira jasno je da je najefikasniji u inhibiciji produkcije violaceina BIOR ekstrakt (**Slika 11**). Manje izražajne zone inhibicije produkcije pigmenta zapažene su kod diskova sa ekstraktima: PEAh>PEMh>BIOh>POAr.



Slika 11. Efekat inhibicije produkcije violaceina na *C. violaceum* CV026 A) DMSO B) PEMh, C) BIOR, D) BIOh, E) POAr, F) PEAh.

4.1.2.3.2. Efekat ekstrakta PEMh, BIOR na formiranje biofilma sojeva *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *P. aeruginosa* PAO1

Da bismo dobili širu sliku o uticaju ekstrakata na bakterije biofilm zajednica, pratili smo njihov efekat na formiranje biofilma i ukupnu biomasu formiranog biofilma. Prvo je testiran efekat PEMh i BIOR ekstrakta na formiranje biofilma sojeva *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 i *P. aeruginosa* PAO1, koji je podrazumevao bojenje biofilma direktno kristal violetom. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je aktivnost ekstrakata zavisna od koncentracije i vrste ispitivanog soja. Sve testirane koncentracije, dovele su do značajne stimulacije produkcije biofilma soja *S. aureus* ATCC 25923 nakon delovanja PEMh ekstrakta (**Slika 12.A**). Sa druge strane, pri svim testiranim koncentracijama, BIOR ekstrakt je uticao na inhibiciju formiranja biofilma soja *S. aureus* ATCC 25923 ($BIK_{50}=100 \mu\text{g/mL}$). Oba ekstrakta, a naročito BIOR, su u značajnom stepenu inhibirala formiranje biofilma soja *S. Enteritidis* ATCC 13076 (**Slika 12.B**). U ovom slučaju, najniži procenat bakterijskog rasta u biofilm formi zapažen je pri koncentraciji $100 \mu\text{g/mL}$ i za PEMh je iznosio 50,11%, a za BIOR 42,97%. Oba ekstrakta u koncentraciji od $10 \mu\text{g/mL}$ podstiču formiranje biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu PEMh omogućava uvećanje bakterijskog biofilma za 25,82%, a BIOR za 29,84% (**Slika 12.C**). Drugačije od navedenog, koncentracija od $50 \mu\text{g/mL}$ značajno inhibira razvoj biofilma, pri čemu je u slučaju tretmana sa PEMh zabeleženo 41,2% inhibicije biofilma, dok je u slučaju BIOR procenat nešto veći i iznosi 46,74%.



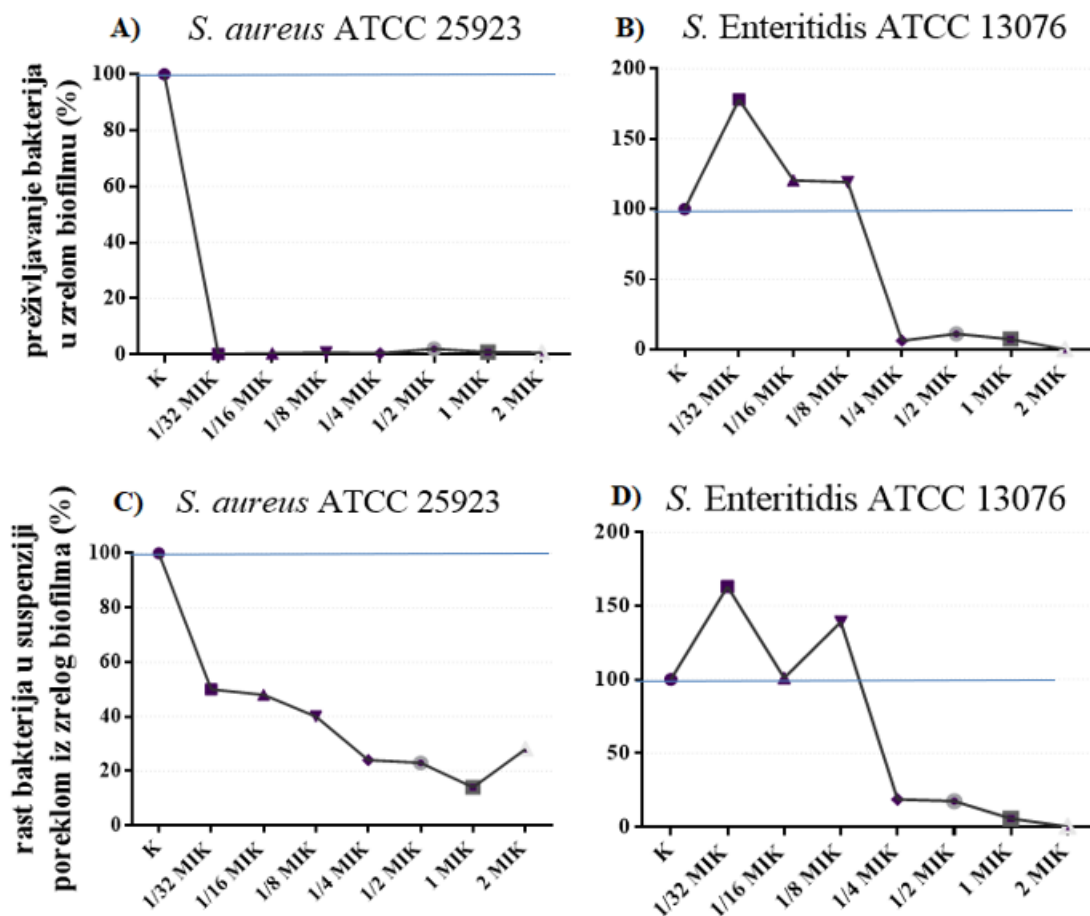
Slika 12. Uticaj ekstrakata PEMh i BIOR na formiranje biofilma A) Gram pozitivnog soja *S. aureus* ATCC 25923; Gram negativnih sojeva B) *S. Enteritidis* ATCC 13076 i C) *P. aeruginosa* PAO 1.

4.1.2.3.3. Efekat ekstrakta BIOR na redukciju broja bakterija u preformiranoj biofilm zajednici sojeva *S. aureus* ATCC 25923 i *S. Enteritidis* ATCC 13076

Kako je u testu ispitivanja uticaja ekstrakata na formiranje biofilma *S. aureus* ATCC 25923 i *S. Enteritidis* ATCC 13076 bolju efikasnost ispoljio BIOR, dalje je testirano delovanje ovog ekstrakta na zreli biofilm koji je razvijen na silikonskim diskovima kao modelu biomaterijala. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu redukciju broja vijabilnih bakterija u zrelog biofilmu starom 24 h soja *S. aureus* nakon dejstva subinhibitornih (subMIK) i inhibitornih koncentracija BIOR ekstrakta (1/32MIK-2MIK) (**Slika 13A**). Procenti preživljavanja bakterijskog soja *S. aureus* u formi biofilma u rasponu doza od 1/32MIK-2MIK kretali su se u opsegu od 0,22-2%. Usled izrazito malih varijacija u procentu preživljavanja bakterija u formi biofilma, dozno-zavisno delovanje testiranih koncentracija nije ustanovljeno (0,22% preživljavanja postignuto je pri koncentraciji od 1/32MIK, a 2% pri koncentraciji 1/2MIK). Nadalje, stimulacija bakterijskog rasta *S. Enteritidis* u biofilm formaciji detektovana je na subinhibitornim koncentracijama (1/32MIK-1/8MIK), dok su koncentracije od 1/4MIK do 2MIK uzrokovale izrazito smanjenje brojnosti bakterija zrelog biofilma (**Slika 13B**). U navedenom slučaju najveći procenat stimulacije rasta biofilma uočen je pri koncentraciji 1/32MIK (178,08%), dok je najveći stepen redukcije zabeležen pri koncentraciji od 2MIK, pri čemu je procenat preživljavanja bakterija u zrelog biofilmu iznosio 0,89%.

Što se tiče rasta bakterija u suspenziji koje su poreklom od zrelog biofilma, možemo primetiti da je najveći procenat preživljavanja soja *S. aureus* ATCC 25923 nakon tretmana BIOR ekstraktom iznosio

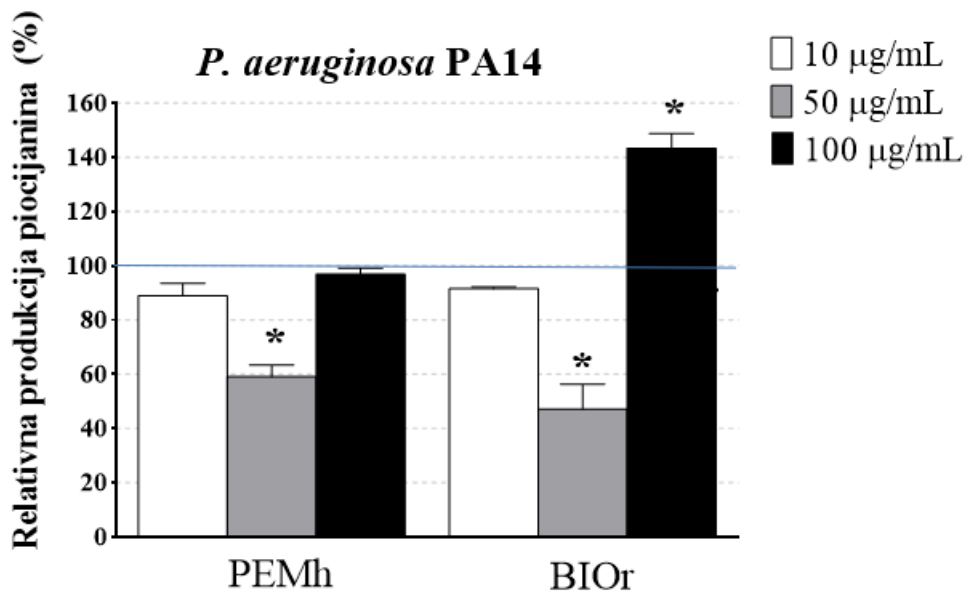
50% na najmanjoj testiranoj koncentraciji (1/32MIK) i da preživljavanje većinom opada sa povećanjem koncentracije (1MIK- 14%) (**Slika 13C**). Blago odstupanje od navedenog uočeno je za koncentraciju 2MIK gde je detektovano 28% bakterijskog rasta, pri čemu ovaj rezultat predstavlja duplo veći procenat preživljavanja u odnosu na preživljavanje bakterija koje su tretirane BIOR ekstraktom pri MIK koncentraciji (14%). Dalje, u slučaju soja *S. Enteritidis* ATCC 13076, nakon delovanja nižih koncentracija BIOR ekstrakta zabeležen je stimulisani rast bakterija u suspenziji (1/32MIK-163%; 1/8MIK-139%) koje su poreklom iz zrelog biofilma (**Slika 13D**). Međutim, veće koncentracije (od 1/4MIK do 2MIK) pokazuju izraziti baktericidni efekat (18,6%-0,02%).



Slika 13. Efekat BIOR ekstrakta na preživljavanje bakterija: u zrelog biofilmu soja A) *S. aureus* ATCC 25923; B) *S. Enteritidis* ATCC 13076; i u suspenziji poreklom iz zrelog biofilma soja C) *S. aureus* ATCC 25923; D) *S. Enteritidis* ATCC 13076.

4.1.2.3.4. Efekat PEMh i BIOR ekstrakta na produkciju piocijanina *P. aeruginosa* PA14

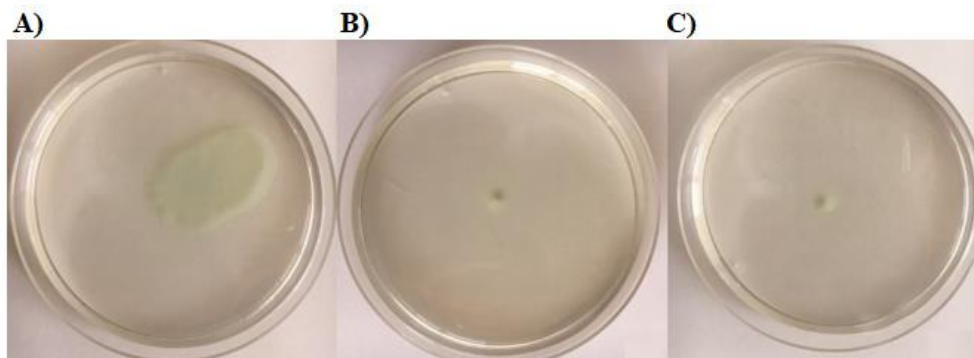
Za potrebe ispitivanja uticaja ekstrakta na produkciju piocijanina korišćeni su supernatanti tretirane bakterijske kulture *P. aeruginosa* PA14 gajene u LB bujonu. Nakon tretmana ekstraktima PEMh i BIOR pri koncentraciji od 50 µg/mL, primećena je smanjena produkcija piocijanina u odnosu na količinu produkovanog pigmenta u kontrolnom uzorku (**Slika 14**). Relativna produkcija piocijanina pri koncentraciji od 50 µg/mL je iznosila 59,04% nakon tretmana sa PEMh ekstraktom, odnosno 47,08% nakon tretmana sa BIOR ekstraktom. Drugačije od navedenog, nakon tretmana BIOR ekstraktom pri koncentraciji od 100 µg/mL zapaženo je povećanje produkcije piocijanina za 43,34%.



Slika 14. Relativna produkcija piocijanina nakon tretmana ekstraktima PEMh i BIOR.

4.1.2.3.5. Efekat ekstrakta PEMh i BIOR na pokretljivost *P. aeruginosa* PAO1

Sposobnost rojenja *P. aeruginosa* PAO1 je praćena poređenjem dijametra površina rasta na polučvrstom agar u čiji sastav su uključeni DMSO i ekstrakti PEMh i BIOR (50 µg/mL), pri čemu dijometri površina rasta ukazuju na sposobnost kretanja PAO1 od mesta zasejavanja. Na **Slici 15** jasno je pokazano da oba ekstrakta onemogućavaju kretanje *P. aeruginosa* PAO1 odnosno sprečavaju rojenje.



Slika 15. Praćenje sposobnosti rojenja na soju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 nakon tretmana sa A) DMSO B) PEMh i C) BIOR.

4.1.2.3.6. Uticaj PEMh i BIOR ekstrakata na QS međubakterijsku komunikaciju

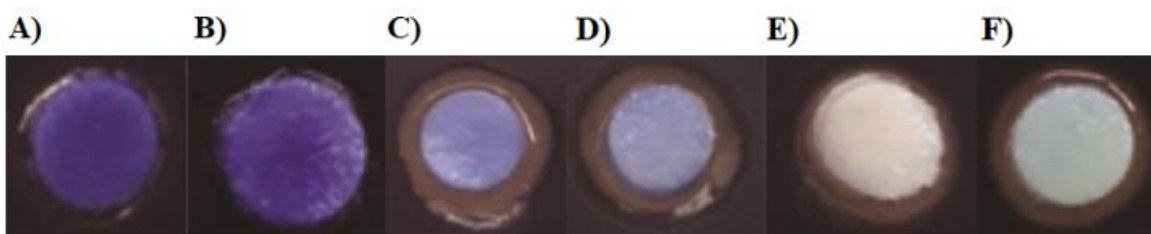
U daljem istraživanju posmatran je uticaj odabranih ekstrakata na različite signalne puteve QS komunikacije, praćenjem aktivnosti „R-proteina” (RhIR, LasR i PqsR) kod odabranih biosenzorskih sojeva: *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasI Prsal::*lux*), *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhlA (Δ rhlA PrhIA::*lux*) i *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX *lux*::*pqsA*). Dobijeni rezultati ukazuju da PEMh i BIOR smanjuju aktivnost LasR transkripcionog aktivatora za 23% i 30%, respektivno (**Tabela 16**). Nadalje, nije detektovana statistički značajna promena aktivnosti RhIR receptora ni kod jednog od testiranih ekstrakata, odnosno aktivnost RhIR receptora suprimirana je za svega 12% nakon tretmana sa PEMh i 10% nakon tretmana sa BIOR. Aktivnost PqsR regularnog proteina je povišena za 53% i 20% nakon delovanja PEMh odnosno BIOR ekstrakta.

Tabela 16. Uticaj PEMh i BIOR ekstrakata na relativnu aktivnost transkripcionih faktora

Ekstrakti	Relativna aktivnost transkripcionih faktora (%)		
	LasR	RhlR	PqsR
PEMh	77±1	88±1	153±4
BIOr	70±1	90±2	120±10

4.1.2.3.7. Produkcija violaceina *C. violaceum* CV026 nakon tretmana sa dominantnim konstituentima ekstrakata

U daljem radu, odabranim QS testovima ispitivan je uticaj dominantnih konstituenata ekstrakata: hinske kiseline (KK), galne kiseline (GK), 5-*O*-kafeoil-hinske kiseline (hlorogenske kiseline, HK), katehina (Ka) i kvercetin-3-*O*-glukozida (K-3-*O*-Glk) na QS signalizaciju (PRILOG 1, **Tabela 21, 22**). Najpre je sproveden test inhibicije violaceina na biotest soju *C. violaceum* CV026. Prema dobijenim rezultatima, sve ispitivane supstance, sa izuzetkom GK inhibiraju sintezu violaceina na šta ukazuje prisustvo opalescentnih zona oko diskova (**Slika 16 A-F**). Kako je inhibicija sinteze violaceina regulisana QS sistemom dobijeni rezultat implicira da navedene supstance onemogućavaju međubakterijsku komunikaciju.

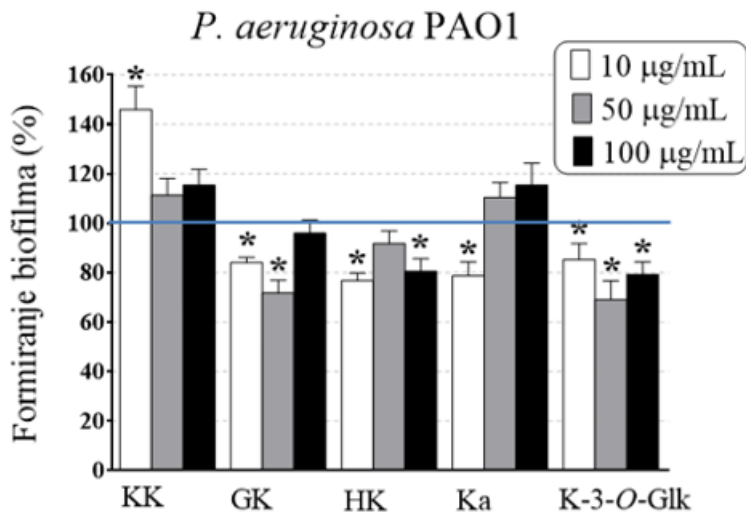


Slika 16. Efekat inhibicije produkcije violaceina na *C. violaceum* CV026 nakon tretmana čistim supstancama: A) DMSO, B) GK, C) KK, D) HK, E) Ka, F) K-3-*O*-Glk.

4.1.2.3.8. Efekat dominantnih konstituenata ekstrakta na formiranje biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1

Dalje smo testirali efekat najzastupljenijih konstituenata ekstrakata na inhibiciju formiranja biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1 u istom opsegu koncentracija u kojima smo ispitivali i same ekstrakte. Svi testirani konstituenti izuzev Ka deluju u maniru nemonotonog doznog odgovora⁷, dok je jedino Ka pokazao linearni rast razvijenosti biofilma sa porastom koncentracije (**Slika 17**). Ka pri koncentraciji od 10 µg/mL značajno smanjuje formiranje biofilma, dok na većim testiranim koncentracijama pokazuje blagi stimulatívni efekat. U značajnom stepenu otežano formiranje biofilma zapaženo je nakon tretmana sa GK, HK, i K-3-*O*-Glk, pri čemu je naizraženija inhibicija izazvana sa 50 µg/mL za GK (28%) i K-3-*O*-Glk (31%), odnosno sa 10 µg/mL za HK (23,22%).

⁷ Nemonotoni dozni odgovor (eng. nonmonotonic dose-response) predstavlja suprotnost dozno-zavisnom odgovoru i odlikuje se oblikom invertovane U ili β-krive (Conolly i Lutz, 2004).



Slika 17. Formiranje biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1 pod uticajem dominantnih konstituenata ekstrakata: KK, GK, HK, Ka, K-3-O-Glc.

4.1.2.3.9. Uticaj dominantnih konstituenata ekstrakata na QS međubakterijsku komunikaciju

U daljem radu ispitan je efekat glavnih konstituenata ekstrakta na relativnu aktivnost transkripcionih faktora, LasR, RhlR i PqsR. U skladu sa rezultatima delovanja PEMh i BIOR ekstrakata, Ka i K-3-O-Glc takođe utiču na Las signalni put, inhibiranjem LasR receptorne aktivnosti za 18% i 19%, respektivno (**Tabela 17**). Izuzimajući HK koja stimuliše aktivnost RhlR receptora, testirane supstance ne dovode do promene aktivnosti ovog receptora. Drugačije od navedenog, povećana stimulacija PqsR transkripcionog aktivatora je detektovana nakon tretmana sa GK (50%), HK (25%) i Ka (16%).

Tabela 17. Uticaj dominantnih konstituenata ekstrakata na relativnu aktivnost transkripcionih faktora

Konstituenti	Relativna aktivnost transkripcionih faktora (%)*		
	LasR	RhlR	PqsR
KK	120±2	103±4	108±8
GK	92±3	95±3	150±35
HK	108±2	119±2	125±5
Ka	82±2	98±6	116±7
K-3-O-Glc	81±4	93±4	98±10

4.2. Efekt POAh, POMh, PEAh i PEMh ekstrakata i njihova interakcija sa D na humanim ćelijama različitih karcinoma u *in vitro* uslovima

U daljem radu ispitivane su biološke aktivnosti odabranih ekstrakata na humanim ćelijskim linijama. Odabir ekstrakata je napravljen nakon pregleda dostupne literature na osnovu stepena njihove istraženosti. Od dvanaest ekstrakata podfamilije Polygonoideae odabrana su sledeća četiri: POAh, POMh, PEAh i PEMh. Prvo je određivana citotoksična aktivnost navedenih ekstrakata, kao i D, na HepG2, A549 i MRC-5 ćelijskim linijama. Nakon utvrđivanja citotoksičnog efekta ekstrakta usledila su dalja istraživanja koja bi pružila objašnjenja o mehanizmima delovanja POAh, POMh, PEAh i PEMh. Takođe, nakon pregleda literature i dobijenih rezultata testa citotoksičnosti, dalja testiranja bioloških aktivnosti POMh ekstrakta, usled ograničene količine i limitirane mogućnosti ponovne ekstrakcije, vršena su isključivo na HepG2 ćelijama (nedostatak biljnog materijala i uslova za uzorkovanje *P. maritimum* opravdava rasprostranjenje biljke koje se isključivo vezuje za priobalske marinske oblasti, odnosno za područja izvan granica Republike Srbije).

4.2.1. Citotoksična aktivnost biljnih ekstrakata pojedinačno i u kombinaciji sa D *in vitro*

U cilju određivanja citotoksične aktivnosti odabranih biljnih ekstrakata primenjen je MTT test na dve kancerske i jednoj normalnoj ćelijskoj liniji. Na osnovu dobijenih vrednosti konstruisane su krive doznog odgovora. Kod testiranih ćelijskih linija pretežno se javlja trend redukcije preživljavanja sa povećanjem koncentracije ekstrakta pojedinačno i kombinovano sa D. Odstupanje od navedenog detektovano je u okviru testiranog opsega koncentracija jedino na izrazito niskim ili visokim dozama u obliku veoma blagog nemonotonog doznog odgovora. Sa krivi doznog odgovora očitane su inhibitorne koncentracije koje smanjuju vijabilnost ćelija za 25% (IC₂₅) i 50% (IC₅₀) (**Tabela 18.A**). Nadalje, citotoksičnost odabranih ekstrakata varira između različitih tipova ćelijskih linija.

Tabela 18. Citotoksični efekat ekstrakta i D, individualno i u kotretmanima na HepG2, A549 i MRC-5 ćelijskoj liniji.

A Ćelijske linije	Individualni tretmani IC ₂₅ [µg/mL]					Individualni tretmani IC ₅₀ [µg/mL]				
	D	POAh	POMh	PEAh	PEMh	D	POAh	POMh	PEAh	PEMh
HepG2	1,3	1250	702	500	1650	12,56	2800	1153	910	2150
A549	12	1600	400	1000	1350	30	3900	2750	2750	2200
MRC-5	4,9	480	430	250	490	11,4	950	2200	750	900

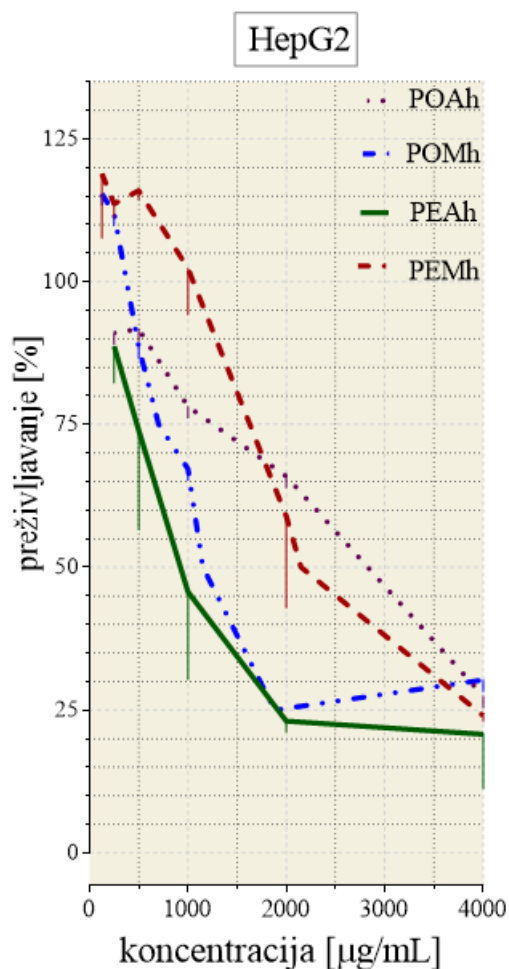
B Ćelijske linije	Kotretmani IC ₂₅ [µg/mL]							
	POAD		POMD		PEAD		PEMD	
	POAh	D	POMh	D	PEAh	D	PEMh	D
HepG2	120	0,68	253	1,44	140	0,79	1100	6,27
A549	175,44	1	1315,79	7,5	789,47	4,5	362	2,06
	394,74	2,25						
	789,47	4,5						
MRC-5	561	3,2	300	1,71	1750	9,98	900	5,13

C Ćelijske linije	Kotretmani IC ₅₀ [µg/mL]							
	POAD		POMD		PEAD		PEMD	
	POAh	D	POMh	D	PEAh	D	PEMh	D
HepG2	160	0,91	393	2,24	250	1,425	1755	10,1
A549	2100	11,97	1900	10,83	2200	12,54	3691	21,04
MRC-5	910	5,19	420	2,39	3200	18,24	2900	16,53

REZULTATI

D Ćelijske linije	CI [IC ₂₅]			
	POAD	POMD	PEAD	PEMD
HepG2	0,62	1,46	0,89	5,49
A549	0,19	3,54	1,16	0,34
MRC-5	0,43	0,87	1,82	1,05
	1,82	1,05	9,03	2,88
E Ćelijske linije	CI [IC ₅₀]			
	POAD	POMD	PEAD	PEMD
HepG2	0,13	0,52	0,39	1,63
A549	0,94	1,05	1,22	2,37
MRC-5	1,41	0,40	5,87	4,67

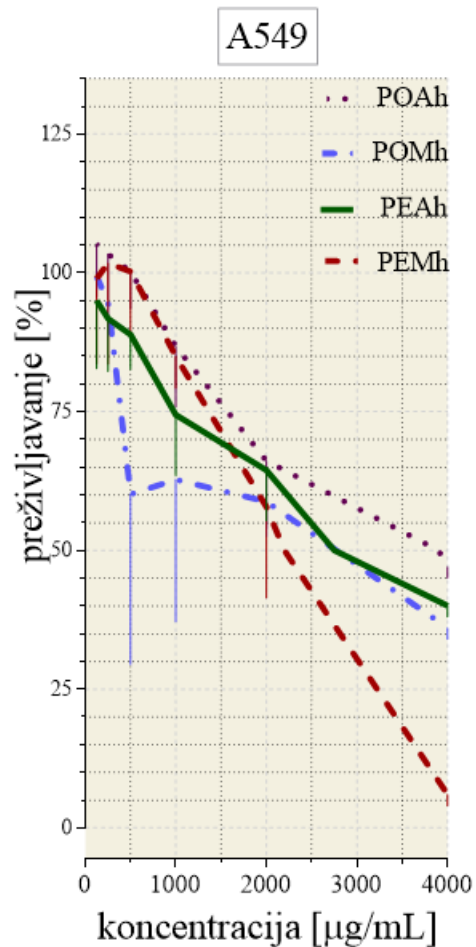
Inhibicija vijabilnosti HepG2 ćelija za 25% i 50% je zapažena na različitim koncentracijama između ekstrakata, pri čemu je uočen sledeći trend: PEAh<POMh<POAh<PEMh, odnosno PEAh<POMh<PEMh<POAh (**Slika 18**).



Slika 18. Uticaj individualno primenjenih odabranih ekstrakata na preživljavanje HepG2 ćelija predstavljen krivama dozne zavisnosti.

REZULTATI

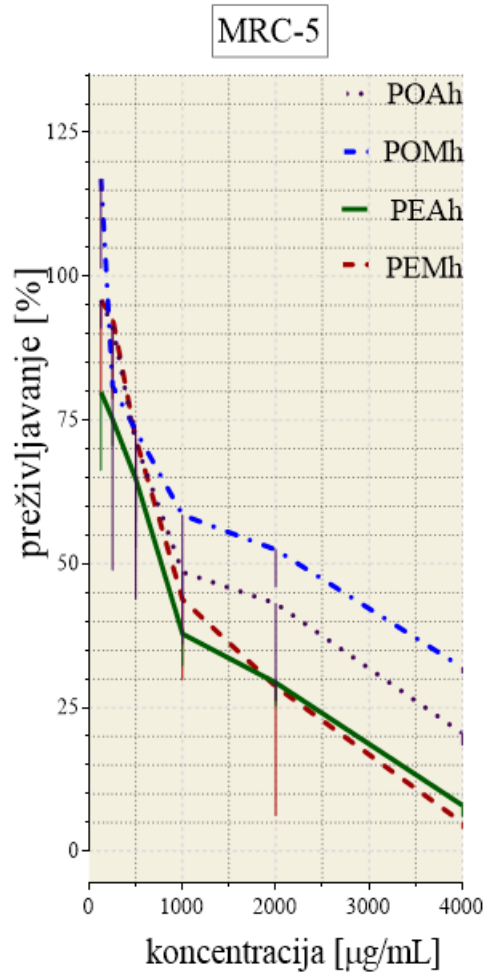
Dalje posmatrano, A549 ćelijska linija se pokazala kao nešto rezistentnija na delovanje ekstrakata, pri čemu je efikasnost ekstrakata na smanjenje preživljavanja u prisustvu IC₂₅ i IC₅₀ predstavljena sledećim redom: POMh<PEAh<PEMh<POAh odnosno PEMh<POMh=PEAh<POAh (Slika 19).



Slika 19. Uticaj individualno primenjenih odabranih ekstrakata na preživljavanje A549 ćelija predstavljen krivom dozne zavisnosti.

REZULTATI

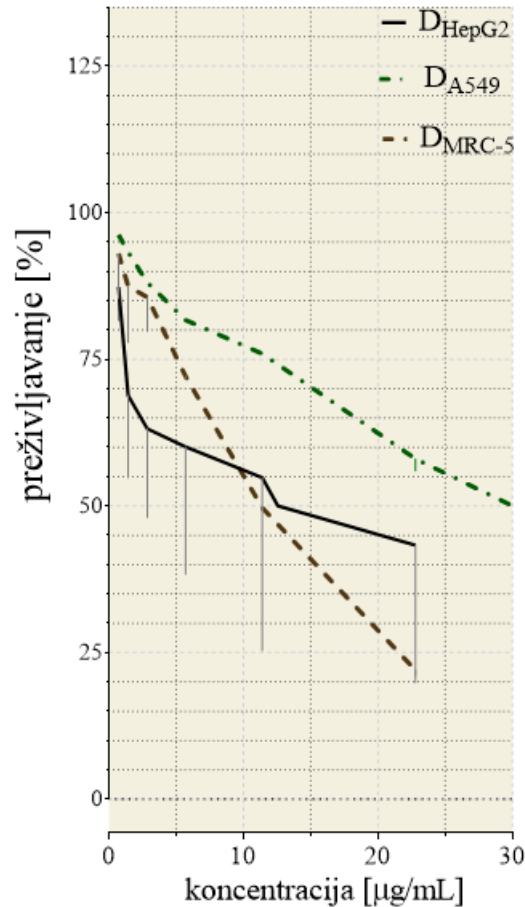
Takođe, inhibicija preživljavanja MRC-5 ćelija za 25% i 50% je detektovana pri različitim koncentracijama testiranih ekstrakata na sledeći način: PEAh<POMh<POAh<PEMh, odnosno PEAh<POAh<PEMh<POMh (**Slika 20**). Od svih testiranih ekstrakata, najveća citotoksičnost ustanovljena je za PEAh (IC_{50} - 750 $\mu\text{g/mL}$), dok je za POMh detektovana najslabija citotoksičnost (IC_{50} - 2200 $\mu\text{g/mL}$).



Slika 20. Uticaj individualno primenjenih odabranih ekstrakata na preživljavanje MRC-5 ćelija predstavljen krivom dozne zavisnosti.

REZULTATI

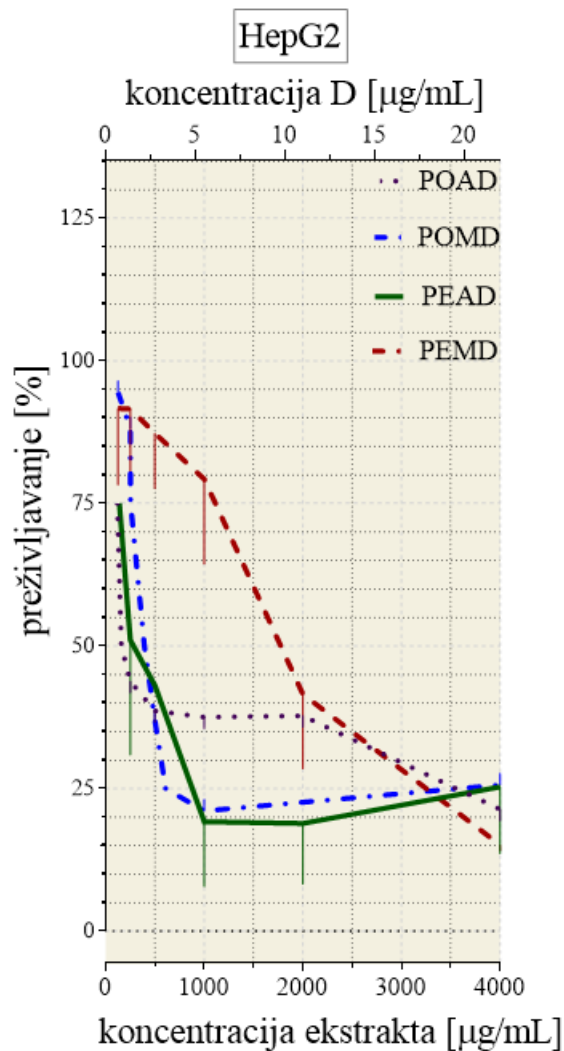
Nakon „skrininga” uticaja pojedinačnih ekstrakata na preživljavanje HepG2, A549 i MRC-5 ćelija, ispitivane su i kombinacije datih ekstrakata i citostatika D (**Tabela 18. B;C**). Pre navedenog praćena je citotoksičnost samog D. Prema dobijenim IC_{50} vrednostima jasno je da D pokazuje najslabiju citotoksičnost na A549 ćelijskoj liniji (IC_{50} -30 $\mu\text{g/mL}$), dok je preživljavanje HepG2 i MRC-5 ćelijske linije približno isto (IC_{50} -12,56 $\mu\text{g/mL}$ i IC_{50} -11,54 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 18. A, Slika 21**).



Slika 21. Uticaj individualno primenjenog D na preživljavanje HepG2, A549 i MRC-5 ćelija predstavljen krivom dozne zavisnosti.

REZULTATI

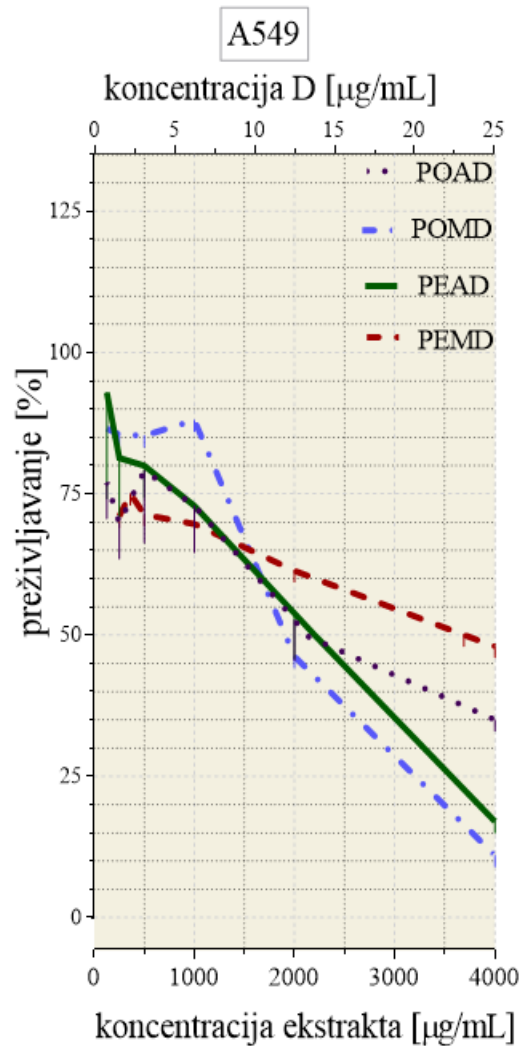
Dalje, na HepG2 ćelijskoj liniji, u kotretmanima POAD, POMD i PEAD, visoke koncentracije pojedinačnih agenasa su značajno redukovane. U skladu sa navedenim, preživljavanje 50% HepG2 ćelija, detektovano je pri koncentraciji POAh ekstrakta od 2800 $\mu\text{g/mL}$ primenjenog pojedinačno, odnosno 160 $\mu\text{g/mL}$ testiranog u kombinaciji sa D (POAh_{POAD}). U kotretmanu POMD IC₅₀ vrednost ekstrakta iznosila je 393 $\mu\text{g/mL}$ (POMh_{POMD}), dok je u individualnom tretmanu iznosila 1153 $\mu\text{g/mL}$ (POMh). U istom maniru, koncentracija PEAh ekstrakta, kojom je smanjena vijabilnost za 50% HepG2 ćelija, je iznosila 910 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 250 $\mu\text{g/mL}$, posmatrano u pojedinačnom i kombinovanom tretmanu (PEAh, PEAh_{PEAD}), respektivno. Takođe, IC₅₀ vrednost D u kotretmanu POAD, POMD i PEAD iznosile su 0,91 $\mu\text{g/mL}$, 2,24 $\mu\text{g/mL}$ i 1,425 $\mu\text{g/mL}$ (D_{POAD}, D_{POMD}, D_{PEAD}), dok je IC₅₀ vrednost citostatika u individualnom tretmanu zabeležena na 12,56 $\mu\text{g/mL}$ (D) (**Slika 22**). Za navedene kotretmane, POAD, POMD, PEAD, na HepG2 ćelijskoj liniji utvrđen je sinergistički odnos između agenasa (CI-0,13; 0,52; 0,39; respektivno) (**Tabela 18. E**). Drugačije od navedenog, iako je CI vrednost izračunata na osnovu IC₅₀ vrednosti ukazala na blagi antagonistički efekat (CI=1,63) u smeši PEMD, koncentracije obe supstance u smeši su donekle snižene u odnosu na IC₅₀ vrednosti uočene u testu aktivnosti pojedinačnih tretmana.



Slika 22. Uticaj kotretmana ekstrakata i D na vijabilnost HepG2 ćelija predstavljen krivom doznog odgovora.

REZULTATI

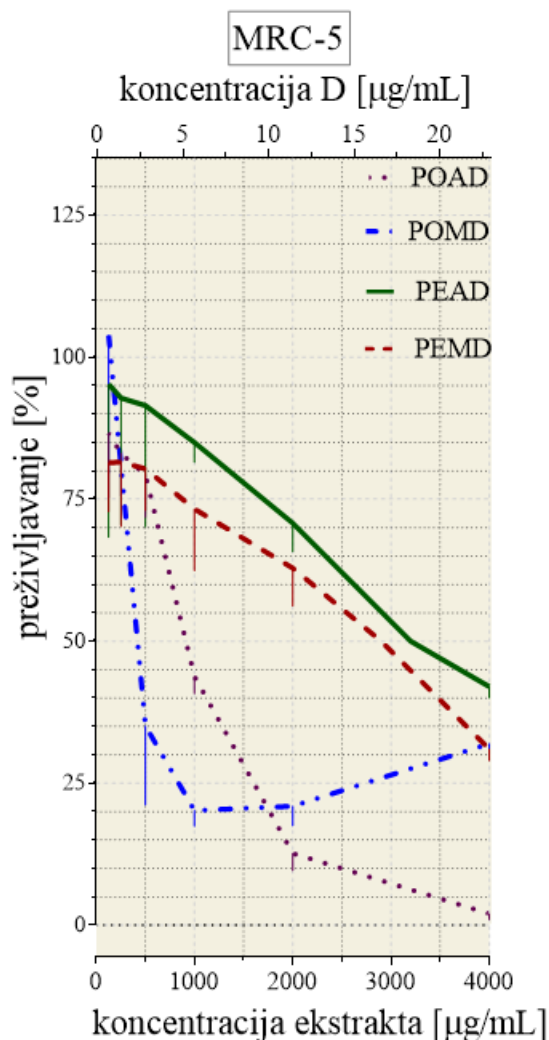
Nadalje, na A549 ćelijskoj liniji IC_{50} vrednosti su dostignute pri visokim koncentracijama, kako u individualnim tretmanima, tako i u kotretmanima (**Slika 23**). Između agenasa primećen je sinergistički odnos u kotretmanu POAD (CI-0,94), indiferentni odnos u kotretmanu POMD (CI-1,05) i antagonistički odnos u kotretmanima PEAD (CI-1,22) i PEMD (CI-2,37).



Slika 23. Uticaj kotretmana ekstrakata i D na vijabilnost A549 ćelija predstavljen krivom doznog odgovora.

REZULTATI

U poređenju sa pojedinačnim tretmanima, ekstrakti PEAh i PEMh primenjeni u kotretmanima sa D, PEAD i PEMD, značajno smanjuju osetljivost normalne ćelijske linije MRC-5. Preživljavanje 50% MRC-5 ćelija, postignuto je sa 18,24 $\mu\text{g/mL}$ D i 3200 $\mu\text{g/mL}$ PEAh ekstrakta u kotretmanu (PEAD), odnosno sa 11,4 $\mu\text{g/mL}$ D kao i 750 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakta PEAh primenjenim u pojedinačnim tretmanima. Takođe, za dostizanje IC_{50} vrednosti potrebna je doza od 16,53 $\mu\text{g/mL}$ D i 2900 $\mu\text{g/mL}$ PEMh ekstrakta primenjenim u kotretmanu PEMD (Slika 24). Kao što je već navedeno pojedinačne doze potrebne za postizanje IC_{50} vrednosti D i PEMh ekstrakta iznose 11,4 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 900 $\mu\text{g/mL}$. Nadalje, u kotretmanima POAD, PEAD, PEMD ustanovljeno je prisustvo antagonističke interakcije (CI-1,41, CI-5,87, CI-4,67), dok je u kotretmanu POMD odnos između testiranih agenasa označen kao sinergizam (CI-0,40).



Slika 24. Uticaj kotretmana ekstrakata i D na vijabilnost MRC-5 ćelija predstavljen krivom doznog odgovora.

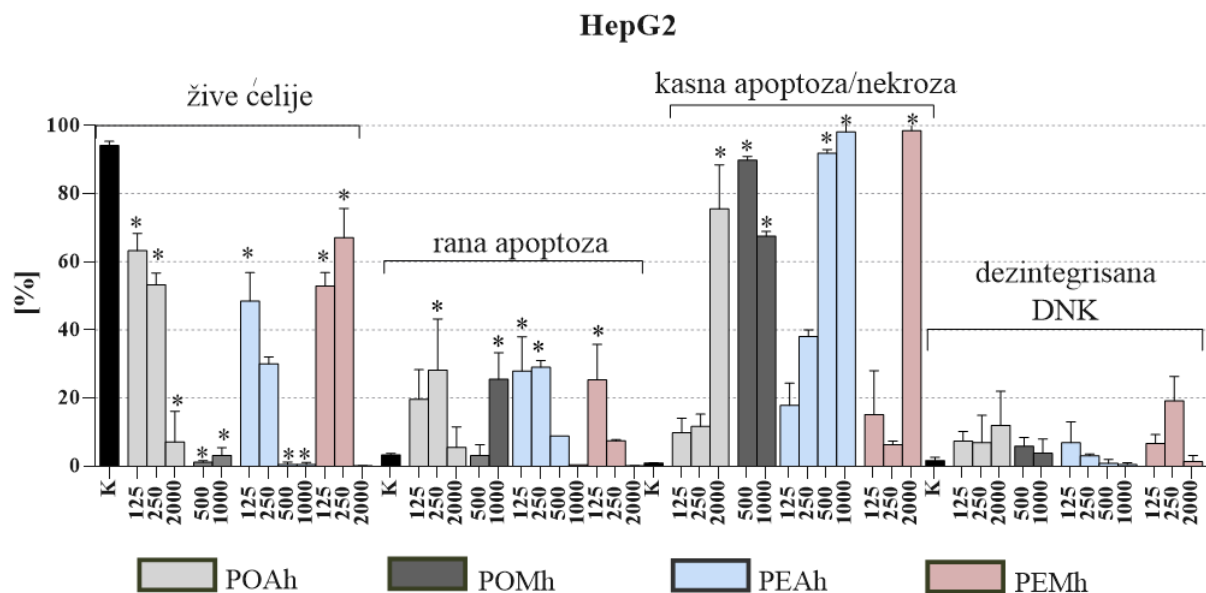
4.2.2. Analize uticaja POAh, POMh, PEAh i PEMh ekstrakata protočnom citometrijom

U daljem radu sprovedeni su testovi uticaja POAh, POMh, PEAh i PEMh ekstrakata i citostatika D, individualno i u kombinaciji, na indukciju apoptoze i remećenje ćelijskog ciklusa primenom protočne citometrije. U ovim testovima ispitan je opseg koncentracija od 125 µg/mL do 2000 µg/mL, pri čemu su predstavljane one vrednosti koje u testovima apoptoze nisu izazivale veliki procenat debria. U slučajevima prisustva linearnog doznog odgovora za IC₅₀ vrednosti posebno su konstruisani grafici uvođenja ćelija u ćelijsku smrt i nagomilavanja ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Kako IC₅₀ vrednosti predstavljaju najčešće korišćeni numerički pokazatelj citotoksičnog potencijala, u diskusiji rezultata stavili smo akcenat upravo na njih.

4.2.2.1. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane ispitivanim ekstraktima na ćelijskim linijama različitih humanih karcinoma

4.2.2.1.1. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane ispitivanim ekstraktima na HepG2 ćelijskoj liniji

Na HepG2 ćelijskoj liniji, svi ekstrakti u testiranim koncentracijama dovode do značajne redukcije broja živih ćelija (**Slika 25**). Pri koncentraciji od 250 µg/mL, POAh (28,18%) i PEAh (29%) uvode značajan broj ćelija u ranu apoptozu. Isti trend je primećen za PEMh ekstrakt (25,33%) pri koncentraciji od 125 µg/mL. Dalje, istaknuto prisustvo kasno apoptotičnih/nekrotičnih ćelija zabeleženo je nakon tretmana sa POAh, POMh, PEAh i PEMh pri koncentracijama od 500 µg/mL do 2000 µg/mL. Međutim, ističe se da POMh uzrokuje indukciju rane (25,52%) i kasne apoptoze/nekroze (67,50%) pri koncentraciji od 1000 µg/mL, dok pri nižoj koncentraciji (500 µg/mL) uzrokuje ulazak ćelija isključivo u kasnu apoptozu (89,85%).



Slika 25. Uticaj pojedinačnih ekstrakata POAh, POMh, PEAh i PEMh na indukciju rane i kasne apoptoze/nekroze kod HepG2 ćelija.

Posmatrano prema kotretmanima, POAD i POMD dovode do indukcije rane i kasne apoptoze/nekroze u svim testiranim koncentracijama (**Slika 26AB**). Indukcija jedino kasne apoptoze/nekroze uočena je nakon kotretmana PEAD (počev od koncentracije 250 µg/mL+1,425 µg/mL; **Slika 26C**) i PEMD (u obe tretirane koncentracije; **Slika 26D**).

REZULTATI

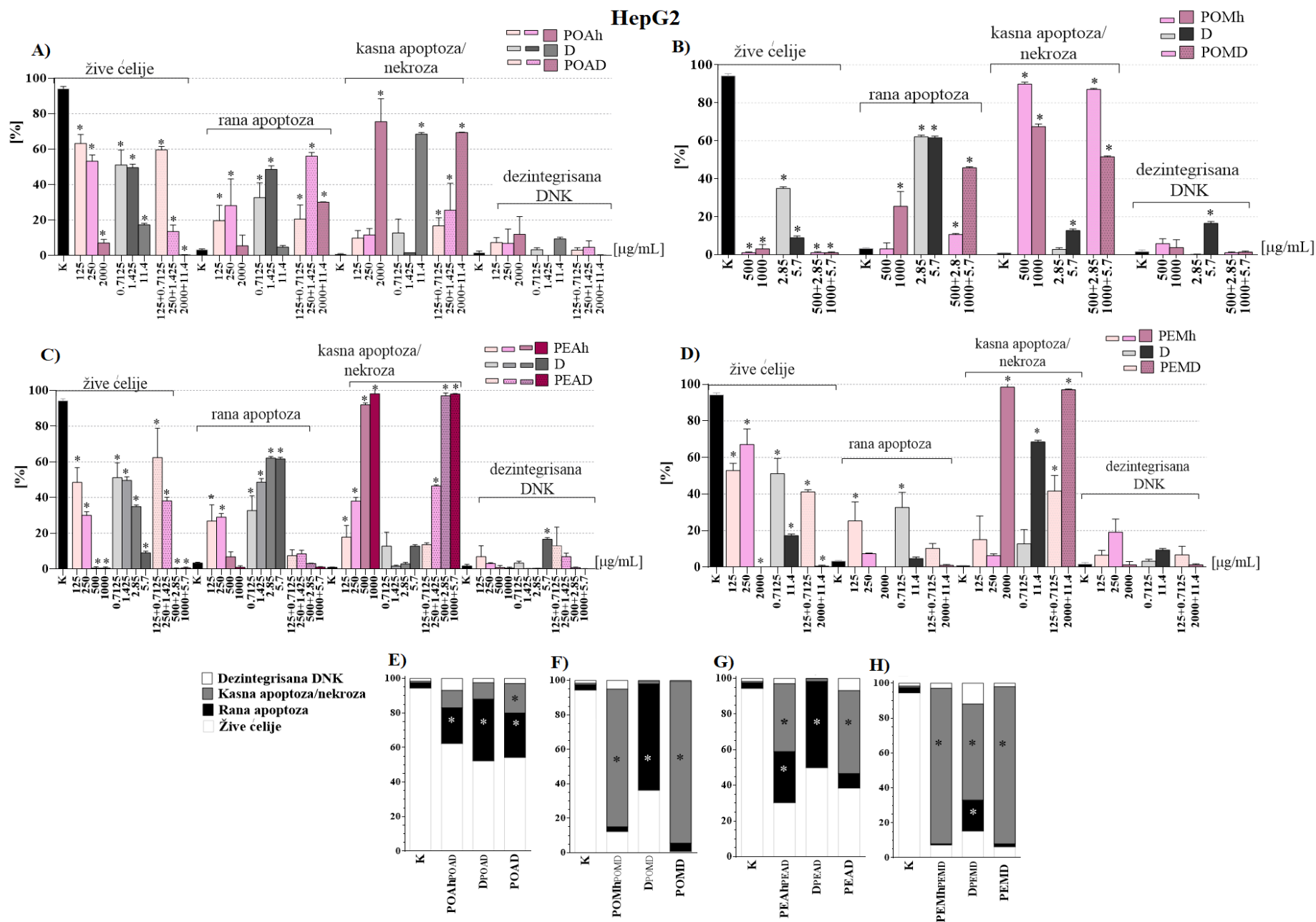
Prilikom dalje analize rezultata kombinovanih tretmana, a radi lakšeg poređenja sa individualnim tretmanima, konstruisani su grafici prema IC_{50} vrednostima procenjenim u testu citotoksičnosti. Na **Slici 26E** jasno se uočava da kotretman POAD (160 $\mu\text{g/mL}$ +0,91 $\mu\text{g/mL}$) uvodi ćelije u ranu (aproksimativno 17%) i kasnu apoptozu (26%), dok individualni agensi pri istoj koncentraciji indukuju isključivo ranu apoptozu (160 $\mu\text{g/mL}$ POAh_{POAD}- 21%; 0,91 $\mu\text{g/mL}$ D_{POAD}- 36%).

Nakon kotretmana POMD (393 $\mu\text{g/mL}$ +2,24 $\mu\text{g/mL}$) detektovano je značajno prisustvo kasno apoptotičnih/nekrotičnih ćelija (aproksimativno 94%) (**Slika 26F**). Isti efekat postignut je i pojedinačnim tretmanom (393 $\mu\text{g/mL}$) POMh_{POMD} ekstraktom (80%), dok je D individualno primenjen (D_{POMD}-2,24 $\mu\text{g/mL}$) uzrokovao ulazak ćelija u ranu apoptozu (62%).

Kotretman PEAD (250 $\mu\text{g/mL}$ +1,425 $\mu\text{g/mL}$) indukuje ulazak ćelija isključivo u kasnu apoptozu/nekrozu (46,5%), dok pojedinačni agensi uvode ćelije u ranu (1,425 $\mu\text{g/mL}$ D_{PEAD} -48,65%) ili u ranu i kasnu apoptozu/nekrozu (250 $\mu\text{g/mL}$ PEAh_{PEAD}-29% i 38%, respektivno) (**Slika 26G**).

U slučaju kotretmana PEMD (1755 $\mu\text{g/mL}$ +10,1 $\mu\text{g/mL}$) detektovano je značajno prisustvo kasno apoptotičnih/nekrotičnih ćelija (90%). Na isti način delovali su i pojedinačni agensi (1755 $\mu\text{g/mL}$ PEMh_{PEMD}-89%; 10,1 $\mu\text{g/mL}$ D_{PEMD}-55%), sa tim što je D indukovao i ulazak ćelija u ranu apoptozu (18%) (**Slika 26H**).

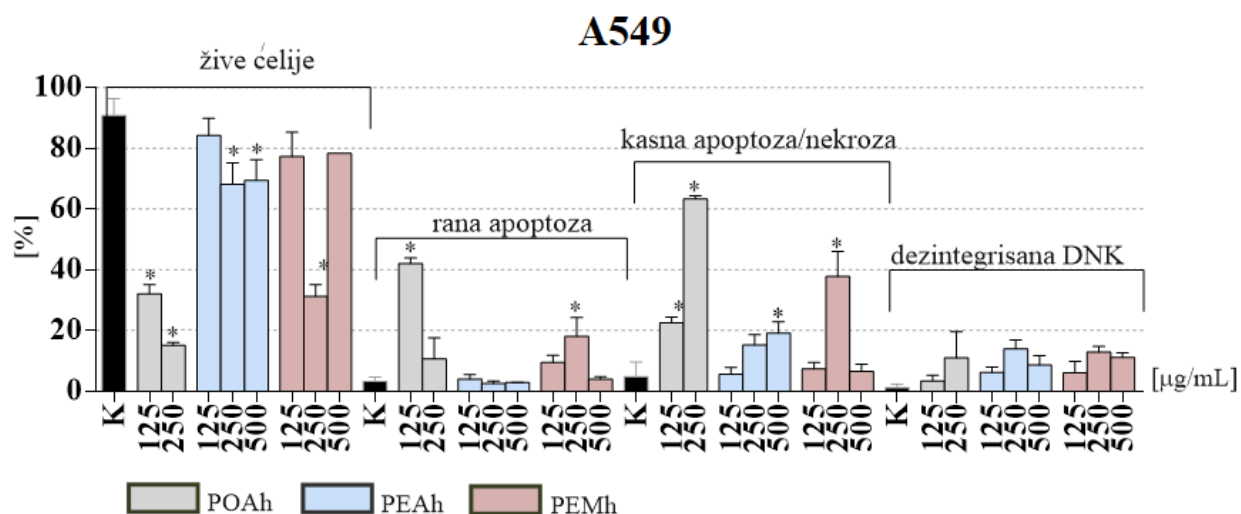
REZULTATI



Slika 26. Indukcija rane i kasne apoptoze/nekroze kod HepG2 ćelija individualnim i kombinovanim tretmanima u različitim dozama sa: **A)** POAh, D i POAD; **B)** POMh, D i POMD; **C)** PEAh, D i PEAD; **D)** PEMh, D i PEMD; individualnim i kombinovanim tretmanima pri IC₅₀ vrednostima: **E)** POAh_{POAD}, D_{POAD} i POAD; **F)** POMh_{POMD}, D_{POM}, POMD; **G)** PEAh_{PEAD}, D_{PEA}, PEAD; **H)** PEMh_{PEMD}, D_{PEM}, PEMD

4.2.2.1.2. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane ispitivanim ekstraktima na A549 ćelijskoj liniji

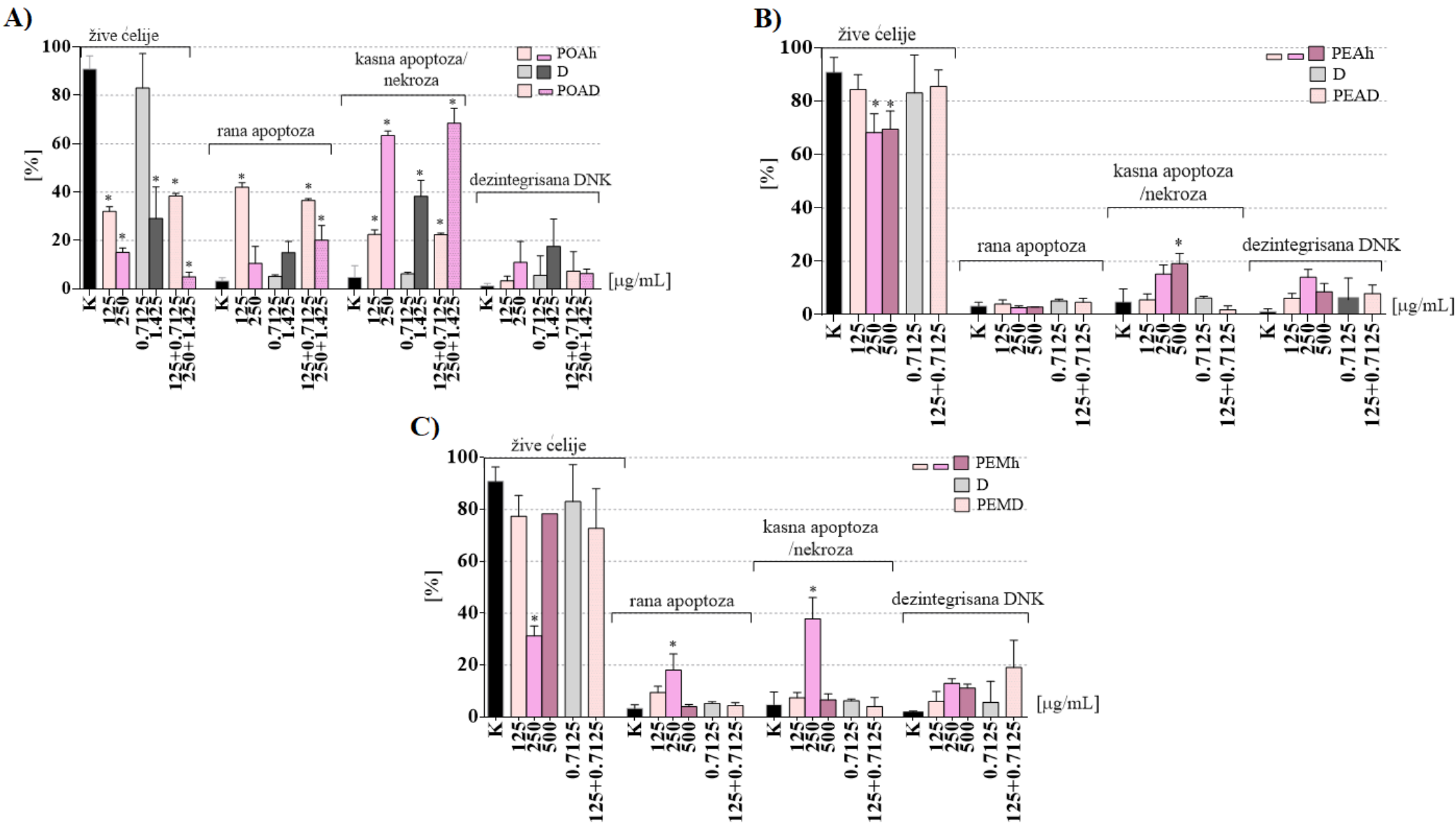
Na A549 ćelijskoj liniji na manje toksičnim koncentracijama (subIC₅₀) POAh ekstrakt uvodi ćelije u ranu apoptozu (42,02% pri koncentraciji od 125 µg/mL) i kasnu apoptozu (22,52% i 63,38% pri koncentracijama od 125 µg/mL odnosno 250 µg/mL) (**Slika 27**). Dalje, značajno smanjenje živih ćelija (za 30,56%) i njihovo uvođenje u kasnu apoptozu/nekrozu (19,1%) prisutno je nakon delovanja PEAh ekstrakta u koncentraciji od 500 µg/mL. Proapoptotski efekat PEMh ekstrakta prisutan je u vidu nemonotonog doznog odgovora, pri čemu jedino koncentracija od 250 µg/mL indukuje ranu (18,05%) i kasnu apoptozu (37,81%).



Slika 27. Indukcija rane i kasne apoptoze/nekroze pojedinačnim tretmanima odabranih ekstrakata kod A549 ćelija.

Posmatrano prema kotretmanima (**Slika 28A**), POAD u oba testirana kotretmana (125 µg/mL+0,7125 µg/mL i 250 µg/mL+1,425 µg/mL) uvodi ćelije u ranu apoptozu (36,59% i 20,16%) i kasnu apoptozu (22,45% i 68,52%). U kontrastu sa navedenim, PEAD i PEMD u koncentraciji od 125 µg/mL ekstrakta i 0,7125 µg/mL citostatika ne dovode do apoptotske ćelijske smrti (**Slika 28B;C**).

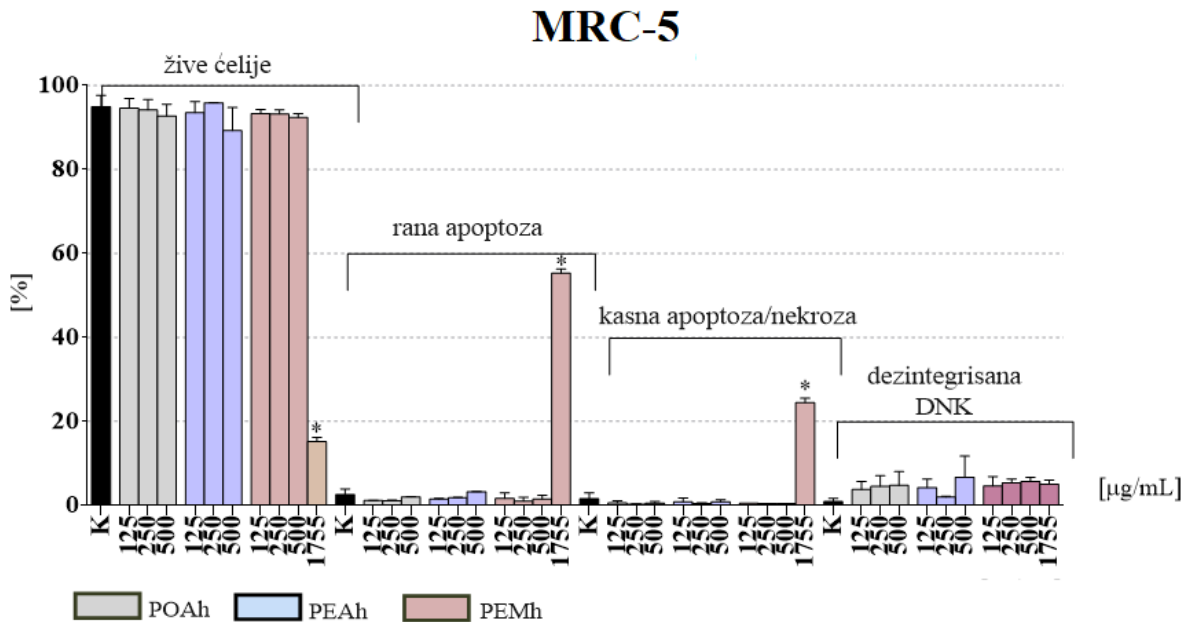
A549



Slika 28. Inducija rane i kasne apoptoze/nekroze kod A549 ćelija pojedinačnim i kombinovanim tretmanima: **A)** POAh, D i POAD; **B)** PEAh, D i PEAD; **C)** PEMh, D i PEMD.

4.2.2.1.3. Analiza tipa ćelijske smrti na MRC-5 ćelijskoj liniji

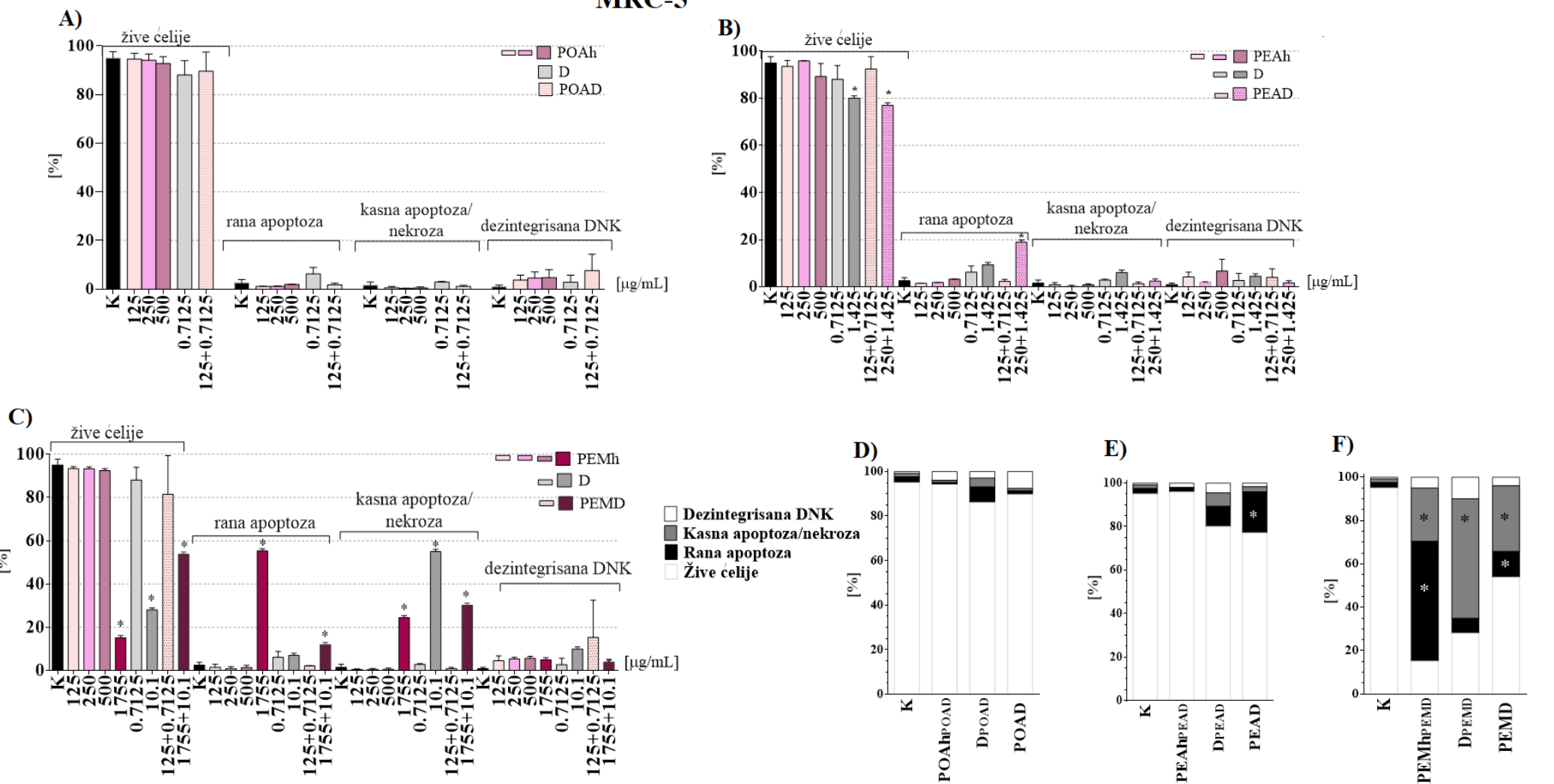
Na MRC-5 ćelijskoj liniji proapoptotski efekat POAh, PEAh i PEMh ekstrakata u koncentracionom opsegu od 125-500 µg/mL nije detektovan. U koncentraciji od 1755 µg/mL PEMh indukuje ranu (55,3%) i kasnu apoptozu (24,5%) (Slika 29).



Slika 29. Indukcija rane i kasne apoptoze/nekroze pojedinačnim tretmanima odabranih ekstrakata kod MRC-5 ćelija.

Posmatrano prema kotretmanima, POAD, PEAD i PEMD u dozama od 125 µg/mL za ekstrakte i 0,7125 µg/mL za D, ne dovode do apoptotske ćelijske smrti (Slika 30A-C). U istom maniru, prilikom kotretmana POAD pri koncentracijama od 160 µg/mL ekstrakta i 0,91 µg/mL D, proapoptotski efekat izostaje. Nadalje, značajan procenat ćelija u ranoj apoptozi (18,91%) detektovan je tek nakon povećanja doze kotretmana PEAD (250 µg/mL+1,425 µg/mL). Takođe, indukcija rane (12%) i kasne apoptoze/nekroze (30,02%) primećena je nakon povećanja doze kotretmana PEMD (1755 µg/mL+10,1 µg/mL). Kako testirane koncentracije u navedenim kotretmanima predstavljaju IC₅₀ vrednosti procenjene za HepG2 ćelije, dobijeni rezultati prilikom testiranja tipa ćelijske smrti pri istim koncentracijama POAD (160 µg/mL i 0,91 µg/mL), PEAD (250 µg/mL+1,425 µg/mL) i PEMD (1755 µg/mL+10,1 µg/mL) ekstrakta na normalnim ćelijama od naročitog su značaja jer ukazuju na bezbednost primene ekstrakata ili sugerišu mehanizam kojim se ostvaruje njihova citotoksičnost (Slika 30D-F).

MRC-5

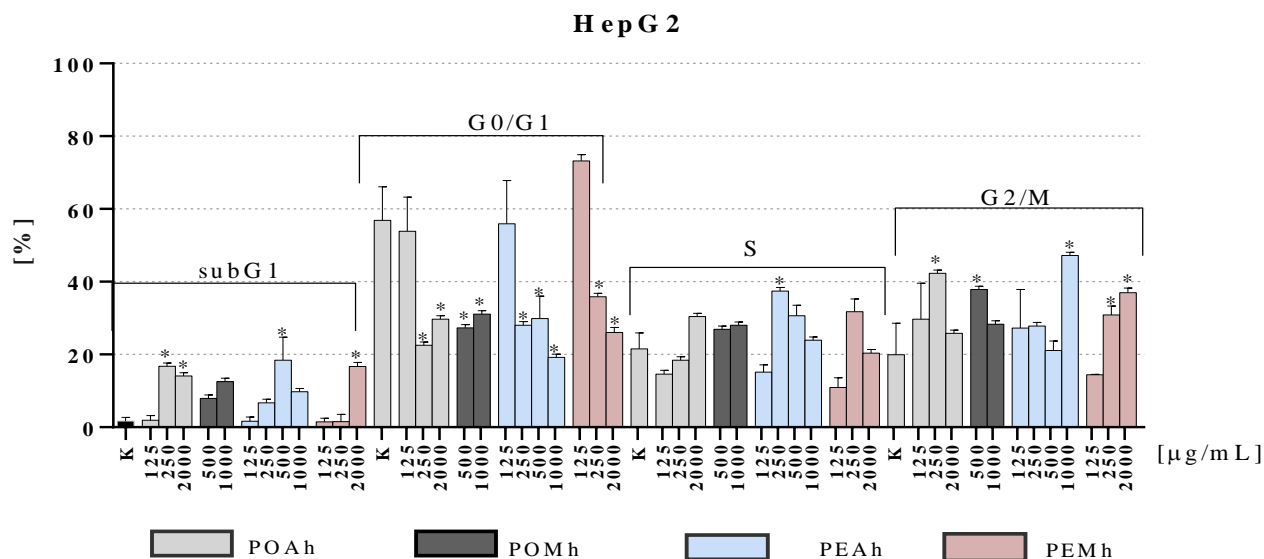


Slika 30. Indukcija rane i kasne apoptoze/nekroze kod MRC-5 ćelija pojedinačnim i kombinovanim tretmanima u različitim dozama sa: **A)** POAh, D i POAD; **B)** PEAh, D i PEAD; **C)** PEMh, D i PEMD; individualnim i kombinovanim tretmanima pri IC₅₀ vrednostima: **D)** POAh_{POAD}, D_{POAD} i POAD; **E)** PEAh_{PEAD}, D_{PEA}, PEAD; **F)** PEMh_{PEMD}, D_{PEM}, PEMD.

4.2.2.2. Uticaj biljnih ekstrakata na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

4.2.2.2.1. Uticaj POAh, POMh, PEAh i PEMh ekstrakata i D na ćelijski ciklus HepG2 ćelija

Nakupljanje HepG2 ćelija u G2/M fazi na račun smanjenja G0/G1 faze primećeno je nakon individualnih tretmana sa svim testiranim ekstraktima: POAh (250 µg/mL), POMh (500 µg/mL), PEAh (1000 µg/mL) i PEMh (250 µg/mL i 2000 µg/mL). Takođe, POAh (250 i 2000 µg/mL) i PEMh (2000 µg/mL) ekstrakti dovode do povećanja broja ćelija u subG1 fazi. Nadalje, nakon pojedinačnog tretmana sa PEAh ekstraktom, pored uočenog bloka u G2/M fazi detektovan je i zastoj ćelijskog ciklusa u S fazi (37,4%) i subG1 fazi (18,39%) pri koncentracijama od 250 µg/mL i 500 µg/mL, respektivno (**Slika 31**).



Slika 31. Uticaj pojedinačnih ekstrakata POAh, POMh, PEAh i PEMh na ćelijski ciklus kod HepG2 ćelija.

Posmatrano prema kotretmanima, POAD u svim testiranim koncentracijama uzrokuje smanjenje broja ćelija u G0/G1 fazi, dok se broj ćelija u zavisnosti od korišćene koncentracije povećava u G2/M (125 µg/mL+0,7125 µg/mL) i subG1 (250 µg/mL+1,425 µg/mL) fazi (**Slika 32A**). Neočekivano, najveće testirane koncentracije ekstrakta i citostatika primenjene zajedno (2000 µg/mL+11,4 µg/mL) nisu izazvale statistički značajno nakupljanje ćelija ni u jednoj fazi ćelijskog ciklusa.

U slučaju kotretmana POMD (500 µg/mL+2,85 µg/mL) i PEAD (sve testirane doze) zapažen je trend smanjenja brojnosti ćelija u G0/G1 praćen povećanjem broja ćelija u G2/M fazi (**Slika 32B**). Takođe, nakupljanje ćelija u S fazi zabeleženo je pri kotretmanu PEAD pri čemu je koncentracija ekstrakta iznosila 250 µg/mL, a citostatika 1,425 µg/mL (**Slika 32C**).

Trend smanjena ćelija u G0/G1 fazi prisutan je i nakon PEMD kotretmana, pri čemu se nakupljanje ćelija uočava u subG1 i G2/M fazi u zavisnosti od primenjenih koncentracija (2000 µg/mL +11,4 µg/mL i 125 µg/mL+0,7125 µg/mL, respektivno, **Slika 32D**).

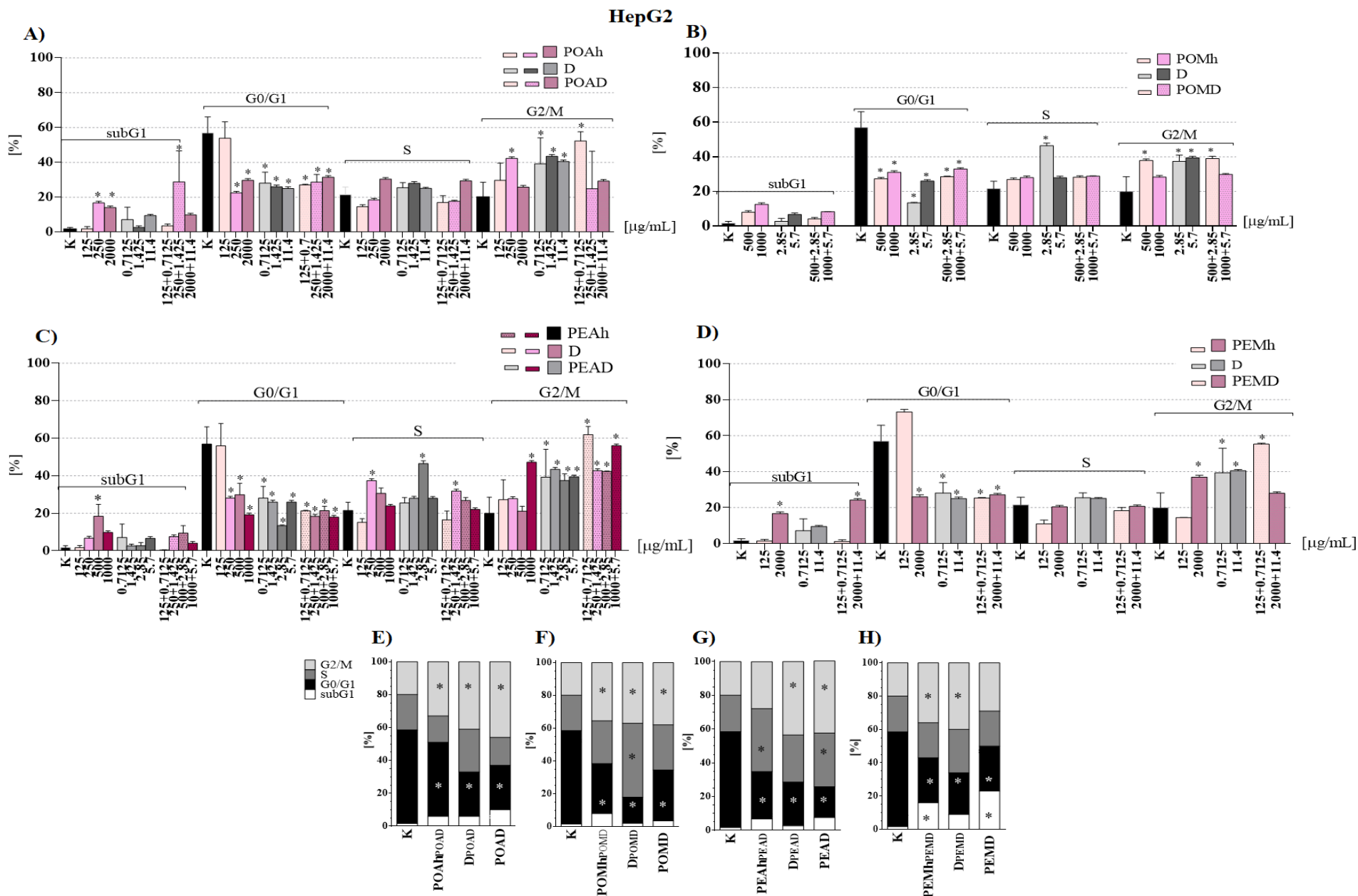
Kao i prilikom predstavljanja rezultata proapoptotskog efekta, i u ovom delu radi lakšeg poređenja uticaja individualnih i kombinovanih tretmana na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa konstruisani su grafici prema IC₅₀ vrednostima procenjenim u testu citotoksičnosti. Kod svih individualnih tretmana i kotretmana zabeleženo je smanjenje broja ćelija u G0/G1 fazi (**Slika 32E-H**). U slučaju POAD (46%) i POMD (37,97%) nakupljanje ćelija uočeno je u G2/M fazi. U istom maniru

REZULTATI

delovali su i individualni agensi primenjeni u istoj koncentraciji poput onih u kotretmanima (POAh_{POAD}-33%; D_{POAD}-41%; POMh_{POMD}-35,5%; D_{POMD}-37%), pri čemu je D_{POMD} dodatno izazvao stvaranje bloka u S fazi (45%).

Nakon kombinovanog tretmana HepG2 ćelija sa PEAD (250 µg/mL +1,425 µg/mL) dolazi do akumulacije ćelija u G2/M (42,69%) i S (31,84%) fazama i do smanjenja broja ćelija u G0/G1 fazi (18,34%). Prisustvo nakupljanja ćelija u S fazi (37,4%) zabeleženo je nakon individualnog tretmana sa PEAh_{PEAD} (250 µg/mL), dok je povećanje broja u G2/M fazi (43,45%) detektovano nakon pojedinačnog tretmana sa D_{PEAD} (1,425 µg/mL). Još jednom je istaknuto da je prilikom oba individualna tretmana prisutno opadanje brojnosti ćelija u G0/G1 (PEAh_{PEAD}-28,05%; D_{PEAD}-25,96%). Kotretman PEMD (1755 µg/mL+10,1 µg/mL) i individualni tretman PEMh_{PEMD} (1755 µg/mL) utiču na povećanje procenta ćelija u apoptozi, na šta jasno ukazuje istaknuti subG1 pik (23% odnosno 16%) na naslaganom stubičastom grafiku. Formirani subG1 pik rezultat je nakupljanja populacije ćelija sa hipodiploidnom DNK, koja je osnovna karakteristika apoptotičnih ćelija. Dalje, broj ćelija u G0/G1 fazi se značajno smanjuje nakon PEMD kotretmana (27%) i pojedinačnog tretmana PEMh_{PEMD} ekstraktom (27%), pri čemu ekstrakt pored nakupljanja ćelija u subG1 fazi, dovodi i do zastoja G2/M faze (36%). Individualno primenjen D_{PEMD} (10,1 µg/mL) takođe dovodi do redukcije broja ćelija u G0/G1 fazi (25%), dok se broj ćelija povećava u G2/M fazi (40%).

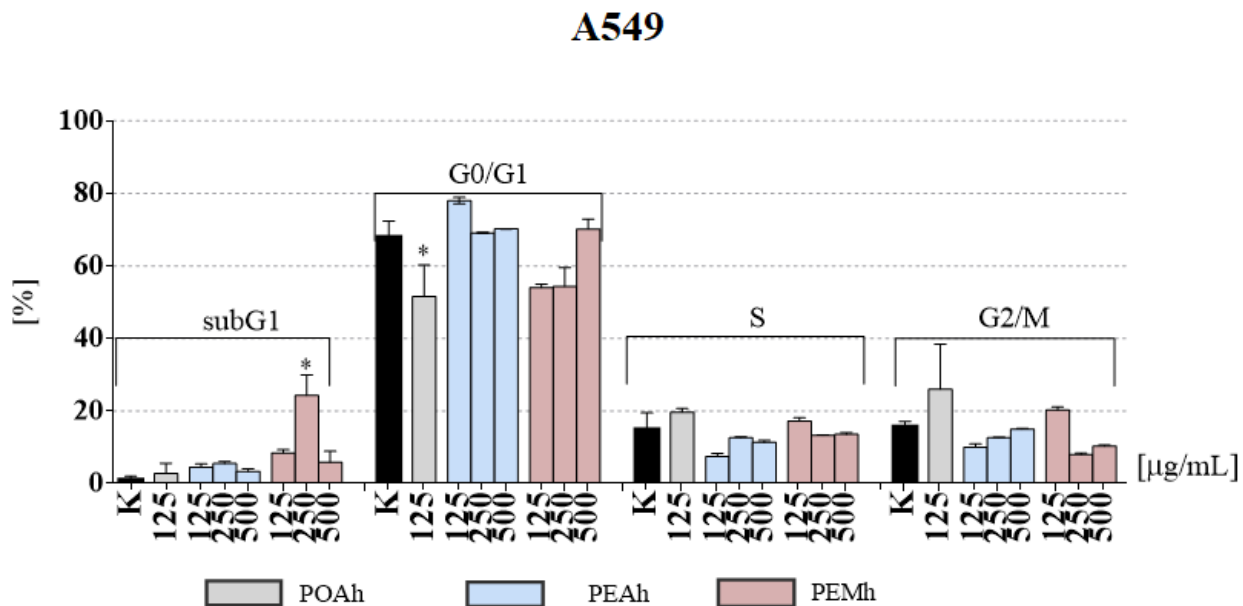
REZULTATI



Slika 32. Uticaj na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa kod HepG2 ćelija individualnim i kombinovanim tretmanima u različitim dozama sa: **A)** POAh, D i POAD; **B)** POMh, D i POMD; **C)** PEAh, D i PEAD; **D)** PEMh, D i PEMD; individualnim i kombinovanim tretmanima pri IC₅₀ vrednostima: **E)** POAh_{POAD}, D_{POAD} i POAD; **F)** POMh_{POMD}, D_{POMD}, POMD; **G)** PEAh_{PEAD}, D_{PEA}, PEAD; **H)** PEMh_{PEMD}, D_{PEM}, PEMD.

4.2.2.2. Uticaj POAh, PEAh i PEMh ekstrakata i D na ćelijski ciklus A549 ćelija

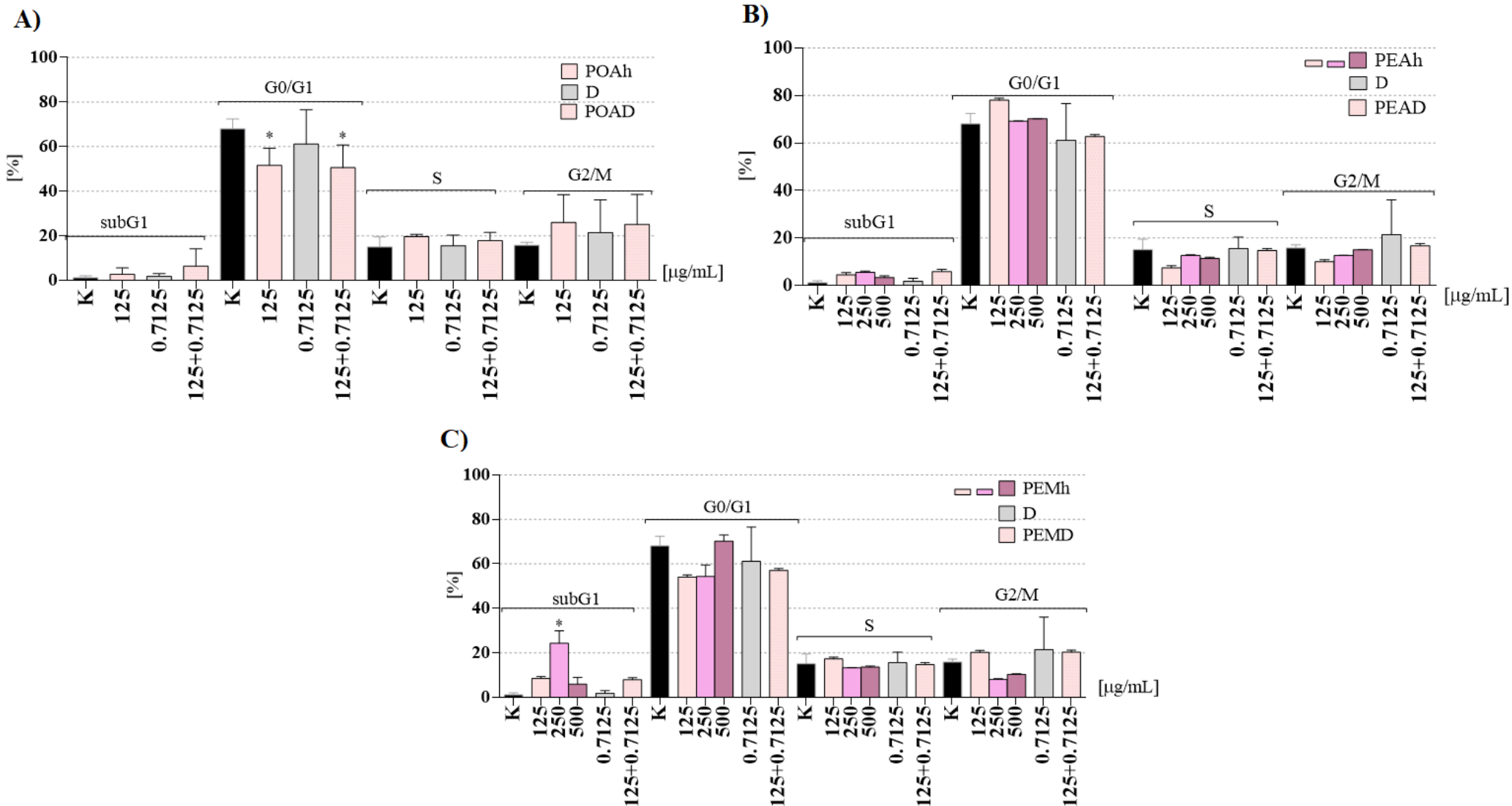
Ekstrakt POAh u subinhibitornoj koncentraciji (125 µg/mL) dovodi do smanjenja broja A549 ćelija u G0/G1 fazi (51,56%), međutim nakupljanje ćelija u S i G2/M fazi se ne smatra statistički značajnim u poređenju sa netretiranom kontrolom (**Slika 33**). Ekstrakt PEAh i PEMh pri koncentraciji od 125 µg/mL testirani individualno ne utiču na distribuciju A549 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Međutim, PEMh u koncentraciji od 250 µg/mL dovodi do nakupljanja ćelija u subG1 fazi (24,30%), pri čemu su G0/G1 i G2/M faze podjednako umanjene (aproksimativno 1,6 puta manje).



Slika 33. Uticaj na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa individualnim tretmanima kod A549 ćelija.

U daljem radu ispitani su kotretmani ekstrakata (125 µg/mL) i D (0,7125 µg/mL). Kao i kod individualnih tretmana, prilikom kombinovanja POAD zabeležen je pad brojnosti ćelija G0/G1 fazi (50,57%) i statistički neprimetno povećanje broja ćelija u S i G2/M fazi (**Slika 34A**). Dalje, poput pojedinačnih tretmana, kod kotretmana PEAD i PEMD nije uočena promena distribucije ćelija u odnosu na netretiranu kontrolu (**Slika 34B;C**).

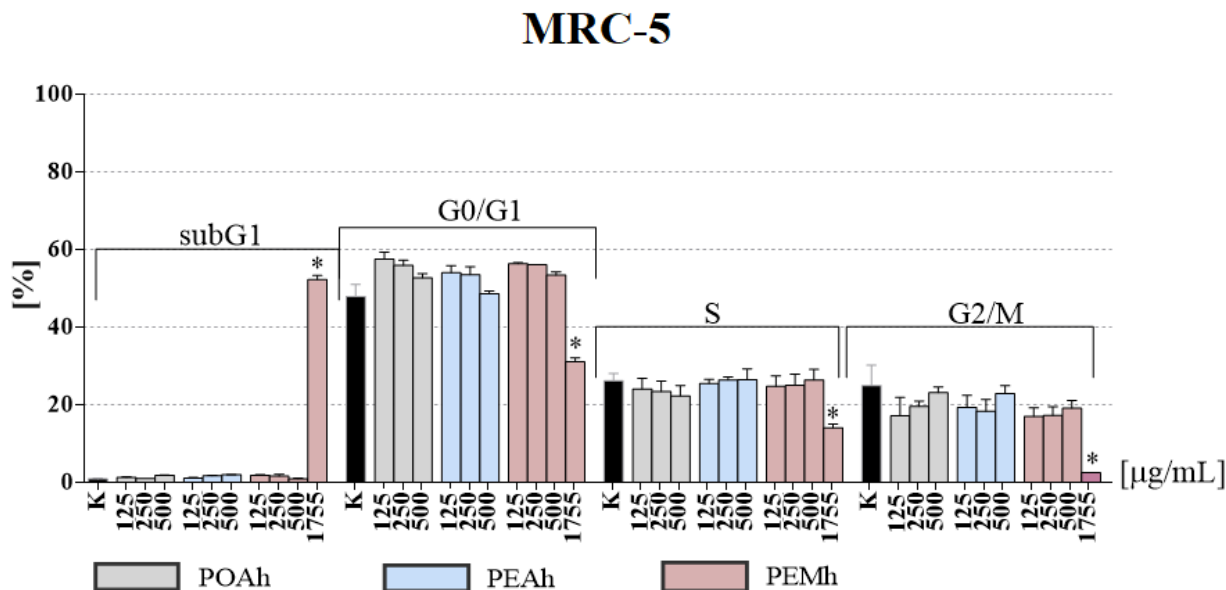
A549



Slika 34. Uticaj na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa kod A549 ćelija: individualnim i kombinovanim tretmanima u različitim dozama sa: A) POAh, D i POAD; B) PEAh, D i PEAD; C) PEMh, D i PEMD.

4.2.2.2.3. Uticaj POAh, PEAh i PEMh ekstrakata i D na ćelijski ciklus MRC-5 ćelija

Raspored MRC-5 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ne remeti ni jedan od testiranih ekstrakata u koncentracijama od 125 do 500 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakt PEMh pri koncentraciji 1755 $\mu\text{g/mL}$ uzrokuje primetno nakupljanje ćelija u subG1 fazi (52,3%) pri čemu broj ćelija u svim ostalim fazama izrazito opada (G0/G1-31,1%; S-14,1%; G2/M-2,5%) (Slika 35).

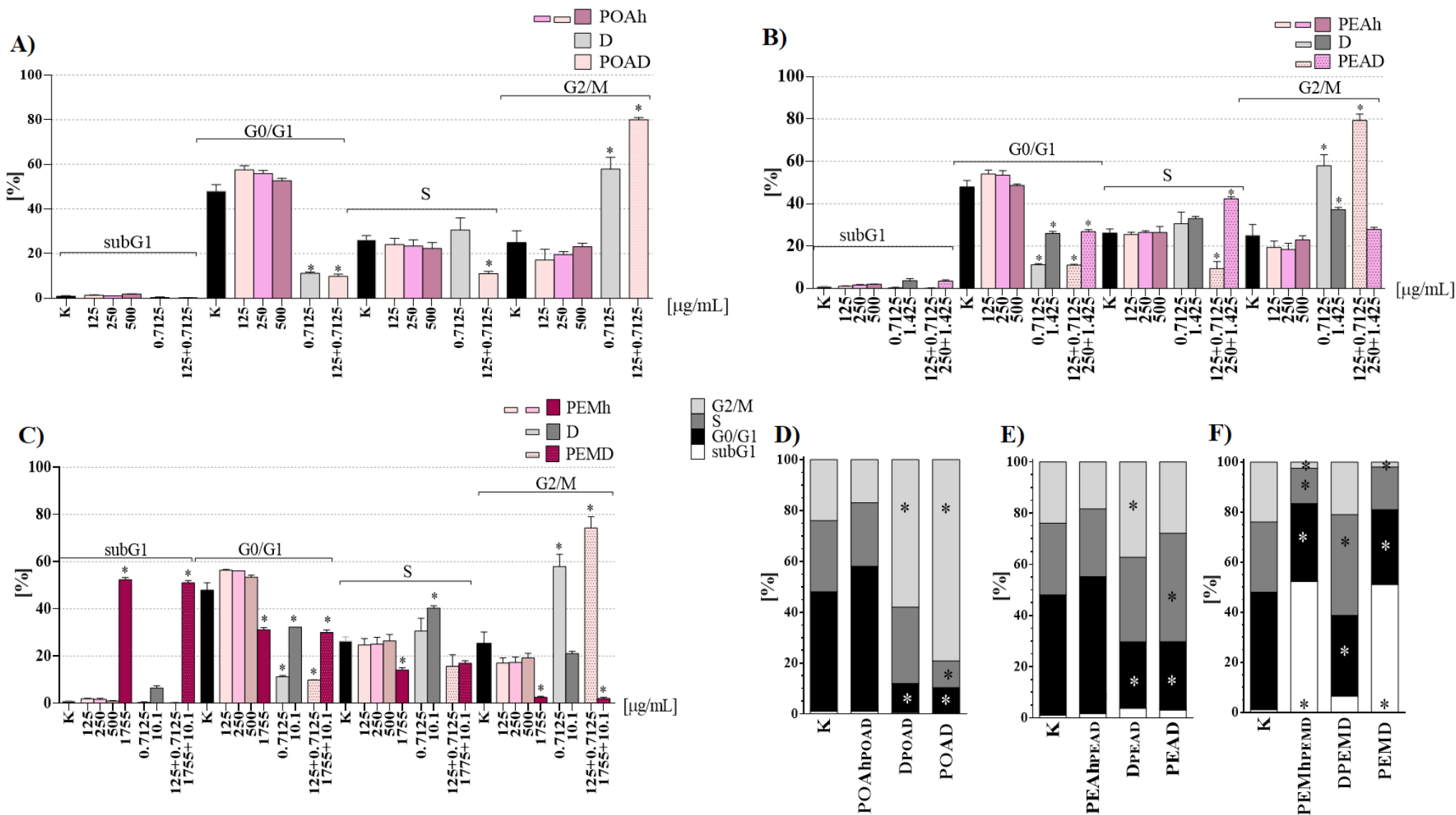


Slika 35. Uticaj na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pojedinačnim tretmanima odabranih ekstrakata kod MRC-5 ćelija.

Dalje, svi kotretmani koji sadrže 125 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakta i 0,7125 $\mu\text{g/mL}$ citostatika utiču na povećanje broja ćelija u G2/M fazi na račun G0/G1 faze, pri čemu se statistički značajno umanjenoje broja ćelija takođe zapaža u S fazi kod kotretmana POAD i PEAD (Slika 36A-C).

U skladu sa dosadašnjim predstavljanjem rezultata, nakon kalkulacije IC_{50} vrednosti kotretmana na HepG2 ćelijama u cilju procene bezbednosti i uzroka ispoljavanja citotoksičnosti na normalnoj ćelijskoj liniji, ekstrakti u izdvojenim IC_{50} koncentracijama su individualno i u kombinaciji sa D primenjeni u testu distribucije ćelija prema fazama ćelijskog ciklusa. Dobijeni rezultati ukazuju da kotretman POAD (160 $\mu\text{g/mL}$ +0,91 $\mu\text{g/mL}$) dovodi do zastoja u G2/M fazi (79,12%), pri čemu se broj ćelija u G0/G1 (10,12%) i S (10,56%) fazama značajno redukuje. Isti trend, sa izuzetkom redukcije ćelija u S fazi, primećen je i kod individualnog tretmana sa D_{POAD} (G2/M-58%; G0/G1-11,5%) (Slika 36D). Smanjenje broja ćelija u G0/G1 fazi detektovano je i nakon kotretmana sa PEAD (250 $\mu\text{g/mL}$ +1,425 $\mu\text{g/mL}$ -26,8%) kao i nakon individualnog tretmana sa D_{PEAD} (1,4 $\mu\text{g/mL}$ -22,99%), međutim povećanje broja ćelija nakon kotretmana zabeleženo je u S fazi (42,3%), a nakon pojedinačnog tretmana sa D_{PEAD} u G2/M fazi (37,27%) (Slika 36E). Kotretman PEMD (1755 $\mu\text{g/mL}$ +10,1 $\mu\text{g/mL}$) dovodi do rasta broja ćelija u subG1 fazi (51%) dok je ćelijska distribucija po drugim fazama umanjena (G0/G1-30% i G2/M-2%). Trend povećanja brojnosti ćelija u subG1 fazi (52,3%) kao i redukcije G0/G1 (31,1) S (14,1%) i G/M faze (2,5%) prisutan je nakon tretmana $\text{PEMh}_{\text{PEMD}}$ (1755 $\mu\text{g/mL}$). Povećanje S faze (42,29%) na račun G0/G1 faze (32,27%) izazvano je pojedinačnim tretmanom D_{PEMD} (10,1 $\mu\text{g/mL}$) (Slika 36F).

MRC-5



Slika 36. Uticaj na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa kod MRC-5 ćelija pojedinačnim i kombinovanim tretmanima u različitim dozama sa: **A)** POAh, D i POAD; **B)** PEAh, D i PEAD; **C)** PEMh, D i PEMD; individualnim i kombinovanim tretmanima pri IC₅₀ vrednosti: **D)** POAh_{POAD}, D_{POAD} i POAD; **E)** PEAh_{PEAD}, D_{PEA}, PEAD; **F)** PEMh_{PEMD}, D_{PEM}, PEMD.

4.2.3. Uticaj biljnih ekstrakata na aktivnost enzima antioksidativne zaštite

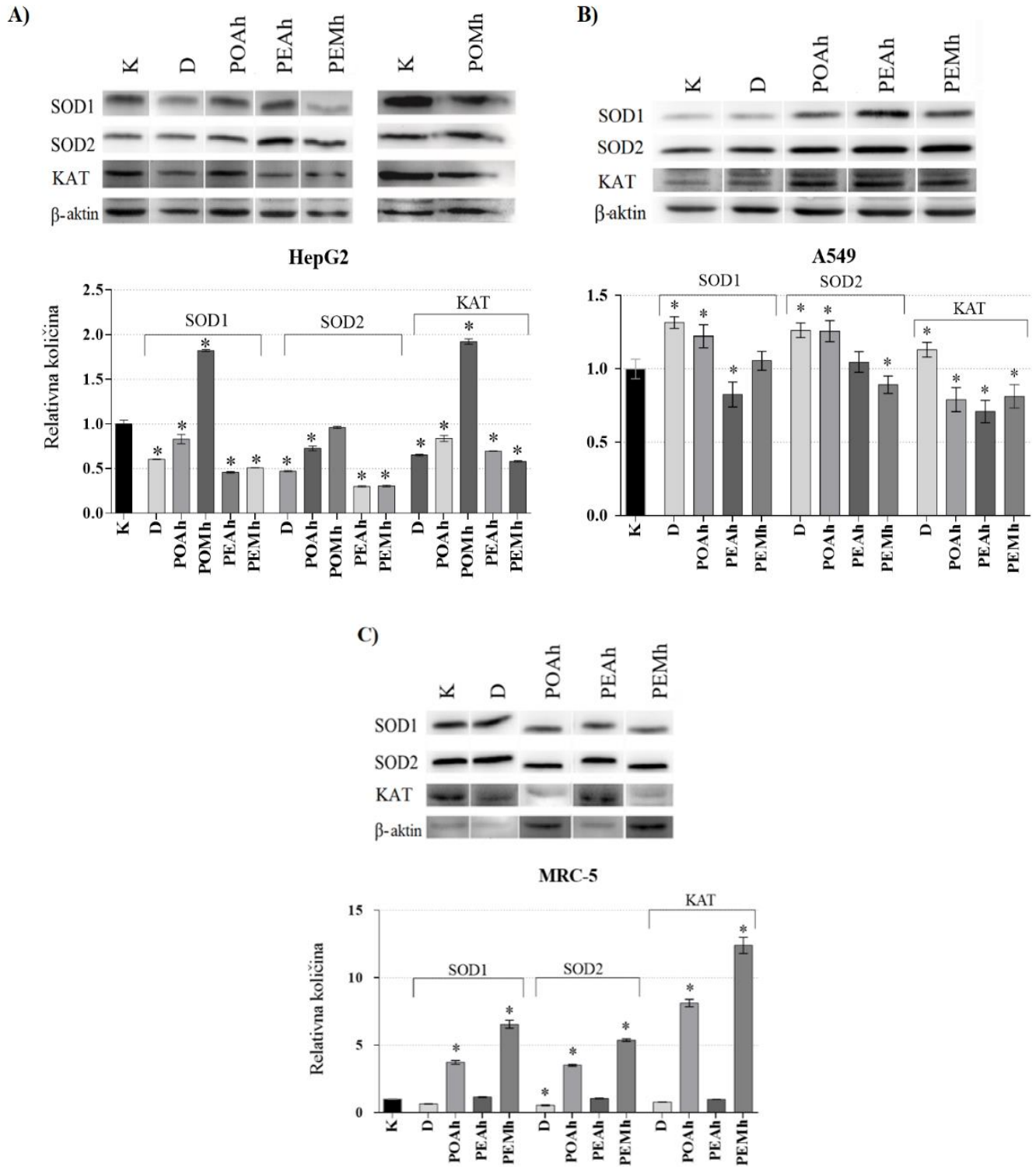
U daljem radu ispitivan je uticaj ekstrakata na regulaciju enzima antioksidativne zaštite. U ovom eksperimentalnom dizajnu odabrane su IC₂₅ vrednosti dobijene na osnovu testiranja citotoksičnog potencijala ekstrakata.

Kao što se može videti na **Slici 37A**, značajno smanjenje nivoa antioksidativnih enzima SOD1, SOD2 i KAT u HepG2 ćelijskoj liniji uočeno je nakon tretmana sa ekstraktima POAh, PEAh i PEMh i D. U kontrastu sa navedenim za POMh ekstrakt je pokazano da utiče na povećanje nivoa SOD1 i KAT.

Relativna količina antioksidativnih proteina u A549 ćelijama značajno varira u zavisnosti od primenjenog ekstrakta i tipa antioksidativnih enzima (**Slika 37B**). Ekstrakt POAh individualno testiran uzrokuje značajno povećanje količine SOD1 i SOD2 u odnosu na netretiranu kontrolu. Smanjeni nivo KAT zabeležen je nakon dejstva svih testiranih ekstrakata. Takođe, redukcija nivoa SOD1 detektovana je nakon tretmana sa PEAh, a SOD2 nakon tretmana sa PEMh ekstraktom. Individualno primenjen D dovodi do povećane aktivnosti svih ispitivanih antioksidativnih enzima.

Rezultati prikazani na **Slici 37C** pokazuju da je u normalnim ćelijama (MRC-5) nivo proteina SOD1, SOD2 i KAT pod uticajem ekstrakata POAh i PEMh značajno povećan u odnosu na netretiranu kontrolu. Dalje, nakon tretmana MRC-5 ćelija sa PEAh ekstraktom količina proteina SOD1, SOD2 i KAT se ne razlikuje značajno od nivoa u netretiranoj kontroli. Takođe, pod uticajem D nije detektovana promena aktivnosti SOD1 i KAT. Drugačije od navedenog D snižava nivo SOD2 enzima.

REZULTATI



Slika 37. Uticaj individualnih tretmana ekstrakata i D na promenu nivoa antioksidativnih enzima SOD1, SOD2 i KAT u A) HepG2, B) A549 i C) MRC-5 ćelijama.

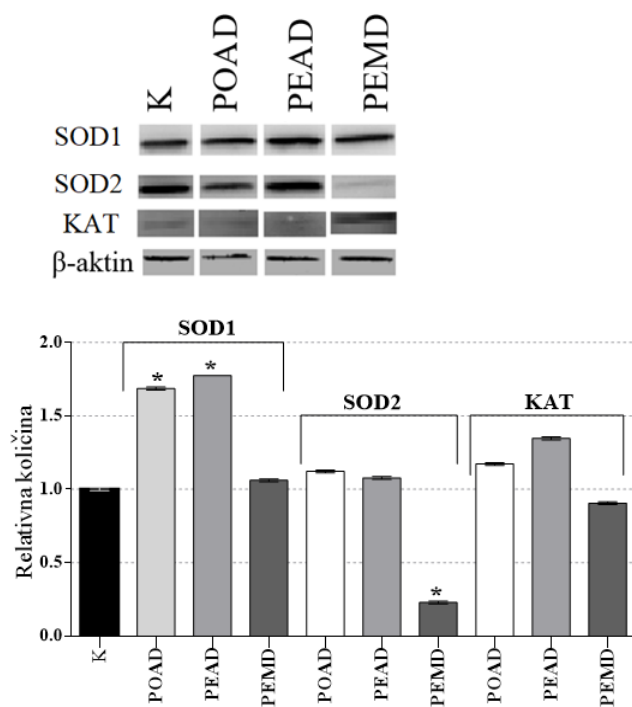
REZULTATI

Različito od pojedinačnih agenasa kotretmani POAD i PEAD indukuju povećanje količine SOD1 proteina u HepG2 ćelijskoj liniji. Smanjenje nivoa SOD2 prisutno je nakon kotretmana sa PEMD (**Slika 38A**).

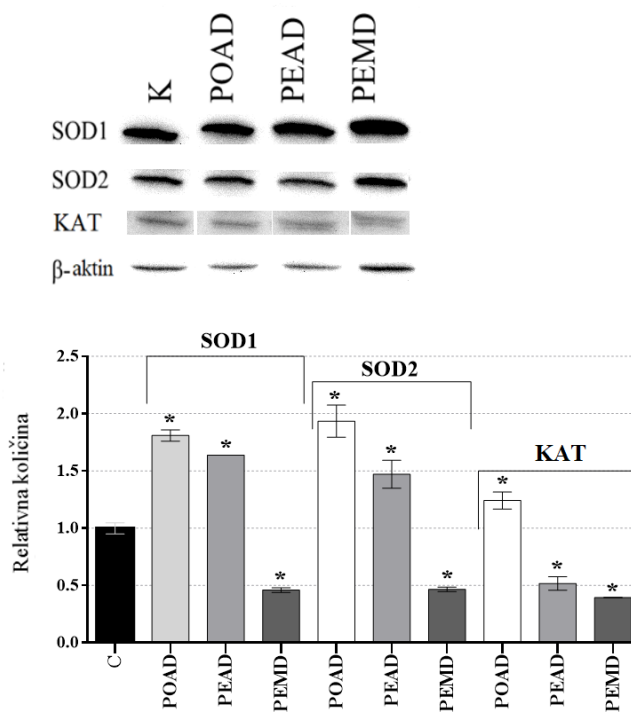
Dalje, povećan nivo SOD1 i SOD2 proteina nakon kotretmana sa POAD i PEAD detektovan je u A549 ćelijama (**Slika 38B**). Dodatno, u A549 ćelijama POAD povećava, a PEAD snižava nivo KAT. PEMD kotretman indukuje smanjenje nivoa svih ispitivanih antioksidativnih enzima.

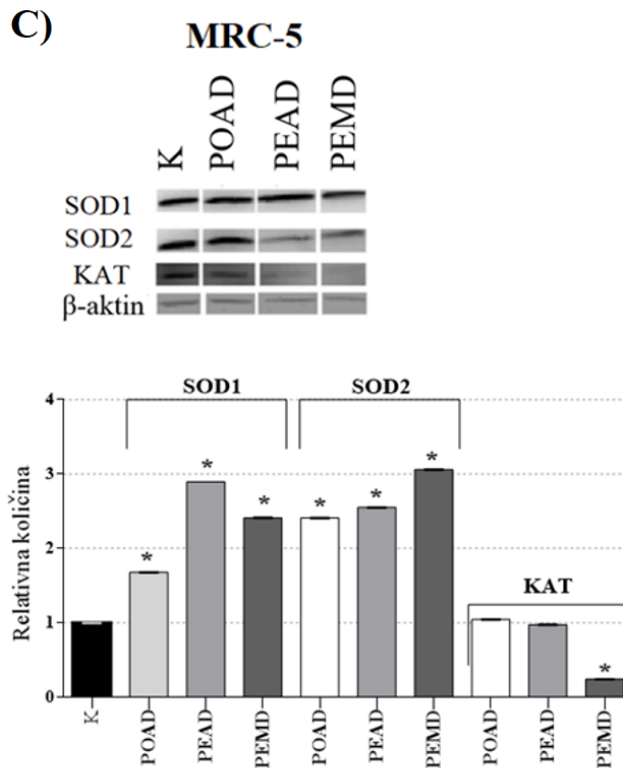
Slično rezultatima dobijenim nakon tretmana pojedinačnim ekstraktima, u MRC-5 ćelijama POAh i PEMh kombinovani sa D utiču na povećanje nivoa SOD1 i SOD2 enzima (**Slika 38C**). Različito od navedenog, KAT je prisutna u manjim količinama u odnosu na netretiranu kontrolu pod uticajem PEMD, dok je nivo KAT nepromenjen nakon dejstva POAD. Kotretman PEAD poput kotretmana POAD u značajnoj meri povećava aktivnost SOD1 i SOD2, bez detektabilnog uticaja na KAT.

A) HepG2



B) A549





Slika 38. Uticaj kotretmana ekstrakata i D na promenu nivoa antioksidativnih enzima SOD1, SOD2 i KAT u A) HepG2, B) A549, C) MRC-5 ćelijama.

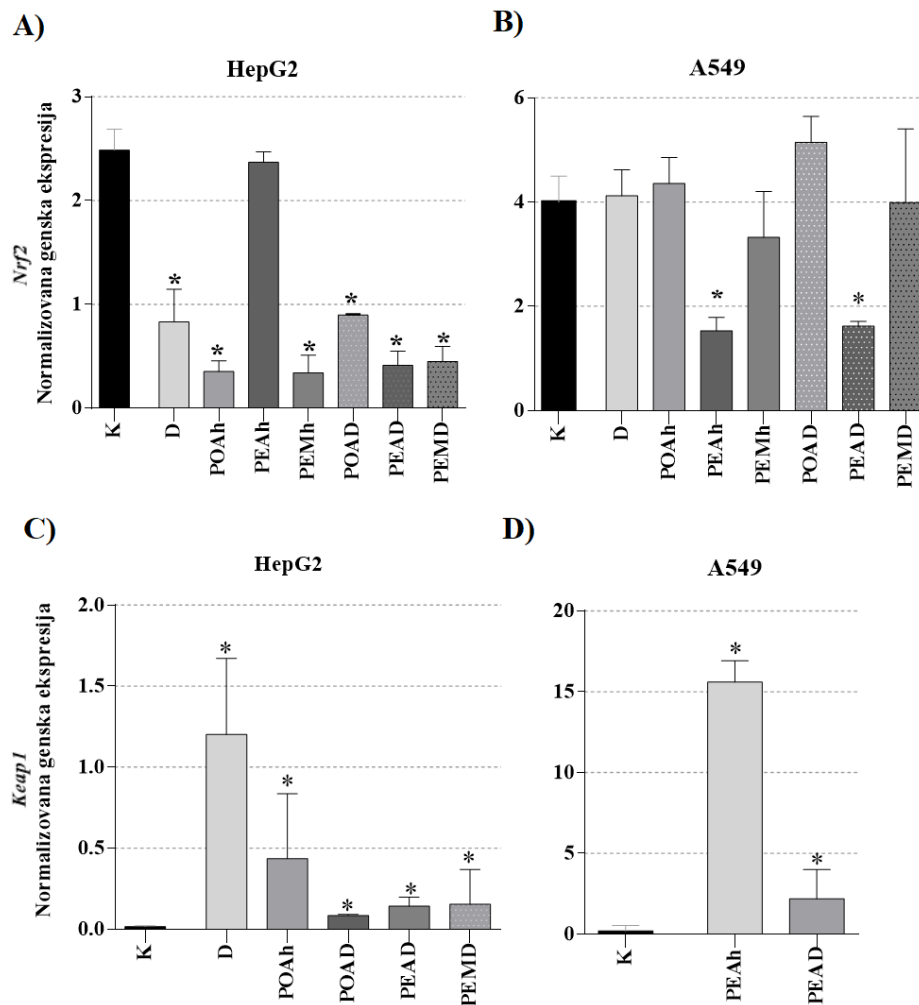
4.2.4. Uticaj biljnih ekstrakata na regulaciju ekspresije *Nrf2* i *Keap1* gena

Kako bi proverili da li je modulacija aktivnosti antioksidativnih enzima koja je izazvana ekstraktima pod regulacijom *Nrf2*-*Keap1* signalnog puta sprovedena je kvantitativna analiza praćenja genske ekspresije u realnom vremenu (qRT-PCR). Kako POMh ekstrakt utiče na povećanje nivoa antioksidativnih enzima u kancerškoj ćelijskoj liniji HepG2, a svrha ispitivanja *Nrf2* ekspresije je prepoznavanje potencijalnih *Nrf2* inhibitora, POMh ekstrakt je isključen iz daljeg istraživanja. S obzirom da na A549 i HepG2 ćelijama ekstrakti POAh, PEAh i PEMh utiču na značajno smanjenje nivoa bar jednog antioksidativnog enzima, praćen je njihov uticaj na gensku ekspresiju *Nrf2* i *Keap1* gena. Rezultati Dunnett testa pokazuju da je u HepG2 ćelijama ekspresija *Nrf2* gena značajno smanjena usled dejstva svih ispitanih pojedinačnih i kombinovanih tretmana, sa izuzetkom individualnog tretmana PEAh ekstraktom u poređenju sa netretiranom kontrolom (**Slika 39A**). U A549 ćelijama umanjena aktivnost *Nrf2* gena je uočena jedino nakon pojedinačnog i kombinovanog tretmana PEAh ekstraktom (**Slika 39B**).

U daljem radu praćena je ekspresija *Keap1* gena kod onih tretmana i kotretmana za koje je ustanovljena statistički značajna razlika u ekspresiji *Nrf2* gena u poređenju sa netretiranom kontrolom. Nakon 40 ciklusa nije detektovano prisustvo *Keap1* gena u HepG2 ćelijama tretiranim pojedinačnim ekstraktima PEMh i PEAh. Ekstrakt POAh, D, kao i svi kotretmani utiču na povećanu aktivnost *Keap1* represora (**Slika 39C**). Isti rezultati dobijeni su nakon tretmana sa PEAh ekstraktom testiranog pojedinačno i u kombinaciji sa D u A549 ćelijskoj liniji (**Slika 39D**).

REZULTATI

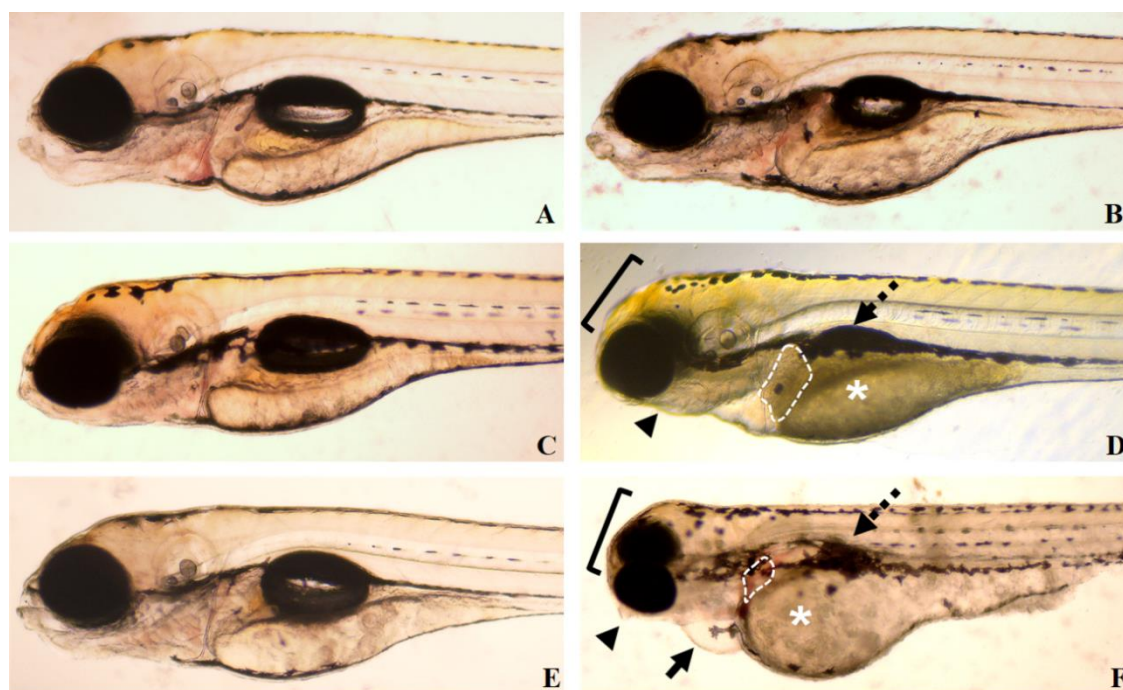
Nadalje, kako POAh i PEMh ekstrakti dovode do povećanja nivoa antioksidativnih enzima na MRC-5 ćelijama, sa ciljem otkrivanja njihove genske regulacije sprovedeno je praćenje aktivnosti *Nrf2* i *Keap1* gena, međutim nakon 40 ciklusa nije uočena ekspresija navedenih gena.



Slika 39. Ekspresija praćena u realnom vremenu: *Nrf2* gena u **A)** HepG2 i **B)** A549 ćelijama; i *Keap1* gena u **C)** HepG2 i **D)** A549 ćelijama.

4.2.5. Procena toksičnosti ekstrakta na embrionalnom modelu zebrića (*Danio rerio*)

Za potrebe ovog eksperimenta embrioni zebrića su nakon 6 spf tretirani ekstraktima PEMh i BIOR kao i njihovim aktivnim konstituentima Ka i K-3-O-Glk. Letalni, teratogeni i kardiotoksični efekti na embrionima su praćeni tokom pet dana. Dobijeni rezultati sugerišu da ekstrakti, K-3-O-Glk i Ka u dozama od 125 µg/mL, 30 µg/mL i 50 µg/mL, respektivno, ne utiču na preživljavanje i razvoj embriona. Takođe, nakon tretmana sa PEMh u koncentraciji od 250 µg/mL i BIOR u koncentraciji od 200 µg/mL kardiotoksičnost nije primećena (**Slika 40A-C**). Za Ka je pokazano da nije toksičan u svim testiranim koncentracijama (10-50 µg/mL). Sa druge strane na osnovu broja uginulih embriona i malformacija koje su detektovane do kraja eksperimenta, odabrani agensi, izuzev Ka, su prema toksičnosti rangirani na sledeći način: PEMh ($LC_{50}=EC_{50}=247,2$ µg/mL) < BIOR ($LC_{50}=207,7$ µg/mL, $EC_{50}=184,6$ µg/mL) < K-3-O-Glk ($LC_{50}=51,4$ µg/mL, $EC_{50}=38,7$ µg/mL) (**Tabela 19**). Dakle, kako je kod tretiranih jedinki uočen niz pojava različitih teratogenih efekata, BIOR i K-3-O-Glk možemo smatrati teratogenima u određenim koncentracijama. Posmatrane teratogene malformacije koje su uočene nakon tretmana sa BIOR (250 µg/mL) i K-3-O-Glk (50 µg/mL) zabeležene su fotografisanjem i prikazane na **Slici 40D; F**. Nakon tretmana sa BIOR i K-3-O-Glk kod embriona zapažene su sledeće iregularnosti: kraniofacijalna deformacija (deformitet glave i vilice), tamno žumance i tamna jetra, riblji mehur bez kiseonika i znaci hepatotoksičnosti. U slučaju tretmana sa K-3-O-Glk detektovan je i perikardijalni edem. Sa druge strane, kod Ka tretiranih zebrića malformacije odsustvuju (**Slika 40 E**).



Slika 40. Procena toksičnosti PEMh i BIOR ekstrakta i čistih supstanci: Ka i K-3-O-Glk na embrionalnom modelu *Danio rerio*. (A) Kontrola (B) PEMh 250 µg/mL (C) BIOR 200 µg/mL (D) BIOR 250 µg/mL (E) Ka 50 µg/mL (F) K-3-O-Glk 50 µg/mL.

Teratogene malformacije su obeležene na sledeći način:

deformitet glave i očiju (uglasta zagrada), deformitet vilice (trougao), perikardijalni edem (strelica), riblji mehur bez kiseonika (isprekidana strelica) i znaci hepatotoksičnosti, tamno žumance (zvezdica) i tamna jetra (oblik formiran isprekidanom linijom).

Tabela 19. Evaluacija toksičnosti PEMh i BIOR ekstrakata

Ekstrakt/konstituent	LC₅₀ (µg/mL)	EC₅₀ (µg/mL)
PEMh	247,15	247,15
BIOr	207,72	184,55
K-3-O-Glk	51,43	38,65
Ka	>50	>50

5. DISKUSIJA

5.1. Antimikrobni efekti

Eksperimentalno je utvrđeno da skoro svi testirani biljni ekstrakti pokazuju antifungalnu aktivnost, pri čemu se javljaju razlike u senzitivnosti ispitivanih gljiva na delovanje ekstrakata različitih biljnih vrsta, odnosno između herbe i rizoma iste biljne vrste. Generalno posmatrano osetljivost testiranih gljiva na delovanje odabranih ekstrakata može se predstaviti sledećim redom: *A. alternata*>*Aspergillus* sp.>*Penicillium* sp.>*F. semitectum*>*F. oxysporum*.

Pregledom literature o istraživanju antifungalnog efekta selektovanih predstavnika Polygonoideae ustanovljeno je da su ispitivanja najčešće sprovedena na vrstama roda *Aspergillus*, da su podjednako zastupljene difuzione i mikrodilucione metode, kao i da stepen inhibicije rasta mikromiceta varira u zavisnosti od vrste rastvarača korišćenog u ekstrakciji (Sardari i sar. 1998; Hasan i sar., 2009; Hussain i sar., 2010; Salama i Marraiki, 2010; Derita i Zacchino, 2011; Bordoloi i sar., 2016; Al-Snafi, 2017; Hailemariam i sar., 2018). Za većinu testiranih ekstrakata antifungalni efekat prema odabranim gljivama je prvi put ispitan u ovom radu usled čega je onemogućena njihova komparacija sa dosadašnjom literaturom.

Posmatrano prema testiranim gljivama, inhibicija rasta *A. alternata* je detektovana nakon tretmana sa svim odabranim ekstraktima, pri čemu je najizraženiji efekat ostvaren sa PEHr ekstraktom, dok je najmanja efikasnost pokazana za PEAh ekstrakt. U literaturi se navodi da inhibiciju rasta *Alternaria tenuissima* izaziva etanolni ekstrakt nadzemnog dela biljke *Fagopyrum esculentum* (Bordoloi i sar., 2016). Slično sa navedenim, blagi antifungalni efekat FAEh ekstrakta je zapažen u našem istraživanju prema *A. alternata*.

Dalje, inhibiciju rasta *Aspergillus* sp. izazivaju svi ekstrakti u određenom stepenu, izuzev BIOh. Literaturni podaci pokazuju da je inhibicija rasta vrsta roda *Aspergillus*; *A. flavus*, *A. fumigatus* i *A. niger* prisutna nakon tretmana sa hloroformskim ekstraktima dobijenim od stabljika i listova *Polygonum aviculare* (Salama i Marraiki, 2010), korena *Persicaria hydropiper* (Hasan i sar., 2009) kao i dihlrometanskim i metanolnim ekstraktima nadzemnih delova *Persicaria maculosa* (Hussain i sar., 2010; Derita i Zacchino, 2011). Ekstrakt listova *P. maculosa* pokazuje i umerenu antifungalnu aktivnost prema *A. solani* (Hussain i sar., 2010). Nadalje, Munir i sar. (2014) su ustanovili da metanolni i etanolni ekstrakti korena biljke *Bistorta officinalis* ostvaruju umeren antifungalni efekat prema *A. niger*. Prema studiji Hailemariam i sar. (2018) hloroformski i metanolni ekstrakti semena *Persicaria lapathifolia* pokazuju izraziti inhibitorni efekat protiv *Aspergillus* sp.. Činjenica da su svi navedeni podaci u skladu sa rezultatima priloženim u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuje da navedeni ekstrakti Polygonoideae biljaka imaju značajan potencijal delovanja protiv različitih vrsta roda *Aspergillus*. Takođe, odsustvo stimulativnog efekta na rast vrsta roda *Aspergillus* detektovano je nakon tretmana sa svim testiranim ekstraktima. U skladu sa navedenim Sardari i sar. (1998) su pokazali da ekstrakt nadzemnih delova *Persicaria amphibia* odlikuje odsustvo stimulatornog efekta, međutim kontradiktorno sa našim rezultatima, u istoj studiji je istaknuto da ekstrakt ne ispoljava inhibitorni efekat na rast različitih vrsta roda *Aspergillus*.

Nadalje, ekstrakt semena *P. lapathifolia* pokazuje antifungalnu aktivnost protiv *Penicillium* sp. i *Fusarium* sp. (Hailemariam i sar., 2018). U našem istraživanju detektovan je veoma blagi antifungalni efekat rizoma i nadzemnih delova *P. lapathifolia* ekstrakta protiv *Penicillium* sp. kao i protiv *F. semitectum* u slučaju PELr ekstrakta, odnosno protiv *F. oxysporum* u slučaju PELh ekstrakta.

Dalje, dokumentovano je da peptid od 4 kDa izolovan iz *F. esculentum* ispoljava antifungalni efekat protiv *F. oxysporum* (Al-Snafi, 2017). Sa druge strane, u našem istraživanju pokazano je da sam ekstrakt FAEh ne remeti rast navedene gljive. U skladu sa navedenim, agensi koje odlikuje značajan stepen inhibicije *F. oxysporum*, poput kafeične, ferulne, sinapinske i siringinske kiseline (Zabka i Pavela, 2013), prisutni su samo u tragovima u ispitanim ekstraktima. U skladu sa našim rezultatima *F. oxysporum* se pokazao kao veoma rezistentan na delovanje antifungalnih agenasa (Muhammed i sar., 2011). U ovom istraživanju umerenu antimikotičnu aktivnost prema *F. oxysporum* ostvario je isključivo PEMh ekstrakt.

Ako se detaljnije posmatra hemijski sastav ekstrakta (Svirčev, 2014) čije su biološke aktivnosti ispitane u našem istraživanju, uočava se da između ekstrakata različitih vrsta, kao i herbe i rizoma iste vrste postoji značajna varijabilnost polifenolnih komponenti. Posmatrano prema ekstraktima, *P. aviculare* skladišti KK u nadzemnim delovima biljke i u rizomu, sa tim što je veća količina detektovana u nadzemnim delovima. Takođe, značajna količina hiperozida, K-3-O-Glk i kemferol-3-O-glukozida nalazi se u herbi *P. aviculare*, dok se u rizomu *P. aviculare* u većoj koncentraciji nalaze GK i Ka. U POMh i PEAh ekstraktima dominantno su zastupljeni GK, epigalokatehingat, hiperozid i K-3-O-Glk. Među glavnim konstituentima POMh ekstrakta nalazi se i Ka, dok PEAh ekstrakt sadrži i kvercitrin i kvercetin. U herbi *P. maculosa* zabeležena je značajna količina fenolnih kiselina: KK, GK i HK. Takođe, u PEMh ekstraktu uočena je signifikantna količina hiperozida, rutina (RU), K-3-O-Glk, kvercitrina i kemferol-3-O-glukozida. *P. lapathifolia* sintetiše GK u nadzemnim delovima i u rizomu. Dalje, u PELh ekstraktu dominantno su zastupljeni KK, HK, K-3-O-Glk i kvercitrin. *P. hydropiper* u približno istoj količini produkuje GK i u nadzemnim delovima biljke i u rizomu. Sa druge strane, KK je znatno zastupljenija u nadzemnim delovima biljke. PEHh ekstrakt kao dominantne konstituente sadrži još i hiperozid, K-3-O-Glk, kvercitrin i kemferol-3-O-glukozid. Prisustvo KK odlika je herbe i rizoma *B. officinalis*. Takođe, u BIOh ekstraktu zabeleženo je prisustvo hiperozida i RU, dok su u BIOR ekstraktu uočeni sledeći konstituenti: HK, Ka i epikatehin. Najveća količina RU i kvercitrina nalazi se u FAEh ekstraktu. FAEh takođe sadrži KK, HK, hiperozid, K-3-O-Glk i kvercetin.

Sa izuzetkom *F. oxysporum*, dominantnim konstituentima testiranih ekstrakata, poput GA, RU i Ka, pripisuje se antifungalni efekat protiv testiranih gljiva. GK pokazuje antifungalnu aktivnost protiv *A. alternata*, vrsta roda *Aspergillus*, *Penicillium*, kao i protiv *F. semitectum* (Zabka i Pavela, 2013; Badhani i sar., 2015), a kako je GK najviše zastupljena kod POMh možemo pretpostaviti da je ona u velikom stepenu zaslužna za pokazani antifungalni efekat protiv navedenih gljiva. Takođe, primetna prisutnost GK detektovana je u POAr, PEAh, PEMh, PELh, PELr, PEHh i PEHr ekstraktima. S obzirom da je jedino PEAh ekstrakt pokazao nisku efikasnost protiv *A. alternata*, a svi ekstrakti su pokazali inhibitorni potencijal protiv *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. možemo pretpostaviti da je GK bar donekle zaslužna za antifungalnu efikasnost ekstrakata, ali i da je antimikotično delovanje ekstrakta uslovljeno interakcijama između različitih aktivnih konstituenata. Sa druge strane, iako sadrže GK u određenim količinama većina ekstrakata nije ispoljila statistički značajan efekat protiv rasta *F. semitectum*.

Nadalje, opet ističemo da je BIOR ekstrakt pokazao najbolju antimikotičnu aktivnost protiv *Aspergillus* sp. od svih testiranih ekstrakata, dok je kod BIOh ekstrakta detektovano potpuno odsustvo antifungalne aktivnosti. Imajući na umu da HK i njeni derivati pokazuju antimikrobna svojstva (Suárez-Quiroz i sar., 2013), njeno značajno prisustvo kod BIOR i odsustvo kod BIOh ekstrakta delimično mogu objasniti antifungalnu efikasnost i izostanak inhibitornog efekta protiv *Aspergillus* sp., za navedene ekstrakte, respektivno. Na *A. flavus* blagi antifungalni efekat pokazuje i Ka (Rauha i sar. 2000) koji je takođe u većoj količini zastupljen u BIOR ekstraktu, dok je u BIOh ekstraktu prisutan samo u tragovima.

Pored toga i RU možemo smatrati nosiocem antifungalne aktivnosti. Štaviše, zastupljenost GK, RU i kvercetina određuje efikasnost infekcije biljke *F. esculentum* sa *A. flavus*, pri čemu je povećana

sinteza navedenih agenasa u negativnoj korelaciji sa pojavom patogeneze (Chitarrini i sar., 2014). Takođe, izražena inhibitorna aktivnost na rast gljive *Penicillium* sp. u našem istraživanju postignuta je sa ekstraktima BIOR i FAEH koje odlikuje prisustvo veće količine RU. Međutim, kod POMh ekstrakta koji pokazuje najizraženiju inhibitornu aktivnost na rast *Penicillium* sp. RU nije detektovan.

Uzimajući u obzir sve navedeno, još jednom ističemo da *in vitro* efikasnost odabranih ekstrakata protiv različitih mikromiceta ne predstavlja iznenađenje, usled prisustva određene količine navedenih polifenolnih agenasa koji najverovatnije predstavljaju nosioce antimikotične aktivnosti ekstrakata, ali kroz međusobne interakcije, a ne pojedinačna delovanja.

Antifungalni efekat aktivnih konstituenata Polygonoideae biljaka dovodi se u vezu sa inhibicijom mitohondrijalnih ATPaza, redukcijom citoplazmatskog i mitohondrijalnog glutationa, kao i povećanom produkcijom ROS (Suárez-Quiroz i sar., 2013; Huq i sar., 2014; Chitarrini i sar., 2014). Takođe, HK i njeni derivati mogu dovesti do narušene permeabilnosti ćelijske membrane, dok agensi poput kafene kiseline i KK i njihovih derivata mogu delovati na inhibiciju sinteze 1,3 β -glukana, komponente ćelijskog zida (Ma i Ma., 2015).

Rezultati daljeg eksperimentalnog rada pokazali su da usled dejstva tretmana sa POAh, POAr, POMh, PEAh, PEHr i BIOR ekstraktima dolazi do obezbojavanja konidija *Aspergillus* sp.

Literaturni podaci sugerišu da se gubitak konidijalnog pigmenta kod *A. fumigatus* i *A. niger* može povezati sa umanjenom aktivnošću antioksidativnih mehanizama tj. izrazitom podložnošću prema delovanju ROS što rezultira smanjenim preživljavanjem navedenih gljiva (Youngchim i sar., 2004). Nadalje, kako je boja konidijalnog pigmenta uslovljena sintezom melanina i njegovim derivatima i regulisana dihidroksinaftalen (DHN)-melanin signalnim putem remećenje komponenata ove kaskade može rezultirati depigmentacijom gljiva (Tekaiia i Latgé, 2005). Među inhibitorima tirozinaze, enzima bitnog u sintezi melanina, nalaze se i antrahinoni i antrahinonski analozi izolovani iz *Polygonum cuspidatum* (Smit i sar., 2009). U skladu sa navedenim postoji mogućnost da testirani ekstrakti remete redoks homeostazu i utiču na aktivnost tirozinaza kod *Aspergillus* sp., međutim predloženi mehanizam delovanja ostaje na nivou spekulacije do dodatnih ispitivanja.

Takođe, pored obezbojavanja, ekstrakt BIOR dovodi i do promene morfologije spora *Aspergillus* sp.. Prema literaturnim podacima zna se da je promena morfologije spora još jedan od parametara koji ukazuju na toksičnost delovanja biljnih produkata protiv gljiva (Carmo i sar., 2008).

Nadalje, brojna istraživanja potvrđuju antibakterijski efekat ekstrakata biljaka iz podfamilije Polygonoideae. Istraživanja su najčešće sprovedena protiv *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa*, bakterijama koje se ističu po multirezistentnosti i perzistentnim prisustvom u bolničkim uslovima (Freitas i sar., 2019), pri čemu genetička pozadina različitih sojeva iste vrste bakterija doprinosi variranju antibakterijskog potencijala navedenih ekstrakata. Nadalje, u različitim publikacijama može se uočiti da odabir rastvarača tokom ekstrakcije u značajnoj meri određuje antibakterijsku efikasnost biljnih ekstrakata, pa i onih iz podfamilije Polygonoideae.

Posmatrano prema ekstraktima, za metanolne, etanolne, acetatne i hloroformske ekstrakte stabljika i listova *P. aviculare* dokazana je antibakterijska aktivnost prema *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Salama i Marraiki, 2010). U našoj studiji uočen je inhibitorni efekat POAh ekstrakta na rast *S. aureus*, međutim nije detektovan antibakterijski efekat prema *E. coli* i *P. aeruginosa*.

Odsustvo antibakterijskog efekata POMh ekstrakta ne slaže se sa predstavljenim rezultatima El-Haci i sar. (2013) u čijoj je publikaciji naglašena antibakterijska aktivnost *P. maritimum* prema različitim humanim patogenima, uključujući i *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *E. faecalis*.

Prema studiji Özbay i Alim (2009) prema *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* acetatni ekstrakt *P. amphibia* ne ispoljava antibakterijsku aktivnost. U skladu sa navedenim, prilikom testiranja PEAh ekstrakta nije zapažen inhibitorski efekat na rast *E. coli* i *P. aeruginosa*, a kako je bakteriostatski efekat prema *S. aureus* detektovan na koncentraciji od 2,5 mg/mL, ne možemo sa sigurnošću reći da PEAh ispoljava antibakterijsku aktivnost ni prema *S. aureus*. Naime, prema Rai i Kon. (2013) ne smatra se značajnim baktericidni efekat ekstrakata pri koncentracijama preko 1 mg/mL, pošto se navedeni efekat može pripisati osmotskom pritisku koji izaziva ekstrakt, a ne antimikrobnom delovanju samog ekstrakta ili njegovih aktivnih konstituenata.

Pored toga, ekstrakt lišća *P. maculosa* pokazuje slabu antibakterijsku aktivnost prema *E. coli*, umerenu prema *P. aeruginosa* i značajnu prema *S. aureus* (Hussain i sar., 2010). U našem istraživanju detektovan je zanemarljiv antibakterijski efekat PEMh ekstrakta na navedenim bakterijskim vrstama.

Metanolni i hloroformski ekstrakti *P. lapathifolia* takođe dovode do inhibicije rasta *S. aureus* i *E. coli* (Hailemariam i sar., 2018). Različito od rezultata Hailemariam i sar. (2018) u našem istraživanju *S. aureus* nije pokazao osetljivost prema PELh ekstraktu, dok je antibakterijski efekat ostvaren na *E. coli* zanemarljiv usled visoke koncentracije.

Slično rezultatima naše studije Hasan i sar. (2009) su dokazali da ekstrakt korena *P. hydropiper* pokazuje određeni stepen antibakterijske aktivnosti prema *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli*. U našoj studiji PEHr je delovao tek na izrazito visokim koncentracijama.

Za ekstrakt rizoma *B. officinalis* pokazana je antibakterijska aktivnost prema *P. aeruginosa* i *S. aureus*, pri čemu metanolni i vodeni ekstrakti ispoljavaju različiti stepen inhibicije bakterijskog rasta (Voronkova i Vysochina, 2014; Khalid i sar., 2011). Navedeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ove studije. Međutim, u našem istraživanju antibakterijski efekat BIOR ekstrakta prema *E. faecalis* nije uočen, dok je prema Khalid i sar., (2011) inhibitorski efekat ekstrakta rizoma *B. officinalis* prisutan prema navedenoj bakteriji. Dalje, Satish i sar. (2009) su dokazali da vodeni i metanolni ekstrakt lišća *B. officinalis* ispoljava antibakterijsku aktivnost protiv *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*. BIOh ekstrakt testiran u našoj studiji je pokazao bakteriostatski efekat prema *S. aureus*, dok antibakterijski efekat prema *E. coli* i *P. aeruginosa* nije uočen. Kao što je već istaknuto, razlika u genetičkim karakteristikama testiranih sojeva može biti esencijalna za kontradiktornost rezultata.

Slično rezultatima grupa autora na čelu sa Čabarkapa (2008) i Al-Snafi (2017), koji pokazuju antimikrobni efekat ekstrakta komercijalnog brašna *F. esculentum* prema *S. aureus* i *E. coli*, u ovom istraživanju detektovana je antibakterijska aktivnost FAEh ekstrakta prema *S. aureus* i *E. coli*, ali pri visokim koncentracijama. Nadalje, različito od rezultata predstavljenim u navedenoj studiji u ovom radu antibakterijski efekat prema *E. faecalis* nije uočen. Kako su ispitani različiti sojevi *E. faecalis* kao i različiti proizvodi dobijeni od *F. esculentum* opravdana je nekonzistentnost navedenih podataka.

Odabrani predstavnici Polygonoideae biljaka do sada nisu bili ispitani sa aspekta antimikrobnog delovanja prema *L. monocytogenes* i *S. Enteritidis*. Međutim, Santomauro i sar. (2018) su uočili slabu antibakterijsku aktivnost ekstrakta korena *P. cuspidatum* prema *L. monocytogenes* i *S. Enteritidis*. Takođe, ranije je pokazano da *P. multiflorum*, *P. capitatum* i *P. chinensis* pokazuju slabi antilisterijski efekat (Huang i sar., 2008). Slično sa dobijenim rezultatima jedino su PEMh i BIOR ispoljili bakteriostatski i baktericidni efekat na *S. Enteritidis* ali pri visokim koncentracijama, dok ni jedan testirani ekstrakt nije pokazao antimikrobnu aktivnost prema *L. monocytogenes*.

Poznato je da su ekstrakti dobijeni od lekovitih biljaka neretko aktivni isključivo protiv Gram pozitivnih bakterija (Gilabert i sar., 2014). I u našem istraživanju ekstrakti POAr i BIOh su dobar antibakterijski efekat pokazali jedino prema Gram pozitivnoj bakteriji, *S. aureus*. Međutim, kako je za PEMh, PELr, BIOR i FAEh neki antibakterijski efekat ipak detektovan i protiv Gram negativnih i Gram

pozitivnih bakterija, kod ovih ekstrakata postoji verovatnoća aktiviranja različitih mehanizama prilikom ostvarivanja antimikrobnog delovanja.

U prilog svemu navedenom ide i činjenica da određeni aktivni konstituenti Polygonoideae biljaka takođe pokazuju antibakterijski efekat. Na rast *S. aureus* inhibitorni efekat pokazuju RU i HK (Lou i sar., 2011; Stojković i sar., 2013). Nadalje, HK ispoljava antibakterijski efekat i prema *E. coli*, pri čemu dovodi do narušavanja permeabilnosti ćelijske membrane (Lou i sar., 2011). GK i Ka takođe ispoljavaju antibakterijski potencijal (Daglia, 2012). Kao i u slučaju antifungalnog efekta možemo pretpostaviti da je interakcija između aktivnih konstituenata zaslužna za ispoljenu antibakterijsku aktivnost, a ne pojedinačne komponente.

Nadalje, deo ove doktorske disertacije posvećen je ispitivanju antibiofilm efekata PEMh i BIOR ekstrakata, kao i njihovih glavnih konstituenata, pri čemu je *in vitro* testiranje sprovedeno na *S. aureus*, *S. Enteritidis* i *P. aeruginosa* PAO1. Kontrolisanje biofilm zajednica uključuje nekoliko različitih pristupa: a) sprečavanje formiranja biofilma, b) razaranje postojećeg biofilma, (c) sprečavanje daljeg rasta biofilma i (d) ubijanje mikroorganizama u biofilmu (Song i sar., 2007). Opšte posmatrano, u našem istraživanju je uočeno da ekstrakti PEMh i BIOR u određenim koncentracijama inhibiraju, dok u drugim stimulišu formiranje biofilma. Ostvareni dualni efekti zavise od testirane koncentracije kao i genetičkih karakteristika sojeva. Dodatno, redukcija preživljavanja bakterija u zreloom biofilmu i bakterija dispergovanih sa zrelog biofilma pri svim primenjenim koncentracijama BIOR ekstrakta na *S. aureus*, odnosno pri većim koncentracijama primenjenim na *S. Enteritidis*, u prvom planu ističe izrazit letalni efekat ovog ekstrakta na bakterije biofilm zajednica.

Dosadašnja literatura je veoma oskudna u pogledu podataka o antibiofilm efektima Polygonoideae biljnih ekstrakata. Međutim, pojedini radovi ističu inhibitorni efekat ekstrakata *Polygonum cuspidatum* i *Polygonum punctatum* na razvoj biofilmova kao i baktericidni efekat ekstrakta *P. cuspidatum* na preživljavanje bakterija u zreloom biofilmu (Song i sar., 2007; Gilabert i sar., 2014).

Song i sar. (2007) su pokazali da frakcije etil acetatnog ekstrakta korena *P. cuspidatum* inhibiraju rast biofilma streptokoka, uzročnika dentalnih oboljenja, kao i da utiču na redukciju zrelih biofilmova *S. mutans* i *S. sobrinus*. Različito od navedenog, u našem istraživanju je pokazano da PEMh ekstrakt u značajnoj meri stimuliše formiranje biofilma *S. aureus*. Međutim, slično sa navedenim rezultatima, ekstrakt BIOR pokazuje inhibitorni efekat na formiranje biofilma i dovodi do redukcije zrelog biofilma *S. aureus* pri svim testiranim koncentracijama skoro u potpunosti.

Posmatrajući dejstvo ekstrakta BIOR na bakterije u suspenziji koje su poreklom od zrelog biofilma, u slučaju *S. aureus* možemo zapaziti da je broj odlepljenih vijabilnih bakterija manji u odnosu na netretiranu kontrolu, što posmatrano sa svim navedenim jasno ukazuje na baktericidno dejstvo ekstrakta prema bakterijama u biofilmu i prema bakterijama u suspenziji.

Kao što je istaknuto u poglavlju **Rezultati**, oba testirana ekstrakta inhibiraju formiranje biofilma soja *S. Enteritidis*. Međutim, stimulacija bakterijskog rasta u zreloom biofilmu prisutna je nakon tretmana sa nižim koncentracijama BIOR ekstrakta, dok je na višim koncentracijama prisutna redukcija vijabilnih bakterija u biofilm zajednici. Isti trend uočen je na neadheriranim bakterijama u suspenziji, dispergovanih sa zrelog biofilma.

Štaviše, niske koncentracije PEMh i BIOR ekstrakta stimulišu stvaranje biofilma i kod bakterije *P. aeruginosa* PAO1, dok ih veće koncentracije inhibiraju.

S obzirom da podaci o antibiofilm efektu Polygonoideae biljaka prema *S. Enteritidis* i *P. aeruginosa* nisu pronađeni tokom pretrage literature, u daljem tekstu opisan je antibiofilm efekat aktivnih konstituenata odabranih ekstrakata dobijenih u ovom radu i sličnim publikacijama.

Što se tiče pojedinačnih komponenti ekstrakata, u ovoj studiji dobijeni su slični rezultati kao i za same ekstrakte. Naime, primećen je i stimulatívni i inhibítorni efekat prilikom formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1, u zavisnosti od vrste aktivnog jedinjenja i testirane koncentracije. Na produkciju biofilma *P. aeruginosa* PAO1, GK i HK pokazuju dualni efekat u zavisnosti od primenjene koncentracije i vremena tretmana (Borges i sar., 2012; Plyuta i sar., 2013). Iako u našoj studiji nije primećena značajna stimulacija formiranja biofilma nakon tretmana sa GK i HK, nemonotoni dozni odgovor ukazuje da ne možemo pretpostaviti efekat koncentracija koje nisu ispitane i ne isključuje postojanje mogućnosti stimulatívnoeg efekta i na nižim koncentracijama od testiranih. Dodatno, Slobodníková i sar. (2016), su detektovali da GK utiče na produkciju biofilma Gram pozitivnih bakterija u zavisnosti od doze, temperature i vremena izloženosti.

Do sada je poznato da derivati KK, poput HK i 3,5-dikafeoilhinske kiseline uslovljavaju rast biofilma *P. aeruginosa*. Međutim, stimulacija formiranja biofilma *P. aeruginosa* usled dejstva čiste KK je prvi put prezentovana u ovom istraživanju.

Štaviše, različite studije potvrđuju antibiofilm aktivnost KK i GK protiv Gram pozitivnih bakterija poput različitih streptokoka uključujući i MRSA soj (Borges i sar., 2012; Luís i sar., 2014; Slobodníková i sar., 2016; Liu i sar., 2017). S obzirom da navedene supstance mogu delovati na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije smatramo da su uključeni različiti molekularni mehanizmi. Nadalje, u skladu sa našim rezultatima u studiji Kordbacheh i sar. (2017) navedeno je da K-3-O-Glk inhibira formiranje biofilma. U istoj studiji je istaknuto da Ka utiče na redukciju biofilma. Slično navedenom, u našem istraživanju na nižim koncentracijama zapažen je inhibítorni efekat na formiranje biofilma, međutim, neznatni stimulatorni efekat detektovan je na višim koncentracijama.

Kao što je istaknuto u **Uvodu** disruptivnost QS komunikacije vodi ka atenuaciji virulencije mikroorganizama (Vasavi i sar., 2017; Asfour, 2018). S obzirom da su regulisani QS sistemima, inhibicija produkcija pigmenata violaceina i piocijanina, kao i smanjena mobilnost, mogu ukazivati na interferenciju QS inhibitora, odnosno QQ agenasa sa QS signalnim putevima. Nadalje, biljni ekstrakti mogu delovati kao QS inhibitori usled sličnosti njihove hemijske strukture sa signalnim molekulima i njihove sposobnosti da inaktiviraju LasR receptor kod *P. aeruginosa* (Nazzaro i sar., 2013).

U ovom istraživanju je zapaženo da oba ekstrakta, a naročito BIOR, značajno remete produkciju violaceina i onemogućavaju rojenje. Slično sa dobijenim rezultatima, Asfour (2018) navodi da ekstrakt listova *P. minus* inhibira sintezu violaceina. Nadalje, za Resveramax, preparat zasnovan na rezveratrolu, aktivnoj komponenti izolovanoj iz *P. cuspidatum*, je dokazano da utiče na inhibiciju produkcije violaceina i da remeti rojenje *P. aeruginosa* PAO1 (Vasavi i sar., 2017). Međutim, kod pojedinih Polygonoideae ekstrakata, poput acetatno-vodenog ekstrakta *P. multiflorum*, nije detektovana značajna inhibicija produkcije violaceina kao ni smanjenje rojenja *P. aeruginosa* PAO1 (Yeo i Tham, 2012). Imajući u vidu navedeno, bitno je istaći da razlika u hemijskim karakteristikama biljnih ekstrakata može definisati prisustvo ili odsustvo anti-QS potencijala. Dalje, kvercetin, aktivna komponenta PEMh ekstrakta dovodi do inhibicije sinteze violaceina *C. violaceum* 12472 (Asfour, 2018). U našoj studiji dektovano je da KK, HK, K-3-O-Glk inhibiraju produkciju violaceina, dok za GK takav efekat nije primećen. Nazzaro i sar. (2013) navode da se HK može koristiti kao pozitivna kontrola u testovima inhibicije QS kaskadne signalizacije.

Što se tiče inhibicije produkcije piocijanina, ovakav efekat je primećen nakon tretmana sa PEMh ekstraktom. Sa druge strane, primećen je inhibítorni i stimulatorni efekat BIOR ekstrakta na produkciju piocijanina u zavisnosti od testirane koncentracije. U studiji Vasavi i sar. (2017) potvrđeno je da Resveramax takođe dovodi do inhibicije sinteze piocijanina i da remeti aktivnost LasR receptora. Treba imati na umu da Ka pokazuje značajan inhibítorni efekat na produkciju piocijanina i da smanjuje aktivnost QS regulatornih gena, *lasI*, *lasR*, *rhlI* i *rhlR*, kod *P. aeruginosa* (Kordbacheh i sar., 2017;

Asfour, 2018). U skladu sa navedenim, rezultati našeg istraživanja potvrđuju da Ka smanjuje aktivnost LasR receptora, koji je pod kontrolom *lasR* gena. Međutim, snižena aktivnost i RhlR i PqsR receptora nije zabeležena, štaviše primećeno je blago povećanje aktivnosti PqsR receptora nakon tretmana katehinom. Nadalje, Kordbacheh i sar. (2017) su uočili da K-3-O-Glk značajno redukuje sintezu piocijanina. Kako je u našoj studiji dokazano umereno smanjenje aktivnosti LasR receptora usled dejstva K-3-O-Glk, postoji mogućnost međusobne zavisnosti aktivnosti receptora i sinteze pigmenta, piocijanina i violaceina. Takođe, u istraživanju Annapoorani i sar. (2012) istaknuto je da HK deluje kao signalni antagonist LasR i RhlR receptora, odnosno da je mogućnost ometanja signal-receptor kompleksa postignuta vezivanjem HK za receptore, umesto autoinducera. Neslaganje naših rezultata, u kojima je jasno uočeno odsustvo inaktivacije LasR i RhlR receptorne aktivnosti, sa podacima iz navede studije možemo objasniti razlikama u testiranim koncentracijama, pri čemu je 7,5 puta manja koncentracija HK ispitana u našem istraživanju. Iako je za derivat GK, epigalokatehin galat, pokazan potencijal inaktivacije LasR receptora, rezultati naše studije pokazuju da sama GK ne utiče na inhibiciju aktivnosti receptora u značajnoj meri (Kalia i sar., 2015). Štaviše, aktivnost PqsR receptora je u velikoj meri pojačana. Pospešivanje aktivnosti PqsR receptora usled dejstva GK primećeno je i u istraživanju Aleksić i sar. (2018). U našem istraživanju po prvi put je dokazana smanjena aktivnost LasR receptora nakon tretmana sa PEMh i BIOR ekstraktima. Nadalje, primećena je povećana aktivnost PqsR receptora. Ambivalentnost u regulaciji LasR i PqsR transkripcionih faktora usled dejstava različitih biljnih ekstrakata je detektovana i u istraživanju Aleksić i sar. (2018). Štaviše, pojedini sintetički signalni molekuli, poput nekih N-acil-L-homoserin laktone, mogu delovati antagonistički i agonistički na različite QS receptore; suprotnim delovanjem na Pqs i Rhl sisteme indukuje se inverzna sinteza piocijanina i ramnolipida (Welsh i sar., 2015). Uzevši sve u obzir, usled kompleksnog delovanja QS mehanizama složena istraživanja QS inhibitora, poput PEMh i BIOR zahtevaju višestranosti analiziranja dobijenih rezultata. Prema tome, iako je nakon tretmana sa oba ekstrakta aktivnost PqsR povišena, smanjenje aktivnosti LasR receptora, koji je na vrhu hierarhijske kontrole QS signalnih puteva, smatramo rezultatima od velikog značaja u cilju pronalazjenja potencijalnih QS inhibitora.

Kako je razvijanje novog antibiotika vremenski i finansijski veoma zahtevno pospešivanje efektivnosti komercijalno dostupnih antibiotika je veoma poželjan pristup prilikom traganja za učinkovitijim antimikrobnim agensima.

Ako izuzmemo rad u kojem su testirane veoma visoke koncentracije ekstrakta *Polygonum minus* (31.25-250 mg/mL) i Str (0.0025-2.5 mg/mL) prema bakterijama *E. coli* i *B. subtilis* (Al-Haj i sar., 2018), u literaturi gotovo da ne postoje podaci o uticaju ekstrakata biljaka podfamilije Polygonoideae na povećavanje aktivnosti Str. Ipak za pojedine aktivne konstituentne Polygonoideae biljaka postoje istraživanja novijeg datuma. Prema Nøhr-Meldgaard i sar. (2018) rezveratrol, aktivna komponenta *P. cuspidatum*, povećava osetljivost soja *S. aureus* JE2 na aminoglikozidne antibiotike: Str, gentamicin, kanamicin, neomicin i tobramicin. U ovoj studiji je pokazano da su MIK vrednosti dobijene nakon kotretmana rezveratrola i antibiotika znatno niže (8-32 puta) u odnosu na MIK vrednosti dobijenih nakon tretmana samih antibiotika (Nøhr-Meldgaard i sar., 2018).

U cilju smanjenja koncentracije komercijalno dostupnog antibiotika Str u našem istraživanju je po prvi put ispitan kombinovani efekat BIOR ekstrakta i navedenog antibiotika prema bakterijama *S. aureus* i *S. Enteritidis*. Dokazali smo da BIOR i Str u određenim subinhibitornim koncentracijama (subMIK) stupaju u sinergistički odnos, pri čemu ekstrakt povećava osetljivost *S. aureus* na dejstvo antibiotika. Kako su pored sinergističkog efekta pri većim testiranim koncentracijama uočeni i drugi tipovi interakcija, poput indiferentnog i aditivnog efekta, potrebno je posebnu pažnju usmeriti prilikom odabira adekvatnih doza u daljim testiranjima. Na *S. Enteritidis* BIOR nije ostvario sinergistički odnos sa Str, štaviše testirani agensi pored indiferentnog i aditivnog stupaju i u blagi antagonistički odnos. Ovaj

rezultat sugeriše da je neophodno ispitati bezbednost primene BIOR u kombinaciji sa različitim antibioticima i na različitim bakterijskim sojevima.

5.2. Citotoksičnost odabranih ekstrakata

Na polju hemioterapije prisutna je kontinuirana posvećenost pronalaženju novih i efikasnih agenasa čija je svrha lečenje maligniteta. Konstantna potreba za unapređenje citostatika nameće se usled njihove toksičnosti i učestale pojave hemiorezistencije kancerskih ćelija. Obično se navodi da toksičnost citostatika raste sa povećanjem primenjene doze, a rezistencija na lek se pojavljuje usled nižih primenjenih koncentracija. Kako bi se prevazišao ovaj problem mnogobrojna istraživanja okrenuta su kombinovanom pristupu koji sa ciljem lečenja maligniteta pored hemioterapeutika uključuju i primenu adjuvanasa, poput biljnih ekstrakata. Primenom adjuvanasa, koji ostvaruju sinergističke interakcije sa citostaticima, omogućeno je smanjenje doze samih citostatika, usled čega se smanjuje njihova toksičnost, dok je pojava rezistencije malignih ćelija značajno otežana usled različitih antitumorskih mehanizama. Određeni broj studija je pokazao da biljni ekstrakti podfamilije Polygonoideae ispoljavaju antitumorsko delovanje koje se pre svega zasniva na sposobnosti inhibicije ćelijske proliferacije, indukciji apoptoze tumorskih ćelija, kao i remećenju ćelijskog ciklusa.

Ravipati i sar. (2013) su ustanovili da etanolni ekstrakt dobijen od komercijano nabavljenog sušenog biljnog materijala *P. aviculare* pokazuje citotoksični efekat na HepG2, A549 i HT-29 ćelijskim linijama. U skladu sa nevedenim rezultatima, u našem istraživanju je potvrđeno da je za postizanje značajnog citotoksičnog efekta na HepG2 i A549 ćelijama potreban tretman visokim koncentracijama POAh ekstrakta. Međutim, razlika u koncentracijama koje inhibiraju vijabilnost ćelija za 50% u pomenutoj studiji i našem istraživanju nije zanemarljiva. U našoj studiji detektovane su aproksimativno 2,5 puta, odnosno 3,5 puta veće IC₅₀ vrednosti za HepG, odnosno A549 ćelije, respektivno. Ovakav rezultat može se objasniti drugačijim hemijskim karakteristikama samih ekstrakata, usled varijabilnog uticaja različitih egzogenih faktora tokom rasta biljaka, a takođe, kako nije jasno navedeno od čega se tačno sastoji sušeni biljni material koji je upotrebljen u ekstrakciji, kao ni pasaža korišćenih ćelija možemo spekulirati da su polazni biljni materijal i starost ćelija različiti. Dalje, ekstrakti celih biljaka *P. aviculare* i *P. amphibia* pokazuju antiproliferativni efekat protiv ćelija cervikalnog adenocarcinoma (Hela), adenocarcinoma dojke (MCF-7) i kožnog epidermoidnog karcinoma (A431) (Lajter i sar., 2013; Ravipati i sar., 2013; Dong i sar., 2014). U našem istraživanju najizraženiji citotoksični efekat na HepG2 ćelijama detektovan je za PEAh ekstrakt. Ekstrakt herbe *P. maculosa* uzrokuje smanjenu proliferativnost HeLa ćelija (Lajter i sar., 2013). U našem istraživanju posmatrano prema IC₅₀ vrednostima od svih testiranih ekstrakata za PEMh je pokazana najveća citotoksičnost prema A549 ćelijama. U vezi sa uticajem ekstrakta *P. maritimum* na vijabilnost kancerskih ćelija Rodrigues i sar. (2019) ističu da ekstrakt ne dovodi do značajne inhibicije rasta melanomskih ćelija B16 4A5. O delovanju ekstrakta *P. maritimum* na preživljavanje plućnih adenocita i hepatokarcinomskih ćelija nema podataka u dostupnoj literaturi. Rezultati istraživanja predstavljeni u ovoj disertaciji pokazuju da kao i u slučaju ostalih testiranih ekstrakata PEMh ostvaruje citotoksični uticaj na A549 i HepG2 ćelijama pri većim testiranim dozama.

Što se tiče komparacije delovanja ekstrakata podfamilije Polygonoideae na kancerskim i normalnim hepatocitama, nakon pretrage literature istaknuto je istraživanje Ghazali i sar. (2014) u kojem je ustanovljeno da ekstrakt dobijen od *P. minus* pokazuje selektivni antiproliferativni efekat, sa značajnom citotoksičnošću prema HepG2 ćelijama i niskom citotoksičnošću prema embrionalnim hepatocitama WRL68. Dalje, ekstrakt *P. cuspidatum* ispoljava antiproliferativni efekat na tumorskim ćelijama jetre Bel-7402 i Hepa 1–6 (Hu i sar., 2012), dok ekstrakti dobijeni od *Polygonum glabrum* i *Polygonum orientale* pokazuju hepatoprotektivni efekat na normalnim hepatocitama *in vivo* (Raja i Ramya, 2017; Chiu i sar., 2017).

Nadalje, vezano za poređenje citotoksičnog delovanja na zdravim i malignim plućnim ćelijama, za pojedine aktivne komponente izolovane iz *P. aviculare*, poput junglandina (sin. kemferol-3-*O*-arabinofuranozid), citotoksični efekat je detektovan na A549 ćelijama, dok na MRC-5 ćelijama nije primećen (Chen i sar., 2017). U našem istraživanju svi ekstrakti su pokazali citotoksičan efekat na MRC-5 ćelijama, pri čemu je PEAh ekstrakt pokazao najslabiju aktivnost. Značajno je pomenuti i da je inhibicija proliferacije A549 ćelijske linije detektovana nakon tretmana sa aktivnim jedinjenjima izolovanim iz *P. limbatum* (Dzoyem i sar., 2012).

Naša dalja istraživanja išla su u pravcu ispitivanja senzitivizacije tumorskih ćelijskih linija u kulturi na dejstvo D. Na obema kancerskim ćelijama uočen je sinergistički efekat nakon POAD kotretmana pri koncentracijama koje izazivaju 25% i 50% preživljavanja. Sinergistički efekat uočen je i na bar jednoj od testiranih kancerskih linija sa preostalim ispitanim ekstraktima i D pri kotretmanima određenih koncentracija. Iako publikacije o interakcijama Polygonoideae ekstrakata i D nisu dostupne, određeni broj studija ističe prisustvo sinergističkog odnosa između izolovanih komponenti navedenih ekstrakata i citostatika. Na primer, prema *in vitro* i *in vivo* istraživanjima rezveratrol, aktivna komponenta *P. cuspidatum*, ostvaruje sinergističku interakciju sa D, čime se pospešuje antikancerski efekat D (Huang i sar., 2014; Rai i sar., 2015). Nadalje, u našem istraživanju na normalnoj ćelijskoj liniji je pokazan antagonistički efekat između D i testiranih ekstrakata, izuzev POMh. Bitno je istaći da aktivne komponente prisutne u ekstraktima poput kvercetina, HK, epigalokatehin-3-galata, naringenina, apigenina, kemferola, *p*-kumarinske kiseline i kafene kiseline smanjuju D indukovanu toksičnost atenuacijom oksidativnog stresa u normalnim ćelijama (Wang i sar., 2012; Mbaveng i sar., 2014; Ojha i sar., 2016).

Brojne studije potvrđuju da inhibicija vijabilnosti kancerskih ćelija manifestovana usled sinergističke interakcije hemioterapeutika i biljnih ekstrakata može biti rezultat proapoptotskog efekta i narušavanja ćelijskog ciklusa. Shodno navedenom, u našem istraživanju posmatran je efekat ekstrakata i D, pojedinačno i u kombinaciji, na indukciju apoptoze i disruptivnost ćelijskog ciklusa. U HepG2 i A549 ćelijama detektovana je indukcija rane i kasne apoptoze/nekroze određenim dozama D i ekstraktima, pojedinačno ili u kombinaciji. Slično sa izloženim rezultatima Habibi i sar. (2011) navode da *P. aviculare* uvodi MCF-7 ćelije u apoptozu. Takođe, skorašnji podaci ukazuju da aktivne komponente izolovane iz *P. amphibia*, kvercetin-3-*O*- β -glukuronid i kvercetin-3-*O*- α -ramnosil-(1 \rightarrow 2)- β -glukuronid, ostvaruju proapoptotsku ulogu na imortalizovanim T limfocitama (Jurkat ćelijama) i ćelijama promijelocitne leukemije (HL-60) (Dong i sar., 2014). Rezultati naše studije se većinom uklapaju u predložen ćelijski odgovor na tretman biljnim ekstraktima; ekstrakti pretežno indukuju ranu apoptozu na niskim koncentracijama, dok na većim koncentracijama uvode ćelije u nekrozu (Ghazali i sar., 2014). Izuzetak od ovog pravila uočen je za tretman HepG2 ćelija sa POMh ekstraktom čija manja koncentracija uvodi ćelije isključivo u kasnu apoptozu/nekrozu, dok veća koncentracija uvodi ćelije i u ranu i kasnu apoptozu/nekrozu. Odstupanje od navedenog trenda je primećeno i na A549 ćelijama nakon tretmana sa PEMh ekstraktom, pri čemu niža koncentracija uvodi ćelije u ranu i kasnu apoptozu/nekrozu, dok kod veće koncentracije proapoptotski efekat u potpunosti izostaje. Što se tiče molekularnih mehanizama apoptoze, u različitim publikacijama koja su posvećene ispitivanju uticaja Polygonoideae ekstrakata je navedeno da ekstrakti u cilju eliminisanja tumorskih ćelija podstiču apoptozu preko *p53* gena, pri čemu dovode do supresije anti-apoptotskog *Bcl-2* gena (Habibi i sar., 2011). Proapoptotska aktivnost *p53* gena ostvaruje se kroz atenuaciju *Cdc2* i gena Rb familije transkripcionih represora. Takođe, *Cdc2* sa ciklinom B1 formira kompleks „faktor pokretanja mitoze” (eng. mitotic promoting factor, MPF) čiji nizak nivo, usled atenuacije ciklin B1 promotera sa *p53*, omogućava zastoj ćelija u G2 fazi ćelijskog ciklusa (Stark i Tailor, 2004). Uzimajući u obzir značaj G2/M kontrolne tačke za prevenciju ulaska oštećenih ćelija u mitozu i inhibiciju proliferacije, važno je napomenuti da svi testirani ekstrakti u određenim koncentracijama individualno ili u kombinaciji sa D povećavaju nakupljanje HepG2 ćelija u G2/M fazi.

Poput navedenog, pojedine studije su pokazale da različiti Polygonoideae ekstrakti i njihova aktivna jedinjenja izazivaju proapoptotski efekat i dovode do zastoja HepG2 ćelija u G2/M fazi (Shieh i sar., 2004; Lee i sar., 2011). U našem istraživanju je takođe uočeno da individualni tretman i kotretman sa ekstraktom *P. amphibia* i D u HepG2 ćelijama indukuju zastoj ćelijskog ciklusa u S fazi. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima Ghazali i sar. (2014) koji pokazuju da *Polygonum minus* indukuje nakupljanje HepG2 ćelija u S fazi. Nadalje, prema Lin i sar. (2010) etanolni ekstrakt *P. cuspidatum* uzrokuje nakupljanje ćelija u subG1 fazi na A549 ćelijama. U skladu sa njihovim rezultatima, ekstrakt PEMh sam ili u kombinaciji sa D pri određenim koncentracijama dovodi do nakupljanja ćelija u subG1 fazi u A549 i HepG2 ćelijama. Takođe, pri većim testiranim koncentracijama POAh i PEAh dovode do nakupljanja HepG2 ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa. Poput naših rezultata Chen i sar. (2017) su dokazali da juglanin (kemferol-3-*O*-arabinozid) aktivna komponenta izolovana iz *P. aviculare* indukuje apoptozu i uzrokuje nakupljanje ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa.

Stoga, opaženi sinergizam u malignim ćelijama između D i testiranih ekstrakata može biti posledica interferencije sa putevima koji su uključeni u regulaciju apoptoze i ćelijskog ciklusa. Podaci iz literature pokazuju da se proapoptotski efekat i zastoj ćelijskog ciklusa izazvani ekstraktima mogu pripisati njihovom hemijskom sastavu. Prema tome, K-3-*O*-Glc dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi, što je praćeno smanjenjem broja ćelija u G0/G1 fazi (Boukes i Venter, 2016). Štaviše, GK i Ka indukuju zaustavljanje ćelijskog ciklusa isključivo u malignim ćelijama, dok normalne ćelije ostavljaju intaktnim (Pinmai i sar., 2008). Nadalje, kvercetin i K-3-*O*-Glc odlikuje sposobnost indukcije apoptoze u različitim malignim ćelijama (Gopalakrishnan i Kong, 2008; Ramos, 2008). Štaviše, kvercetin i K-3-*O*-Glc pokazuju antiapoptotski efekat u normalnim ćelijama tretiranim sa D (Lajter i sar., 2013; Iang i sar., 2014).

Poznato je da modulacijom antioksidativnih enzima preko Keap1-Nrf2 kaskadne signalizacije brojni konstituenti biljnih ekstrakata mogu modelovati ćelijski odgovor na oksidativni stres pri čemu se njihovo delovanje može manifestovati kao protektivni ili prooksidativni efekat (Kalender i sar., 2005; Han i Lou 2007; Gopalakrishnan i Kong, 2008; Gao i sar., 2013; Lee i sar., 2015). Koja će se od dualnih aktivnosti ispoljiti zavisi pre svega od doze i vremena izlaganja biljnim agensima (Procházková i sar., 2011; Lee i sar., 2015). Snižavanje *Nrf2* aktivnosti naročito je povoljno kod malignih ćelija kod kojih je detektovana česta pojava hemiorezistencije usled povećane, konstitutivne ekspresije *Nrf2* gena (Gao i sar., 2013; Raghunath i sar., 2018). Dakle, *Nrf2* inhibitori mogu služiti u terapiji maligniteta kod ćelija sa stalnom ekspresijom *Nrf2* gena, poput ćelija hepatokarcinoma i plućnog adenokarcinoma. Sa druge strane povećanje ekspresije *Nrf2* gena od posebnog je značaja za normalne ćelije koje su izložene oksidativnom stresu. Poznato je da *Nrf2* aktivacija predstavlja protektivni mehanizam detektovan prilikom pojave brojnih oboljenja, uključujući i supresiju nastanka tumora (Zhu i sar., 2016).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da POAh i PEMh dovode do redukcije aktivnosti SOD1, SOD2 i KAT što je regulisano preko smanjenja *Nrf2* ekspresije u HepG2 ćelijskoj liniji. Štaviše, pokazano je da je smanjena aktivnost *Nrf2* ekspresije rezultat povećane ekspresije *Keap1* gena. Sa druge strane, smanjena aktivnost antioksidativnih enzima nakon tretmana sa PEAh ne može se dovesti u vezu sa *Nrf2* genskom regulacijom u HepG2 ćelijama. Neočekivano, pokazano je da POMh ekstrakt dovodi do povećane ekspresije SOD1 i KAT, pri čemu treba uzeti u obzir da su ovi proteinski produkti potencijalno rezultat obrade posttranslacionih mehanizama. Uzevši u obzir sve dobijene rezultate vidimo da ekstrakti, izuzev POMh, smanjuju antioksidativnu zaštitu HepG2 malignih ćelija, što dalje može objasniti indukciju apoptoze i zaustavljanje ćelijskog ciklusa usled senzitivizacije ćelija posredovane oksidativnim stresom. Nadalje, kako je prema studiji Alía i sar. (2006) pokazano da visoka doza kvercetina značajno smanjuje nivo KAT u HepG2 ćelijama, a kako se PEAh odlikuje značajnom

količinom K-3-O-Glk i kvercetina, smatramo da su navedene komponente odgovorne za smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima, naročito KAT.

Dalje, posmatrajući dejstvo odabranih kotretmana na HepG2 ćelijama, zapaženo je da PEMD dovodi do povećane ekspresije *Keap1* gena koja uzrokuje supresiju *Nrf2* gena što rezultira redukovanjem SOD2 aktivnosti. Isto tako, nakon kotretmana POAD i PEAD uočena je jasna veza između povećane aktivnosti *Keap1* gena i redukovane ekspresije *Nrf2* gena, međutim, kako je zapažen povećani nivo SOD1 proteina, smatra se da su različiti signalni putevi uključeni u regulaciji SOD1 aktivnosti. Varibijalna ekspresija SOD1 enzima u individualnom tretmanu i kotretmanu može biti uzrokovana različitim dozama. Predstavljeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji sugerišu da usled delovanja različitih koncentracija i vremena delovanja rezveratrol, aktivna komponenta *P. cuspidatum*, može uticati na inhibitorski i stimulatorski način na aktivaciju *Nrf2* i modelovati SOD aktivnost (Cao i sar., 2004). Štaviše, na određenim koncentracijama detektovano je snižavanje *Nrf2* nivoa usled kotretmana rezveratrolom i D (Rai i sar., 2016). Takođe, treba imati na umu da je disbalans prisustva povećane i smanjenje produkcije različitih antioksidativnih enzima koji su pod kontrolom *Nrf2* gena zabeležen i u publikaciji Vnukov i sar. (2017).

Rezultati našeg istraživanja takođe ukazuju da u A549 ćelijama povećana ekspresija *Keap1* gena rezultira smanjenom aktivacijom *Nrf2* gena, što za posledicu ima redukovan nivo SOD1 i KAT proteina nakon tretmana PEAh ekstraktom. Takođe, smanjena ekspresija *Nrf2* gena detektovana je i nakon tretmana PEMh ekstraktom, ali kako ona nije statistički značajna, ne možemo reći da je redukcija SOD2 i KAT isključivo pod kontrolom *Nrf2*-*Keap1* signalnog puta. Smanjenje aktivnosti KAT detektovano je i nakon tretmana sa POAh ekstraktom, međutim povećanje nivoa SOD1 i SOD2, i odsustvo promene ekspresije *Nrf2* gena takođe sugerišu na postojanje alternativnog načina regulacije aktivnosti antioksidativnih enzima. Što se tiče dejstva ispitanih kotretmana na A549 ćelijskoj liniji, jedino je PEAD izazvao značajno povećanje aktivnosti *Keap1* gena praćeno smanjenjem ekspresije *Nrf2* gena. Kako PEAD utiče na smanjenje nivoa KAT, smatramo da je aktivnost ovog enzima regulisana *Keap1*-*Nrf2* signalnim putem. Sa druge strane smanjenje aktivnosti svih ispitanih antioksidativnih enzima PEMD kotretmanom ne možemo povezati sa *Keap1*-*Nrf2* kaskadom.

Nadalje, gotovo da nema literaturnih podakaka o interferenciji odabranih *Polygonoideae* ekstrakata sa *Nrf2*-*Keap1* signalnim putem. Međutim, bitno je pomenuti da su Cheng i sar. (2013) pokazali da ekstrakt dobijen od *Polygonum viviparum* u RAW264.7 makrofagima indukuje translokaciju *Nrf2* iz citoplazme u jedro, pri čemu *Nrf2* dovodi do povećane aktivnosti hem oksigenaze (HO-1) antioksidativnog proteina.

U našoj studiji na zdravoj ćelijskoj liniji nakon 40 ciklusa nismo detektovali ekspresiju *Nrf2* i *Keap1* gena. Navedeno donekle može biti opravdano visokom ćelijskom pasažom. Ipak, utvrđeno je povećanje nivoa antioksidativnih proteina u MRC-5 ćelijama tretiranim sa POAh i PEMh. Takođe, povećanje nivoa SOD1 i SOD2 proteina detektovano je nakon svih testiranih kotretmana. Povećan nivo antioksidativne zaštite je najverovatnije uzrok antagonizma ekstrakata i D u normalnoj MRC-5 ćelijskoj liniji. Bitno je napomenuti i da je povećanje antioksidativne aktivnosti kod *P. aviculare* etanolnog ekstrakta detektovano u različitim studijama, pri čemu se kao mehanizam delovanja navodi inhibicija lipidne preroksidacije i mogućnost uklanjanja slobodnih radikala (Hsu, 2006; Habibi i sar., 2011; Ravipati i sar., 2013). Takođe, DPPH i ABTS testom pokazano je da metanolni ekstrakt lišća i korena *P. maritimum* pokazuje izrazit antioksidativni efekat (Rodrigues i sar., 2018). Štaviše, metanolni ekstrakt *P. maritimum* štiti ćelije neuroblastoma (SH-SY5Y) tretirane H₂O₂ od citotoksičnosti indukovane oksidativnim oštećenjima (Rodrigues i sar., 2018). Za ekstrakt *P. maculosa* takođe je zapažena antioksidativna aktivnost (Özen, 2010; Svirčev i sar., 2014).

5.3. Bezbednost primene ekstrakata

Serijski ispitivanja bioloških efekata odabranih ekstrakata koja je predstavljena u ovoj doktorskoj disertaciji uključila je i evaluaciju toksičnosti. Iako su ekstrakti dobijeni od jestivih i medicinskih biljaka za koje bi mogli pretpostaviti da ne predstavljaju opasnost po zdravlje korisnika, usled aktuelnog pogleda da prirodna medicina nije toliko bezbedna kao što mislimo, započeta su ispitivanja toksičnosti selektovanih ekstrakata. Kako su prema rezultatima predstavljenim u ovoj doktorskoj disertaciji PEMh i BIOR ekstrakti dali odlične rezultate kao samostalni agensi u različitim testovima, želeli smo da proverimo da li su bezbedni za korišćenje.

Kao što je već istaknuto, usled visokog stepena molekularne, genetičke, fiziološke i imunološke sličnosti između zebrića i ljudi testiranje toksičnosti potencijalnih lekova na modelu *Danio rerio* se pokazalo kao veoma benefično (Lieschke i Currie, 2007; MacRae i Peterson, 2015). U ovoj studiji ispitana je aktivnost PEMh i BIOR ekstrakta kao i njihovih aktivnih konstituenata, Ka i K-3-O-Glk, na preživljavanje i razvoj embriona zebrića.

Iako oba ekstrakta, primenjena na zebrićama u koncentracijama koje su bile aktivne u suzbijanju biofilma, ne ispoljavaju letalne i teratogene efekte, štetni efekti su ipak uočeni pri delovanju većih doza. U studiji Yang i sar. (2018) istaknuto je da prečišćene antrahinonske komponente etanolnog ekstrakta korena *P. multiflorum*, uključujući i emodin, aloe-emodin i hrizofanol, pokazuju visok stepen embriotoksičnosti, dok stilbeni i amidi prisutni u navedenom ekstraktu nisu ispoljili štetan uticaj na ispitivanom modelu zebrića. Kako kod PEMh i BIOR prisustvo emodina, aloe-emodina i hrizofanola nije detektovano, ali je ustanovljen relativno visok sadržaj ukupnih antrahinonskih jedinjenja (Svirčev, 2014), potrebna je detaljnija hemijska karakterizacija ekstrakata i dodatna analiza embriotoksičnosti da bi se ispitala njihova potencijalna veza. Nadalje, u našoj studiji dokazano je da K-3-O-Glk remeti preživljavanje i razviće embriona u određenim koncentracijama. Ranije je pokazano da kvercetinški glikozidi nisu toksični pri niskoj koncentraciji, ali da se uočavaju malformacije tokom razvoja zebrića pri većim koncentracijama (Park i sar., 2014). Iako embriotoksičnost Ka nije do sada ispitana, pojedine studije ističu da biljni ekstrakti bogati katehinom, poput *Cinnamom zeylanicum* i *Eugenia polyantha*, pokazuju dozno-zavisnu toksičnost (Ismail i sar., 2017). U našoj studiji, nije zabeležena toksična aktivnost Ka prema zebrićama. Kako je Ka dijetetski flavonoid koji je često zastupljen u namirnicama biljnog porekla odsustvo toksičnosti je od velikog značaja. Naravno, dalja detaljna ispitivanja drugih odabranih ekstrakata su neophodna radi sagledavanja njihovih štetnih ili korisnih efekata kao i procene rizika njihove upotrebe.

5.4. Dalje perspektive istraživanja odabranih predstavnik podfamilije Polygonoideae baziranim na predstavljenim rezultatima disertacije

Jedan od održivih razvojnih ciljeva Ujedinjenih nacija je postizanje zdravstvene i opšte dobrobiti za sve, a Svetska Zdravstvena Organizacija (SZO) podržava ovaj cilj kroz podsticanje aktivne primene tradicionalnih medikamenata paralelno sa konvencionalnim lekovima. Nažalost, nedostatak verodostojnih podataka o upotrebi tradicionalnih lekovitih biljaka izazov je koji se nameće prilikom realizacije navedenog, usled čega je neophodna naučna procena upotrebe narodnih lekova.

Kombinovanom pristupu lečenja (koji koristi kombinaciju biljnih ekstrakata i komercijalnih lekova) hitno je potrebna terapijska strategija, pre svega usled pojave sve češće rezistencije kako mikroorganizama tako i kancerskih ćelija na konvencionalne medikamente. Štaviše, od uvođenja „čudotvornih lekova” tj. antibiotika u kliničku praksu do danas broj rezistentih bakterija je porastao i još uvek raste (Dong i sar., 2007; Uroz i sar., 2009; Morić i sar., 2010). Takođe, konvencionalni citostatici nisu dovoljni kao jedini lek izbora u hemioterapiji (Pavić i sar., 2019).

Kao što je istaknuto u Uvodnom delu, odabrane biljke podfamilije Polygonoideae imaju dugu tradiciju primene u alternativnoj medicini brojnih naroda. S obzirom da su ove biljke okarakterisane kao samonikle, korovske, a pojedine spadaju i u invazivne, njihova pozamašna dostupnost olakšava sprovođenje ideje da se ove biljke najpre ispituju, a potom i koriste u kombinaciji sa konvencionalnim medikamentima.

Da bi omogućili kontrolisanje rezistentnih bakterija, u mikrobiologiji je prisutno intenzivno izučavanje QS signalizacije i QQ interferencije, takozvanog „jin i janga međubakterijske komunikacije” (Uroz i sar., 2009). Što se tiče antivirulentnog potencijala, još jednom ističemo da je u našoj studiji, po prvi put, dokazan anti-QS efekat PEMh i BIOR ekstrakta primenjenih u netoksičnim koncentracijama na *P. aeruginosa* PAO1, i da je ovo veoma značajan rezultat koji nameće dalja istraživanja antivirulentne aktivnosti navedenih ekstrakata. Za dodatna testiranja interferencije selektovanih ekstrakata sa QS signalizacijom preporučujemo ispitivanje pokreta grčenja (eng. twitching) CV bojenjem i praćenje formiranja biofilмова soja *P. aeruginosa* PAO1 na 3D modelu A549 ćelijske linije različitim mikroskopskim tehnikama nakon tretmana ekstraktima PEMh i BIOR (metoda bi bila prilagođena prema Crabbé i sar., 2017).

Što se tiče hemoterapijskog potencijala, prvi smo dokazali da ekstrakti *P. aviculare* i *P. amphibia* ostvaruju sinergistički odnos sa D na HepG2 ćelijskoj liniji, pri čemu su za dati sinergizam delom odgovorni zastoj ćelijskog ciklusa, uvođenje ćelija u apoptozu i interferiranje sa Keap1-Nrf2 signalnim putem. Navedeno opravdava dalja ispitivanja ekstrakata herbi *P. aviculare* i *P. amphibia* u svojstvu adjuvantnih agenasa u hemioterapiji. Prvo bi trebalo proceniti njihovu toksičnost *in vivo* testovima, u ovom koraku bi bio sproveden test procene toksičnosti ekstrakata na embrionalnom modelu zebrica (*Danio rerio*). Dalja ispitivanje uticaja selektovanih ekstrakata u kombinaciji sa doksorubicinom trebaju ići u smeru njihovog testiranja na 3D modelu HepG2 ćelija, merenja mitohondrijskog membranskog potencijala i ispitivanja genotoksičnog potencijala komet i mironukleus testom. U zavisnosti od dobijenih rezultata potencijalno bi bila sprovedena i randomizovana pilot studija otvorenog tipa za ocenjivanje efikasnosti i bezbednosti ekstrakta u kombinaciji sa citostatikom doksorubicinom primenjenim kod pacijenata sa hepatokarcinomom.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu rezultata ispitivanja bioloških aktivnosti 12 etanolnih ekstrakata rizoma i nadzemnih delova različitih biljaka podfamilije Polygonoideae, sprovedenih u okviru ove disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Svi testirani biljni ekstrakti pokazali su antifungalnu aktivnost, pri čemu je efikasnost zavisila od tipa ekstrakta i vrste indikatorskog soja. Najveća je bila prema *Alternaria alternata*, gde je uočena maksimalna inhibicija rasta 34,76% primenom ekstrakta rizoma *Persicaria hydropiper*. Pojedini ekstrakti dovodili su do dekolorizacije konidija i promene morfologije spora gljive *Aspergillus* sp.
2. Antibakterijski efekat prema 5 od ukupno 7 testiranih sojeva uočen je za 9 ekstrakata. Gram-negativne bakterije pokazale su slabu osetljivost, a najosetljivija Gram pozitivna bakterija je bila *Staphylococcus aureus*, kod koje je efekat ekstrakata rizoma *Polygonum aviculare* i *Bistorta officinalis* uočen na koncentracijama 0,16-0,31 mg/mL (bakteriostatski), odnosno 0,31-0,62 mg/mL (baktericidni). Uz to, ekstrakt rizoma *Bistorta officinalis* stupa u različite vrste interakcija sa streptomycinom, uključujući i sinergistički efekat ostvaren prema *Staphylococcus aureus*.
3. Antibiofilm potencijal prema sojevima *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis i *Pseudomonas aeruginosa*, praćen kroz analizu efekta na formiranje i destrukciju preformiranog biofilma, kao i na signalne puteve ćelijske komunikacije, uočen je za ekstrakte herbi *Persicaria amphibia*, *Persicaria maculosa* i *Bistorta officinalis* i rizoma *Polygonum aviculare* i *Bistorta officinalis*, kao i njihove aktivne konstituente hinsku kiselinu, 5-*O*-kafeolinsku kiselinu, katehin i kvercetin-3-*O*-glukozid. Pri tome je svaka od test supstanci bila efikasna u barem jednom primenjenom testu.
4. Uticaj ekstrakata herbe *Persicaria maculosa* i rizoma *Bistorta officinalis* na faktore virulencije: mobilnost, produkciju pigmenata i formiranje biofilma *Pseudomonas aeruginosa* je u korelaciji sa smanjenjem aktivnosti LasR receptora signalnog puta međubakterijske komunikacije.
5. Ekstrakti herbi *Polygonum aviculare*, *Polygonum maritimum*, *Persicaria maculosa* i *Persicaria amphibia* pokazali su citotoksičnost prema ćelijskim linijama hepatokarcinoma (HepG2), adenokarcinoma (A549) i normalnih fibroblasta (MRC-5) pluća. Ispitivanje efekta ekstrakata u kombinaciji sa komercijalnim citostatikom doksorubicinom ukazalo je na postojanje sva tri tipa interakcije, pri čemu je najbolju selektivnost pokazao ekstrakt *P. aviculare*, za koji je utvrđen sinergizam u slučaju kancerskih, a antagonizam u normalnim ćelijama.
6. Proapoptotski efekat i zaustavljanje ćelijskog ciklusa u nekoj od faza uočen je na svim ćelijskim linijama u slučaju ekstrakta *Persicaria maculosa*, dok su *Polygonum aviculare*, *Polygonum maritimum* i *Persicaria amphibia* ostvarili oba efekta jedino na HepG2 ćelijama.
7. Testirani ekstrakti pokazali su različite efekte na enzime antioksidativne zaštite superoksid dismutaze i katalazu u različitim ćelijskim linijama. Značajnim se mogu smatrati smanjenje aktivnosti enzima u kancerskim HepG2 ćelijama izazvano delovanjem svih ekstrakata izuzev *Polygonum maritimum*, kao i *Persicaria amphibia* primenjene individualno i u kombinaciji sa doksorubicinom u kancerskim A549 ćelijama. Pored toga, značajno je i povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima u normalnim MRC-5 ćelijama, što je uočeno u slučaju primene *Polygonum aviculare* i *Persicaria maculosa*, pojedinačno i u kombinaciji sa doksorubicinom.
8. Uticaj na ekspresiju enzima antioksidativne zaštite se može povezati sa regulacijom Keap1-Nrf2 signalnog puta, koja je uočena u slučajevima primene ekstrakta *Polygonum aviculare* i kotretmana sa ekstraktom *Persicaria maculosa* i doksorubicinom u HepG2 ćelijama, kao i primenom *Persicaria amphibia*, pojedinačno i u kombinaciji, u ćelijama A549 linije.
9. Procena rizika upotrebe ekstrakata i njihovih aktivnih konstituenata, testirana na modelu *Danio rerio*, ukazuje da ekstrakti herbe *Persicaria maculosa* i rizoma *Bistorta officinalis* i njihovi aktivni

ZAKLJUČCI

konstituenti katehin i kvercetin-3-*O*-glukozid u dozama od 125 µg/mL, 50 µg/mL i 30 µg/mL ne utiču na preživljavanje i razvoj embriona *Danio rerio*. U većim ispitanim koncentracijama ekstrakt rizoma *Bistorta officinalis* i kvercetin-3-*O*-glukozid deluju teratogeno, pri čemu su uočene sledeće iregularnosti: deformitet glave i vilice, tamno žumance i tamna jetra, riblji mehur bez kiseonika i znaci hepatotoksičnosti.

7. LITERATURA

Agosta, W.C. (1997). Medicines and drugs from plants. *J. Chem. Educ.* 74, 857.

Al Yousef, S.A. (2013) Antifungal activity of volatiles from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and peppermint (*Mentha piperita*) oils against some respiratory pathogenic species of *Aspergillus*. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2, 261-72.

Aleksić, I., Ristivojević, P., Pavić, A., Radojević, I., Čomić, L. R., Vasiljević, B., Opsenica, D., Milojković-Opsenica, D., Senerović, L. (2018). Anti-quorum sensing activity, toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and phytochemical characterization of *Trapa natans* leaf extracts. *J Ethnopharmacol.* 222, 148-158.

Al-Hajj, N.A., Hassan, K.Z., Alabed, A.A.A., Al Mahdi, A.Y., Abdsalam, R., Albawani S. M.(2018) Antibacterial Assays of Malaysian Medicinal Plant *Polygonum minus* Using Different Extraction Methods. *Res. J. Med. Sci.*12, 5-11.

Ali, M.Z., Janbaz, K.H., Mehmood, M.H., Gilani, A.H. (2015). Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Polygonum bistorta* rhizomes are mediated predominantly through K⁺ channels activation. *Bangl J Pharmacol.* 10, 627-634.

Alimbetov, D., Askarova, S., Umbayev, B., Davis, T., Kipling, D. (2018). Pharmacological targeting of cell cycle, apoptotic and cell adhesion signaling pathways implicated in chemoresistance of cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1690.

Al-Snafi, A.E. (2017). A review on *Fagopyrum esculentum*: A potential medicinal plant. *IOSRPHR.* 7, 21-32.

Alzahrani, S., Alqahtani, F. (2016). Pyocyanin Pigment Extracted from *Pseudomonas Aeruginosa* Isolate as Antimicrobial Agent and Textile Colorant. *Science.* 5.

Andlauer, W., Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res Int.* 35, 171-176.

Annapoorani, A., Umamageswaran, V., Parameswari, R., Pandian, S.K., Ravi, A.V. (2012). Computational discovery of putative quorum sensing inhibitors against LasR and RhlR receptor proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Comput Aid Mol Des.* 26, 1067-1077.

Arai, S., Osawa, T., Ohigashi, H., Yoshikawa, M., Kaminogawa, S., Watanabe, M., Ogawa, T., Okubo, K., Watanabe, S., Nishino, H., Shinohara, K. (2001). A mainstay of functional food science in Japan history, present status, and future outlook. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1-13.

Arora, P., Lamba, H.S., Sharma, P. (2018). Pharmacological, phytochemical, biological evaluation and future prospects of *Polygonum hydropiper* *World J. Pharm. Res.* 5, 539-551.

Asfour, H.Z. (2018). Anti-quorum sensing natural compounds. *JMAU.* 6, 1.

Aung, H.T., Sein, M.M., Aye, M.M., Thu, Z.M. (2016). A review of traditional medicinal plants from Kachin State, Northern Myanmar. *Nat Prod Commun.* 11, 1934578X1601100310.

Badhani, B., Sharma, N., Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Rsc Advances.* 5, 27540-27557.

Badillo, L.M., Madrigal, R.M.E., Muñoz, R.E.M., Ron, O.A., Echeverria, R.S.G., Garcia, A.F., Gonzalez, D.R., Pacheco, M.M.M. (2008). The Mexican medicinal plants with antifungal properties are an economic and health opportunity area. *Pharmacology online.* 3, 61-77.

- Balázs, E. (2014). Microbial Diversity and its Applications, S.B. Barbuddhe, R. Ramesh and N.P. Singh (Eds.), 2013, Jai Bharat Printing Press, Delhi, (pp. 256) ISBN: 9789381450666.
- Ballabh, B., Chaurasia, O.P., Ahmed, Z., Singh, S.B. (2008). Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh used against kidney and urinary disorders. *J Ethnopharmacol.* 118, 331-339.
- Barnum, K.J., O'Connell, M.J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. In *Cell Cycle Control* (pp. 29-40). Humana Press, New York, NY.
- Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., Berghmans, S. (2008). Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1400-1413.
- Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules.* 17, 3989-4006.
- Bhatia, H., Manhas, R.K., Kumar, K., Magotra, R. (2014). Traditional knowledge on poisonous plants of Udhampur district of Jammu and Kashmir, India. *J Ethnopharmacol.* 152, 207-216.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5, 9.
- Bladt, S., Wagner, H. (2007). From the Zulu medicine to the European phytomedicine Umckaloabo®. *Phytomedicine.* 14, 2-4.
- Bolotova, Y.V. (2015). Aquatic plants of the Far East of Russia: a review on their use in medicine, pharmacological activity. *BJMS,* 14, 9-13.
- Bordoloi, M., Bordoloi, P.K., Dutta, P.P., Singh, V., Nath, S., Narzary, B., Bhuyan, P.D., Rao, P.G., Barua, I.C. (2016). Studies on some edible herbs: Antioxidant activity, phenolic content, mineral content and antifungal properties. *J Funct Foods,* 23, 220-229.
- Borges, A., Saavedra, M. J., Simões, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling.* 28, 755-767.
- Borges, A., Serra, S., Cristina Abreu, A., Saavedra, M.J., Salgado, A., Simoes, M. (2014). Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and *in vitro* cytotoxicity. *Biofouling.* 30, 183-195.
- Boukes, G.J., van de Venter, M. (2016). The apoptotic and autophagic properties of two natural occurring prodrugs, hyperoside and hypoxoside, against pancreatic cancer cell lines. *Biomed. Pharmacother.* 83, 617-626.
- Burke, J.M., Sanchez, A. (2011). Revised subfamily classification for Polygonaceae, with a tribal classification for Eriogonoideae. *Brittonia.* 63, 510-520.
- Burrows, G.E., Tyrl, R.J. (1989). Plants causing sudden death in livestock. *Vet Clin N Am-Food A,* 5, 263-289.
- Čabarkapa, I.S., Sedej, I.J., Sakač, M.B., Šarić, L.Ć., Plavšić, D.V. (2008). Antimicrobial activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls extract. *Food Feed Res.* 35, 159-164.
- Carmo, E., E. de Oliveira Lima, E. de Souza. (2008). The potential of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.* 39, 362-367.
- Cartron, J.L.E., Lightfoot, D.C., Mygatt, J.E. (2008). A field guide to the plants and animals of the Middle Rio Grande Bosque. UNM Press.

- Chen, L., Xiong, Y.Q., Xu, J., Wang, J.P., Meng, Z.L., Hong, Y.Q. (2017). Juglanin inhibits lung cancer by regulation of apoptosis, ROS and autophagy induction. *Oncotarget*. 8, 93878.
- Cheng, H.W., Lee, K.C., Cheah, K.P., Chang, M.L., Lin, C.W., Li, J.S., Yu, W.Y., Liu, E.T., Hu, C.M. (2013). *Polygonum viviparum* L. inhibits the lipopolysaccharide- induced inflammatory response in RAW264. 7 macrophages through haem oxygenase- 1 induction and activation of the Nrf2 pathway. *J Sci Food Agr*, 93. 491-497.
- Chitarrini, G., Nobili, C., Pinzari, F., Antonini, A., De Rossi, P., Del Fiore, A., Procacci, S., Tolaini, V., Scala, V., Scarpari, M., Reverberi, M. (2014). Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 1-10.
- Chiu, Y.J., Chou, S.C., Chiu, C.S., Kao, C.P., Wu, K.C., Chen, C.J., Tsai, J.C., Peng, W.H. (2017). Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Polygonum orientale* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *J Food Drug Anal.* 26, 369-379.
- Chu, W., Zhou, S., Jiang, Y., Zhu, W., Zhuang, X., Fu, J. (2013). Effect of traditional Chinese herbal medicine with antiquorum sensing activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013.
- Churchill, R.L., Lee, H., Hall, J.C. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J. Microbiol. Methods.* 64, 141-170.
- Conolly, R.B., Lutz, W.K. (2004). Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol. Sci.* 77, 151-157.
- Cornelis, P. (2019). Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *MicrobiologyOpen.* e962.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* ‘proof-of-concept’. *J Ethnopharmacol.* 106, 290-302.
- Costea, M., Tardif, F.J. (2005). The biology of Canadian weeds. 131. *Polygonum aviculare* L. *Can. J. Plant Sci.* 85, 481-506.
- Crabbé, A., Liu, Y., Matthijs, N., Rigole, P., De La Fuente-Núñez, C., Davis, R., Ledesma, M.A., Sarker, S., Van Houdt, R., Hancock, R.E., Coenye, T. (2017). Antimicrobial efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in a three-dimensional lung epithelial model and the influence of fetal bovine serum. *Sci. Rep.* 7, 43321.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech.* 23, 174-181.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 15, 7313-7352.
- De Craene, L.R., Hong, S.P., Smets, E.F. (2004). What is the taxonomic status of *Polygonella*? Evidence of floral morphology. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 320-345.
- Dekker, J.P., Frank, K.M. (2015). *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. *Clin Lab Med.* 35, 225-246.
- Demiray, S., Pintado, M.E., Castro, P.M.L. (2009). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Acad Sci Eng Technol.* 54, 312-317.
- Derita, M., Zacchino, S. (2011). Validation of the ethnopharmacological use of *Polygonum persicaria* for its antifungal properties. *Nat Prod Commun.* 6, 1934578X1100600702.

- Dinges, MM., Orwin, PM., Schlievert, PM., (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 13, 16-34.
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Li, X., Wang, B., Cao, S., Zhang, J., Zhang, H., Zhao, Y., Ni, J. (2014). Pharmacological and other Bioactivities of the Genus Polygonum-A Review. Trop J Pharm Res. 13.
- Dong, X., Ni, B., Fu, J., Yin, X., You, L., Leng, X., Liang, X., Ni, J. (2018). Emodin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepaRG cells via the mitochondrial caspase-dependent pathway. Oncol. Rep. 40, 1985-1993.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Zhang, L.H. (2007) Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. PHILOS T R SOC B. 362,1201-1211.
- Dong, Y.H., Zhang, L.H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. J. Microbiol. 43, 101-109.
- Donlan, RM. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin. Infect. Dis. 33,1387-92.
- Duan, K., Surette, M.G. (2007). Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. J Bacteriol. 189, 4827-4836.
- Dubois-Brissonnet, F., Trotier, E., Briandet, R. (2016). The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. Front Microbiol. 7, 1673.
- Duraipandiyar, V., Indwar, F., Ignacimuthu, S. (2010). Antimicrobial activity of confertifolin from *Polygonum hydropiper*. Pharm Biol. 48, 187-190.
- Dzoyem, J.P., NKuete, A.H., Kuete, V., Tala, M.F., Wabo, H.K., Guru, S.K., Rajput, V.S., Sharma, A., Tane, P., Khan, I.A., Saxena, A.K. (2012). Cytotoxicity and antimicrobial activity of the methanol extract and compounds from *Polygonum limbatum*. Planta Med. 78, 787-792.
- Egbuta, M., Mwanza, M., Babalola, O. (2017). Health risks associated with exposure to filamentous fungi. Int J Env Res Pub He. 14, 719.
- Eid, S.Y., El-Readi, M.Z., Wink, M. (2012). Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. Phytomedicine. 19, 1288-1297.
- El-Haci, I.A., Bekkara, F.A., Mazari, W., Hassani, F., Didi, M.A. (2013). Screening of biological activities of *Polygonum maritimum* L. from Algerian coast. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3, 611-616.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol. 35, 495-516.
- Falcão, M.A.P., de Souza, L.S., Dolabella, S.S., Guimarães, A.G., Walker, C.I.B. (2018). Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. Environ Sci Pollut Res Int. 25, 35015-35026.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Mol Biol R. 55, 476-511.
- Fletcher, M.P., Diggle, S.P., Crusz, S.A., Chhabra, S.R., Camara, M., Williams, P. (2007) A dual biosensor for 2-alkyl-4-quinolone quorum-sensing signal molecules. Environ Microbiol. 9, 2683-2693.
- Freitas, C.S., Vericimo, M.A., da Silva, M.L., da Costa, G.C., Pereira, P.R., Paschoalin, V.M., Del Aguila, E.M. (2019). Encrypted antimicrobial and antitumoral peptides recovered from a protein-rich soybean (*Glycine max*) by-product. J Funct Foods, 54, 187-98.

- Galasso, G., Banfi, E., De Mattia, F., Grassi, F., Sgorbati, S., Labra, M. (2009). Molecular phylogeny of *Polygonum* L. s.l. (Polygonoideae, Polygonaceae), focusing on European taxa: preliminary results and systematic considerations based on rbcL plastidial sequence data. *Atti della Società italiana di scienze naturali e del Museo civico di storia naturale di Milano*, 150, 113-148.
- Gao, A.M., Ke, Z.P., Shi, F., Sun, G.C., Chen, H. (2013). Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway. *Chem. Biol. Interact.* 206, 100-108.
- Ghazali, M., Alfazari, M., Al-Naqeb, G., Krishnan Selvarajan, K., Hazizul Hasan, M., Adam, A. (2014). Apoptosis induction by *Polygonum minus* is related to antioxidant capacity, alterations in expression of apoptotic-related genes, and S-phase cell cycle arrest in HepG2 cell line. *Biomed Res Int.* 2014.
- Ghosh, K.C., Rahman, H., Alam, J., Faruque, M.O., Mahamudul, M. (2010). A comparative analysis of medicinal plants used by folk medicinal healers in villages adjoining the Ghaghot, Bangali and Padma Rivers of Bangladesh. *Am Eurasian J Agric Environ Sci.* 4, 70-85.
- Gilabert, M., Cartagena, E., Escobar, G., Bardón, A., Arena, M. (2014). Volatile terpenoids from water pepper (*Polygonum punctatum*) against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* virulence strategies. *Glob. J. Agric. Innov. Res. Dev.* 1, 3-10.
- González - Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M., Malouin, F., Bouarab, K. (2009). Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3400-3419.
- Gopalakrishnan, A., Kong, A.N.T. (2008). Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF- κ B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1257-1270.
- Guarrera, P.M., Savo, V. (2016). Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *J Ethnopharmacol.* 185, 202-234.
- Habibi, R.M., Mohammadi, R.A., Delazar, A., Halabian, R., Soleimani, R.J., Mehdipour, A., Bagheri, M., Jahanian-Najafabadi, A. (2011). Effects of *Polygonum aviculare* herbal extract on proliferation and apoptotic gene expression of MCF-7. *DARU J. Pharm. Sci.* 19, 326.
- Hadi, S.M., Bhat, S.H., Azmi, A.S., Hanif, S., Shamim, U., Ullah, M.F. (2007). October. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. In *Semin Cancer Biol.* 5, 370-376.
- Hailemariam, A., Feyera, M., Deyou, T., Abdissa, N. (2018). Antimicrobial Chalcones from the Seeds of *Persicaria lapathifolia*. *Biochem Pharmacol.* 7, 2167-0501.
- Hamanaka, R.B., Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci.* 35, 505-513.
- Hasan, M.F., Das, R., Khan, A., Hasan, M.S. and Rahman, M. (2009). The determination of antibacterial and antifungal activities of *Polygonum hydropiper* (L.) root extract. *Adv Biol Res.* 3, 53-56.
- Hashemzaei, M., Karami, S.P., Delaramifar, A., Sheidary, A., Tabrizian, K., Rezaee, R., Shahsavand, S., Arsene, A.L., Tsatsakis, A.M., Taghdisi, S.M. (2016). Anticancer effects of co-administration of daunorubicin and resveratrol in MOLT-4, U266 B1 and RAJI cell lines. *Farmacia.* 64, 36-42.

Hashim, N.H.N., Abas, F., Shaari, K., Lajis, N.H. (2012). LC–DAD–ESIMS/MS characterization of antioxidant and anticholinesterase constituents present in the active fraction from *Persicaria hydropiper*. LWT-Food Sci Technol. 46, 468-476.

Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int. J. Antimicrob. Agents. 35, 322-32.

Hu, B., An, H.M., Shen, K.P., Song, H.Y., Deng, S. (2012). *Polygonum cuspidatum* extract induces anoikis in hepatocarcinoma cells associated with generation of reactive oxygen species and down regulation of focal adhesion kinase. Evid-Based Compl Alt. 1-9.

Huang, F., Wu, X.N., Chen, J.I.E., Wang, W.X., Lu, Z.F. (2014). Resveratrol reverses multidrug resistance in human breast cancer doxorubicin-resistant cells. Exp Ther Med. 7, 1611-1616.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Xing, J., Corke, H., Sun, M. (2008). Comparative analysis of bioactivities of four *Polygonum* species. Planta Med. 74, 43-49.

Hughes, J.M., Wilson, M.E., Johnson, K.E., Thorpe, C.M., Sears, C.L. (2006). The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin—producing *Escherichia coli*. Clin. Infect. Dis. 43, 1587-1595.

Huq, A.K.M., Jamal, J.A., Stanslas, J. (2014). Ethnobotanical, phytochemical, pharmacological, and toxicological aspects of *Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre. Evid Based Complement Alternat Med. 2014.

Hussain, F., Ahmad, B., Hameed, I., Dastagir, G., Sanaullah, P., Azam, S. (2010). Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of polygonaceae. Afr. J. Biotechnol. 9, 5032-5036.

Hybertson, B.M., Gao, B., Bose, S.K., McCord, J.M. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. Mol. Aspects Med. 32, 234-246.

Ichihara, S., Yamada, Y., Kawai, Y., Osawa, T., Furuhashi, K., Duan, Z., Ichihara, G., 2007. Roles of oxidative stress and Akt signaling in doxorubicin cardiotoxicity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 359, 27-33.

Intisar, A., Zhang, L., Luo, H., Kiazolu, J.B., Zhang, R., Zhang, W. (2013). Anticancer constituents and cytotoxic activity of methanol-water extract of *Polygonum bistorta* L. Afr J Tradit Complement Altern Med. 10, 53-59.

Ismail, H. F., Hashim, Z., Soon, W. T., Ab Rahman, N. S., Zainudin, A. N., Majid, F. A. A. (2017). Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. J Tradit Complement Med. 7, 452-465.

Jarić, S., Kostić, O., Mataruga, Z., Pavlović, D., Pavlović, M., Mitrović, M. Pavlović, P. (2018). Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe). J. ethnopharmacol. 211, 311-32.

Jennison, A.V., Verma, N.K. (2004). Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Microbiol Rev. 28, 43-58.

Joensen, K.G., Tetzschner, A.M., Iguchi, A., Aarestrup, F.M., Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. J. Clin. Microbiol. 53, 2410-2426.

- Kalia, V.C., Kumar, P., Pandian, S.T., Sharma, P. (2015). Biofouling control by quorum quenching. In *Springer handbook of marine biotechnology* (pp. 431-440). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levonen, A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biol.* 1, 45-49.
- Karaguler, T., Kahraman, H., Tuter, M. (2017). Analyzing effects of ELF electromagnetic fields on removing bacterial biofilm. *Biocybern Biomed Eng.* 37, 336-340.
- Karlowisky, J.A., Hoban, D.J., Zhanel, G.G., Goldstein, B.P. (2006). *In vitro* interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27, 174-177.
- Kayaoglu, G., Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15, 308-320.
- Khalid, A., Waseem, A., Saadullah, M., Khiljee, S., Sethi, A., Asad, M.H.H.B., Rasool, F., Waqas, M.K., Murtaza, G. (2011). Antibacterial activity analysis of extracts of various plants against gram-positive and-negative bacteria. *Afr J Pharm Pharmacol*, 5, 887-893.
- Kordbacheh, H., Eftekhari, F., Ebrahimi, S. N. (2017). Anti-quorum sensing activity of *Pistacia atlantica* against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and identification of its bioactive compounds. *Microb. Pathog.* 110, 390-398.
- Kubínová, R., POŘÍZKOVÁ, R., BARTL, T., Navrátilová, A., CÍŽEK, A., Valentová, M. (2014). Biological activities of polyphenols from *Polygonum lapathifolium*. *Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát.* 13.
- Kulakkattolickal, A.T. (1989). Piscicidal plants of Nepal: ripe fruit of *Catunaregam spinosa* (Thunb.) (Rubiaceae) and leaves of *Polygonum hydropiper* L. (Polygonaceae) as fish poisons. *Aquaculture.* 78, 293-301.
- Lajter, I., Zupkó, I., Molnár, J., Jakab, G., Balogh, L., Vasas, A., Hohmann, J. (2013). Antiproliferative activity of Polygonaceae species from the Carpathian Basin against human cancer cell lines. *Phytother Res.* 27, 77-85.
- Latifa, B., Uddin, M.J., Sushanta, S.M., Jhani, R. (2013). Phytochemical screening, anthelmintic and antiemetic activities of *Polygonum lapathifolium* flower extract. *Euro J Med Plants*, 3, 333-344.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomed. Pharmacother.* 56, 296-301.
- Lebowitz, P.F. i Prendergast, G.C. (1998). Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. *Oncogene*, 17, 1439.
- Lee, B.H., Huang, Y.Y., Wu, S.C. (2011). Hepatoprotective activity of fresh *Polygonum multiflorum* against Hep G2 hepatocarcinoma cell proliferation. *J Food Drug Anal* 19, 1.
- Lee, Y.J., Lee, D.M., Lee, S.H. (2015). Nrf2 expression and apoptosis in quercetin-treated malignant mesothelioma cells. *Mol. Cells.* 38, 416.
- Leonarduzzi, G., Testa, G., Sottero, B., Gamba, P., Poli, G. (2010). Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. *Curr Med Chem.* 17, 74-95.

- Leonti M, Stafford GI, Dal Cero M, Cabras S, Castellanos ME, Casu L, Weckerle CS. (2017). Reverse ethnopharmacology and drug discovery. *J Ethnopharmacol.* 198, 417-31.
- Lewis, W.H., Elvin-Lewis, M.P. (2003). *Medical botany: plants affecting human health.* John Wiley & Sons.
- Lieschke, G. J., Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353–367.
- Lin, Y.W., Yang, F.J., Chen, C.L., Lee, W.T., Chen, R.S. (2010). Free radical scavenging activity and antiproliferative potential of *Polygonum cuspidatum* root extracts. *J Nat Med.* 64, 146-152.
- Liu, G.Y., Nizet, V. (2009). Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *TIM.* 17, 406-413.
- Liu, M., Wu, X., Li, J., Liu, L., Zhang, R., Shao, D., Du, X. (2017). The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the ica operon. *Food Control.* 73, 613-618.
- Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J.C., Yu, J. and Nierman, W.C. (2009). Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Med Mycol.* 47, S88-S96.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J. Food Sci.* 76, M398-M403.
- Lucchetti, L., Zitti, S., Taffetani, F. (2019). Ethnobotanical uses in the Ancona district (Marche region, Central Italy). *J Ethnobiol Ethnomed.* 15, 9.
- Lugton, I.W., Woolacott, J., (2014). Liver necrosis and photosensitisation in cattle after eating *Persicaria lapathifolia* (pale knotweed) and *Persicaria orientalis* (Prince's feather). *Aust Vet J.* 92, 62-64.
- Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., Domingues, F. (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling.* 30, 69-79.
- Ma, C.M., Kully, M., Khan, J.K., Hattori, M., Daneshtalab, M. (2007). Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6830-6833.
- Ma, J.N., Ma, C.M. (2015). Antifungal Inhibitory Activities of Caffeic and Quinic Acid Derivatives. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 635-641). Academic Press.
- MacRae, C. A., Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 721-731.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. and Stahl, D.A., 2015. *Brock biology of microorganisms*, 14th edn. US.
- Mahmood, T., Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am. J. Med. Sci.* 429–434.
- Manning, L. (2017). Categorizing food-related illness: Have we got it right? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57, 1938-1949.
- Massai, F., Imperi, F., Quattrucci, S., Zennaro, E., Visca, P., & Leoni, L. (2011). A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoylhomoserine lactone quorum sensing signal. *Biosens Bioelectron.* 26, 3444-3449.

- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603.
- Mbaveng, A.T., Zhao, Q., Kuete, V. (2014). Harmful and protective effects of phenolic compounds from African medicinal plants. In *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* (pp. 577-609). Elsevier.
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., Pesci, E.C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 2702-2708.
- Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E., Couladis, M. (2010). Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules.* 15, 2759-2770.
- Mitić-Ćulafić, D., Nikolić, B., Simin, N., Jasnić, N., Četojević-Simin, D., Krstić, M., Knežević-Vukčević, J. (2016). Effect of *Allium flavum* L. and *Allium melanantherum* Panč. Extracts on oxidative DNA damage and antioxidative enzymes superoxide dismutase and catalase. *Plant Food Hum Nutr.* 71, 28-34.
- Moore, C. 2009. Introduction to Western Blotting. MorphoSys, UK.
- Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 7, 39.
- Morić, I., Savić, M., Ilić-Tomić, T., Vojnović, S., Bajkić, S., Vasiljević, B. (2010). rRNA Methyltransferases and their role in resistance to antibiotics. *J Med Biochem.* 29, 165-174.
- Muhammed, M., Carneiro, H., Coleman, J., Mylonakis, E. (2011). The challenge of managing fusariosis. *Virulence.* 2, 91-96.
- Munir, N., Ijaz, W., Altaf, I., Naz, S. (2014). Evaluation of antifungal and antioxidant potential of two medicinal plants: *Aconitum heterophyllum* and *Polygonum bistorta*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 4, S639-S643.
- Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Sillanpää, J., Garsin, D.A., Höök, M., Erlandsen, S.L., Murray, B.E. (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* 116, 2799-2807.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R. (2013). Quorum sensing and phytochemicals. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12607-12619.
- Nikolaeva, G.G., Lavrent'Eva, M.V., Nikolaeva, I.G. (2009). Phenolic compounds from several *Polygonum* species. *Chem. Nat. Compd.* 45, 735-736.
- Nkuété, AH., Migliolo, L., Wabo, HK., Tane, P., Franco, OL. (2015) Evaluation of Multiple Functions of *Polygonum* Genus Compounds. *Euro J Med Plants.* 6, 1-16.
- Nøhr-Meldgaard, K., Ovsepian, A., Ingmer, H., Vestergaard, M. (2018) Resveratrol enhances the efficacy of aminoglycosides against *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob.* 52, 390-396.
- Odds, F.C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 1-1.
- OECD guidelines for the testing of chemicals (2013). Fish embryo acute toxicity (FET) test. No. 236, O.P.

- Ojha, S., Al Taei, H., Goyal, S., Mahajan, U.B., Patil, C.R., Arya, D.S., Rajesh, M. (2016). Cardioprotective potentials of plant-derived small molecules against doxorubicin associated cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev.* 2016.
- Omar, H.E.M. (2013). Mycotoxins-induced oxidative stress and disease. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries.* Rijeka, Croatia: InTech, pp.63-92.
- Özbay, H., Alim, A. (2009). Antimicrobial activity of some water plants from the northeastern Anatolian region of Turkey. *Molecules.* 14, 321-328.
- Özçelik, B., Kartal, M., Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.* 49, 396-402.
- Özen, T. (2010). Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. *Grasas aceites,* 61, 86-94.
- Palaksha, M.N., Ahmed, M., Das, S. (2010). Antibacterial activity of garlic extract on streptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* solely and in synergism with streptomycin. *J Nat Sc Biol Med.* 1, 12.
- Pantelić, M., Popović, M., Ilić, M. (2014). Atropine: Drug for peri-arrest arrhythmias. *ABC čas urg med.* 14, 31-36.
- Park, S. H., Kim, H. J., Yim, S. H., Kim, A. R., Tyagi, N., Shen, H., Kim, K.K., Shin, B. A., Jung, D. W., Williams, D. R. (2014). Delineation of the role of glycosylation in the cytotoxic properties of quercetin using novel assays in living vertebrates. *J. Nat. Prod.* 77, 2389-2396.
- Pavić, A., Glišić, B. Đ., Vojnović, S., Warzajtis, B., Savić, N. D., Antić, M., Radenković, S., Janjić, G.V., Nikodinovic-Runić, J., Rychlewska, U., Djuran, M. I. (2017). Mononuclear gold (III) complexes with phenanthroline ligands as efficient inhibitors of angiogenesis: A comparative study with auranofin and sunitinib. *J. Inorg. Biochem.* 174, 156-168.
- Pavić, A., Mitić-Ćulafić, D., Jasnić, N., Nikolić, B., Simin, N., Vasiljević, B., Knežević-Vukčević, J. (2019). Wild edible onions-*Allium flavum* and *Allium carinatum*-successfully prevent adverse effects of chemotherapeutic drug doxorubicin. *Biomed. Pharmacother.* 109, 2482-2491.
- Pearson, J.P., Van Delden, C., Iglewski, B.H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181, 1203-1210.
- Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods.* 72, 157-65.
- Pinmai, K., Chunlaratthanabhorn, S., Ngamkitidechakul, C., Soonthornchareon, N., Hahnvajanawong, C. (2008). Synergistic growth inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* and *Terminalia bellerica* extracts with conventional cytotoxic agents: doxorubicin and cisplatin against human hepatocellular carcinoma and lung cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 14, 1491.
- Plyuta, V., Zaitseva, J., Lobakova, E., Zagorskina, N., Kuznetsov, A., Khmel, I. (2013). Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 121, 1073-1081.
- Prota, N., Mumm, R., Bouwmeester, H. J., Jongsma, M. A. (2014). Comparison of the chemical composition of three species of smartweed (genus *Persicaria*) with a focus on drimane sesquiterpenoids. *Phytochemistry.* 108, 129-136.

- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Bailleul, F., Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol.* 72, 35-42.
- Raghunath, A., Sundarraj, K., Arfuso, F., Sethi, G., Perumal, E. (2018). Dysregulation of Nrf2 in hepatocellular carcinoma: Role in cancer progression and chemoresistance. *Cancers.* 10, 48.
- Rai, G., Mishra, S., Suman, S., Shukla, Y. (2016). Resveratrol improves the anticancer effects of doxorubicin *in vitro* and *in vivo* models: A mechanistic insight. *Phytomedicine.* 23, 233-242.
- Rai, M., Kon, K. eds., (2013). Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. Academic Press.
- Raja, S., Ramya, I.A. (2017). Comprehensive review on *Polygonum glabrum*. *Ijop.* 8, 457-67.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res.* 52, 507-526.
- Ravipati, A.S., Zhang, L., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, N., Bartlett, J., Smith, P.T., de Pedro, N., Melguizo, Á., Cantizani, J., Asensio, F. (2013). Anti-proliferative activities of selected Chinese medicinal herbs against human cancer cell lines. *Phytopharmacology.* 4, 206-219.
- Rodrigues, M.J., Matkowski, A., Ślusarczyk, S., Magné, C., Poleze, T., Pereira, C., Custódio, L. (2019). Sea knotgrass (*Polygonum maritimum* L.) as a potential source of innovative industrial products for skincare applications. *Ind Crops Prod.* 128, 391-398.
- Rodrigues, M.J., Slusarczyk, S., Pecio, Ł., Matkowski, A., Salmas, R.E., Durdagi, S., Pereira, C., Varela, J., Barreira, L., Custódio, L. (2018). *In vitro* and *in silico* approaches to appraise *Polygonum maritimum* L. as a source of innovative products with anti-ageing potential. *Ind Crops Prod.* 111, 391-399.
- Romagnolo, D.F., Selmin, O.I. (2012). Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr.* 31, 206-238.
- Salama, H.M., Marraiki, N. (2010). Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L.(Polygonaceae), naturally growing in Egypt. *Saudi J Biol Sci.* 17, 57-63.
- Salhi, N., Bouyahya, A., Fettach, S., Zellou, A., Cherrah, Y. (2019). Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of skin burns in occidental Morocco (area of Rabat). *S. Afr. J. Bot.* 121, 128-142.
- Sanchez, A., Schuster, T.M., Burke, J.M., Kron, K.A. (2011). Taxonomy of Polygonoideae (Polygonaceae): a new tribal classification. *Taxon.* 60, 151-160.
- Sandasi, M., Leonard, CM., Van Vuuren, SF., Viljoen, AM. (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms *in vitro*. *S. Afr. J. Bot.* 77, 80-5.
- Santomauro, F., Sacco, C., Donato, R., Bellumori, M., Innocenti, M., Mulinacci, N. (2018). The antimicrobial effects of three phenolic extracts from *Rosmarinus officinalis* L., *Vitis vinifera* L. and *Polygonum cuspidatum* L. on food pathogens. *Nat Prod Res.* 32, 2639-2645.
- Sardari, S., Amin, G., Micetich, R.G. and Daneshtalab, M., 1998. Phytopharmaceuticals. Part 1. Antifungal activity of selected Iranian and Canadian plants. *Pharm. Biol.* 36, 180-188.

Satish, S., Mohana, D., Raghavendra, M., Babu, S., Raveesha, K.A. (2009). Antibacterial evaluation of some Iranian medicinal plants against some human pathogenic bacteria. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci.* 11, 735-738.

Schleifer, K.H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* 32, 533-542.

Schuster, M., Greenberg, E.P. (2006). A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 73-81.

Schütz, C., Empting, M. (2018). Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein J. Org. Chem.* 14, 2627-2645.

Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M. (2014). Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *J Ethnopharmacol.* 154, 481-536.

Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., Mučaji, P. (2016). Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules.* 21, 1717.

Smit, N., Vicanova, J., Pavel, S. (2009). The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 5326-5349.

Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 2. Williams & Wilkins.

Song, J.H., Yang, T.C., Chang, K.W., Han, S.K., Yi, H.K., Jeon, J.G. (2007). *In vitro* effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mutans streptococci. *J Ethnopharmacol.* 112, 419-425.

Srdić Rajić, T., Nikolić, K., Cavić, M., Djokić, I., Gemović, B., Perović, V., Veljković, N. (2016). Rilmenidine suppresses proliferation and promotes apoptosis via the mitochondrial pathway in human leukemic K562 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 81, 172-180.

Stark, G.R., Taylor, W.R., (2004). Analyzing the G2/M checkpoint, in: Schönthal A.H, (Eds.), *Methods in Molecular Biology™ Vol 1, Checkpoint Controls and Cancer; Reviews and Model Systems*. Humana Press., Totowa, New Jersey, pp. 51-82.

Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić- Marković, J., Petrović, S. (2013). *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p- coumaric acid and rutin, using food systems. *J Sci Food Agr.* 93, 3205-3208.

Suárez-Quiroz, M.L., Campos, A.A., Alfaro, G.V., González-Ríos, O., Villeneuve, P., Figueroa-Espinoza, M.C. (2013). Anti-Aspergillus activity of green coffee 5-*O*-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters. *Microb. Pathog.* 61, 51-56.

Svirčev, E. (2014). Ispitivanja odabranih predstavnika podfamilije Polygonoideae (Polygonaceae AL de Jussieu 1789) sa područja centralnog i zapadnog Balkana. Fitohemijski i biohemijski aspekti. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.

Svirčev, E., Simin, N., Orčić, D., Bekvalac, K., Francisković, M., Sibul, F., Mimica-Dukić, N. (2014). *Persicaria maculosa* SF Gray 1821—Comparative analysis of herb and root extracts: Chemical composition and antioxidant activity. *Planta Med.* 80, P2P33.

- Sweeney, M.J., Dobson, A.D. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 141-158.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., Nakonieczna, J. (2012) Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Biomed Res. Int.* 23, 2013.
- Tekaia, F., Latgé, J.P. (2005). *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 385-392.
- Tewari, D., Rawat, P., Singh, P. K. (2019). Adverse drug reactions of anticancer drugs derived from natural sources. *Food Chem. Toxicol.* 123, 522-535.
- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 62, 5196-5203.
- Tong, N., Zhang, J.I.E., Chen, Y., Li, Z., Luo, Y., Zuo, H.U.A., Zhao, X. (2012). Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of doxorubicin *in vitro*. *Oncol Lett.* 3, 1263-1267.
- Tsang, W.P., Chau, S.P., Kong, S.K., Fung, K.P., Kwok, T.T. (2003). Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci.* 73, 2047-2058.
- Tucakov, J. (2014). *Lečenje biljem*, Vulkan izdavaštvo d.o.o. ISBN 978-86-10-01124-1
- Ullah, M.F., Khan, H.Y., Zubair, H., Shamim, U., Hadi, S.M. (2011). The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67, 103-110.
- Uroz, S., Dessaux, Y., Oger, P. (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *ChemBioChem.* 10, 205-216.
- Van Delden, C., Iglewski, B.H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infect. Dis.* 4, 551.
- Van der Ent, W., Burrello, C., de Lange, M.J., van der Velden, P.A., Jochemsen, A.G., Jager, M.J., Snaar-Jagalska, B.E. (2015). Embryonic zebrafish: different phenotypes after injection of human uveal melanoma cells. *Ocul Oncol Pathol.* 1, 170-181.
- Vasavi, H.S., Sudeep, H.V., Lingaraju, H.B., Prasad, K.S. (2017). Bioavailability-enhanced Resveramax™ modulates quorum sensing and inhibits biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microb. Pathog.* 104, 64-71.
- Vasiljević, B., Knežević-Vukčević, J., Mitić-Ćulafić, D., Orčić, D., Francišković, M., Srdić-Rajić, T., Jovanović, M., Nikolić, B. (2018). Chemical characterization, antioxidant, genotoxic and *in vitro* cytotoxic activity assessment of *Juniperus communis* var. *saxatilis*. *Food Chem. Toxicol.* 112, 118-125.
- Vasiljević, B., Mitić-Ćulafić, D., Djekic, I., Marković, T., Knežević-Vukčević, J., Tomasevic, I., Velebit, B., Nikolić, B. (2019). Antibacterial effect of *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* *in vitro* and in wine marinated beef. *Food control.* 100, 247-256.
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 274-291.

- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferat.* 36, 131-149.
- Vincent, R. (1997). Drugs in modern resuscitation. *Br. J. Anaesth.* 79, 188-197.
- Vnukov, V.V., Gutsenko, O.I., Milyutina, N.P., Kornienko, I.V., Ananyan, A.A., Plotnikov, A.A., Panina, S.B. (2017). SkQ1 regulates expression of Nrf2, ARE-controlled genes encoding antioxidant enzymes, and their activity in cerebral cortex under oxidative stress. *Biochem (Mosc).* 82, 942-952.
- Voelker, D., Vess, C., Tillmann, M., Nagel, R., Otto, G.W., Geisler, R., Schirmer, K., Scholz, S. (2007). Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* 81, 355-364.
- Voronkova, M.S., Vysochina, G.I. (2014). Bistorta Scop. Genus (Polygonaceae): Chemical Composition and Biological Activity. *Chemistry for Sustainable Development.* 22, 207-212.
- Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S., Dong, Q. (2012). Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *PloS one*, 7, 51764.
- Watkins, III, J.B., Klaassen, C.D. (1986). Xenobiotic biotransformation in livestock: comparison to other species commonly used in toxicity testing. *J. Animal Sci.* 63, 933-942.
- Weaver, B.A. (2014) How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 25, 2677-2681.
- Welsh, M. A., Eibergen, N. R., Moore, J. D., Blackwell, H. E. (2015). Small molecule disruption of quorum sensing cross-regulation in *Pseudomonas aeruginosa* causes major and unexpected alterations to virulence phenotypes. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 1510-1519.
- Wilder, C.N., Diggle, S.P., Schuster, M. (2011). Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the las, rhl and pqs quorum-sensing systems. *The ISME journal*, 5, 1332.
- Xin, Y.F., Wan, L.L., Peng, J.L., Guo, C. (2011). Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by *Lyciumbarbarum* polysaccharides through the suppression of oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* 49, 259-264.
- Yang, J.B., Li, W.F., Liu, Y., Wang, Q., Cheng, X.L., Wei, F., Wang, A.G., Jin, H.T., Ma, S.C. (2018). Acute toxicity screening of different extractions, components and constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. on zebrafish (*Danio rerio*) embryos *in vivo*. *Biomed. Pharmacother.* 99, 205-213.
- Yeo, S.S.M., Tham, F.Y. (2012). Anti-quorum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Malays J Microbiol.* 8, 11-20.
- Youngchim, S., Morris-Jones, R., Hay, R.J., Hamilton, A.J. (2004). Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* 53, 175-181.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules.* 21, 559.
- Zabka, M., Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere.* 93, 1051-1056.
- Zabka, M., Pavela, R., Gabrielova- Slezakova, L. (2011). Promising antifungal effect of some Euro- Asiatic plants against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *J Sci Food Agric.* 91, 492 - 497.

LITERATURA

Zarco, M.F., Vess, T.J., Ginsburg, G.S. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis.* 18,109-120.

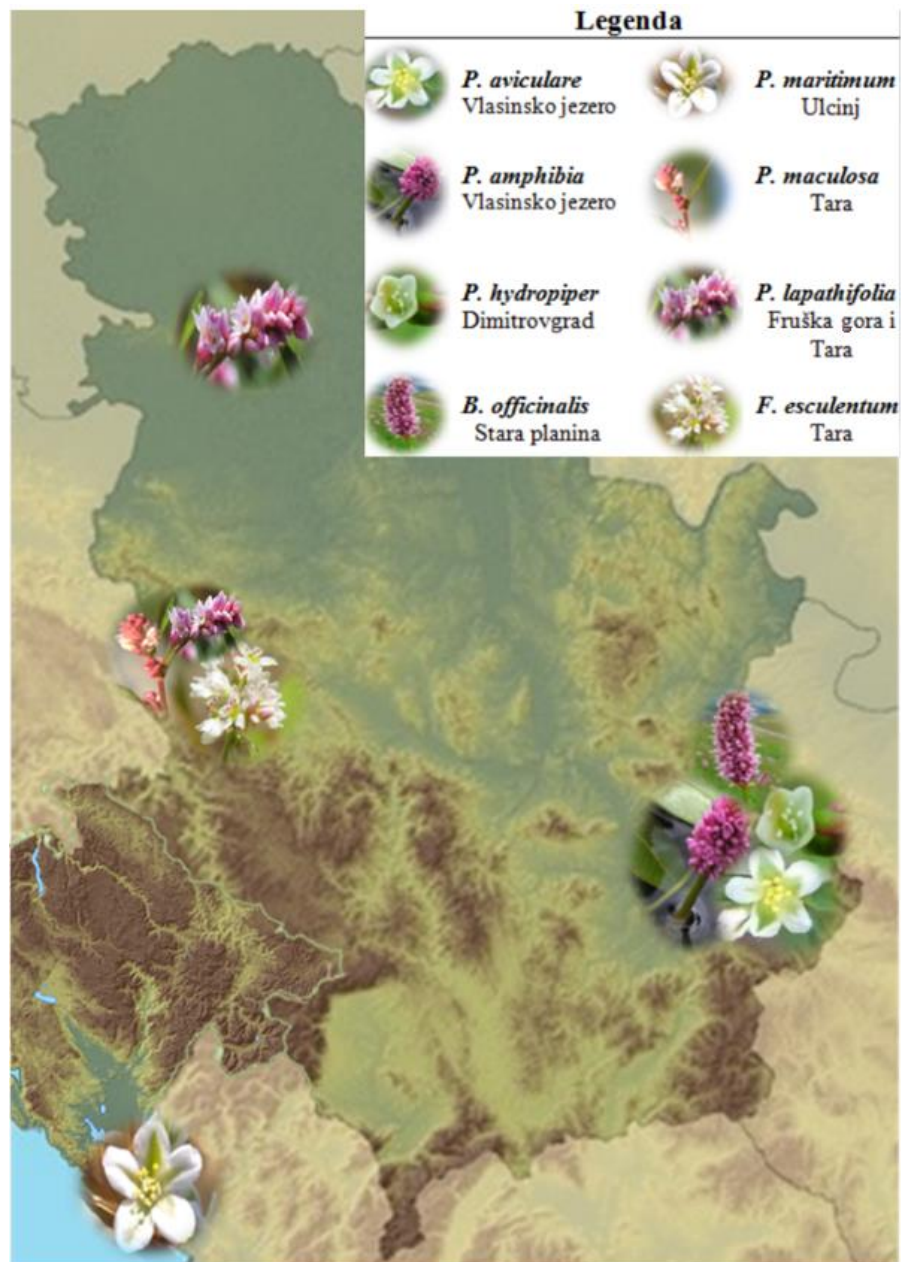
Zhang, D.D. (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* 38, 769-789.

Zhu, A.X. (2006). Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should we be? *Oncologist.* 11, 790-800.

Zhu, J., Wang, H., Chen, F., Fu, J., Xu, Y., Hou, Y., Kou, H.H., Zhai, C., Nelson, M.B., Zhang, Q., Andersen, M.E. (2016). An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 99, 544-556.

8. PRILOG

8.1. PRILOG 1. Podaci o biljnom materijalu, ekstrakciji i hemijskoj karakterizaciji ekstrakata



Slika 41. Mapa lokaliteta prikupljanja biljnih uzoraka.

Tabela 20. Podaci o sakupljenom biljnom materijalu istraživanih vrsta

Biljna vrsta		Oznaka ekstrakta	Lokalitet	Stanište	Broj vaučera	Datum	Legator
<i>Polygonum aviculare</i>	rizom herba	POAr POAh	Vlasinsko jezero	ispred brane	2-1669	2009.	Goran Anačkov, Jelena Jovin, Emilija Svirčev
<i>Polygonum maritimum</i>	herba	POMh	Crna Gora Ulcinj	plaža	2-1670	2009.	Goran Anačkov
<i>Persicaria amphibia</i>	herba	POAh	Vlasinsko jezero	sartoriija	2-1691	2009.	Emilija Svirčev
<i>Persicaria maculosa</i>	herba	PEMh	Tara	ergela	2-1689	2010.	Dejan Orčić, Biljana Božin
<i>Bistorta officinalis</i>	herba rizom	BIOh BIOr	Stara planina	put ka Midžoru	2-1674	2011.	Neda Mimica-Dukić, Kristina Balog, Emilija Svirčev
<i>Persicaria hydropiper</i>	herba rizom	PEHh PEHr	Dimitrovgrad	kanjon Jerme, ispred restorana Poganovski manastir	2-1682	2011.	Biljana Božin, Emilija Svirčev
<i>Persicaria lapathifolia</i>	herba rizom	PELh PELr	Fruška gora		2-1687		Dejan Orčić, Marina Francišković
<i>Fagopyrum esculentum</i>	herba	FAEh	Tara	rasadnik	2-1692	2010.	

*Po jedan primerak biljnog materijala sa svakog lokaliteta, ostavljen je u herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju (BUNS Herbarium) Prirodno-matematičnog fakulteta u Novom Sadu. Identifikaciju biljnog materijala izvršio je dr Goran Anačkov (Svirčev, 2014).

Tabela 21. Hemijski sastav odabranih ekstrakata podfamilije Polygonoideae¹

Komponente [mg/g SO]*	<i>P. aviculare</i> (POAh)	<i>P. aviculare</i> (POAr)	<i>P. maritimum</i> (POMh)	<i>P. amphibia</i> (PEAh)	<i>P. maculosa</i> (PEMh)	<i>P. lapathifolia</i> (PELh)
Hinska kiselina	8,72 ± 0,87	0,92±0,09	0,77 ± 0,08	0,88 ±0,09	12,8±1,28	1,17±0,12
Galna kiselina	0,95 ± 0,09	1,23±0,11	5,54±0,50	3,49±0,31	2,47±0,22	1,40±0,13
Protokatehinska kiselina	0,23 ± 0,02	0,07±0,01	0,08±0,01	0,19±0,01	0,21±0,02	0,06±0,01
2,5-dihidroksibenzoeva kiselina	0,03 ± 0,00	0,02±0,00	Nd	0,003±0,00	0,01±0,00	Nd
Hlorogenska kiselina	0,69 ± 0,03	0,03±0,00	0,03±0,00	0,01±0,00	6,41±0,32	1,73±0,09
Epigalokatehin galat	0,15 ± 0,04	0,10±0,03	3,73±1,12	1,28±0,38	0,30±0,09	0,23±0,07
<i>p</i> -hidroksi-benzoeva kiselina	0,03 ± 0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00
Kafena kiselina	0,02 ± 0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,06±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00
Vanilinska kiselina	0,03 ±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	Nd	0,03±0,01
Siringinska kiselina	0,15 ±0,03	0,16±0,03	0,11±0,02	0,11±0,02	0,01±0,00	0,02±0,00
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,05 ±0,01	0,01±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,06±0,01	0,03±0,00
Ferulna kiselina	0,03±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,05±0,01	0,05±0,01	0,02±0,00
Sinapinska kiselina	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,04±0,00	Nd	0,01±0,00
Katehin	0,70±0,07	8,99±0,90	2,63±0,27	0,65±0,07	0,19±0,02	0,04±0,00
Epikatehin	0,09±0,01	0,13±0,01	0,06±0,01	0,23±0,02	0,15±0,02	0,04±0,00
Viteksin	Nd	Nd	Nd	Nd	0,03±0,00	0,02±0,00
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	Nd	Nd	Nd	Nd	0,14±0,00	0,07±0,00
Hiperozid	3,02±0,18	0,02±0,00	0,97±0,06	11,90±0,71	4,93±0,30	0,32±0,02
Rutin	0,26±0,01	0,02±0,00	ND	0,21±0,01	2,65±0,08	0,51±0,02
Kvercetin-3-<i>O</i>-glukozid	1,38±0,04	0,04±0,00	0,48±0,01	1,49±0,04	11,71±0,35	1,34±0,04
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	Nd	Nd	Nd	Nd	0,22±0,01	0,07±0,00
Miricetin	0,11±0,00	0,02±0,00	0,17±0,05	0,86±0,00	0,02±0,01	Nd
Kvercitrin	0,16±0,01	Nd	0,07±0,00	9,79±0,59	2,10±0,13	0,93±0,06
Kempferol-3-<i>O</i>-glukozid	1,33±0,05	Nd	0,11±0,01	0,03±0,00	1,44±0,06	0,33±0,01
Kvercetin	0,40±0,12	0,02±0,00	0,19±0,06	5,50±1,65	0,27±0,08	0,09±0,03
Naringenin	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,08±0,01	0,03±0,00
Luteolin	0,01±0,00	Nd	Nd	0,01±0,00	0,13±0,01	0,06±0,00
Apigenin	0,09±0,01	0,01±0,00	Nd	0,04±0,00	0,56±0,04	0,01±0,00
Kemferol	0,12±0,01	Nd	0,01±0,00	0,13±0,01	0,06±0,00	0,02±0,00
Eskuletin	0,01±0,00	Nd	Nd	0,01±0,00	0,11±0,01	Nd

¹Ni kod jednog ekstrakta nisu detektovane sledeća antrahinonska jedinjenja: emodin, aloe-emodin i hrizofanol;

*Drugi naziv hlorogenske kiseline je 5-*O*-kafeoil-hinska kiselina.

Tabela 22. Hemijski sastav odabranih ekstrakata podfamilije Polygonoideae¹

Komponente [mg/g SO]*	<i>P. lapathifolia</i> (PELr)	<i>P. hydropiper</i> (PEHh)	<i>P. hydropiper</i> (PEHr)	<i>B. officinalis</i> (BIOh)	<i>B. officinalis</i> (BIOr)	<i>F. esculentum</i> (FAEh)
Hinska kiselina	0,09±0,009	5,60±0,56	0,61±0,06	1,71±0,17	1,14±0,11	9,66±0,97
Galna kiselina	1,06±0,095	1,95±0,18	2,98±0,27	0,03±0,00	0,97±1,69	0,17±0,02
Protokatehinska kiselina	0,03±0,002	0,08±0,01	0,11±0,01	0,06±0,01	0,01±0,00	0,54±0,05
2,5-dihidroksibenzoeva kiselina	Nd	0,01±0,00	Nd	0,02±0,00	Nd	Nd
Hlorogenska kiselina	Nd	0,01±0,00	Nd	0,02±0,00	33,89±1,69	8,32±0,42
Epigalokatehin galat	0,27±0,08	0,10±0,03	0,20±0,06	Nd	Nd	Nd
p-hidroksi-benzoeva kiselina	0,01±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,08±0,01	Nd	0,04±0,00
Kafena kiselina	Nd	0,01±0,00	0,01±0,00	0,36±0,03	0,02±0,00	0,06±0,00
Vanilinska kiselina	Nd	Nd	0,07±0,02	0,06±0,02	Nd	0,03±0,01
Siringinska kiselina	0,02±0,01	0,01±0,00	0,10±0,02	0,01±0,00	Nd	0,01±0,00
p-Kumarinska kiselina	0,01±0,00	0,03±0,00	0,05±0,00	0,09±0,01	Nd	0,07±0,01
Ferulna kiselina	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,09±0,01	Nd	0,03±0,00
Sinapinska kiselina	Nd	Nd	0,02±0,00	Nd	Nd	Nd
Katehin	Nd	0,22±0,02	0,34±0,03	Nd	14,92±1,49	0,18±0,02
Epikatehin	0,13±0,01	0,03±0,00	0,29±0,03	Nd	1,67±0,17	0,87±0,09
Viteksin	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,37±0,02
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	Nd	0,01±0,00	0,01±0,00	Nd	Nd	Nd
Hiperozid	0,01±0,00	2,70±0,16	0,18±0,01	2,24±0,13	Nd	1,87±0,11
Rutin	0,12±0,00	0,01±0,00	Nd	5,01±0,15	Nd	119,95±3,60
Kvercetin-3-<i>O</i>-glukozid	0,07±0,00	10,11±0,30	0,09±0,0	Nd	Nd	2,96±0,09
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Miricetin	Nd	0,37±0,11	Nd	Nd	Nd	Nd
Kvercitrin	Nd	3,62±0,22	Nd	Nd	Nd	25,97±1,56
Kempferol-3-<i>O</i>-glukozid	0,01±0,00	1,22±0,05	0,01±0,00	Nd	Nd	0,02±0,00
Kvercetin	0,01±0,00	0,26±0,08	0,03±0,01	0,03±0,01	0,01±0,00	1,52±0,46
Naringenin	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Luteolin	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,01±0,00
Apigenin	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Kemferol	Nd	0,04±0,00	Nd	Nd	Nd	0,02±0,00
Eskuletin	Nd	Nd	Nd	0,02±0,00	Nd	0,01±0,00

¹Ni kod jednog ekstrakta nisu detektovane sledeća antrahinonska jedinjenja: emodin, aloe-emodin i hrizofanol;*Drugi naziv hlorogenske kiseline je 5-*O*-kafeoil-hinska kiselina.

Opis ekstrakcije

Osušeni i usitnjeni biljni materijal (5-15g) je ekstrahovan sa 80% etanolom (sa odnosom biljni materijal: rastvarač – 1:10), u toku 72 h, na sobnoj temperaturi uz mućkanje; nakon čega je dobijeni macerat ceđen kroz filter papir. Dobijeni ekstrakti su uparivani do suva u vakum uparivaču (<45°C). Ekstrakti su pripremani iz nadzemnog dela biljke (herba) i iz rizoma. Sirovi ekstrakti herbi su prečišćeni tečno-tečnom ekstrakcijom sa petroletrom radi uklanjanja balastnih masnih kiselina i hlorofila. Potom je rađena dodatna reekstrakcija metanolom iz petroletarske frakcije. Nakon toga, ekstrakt je uparen do suva i rastvoren u DMSO-u do finalne koncentracije od 200 mg/mL.

8.2. PRILOG 2. Podaci antibiofilm i antivirulentnog efekta

Tabela 23. Procentualne vrednosti dobijene u testu formiranja biofilma nakon tretmana ekstraktima PEMh i BIOR na odabranim sojevima: A) *S. aureus* B) *S. Enteritidis* C) *P. aeruginosa* PAO1.

A)

PEMh 10 µg/mL	PEMh 50 µg/mL	PEMh 100 µg/mL	BIOr 10 µg/mL	BIOr 50 µg/mL	BIOr 100 µg/mL
Y	Y	Y	Y	Y	Y
195.0169	602.1255	690.7913	77.1108	40.96122	37.07202
195.2290	603.4758	688.9255	76.6364	41.23136	37.17126

B)

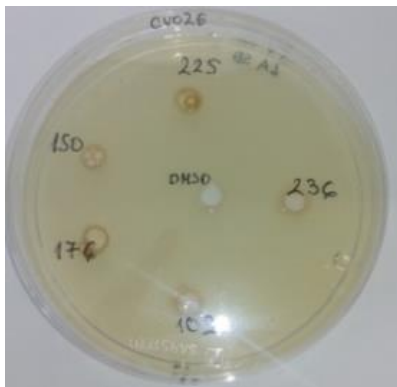
PEMh 10 µg/mL	PEMh 50 µg/mL	PEMh 100 µg/mL	BIOr 10 µg/mL	BIOr 50 µg/mL	BIOr 100 µg/mL
Y	Y	Y	Y	Y	Y
88.96193	89.47881	50.60932	67.70485	45.36629	43.510820
86.02626	86.94223	49.61770	65.80956	44.39809	42.431590

C)

PEMh 10 µg/mL	PEMh 50 µg/mL	PEMh 100 µg/mL	BIOr 10 µg/mL	BIOr 50 µg/mL	BIOr 100 µg/mL
Y	Y	Y	Y	Y	Y
120.9104	53.65398	75.88016	129.5564	57.52134	65.10046
113.3979	54.80974	75.59122	130.0009	55.67656	71.52383
146.4927	61.47760	62.81117	128.2450	53.40950	77.85829
122.4884	63.18901	68.01209	130.1342	50.45341	70.92372
	60.87749	64.30032		53.52063	74.07984
		77.94719		48.98649	65.92283

Tabela 24. Procentualne vrednosti dobijene u testu formiranja biofilma soja *P. aeruginosa* PAO1 nakon tretmana odabranih konstituenata PEMh i BIOR ekstrakta.

KK 10 µg/mL	KK 50 µg/mL	KK 100 µg/mL	GK 10 µg/mL	GK 50 µg/mL	GK 100 µg/mL	HK 10 µg/mL	HK 50 µg/mL	HK 100 µg/mL	Ka 10 µg/mL	Ka 50 µg/mL	Ka 100 µg/mL	K-3-O-Glik 10 µg/mL	K-3-O-Glik 50 µg/mL	K-3-O-Glik 100 µg/mL
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
130.645900	116.882400	125.052200	83.476230	65.513690	87.932980	74.917620	91.450710	88.013720	76.192370	106.954900	112.805400	89.088870	66.675390	86.131080
147.483900	117.643200	123.112300	85.659520	72.770260	102.041500	77.860730	87.975720	75.384540	83.429180	114.867500	119.129500	75.201020	65.849110	77.688960
156.302200	109.773100	108.727700	85.755360	77.736150	100.469600	80.146610	96.209090	82.270580	80.980800	100.760200	118.262800	79.993610	62.421260	73.931790
149.379600	100.823000	113.642700	85.297410	66.233620	91.820500	79.225760	84.831440	76.365540	74.758730	117.498400	100.604800	90.271050	67.460770	79.250610
145.952900	111.280400	108.904100	80.302470	76.803500	97.333560	71.761440	98.514240	80.508600	86.953700	112.192100	111.881500	91.879230	83.724660	
		113.067600	84.098200	71.811450	95.919640	76.782430	91.796240		70.129190	110.454600	129.730000	85.286760	69.226230	
		115.417800							78.740660		115.402300			



Slika 42. Nanošenje uzorka na diskove filter papira u testu produkcije violaceina

Tabela 25. Srednje vrednosti izražene u procentima dobijene prilikom analize uticija PEMh i BIOR ekstrakta na preživljavanje bakterija već formiranih biofilm zajednica: A) preživljavanje bakterija u zrelom biofilmu B) preživljavanje bakterija u suspenziji poreklom iz zrelog biofilma.

A)

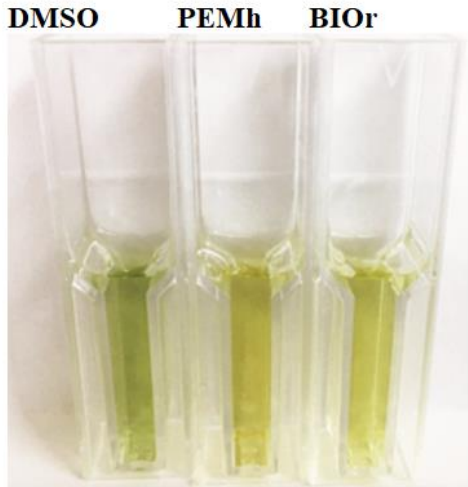
	K	1/32 MIK	1/16 MIK	1/8 MIK	1/4 MIK	1/2 MIK	1 MIK	2 MIK
<i>S. aureus</i>	100.00	0.22	0.44	0.67	0.44	2.00	0.89	0.67
<i>S. Enteritidis</i>	100.00	178.08	120.55	119.18	6.44	11.23	7.40	0.14

B)

	K	1/32 MIK	1/16 MIK	1/8 MIK	1/4 MIK	1/2 MIK	1 MIK	2 MIK
<i>S. aureus</i>	100.00	50.00	48.00	40.00	24.00	23.00	14.00	28.00
<i>S. Enteritidis</i>	100.00	163.00	101.00	139.00	18.60	17.40	5.58	0.02

Tabela 26. Procentualne vrednosti dobijene u testu produkcije piocijanina.

PEMh 10 µg/mL	PEMh 50 µg/mL	PEMh 100 µg/mL	BIOr 10 µg/mL	BIOr 50 µg/mL	BIOr 100 µg/mL
Y	Y	Y	Y	Y	Y
85.765620	55.983690	96.113350	92.053210	53.630330	139.496300
92.179260	62.112500	94.996730	91.079270	40.535500	147.175500
		99.455960			



Slika 43. Produkcija piocijanina.

8.3. PRILOG 3. Podaci praćenja nivoa antioksidativnih enzima i mehanizma genske regulacije

Tabela 27. Vrednosti relativne ekspresije *Nrf2* gena normalizovane u odnosu na β -aktin na ćelijskim linijama A) HepG2 B) A549.

A)

K	D	POAh	PEAh	PEMh	POAD	PEAD	PEMD
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2.487869	1.054123	0.427087	2.470471	0.461640	0.902879	0.316923	0.554373
2.687869	0.610000	0.280000	2.370471	0.220000	0.890000	0.510000	0.350000
2.287869			2.270471				

B)

K	D	POAh	PEAh	PEMh	POAD	PEAD	PEMD
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3.996619	4.122258	4.355787	1.282334	2.814251	5.146419	1.710774	5.468572
3.496619	3.622258	3.855787	1.516286	2.814251	4.646419	1.614144	2.648427
4.496619	4.622258	4.855787	1.792922	4.341690	5.646419	1.522973	3.857874

Tabela 28. Vrednosti relativne ekspresije *Keap1* gena normalizovane u odnosu na β -aktin na odabranim ćelijskim linijama: A) HepG2 B) A549.

A)

K	D	POAh	POAD	PEAD	PEMD
Y	Y	Y	Y	Y	Y
0.011998	1.533099	0.718239	0.080304	0.102549	0.305644
0.019611	0.868140	0.150405	0.089044	0.180966	0.000111

B)

K	PEAh	PEAD
Y	Y	Y
0.084606	16.533710	0.772023
0.054260	14.665000	1.551094
0.041430		4.219419
0.060955		
0.006096		
0.900074		

Tabela 29. Relativne vrednosti aktivnosti antioksidativnih enzima normalizovanih u odnosu na β -aktin na odabranim ćelijskim linijama A) HepG2 B) A549 C) MRC-5 tretiranih pojediničnim ekstraktima i D.

A)

K	SOD1 D	SOD1 POAh	SOD1 POMh	SOD1 PEAh	SOD1 PEMh	SOD2 D	SOD2 POAh	SOD2 POMh	SOD2 PEAh	SOD2 PEMh	KAT D	KAT POAh	KAT POMh	KAT PEAh	KAT PEMh
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
0.922332	0.607049	0.767539	1.810213	0.447170	0.511707	0.481026	0.697398	0.976311	0.309717	0.318235	0.661372	0.796633	1.958643	0.692872	0.593389
1.046322	0.608430	0.876403	1.834428	0.465467	0.509643	0.471152	0.754839	0.959900	0.300528	0.304513	0.653512	0.868485	1.892382	0.695074	0.576760
1.031346	0.600348	0.851823	1.819036	0.464958	0.507467	0.464376	0.730696	0.949294	0.293906	0.296725	0.641584	0.855891	1.916366	0.698622	0.578776
0.990650															
1.019702															
0.989649															
0.931259															
1.029025															
1.039716															
1.014101															
0.992312															
0.993587															
0.944782															
1.006249															
1.048969															
1.072039															
0.953341															
0.974621															

B)

K	SOD1 D	SOD1 POAh	SOD1 PEAh	SOD1 PEMh	SOD2 D	SOD2 POAh	SOD2 PEAh	SOD2 PEMh	KAT D	KAT POAh	KAT PEAh	KAT PEMh
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1.008494	1.319245	1.314654	0.870158	1.085477	1.237907	1.224115	1.013188	0.865691	1.156761	0.855433	0.778277	0.884207
0.973004	1.271497	1.216256	0.716568	0.973104	1.224589	1.199824	0.990636	0.844384	1.066504	0.684261	0.613053	0.712216
1.018502	1.358139	1.138642	0.890505	1.106803	1.327873	1.348567	1.137555	0.968442	1.170205	0.832284	0.736168	0.842998
1.054165												
0.890863												
1.054972												
0.989818												
0.979967												
1.030215												
0.978762												
0.963303												
1.057934												
1.027155												
0.958521												
1.014323												
1.143604												
0.836002												
1.020394												

C)

K	SOD1 D	SOD1 POAh	SOD1 PEAh	SOD1 PEMh	SOD2 D	SOD2 POAh	SOD2 PEAh	SOD2 PEMh	KAT D	KAT POAh	KAT PEAh	KAT PEMh
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1.005200	0.648945	3.605996	1.157705	6.198801	0.577144	3.492693	1.089774	5.266341	0.796042	7.782522	0.975312	11.646180
0.966097	0.644865	3.721728	1.135577	6.631343	0.553806	3.617312	1.039503	5.483513	0.802728	8.264808	0.998899	12.640470
1.028703	0.665164	3.886160	1.198867	6.852844	0.516499	3.452840	1.039037	5.385690	0.776897	8.351882	0.970638	12.927790
1.040035												
0.982644												
0.977321												
1.035236												
0.973042												
0.991722												

Tabela 30. Relativne vrednosti aktivnosti antioksidativnih enzima normalizovanih u odnosu na β -aktin na odabranim ćelijskim linijama A) HepG2 B) A549 C) MRC-5 kotretiranih sa ekstraktima i D.

A)

K	SOD1 POAD	SOD1 PEAD	SOD1 PEMD	SOD2 POAD	SOD2 PEAD	SOD2 PEMD	KAT POAD	KAT PEAD	KAT PEMD
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1.000000	1.686347	1.775280	1.061692	1.121287	1.076756	0.228451	1.172147	1.347207	0.905209
1.010000	1.696347	1.785280	1.071692	1.131287	1.086756	0.238451	1.182147	1.357207	0.915209
0.990000	1.676347	1.765280	1.051692	1.111287	1.066756	0.218451	1.162147	1.337207	0.895209

B)

K	SOD1 POAD	SOD 1 PEAD	SOD 1 PEMD	SOD 2 POAD	SOD 2 PEAD	SOD 2 PEMD	KAT POAD	KAT PEAD	KAT PEMD
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
0.987723	1.774138	1.586130	0.445637	1.835327	1.383311	0.450993	1.293791	0.559414	0.395884
1.012277	1.844254	1.686976	0.473277	2.033024	1.556746	0.479948	1.189227	0.475013	0.391857
0.950393									
1.039209									
1.061543									
0.938457									

C)

K	SOD1 POAD	SOD1 PEAD	SOD1 PEMD	SOD2 POAD	SOD2 PEAD	SOD2 PEMD	KAT POAD	KAT PEAD	KAT PEMD
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1.000000	1.676976	2.892704	2.410752	2.409341	2.550423	3.058821	1.043959	0.972986	0.241202
1.010000	1.686976	2.902704	2.420752	2.419341	2.560423	3.068821	1.053959	0.982986	0.251202
0.990000	1.666976	2.882704	2.400752	2.399341	2.540423	3.048821	1.033959	0.962986	0.231202

BIOGRAFIJA

Marina Jovanović (devojačko prezime Rajić) je rođena 15. septembra 1989. godine u Zrenjaninu. Osnovno i srednje obrazovanje završila je u rodnom gradu. Na Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, na smer Biologija upisala se 2008. godine, a diplomirala je 2013. godine. Iste godine upisuje master na modulu Biologija mikroorganizama, pod rukovodstvom dr Dragane Mitić Čulafić. Master tezu pod nazivom „Adhezivnost prirodnih izolata *Lactobacillus* sp. na kulture humanih ćelija” je odbranila u septembru 2014. godine. U periodu od 2015–2018. godine bila je angažovana po pozivu kao saradnik u nastavi na Katedri za mikrobiologiju. 2018. godine je učestvovala u pripremi radionice „Proizvodnja piva u kućnim uslovima” u okviru kursa Primenjene mikrobiologije i Centra za transfer znanja i inovacije Fakulteta. Od aprila 2019. godine do januara 2020. godine kao istraživač-pripravnik je bila angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: „Osmotska dehidracija hrane - energetski i ekološki aspekti održive proizvodnje” kojim je rukovodila dr Tatijana Kuljanin. Godine 2019. i 2020. dobila je FEMS-ove stipendije, za mlade naučnike, predviđene za učešće na konferencijama. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije, Federacije evropskog mikrobiološkog društva, Srpskog biološkog društva, Društva genetičara Srbije i Udruženja prehrambenih tehnologa Srbije. Autor je i koautor četiri rada u časopisima međunarodnog i domaćeg značaja i ima 14 saopštenja predstavljenih na naučnim skupovima. Trenuto je zaposlena kao istraživač saradnik na Institutu za opštu i fizičku hemiju čiji je direktor dr Stevan Blagojević.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Марина Јовановић _____

број индекса _____ Б3016/2014 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антимикробни и цитотоксични потенцијални етанолних екстракта представника подфамилије Polygonideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Марина Јовановић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марина Јовановић

Број индекса Б3016/2014

Студијски програм Биологија

Наслов рада Антимикробни и цитотоксични потенцијални етанолних екстракта представника подфамилије Polygonideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином

Ментор др Драгана Митић Ђулафић

Потписани/а Марина Јовановић

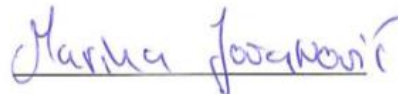
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Антимикробни и цитотоксични потенцијални етанолних екстракта представника подфамилије Polygonideae и њихов ефекат у комбинацији са стрептомицином и доксорубицином

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

Марина Јасковић